

Die H3K4me3 Histondemethylase LID reguliert die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin in *Drosophila melanogaster*

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt am

**Institut für Biologie/Genetik der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Herrn Heiko Baisch

geb. am 27.05.1974 in Querfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Reuter
2. Prof. Dr. Harald Saumweber
3. Prof. Dr. Klaus Humbeck

Halle (Saale), 30.06.2010

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ARID	AT-Rich-Interaction-Domain
AS	Aminosäuren
ASH1	Absent Small or Homeotic Discs 1
AOD	Aminoxidase-Domäne
BPTF	Bromodomain and PHDfinger-Transcription-Factor
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CBP	CREB-Binding-Protein
Chromo	Chromatin Organization Modifier
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CDT	Carboxy-Terminal-Domain
CoREST	REST-Corepressor
CtBP	C-terminal Binding Protein
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
ddNTP	2,3-Dideoxy-Nucleosid-5-Triphosphat
dGCN5	<i>Drosophila</i> General Control Nonderepressible Acetyltransferase5
dING2	<i>Drosophila</i> Inhibitor of Growth2
dLid	<i>Drosophila</i> Little Imaginal Disc
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nucleosid-5`-Triphosphat
dRpd3	Reduced-Potassium-Dependency 3
dSIR2	<i>Drosophila</i> Silent-Information-Regulator 2
E	Aminosäure Glutaminsäure
EGFP	Embryonales Green Fluorescent Protein
F	Aminosäure Phenylalanin
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FIH	Factor Inhibiting Hypoxia
H	Aminosäure Histidin
HATase	Histonacetyltransferasen
hChd1	<i>Human</i> Chromodomain Protein1
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HD	Huntington Disease (Huntington-Krankheit)
HDAC	Histondeacetylase
HDMase	Histondemethylase
HMTase	Histonmethyltransferase
HOAP	HP1/ ORC-Associated Protein
HP1	Heterochromatin Protein 1
HSM1	Homo Sapiens M1-Protein
HYPB	Huntingtin Interacting Protein B
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IR	Inverted Repeat
JARID	Jumonji C- und AT-Rich-Interaction-Domain
JHDM	JmjC-Domain Containing Histone demethylase
JHDM1	JmjC-Domain Containing Histone demethylase 1
Jhd2p	JmjC-Domain Containing Histone demethylase 2 Protein
K	Aminosäure Lysin

Abkürzungsverzeichnis

KMTase	Lysinmethyltransferase
LBR	Lamin B Receptor
Lid	Little Imaginal Disc
LSD1	Lysine Specific Demethylase 1
M31	HP1 β
Mbp	Millionen Basenpaare
me	Methyl
mING2	<i>Mus musculus</i> Inhibitor of Growth 2
NURD	Nucleosom-Remodelling and Deacetylase
NURF	Nucleosom-Remodelling Factor
ORC	Origin Recognition Complex
ORF	Open Reading Frame
PAA	Polyacrylamid
PAD4	Peptidylarginine Deiminase 4
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PcG	Polycomb-Gruppenproteine
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PCR1	Polycomb-Repressive Complex 1
PCR2	Polycomb-Repressive Complex 2
PEG	Polyethylene-Glycol
PHD	Plant Homeo Domain
PP1	Protein-Phosphatase 1
PREs	Polycomb Regulatory Elements
PRE	PcG-Response Element
RB	Retinoblastoma Binding Protein
RBR-2	RB-Related
REST	Repressor-Element 1 Silencing Transcriptionfactor
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	round per minute
Rsc8	Remodel the Structure of Chromatin 8
SANT	SWI-SNF, ADA, N-CoR und TFIIB
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SET	SU(VAR)3-9, E(Z), TRITHORAX-Domäne
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
Swi6	Switching deficient 6p
SWIRM	Swi3p, Rsc8p und Moira
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
TF	Transkriptionsfaktor
TFL2	Terminal Flower 2
TRE	TrxG-Response-Elemente
TrxG	Tritorax-Gruppenproteine
U	Unit

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	15
2.1 Genetische Methoden	15
2.1.1 Anzucht der Fliegen	15
2.1.2 Verwendete Stämme und Stabilisationschromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i> ..	15
2.1.3 Herstellung transgener <i>Drosophila melanogaster</i> -Linien	16
2.1.4 Kartierung von <i>lid</i>	17
2.1.5 Untersuchung der genetischen Interaktion von <i>lid</i> mit verschiedenen PEV Suppressormutationen.....	18
2.1.6 Untersuchung des Effekts von <i>lid</i> auf heterochromatisches Gensilencing.....	18
2.1.7 Generierung von homozygoten Mutanten- und Doppelmutantentieren	19
2.1.8 <i>In vivo</i> -Lokalisation von LID	20
2.1.9 Remobilisierung der P-Elemente $P\{PZ\}lid^{10424}$ und $P\{lacW\}lid^{k06801}$	20
2.1.10 GAL4-UAS-kontrollierte Transgenexpression	20
2.2 Molekulare Methoden	21
2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden	21
2.2.2 Isolation von DNA.....	22
2.2.3 Isolation von RNA.....	22
2.2.4 PCR-Methoden.....	23
2.2.5 Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	25
2.2.6 Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	26
2.2.7 Agarosegelelektrophorese und Isolation von DNA-Fragmenten	28
2.2.8 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten.....	28
2.2.9 Herstellung kompetenter Zellen	30
2.2.10 Transformation der Vektoren und Kultivierung der Bakterien	31
2.3 Immunozytologische Methoden	32
2.3.1 Immunmarkierung von embryonalen <i>Drosophila</i> -Zelllinien	32
2.3.2 Immunmarkierung von Embryonen	34
2.3.3 Immunmarkierung von Polytäanchrosomen.....	35
2.3.4 Enzymatischer Assay für <i>lacZ</i> -Expression in Speicheldrüse	36
2.3.5 <i>In vivo</i> -Detektion von EGFP	36
2.4 Proteinbiochemische Methoden	37
2.4.1 Gelelektrophorese von Proteinen.....	37
2.4.2 Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	37
2.4.3 Westernblot-Analyse	37
2.4.4 Herstellung von Kernextrakten aus <i>Drosophila melanogaster</i> für Westernblot-Analysen	38
2.4.5 Herstellung von Kernextrakten aus <i>Drosophila melanogaster</i> für massenspektrometrische Analysen	39
2.4.6 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen	39
2.4.7 Herstellung und Reinigung von polyklonalen α -LID- und α -dING2-spezifischen Antikörpern	40
2.4.8 Co-Immunopräzipitation	41

3 Ergebnisse	42
3.1 Die H3K4me3 Demethylase LID beeinflusst heterochromatisches Gensilencing ...	42
3.2 <i>Su(var)2-5</i> , <i>Su(var)3-1</i> , <i>Su(var)3-3</i> , <i>Su(var)3-7</i> und <i>Su(var)3-9</i> sind epistatisch gegenüber dem <i>E(var)</i> -Effekt von <i>lid</i>	44
3.3 Regulierte Überexpression von <i>lid</i> kompensiert partiell den Triplo-Enhancereffekt von <i>Su(var)2-5</i> , <i>Su(var)3-3</i> , <i>Su(var)3-7</i> und <i>Su(var)3-9</i>	45
3.4 Der Haplo-Suppressoreffekt von <i>Rpd3</i> ist epistatisch über <i>lid</i>	46
3.5 Klonierung von <i>lid</i> und Generierung von <i>lid</i> -Nullallelen	46
3.6 Molekulare Analysen von <i>lid</i> -Nullallelen	49
3.7 Expression von <i>lid</i> während der <i>Drosophila</i> -Entwicklung	50
3.8 Generierung eines spezifischen LID- und dING2-Antikörpers	51
3.8.1 Generierung eines polyklonalen LID-spezifischen Antikörpers	51
3.8.2 Generierung eines polyklonalen dING2-spezifischen Antikörpers	55
3.9 LID ist ein Interbandenprotein und zygotisch exprimiert	56
3.10 <i>In vivo</i> -Demethylaseaktivität von DmLID in Zellkulturen	59
3.11 <i>In vivo</i> -Kontrolle von H3K4me3 durch LID	61
3.12 Einfluss von LID auf Histonmodifikationen in frühen Embryonalstadien von <i>Drosophila melanogaster</i>	63
3.13 Einfluss von LID auf Histonmodifikationen in polytären Speicheldrüsenchromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	67
3.14 Funktionelle Interaktion der Demethylasen SU(VAR)3-3 und LID	72
4 Diskussion	76
4.1 LID ist Bestandteil euchromatischer Proteinkomplexe und <i>Su(var)s</i> sind epistatisch gegenüber dem <i>E(var)</i> -Effekt von <i>lid</i>	76
4.2 Einfluss von H3K4me3 auf Chromatin	78
4.3 LID kontrolliert euchromatische Chromatinzustände	79
4.4 Bedeutung von LID, SU(VAR)3-3 und RPD3 während der Chromatindifferenzierung	83
4.5 LID sichert transkriptionelle „Quiescence“ in der Keimbahn von <i>Drosophila</i> ab....	84
4.6 H3K4me3-spezifische Demethylase LID bindet an Interbanden polytärer Speicheldrüsenchromosomen	85
4.7 Funktionelle Interaktion von LID und SU(VAR)3-3 in <i>Drosophila melanogaster</i>	87

5 Zusammenfassung	92
6 Literaturverzeichnis	94
7 Anhang	117
7.1 Primerliste.....	117
7.2 Antikörperliste	119
7.3 Kreuzungsschema zur Herstellung von w ⁺ Deletionen und w ⁺ Duplikationen aus P- Elementen	120
7.4 Kreuzungsschema zur Herstellung von w ⁻ Deletionen und w ⁻ Duplikationen aus P- Elementen	120
7.5 Kreuzungsschema zur Herstellung von neuen Mutantenallelen durch P- Elementremobilisierung.....	121
7.6 Kreuzungsschema zur Herstellung transgener <i>lid</i> - und <i>ding2</i> -Linien	121
7.7 Transgene <i>lid</i> - und <i>ding2</i> - Fliegenstämme	122
7.8 Evolutionäre Konservierung	124
7.9 Publikationsliste.....	126

1 Einleitung

Die genetische Information einer Zelle ist in Form genomischer DNA gespeichert und in der Abfolge der 4 Nukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin verankert. Komplette Genome-Sequenzierprojekte ergaben, dass das Genom des Menschen aus mindestens 3300Mbp und der Taufliege *Drosophila* aus rund 200Mbp bestehen. Somit entsprechen diese einer Länge von 2m bzw. 0,5m und beinhalten ungefähr 25.000 bzw. 14000 Gene (The FlyBase Consortium, 1999; Drysdale, 2003). Heute weiß man, dass die Komplexität eines Organismus nicht nur durch die gespeicherten Informationen sondern auch durch die Kontrolle der räumlich und zeitlich präzisen Ausprägung seiner Gene bestimmt wird. Alle Zellen eines eukaryotischen Organismus sind weitestgehend genetisch identisch, unterscheiden sich aber zum Teil sehr stark in Form und Funktion. Dieser Unterschied ist in dem spezifischen Expressionsmuster der Gene begründet, die während der Zelldifferenzierung etabliert und durch epigenetische Prozesse aufrechterhalten werden. Die genetischen Expressionsmuster sind für jeden Zelltyp eines eukaryotischen Organismus charakteristisch, definieren deren Spezifität und werden innerhalb eines Zelltyps vererbt. Diese Art der Zellidentität wird als „cellular memory“ bezeichnet (Turner et al., 2002) und ist in der Chromatinstruktur verankert. Äußere Einflüsse, wie Nahrung, Stress oder andere Umweltfaktoren können dieses zelluläre Gedächtnis beeinträchtigen und eine veränderte epigenetische Prägung festlegen, doch während der DNA-Replikation, Chromatinassemblierung oder Zellteilung bleibt diese bestehen. Der Zweig der Epigenetik wurde 1942 von Conrad Waddington (1905-1975) erstmals definiert und beschäftigt sich mit der Analyse des Chromatins.

Das Chromatin, ein Komplex aus DNA, Histon-, Nicht-Histonproteinen und RNA, spielt eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der spezifischen Expression der Gene. Die kleinste sich wiederholende Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Es besteht aus einem Histon-Oktamer-Komplex, der aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist, um welches 147bp DNA gewunden sind (Luger et al., 1997; Luger et al., 2003). Über mehrere Verpackungsstufen bilden diese Histonkomplexe schließlich die höchste Form der DNA-Kondensation das Metaphasenchromosom (Kornberg, 1974; Nemeth und Längst, 2003; Felsenfeld und Groudine, 2003). Dabei

spielt der Grad der Verpackung des Chromatins eine wesentliche Rolle bei der Genexpression.

Bezüglich des Grades der Kompaktierung lassen sich generell zwei Zustände des Chromatins beschreiben, das Euchromatin und das Heterochromatin. Offene und lockere Strukturen werden als Euchromatin und stark kondensierte als Heterochromatin bezeichnet. Diese zwei zytologisch sichtbaren Verpackungsstufen des Chromatins wurden im Interphasenkern erstmals von Heitz (1928) dokumentiert. Euchromatische Chromatindomänen sind transkriptionell aktiv und enthalten die Mehrheit der Gene. Heterochromatin wird in seiner Kompaktheit erst spät in der Interphase repliziert (Lima di Faria und Jaworska, 1968), enthält nur wenige essentielle Gene (Gatti und Pimpinelli, 1992) und lässt sich in konstitutives und fakultatives Heterochromatin differenzieren (Brown, 1966). Konstitutives Heterochromatin besteht hauptsächlich aus hoch- und mittelrepetitiven Sequenzen (Lohe et al., 1993; Pimpinelli et al., 1995) und ist vorwiegend auf perizentrische Bereiche bzw. Telomerregionen konzentriert (Blackburn, 1994; Pardue, 1994). Unter Verwendung von Mikrokokken-Nuklease konnte im konstitutiven Heterochromatin eine regelmäßige Nukleosomenanordnung als im Euchromatin festgestellt werden (Wallrath und Elgin, 1995; Sun et al., 2001). Heterochromatin kann entgegen früherer Annahmen (Pardue ML und Hennig W, 1990) zur dauerhaften Stilllegung einzelner Gene oder ganzer Chromosomen etabliert werden (Boumil und Lee, 2001; Craig, 2005; Huisinga et al., 2006) und in wesentliche Kernfunktionen involviert sein. Dabei können zum Beispiel Chromosomensegregation und Crossing-over-Vorgänge während der Meiose und Mitose (Wines und Henikoff, 1992; Hawley et al., 1992; Westphal und Reuter, 2002), Kernorganisation (Cremer et al., 2004), Reprimierung mobiler Elemente (Henikoff und Matzke, 1997; Birchler et al., 2000) sowie Gensilencing (Wallrath, 1998; Wakimoto, 1998; Girton und Johansen, 2008) betroffen sein. Das X-Chromosom von weiblichen Säugern (*Eutheria*) ist das bekannteste Beispiel. Dessen Heterochromatisierung erfolgt rein zufällig und wird als Barr-Körperchen sichtbar (Barr und Bertram, 1949; Lyon, 1961; Boumil und Lee, 2001; Erwin und Lee, 2008). Ein anderes Phänomen wurde bei Schildläusen (*Coccoidea*) beschrieben. Hier wird in den meisten somatischen Zellen der ganze männliche Chromosomensatz heterochromatisiert (Brown und Nur, 1964; Nur, 1990). Durch die zeitliche als auch lokale Heterochromatisierung der Gene wird deutlich,

welche große Bedeutung die epigenetischen Prozesse in der Genregulation haben (Craig, 2005).

Die Daten der letzten Jahre zeigen, dass die Nukleosomen, neben der Verpackung der DNA, eine weitere bedeutende und hoch konservierte Funktion in der Regulation der Gen-Expression ausüben. Da die Histone basische, positiv geladene Proteine sind, können sie mit der negativ geladenen DNA elektrostatisch wechselwirken. Die N-terminalen Enden der Histone (Luger et al., 1997) ragen aus der Oberfläche der Nukleosomen heraus und definieren dessen zweite bedeutende Funktion. Diese N-terminalen Schwänze („*Tails*“) sind vielfältigen posttranslationalen Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitinierung unterworfen (Okazaki und Moss, 1999; Strahl und Allis, 2000; Ito, 2007). Solche Modifizierungen sind hoch dynamisch, kennzeichnen den Grad der Chromatinverpackung und regulieren die Genexpression. Die Kombination der möglichen Histonmodifikationen stellt einen Code dar, der den Chromatinstatus definiert (Jenuwein und Allis, 2001; Richards und Elgin, 2002; Kouzarides, 2007). Dieser Histon-Code, von spezifischen Histon-modifizierenden Enzymen kontrolliert, generiert im Nukleosom neue Bindungsstellen, die von Nicht-Histonproteinen erkannt werden und zelluläre Prozesse nachschalten. Dieses ausgefeilte System zur Nutzung genetischer Informationen wird auf molekularer Ebene bei der Etablierung, Aufrechterhaltung und Vererbung des Chromatinstatus durch unterschiedlichste Proteine, wie Histon-modifizierende Enzyme, Transkriptions- oder Chromatin-Remodellingfaktoren (NuRD-Komplex, Nucleosome Remodeling and Deacetylase, Zegerman et al., 2002; Bannister und Kouzarides, 2005) oder HP1 (Heterochromatin Protein 1, van Holde, 1988; Turner, 2000; Ito, 2007) definiert. Zu den Nicht-Histonproteinen gehören Methyltransferasen (ASH1, Beisel et al., 2002), Demethylasen (LID, SU(VAR)3-3, Rudolph et al., 2007; Secombe et al., 2007), Acetylasen (GCN5, Carre et al., 2005), Deacetylasen (dRPD3, Lee et al., 2009) oder Histonkinasen (SU(AR)3-1, Ebert et al., 2004; Griswold et al., 2008). Damit kommt Faktoren, die den Aufbau heterochromatischer Strukturen kontrollieren, eine große Bedeutung für das Verständnis des Ablaufs epigenetischer Prozesse zu.

Um neue interessante Einblicke in die epigenetischen Prozesse zu gewinnen, steht bei *Drosophila melanogaster* mit dem Phänomen der Positioneffekt-Variegation (PEV) ein experimentelles Modellsystem zur Verfügung, welches erstmals von Muller (1930) beschrieben wurde. Dabei werden euchromatisch aktive Gene, durch

chromosomale Rearrangements in unmittelbare Nachbarschaft zu heterochromatischen Bereichen gebracht und unterliegen danach einer Heterochromatisierung (Spofford, 1976; Weiler und Wakimoto, 1995). Diese Inaktivierung euchromatischer Gene ist phänotypisch sichtbar. Wird beispielsweise das *white*-Gen, welches für die rote Augenpigmentierung verantwortlich ist, infolge einer Inversion des X-Chromosoms in die Nähe des perizentrischen Heterochromatins gebracht (*In(1)w^{m4h}*), wird durch die unkontrollierte Ausbreitung des benachbarten Heterochromatins eine Inaktivierung des *white*-Gens in einigen Zellen hervorgerufen. Diese variable Inaktivierung ist an einer rot-weißen mosaikartigen Augenpigmentierung (*white*-mottled-Phänotyp) erkennbar (Muller, 1930; Schultz, 1936; Reuter et al., 1984; Tartof et al., 1984). Die Ausbreitung des Heterochromatins auf normalerweise euchromatische Bereiche kann in einigen PEV-Rearrangements überdies zytologisch nachgewiesen werden (Reuter et al., 1982). Mit dem System der Positioneffekt-Variation können auf einfachem Weg epigenetische Kontrollfaktoren identifiziert werden. In verschiedenen genetischen Screens ließen sich zahlreiche Gene (etwa 120) isolieren, die in eukaryotischen Organismen für Modifikatoren epigenetischer Prozesse kodieren (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1983; Wustmann et al., 1989; Reuter und Spierer, 1992; Dorn et al., 1993a).

Es lassen sich zwei wesentliche Gruppen von Modifikatoren unterscheiden, die PEV supprimierenden *Su(var)s* (suppressors of variegation) und die PEV verstärkenden *E(var)s* (enhancers of variegation, Wustmann et al., 1989; Reuter und Spierer, 1992). Suppressoren für PEV stellen Gene dar, deren Genprodukte direkt oder indirekt an der Etablierung oder Aufrechterhaltung von heterochromatischen Chromatinstrukturen beteiligt sind (Locke et al., 1988). Im *white*-mottled-System führen Mutationen in Suppressorgen zur Abschwächung der Fähigkeit des Heterochromatins das Markergen zu inaktivieren, was in der Rotfärbung der Augen sichtbar wird. Im Gegensatz dazu werden Gene als *E(var)s* bezeichnet, deren funktionellen Produkte die Etablierung offener euchromatischer Chromatinstrukturen begünstigen und somit dem Silencingpotential des Heterochromatins entgegenwirken. Im *white*-mottled-System verstärken Mutationen in Enhancergenen die Inaktivierung des *white*-Gens und somit die Ausdehnung des Heterochromatins, was phänotypisch in einer weißen Augenfarbe sichtbar wird. (Locke et al., 1988; Reuter und Spierer, 1992; Weiler und Wakimoto, 1995). Dabei weisen einige

Modifikatoren eine Besonderheit auf und sind deshalb von speziellem Interesse. Diese zeigen bei erhöhter Gendosis einen umgekehrten PEV-Effekt (Triplo-Enhancer- bzw. Triplo-Suppressoreffekt; Wustmann et al., 1989). Vermutlich sind deren Genprodukte im Aufbau multimerer Proteinkomplexe involviert und somit direkt am Aufbau höhergeordneter Chromatinstrukturen beteiligt (Locke et al., 1988). In Reuter und Spierer (1992) wird abgeschätzt, dass vermutlich nur 10% der identifizierten Modifikatoren einen Triplo-abhängigen Dosis-effekt auf PEV besitzen (Reuter und Spierer, 1992).

Ein Großteil der nachgewiesenen *E(var)s* kodiert für Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren oder Chromatin Remodeling Faktoren, wie *mod(mdg4)* (Dorn et al., 1993a; Büchner et al., 2000), *brahma* (Büchner et al., 2000) oder *trithorax-like* (Farkas et al., 1994; Weiler und Wakimoto, 1995). Transkriptionsaktivator *e2f* (Seum et al., 1996) gehört zu der Gruppe, die neben einem Haplo-Enhancereffekt bei erhöhten Gendosen einen Triplo-Suppressoreffekt manifestieren.

Molekular charakterisierte *Su(var)s* kodieren für Chromatin-assoziierte Proteine, die über verschiedene hoch konservierte Proteindomänen verfügen und vielfältige Funktionen ausüben. Einige kodieren für Proteine, die in Chromatin-Remodeling- und -Assemblierungsprozesse involviert sind und PEV supprimieren. Zu diesen Faktoren gehören zum Beispiel MODULO, ein RNA/rDNA-bindendes Protein (Perrin et al., 1998) oder PCNA (proliferating cell nuclear antigen), welches in DNA-Replikation involviert ist (Henderson et al., 1994). Die beiden Proteine HOAP (HP1/ ORC-associated protein) und HP1 (Heterochromatin-Protein1) interagieren miteinander und supprimieren ebenso PEV (Wustmann et al., 1989; Badugu et al., 2003). Dabei gehört HP1 zu den Chromatin-assoziierten Proteinen, die bei erhöhter Gendosis zusätzlich einen Triplo-Enhancereffekt ausprägen (Eissenberg et al., 1990). Zu der Gruppe der Haplo-Suppressoren gehören weiterhin die Histon-Deacetylasen HDAC1 (Mottus et al., 2000) und dSIR2 (Newman et al., 2002) oder die Protein-Phosphatase PP1, die von *Su(var)3-6* kodiert wird (Reuter et al., 1986; Baksa et al., 1993). Von besonderer Bedeutung bei der Heterochromatinetablierung, wegen ihres Haplo-Suppressor-/ Triplo-Enhancereffekts, sind neben HP1 (Wustmann et al., 1989) auch SU(VAR)3-7 (Reuter et al., 1990) und SU(VAR)3-9 (Tschiersch et al., 1994; Schotta et al., 2002; Schotta et al., 2003). Die Dosis-abhängigen Effekte auf Heterochromatin-induziertes Gensilencing implizieren, dass selbst geringe

Unterschiede in deren Konzentration das Ausmaß der Ausbreitung des Heterochromatins beeinflussen können.

Eines der ersten klonierten Suppressorgene für PEV war *Su(var)3-7* (Reuter et al., 1990). *Su(var)3-7*-Mutanten sowie eine den *Su(var)3-7*-Locus einschließende Defizienz zeigen einen signifikanten Suppressoreffekt. Im Gegensatz dazu wird durch Erhöhung der genomischen Kopien ein Heterochromatin-induziertes Gensilencing verstärkt (Reuter et al., 1990; Cleard et al., 1997). Charakteristisch für *SU(VAR)3-7* sind dessen 7 Zinkfinger-Motive (Cleard und Spierer, 2001) über die das Protein mit mittel-repetitiven-Elementen und Satelliten-Sequenzen interagiert (Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000; Delattre et al., 2004). Co-Immunopräzipitationen, Hefe-Dihybridanalysen und immunozytologische Färbungen zeigten, dass *SU(VAR)3-7* mit dem N-terminus von *SU(VAR)3-9* (Schotta et al., 2003) und der Chromo-Shadow-Domäne von *SU(VAR)2-5* (Eissenberg et al., 1990; Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000) interagiert. Der C-terminus von *SU(VAR)3-7* besitzt vermutlich mit dem BESS-Motiv große Bedeutung bei Dimerisationsvorgängen und ist verantwortlich für eine spezifische Erkennung und Bindung des Proteins an das perizentrische Heterochromatin (Jaquet et al., 2002).

Das *Su(var)2-5*-Gen kodiert für HP1 (Heterochromatin Protein 1), ein 206 Aminosäuren (AS) großes Protein, welches mit der N-terminal gelegenen Chromo-Domäne (chromatin-organization-modifier-domain, Paro und Hogness, 1991; Jacobs et al., 2001) spezifisch H3K9 Di- und Trimethyl erkennt und bindet (Lachner et al., 2001). Die Chromo-Domäne ist über eine flexible Hinge-Region (Singh et al., 1991; Eissenberg und Elgin, 2000) mit der C-terminal gelegenen Chromo-Shadow-Domäne (Aasland und Stewart, 1995) verbunden. Die Chromo-Shadow-Domäne verfügt mit der Pentapeptidsequenz (PxVxL) über ein Motiv, mit dem sie mit verschiedenen Kernproteinen dimerisieren und Hetero- bzw. Homodimere ausbilden kann (Ball et al., 1997; Thiru et al., 2004; Lechner et al., 2005). In *Drosophila melanogaster* wurde HP1 mit Hilfe spezifischer Antikörper als erstes Heterochromatin-assoziiertes Protein identifiziert (James und Elgin, 1986; Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). HP1 bindet vorwiegend am perizentromeren Heterochromatin, dem vierten Chromosom, am Telomer aber auch an einigen euchromatischen Stellen (James et al., 1989; Fanti et al., 1998). Es ist evolutionär hoch konserviert und homologe Proteine konnten in Hefe (*Swi6p*, Ayoub et al., 1999), in Pflanzen (*TFL2*, Kotake et

al., 2003; Nakahigashi et al., 2005) und ebenso in der Maus (M31) und im Menschen (M1) nachgewiesen werden (Wreggett et al., 1994; Singh et al., 2001).

Einer der stärksten bisher identifizierten Suppressoren für PEV ist *Su(var)3-9*. Damit kommt der H3K9 Methyltransferase (HMTase) eine große Bedeutung im Prozess des heterochromatischen Gensilencings zu (Tschiersch et al., 1994). *Su(var)3-9*-Mutanten sind homozygot lebensfähig, zeigen aber eine reduzierte Fertilität. SU(VAR)3-9 enthält wie HP1 eine Chromo-Domäne, deren Funktion jedoch noch unbekannt ist. Weiterhin besitzt SU(VAR)3-9 im C-terminalen Bereich eine SET-Domäne (SU(VAR)3-9, E(Z), TRITHORAX-Domäne). Diese ist von einer cysteinreichen preSET- und postSET-Domäne eingeschlossen und besitzt H3K9 Di- und Trimethyltransferaseaktivität (Tschiersch et al., 1994; Jenuwein et al., 1998; Schotta et al., 2002). Diese Transferaseaktivität wird durch H3K9 Acetylierung oder H3S10 Phosphorylierung gehemmt (Wang et al., 2001; Ebert et al., 2004). Über den N-Terminus interagiert SU(VAR)3-9 mit HP1 und SU(VAR)3-7 (Fischer, 1997). Homologe Proteine sind in *Schizosaccharomyces pombe* mit CLR4p (Ivanova et al., 1998) und im Menschen mit den Proteinen SUV39H1 (Aagaard et al., 1999) und SUV39H2 (O'Carroll et al., 2000) identifiziert. Das humane SUV39H1 ist in der Lage, die Funktion von SU(VAR)3-9 in *Drosophila* zu übernehmen und dessen Mutantenphänotyp zu retten (Schotta et al., 2002). Durch diese Arbeiten konnte neben der strukturellen auch eine funktionelle Konservierung von SU(VAR)3-9 nachgewiesen werden. Ebenso wurde für die Homologen aus Hefe und Mensch gezeigt, dass sie in die epigenetische Kontrolle des heterochromatischen Gensilencings involviert sind (Allshire et al., 1995; Peters et al., 2002; Schotta et al., 2002). Für das murine SUV39H-Protein wurde gezeigt, dass es für die H3K9-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin verantwortlich ist (Peters et al., 2001). In *Suv39h*-defizienten Mäusen kommt es zu chromosomalen Instabilitäten, die zu einem erhöhten Tumorrisiko, aber auch zu verringerten DNA-Methylierungen der perizentrischen Haupt-Satellitensequenzen führen (Peters et al., 2001; Lehnertz et al., 2003).

Mit der Identifizierung von SUV39H1 als Methyltransferase eröffneten sich neue Analysemöglichkeiten, die einen Meilenstein in der Chromatinforschung darstellten. Die spezifische Methylierung von H3K9 durch SU(VAR)3-9 generiert Bindungsstellen für Heterochromatin-assoziierte Proteine wie HP1. Dieser Zusammenhang erweiterte grundlegend das Verständnis vom Aufbau des Chromatins (Rea et al., 2000;

Rudolph et al., 2007; Nishioka et al., 2009). Laut Datenbankanalysen sind in der Maus, *Schizosaccharomyces pombe* und *Drosophila melanogaster* zusammen über 80 SET-Domänenproteine (Schultz et al., 1998) bekannt, wobei in *Drosophila* über 20 Proteine eine SET-Domäne besitzen.

Die Vielzahl der bisher bekannten SET-Domänen-Proteine spiegelt die hohe Anzahl der möglichen Methylierungsreaktionen von Histonen und wahrscheinlich auch anderer Chromatinproteine wieder. Einige Methyltransferasen sind in der Lage drei verschiedene Lysin-Positionen und zwei verschiedene Arginin-Positionen zu methylieren. Bei 17 verschiedenen Lysinen (zum Beispiel am Histon H3 das Lysin K4, K9, K27, K36 und K79 und am Histon H4 das Lysin K20) und 7 verschiedenen Argininen ergibt sich so eine hohe Zahl möglicher Kombinationen (Kouzarides, 2002). Die Vielzahl an Kombinationen lassen sich in zwei Gruppen differenzieren. Neben den repressiven, wie der H3K9 Methylierung, gibt es aktive Modifizierungen, wie die H3K4 Methylierung, die spezifisch kondensierte bzw. offenere Strukturen des Chromatins bilden können (Rea et al., 2000; Rudolph et al., 2007; Nishioka et al., 2009). Das Zusammenspiel der einzelnen Histonmodifikationen regelt den Zustand des Chromatins (Schultz et al., 1998; Kouzarides, 2002).

Bei der Etablierung und Aufrechterhaltung heterochromatischer Chromatinzustände ist die H3K9 Methylierung von entscheidender Rolle. In *Drosophila* ist SU(VAR)3-9 die Haupt-, aber nicht die einzige Heterochromatin-spezifische H3K9 Methyltransferase, da im 4. Chromosom von *Su(var)3-9* Null-Mutantenembryonen noch signifikante Methylierung nachweisbar ist (Schotta et al., 2002; Serum et al., 2007). Neben SU(VAR)3-9 können in *Drosophila* auch SETDB1 (Serum et al., 2007), in der Maus ESET (Yang et al., 2002), im Menschen G9A (Tachibana et al., 2001) und EUHMTASE1 (Ogawa et al., 2002) H3K9 Methylierungen katalysieren.

Zusätzlich zu H3K9 existieren in der Fruchtfliege mit H3K27 und H4K20 noch weitere Methylierungsstufen, die prominente Modifikationen in perizentrischem Heterochromatin polytärer Speicheldrüsenchromosomen und wesentliche epigenetische Markierungen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung inaktiver Chromatinzustände sind (Schotta et al., 2004; Ebert et al., 2006). Die Methyltransferasen für H3K27 in *Drosophila* sind E(Z) und PR-SET7 (Czermin et al., 2002; Nishioka et al., 2002), H4K20 wird dagegen durch dSET8 methyliert (Fang et al., 2002).

Nicht nur für die Heterochromatisierung der Chromozentren ist H3K9 und H3K27 Methylierung wichtig, sondern auch für die Erhaltung totipotenter Stammzellen in der Keimbahn. Folglich sind diese repressiven Modifizierungen in den Polzellen von *Drosophila* angereichert und reprimieren die Primordialzellen der Keimbahn (Leatherman et al., 2002; Rudolph et al., 2007). Die durch das Chromatin vermittelte Repression, auch transkriptionale „Quiescence“ genannt, verhindert die Aktivierung somatischer Differenzierungswege in den Keimzellen (Seydoux et al., 1996; Wylie, 1999; Pirrotta et al., 2002). Initiiert wird die transkriptionelle Inaktivität der Primordialzellen durch Gene wie *nanos*, *germ cell-less* und *pumilio*. Folglich treten keine aktivierenden H3K4 Methylierungen in Polzellen des Wildtyps auf. Bei Mutationen dieser Gene kommt es zur vorzeitigen Aktivierung der Transkription (Asaoka-Taguchi et al., 1999; Deshpande et al., 1999; Leatherman et al., 2002; Rudolph et al., 2007) und in den Polzellen von *nanos* Mutationen kann H3K4 Methylierung nachgewiesen werden. Diese euchromatischen Methylierungen gehen schließlich mit einer Reduktion der H3K9 Methylierung und einem Verlust der transkriptionellen Repression einher (Schaner et al., 2003).

Im Gegensatz dazu sind die aktivierenden H3K4 und H3K36 Methylierungen oder auch die H3S10 Phosphorylierung prominent in den Interbanden des Euchromatins vorhanden. Diese werden in *Drosophila* durch die Methyltransferasen ASH1 (absent, small, or homeotic discs 1) für H3K4 (Beisel et al., 2002; Byrd und Shearn, 2003), dHYPB für H3K36 (Sun et al., 2005; Bell et al., 2007) und der Phosphotransferase JIL1 für H3S10 (Ebert et al., 2004; Johansen und Johansen, 2006) etabliert. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt die Etablierung der aktivierenden Modifizierungen durch die HMTasen SET1p für H3K4- und SET2p für H3K36 Methylierung (Roguev et al., 2001; Roguev et al., 2003).

SET1 ist in *Saccharomyces cerevisiae* (Sc_SET1) im Komplex COMPASS als die einzige H3K4 HMTase identifiziert worden, da in *set1*-Mutanten die gesamte H3K4 Methylierung ausfällt (Briggs et al., 2001; Krogan et al., 2002). Phosphoryliert die Kinase, KIN28, die RNA-Polymerase II am Serin 5 des CDT (carboxy-terminal domain), so wird Sc_SET1 über den PAF1-RNA-Polymerase II-Komplex an den Promotor transkriptionsaktiver Gene rekrutiert (Krogan et al., 2003a). H3K4 Methylierung durch Sc_SET1 setzt neben der Serin 5 Phosphorylierung auch die Ubiquitinierung des Lysins 123 des Histons H2B durch RAD6/BRE1 voraus (Robzyk et al., 2000; Bernstein et al., 2002; Dover et al., 2002; Krogan et al., 2003a; Wood et

al., 2003). Bemerkenswert ist der gegenseitige Ausschluss von H3K4 Methylierung und H2BK123 Ubiquitinierung am gleichen Nukleosom. Aus diesen Daten wurde geschlussfolgert, dass Paf1 sowohl die Bindung von Rad6/Bre1, als auch von Sc_Set1 an transkriptionsaktive Regionen kontrolliert und damit an der Etablierung einer offenen Chromatinstruktur beteiligt ist. Untermuert wird diese These durch den Befund, dass Paf1 auch für die Etablierung von H3K36 essentiell ist (Krogan et al., 2003b; Sun et al., 2005; Stabell et al., 2007).

Die Frage, wie sich die einzelnen H3K4 Modifizierungen in einer transkribierenden Region verteilen, konnte auch in der Hefe beantwortet werden. Eine Genom-weite ChIP-on-chip-Analyse zeigte, dass H3K4me3 sich vorrangig im Promotorbereich, H3K4me2 hauptsächlich im offenen Leserahmen (ORF – open reading frame) kodierender Regionen und H3K4me1 am 3' Ende kodierender Gene befindet (Bernstein et al., 2002; Pokholok et al., 2005).

Die verschiedenen H3K4 Methylierungsstufen werden durch Bindeproteine erkannt und gebunden. Ein solcher Proteinkomplex in *Drosophila* ist der NURF-Komplex (nucleosome remodeling factor complex). Dessen größte und essentiellste Untereinheit in *Drosophila* ist NURF301 bzw. im Menschen BPTF (bromodomain und PHD-finger transcription factor). Beide Untereinheiten enthalten eine PHD-Domäne (plant homeo domain), die spezifisch H3K4me3 erkennt und bindet (Wysocka et al., 2006; Sims III et al., 2007; Kwon et al., 2009; Lee W. et al., 2009). Die Rekrutierung des NURF-Komplexes ist für die Regulation der HOX-Gene während der Embryonalentwicklung essentiell (Wysocka et al., 2006; Berger et al., 2007). Weiterhin ermöglicht alternatives Spleißen die Expression unterschiedlicher NURF-Komplex-Isoformen. Diese Diversität führt zur Ausprägung verschiedener Chromatin „remodeling“ Komplexe und impliziert eine veränderte Histonbindung (Kwon et al., 2009).

Die Etablierung von H3K4me3 in *Drosophila* durch ASH1 oder TRX dient nicht nur der Etablierung euchromatischer Domänen und damit der Aktivierung der Transkription homöotischer Gene (Beisel et al., 2002; Poux et al., 2002), sondern auch dazu, dass die Ausbildung repressiver Histonmodifizierungen unterdrückt wird (Poux et al., 2002; Klymenko et al., 2004). Die Bindung des NuRD-Komplexes (Nucleosome remodeling and deacetylase complex) und somit die Bindung von Deacetylasen wird durch H3K4me3 verhindert. Dadurch wird H3K9 nicht methyliert, es erfolgt keine HP1-Bindung, heterochromatische Chromatinstrukturen werden nicht

etabliert und Transkription kann erfolgen (Nishioka et al., 2002; Zegerman et al., 2002).

Im Gegensatz dazu führt die ING1-Bindung (inhibitor of growth 1) an H3K4me3 im Menschen zum Aufbau heterochromatischer Chromatinstrukturen (Kuzminchev et al., 2002). Der ING1-Komplex rekrutiert die Histondeacetylase Sin3a an Promotorsequenzen von Proliferationsgenen. Bei DNA-Schäden kann so die Zellproliferation durch Etablierung von Heterochromatin und Reprimierung aktiver Gene unterbunden werden (Kuzminchev et al., 2002; Gozani et al., 2003; Doyon et al., 2006; Shi et al., 2006). Demzufolge aktiviert (Klymenko et al., 2004; Kwon et al., 2009) bzw. reprimiert H3K4 Trimethylierung die Genexpression (Shi et al., 2006), was die Etablierung und Aufrechterhaltung des Heterochromatins beeinflusst (Klymenko et al., 2004).

In Zellen höherer eukaryotischer Organismen besteht eine genau definierte Balance zwischen Eu- und Heterochromatin und deren zugrunde liegenden spezifischen Histonmodifizierungen. Um aktive Gene stillzulegen bzw. reprimierte Gene zu aktivieren, muss der epigenetische Code innerhalb des Chromatins geändert werden. Die transkriptionelle Kompetenz einer bestimmten Region wird beispielsweise durch Acetylierung festgelegt. Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) regulieren gegensätzlich diese Histonmodifizierung, regeln dadurch die transkriptionelle Aktivität eines Gens und entscheiden, ob Eu- oder Heterochromatin gebildet wird (Turner et al., 2000). Basierend auf der thermodynamischen Stabilität von Histonmethylierungen wurde lange Zeit vermutet, dass diese Modifizierungen stabil und somit irreversibel sind und nur durch Ausdünnen der repressiven Modifikation eine Veränderung erreichbar ist (Loyola et al., 2006; Loyola und Almouzni, 2007). Durch die Entdeckung der ersten Lysin-spezifischen Demethylase (LSD1) wurde jedoch gezeigt, dass Histonmethylierung reversibel ist (Shi et al., 2004; Tsukada et al., 2005; Lee et al., 2009). Lysinmethylierungen können durch zwei Klassen von Enzymen entfernt werden. Die Aminoxidasen katalysieren die Demethylierung von Mono- und Dimethyl-Gruppen durch Aminoxidation (Shi et al., 2004; Metzger et al., 2005; Rudolph et al., 2007), während JUMONJI-Proteine Di- und Trimethylierungen durch Hydroxylierung abspalten (Klose et al., 2006a; Tsukada et al., 2006; Yamane et al., 2006).

LSD1 (Lysine specific demethylase 1), das humane Homolog zu *Drosophila* SU(VAR)3-3, kann je nach gebundenem Co-Faktor die aktiven H3K4 Mono- und

Dimethyl- als auch H3K9 Dimethyl als repressive Markierung entfernen (Bannister und Kouzarides, 2005; Metzger et al., 2005; Schneider und Shilatifard, 2006; Rudolph et al., 2007). Das Protein besitzt eine N-terminal gelegene SWIRM- (Swi3p, Rsc8p und Moira) und eine C-terminale Aminoxidase-Domäne (AOD). Die SWIRM-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktion, wirkt auf Acetyltransferasen aktivierend und interagiert mit dem N-terminus von Histonen (Tochio et al., 2006). Die AOD-Domäne bindet den Co-Faktor FAD und katalysiert die Demethylierung von H3K4 und H3K9 (Shi et al., 2004; Forneris et al., 2005). Die Entfernung einer Trimethylierung ist aufgrund der chemischen Natur der Aminoxidationsreaktionen nicht möglich, da der Co-Faktor FAD immer ein protoniertes Stickstoffion benötigt (Shi et al., 2004; Klose et al., 2006a). Die Demethylase wurde in verschiedenen Repressor-Komplexen, wie dem CoREST- (Rest corepressor), dem CtBP- (C-terminal binding protein) oder dem HDAC-Komplex nachgewiesen (Ballas et al., 2001; Humphrey et al., 2001; Shi et al., 2003; You et al., 2001).

JUMONJI-Proteine wurden nach der Jmj-Domäne des *jmj*-Genes benannt (Takeuchi et al., 1995). Die Jmj-Domäne ist bisher in über 100 Proteinen vom Prokaryonten (YCFD in *Escherichia coli*) bis zum Eukaryonten (RBP2 im Menschen) nachgewiesen. Diese sind in 7 Gruppen eingeteilt und besitzen weitere typische Domänen von Transkriptionsfaktoren wie PHD-, ARID- oder Zink-Finger-Domänen (Clisshold und Ponting, 2001). Zusätzlich zur JmjC-Domäne (C-terminal, 123AS) existiert in einer Gruppe von Proteinen die JmjN-Domäne (N-terminal, 43AS). Die JmjN-Domäne ist in ihrer Sequenzstruktur zur JmjC-Domäne homolog und vermutlich für die Demethylierung verschiedener Methylierungszustände (Mono-, Di- bzw. Trimethylierung) verantwortlich (Secombe et al., 2007). Sind beide Domänen in einem Protein vorhanden werden bevorzugt di- und trimethylierte Lysine gespalten. Existiert die JmjC-Domäne nur alleine werden vorrangig mono- und dimethylierte Lysine demethyliert (Klose et al., 2006b; Whetstine et al., 2006).

Die JmjN-Domäne ist offensichtlich nicht durch „Domänenswap“ aus der JmjC-Domäne entstanden, da beide Domänen in verschiedenen molekularen Hintergründen agieren und somit funktionell unterschiedlich sind (Balciunas und Ronne, 2000; Clisshold und Ponting, 2001). Neue Untersuchungen bestätigten, dass dMYC nur die JmjC-Domäne bindet (Secombe et al., 2007). dMYC ist ein Oncoprotein und als Transkriptionsfaktor in vielen verschiedenen Katalysewegen aktiv, wobei es Zellwachstums- und Apoptosevorgänge induziert (Coller et al., 2000;

O'Connell et al., 2003; Patel et al., 2004; Oskarsson und Trumpp, 2005). Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen wurde nachgewiesen, dass die JmjN-Domäne eher einer Dimerisierungsdomäne ähnelt und Chen et al. postuliert, dass die JmjN-Domäne mit der JmjC-Domäne interagiert und damit deren katalytischen Kern stabilisiert (2006). Die für die Hydrolyse benötigten Co-Faktoren Eisen und α -Ketoglutarat werden außerdem nur von der JmjC-Domäne gebunden. Das weist darauf hin, dass beide Jmj-Domänen für die spezifische Demethylaseaktivität erforderlich sind (Klose et al., 2006b).

Die ARID-Domäne ist als AT-reiche Interaktionsdomäne für DNA-Bindung nachgewiesen (Kortschak et al., 2000; Takeuchi 2006), während die C_5HC_2 -Zinkfinger- und die PHD-Zinkfinger-Domänen für Protein-Protein-Interaktionsdomänen verantwortlich sind (Aasland 1995; Bienz et al., 2006). Neue Studien zeigten, dass der PHD-Finger des ING2-Proteins als auch die BPTF-Domäne des NURF-Komplexes eine „Lese-Funktion“ beim Erkennen von H3K4me2 und H3K4me3 besitzen (Li 2006; Mellor, 2006; Wysocka 2006; Champagne und Kutateladze, 2009; Lee et al., 2009a).

Mit JHDM1 (JmjC domain-containing histone demethylase 1), die spezifisch H3K36me2 demethyliert, wurde das erste JUMONJI-Protein mit Demethylasefunktion beschrieben (Tsukada et al., 2005). Bis heute sind viele JHDMs (JmjC-domain containing histone demethylases), wie die H3K4- (LID; JARID-Gruppe), die H3K9- (JHDM2A; JMJD2), die H3K27- (UTX; JMJD3) oder die H3K36-Demethylasen (JHDM1; JMJD2) beschrieben worden (Klose et al., 2006a; Klose et al., 2006b; Whetstine et al., 2006; Agger et al., 2007; Eissenberg et al., 2007; Lan et al., 2007; Lee et al., 2007; Secombe et al., 2007; Yamane et al., 2007).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst in *Drosophila melanogaster* ein *E(var)* in der Region 26B, der für ein Triplo-Suppressoreffekt verantwortlich ist, lokalisiert und umfassend genetisch charakterisiert. Die genetischen Analysen wurden mit Hilfe von P-Element-Insertionslinien, die zur Generierung von Deletions- und Duplikationsmutanten verwendet wurden, durchgeführt. Sie zeigten, dass der *E(var)26B* ein Haplo-Enhancer und Triplo-Suppressor im System der PEV und mit *lid* identisch ist. Funktionelle Analysen ergaben, dass die evolutionär konservierte Histondemethylase LID durch Demethylierung von H3K4me3 entscheidenden Einfluss am Aufbau und Etablierung des Euchromatins besitzt. Durch Generierung eines polyklonalen Antikörpers konnte das Protein spezifisch lokalisiert und ein

Einfluss auf das Bindeverhalten von dING2 (*Drosophila* ING2) und SU(VAR)3-3 nachgewiesen werden. Letztendlich deuten alle Ergebnisse auf eine essentielle Funktion von LID im heterochromatischen Gensilencing und beim Aufbau einer dynamischen Balance zwischen Eu- und Heterochromatin hin.

2 Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Anzucht der Fliegen

Anzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgte auf einem Standardmedium (1% Agar; 2,5% Sirup; 3,5% Rosinen; 3% Grieß; 5% Hefe). Zur Vermeidung von Schimmelpilz- bzw. Bakterienwachstum wurden 0,1% Nipagin sowie 100mM Ampicillin zugesetzt. Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18°C. Kreuzungen wurden im Allgemeinen bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt.

Für Eiablagen (Präparation von Proteinextrakten, zytologische Methoden) wurde ein spezielles Nährmedium, das sich aus 2% Agar, 10% Zucker, 0,1% Essigsäure und Aktivkohle zusammensetzt, verwendet. Zur Stimulation der Eiablage der Weibchen wurde Hefe auf die Platten gegeben.

2.1.2 Verwendete Stämme und Stabilisationschromosomen von *Drosophila melanogaster*

Die verwendeten Stämme und Stabilisierungschromosomen sind in Lindsley und Zimm (1992) bzw. FLYBASE (2010) beschrieben. Die am häufigsten benutzten Mutationen sind in der Tabelle 2.1 und die durch P-Element-Vektoren (Tab. 2.2) erhaltenen transgenen Linien sind im Anhang (siehe Tab. 7.3) aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Mutationen und Stabilisierungschromosomen

Balancer/ Mutation	Markierungsmutation	Mutantenphänotyp / Bemerkung
→ Stabilisierungschromosomen für 2. Chromosomenpaar		
<i>CyO</i>	<i>Curly</i>	gebogene Flügel
<i>CyRoi</i>	<i>Curly Rough eye</i>	gebogene Flügel und defekte Ommatidenanordnung
<i>Sco</i>	<i>Scutoid</i>	fehlende Scutellarborsten
→ Stabilisierungschromosomen für 3. Chromosomenpaar		
<i>TM2</i>	<i>Ubx, Ultrabithorax</i>	verdickte Halteren
<i>TM3</i>	<i>Ser, Serate</i>	eingeschnittene Flügelspitzen
	<i>Sb, Stubble</i>	verkürzte Scutellarborsten
<i>TM6</i>	<i>Tb, Tubby</i>	verkürzter und verdickter Körper

2 Material und Methoden

<i>TM3, Sb, P(Δ 2-3)</i> <i>ry^{RK}</i> <i>Su(var)2-1⁰¹</i>	Stabile Transposasequelle Deletion im <i>rosy</i> -Gen Mutation im <i>Su(var)2-1</i> -Gen	Remobilisierung von P-Elementen braune Augen Quantifizierung des Effektes von Enhancermutationen
<i>Su(var)2-5⁰⁵</i> <i>Df(2L)HB1Su(var)2-5⁻</i> <i>Dp(2L)HB1Su(var)2-5⁺</i> <i>P{Su(var)2-5^{HP183c}}</i> <i>Su(var)3-1⁰²</i> <i>Su(var)3-3¹¹</i> <i>Su(var)3-3¹²</i> <i>Df(3L)TR2Su(var)3-3⁻</i> <i>Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺</i> <i>Su(var)3-7⁰⁵</i> <i>Su(var)3-7⁰⁶</i> <i>P{Su(var)3-7^{T21A16}}</i> <i>Su(var)3-9⁰⁶</i> <i>Su(var)3-9¹⁷</i> <i>P{Su(var)3-9}</i> <i>HDAC13³²⁶</i> <i>In(1)^{wm4h}</i> <i>P{PZ}lid¹⁰⁴²⁴</i> <i>P{lacW}lid^{h06801}</i> <i>lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸</i> <i>Df(2L)HB4lid⁻</i> <i>Dp(2L)HB4lid⁺</i>	Mutation im <i>Su(var)2-5</i> -Gen Deletion des <i>Su(var)2-5</i> -Gens Duplikation des <i>Su(var)2-5</i> -Gens zusätzliche Kopie von <i>Su(var)2-5</i> Mutation im <i>Su(var)3-1</i> -Gen Mutation im <i>Su(var)3-3</i> -Gen Mutation(Stop) im <i>Su(var)3-3</i> -Gen Deletion des <i>Su(var)3-3</i> -Gens Duplikation des <i>Su(var)3-3</i> -Gens Mutation im <i>Su(var)3-7</i> -Gen Mutation im <i>Su(var)3-7</i> -Gen zusätzliche Kopie von <i>Su(var)3-7</i> Mutation im <i>Su(var)3-9</i> -Gen Mutation im <i>Su(var)3-9</i> -Gen zusätzliche Kopie von <i>Su(var)3-9</i> Mutation im <i>Rpd3</i> -Gen Inversion des <i>white</i> -Gens P-Element Insertion P-Element Insertion P-Elementausbau Deletion des <i>lid</i> -Gens Duplikation des <i>lid</i> -Gens	Nullallel, PEV-Test genomische Deletion, PEV-Test genomische Duplikation, PEV-Test P-Elementinsertion, PEV-Test <i>Jil1</i> -Mutation, PEV-Test Funktionsmutante in AOD-Domäne Abbruchmutante, PEV-Test genomische Deletion genomische Duplikation, PEV-Test Mutante, PEV-Test Mutante, PEV-Test P-Elementinsertion, PEV-Test Nullallel, PEV-Test, Nullallel, PEV-Test P-Elementinsertion, PEV-Test Mutante, PEV-Test PEV-System, rot-weiße Augen P-Elementinsertion P-Elementinsertion Revertante genom. <i>lid</i> -Defizienz. genom. <i>lid</i> -Duplikation

Tabelle 2.2: Verwendete Konstrukte zur Herstellung transgener Linien

P-Element-Vektor	Bezeichnung
<i>P{GS.v+hs(cDNA-lid)EGFP3'}</i>	<i>P{c,hs,lid}</i>
<i>P{GS.v+hs(cDNA-lid^{H637A})EGFP3'}</i>	<i>P{c,hs,lid^{H637A}}</i>
<i>P{GS.v+UAS(cDNA-lid)EGFP3'}</i>	<i>P{c,UAS,lid}</i>
<i>P{GS.v+UAS(cDNA-lid^{H637A})EGFP3'}</i>	<i>P{c,UAS,lid^{H637A}}</i>
<i>P{GS.v+UAS(cDNA-lid^{Δ587-740aa})EGFP3'}</i>	<i>P{c,UAS,lid^{Δ587}}</i>
<i>P{GS.v+UAS(cDNA-lid^{Δ624-740aa})EGFP3'}</i>	<i>P{c,UAS,lid^{Δ624}}</i>
<i>P{GS.v+UAS(cDNA-dIng2)EGFP3'}</i>	<i>P{c,UAS,dIng2}</i>
<i>P{GS.v+UAS(cDNA-dING2^{Y360A})EGFP3'}</i>	<i>P{c,UAS,dIng2^{Y360A}}</i>

2.1.3 Herstellung transgener *Drosophila melanogaster*-Linien

Enthalten DNA-Moleküle flankierende P-Element-Repeats, können diese mit Hilfe einer Transposase in das Genom von *Drosophila melanogaster* integriert werden (Rubin und Spradling, 1982). Die Injektion des Transformationsvektors und einer Transposasequelle (pP[ry+ Δ2-3]; Robertson et al. 1988) erfolgte im präblastodermalen Stadium der Embryonalentwicklung in den posterioren Bereich des *Drosophila melanogaster* Embryos. Die Embryonen waren entsprechend dem Selektionsmarker, entweder *rosy^{RK}*- oder *vermillion¹*- Mutanten.

Alle Arbeitsschritte wurden bei 18°C durchgeführt. Die Embryonen wurden mit einem Pinsel von der Ablegeschale, die schwarzes Futter enthielt, nach 30min Ablegezeit abgesammelt und in Ringer-Lösung (1,82M KCl; 46mM NaCl; 3mM CaCl₂; 10mM Tris/HCl; pH 7,2) gewaschen. Die Chorionschicht wurde durch 2 minütige Inkubation mit Natriumhypochloridlösung (100%) (Roth) entfernt und die Embryonen erneut in Ringer-Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie auf einem mit Leim beschichteten Deckgläschen ausgerichtet, 4min bei 30°C getrocknet und mit 10S-Voltalef-Öl (Lehmann & Voss) überschichtet. Das Deckgläschen mit den Embryonen wurde auf einem Objektträger fixiert und auf dem Objektisch eines Mikroskops (Technoval, Carl-Zeiss-Jena) platziert. Durch Bewegen des Objektisches an der Mikrokapillare, die mit einem Mikromanipulator verbunden ist und die zu injizierende DNA enthält, erfolgte die Injektion der Injektionslösung (0,1mM Na-Phosphat (pH 6,8-7,8); 10mM KCl; 150ng Transposasequelle; 450ng Transformationsvektor) in den posterioren Pol der Embryonen. Die anschließende Entwicklung der Embryonen erfolgte unter sauerstoffreicher Atmosphäre bei 25°C in einer feuchten Kammer. Nach 24h wurden die geschlüpften Larven auf Hefe gesetzt und mit Erreichen des 3. Larvenstadiums in Glasröhrchen überführt. Die überlebenden Tiere wurden mit dem Ausgangstamm zurückgekreuzt und die Nachkommenschaft mittels Selektionsmarker auf transgene Tiere selektiert. Zur genetischen Lokalisierung des Integrationsortes wurden Kreuzungen mit Balancerchromosomen für das zweite (CyO) und das dritte (TM3, Sb) Chromosom durchgeführt. Das Segregationsverhalten des Selektionsmarkers im Verhältnis zum Balancerchromosomen ermöglichte es, den Insertionsort des Plasmids einem Chromosom zuzuordnen. Wird der Selektionsmarker X-gekoppelt vererbt, liegt ein Einbau im X-Chromosom vor. Die für *lid* und *ding2* erhaltenen Stämme sind im Anhang (siehe Tab. 7.3) mit genauem Genotyp aufgeführt.

2.1.4 Kartierung von *lid*

Defizienzen und Duplikationen für den *lid*-Locus wurden mit Hilfe von Drosdel-P-Element-Insertionslinien durch FLP/FRT basierte Rekombination (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007) generiert und auf ihren Suppressor-Phänotyp gegenüber *white*-Variegation in *w^{m4h}*-Tieren untersucht. In einem zweiten unabhängigen Test wurde

ein Rescue-Experiment mit dem *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Allel und der Duplikation *Dp(2L)HB4lid*⁺ durchgeführt und auf PEV getestet.

2.1.5 Untersuchung der genetischen Interaktion von *lid* mit verschiedenen PEV-Suppressormutationen

Die Duplikation *Dp(2L)HB4lid*⁺ wurde mit Stämmen, die genomische Zusatzkopien von *Su(var)2-5* (*P{Su(var)2-5}*; *Dp(2L)HB1Su(var)2-5*⁺; Reuter et al., 1990, vorliegende Arbeit), *Su(var)3-3* (*Dp(3L)TR3Su(var)3-3*⁺; Rudolph et al., 2007), *Su(var)3-7* (*P{Su(var)3-7}*; Reuter et al., 1990) oder *Su(var)3-9* (*P{Su(var)3-9}*; Tschiersch et al., 1994) enthalten sowie mit der *Rpd3*-Mutantenlinie *HDACI3*³²⁶ (Mottus et al., 2000) gekreuzt.

Die *lid*-Mutante *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ wurde mit den Suppressorstämmen *Su(var)2-1*⁰¹, *Su(var)2-5*⁰⁵ (Reuter et al., 1990), *Df(2L)HB1Su(var)2-5* (vorliegende Arbeit), *Su(var)3-1*⁰² (Ebert et al., 2004), *Su(var)3-3*¹² (Rudolph et al., 2007), *Su(var)3-7*⁰⁵, *Su(var)3-7*⁰⁶, *Su(var)3-9*⁰⁶, *Su(var)3-9*¹⁷ (Krauss et al., 1995) und *HDACI3*³²⁶ (Mottus et al., 2000) gekreuzt.

Die transheterozygoten Nachkommen wurden anschließend bezüglich des Effekts auf *In(1)w*^{m4h} beurteilt und fotografisch dokumentiert.

2.1.6 Untersuchung des Effekts von *lid* auf heterochromatisches Gensilencing

Das Gen *lid*, mit den Allelen *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ und *Dp(2L)HB4lid*⁺, wurde auf einen Haplo-Enhancer- und Triplo-Suppressor-Effekt in verschiedenen PEV-Rearrangements untersucht. Dazu wurden die beiden Allele in den Hintergrund von *In(1)w*^{m4h} (Reuter et al., 1981; Schotta et al., 2003), *Dp(1;f)Y*²³⁸ (Le et al., 1995), *T(2;3)BL1* (Lu et al., 1998), die Inversion *In(2R)bw*^{VDe1} (Belyaeva et al., 1997) und *T(2;3)Sb*^V (Sinclair et al., 1983) gebracht und analysiert. Dabei wurden die PEV-Rearrangements und die zu untersuchende Mutationen über ein *T(2;3)CyO*, *P{w[+m]hsp70:GAL4}* *P{w[+m]UAS:GFP}*; *TM3*, *y[+] ri[1] p[p] bx[34e] e[s] Ser[1] P{w[+m]hsp70:GAL4}* *P{w[+m]UAS:GFP}*-Chromosom aus dem Stamm *w[1]; Sco[1]/T(2;3)CyO*,

$P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}; TM3, y[+] ri[1] p[p] bx[34e] e[s] Ser[1] P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}/Sb[1]$ balanciert (Rudolph et al., 1999). Larven der Nachkommenschaft, die das entsprechende Gen und Rearrangement enthalten, können durch Fehlen der starken GFP-Fluoreszenz oder des Balancerchromosomen identifiziert werden.

Bei dem *Sb*-Rearrangement ($T(2;3)Sb^V$); Sinclair et al., 1983) wurden 12 definierte Borsten (Abb. 2) pro Tier ausgewertet und die Anzahl der *Stubble*-Borsten in Männchen und Weibchen der F1-Generation ermittelt.

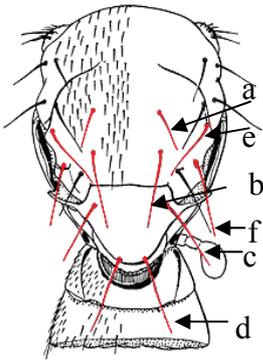


Abb. 2: Thorakale und scutellare Borsten von *Drosophila melanogaster*

Die 12 ausgezählten Borsten sind rot markiert.

- a: anteriore dorsozentrale Borsten
- b: posteriore dorsozentrale Borsten
- c: anteriore Scutellarborsten
- d: posteriore Scutellarborsten
- e: supraalare Borsten
- f: postalare Borsten

2.1.7 Generierung von homozygoten Mutanten- und Doppelmutantentieren

Lid⁻-Nulltiere konnten bis zum 3. Larvenstadium als GFP-negative Larven in den Nachkommen des Stammes $w^{mh}; lid^{10424-8}/T(2;3)CyO, P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}; TM3, y[+] ri[1] p[p] bx[34e] e[s] Ser[1] P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}/+$ identifiziert werden.

Lid⁻; *Su(var)3-3*-Doppelnulltiere entwickeln sich ebenfalls bis zum 3. Larvenstadium. Sie wurden als GFP-negative Larven ($w^1; lid^{10424-8}/lid^{10424-8}; Su(var)3-3^{11}/Su(var)3-3^{12}$) aus der Kreuzung von $w^1; lid^{10424-8}/T(2;3)CyO, P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}; TM3, y[+] ri[1] p[p] bx[34e] e[s] Ser[1] P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}/Su(var)3-3^{11}$ -Weibchen mit $w^1/Y; lid^{10424-8}/T(2;3)CyO, P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}; TM3, y[+] ri[1] p[p] bx[34e] e[s] Ser[1] P\{w[+m]hsp70:GAL4\} P\{w[+m]UAS:GFP\}/Su(var)3-3^{12}$ -Männchen selektiert.

Dp(2L)HB4Lid⁺; *Dp(3L)TR3Su(var)3-3*⁺-Tiere konnten als Stamm ($w^1; Dp(2L)HB4lid^+/Dp(2L)HB4lid^+; Dp(3L)TR3Su(var)3-3^+/Dp(3L)TR3Su(var)3-3^+$) etabliert werden, so dass auf eine Selektion der Larven verzichtet werden konnte.

2.1.8 *In vivo*-Lokalisation von LID

Die LID-Proteinverteilung konnte *in vivo* mittels EGFP-markierten LID-Protein-Konstruktes und durch Verwendung eines endogenen LID-Antikörpers in Verbindung mit einem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper (Alexa 488, Goat-Anti-Rabbit) in *Drosophila melanogaster* untersucht werden. Die LID-EGFP exprimierende Linie ($w^{m4h}; P\{GS.v^+, hs(cDNA-lid) EGFP3'\}/CyRo$) wurde 60min hitzegeschockt und nach Inkubation für 2h bei 18°C konnte die EGFP-Fluoreszenz analysiert werden.

2.1.9 Remobilisierung der P-Elemente $P\{PZ\}lid^{10424}$ und $P\{lacW\}lid^{k06801}$

Die beiden P-Elementinsertionslinien $P\{PZ\}lid^{10424}$ (lid^{10424}) und $P\{lacW\}lid^{k06801}$ (lid^{k06801}) wurden remobilisiert. Dazu wurden die Insertionslinien mit einer $\Delta 2$ -3-Transposase zusammengebracht. Da die Transposase mit dem *Dropped eye*-Phänotyp ($\Delta 2$ -3Dr) gekoppelt ist, kann ein genetisch kontrollierter Ausbau der P-Elemente erfolgen. Die $w/Y; P\text{-Element}/SM6a; \Delta 2$ -3Dr/+ Männchen der F1-Generation wurden mit $w^{m4h}; SM1/T(2;3)ap^{Xa}, Su(var)2-1^{01}/Sb$ Weibchen gekreuzt, in der F2-Generation wurde in $w^{m4h}/Y; P\text{-Element}/T(2;3)ap^{Xa}, Su(var)2-1^{01}/+$ Männchen auf Enhancereffekt selektiert und mit entsprechendem Balancer ein Stamm aufgebaut. Die $w^{m4h}/Y; P\text{-Element}/T(2;3)ap^{Xa}, Su(var)2-1^{01}/+$ Tiere wurden im Anschluss mit genomischen Primern überprüft. Im Anhang sind die verwendeten Primer (siehe Tab. 7.1) aufgelistet und ein Kreuzungsschema (siehe Abb. 7.3) dargestellt.

2.1.10 GAL4-UAS-kontrollierte Transgenexpression

Das GAL4-UAS-Expressionssystem erlaubt die kontrollierte Expression von Transgenen in *Drosophila melanogaster*. Das System beruht auf der gewebespezifischen Expression von GAL4 in eigens dafür etablierten transgenen *Drosophila*-Linien, sogenannten Treiberlinien. In Tabelle 2.3 sind die verwendeten P-Elemente für die spezifische GAL4-Expression aufgeführt. Die beschriebenen Stämme sind beim *Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University)* erhältlich.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.3: Verwendete GAL4-Treiberlinien.

Bezeichnung	Expression	P-Element	Herkunft
hspGAL4	ubiquitär nach Hitzchock: 30 min, 37°C	$P\{ry[+t7.2]=GAL4-Hsp70.sev\}2$	Bloomington
actinGAL4 (2.Chromosom)	ubiquitär, konstitutiv	$P\{w[+mC]=Act5C-GAL4\}25FO1$	Bloomington
actinGAL4 (3.Chromosom)	ubiquitär, konstitutiv	$P\{w[+mC]=Act5C-GAL4(FRT.CD2).P\}S$	Bloomington
T80GAL4 (2.Chromosom)	Speicheldrüsen, konstitutiv	$P\{GawB\}T80$	H. Saumweber
14-2GAL4 (3.Chromosom)	Speicheldrüsen, konstitutiv	$P\{GAL4\}$	H. Saumweber

2.2 Molekulare Methoden

Die Standardmethoden der Molekularbiologie erfolgten weitestgehend nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1998) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1994). Die wichtigsten in dieser Arbeit angewendeten Techniken werden im Folgenden kurz beschrieben.

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 4ml Übernacht-Kulturen erfolgte nach der alkalischen Lyse (Birnboim und Doley, 1979) oder mittels dem Rapid Plasmid-Minipräparationskit nach Angaben des Herstellers (Marligen-Biosciences-INC).

Großpräparationen wurden unter Verwendung eines Plasmid-Midipräparationskits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Isolation der BAC-DNA (Bac-RP98M10) erfolgte nach dem Low-copy-Plasmid-Protokoll.

Verdaureaktionen erfolgten mit Enzymen der Firma MBI Fermentas. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Nucleobond-Kit (Macherey-Nagel) bzw. der Quiaex II-Kit (Quiagen) benutzt.

Agarose-Gelelektrophorese, Behandlung mit Alkalischer Phosphatase, Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *E. coli* erfolgten nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989).

Für PCR-Reaktionen wurden Taq-Polymerase (GibcoBRL) bzw. Pfu-Polymerase (Stratagene) nach Standardprotokoll (Saiki et al., 1990) verwendet. Klonierungen von PCR-Fragmenten erfolgten mit dem pGEM-T Cloning-Kit (Promega) oder dem pZero-blunt-Kit (Invitrogen). Sequenzreaktionen wurden mit dem ABI377 (APPLIED BIOSYSTEMS) Cycle-Sequencing-Kit nach Herstellervorgaben durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit dem Staden-Package, Version 2001.0 bzw. GCG-Package, Version 10.2. Für PCR-Klonierungen verwendete Primer sind im Anhang (siehe Tab. 7.1) aufgelistet.

2.2.2 Isolation von DNA

Für die Isolation geringer Mengen genomischer DNA aus einzelnen Larven oder adulten Tieren fand die „Single-fly-prep“-Methode (Gloor und Engels, 1992) Anwendung. Dabei wurde eine einzelne Fliege für 10min bei -20°C in einem Eppendorfgefäß tief gefroren und anschließend in einem Gemisch aus 50µl Squishing-Puffer (10mM Tris-HCL (pH 8,2); 1mM EDTA und 25mM NaCl) und 0,5µl Proteinase-K-Stammlösung homogenisiert. Nachdem das Homogenisat bei 37°C für 30min inkubiert wurde, erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 85°C für 15min. Der so erhaltene Überstand wurde mit je 3µl zur PCR-Analyse eingesetzt.

Die Präparation von genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster* wurde nach dem „Quick Fly Genomic DNA Prep“-Protokoll von E. Jay Rehm (Berkley Drosophila Genome Project; BDGB) durchgeführt.

2.2.3 Isolation von RNA

Für die Isolation von RNA aus *Drosophila melanogaster* wurde 1ml TRIzol[®] (Invitrogen) auf die Probe gegeben und diese unter Benutzung eines Homogenisators aufgeschlossen. Die verbliebenen Gewebestücke wurden bei Raumtemperatur (RT) und 13.000rpm für 5min abzentrifugiert. Dem Überstand wurde anschließend 200µl Chloroform zugegeben und das Gemisch 5min geschüttelt. Durch Zentrifugation wird die organische von der wässrigen Phase getrennt (30min bei RT und 13.000rpm). Um RNA aus der wässrigen Phase zu gewinnen, wurde die obere Phase abgenommen, 700µl Isopropanol (0,7 Volumeneinheiten) zugegeben

und das Gemisch für 5min inkubiert. Anschließend erfolgte ein 20minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000rpm. Das erhaltene Pellet wurde mit 70%igem EtOH (mit DEPC-behandeltem H₂O verdünnt) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet (nicht vollständig trocknen lassen) und in 100µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde die RNA photometrisch quantifiziert und die Qualität mittels Agarose-Gelelektrophorese ermittelt.

2.2.4 PCR-Methoden

Die "Polymerase Chain Reaction" (PCR) ermöglicht eine pseudoexponentielle Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Die Verwendung der aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammenden hitzestabilen Taq-Polymerase (Promega; Saiki et al., 1988) ermöglichte eine Automatisierung der Reaktion durch Einsatz von Thermocyclern. Die PCR-Anwendungen erfolgten weitestgehend nach Anleitung (Eppendorf, InViTek), sowie in Anlehnung an die Protokolle des Buches „PCR1“ und „PCR2“ der Practical Approach Serie (Mc Person et al., 1991, 1995). Durch den Einsatz geeigneter genspezifischer Primer können spezifische Genfragmente amplifiziert werden. Die Anlagerungstemperatur (T_{an}) des Primers errechnet sich nach folgender Formel: $T_{an} = (4^{\circ}\text{C} \times (n(\text{G}+\text{C})) + 2^{\circ}\text{C} \times (n(\text{A}+\text{T}))) - 5^{\circ}\text{C}$ (G, C, A und T stehen für die 4 Basen der DNA).

Das verwendete Protokoll wurde je nach Bedarf hinsichtlich DNA-Konzentration, den erwarteten Fragmentgrößen (Taq-Polymerase 1.000bp/min, Pfu-Polymerase 500bp/min) und den Anlagerungstemperaturen der verwendeten Primer angepasst. Die PCRs wurden in einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

Der Standard-PCR-Reaktionsansatz für genomische- als auch Plasmid-DNA enthielt folgende Komponenten: 50-500ng genomische oder Plasmid-DNA; 1µl dNTP's (10mM); 2µl 10x PCR-*Pfu*-Puffer (1,5-2mM MgCl₂); 1pmol Oligonukleotid-Primer1 (5pmol/µl); 1pmol Oligonukleotid-Primer2 (5pmol/µl); 0,2µl *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase (5U/µl) und ad 20µl mit Aqua bidest. Das PCR-Programm hatte folgende Bedingungen: 1. 95°C 5'; 2. 95°C 40''; 3. T_{an} 40''; 4. 72°C 1'; 38 Zyklen beginnend bei 2.; 5. 72°C 5' und 6. 4°C ∞.

Die Reverse Transkription ist eine Methode zur Umschreibung von isolierter RNA in cDNA, wodurch man in einer anschließenden PCR spezifische mRNA-Moleküle

indirekt nachweisen und quantifizieren kann. Für die Herstellung von cDNA aus RNA mittels reverser Transkription, wurden 2-6µg der entsprechenden RNA verwendet. Diese mussten zunächst mit RNase-freier DNase (Promega) behandelt werden, um DNA Kontaminationen der RNA zu vermeiden. Dazu wurden 1U DNase/µg RNA und 1µl 10xDNase-Puffer im RNA-DNase-Ansatz verwendet. Dieser wurde mit DEPC-behandeltem H₂O auf 10µl aufgefüllt. Es erfolgte nun eine einstündige Inkubation bei 37°C. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl DNase Stop-Solution (Promega) bei 10min und 60°C inaktiviert. Um die reverse Transkription initiieren zu können, wurden 1µg/µl Random Hexamer Primer (Promega) hinzugegeben. Das *Annealing* erfolgte 15min bei 70°C. Im letzten Schritt konnte der Mastermix, bestehend aus 5µl 5x MLV-Reaktionspuffer (Promega), 40U/µl RNase-Inhibitor (Promega), 2,5µl dNTPs (10mM) und 200U/1µl Reverse Transkriptase (Promega, RNA-abhängige DNA-Polymerase), zugegeben werden. Die Synthesezeit betrug 2h bei einer Temperatur von 37°C. Es schloss sich ein RNA-Verdau mit 1µl RNase H (5U/µl), bei 37°C für 20min an, welcher danach bei 60°C für 10min inaktiviert wurde. Zur Überprüfung der erfolgreichen cDNA Synthese wurde eine PCR zum Nachweis von *rp49*-cDNA (ribosomales Protein) durchgeführt. Dieses Enzym ist konstitutiv in allen Geweben in hohem Maße exprimiert und gehört deshalb zur Gruppe der sogenannten Haushaltsgene.

Zur Ermittlung quantitativer Unterschiede der mRNA-Expression verschiedener Gene wurden Real-Time-PCR-Reaktionen (qRT) in einem iCycler® von BioRad durchgeführt. Um Pipettierfehler zu minimieren, wurden die erhaltenen 20µl cDNA Proben in einer Verdünnungsreihe (1:4, 1:16, 1:64) eingesetzt. Dafür wurden 1µg RNA umgeschrieben. Als Standard wurden die Haushaltsgene *rp49* und *β-Tub56D* verwendet. Um die Reinheit der Reaktionen zu bestätigen, wurden für jedes zu prüfende Gen zwei Kontrollen (ohne Reverse-Transkriptase und Wasserkontrolle) mitgeführt. Zusätzlich wurden für jedes zu analysierende Gen pro PCR und Verdünnung je zwei Messreihen erfasst, wobei alle Experimente dreifach wiederholt wurden. Für den PCR-Ansatz wurde das iQ™ SYBR® Green Supermix-PCR Kit von BioRad verwendet. Die Messung beruht auf der verstärkten Fluoreszenz des SYBR® Greens nach Einlagerung in die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Durch eine Schmelzkurvenanalyse, in der von 60°C Ausgangstemperatur pro Zyklus die Temperatur um 0,5°C bis auf 95°C erhöht wird, kann so eine Aussage über die Reinheit des PCR Produkts und das Auftreten von Primer-Dimeren getroffen werden.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten im iCycler® von BioRad. Anschließend wurden die Daten nach Pfaffl (2001) berechnet und ausgewertet. Der qRT-PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten: 2µl cDNA (Verdünnung)/ noRT/ dest; 10µl iQ™ SYBR® Green Supermix (2x); 1,5µl Oligonukleotid-Primer 1 (5pmol/µl); 1,5µl Oligonukleotid-Primer 2 (5pmol/µl) und ad 20µl mit Aqua bidest. Das qRT-PCR-Programm hatte folgende Bedingungen: 1. 95°C 5'; 2. 95°C 1'; 3. T_{an} 45''; 4. 65°C 1' ("Real Time" Fluoreszenz Messung); 40 Zyklen beginnend bei 2.; 5. 65°C 1'; 6. T_{an} 10'' (Erhöhung 0,5°C/ Zyklus ("Real Time" Fluoreszenz Messung)); 70 Zyklen beginnend bei 5.; 7. 55°C ∞.

Die Inverse-PCR ist eine Methode um unbekannte Insertionsorte von P-Elementen zu bestimmen und erfolgte in Anlehnung an die Methode von Huang et al. (2000). Der Verdau der genomischen DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *Msp1*, *Sal1*) variiert. Die selbstligierten DNA-Fragmente wurden direkt für die PCR-Reaktionen eingesetzt. Zunächst wurden PCRs mit den Primern 5'P *forw-1* und 5'P *rev-1* für das 5'-Ende des P-Elements bzw. für 3'P *forw-1* und 3'P *rev-1* für das 3'-Ende des P-Elements vorgenommen. Bei zu geringer Produktausbeute wurden geschachtelte PCRs mit entsprechenden Primerpaaren für den 5' Bereich 5'P *forw-2* und 5'P *rev-2* bzw. den 3'-Bereich 3'P *forw-2* und 3'P *rev-2* durchgeführt. Die PCR Produkte wurden zunächst in pGEM-T kloniert und anschließend sequenziert oder aber direkt mit Primern sequenziert, die vom 5'P-Repeat (Sp1) bzw. vom 3'P-Repeat (Pry2mod) in Richtung der angrenzenden genomischen DNA orientiert sind. Durch Datenbankvergleich der an das P-Element angrenzenden Sequenz mit der Gesamtsequenz von *Drosophila melanogaster* konnten die entsprechenden Insertionsstellen identifiziert werden. Die verwendeten Primer sind im Anhang (siehe Tab. 7.1) aufgeführt.

2.2.5 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Didesoxynucleotidverfahren, Sanger et al., 1977). Bei der Sequenzreaktion liegen zusätzlich zu den 4 Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP, dTTP) die 4 2', 3'-Didesoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTPs - ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) vor, die mit vier verschiedenen Fluorophoren markiert sind. Somit ist

es möglich, alle 4 Nukleotide in einem Ansatz zu analysieren. Der Einbau eines ddNTPs in einen neu synthetisierten DNA-Strang führt zu einem Abbruch der Synthesereaktion, da aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxydgruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Dadurch erhält man Fragmente verschiedener Länge mit unterschiedlichen 3'-terminalen ddNTPs. Durch einen Laser wurden nach einer Kapillarelektrophorese die Fluorophore der ddNTPs angeregt, die entstandenen Emissionen von einer Kamera erfasst und von einem Computerprogramm ausgewertet. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass nur geringe Mengen DNA eingesetzt werden müssen.

Ein 10µl Sequenzier-Reaktionsansatz (Big-DYE-Kit, Applied Biosystems) enthielt folgende Komponenten: 500ng DNA; 1µl Primer (5pmol/µl); 1µl Big-Dye-Puffer (5x); 2µl Big-Dye-Sequenziermix und ad 10µl mit Aqua bidest.

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Temperatur-Gradientencycler (Biometra). Es wurden 40 Zyklen durchgeführt, wobei das Primerannealing 40sec dauerte. Die Annealingtemperatur variierte je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Primer. Die Verlängerung der eingesetzten Primer erfolgte bei 60°C für 4 min, die Denaturierung für 3 min bei 95°C und die Vordenaturierung lag bei 95°C und 40 sec. Anschließend wurde die DNA gefällt (2.2.6). Die Auftrennung und Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte laut Herstelleranleitung in der Sequenzieranlage ABI377 (APPLIED-BIOSYSTEMS, Darmstadt). Die Sequenzierungsdaten konnten mit Hilfe Staden-Package, Version 2001.0 bzw. GCG-Package, Version 10.2. analysiert und mit der Flybase-Datenbank (www.flybase.org) verglichen werden.

2.2.6 Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Ethanolfällung kann man Nukleinsäuren aus einer Lösung präzipitieren. Zur Lösung wird das 4 fache Volumen an 96%igem EtOH (DNA) (99%iger EtOH bei RNA-Isolation) und 1/50 des Volumens an 3M NaAc (pH 4,8) gegeben. Anschließend wird die Nukleinsäure durch Zentrifugation für 20min bei 13000rpm in einer Kühlzentrifuge (4°C) sedimentiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Sediment wird mit der Hälfte des vorherigen Gesamtvolumens mit vorgekühltem Ethanol (70%) gewaschen und für weitere 20min bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert, bei 37°C getrocknet und in H₂O resuspendiert.

Die Isopropanolfällung hat den Vorteil, dass mit kleinerem Volumen (0,75 Volumeneinheiten Isopropanol) gearbeitet werden kann. Der Nachteil ist jedoch, dass mehr Salze ausfallen, welche in Folgeexperimenten stören könnten. Die Fällung erfolgt für 10min bei Raumtemperatur, wobei anschließend für 10min bei 4°C, und 13.000rpm zentrifugiert wird. Der Waschschrift ist analog zur Ethanol-fällung.

Mit Hilfe der Chloroform/Phenolextraktion (Chloroformextraktion) kann man Nukleinsäurelösungen von Proteinen isolieren. Der Nukleinsäurelösung wird das gleiche Volumen an Chloroform (1 Volumeneinheit Tris-gesättigtes Phenol und 1 Volumeneinheit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)) zugesetzt, intensiv gemischt und zur Phasentrennung bei Raumtemperatur für 10min bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zweimal mit Chloroform (Trichlormethan) in analoger Weise extrahiert. Damit wurde versucht, das Phenol vollständig zu beseitigen. Die phenolische untere Phase enthält die Proteine. Anschließend wurde die Nukleinsäure mit EtOH (bei DNA) oder mit Isopropanol (bei RNA) gefällt.

Mit Hilfe des NucleoSpin[®]-Extract-II-Kits (Macherey-Nagel) wurde nach einer anderen Methode nach Herstellerangaben die in gelöster Form vorliegende DNA von Proteinen isoliert und präzipitiert.

Die Konzentrationen der gefällten, wässrigen Nukleinsäuren wurden abschließend, entweder mit dem Spektralphotometer (Amersham Bioscience) oder mittels Agarosegel bestimmt. Das Verfahren am Spektralphotometer beruht auf der Messung der Absorption von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen bei drei verschiedenen Wellenlängen (Salze bei 230nm, DNA/RNA bei 260nm und AS bei 280nm). Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach der Lambert-Beerschen-Regel: OD₂₆₀ von 1 entspricht 50µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA bei einer Schichtdicke von 1cm. Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ wurde zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure-Lösung herangezogen. Dieser Wert sollte für reine DNA bei 1,8 und bei reiner RNA-Lösung bei 2,0 liegen. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Eine 50%ige DNA-Protein-Lösung zeigt ein Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ von ca. 1,5.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese und Isolation von DNA-Fragmenten

Zur präparativen und analytischen Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,6-2%igen Agarosegelen in Flachbettgelapparaturen mit 1 x TAE- Puffer (40mM Tris; 20mM Essigsäure und 1mM EDTA in Aqua dest) oder 1 x TBE-Puffer (89mM Tris; 89mM Borsäure und 20mM EDTA in Aqua dest). Angefärbt wurden die Nucleinsäuren mit Ethidiumbromidlösung, wobei zu 100ml Agarosegel 5µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) zugesetzt wurden. Die zu analysierenden Proben wurden in entsprechendem Verhältnis mit 5 x Ladepuffer (50%Glycerin; 50mM TrisHCl; 0,4% Bromphenolblau und 1mM EDTA mit pH 8,0) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese (3-6V/cm) erfolgte für 1-6h bei 60 – 150V oder über Nacht bei 20V. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Durchlichttisch im durchscheinenden UV-Licht unter Verwendung einer Kamera dokumentiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente dienten Längenstandards (GeneRuler™, Fermentas).

Zur Elution, von in der Gelmatrix gebundenen DNA-Fragmenten, wurden diese aus dem Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Nucleospin®-ExtraktII-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben eluiert.

Bei der „Huckepack-Elution“ werden die DNA-Fragmente aus der Agarose durch silanisierte Glaswolle (keine Wechselwirkungen zur DNA), rein mechanisch und durch Zentrifugationskraft getrennt. Der Boden, eines mit einer Kanülenspitze gelochtem 500µl Tube, wird mit Glaswolle gefüllt und in ein 1,5ml Eppendorf-Tube gesteckt. Die DNA-Fragment-enthaltenen Gelbanden werden nun im 500µl Eppendorftube auf der Glaswolle platziert. Das ganze „Tube-Konstrukt“ wird für 15min bei Raumtemperatur und 13.000rpm zentrifugiert. Die DNA ist abschließend in der Gel-Lösung im unteren Teil des 1,5ml Eppendorfgefäßes und kann durch Ethanolfällung gereinigt werden (2.2.6).

2.2.8 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten

Klonierung ist wie die PCR-Technik eine gute Methode DNA-Fragmente zu vervielfältigen. Dazu wurde das gewünschte, lineare DNA-Fragment in einen Vektor

ligiert und dieser in kompetente Zellen zum Beispiel *E.coli*. transformiert. Durch Selektion der Bakterien auf einen spezifischen Marker, den der Vektor trägt, kann man die positiv transformierten Bakterien isolieren. Die entsprechenden Vektoren wurden durch Restriktion und Ligation hergestellt.

Zur Spaltung von Plasmiden und doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen (MBI-Fermentas) verwendet. Diese erkennen meist spezifische 4-8bp lange, palindromische Sequenzen und spalten in dieser Erkennungssequenz die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden. Für die enzymatische Spaltung ist zu beachten, dass 1µg DNA von 1U Enzym pro h bei 37°C geschnitten wird. Die Kombination von Puffern und Enzymen erfolgte nach Angaben der Hersteller.

Ein analytischer 10µl-Restriktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen: 1µg DNA; 1µl Restriktionspuffer (10x); 1µl BSA (10x, 1mg/ml); 1U Enzym und ad 10µl mit Aqua bidest.

Bei präparativen Ansätzen (>10µg DNA) wurde die Restriktion in einem Volumen von 50µl oder mehr durchgeführt. Sowohl analytische, als auch präparative Ansätze wurden für die Dauer von 1-4h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der DNA-Menge. Anschließend wurde das Enzym für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert. Kontrolle der Qualität und Quantität der Restriktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Nachdem die Vektoren (Tab. 2.4) linearisiert waren, wurden diese dephosphoryliert, um Religationen zu vermeiden. Die Dephosphorylierung erfolgte am 5'-Terminus durch Zugabe von 1µl CIAP (Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase, MBI-Fermentas) und entsprechender Menge enzymatischen Puffers zum inaktivierten Verdauansatz. Es folgte bei Raumtemperatur ein einstündiger Inkubationsschritt mit anschließender Inaktivierung für 15min bei 85°C. Abschließend wurde der Vektor mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits gereinigt (2.2.7). Zu ligierende DNA-Fragmente, die durch Amplifikation mit 5'-Terminus unphosphorylierten Oligonukleotiden entstanden, müssen phosphoryliert werden. Dazu wurden 10 Einheiten (U) T4-Poly-Nukleotid-Kinase (T4-PNK, Promega) zugegeben und entsprechend nach Herstellerangaben verfahren. Die enzymatische Reaktion wurde für 30min bei 37°C durchgeführt und abschließend für 10min bei 70°C inaktiviert.

Die Ligation von phosphorylierten DNA-Fragmenten in dephosphorylierte Vektoren erfolgte mit T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) unter ATP-Hydrolyse. Dabei verbindet

die T4-DNA-Ligase zwei DNA-Stränge zwischen der 5`Phosphatgruppe und der 3`Hydroxylgruppe. PCR-Produkte konnten direkt in den pGEM[®]T-Vektor ligiert werden, da der Vektor einen T-Überhang besitzt und die Taq-Polymerase ein freies Adenosin am 3`Ende des Fragmentes etabliert (gemäß Herstellerangaben). Bei PCR-Produkten, welche nur mit *Pfu*-Polymerase erzeugt wurden, erfolgte zunächst ein vorangestelltes A-Tailing. Dazu wurde für 30min ein Syntheseschritt bei 72°C mit Adenosin und Taq-Polymerase durchgeführt. DNA-Fragmente die durch Restriktion entstanden sind, konnten direkt in entsprechend verdauete Vektoren ligiert werden. Die zur Ligationsreaktion eingesetzte Menge an Vektor-DNA betrug 50-200ng. Die äquimolare Menge an DNA-Fragment wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ng (Vektor)} \times \text{kb (Insert)} \times 3/\text{kb (Vektor)} = \underline{\text{ng (Insert)}}$$

Anschließend wurde die Ligation wie folgt angesetzt: x ng DNA-Fragment; x ng Plasmid-DNA; 1µl Ligasepuffer (10x); 1µl T4-DNA-Ligase (3U/µl) und ad 10µl mit Aqua bidest. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 18°C oder für 2h bei Raumtemperatur.

Tabelle 2.4: Für Ligationen verwendete Vektoren.

Vektorbezeichnung	Verwendung	Referenz
pGEM-T	Klonierung von PCR-Produkten	Promega
pGEX-6P1	Proteinüberexpression in BL21-pLys	Promega
pP{GS.v+hs EGFP 3}	Transformation in <i>Drosophila melanogaster</i>	Prof. Reuter
pP{GS.v+UAS EGFP 3}	Transformation in <i>Drosophila melanogaster</i>	Prof. Reuter
pMT-V5-His	Transfektion in Drosophila S2-Zelllinien	Invitrogen
pAC5.1-V5-His	Transfektion in Drosophila S2-Zelllinien	Invitrogen
pPCR-Script	Klonierung von PCR-Produkten	Stratagene
pZERO-blunt	Klonierung von PCR-Produkten	Stratagene
pBluescriptIIKS-	Klonierung von PCR-Produkten	Stratagene

2.2.9 Herstellung kompetenter Zellen

Calciumchlorid- kompetente *E.coli*-Zellen wurden aus einer einzelnen *E.coli*-XL1-blue Kolonie (Stratagene) hergestellt. Ausgehend von dieser einzelnen Kolonie wurde über Nacht eine 4ml Kultur angezogen. Davon wurden 400µl in 40ml LB-Medium überführt und bei 37°C auf einem Schüttler, bis zu einer OD von 0,5-0,6 bei A₆₀₀-E

inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 7min bei 4°C und 4.000rpm zentrifugiert und das Pellet in 20ml eisgekühltem CaCl₂ (50mM) resuspendiert. Nach 20min erfolgte eine nochmalige Zentrifugation für 5min bei 4°C und 4.000rpm. Das Pellet wurde in 4ml eisgekühltem CaCl₂ (50mM) aufgenommen und die Lösung zu 300µl aliquotiert. Diese Aliquots wurden bei -80°C gelagert oder konnten bei 4°C innerhalb von 2d aufgebraucht werden.

Magnesiumsulfat-kompetente *E.coli*-Zellen wurden ähnlich der Calciumchlorid-Methode hergestellt. Dazu wurden 500µl einer 5ml *E.coli* Übernachtskultur in 50ml Medium A (10mM MgSO₄ und 0,2% Glukose in LB-Medium) überführt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei A₆₀₀-E kultiviert. Dann wurde die Suspension für 10min auf Eis gekühlt, um die Zellen anschließend für 10min, bei 1.500g und 4°C zu zentrifugieren. Das Zellsediment wurde in 500µl eiskaltem Medium A aufgenommen und vorsichtig mit 2,5ml Medium B (36% Glycerin; 12% PEG 8000 und 12mM MgSO₄ in LB-Medium) vermischt. Aliquots von je 100µl wurden bei -80°C gelagert.

2.2.10 Transformation der Vektoren und Kultivierung der Bakterien

Transformation ist als Einschleusung von DNA in kompetente Bakterien definiert. Indem Bakterien vorbehandelt werden, ist deren Membran für Moleküle permeabel und Klonierungsprodukte können durch Kultivierung der transformierten Bakterien vervielfältigt werden.

Zur Transformation wurden 50µl Calciumchlorid-kompetente Zellen (Tab. 2.5) oder 50µl kompetente Zellen der Firma Invitrogen auf Eis aufgetaut, mit 5µl (25-250ng) des Ligationsansatzes (2.2.8) gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 30sec bei 37°C. Nach erneuter Inkubation für 2min auf Eis wurden die Zellen mit 900µl LB-Medium (DUCHFA, Harleem/Niederlande, 20g/l) versetzt und für 30-60min bei 37°C und 500rpm kultiviert. Die Transformationsansätze wurden anschließend auf LB-Agarplatten (DUCHEFA, Harleem/Niederlande), mit vom Markergen des Vektors abhängigem Antibiotikum, ausplattiert. Die Behandlung der Platten mit X-Gal ermöglichte eine Blau-Weiß-Vorselektion, hinsichtlich positiver Kolonien bei Nutzung des pGEM-T-Vektorsystem. Die Vorselektion ist möglich, da die Fragmentinsertionstelle im β-Galactosidase-Gen

2 Material und Methoden

liegt und bei Insertion das Gen nicht mehr abgelesen werden kann. Nachdem die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert wurden, erfolgte die Auswahl von rekombinanten Kolonien, deren Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken, entsprechend Punkt 2.2.1, isoliert wurde.

Tabelle 2.5: Verwendete *E. coli*-Zelllinien.

Zelllinie	Genotyp	Verwendung	Agarmedium
<i>XL1-blue</i> (Stratagene)	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15</i> , Tn10 (Tetr)].	Plasmid-vermehrung	LB-Agar (30 g/L), 100μM Ampicillin
<i>DH5TMα</i> (Invitrogen)	F ⁻ φ,80d <i>lacZΔM15</i> , Δ [<i>lacZYA-argF</i>], U169, deo R <i>recA1, endA1, hsdR17, [r_k⁻, m_k⁺], phoA, supE44, λ- thi-1, gyrA96, relA1</i>	Plasmid-vermehrung	LB-Agar (30 g/L), 1μl X-Gal/ml Medium (2% in DMF), 100μM Ampicillin,
<i>BL21-pLys</i> (Promega)	F ⁻ <i>ompT, hsdS_B, [r_B⁻m_B⁻], gal, dcm, [DE3], pLysS [Cam^R]</i>	Überexpression von GST-Fusionsproteinen	LB-Agar (30 g/L), 100μM Ampicillin, 34μM Chloramphenicol

Von den erhaltenen und geprüften Transformanten wurden zur späteren Verwendung Stocks hergestellt. Dazu wurden 5ml LB-Broth-Flüssigmedium (DUCHFA, Harleem/Niederlande, 20g/l) bzw. LB-Selektions-Medium mit einer vereinzelt *E. coli*-Zellkolonie beimpft und diese über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. 700μl aus dieser Übernachtskultur wurden mit 300μl Glycerin (65%) versetzt und sofort in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung der Gefrierkultur erfolgte bei -80°C.

2.3 Immunozytologische Methoden

2.3.1 Immunmarkierung von embryonalen *Drosophila*-Zelllinien

Immunozytologisch wurden embryonale *Drosophila*-Zelllinien, Embryonen und Speicheldrüsenchromosomen, sowie die EGFP-Fluoreszenz und *lacZ* Färbung von Speicheldrüsen untersucht.

2 Material und Methoden

Die Anzucht, Transfektion und Selektion transienter und stabiler Schneider-Zellen (S2) und Kc167-Zellen erfolgte entsprechend dem Protokoll DES[®]Blasticidin-Support-Kits, Version C (Invitrogen). Für die Klonierung der Voll-Längen-*lid*-cDNA und der Funktionslos-Variante *lid*-cDNA-H637A wurden die Vektoren pMT-V5-HisB (induzierbar exprimierend) und pAC5.1-V5-HisB (konstitutiv exprimierend) verwendet (Tab. 2.6). Die Selektion stabiler Zelllinien erfolgte mit 20µg Blasticidin. Im transienten Test wurde die Expression rekombinanten Proteins mit 500µM CuSO₄ induziert und nach 24-48h die Zellen analysiert.

Tabelle 2.6: Für Transfektion in Zelllinien verwendete Vektoren.

Vektorbezeichnung	Verwendung
pAC5.1-V5-HisB- <i>lid</i> -cDNA	Transfektion in Drosophila S2-Zelllinien
pAC5.1-V5-HisB- <i>lid</i> -cDNA-H637A	Transfektion in Drosophila S2-Zelllinien
pMT-V5-HisB- <i>lid</i> -cDNA	Transfektion in Drosophila S2-Zelllinien
pMT-V5-HisB- <i>lid</i> -cDNA-H637A	Transfektion in Drosophila S2-Zelllinien
pAC5.1-V5-HisB- <i>lid</i> -cDNA	Transfektion in Drosophila Kc167-Zelllinien
pAC5.1-V5-HisB- <i>lid</i> -cDNA-H637A	Transfektion in Drosophila Kc167-Zelllinien

Stabil mit pAC5.1-V5-HisB-*lid*-cDNA und pAC5.1-V5-HisB-*lid*-cDNA-H637A transfizierte und in DES-Medium angezogene S2- und Kc167-Zellen wurden in Lab-Tek II Chamber-Slides (Nunc) gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium und übrige Zellen entfernt und die Kammern 3x10min mit 1xPBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von Methanol (MeOH) für 20min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit 1xPBTA (1% BSA; 0,05% Triton X-100 und 0,02% Na-Azid in 1xPBS) gespült. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurden die Zellen anschließend für 30min mit 1xPBTA bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Der primäre Antikörper (H3K4me3 (Lot:32497) 1:100 in 1xPBTA) wurde mit den Zellen über Nacht bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut 3x10min mit 1xPBTA gewaschen und der sekundäre Antikörper (Ziege- α -Maus, konjugiert mit Alexa 488; Upstate), in der Verdünnung 1:200 in 1xPBTA, zugefügt. Die Zellen wurden nun mit dem 2. AK für 1h bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert, um danach wieder 3x10min mit 1xPBTA zu waschen. Die DNA der Zellen wurde anschließend für 5min mit 0,2µg/ml DAPI-Lösung angefärbt. Nach erneutem Waschen mit 1xPBTA wurden die Kammern entfernt, die Objektträger mit Citifluor (Agar-Scientific) versehen und mit Nagellack versiegelt. Die

Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss).

2.3.2 Immunmarkierung von Embryonen

Die Immunmarkierung von *Drosophila*-Embryonen erfolgte auf zwei Wegen. Für die erste wurde die „Boiling Fix“-Methode nach Rothwell und Sullivan (2000) wie folgt modifiziert: Embryonen wurden mit Natrium-Hypochlorid-Lösung (Roth) dechorionisiert und in 5ml Embryo-Wasch-Lösung (0,7% NaCl; 0,05% Triton X-100) bei 100°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen auf Eis gestellt und durch Zugabe von 45ml kalter Embryo-Wasch-Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden die Embryonen nach Zugabe von je 1ml N-Heptan und Methanol durch kräftiges Schütteln devitellinisiert.

Zum anderen wurde die Immunmarkierung mit der Formaldehyd-Fixierungsmethode nach Mitchison und Sedat (1983) durchgeführt, die folgendermaßen modifiziert wurde: Embryonen wurden, nach der Dechorionisierung (Natriumhypochloritlösung (Roth)) in 1ml eines 1:1-Gemisches aus N-Heptan und 3,7% Formaldehyd in 1xPBS gegeben und 15min auf einem Drehrad fixiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Embryonen durch Zugabe von 1ml Methanol und anschließendem kräftigen Schütteln devitellinisiert.

Nach 3 weiteren Methanolwaschschritten wurden bei beiden Fixierungsmethoden die Embryonen entweder bei -20°C in Methanol aufbewahrt oder der Antikörperfärbung unterzogen. Für die Antikörperfärbung wurden die Embryonen zunächst rehydriert. Dazu wurde das Methanol in 5 Waschschritten in 1xPBTA (1xPBS; 1% BSA; 0,05% Triton X-100 und 0,02% Natriumazid) vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Embryonen mit 1xPBTA für mindestens 15min bei Raumtemperatur gewaschen, um über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad mit dem primären Antikörper in 1xPBTA (siehe Tab. 7.2) zu inkubieren. Nach 3 Waschschritten in 1xPBTA wurde der sekundäre Antikörper (siehe Tab. 7.2) verdünnt in 1xPBTA zugegeben und mit den Embryonen für 3h bei Raumtemperatur inkubiert. DNA-Färbung mit DAPI (0,5µg/ml) erfolgte nach weiteren 3 Waschschritten in 1xPBTA in Mounting-Medium (50%Glycerol in 1xPBS). Die Immunmarkierungen wurden am konfokalen Mikroskop

(LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der entsprechenden Filterkombinationen ausgewertet.

2.3.3 Immunmarkierung von Polytänchromosomen

Für die Präparation von polytänen Speicheldrüsenchromosomen wurde die Methode von Silver und Elgin (1978) modifiziert verwendet. Speicheldrüsen aus Larven des dritten Larvenstadiums wurden in 1xPBS präpariert und in Fixierlösung (45% Essigsäure; 2% Formaldehyd) 10min inkubiert. Nach dem Spreiten der Chromosomen wurde das Deckgläschen in flüssigem Stickstoff entfernt und der Objektträger bis zur Antikörperfärbung in 1xPBS bei 4°C aufbewahrt.

Für Immunmarkierungen mit α -Histon-Modifikations-AK und dem α -LID-AK erfolgte die Präparation von polytänen Speicheldrüsenchromosomen nach Alfageme et al. (1980) mit folgenden Modifikationen. Larven im dritten Stadium wurden in 1xPBS, 0,5% NP-40 präpariert und für 30sec in 3,7% Formaldehyd und 1% Triton X-100 in 1x PBS fixiert. Nach einer weiteren Inkubation für 1min in 45% Essigsäure und 3,7% Formaldehyd in Aqua-dest (Pile et al., 2000) erfolgte das Spreiten der Chromosomen mit der anschließenden Aufbewahrung der Objektträger in 1xPBS bei 4°C bis zur Antikörperfärbung.

Die Antikörpermarkierungen erfolgten mit verschiedenen Antikörpern (siehe Tab. 7.2). Die Präparate wurden mit einem AK in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) in 1xPBST (1xPBS; 0,2% Tween20) bzw. 5% BSA über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1xPBST für jeweils 5min bei Raumtemperatur folgte die Inkubation der Präparate mit dem sekundären Antikörper in 1xPBST mit 5% Trockenmilchpulver in einer Feuchtkammer für 2h bei 37°C. Nach weiteren drei Waschschritten in 1xPBST für jeweils 5min erfolgte die Färbung der DNA mit DAPI (0,5 μ g/ml). Nach Waschen in 1xPBST für 5min wurden die Präparate getrocknet, anschließend in Citifluor eingebettet und mit Nagellack verschlossen. Die Auswertung der Immunmarkierungen erfolgte mit einem Konfokalmikroskop (LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der Standardfiltersätze.

2.3.4 Enzymatischer Assay für *lacZ*-Expression in Speicheldrüse

Die *lacZ*-Expression des Konstrukts *P[w+, HS-lacZ]* wurde im PEV-Rearrangement *In(3L)BL1* in Speicheldrüsen aus Larven des 3. Larvenstadiums untersucht (Lu et al., 1998). Dazu wurden Larven für 30min bei 37°C hitzegeschockt. Nach weiteren 30min Inkubation bei 18°C wurden die Speicheldrüsen in 1xPBS präpariert. Anschließend wurden die Speicheldrüsen für 2min mit 5% Formaldehyd/PBS fixiert und 5min in 1xPBS gewaschen. Über Nacht wurden die Speicheldrüsen in einer *XGal*-Färbelösung (3,1mM Kaliumferricyanid; 3,1mM Kaliumferrocyanid; 10mM Natriumphosphat; 0,15M NaCl; 1mM MgCl₂; 10% DMSO; 0,1% *XGal* und pH 6,8) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift in 1xPBS wurden die Speicheldrüsen in 90% Glycerin in 1xPBS eingebettet und mit einer CCD-Kamera an einem Zeiss Axioskop im Differenzial-Interferenzkontrast-Modus dokumentiert.

2.3.5 *In vivo*-Detektion von EGFP

Zur Analyse der Expression von EGFP-Fusionsproteinen wurden aus Larven des dritten Stadiums transgener Fliegen ganze Speicheldrüsen präpariert und diese in einem Tropfen 1xPBS mit 50% Glycerin auf einen Objektträger überführt. Nach Auflegen eines Deckgläschens konnte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (LSM 510, Zeiss) die EGFP-Fluoreszenz der eingebrachten und exprimierten Transgene in den Zellkernen analysiert werden. Hierfür wurde ein invertiertes Carl-Zeiss LSM 510 Mikroskop mit einem Plan Apo 63xN.A. 1.2 Wasser-Immersionsobjektiv benutzt. Zur Analyse von EGFP wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet und die Fluoreszenz nach einem 505-550nm Bandpass-Filter mittels Photomultiplier detektiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5% und im Trenngel 7,5-20%, abhängig vom aufzutrennenden Molekulargewichtsbereich. Die Elektrophorese wurde in ELPHO-Laufpuffer (192mM Glycin; 25mM Tris; 0,1% SDS) bei 15-20mA (300V) für ein Minigel (10x15cm) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandards wurden Proteinleitern von Invitrogen bzw. MBI Fermentas verwendet.

2.4.2 Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Färbung der Proteine wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassielösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue R250; 40% Methanol und 10% Essigsäure in Aqua dest) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch Entfärbelösung (40% Methanol und 10% Essigsäure in Aqua dest) oder durch Erhitzen der Gele in Aqua bidest für 20 min.

2.4.3 Westernblot-Analyse

Die Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran (Machery-Nagel) durch Elektro-Blot-Transfer (Semi-Dry-Blotter) bei $0,8\text{mA/cm}^2$ für 2h transferiert (1xBlotpuffer: 192mM Glycin; 25mM Tris; 20% Methanol in Aqua dest). Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit 1xPonceau-S-Lösung (0,2% Ponceau-S; 3% Trichloressigsäure; 3% Sulfosalicylsäure in Aqua dest) für fünf Minuten angefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Membran wurde anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) bzw. 3% BSA in 1xPBST (1xPBS und 0.2% Tween 20) geblockt. Im Anschluss daran wurden die primären Antikörper (siehe Tab. 7.2) in 5% Trockenmilchpulver oder 3% BSA in 1xPBST verdünnt zugegeben und entweder 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C

mit der Membran in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach 3x20min Waschen in 1xPBST wurden die entsprechenden sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper (siehe Tab. 7.2) in 5% Trockenmilchpulver oder 3% BSA in je 1xPBST zugegeben und für 2h bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut 3x20min in 1xPBST gewaschen. Abschließend erfolgte die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Antikörper mit dem ECL-Plus-System (Amersham-Pharmacia-Biotech) nach Angaben des Herstellers.

2.4.4 Herstellung von Kernextrakten aus *Drosophila melanogaster* für Westernblot-Analysen

Für die Herstellung embryonaler Kernextrakte wurden Embryonen (2-3h) zunächst in Aqua-dest gewaschen. Die Chorionmembran der Embryonen wurde mit Natriumhypochloridlösung (Roth) entfernt. Diese dechorionisierten Embryonen wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Präparation der Kernextrakte aus *Drosophila melanogaster* wurde die Methode von Elgin und Hood (1973) modifiziert angewandt. Alle Schritte der Präparation wurden bei 4°C ausgeführt. Etwa 500mg dechorionisierte Embryonen wurden im Dounce-Homogenisator in 5ml Puffer II (0,05M Tris-maleat; 0,005M MgCl₂; 0,01M β-Mercaptoethanol; 0,1mM PMSF pH 7,4) homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde durch eine Miracloth-Membran mit einer Porengröße von 100µm filtriert und auf 5ml Saccharose (0,2M) in Puffer II geschichtet. Dieser Ansatz wurde 10min bei 2.000g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in jeweils 5ml Puffer II, Puffer II+0,1% Triton-X100 sowie in Puffer II gewaschen und jeweils für 10min bei 2.000g sedimentiert. Die erhaltenen Kerne wurden im nächsten Schritt in 17ml Saccharose (0,2M) in Puffer II resuspendiert, auf 19ml Saccharoselösung (2,2M) in Puffer III (0,01M Tris-maleat; 0,005M MgCl₂; 0,01M β-Mercaptoethanol; 0,1mM PMSF pH 7,4) geschichtet und für 100 Minuten bei 85.000g (Rotor SW27, Beckmann, 4°C) sedimentiert und 3x in Puffer II gewaschen. Zuletzt wurde das Sediment in entsprechendem Volumen 1xPBS resuspendiert und für 20sec mit Ultraschall behandelt. Diese Kernextrakte konnten nun direkt verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

Für die Präparation von Kernextrakten aus Speicheldrüsen wurden 200 Speicheldrüsenpaare in 150µl 1xPBS-NP40 (0,5%) und 50µl Rotiload-Gemisch in einem Eppendorf-Gefäß (Tube) mit einem Pistilator homogenisiert. Dieses Homogenat wurde für 1min auf 95°C erhitzt und anschließend für 20sec sonifiziert. Nach erneutem Erhitzen für 1min auf 95°C wurden die Proben für 15min bei 17.300rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.4.5 Herstellung von Kernextrakten aus *Drosophila melanogaster* für massenspektrometrische Analysen

Die Präparation der Kerne erfolgte auf Eis wie unter 2.4.4 beschrieben. Um eine besonders hohe Anreicherung von Histonen für massenspektrometrische Analysen zu erreichen, wurde eine saure Extraktion der isolierten Kerne vorgenommen. Dazu wurde das aus der Kernextraktion gewonnene Pellet nicht in 1xPBS sondern in 0,6N HCl resuspendiert und bei 4°C für 2h auf einem Drehrad inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 17.300rpm wurde der Überstand mit 10Volumen kaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -80°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 300µl Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde auf Eis getrocknet und danach direkt analysiert oder bei -80°C gelagert.

2.4.6 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

Unter Verwendung des Expressionsvektors pGEX-6-P1 (Amersham Biosciences) wurden die rekombinanten Proteine intrazellulär als Fusionsproteine mit einem GST-Taq exprimiert.

Für analytische Ansätze wurde eine Einzelkolonie, BL21plys-Zellen mit Expressionskonstrukt, über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin (100mg/ml) und Chloramphenicol (34mg/ml) inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurde 1:100 eine neue Kultur angesetzt (100mg/ml Ampicillin; 34mg/ml Chloramphenicol) und bei 37°C bis zu einer OD von 0,5-0,6 bei A₆₀₀-E kultiviert. Es wurde 1ml Kulturmedium als Kontrollprobe abgenommen, die Zellen für 5min bei 6.000g und 4°C zentrifugiert

und bei -20°C aufbewahrt. Die verbleibenden Kulturen wurden durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 0,1mM) induziert und über Nacht bei 18°C bei 200rpm inkubiert. Für präparative Analysen erfolgte die Protein-Präparation aus einem 0,5-4,0 Liter-Kulturansatz und nach Protokoll.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden für 10min bei 6.000g abzentrifugiert, mit eiskaltem Aufschlusspuffer (RIPA-Puffer: 5mM EDTA; 1% NP-40; 0,5% Na-desoxycholat; 5mg Lysozym; 20mM Tris/HCl (pH 7,5); 500mM NaCl und 1 Tablette Protease-Inhibitor) gewaschen, für 10min bei 6.000g zentrifugiert und das erhaltene Pellet erneut in 10ml Aufschlusspuffer pro 100ml Kulturvolumen resuspendiert. Anschließend wurden die im Aufschlusspuffer resuspendierten Zellen entweder bei -80°C aufbewahrt oder mittels Ultraschallgerät (Bandelin-Sonopuls-GM-70) für je 4 x 30sec mit gepulstem Schall (70%) bei 42W aufgeschlossen. Das Lysat wurde im nächsten Schritt für 30min bei 20.000g zentrifugiert und aus dem Überstand die löslichen Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie isoliert. Die Reinigung der löslichen Fusionsproteine erfolgte über Protein-G-Sepharose (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers. Das erhaltene Eluat wurde 24h gegen Dialysepuffer (50mM Tris/HCL (pH 8,0)) dialysiert und anschließend in einem der Proteingröße entsprechenden Amicon-Ultra-Filter (MilliPore) aufkonzentriert. Das im Aufschlusspuffer gelöste GST-Fusionsprotein wurde, um das GST abzuspalten, mit PreScission-Protease (Amersham Biosciences) versetzt (nach Herstellerangaben). Abschließend wurde über Affinitätschromatographie (Protein-G-Sepharose) das GST-freie Protein isoliert. Im Überstand reicherte sich nach 5minütiger Zentrifugation bei 500g und 4°C das rekombinante Protein an. Eine Abschätzung der erhaltenen Menge erfolgte mit Hilfe eines bekannten BSA-Standards auf PAA-Gelen.

2.4.7 Herstellung und Reinigung von polyklonalen α -LID- und α -dING2-spezifischen Antikörpern

Die zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten rekombinanten Proteine wurden aus Bakterien, die das entsprechende Antigen überexprimierten, gewonnen (2.4.6). Für die Herstellung des α -LID-Antikörpers wurde ein LID-Antigen aus der *lid*-cDNA mit den Primer lid-394aa-forw und lid-394aa-rev und für den α -dING2-Antikörper aus der *ding2*-cDNA mit den Primer ING2_20aa_AB1_f und ING2_20aa_AB1_r generiert.

Pro Injektion wurden je Kaninchen 100µg Protein eingesetzt. Die Tiere wurden bei „PAB Produktions“ nach dem Standardprotokoll immunisiert.

Das Serum der neunten Blutabnahme, eines mit rekombinantem Protein immunisierten Kaninchens, wurde zur Aufreinigung und Konzentrierung des α -LID-AK eingesetzt. Für den α -dING2 spezifischen Antikörper wurde die fünfte Blutabnahme verwendet. Die Antikörpermoleküle wurden an Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences) gebunden und durch einen sauren Elutionspuffer (100mM Glycinpuffer, pH 2,5) eluiert. Nach Neutralisierung mit 1/10Volumeneinheiten Tris/HCL (1M, pH8) wurden die Konzentrationen bestimmt. Fraktionen wurden mit Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren. Aufgetaute Aliquots dieser Elutionsfraktion wurden für Westernblots und immunzytologische Analysen eingesetzt.

2.4.8 Co-Immunopräzipitation

Kernextrakte aus 1g Wildtypembryonen (2-3h) wurden wie unter 2.4.4 beschrieben, isoliert. Modifiziert wurde die Prozedur, indem eine Aufnahme des Kernpellets in Extraktionspuffer (50mM Tris/HCl (pH 7,5); 150mM NaCl; 0,1% NP40 und 250mM KCl in Aqua dest) erfolgte. Um Unspezifitäten zu minimieren, wurden nach 20 minütiger Sedimentation bei 10.000g und 4°C der Überstand auf mit Extraktionspuffer vorbehandelte Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences) gegeben und für 20min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach 3minütiger Zentrifugation bei 500g und 4°C wurde der Überstand auf mit LID-gekoppelter Protein-A-Sepharose überführt und über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die kovalente Bindung des Antikörpers an die Matrix erfolgte durch Dimethylpimelimidat. Die Sepharose-Beads wurden anschließend für 3min bei 4°C und 500g sedimentiert und zweimal mit Puffer A (50mM Tris/HCl (pH 7,5); 150mM NaCl und 0,1% NP-40 in Aqua dest) und dreimal mit Extraktionspuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden abschließend durch Zugabe von Glycinpuffer (0,1M Glycin (pH 2,5) in Aqua-dest) eluiert und mit 1/10Volumeneinheiten Tris/HCl (1M; pH 8,0) neutralisiert. Nach Zugabe von Rotiload (Roth) und 5min bei 95°C wurde das Eluat im PAA-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Proteine erfolgte im Westernblot mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern.

3 Ergebnisse

3.1 Die H3K4me3 Demethylase LID beeinflusst heterochromatisches Gensilencing

E(var)- und *Su(var)*-Mutationen beeinflussen antagonistisch heterochromatisches Gensilencing in PEV-Rearrangements. Enhancermutationen verstärken, während Suppressormutationen Gensilencing unterdrücken. Hierbei spielt die Gendosis eine entscheidende Rolle. Einen der stärksten Haplo-Suppressoren stellt das Gen *Su(var)3-9* dar. Liegt nur eine Kopie des Gens vor, kommt es zu einer Unterdrückung von heterochromatischem Gensilencing. Eine zusätzliche Kopie *Su(var)3-9* führt zu einem verstärkten Gensilencing und zeigt einen Triplo-Enhancereffekt (Tschiersch et al., 1994).

In der Region 26B wurde durch zytogenetische Analysen ein Gen identifiziert, das einen Triplo-Suppressoreffekt manifestiert (Reuter und Szidonya, 1983). Als Ergebnis hochauflösender Defizienzanalysen konnte dem Gen *lid* (little imaginal disc) dieser Triplo-Suppressoreffekt zugeordnet werden. Um den Einfluss von *lid* im Gensilencing einstuft zu können, wurden verschiedene *lid*-Allele in den Hintergrund von *In(1)w^{m4h}* gebracht. Hierbei führt der Verlust einer *lid*-Kopie (*Df(2L)HB4lid⁻* bzw. *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*) zu einer reduzierten Expression des *white*-Gens (Abb. 3.1). Das *lid*-Gen manifestiert somit einen Haplo-Enhancereffekt.

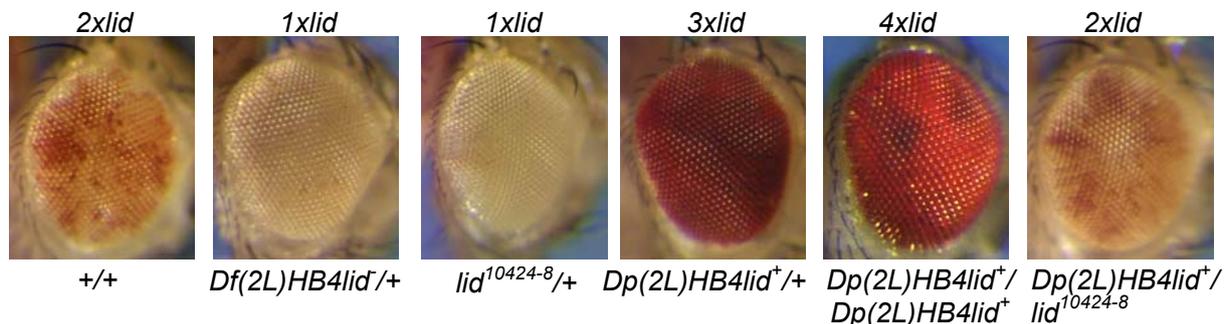


Abbildung 3.1: PEV-Effekt von *lid*-Allelen im *In(1)w^{m4h}*-Variegationssystem.

Im ersten Bild (von links) ist die Variegationskontrolle zu sehen. Im zweiten und dritten Bild liegen jeweils eine, im vierten 3 und im fünften Bild 4 *lid⁺*-Genkopien vor. In einer Heterozygoten (letztes Bild) von *Dp(2L)HB4lid⁺* und *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸* sind die PEV-Effekte der Duplikation und der Deletion ausgeglichen.

Hingegen verursacht eine genomische Duplikation (*Dp(2L)HB4lid⁺*) eine Suppression des Gensilencings, was zum Triplo-Suppressoreffekt führt, sichtbar an der nahezu

3 Ergebnisse

vollständigen Wildtypfunktion des *white*-Gens im w^{m4h} -Rearrangement. Im Hintergrund eines *lid*-Nullallels ($lid^{10424-8}$) zeigt eine genomische Duplikation von lid^+ ($Dp(2L)HB4lid^+$) keinen Triplo-Suppressoreffekt. Eine zusätzliche Kopie des Wildtyp-Gens ist in der Lage, den Haplo-Enhancer-Effekt von *lid* vollständig auszugleichen. Dabei wird der Triplo-Suppressoreffekt kompensiert und eine Variegation beobachtet (Abb. 3.1).

Um ausschließen zu können, dass dieser Effekt in *lid*-Mutationen nur ausschließlich die *white*-Inaktivierung in w^{m4h} betrifft und kein allgemeiner Effekt auf PEV ist, wurden $Dp(2L)HB4lid^+$ und $lid^{10424-8}$ mit weiteren PEV-Rearrangements gekreuzt (Abb. 3.2). Die Translokation $T(2;3)Sb^V$ (Sinclair et al., 1992) enthält die neomorphe Sb^1 -Mutation, deren Inaktivierung zur Ausprägung des Sb^+ -Phänotyps führt. Im Fall des *yellow*-Rearrangements liegt ein zusätzliches *yellow*-Gen in $Dp(1;f)\gamma^{238}$ vor (Le et al., 1995). Ist das Gen aktiv wird in einem *yellow*-Mutantenhintergrund ein Wildtypfarbenedes Abdomen manifestiert. In der Inversion $In(3L)BL1$ (Lu et al., 1998) liegt ein *lacZ*-Gen im 3. Chromosom in der Nähe des Heterochromatins. Bei diesem Rearrangement kann durch *lacZ*-Färbung der Speicheldrüsenchromosomen eine Variegation detektiert werden. Das Rearrangement *brown* in $v; In(2R)bw^{vD1}$ (Sass und Henikoff, 1998) betrifft das 2. Chromosom und zeigt sich in variierten Augen.

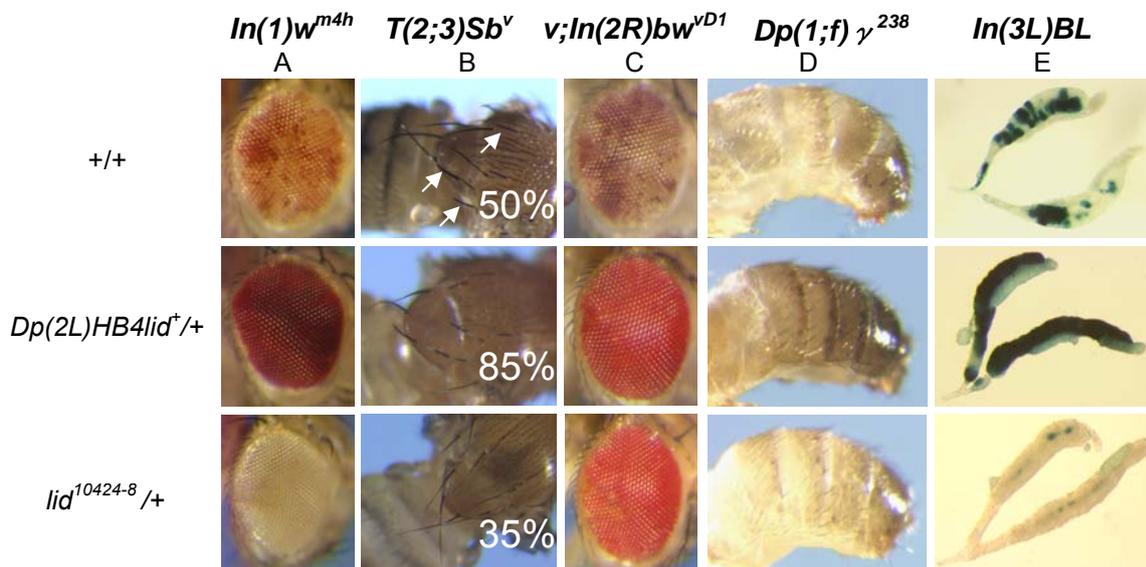


Abbildung 3.2: Allgemeine Wirkung von *lid* auf PEV in verschiedenen Rearrangements. Die obere Reihe zeigt die Kontrolltiere der verwendeten PEV-Rearrangements von (A) *white* in $In(1)w^{m4h}$, (B) *Stubble* in $T(2;3)Sb^V$, (C) *brown* in $v; In(2R)bw^{vD1}$, (D) *yellow* in $Dp(1;f)\gamma^{238}$ und (E) *lacZ* in $In(3L)BL1$. In der mittleren Reihe ist der Triplo-Suppressor-Phänotyp der Kreuzungen mit der genomischen Duplikation $Dp(2L)HB4lid^+$ zu sehen. In der unteren Reihe ist der Haplo-Enhancer-Phänotyp der Kreuzungen mit der Mutation $lid^{10424-8}$ zu sehen, mit Ausnahme von $v; In(2R)bw^{vD1}$. Die Anzahl der *Sb*-Borsten (in Prozent) wurden in ♂ und ♀ der F1-Generation ermittelt. Kurze, dicke Borsten (Pfeile) zeigen Reaktivierung des *Sb*-Allels.

Eine Duplikation für *lid* manifestiert in allen 5 getesteten PEV-Systemen (*white*, *Stubble*, *brown*, *yellow* und *lacZ*) einen Triplo-Suppressoreffekt. Im Gegensatz dazu zeigt die untersuchte *lid*-Mutation einen schwachen Haplo-Enhancereffekt. Im *brown*-Rearrangement der *lid*-Mutation ist sogar ein Triplo-Suppressoreffekt zu erkennen. Da eine Duplikation für *lid* einen signifikanten Triplo-Suppressor zeigt und eine *lid*-Mutation mit einem schwachen Haplo-Enhancer verbunden ist, kann geschlussfolgert werden, dass das Genprodukt von *lid* beim Aufbau euchromatischer Strukturen eine wichtige Rolle spielt und ein essentieller Bestandteil euchromatischer Proteinkomplexe ist.

3.2 *Su(var)2-5*, *Su(var)3-1*, *Su(var)3-3*, *Su(var)3-7* und *Su(var)3-9* sind epistatisch gegenüber dem *E(var)*-Effekt von *lid*⁻

Beim Aufbau des Heterochromatins spielen viele Faktoren eine wichtige Rolle. Einige essentielle Faktoren für heterochromatisches Gensilencing sind die Haplo-Suppressoren *Su(var)2-5*⁰⁵, *Su(var)3-1*⁰², *Su(var)3-3*¹², *Su(var)3-7*⁰⁵ und *Su(var)3-9*⁰⁶. Um die genetische Wechselwirkung der Nullmutation *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ mit den Suppressoren zu charakterisieren, wurden Transheterozygote mit den jeweiligen *Su(var)*-Mutationen untersucht (Abb. 3.3). Wie in der Abbildung zu sehen ist, sind alle Suppressoren gegenüber dem *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Nullallel in ihrer Wirkung epistatisch und stellen somit bei der Etablierung des heterochromatischen Gensilencings übergeordnete Funktionen dar.

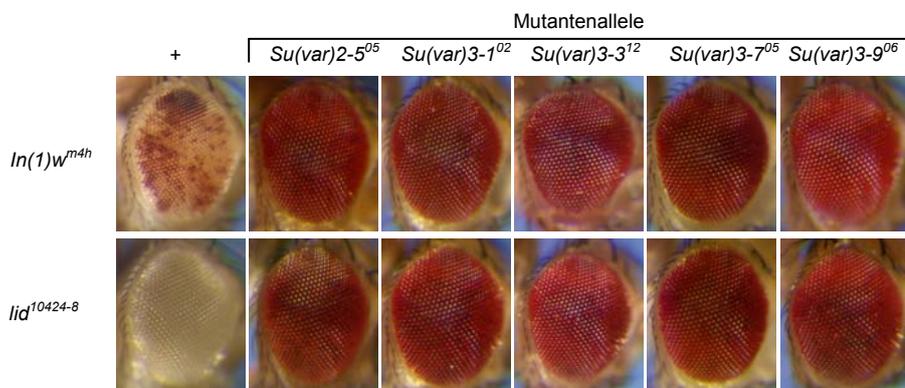


Abbildung 3.3: Genetische Interaktion zwischen *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ und *Su(var)2-5*⁰⁵-, *Su(var)3-1*⁰²-, *Su(var)3-3*¹²-, *Su(var)3-7*⁰⁵- und *Su(var)3-9*⁰⁶-Mutationen.

Das *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Nullallel wurde mit *Su(var)2-5*-, *Su(var)3-1*-, *Su(var)3-3*-, *Su(var)3-7*- und *Su(var)3-9*-Mutationen verkreuzt. Es sind die *white*-Variegationen der Kontrolltiere (obere Reihe) und der Einfluss des *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Allels (untere Reihe) dargestellt.

3.3 Regulierte Überexpression von *lid* kompensiert partiell den Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)2-5*, *Su(var)3-3*, *Su(var)3-7* und *Su(var)3-9*

Eine zusätzliche Kopie der Suppressoren *Su(var)2-5*, *Su(var)3-3*, *Su(var)3-7* und *Su(var)3-9* führt im *In(1)w^{m4h}*-Testsystem zu einer verstärkten Ausbreitung des Heterochromatins (Triplo-Enhancereffekt). Um die genetischen Wechselwirkungen zwischen dem Triplo-Enhancereffekt der Suppressoren und dem Triplo-Suppressoreffekt von *lid* zu untersuchen, wurden jeweils eine zusätzliche genomische Genkopie von *lid* mit zusätzlichen Genkopien von *Su(var)2-5*, *Su(var)3-3*, *Su(var)3-7* und *Su(var)3-9* kombiniert. In den transheterozygoten Fliegen wirkt die Überexpression von *lid* gegenüber dem Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)2-5*, *Su(var)3-3*, *Su(var)3-7* und *Su(var)3-9* additiv (Abb. 3.4). Das spiegelt sich in einer rot-weißen mosaikartigen Augenpigmentierung wieder. In Fliegen mit 4 Kopien von *Su(var)3-9* ist ein besonders starker *E(var)*-Effekt zu beobachten, der epistatisch gegenüber dem *S(var)*-Effekt einer Duplikation für *lid* ist.

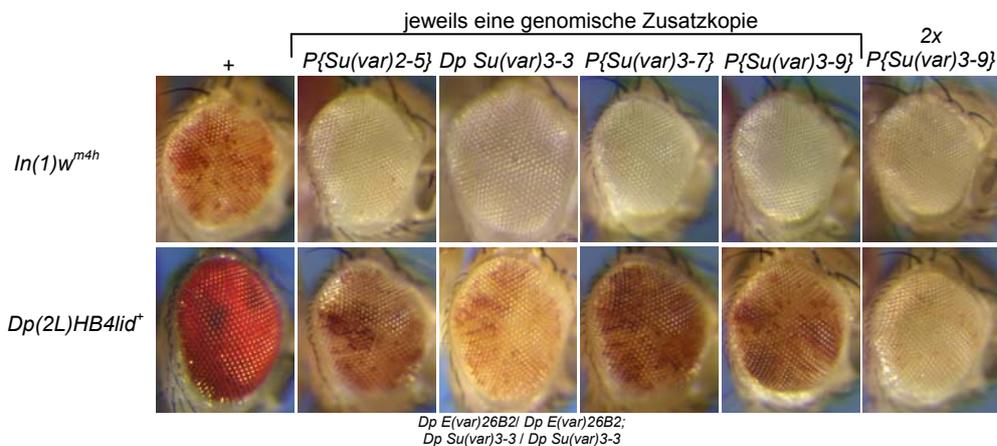


Abbildung 3.4: Genetische Interaktion zwischen *Dp(2L)HB4lid⁺* und dem Triplo-Enhancereffekt zusätzlicher Kopien von *P{Su(var)2-5}*, *Dp Su(var)3-3*, *P{Su(var)3-7}* und *P{Su(var)3-9}*.

Eine Duplikation für *lid* wurde mit einer Duplikation für *Su(var)3-3* sowie mit einer zusätzlichen genomischen Kopie von *Su(var)2-5*, *Su(var)3-7* und *Su(var)3-9* kombiniert. Es ist die *white*-Variegation der Kontrolltiere (obere Reihe) und der Einfluss von *Dp(2L)HB4lid⁺* auf den Triplo-Enhancereffekt der *Su(var)s* (untere Reihe) dargestellt.

3.4 Der Haplo-Suppressoreffekt von *Rpd3* ist epistatisch über *lid*

RPD3 wurde bereits als Histone-Deacetylase und dessen Mutantenallel *Rpd3*³²⁶ im *In(1)w^{m4h}*-Testsystem als Haplo-Suppressor beschrieben (Mottus et al., 2000; Ebert et al., 2004). In Fliegen mit transheterozygoten *lid/Rpd3*-Hintergrund (*w^{m4h}; lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/+; Rpd3³²⁶/+*) wird eine epistatische Wirkung von *Rpd3*³²⁶ über *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ beobachtet, was darauf hindeutet, dass funktionell *Rpd3* „upstream“ von *lid* wirkt. Der Haplo-Suppressoreffekt von *Rpd3*³²⁶ bleibt von der Triplo-Suppressorfunktion der genomisch regulierten Überexpression in *Dp(2L)HB4lid⁺* unbeeinflusst (Abb. 3.5).

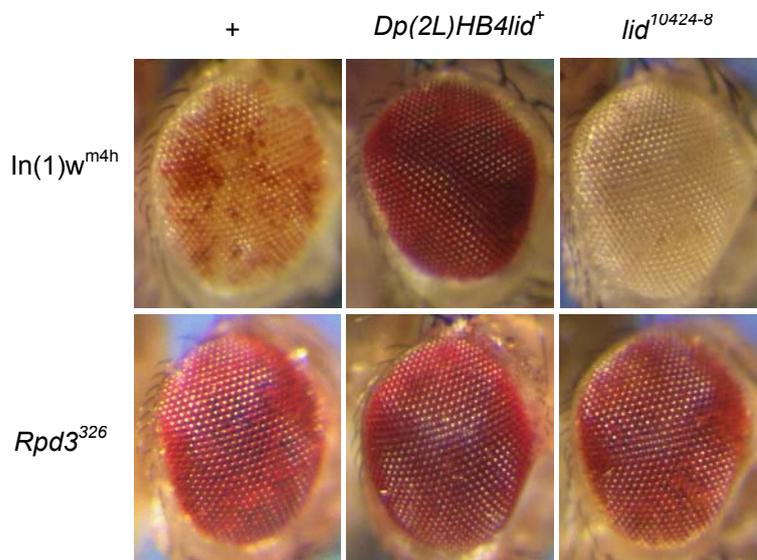


Abbildung 3.5: Genetische Interaktion zwischen *Rpd3*³²⁶ und der *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Nullmutation. Der *Su(var)*-Effekt von *Rpd3*³²⁶ dominiert über den *E(var)*-Effekt von *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸.

3.5 Klonierung von *lid* und Generierung von *lid*-Nullallelen

Gene, deren Faktoren den Chromatinstatus regulieren, wurden erfolgreich als *Su(var)*- und *E(var)*-Mutationen für Positions-Effekt-Variegationssysteme (PEV) identifiziert (Schotta et al., 2003; Reuter et al., 1982; Wustmann, 1989).

Durch zytogenetische Analysen wurde ein Gen identifiziert, das einen Triplo-Suppressoreffekt manifestiert (Reuter und Wolff, 1981; Reuter und Szidonya, 1983). Die Analyse von erfolgreich generierten und in der genomischen Sequenz definierten Duplikationen und Deletionen (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007) sowie von P-Elementen zeigte, dass dem Gen *CG9088* (*lid*) in der Region 26B2 auf dem linken Arm vom Chromosom 2 dieser Triplo-Suppressoreffekt zugeordnet werden kann

3 Ergebnisse

(Abb. 3.6). Diese Kartierungsmethode hat den Vorteil, dass Deletionen und Duplikationen zwischen zwei P-Elementen mit molekular bekannten Insertionsorten generiert und direkt im PEV analysiert werden können. Die erhaltenen Deletionen und Duplikationen wurden mit dem *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Nullallel komplementiert und auf Letalität bzw. Gendosiskompensation im PEV überprüft. Im Anhang ist je ein Kreuzungsschema für die Herstellung von w^+ (siehe Abb. 7.1) sowie von w^- (siehe Abb. 7.2) Deletionen bzw. Duplikationen dargestellt. Stellvertretend für diese Kreuzungen sind in Abbildung 3.6 sechs Defizienzen, eine Duplikation und zwei für deren Herstellung verwendete P-Elemente gezeigt.

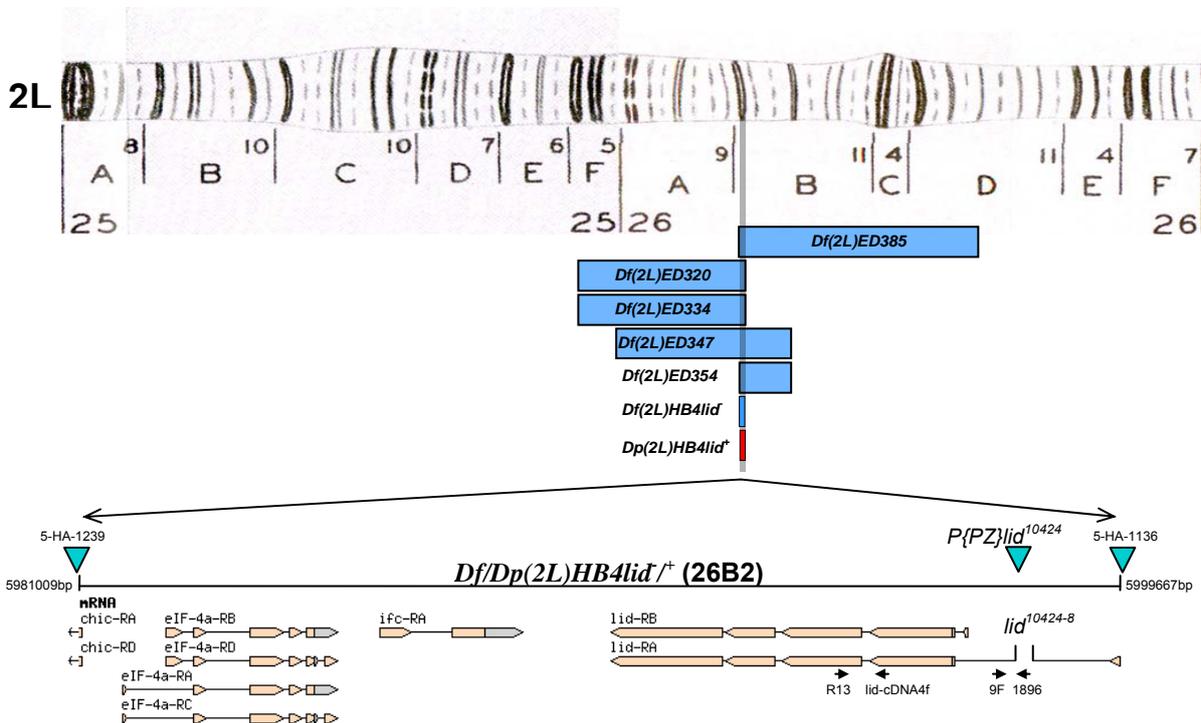


Abbildung 3.6: Genetische Analyse der *lid*-Region.

Kartierung von *lid* (CG9088) mittels P-Element generierten Duplikationen und Deletionen. Im oberen Teil ist ein Ausschnitt (Region: 25-27) des Chromosomenarms 2L gezeigt. Darunter sind in blau die Defizienzen und in rot eine Duplikation zu sehen. Die Defizienz (*Df(2L)HB4lid*⁻) zeigt einen Haplo-Enhancer- und die Duplikation (*Dp(2L)HB4lid*⁺) einen Triplo-Suppressoreffekt. Die P-Elemente 5-HA-1239 und 5-HA-1136 wurden zur Generierung von *Df(2L)HB4lid*⁻ und *Dp(2L)HB4lid*⁺ benutzt. Das P-Element *P{PZ}*lid*¹⁰⁴²⁴* wurde remobilisiert und die *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Nullmutation isoliert. Die Primer (Pfeile) R13 und *lid*-cDNA4f, die das 2. Intron von *lid* überspannen, wurden für RT-Analysen und die Primer 9F und 1896 zur Überprüfung der Revertanten verwendet.

Die erhaltenen w^- -Deletionen und -Duplikationen sowie die *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Nullmutation wurden im PEV-Rearrangement *In(1)w^{m4h}* auf Suppressor- bzw. Enhancereffekt getestet. Mit Hilfe dieser Mutationen konnte das Gen *lid* als Haplo-Enhancer und Triplo-Suppressor definiert werden (siehe Abb. 3.1).

3 Ergebnisse

Um den Haplo-Enhancer von *lid* bestätigen zu können, wurden die P-Insertionen $P\{PZ\}lid^{10424}$ bzw. $P\{lacW\}lid^{k06801}$ verwendet, die im 1. Intron von *lid* inseriert sind. Diese P-Elemente wurden mittels Transposase (*TM3*, *Sb*, $P(\Delta 2-3)$) remobilisiert. Ziel dieses Experimentes war es, Deletionen des Genes *lid* durch P-Elementausbau zu erhalten. Die erhaltenen Männchen des Genotyps $w/Y; P\text{-Element}/SM6a; P(\Delta 2-3)/+$ wurden mit Weibchen des Genotyps $w^{m4h}/w^{m4h}; SM1/T(2;3)ap^{Xa}, Su(var)2-1^{01}/Sb$ gekreuzt, um in der Folgegeneration $w^{m4h}/Y; P\text{-Element}/T(2;3)ap^{Xa}, Su(var)2-1^{01}/+$ Ausnahmetiere mit einem Haplo-Enhancer zu selektieren (siehe Abb. 7.3). Es konnten aus diesem Remobilisierungsexperiment 12 Haplo-Enhancerstämme ($lid^{10424-1}$ bis $lid^{10424-9}$ und $lid^{k06801-1}$ bis $lid^{k06801-3}$) selektiert werden (siehe Tab. 7.3). Bei den Stämmen, $lid^{10424-1}$ und $lid^{10424-8}$, konnten durch PCR-Analyse (Abb. 3.7) mit den Primern 9F/1896 (siehe Abb. 3.6) und Sequenzierung (siehe Abb. 3.8) ein Ausbau von Intronsequenzen (54 bp bzw. 194 bp) nachgewiesen werden.

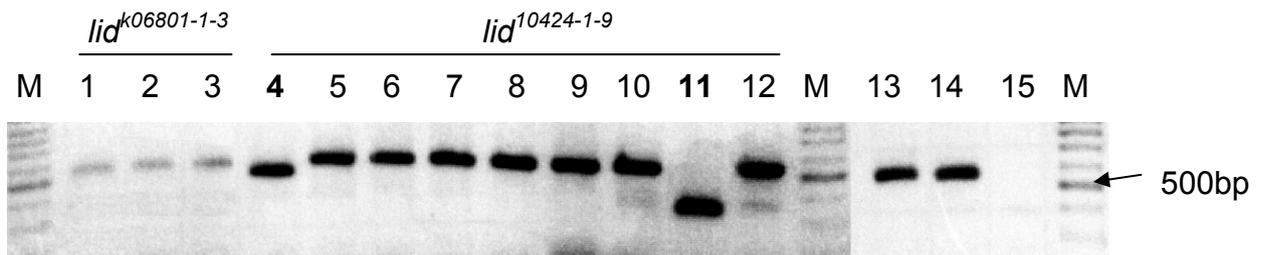


Abbildung 3.7: PCR-Analyse der nach Remobilisierung erhaltenen *E(var)*-Mutationen. Die Analyse wurde mit dem Primerpaar 9F/1896 (9F im 1. Intron; 1896 im IR vom P-Element; Fragmentgröße 550bp) durchgeführt. In den Spuren 1 bis 3 sind die Revertanten $lid^{k06801-1}$ bis $lid^{k06801-3}$ und in 4 bis 12 die Revertanten $lid^{10424-1}$ bis $lid^{10424-9}$ zu sehen. Die Spuren 4 und 11 zeigen nach Remobilisierung eine Deletion (54 bp bzw. 194 bp) von Intronsequenzen. Als Kontrollen dienten die P-Element tragenden Linien $P\{lacW\}lid^{k06801}$ (Spur 13) und $P\{PZ\}lid^{10424}$ (Spur 14) sowie eine Wasserkontrolle (Spur 15). (M = Marker: Fermentas GeneRuler™ 100bp DNA Leiter)

Weiterhin ergaben die PCR-Analysen ergaben, dass die selektierten Stämme noch einen Großteil des vorhandenen P-Elementes enthalten und durch die Remobilisierung hauptsächlich deren Selektionsmarker (*white* bzw. *rosy*) funktionslos wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass alleine das Vorhandensein der P-Elemente im 1. Intron diesen Enhancereffekt bewirkt und verantwortlich für den Verlust der Expression des LID-Proteins ist (D. Gerloff, persönliche Mitteilung). Im $In(1)w^{m4h}$ -Testsystem konnte mit Hilfe der *lid*-Mutation, $lid^{10424-8}$ der Triplo-Suppressoreffekt der *lid*-Duplikation, $Dp(2L)HB4lid^+$ kompensiert (siehe Abb. 3.1) und so das *lid*-Gen als *E(var)* bestätigt werden.

3.6 Molekulare Analysen von *lid*-Nullallelen

Für Sequenzanalysen der 12 Revertanten wurden heterozygote Tiere mit der Deletion *Df(2L)HB4lid^r* hergestellt. In Abbildung 3.8 sind schematisch die Ergebnisse der Sequenzanalysen, der Revertanten *lid¹⁰⁴²⁴⁻¹*, *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, *lid¹⁰⁴²⁴* und *lid^{k06801}* dargestellt.

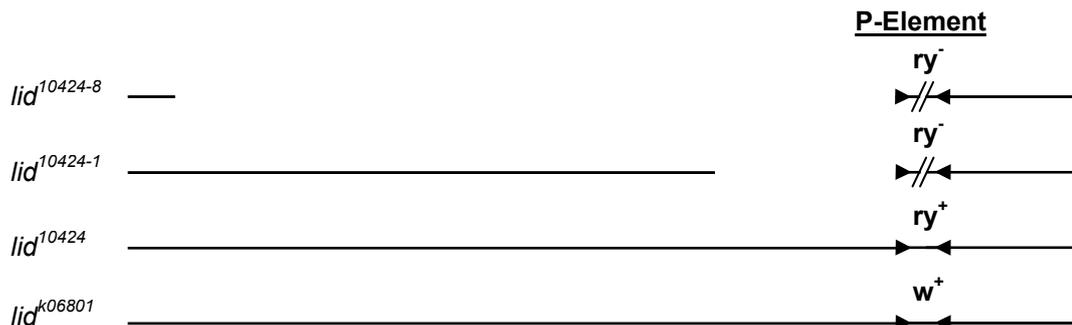


Abbildung 3.8: Ergebnisse der Sequenzanalysen von Revertantenlinien.

In den beiden Linien *lid¹⁰⁴²⁴* und *lid^{k06801}* sind die P-Elemente (*P{PZ}lid¹⁰⁴²⁴* bzw. *P{lacW}lid^{k06801}*) im ersten Intron des *lid*-Genes an Position 5998036bp inseriert. Neben dem Funktionsverlust des Markergens vom P-Element enthält die Revertante *lid¹⁰⁴²⁴⁻¹* eine 54bp-große Deletion und *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸* eine 194bp-große Deletion im 1. Intron von *lid*.

Durch die Sequenzdaten konnten die Ergebnisse der PCR-Analysen (siehe Abb. 3.7) verifiziert und in der Revertante *lid¹⁰⁴²⁴⁻¹* eine 54bp-große Deletion und in *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸* eine 194bp-große Deletion im 1. Intron von *lid* (Abb. 3.8) nachgewiesen werden. Die restlichen Revertanten zeigten im Vergleich zu den Ausgangsstämmen *lid¹⁰⁴²⁴* und *lid^{k06801}* in der genomischen Sequenz von *lid* keine Veränderungen. In den Ausgangslinien *lid¹⁰⁴²⁴* und *lid^{k06801}* sind deren P-Elemente *P{PZ}lid¹⁰⁴²⁴* bzw. *P{lacW}lid^{k06801}* im ersten Intron des Genes *lid* an Position 5998036bp inseriert. An der Insertionsstelle konnte weiterhin eine Duplikation von 8bp, hervorgerufen durch die Insertion der P-Elemente, nachgewiesen werden.

Weitere Experimente zeigen, dass durch die Insertion der P-Elemente die Transkription von *lid* gestört ist. Da *lid*-Mutationen rezessiv letal sind, erreichen Fliegen, die kein *lid* exprimieren, nicht das adulte Stadium. Exemplarisch ist in Abbildung 3.9 in Speicheldrüsen der Transkriptionsverlust von *lid* in transheterozygoten Larven mit dem *lid*-Nullallel *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸* und der Defizienz *Df(2L)HB4lid^r* gezeigt. Es handelt sich somit bei der Revertante *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸* nachweislich um ein *lid*-Nullallel (Abb. 3.9).

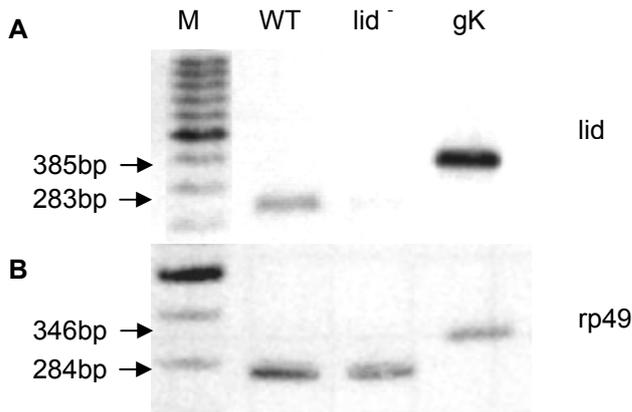


Abbildung 3.9: Lid-Transkript-nachweis im Wildtyp und der *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸-Mutation.

Die Expressionsanalysen (A) für *lid* erfolgten mit den Primern *lid*-cDNA4f und R13 und (B) für *rp49* als Ladekontrolle mit den Primern Rp49-RT-F und Rp49-RT-B. WT = Wildtyp (*w^{iso3}*), *lid*⁻ = Nullmutante (*lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸/*Df(2L)HB4lid*), gK = genomische Kontrolle, M = Marker (Fermentas GeneRuler™ DNA Ladder Mix)

3.7 Expression von *lid* während der *Drosophila*-Entwicklung

Das LID-Protein enthält eine JmjC-Domäne (siehe Abb. 7.5 und Abb. 7.6) und katalysiert die Demethylierung von H3K4me3 zu H3K4me2 (Eissenberg et al., 2007; Lee N. et al., 2007; Secombe et al., 2007). Die JmjC-Domäne, welcher in *Drosophila* diese H3K4me3-Demethylierungsaktivität zugewiesen werden konnte (Lee et al., 2007), ist stark konserviert und wurde bereits in Arten wie *Saccharomyces cerevisiae* (Liang et al., 2007; Metzger et al., 2007; Seward et al., 2007) *Schizosaccharomyces pombe* (Huarte et al., 2007), *Arabidopsis thaliana* (Lu et al., 2008; Lu et al., 2010), *C. elegans* (Christensen et al., 2007; Klose et al., 2006a) und dem Menschen (Secombe et al., 2007; Gildea et al., 2000; Christensen et al., 2007; Eissenberg et al., 2007) identifiziert (siehe Abb. 7.6). Als Voraussetzung für funktionelle LID-Analysen wurde zunächst die Expression des *lid*-Gens während der verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila* untersucht (Abb. 3.10). Semiquantitative RT-PCR-Analysen zeigen die höchste Expressionsrate in adulten Weibchen und im Embryo.

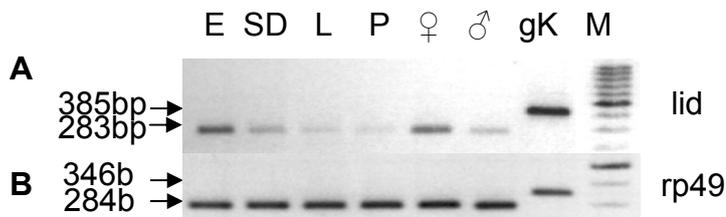


Abbildung 3.10: Entwicklungsspezifische Expression des *lid*-Gens.

(A) Die PCR-Analysen wurden mit den Primern *lid*-cDNA4f und R13 für die *lid*-Expression und (B) Rp49-RT-F und Rp49-RT-B für die *rp49*-Expression im WT durchgeführt. E = Embryo, SD = Speicheldrüsen, L = Larve, P = Puppe, ♀ = adultes Weibchen, ♂ = adultes Männchen, gK = genomische Kontrolle, M = Marker (Fermentas GeneRuler™ DNA Ladder Mix)

3.8 Generierung eines spezifischen LID- und dING2-Antikörpers

Exprimierte LID-FLAG-Fusionsproteine transgener Linien binden in Speicheldrüsenchromosomen im Interbandenbereich des Euchromatins (Lee et al., 2009). Neben LID bindet auch ING2 spezifisch H3K4me3 (Becker, 2006; Pena et al., 2006; Shi et al., 2006; Lee et al., 2007). Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers ist es möglich die Verteilung und die gegenseitige Abhängigkeit von LID und dING2 während der *Drosophila*-Entwicklung zu dokumentieren.

3.8.1 Generierung eines polyklonalen LID-spezifischen Antikörpers

Für *lid* existieren 2 alternative mRNAs (9043bp und 6345bp), welche für je 5 Exone kodieren und sich im 5'-Bereich unterscheiden (Abb. 3.11). Das gemeinsame Protein (1838aa) enthält eine JmjN- und JmjC-Domäne, eine ARID-Domäne, eine C5HC2-Domäne und drei PHD-Domänen. Um einen spezifischen LID-Antikörper (LID-AK) zu generieren, wurde ein auf Proteinebene zu anderen *Drosophila*-Proteinen nicht konservierter Bereich von 394 Aminosäuren, aus dem mittleren Bereich des LID-Proteins, rekombinant exprimiert.

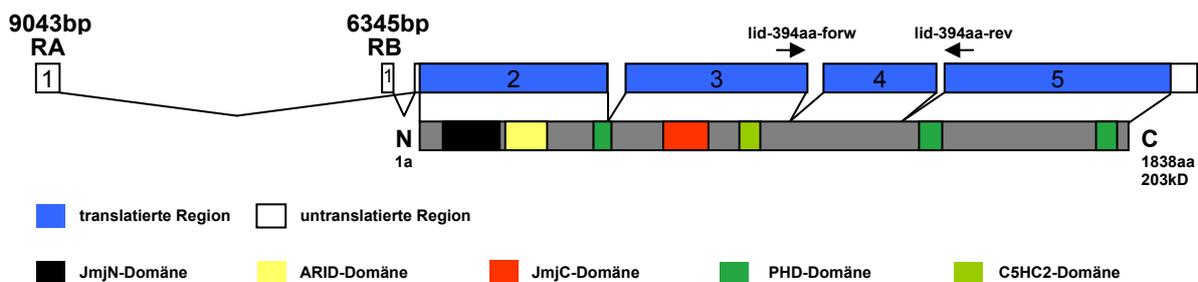


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des *lid*-Genes und der LID-Domänenstruktur.

Die 2 Transkripte (9043bp und 6345bp) von *lid* sind oben dargestellt und darunter die Domänenstruktur des Proteins (1838aa). Die Primer (Pfeile), lid-394aa-forw und lid-394aa-rev, die das 3. und 4. Intron von *lid* überspannen, wurden zur Antigenherstellung verwendet.

Dazu wurde ein DNA-Fragment mit den Primern Lid-394aa-forw und Lid-394aa-rev aus dem cDNA-Klon LD40310 (BACPAC Resources Center) amplifiziert. Das für die Aminosäuren 888 bis 1281 kodierende Fragment wurde anschließend in den Vektor pCR[®]-Blunt II TOPO[®] (Invitrogen) subkloniert und in den Expressionsvektor pGEX-6PI (Amersham Biosciences) umkloniert. Die Expression des Proteins erfolgte im *E.*

3 Ergebnisse

coli Stamm BL21(DE3)pLys (Promega). Induzierte Testexpressionen (Abb. 3.12 A, Pfeil in Spur 3) ergaben, gegenüber nicht induzierten Proben (Abb. 3.12 A, Spur 2), bei 18°C und einer IPTG-Konzentration von 0,1mM eine gute Expressionsrate des ≈74kDa großen Fusionsproteins (Abb. 3.12 A).

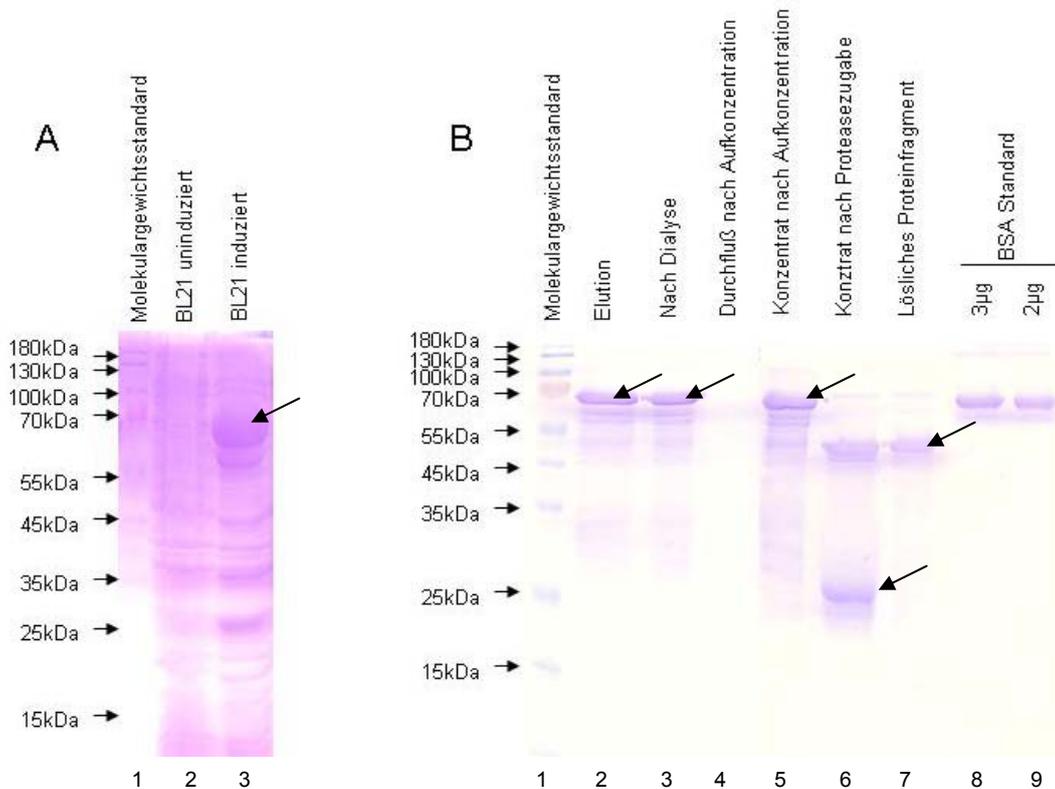


Abbildung 3.12: Aufreinigung des LID-Proteinfragmentes zur Antikörperherstellung.
A: IPTG-induzierte Testexpression des GST-Fusionsproteins (Pfeil in Spur 3) gegenüber nicht induzierten Zellen (Spur 2) in E.coli BL21-Zellen.
B: Aufreinigung des GST-LID-Fusionsproteins. Spur 2, 3 und 5 zeigen das ca. 74kDa große mit Glutathione-Sepharose® 4B (Amersham Biosciences) aufgereinigtes LID-GST-Fusionsprotein (Pfeil). Spur 7 zeigt, nach Abspaltung von GST, „freies“ lösliches ca. 45kDa großes LID-Proteinfragment (Pre-Scission™-Protease, Amersham Biosciences). Ebenso ist in Spur 6 das abgespaltene GST (≈29kDa) zu erkennen (Pfeil). Zur Abschätzung der erhaltenen Proteinmenge wurden 3µg bzw. 2µg (Spuren 8 und 9) von BSA (≈70kDa) aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt und als Leiter der Molekulargewichtsstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte über Glutathione-Sepharose® 4B-Chromatographie (Amersham Biosciences). Die nach der Pre-Scission™-Protease-Behandlung (Amersham Biosciences) erhaltene Menge löslichen Proteins wurde durch Auftragen auf ein PAA-Gel zusammen mit einem BSA-Standard abgeschätzt (Abb. 3.12 B, Spuren 7, 8 und 9).

Insgesamt 1,5mg des gereinigten Proteins wurden zur Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung des Antikörpers eingesetzt. Die nach der Immunisierung erhaltenen

3 Ergebnisse

Blutseren wurden immunozytologisch an Speicheldrüsenchromosomen und im Westernblot getestet. Das Antiserum der neunten Blutung wurde über Protein-A-Sephrose-Chromatographie gereinigt und für weitere Experimente verwendet.

Der gereinigte Antikörper zeigte hohe Reaktivität und Spezifität für das endogene LID-Protein. Für die Analyse im Westernblot wurde Gesamtproteinextrakt verwendet, um unspezifische Bindungen des Antikörpers, hervorgerufen durch nicht kernlokalisierte Proteine, ausschließen zu können. Die Spezifität des LID-Antikörpers wurde im Westernblot an Gesamtproteinextrakt von Speicheldrüsen des Wildtyps und homozygoter *lid*-Nullmutanten ermittelt (Abb. 3.13).

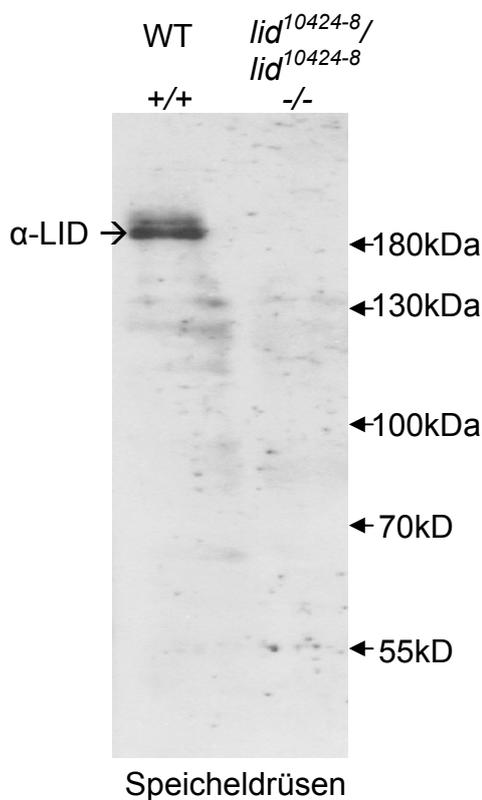


Abbildung 3.13: LID-Antikörpertest.

Der Antikörper detektiert im Wildtyp ein Protein von ≈ 204 kDa. In der *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ - Nullmutante wurde kein Protein nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte mittels Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus 10 Speicheldrüsen.

Trotz der rezessiven Letalität von *lid* erreichen einige *lid*-Nulltiere (*w*^{m4h}/*w*^{m4h}; *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸/*lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸; +/+) das 3. Larvenstadium. Diese homozygoten *lid*-Nulltiere können unter UV-Licht selektiert werden, da nur die heterozygoten Tiere (*w*^{m4h}/*w*^{m4h}; *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸/*T(2;3)CyO*, *P{w[+m]hsp70:GAL4}* *P{w[+m]UAS:GFP}*; *TM3*, *y*⁺ *ri*[1] *p*[*p*] *bx*[34*e*] *e*[*s*] *Ser*[1] *P{w[+m]hsp70:GAL4}* *P{w[+m]UAS:GFP}*+/+) fluoreszieren. Neben Speicheldrüsen (Abb. 3.14 G-O) wurden auch Embryonen (Abb. 3.14 A-F) von Wildtyp, *lid*-Null und *Dp(2L)HB4lid*⁺ immunozytologisch analysiert.

3 Ergebnisse

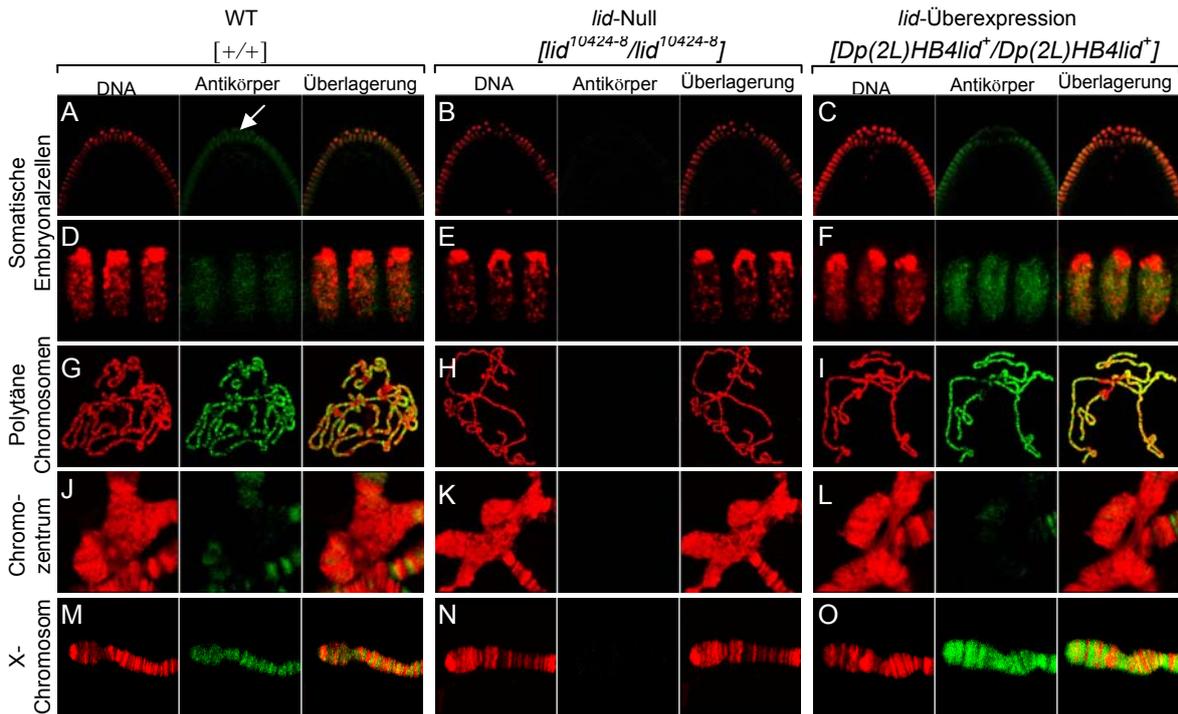


Abbildung 3.14: LID-Nachweis an Embryonen und polytären Chromosomen larvaler Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster*.

Die immunozytologischen Färbungen erfolgten an Embryonen des Kernteilungszyklus 14 (A-F) und Speicheldrüsenchromosomen (G-O) vom Wildtyp, w^{iso3} (A, D, G, J und M), einer *lid*-Nulllinie, $lid^{10424-8}$ (B, E, H, K und N) und einer *lid*-Überexpressionslinie, $Dp(2L)HB4lid^+$ (C, F, I, L und O). Der Pfeil markiert in den Polzellen spezifisch LID. Das endogen exprimierte Protein wurde mit einem spezifischen polyklonalen LID-AK (grün) detektiert. Die Anfärbung der DNA erfolgte mit DAPI (rot).

Die Berechnung des Molekulargewichtes von LID erfolgte aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons. Dieses beträgt ≈ 204 kDa. In Nullmutanten wird sowohl nach Westernanalyse (Abb. 3.13) als auch in den immunozytologischen Analysen (Abb. 3.14) keine unspezifische Reaktion des Antikörpers nachgewiesen.

In Interphasenkernen somatischer Embryonalzellen wird das LID-Protein im euchromatischen Bereich (Abb. 3.14 D) und in den Polzellen (Abb. 3.14 A, Pfeil) detektiert. In Polytänchromosomen von Speicheldrüsen bindet LID spezifisch in Interbanden (Abb. 3.14 G und M; Lee et al., 2007; Lee et al., 2009). In der *lid*-Überexpressionslinie $Dp(2L)HB4lid^+$ ist in den Interbanden eine verstärkte (Abb. 3.14 I und O) und in der homozygoten $lid^{10424-8}$ -Nullmutantenlinie keine LID-AK-Bindung zu beobachten (Abb. 3.14 H und N). Eine Bindung von LID an heterochromatische Bereiche konnte weder in den somatischen Zellen des Embryos (Abb. 3.14 D-F) noch in den Banden und Chromozentren polytärer Speicheldrüsenchromosomen (Abb. 3.14 J-O) nachgewiesen werden. LID ist demnach in der Embryonalentwicklung hauptsächlich euchromatisch lokalisiert. Weiterhin

unterstreicht das Fehlen der LID-Bindung in den *lid*-Nullmutanten (Abb. 3.14 B, E, H, K und N) die hohe Spezifität des hergestellten polyklonalen Antikörpers.

3.8.2 Generierung eines polyklonalen dING2-spezifischen Antikörpers

Neben LID (Klose et al., 2006a; Eissenberg et al., 2007; Secombe et al., 2007) bindet auch ING2 (Inhibitor of Growth2; Becker, 2006; Pena et al., 2006; Shi et al., 2006) spezifisch H3K4me3. Um einen LID-Einfluss auf die dING2-Bindung (*Drosophila* ING2) charakterisieren zu können, wurde ein polyklonaler dING2-Antikörper generiert. Dieser wurde analog der Vorgehensweise für den LID-spezifischen Antikörper (3.8.1) hergestellt. Ein 20 Aminosäure großes Fragment wurde rekombinant exprimiert, welches die letzten 20 Aminosäuren des C-Terminus der 433 Aminosäuren großen dING2-Proteinsequenz umfasst. Dieses Fragment wurde mit den Primern ING2_20aa_AB1_f und ING2_20aa_AB1_r aus dem cDNA-Klon GH01429 (BACPAC Resources Center) amplifiziert und anschließend in den Expressionsvektor pGEX-6PI kloniert.

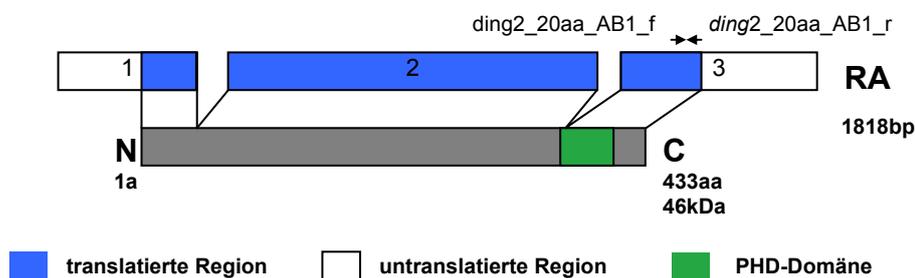


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des *ding2*-Genes und der dING2-Domänenstruktur.

ding2 kodiert für 3 Exone und es wird eine 1818bp große mRNA transkribiert. Das 46kDa große Protein (433aa) enthält eine PHD-Domäne. Die Primer (*Pfeile*), *ding2_20aa_AB1_f* und *ding2_20aa_AB1_r*, im 3. Exon wurden zur Antigenherstellung verwendet.

Die Expression des Proteins erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLys (Promega). Induzierte Testexpressionen ergaben gegenüber nicht induzierten Proben bei 18°C und einer IPTG-Konzentration von 0,1mM eine gute Expressionsrate des ≈32kDa großen ING2-GST-Fusionsproteins. Nach der Aufreinigung des Proteinfragmentes wurde die erhaltene Menge des löslichen Proteins durch Auftragen auf ein PAA-Gel zusammen mit einem BSA-Standard abgeschätzt (Daten nicht gezeigt). Insgesamt 1,5mg des gereinigten Proteins wurden anschließend zur Herstellung des Antikörpers für die Immunisierung der Kaninchen eingesetzt. Die erhaltenen Blutseren der Kaninchen wurden analog der LID-AK-Testung ebenfalls mittels

Westernblots getestet. Das 5. und 6. Blutserum wurde vereinigt und nach Aufreinigung für weitere Experimente verwendet.

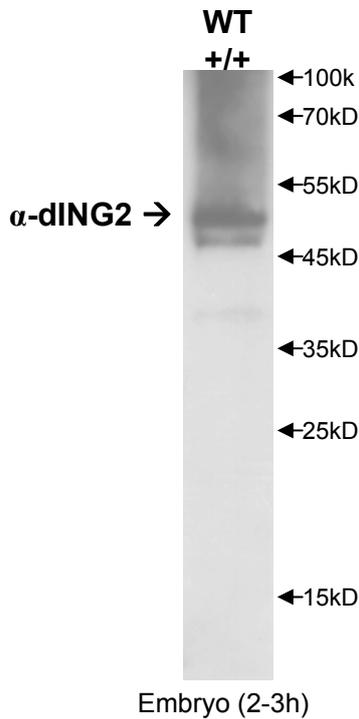


Abbildung 3.16: dING2-Antikörpertest.

Der Antikörper detektiert im Wildtyp ein Protein von ≈ 46 kDa. Der Nachweis erfolgte mittels Westernblot an Gesamtproteinextrakt von Wildtypembryonen (2-3h).

Aufgereinigte Antikörper zeigten für das endogene dING2-Protein eine gute Reaktivität und Spezifität. Für die Analyse im Westernblot (Abb. 3.16) wurde Gesamtproteinextrakt aus Wildtypembryonen (2-3h) verwendet.

Die Berechnung des Molekulargewichtes vom dING2-Protein erfolgte aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons und beträgt ≈ 46 kDa. Im Westernblot konnte mit dem dING2-Antikörper eine prominente und eine schwächere Bande detektiert werden (Abb. 3.16).

3.9 LID ist ein Interbandenprotein und zygotisch exprimiert

LID konnte immunozytologisch mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers im Euchromatin lokalisiert werden. Neben dem endogenen Proteinnachweis war es durch die Generierung transgener Linien, die ein LID-EGFP Fusionsprotein unter Kontrolle eines Hitzeschockpromotors ektopisch exprimieren ($pP\{GS[hs\ lid\ cDNA], v^+, EGFP+\}$), möglich die nukleäre Verteilung von LID zu analysieren (Abb. 3.17 C). Mit Hilfe mono- und polyklonaler EGFP-spezifischer Antikörper konnte das LID-EGFP Fusionsprotein in den Interbanden der polytären Chromosomen lokalisiert werden (Abb. 3.17 B und E). Mit Hilfe des polyklonalen LID-Antikörpers (siehe Abb. 3.13 und

3 Ergebnisse

Abb. 3.14) konnte das endogene LID-Protein ebenfalls in Interbanden (Abb. 3.17 A und D) nachgewiesen werden.

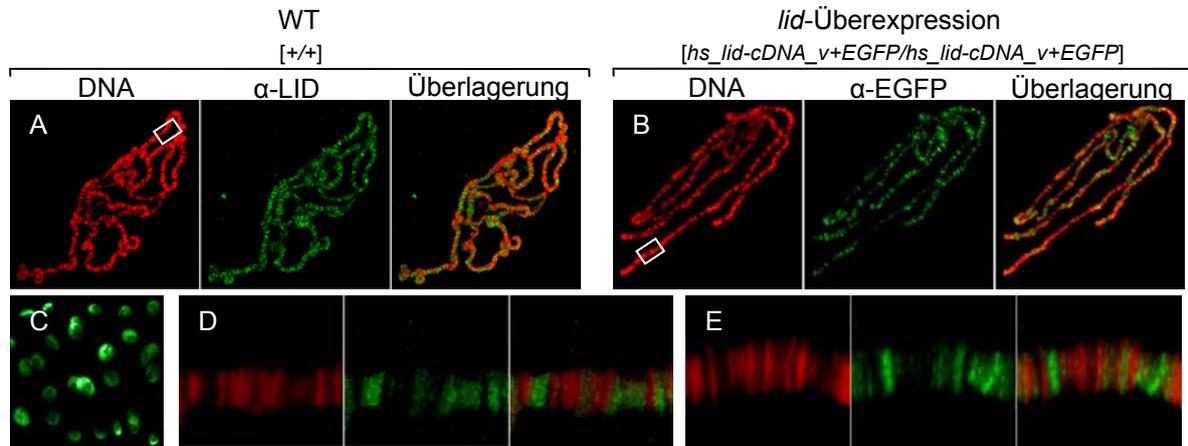


Abbildung 3.17: Verteilung des endogenen LID-Proteins und des transgenen LID-EGFP-Fusionsproteins in polytären Speicheldrüsenchromosomen.

Der Nachweis des nativen LID-Proteins erfolgte mit einem spezifischen polyklonalen LID-Antikörper (A und D, anti-Kaninchen). Der Nachweis des LID-EGFP-Fusionsproteins einer $pP\{GS[hs\ lid-cDNA, v^+, EGFP+]\}$ transgenen Linie erfolgte mit EGFP-spezifischen Antikörpern (anti-Maus monoklonal) (B und E). (D) und (E) stellen vergrößerte Ausschnitte von (A) und (B) dar. (C) Nachweis des LID-EGFP Fusionsproteins in intakten Speicheldrüsen unter UV-Licht. Die DNA wurde mit DAPI anfärbt.

Demnach kolokalisiert die endogene LID-Bindung mit der ektopischen Bindung des LID-EGFP Fusionsproteins während der *Drosophila* Entwicklung an chromosomalen Interbanden (Lee et al., 2007).

Nach der Befruchtung erfolgen im *Drosophila*-Embryo in einem Syncytium 13 rasch aufeinanderfolgende und synchrone Kernteilungen (Foe und Alberts, 1983). Dabei wandern ab dem 8. Zyklus die Kerne an die Peripherie und bilden das nukleäre Blastoderm. Im Inneren verbleiben die sogenannten Dotterkerne. Während dieser syncytialen Kernteilungen werden maternal in das Ei eingebrachte mRNAs translatiert. SU(VAR)3-3 (Rudolph et al., 2007) und SU(VAR)3-9 (Ebert, 2005) sind bereits ab dem 2. Kernteilungszyklus, wahrscheinlich als maternale Komponenten, im Embryo nachweisbar. Die Zellularisierung erfolgt nach dem 13. Kernteilungszyklus und geht mit dem 14. Kernteilungszyklus in das zelluläre Blastoderm über. Ab dem 12. Kernteilungszyklus ist es erstmals möglich, innerhalb des Kernes, die Differenzierung von Eu- und Heterochromatin zu unterscheiden (Rudolph et al., 2007). Das zu diesem Zeitpunkt entstehende Heterochromatin ist durch seine verstärkte Anfärbbarkeit mit DAPI nachweisbar und befindet sich an der apikalen Peripherie des Kernes (Abb. 3.18 A). Die euchromatischen Regionen sind basal ausgerichtet (Abb. 3.18 B).

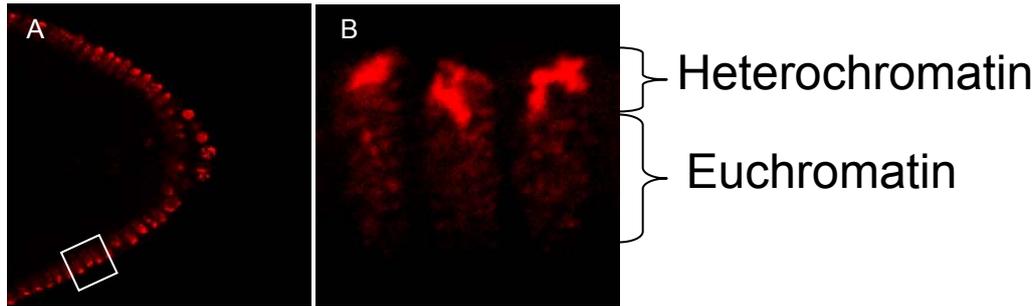


Abbildung 3.18: Polare Organisation von Eu- und Heterochromatin im Blastoderm von *Drosophila*.

(A) Somatische Zellen des Kernteilungszyklus 14 im posterioren Pol eines *Drosophila*-Embryos. (B) Ausschnittsvergrößerung der Abbildung A zeigt apikal gelegenes Heterochromatin und basal ausgerichtetes Euchromatin. Stark mit DAPI angefärbte Bereiche entsprechen Heterochromatin und schwächere Regionen Euchromatin.

Die maternalen mRNAs werden während der ersten Furchungsteilungen translatiert und regulieren die zygotische Expression der ersten embryonalen Transkriptionsfaktoren (TF). Zu den früh embryonal exprimierten Genen gehören die *Gap*-Gene, deren RNA schon ab dem 10. Kernteilungszyklus nachweisbar sind (Edgar und Schubigert, 1986).

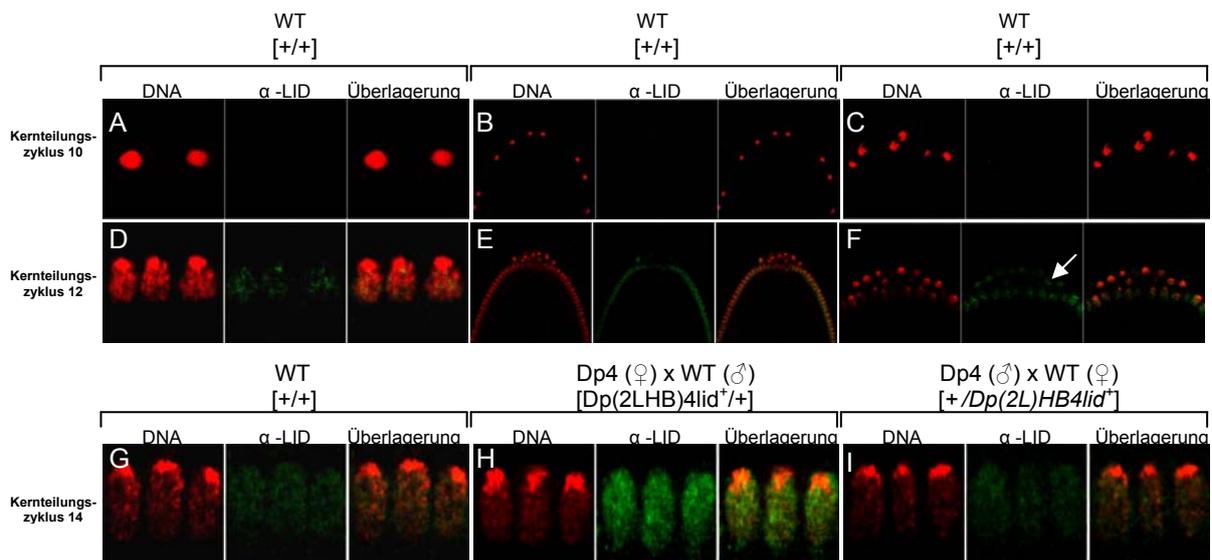


Abbildung 3.19: Zygotische *lid*-Expression und maternaler Effekt auf die embryonale Konzentration von LID in *Drosophila melanogaster*.

Immunocytochemische Analysen des zygotisch exprimierten LID-Proteins, während der Kernteilungszyklen 10 (A-C), 12 (D-F) und 14 (G-I). LID-Färbung in somatischen Zellen von WT-Embryonen (A-G) und nach Kreuzung von *Dp(2L)HB4lid⁺* homozygoten Weibchen mit Wildtypmännchen (H) und reziproker Kreuzung (I). LID in Polzellen (Pfeil) von WT-Embryonen des Kernteilungszyklus 12 (F). Das Protein wurde mit einem spezifischen LID-AK detektiert. Die Anfärbung der DNA der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

Lid gehört ebenfalls zu den ersten zygotisch exprimierten Genen. Das Protein ist im Embryo ab dem 12. Kernteilungszyklus im Euchromatin nachweisbar (Abb. 3.19 D-F). In früheren Zyklen konnte LID noch nicht detektiert werden (Abb. 3.19 A-C). Im zellulären Blastoderm und während der Gastrulation ist LID mit dem Euchromatin assoziiert. LID ist darüber hinaus in den Polzellen nachweisbar (Abb. 3.19 F, Pfeil). Weiterhin wurde festgestellt, dass das maternale Allel stärker oder das paternale schwächer exprimiert wird. In den Nachkommen der Kreuzung *lid*-Überexpressions-Weibchen mit Wildtyp-Männchen ist eine höhere LID-Proteinkonzentration (Abb. 3.19 H) gegenüber dem reziproken Ansatz (Abb. 3.19 I) zu beobachten.

3.10 *In vivo*-Demethylaseaktivität von *DmLID* in Zellkulturen

Ein in *E.coli* rekombinant hergestelltes LID-Vollängenprotein war sehr schlecht löslich und konnte für einen funktionalen *in vitro*-Assay nicht genutzt werden. Aus diesem Grund wurden zwei Zelllinien, S2 und Kc 167 (DGRC, Bloomington) aus *Drosophila melanogaster*, mit einem Vollängen-*lid*-cDNA- und einem Mutantenkonstrukt (Abb. 3.20), induziert- bzw. konstitutiv-exprimierend transfiziert (Tabelle 2.6) und stabil exprimierend etabliert. Die für den LID-Funktionsnachweis interagierenden und essentiellen Proteine des gesamten LID-Komplexes sind endogen in den Zelllinien vorhanden. Die zur Transfektion verwendeten Konstrukte sind in der Abbildung 3.20 aufgeführt.

LID-V5-HIS



LID^{H637A}-V5-HIS

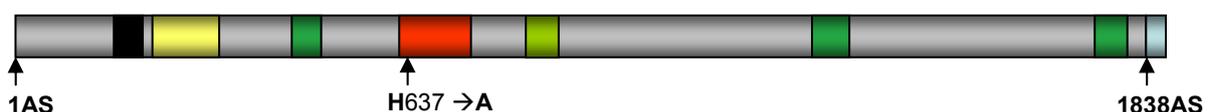


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der beiden LID-Konstrukte zur Etablierung stabiler Zelllinien.

Funktionales (oben) und funktionsloses LID-Vollängenprotein (unten, Austausch von Histidin zu Alanin) mit C-terminalem-V5-HIS-Tag zur Etablierung stabiler S2- und Kc167-Zelllinien.

3 Ergebnisse

Ein funktionales Vollängen-*lid*-cDNA- und ein funktionsloses Mutantenkonstrukt, mit einem Aminosäureaustausch (H637A) in der funktionellen JmjC-Domäne, wurden in die Vektoren pMT-V5-His und pAC5.1-V5-His (Invitrogen) eingebracht. Die Expression des Vektors pMT-V5-His steht unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors (Induktion der Expression mit Kupfersulfat) und die des Vektors pAC5.1-V5-His unter der des konstitutiven Actin-Promotors. Nach Co-Transfektion mit pCoBlast (Invitrogen) wurden für beide Konstrukte transgene Zelllinien erhalten, die ein LID- bzw. LID^{H637A}-V5-HIS-Fusionsprotein exprimieren. Unter der Zugabe von Blasticidin-S-HCL (Invitrogen) wurde auf stabil exprimierende Zelllinien selektiert. Putative transgene S2- und Kc167-Zelllinien wurden mit einem spezifischen LID- und einem V5-AK untersucht. Mit dem α -V5-Antikörper konnte indirekt die Transfektion und direkt die Expression der Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 3.21). In der ersten Spur (Abb. 3.21, Pfeil) wird mit dem LID-Antikörper im Gesamtzellextrakt von Wildtyp-S2-Zellen das endogene LID detektiert. Die endogenen und die rekombinanten LID-Proteine sind mit dem LID-Antikörper in den Spuren 2 und 3 (Abb. 3.21) nachgewiesen.

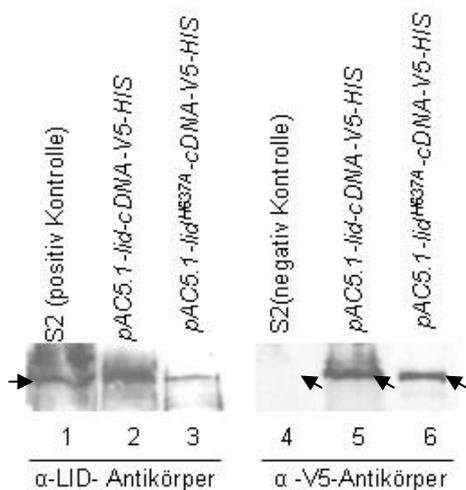


Abbildung 3.21: *lid*-Expressionsnachweis transfizierter S2-Zellen.

Nachweis von endogenem LID-Protein (Spur 1, Pfeil) und von konstitutiv exprimierenden LID- bzw. LID^{H637A}-V5-HIS-Protein (Spuren 5 und 6) in WT-S2- bzw. stabil transfiziertem S2-Gesamtzellextrakt. Detektiert wurde mit α -LID- (1:5000) und α -V5-Antikörper (1:2000; Invitrogen), S2-Zellen (Spuren 1 und 4, *Drosophila melanogaster*) dienen als Kontrolle.

Es ist nicht möglich die endogenen von den rekombinanten Proteinen getrennt voneinander aufzulösen, da der V5-HIS-Tag das Molekulargewicht nur um 2,6kDa erhöht. Bei einer Gesamtgröße von 204kDa und 206,6kDa lassen sich die Banden nicht unterscheiden und zeigen die gleiche Größe. Die Expression der rekombinanten LID-V5-HIS-Fusionsproteine ist jedoch mit einem V5-Antikörper nachweisbar und wird in den Spuren 5 und 6 (Abb. 3.21) in rekombinantem S2-Zellextrakt gezeigt. Im Wildtypextrakt konnte kein Protein mit dem V5-Antikörper (Abb. 3.21, Pfeil in Spur 4) detektiert werden.

3 Ergebnisse

Die transfizierten Zellen wurden immunozytologisch auf H3K4me3 untersucht (Abb. 3.22). In den mit dem Vollängen-*lid*-cDNA-Konstrukt stabil transfizierten S2-Zellen ist im Vergleich zum untransfizierten Wildtyp (Abb. 3.22 A) die H3K4-Trimethylierung (grün) stark reduziert (Abb. 3.22 C). Im Gegensatz dazu weisen die Zellen, die zusätzlich das *lid*-cDNA^{H637A}-Mutantenkonstrukt exprimieren (Abb. 3.22 B), Wildtypfärbung auf (Lee et al., 2006; Eissenberg et al., 2007; Secombe et al., 2007). Die reduzierte H3K4 Trimethylierung bei erhöhter *lid*-Expression belegt, dass LID eine H3K4me3 Demethylase ist.

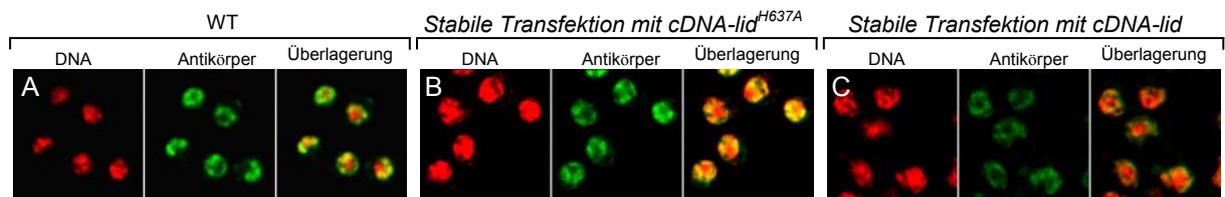


Abbildung 3.22: Reduktion von H3K4me3 nach Überexpression von LID in S2-Zellen. *Drosophila melanogaster* S2-Zellen sind stabil mit einem Vollängen-*lid*-cDNA-Konstrukt (C) bzw. (B) einem Vollängen-*lid*-cDNA^{H637A}-Mutantenkonstrukt (B) transfiziert. Die Histonmodifikation H3K4me3 (grün) wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:200) der Firma Upstate detektiert und die DNA der Zellkerne mit DAPI (rot) angefärbt.

3.11 *In vivo*-Kontrolle von H3K4me3 durch LID

Immunozytologische Analysen mit einem H3K4me3-spezifischen Antikörper belegen, dass eine Erhöhung der *lid*-Expression zu einer signifikanten Reduktion von H3K4me3 in S2-Zellen führt und, dass das aktive Zentrum von LID in der JmjC-Domäne liegt (siehe Abb. 3.22). Die JmjC-Domäne von LID katalysiert spezifisch die Demethylierung von H3K4me3 zu H3K4me2 (Secombe et al., 2007; Eissenberg et al., 2007; Lee et al., 2007; Lee et al., 2009). H3K4-Methylierung hat einen starken Einfluss auf die Bindung von Proteinkomplexen wie zum Beispiel des NuRD-Komplexes (Zegerman et al., 2002). Im Euchromatin kann der NuRD-Komplex an Promotorregionen aktiver Gene binden. An diese Promotorregionen gebundene H3K4-methylierte Histone verhindern die Bindung des NuRD-Komplexes (Zegerman et al., 2002). Folglich kommt es an diesen Regionen nicht zur Aktivierung der Deacetylaseaktivität des NuRD-Komplexes, H3K9-Methylierung wird verhindert, HP1 kann nicht binden, Heterochromatin kann sich nicht etablieren und die aktiven Gene bleiben Transkriptions-aktiv (Zegerman et al., 2002; Nishioka et al., 2002). Das Zusammenspiel zwischen H3K4me3 und NuRD-Komplex-Bindung zeigt, dass

H3K4me3 eine große Bedeutung in der Embryonalentwicklung durch die Regulierung der Genaktivität hat.

Um H3K4me3 in Embryonen zu untersuchen, wurden Kernextrakte von 2-3h alten Embryonen im Westernblot analysiert. Tatsächlich konnte in einer *lid*-Überexpressionslinie, mit Hilfe eines H3K4me3-spezifischen Antikörpers, eine signifikante Reduktion von H3K4me3 nach Überexpression von *lid* nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde mit einem spezifischen LID-AK ein deutlicher Anstieg des LID-Proteins bestätigt (Abb. 3.23).

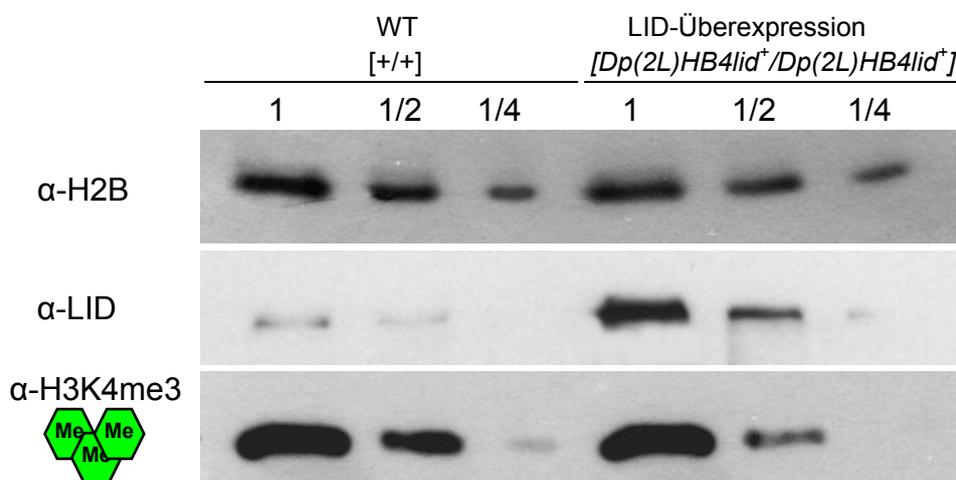


Abbildung 3.23: LID-abhängige Demethylierung von H3K4me3 in embryonalen Gesamtkernextrakten von 2-3h alten *Drosophila*-Embryonen. In einer Verdünnungsreihe (1 Volumeneinheit, ½ Volumeneinheit und ¼ Volumeneinheit) wurden gleiche Mengen an embryonalen Kernextrakt von Wildtyp und einer *LID*-Überexpressionslinie (*Dp(2L)HB4lid⁺*) auf separate Westernblots aufgetragen und mit α-H2B-Antikörper (oben) zur Quantifizierung, α-LID-Antikörper (Mitte) und α-H3K4-Trimethyl (unten) markiert.

Diese H3K4me3-Demethylaseaktivität von LID konnte in spezifischen *in vitro*-Assays bestätigt werden (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung). In einem Baculovirus-Expressionssystem wurden ein Wildtyp- (1-960aa) und ein Mutantenkonstrukt (1-960aa mit Aminosäureaustausch H637A) von *lid* exprimiert, gereinigt und auf seine enzymatische Aktivität getestet. Im Gegensatz zum *in vivo*-Experiment wurde *in vitro* auch eine Demethylierung von H3K4me2 zu H3K4me1 nachgewiesen (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung). Massenspektroskopische Analysen bestätigten die Demethylierung dieser beiden Histonmodifizierungen (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung). Weitere Analysen ergaben, dass die enzymatische Aktivität von LID unbeeinflusst vom Vorhandensein einer zusätzlichen H3K9 Acetylierung bzw. H3K9 Di- oder Trimethylierung erfolgt (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung).

3.12 Einfluss von LID auf Histonmodifikationen in frühen Embryonalstadien von *Drosophila melanogaster*

Immunozytologische Analysen mit einem LID-spezifischen Antikörper (LID-AK) lassen den Schluss zu, dass *lid* bereits früh zygotisch exprimiert wird und auf Proteinebene kaum eine maternale Komponente nachweisbar ist. Nach Kreuzung von *lid*/*Balancer*-Tieren wird bei 1/3 der Embryonen keine Färbung für LID beobachtet (Schicht, 2007). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass *lid* offensichtlich zu den frühen zygotischen Genen gehört und keine signifikante maternale Komponente nachzuweisen ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Protein in den Interbanden des Euchromatins von Speicheldrüsen gebunden und dass das Chromozentrum ausgespart ist (Lee et al., 2007). Um den Einfluss von LID auf Histonmodifizierung im frühen Embryo zu untersuchen, wurden Embryonen während der ersten 14 Kernteilungszyklen bis zum Beginn der Gastrulation, von Wildtyp, *lid*-Nullallelen und *lid*⁺-Überexpressionsallelen analysiert.

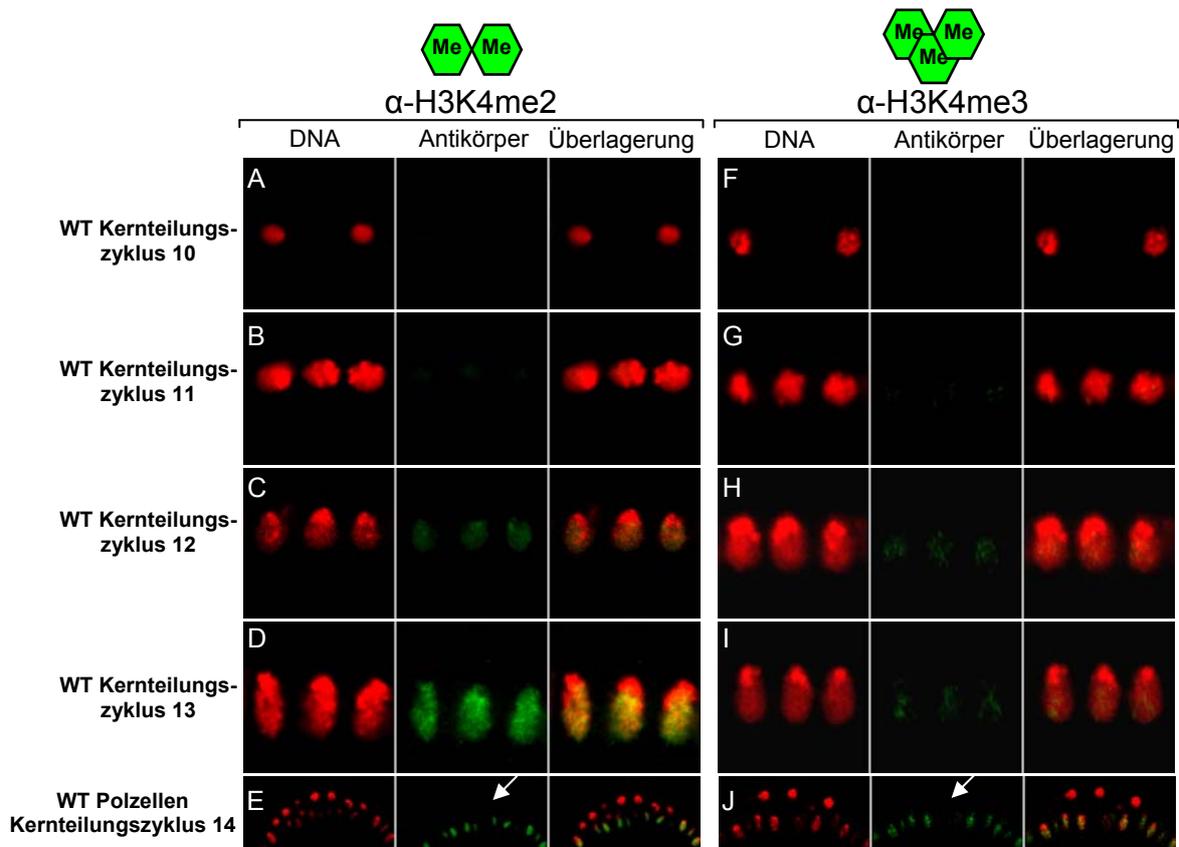


Abbildung 3.24: H3K4me2 und H3K4me3 in der frühen Embryonalentwicklung. Die Analyse von H3K4me2 (A-E) und H3K4me3 (F-J) erfolgte an Wildtypembryonen des Kernteilungszyklus 10-14 von *Drosophila melanogaster*. Der Pfeil markiert die Polzellen. Die Histonmodifikationen wurden mit spezifischen Antikörpern (grün) detektiert und die DNA der Zellkerne zusätzlich mit DAPI (rot) angefärbt.

3 Ergebnisse

Aktive posttranslationale Histonmodifikationen, wie H3K4-Methylierung und H3K9-Acetylierung bestimmen das Euchromatin. Diese Markierungen werden bereits in frühen Embryonalstadien ab dem 11. Embryonalzyklus etabliert. Für die Analysen wurden drei benachbarte somatische Kerne stark vergrößert aufgenommen. Exemplarisch dazu sind in Abbildung 3.24 die Ergebnisse für die aktiven Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3 dargestellt (Schicht, 2007). Die beiden Methylierungsstufen H3K4me2 und H3K4me3 sind bereits ab dem 11. Kernteilungszyklus im Wildtypembryo (Abb. 3.24 B und G) als euchromatische Histonmodifizierung nachweisbar. In der weiteren Entwicklung nehmen bis zum 13. Zyklus die Konzentrationen der beiden Modifikationen (Abb. 3.24 C, D und H, I) im Euchromatin zu. Im Gegensatz dazu werden keine H3K4me2- (Rudolph et al., 2007) und H3K4me3-Methylierungen in den Polzellen beobachtet (Abb. 3.24E und J). Das Fehlen dieser Modifikationen in den Polzellen spiegelt die transkriptionelle „Quiescence“ in der Keimbahn wider (Schaner et al., 2003).

Ab Zyklus 14 wird ein signifikanter Unterschied in der euchromatischen Bindung von LID zwischen den untersuchten *lid*-Genotypen nachgewiesen. Da zwischen dem 10. und dem 14. Zyklus die Differenzierung von Eu- und Heterochromatin erfolgt, wurde der 14. Zyklus (Abb. 3.25) besonders intensiv untersucht.

Während des 14. Kernteilungszyklus ist LID im Euchromatin assoziiert (siehe Abb. 3.14; Lee et al., 2007). Dass LID die Trimethylierung von H3K4 demethylieren kann, wurde sowohl *in vivo* an transgenen S2-Zellen (siehe Abb. 3.22) und embryonalem Kernextrakt (siehe Abb. 3.23) als auch *in vitro* gezeigt (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung; Lee et al., 2007). Die erhöhte *lid*-Expression in *Dp(2L)HB4lid⁺* führt in Embryonen des 14. Kernteilungszyklus zur Abnahme von H3K4me3 (Abb. 3.25 F). Diese Euchromatin-spezifische Modifikation ist in *lid*-Nulltierembryonen, *lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, (Abb. 3.25 E) erhöht. Durch das Fehlen des zygotisch exprimierten LID-Proteins breitet sich die für das Euchromatin spezifische Modifikation H3K4me3 bis in die Grenzregion des Eu- und Heterochromatins aus. In der *lid*-Überexpressionslinie lässt sich neben der Abnahme von H3K4me3 ein Anstieg von H3K4me2 (Abb. 3.25 C) beobachten. Die Akkumulation von H3K4me2 kann auf die erhöhte LID-Konzentration (siehe Abb. 14 F), wodurch ein vermehrter Abbau von H3K4me3 zu H3K4me2 stattfindet, als auch auf die Abnahme von SU(VAR)3-3 (Abb. 3.25 I) zurückgeführt werden. Ein Anstieg von SU(VAR)3-3 (Abb. 3.25 H) in der *lid*-Nullmutante ist mit gleichzeitiger Reduktion von H3K4me2 (Abb. 3.25 B) zu

3 Ergebnisse

beobachten. Für H3K4me1 wurden in den untersuchten *lid*-Genotypen keine Unterschiede nachgewiesen (M. Schicht, persönliche Mitteilung).

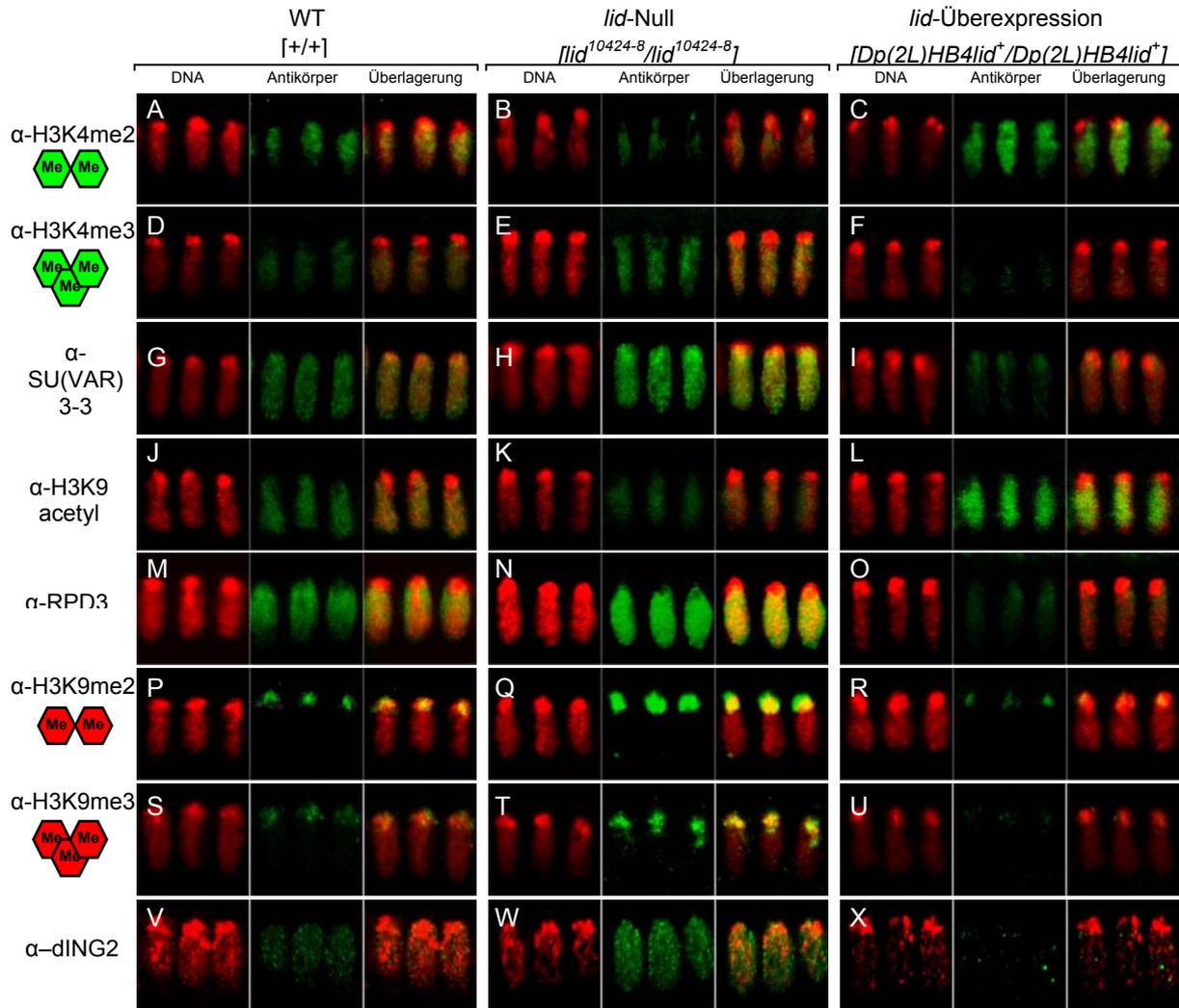


Abbildung 3.25: Einfluss von LID auf Histonmodifikationen und modifizierende Proteine während des 14. Kernteilungszyklus von Embryonen bei *Drosophila melanogaster*.

Nachweis von H3K4me2 (A-C), H3K4me3 (D-F), SU(VAR)3-3 (G-I), H3K9acetyl (J-L), RPD3 (M-O), H3K9me2 (P-R), H3K9me3 (S-U) und dING2 (V-X) erfolgte an Embryonen vom Wildtyp (A, D, G, J, M, P, S und V), von *lid*-Nulltieren, *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ (B, E, H, K, N, Q, T und W) und einer *lid*-Überexpressionslinie, *Dp(2L)HB4lid*⁺, (C, F, I, L, O, R, U und X). Die Histonmodifikationen und Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern (grün) detektiert und die DNA der Zellkerne zusätzlich mit DAPI (rot) angefärbt.

Die erhöhte LID-Menge führt in der *lid*-Überexpressionslinie nicht nur zur Verringerung von H3K4me3, sondern auch zur Erhöhung der H3K9ac (Abb. 3.25 L). Diese Erhöhung korreliert mit einer signifikanten Reduktion von RPD3 (Abb. 3.25 O). Die H3K9ac und die Bindung von RPD3 sind im Wildtyp ab dem 10. Kernteilungszyklus ubiquitär über das Euchromatin bis in die Grenzregion des Eu-

3 Ergebnisse

und Heterochromatins verbreitet (Daten nicht gezeigt). Während in der *lid*-Überexpression H3K9ac erhöht ist, kann in *lid*-Nulltieren eine Reduktion (Abb. 3.25 K) beobachtet werden, die mit einer Erhöhung von RPD3 (Abb. 3.25 N) einhergeht. Die Erhöhung der RPD3-Menge in den *lid*-Nulltieren und die Abnahme der Deacetylasekonzentration in der *lid*-Überexpression wurden quantitativ bestätigt (Abb. 3.26). Die RPD3-Konzentration in *lid*-Nulltieren resultiert somit aus einem erhöhten *rpd3*-mRNA-Level, während der *rpd3*-mRNA-Level in der *lid*-Überexpressionslinie reduziert ist.

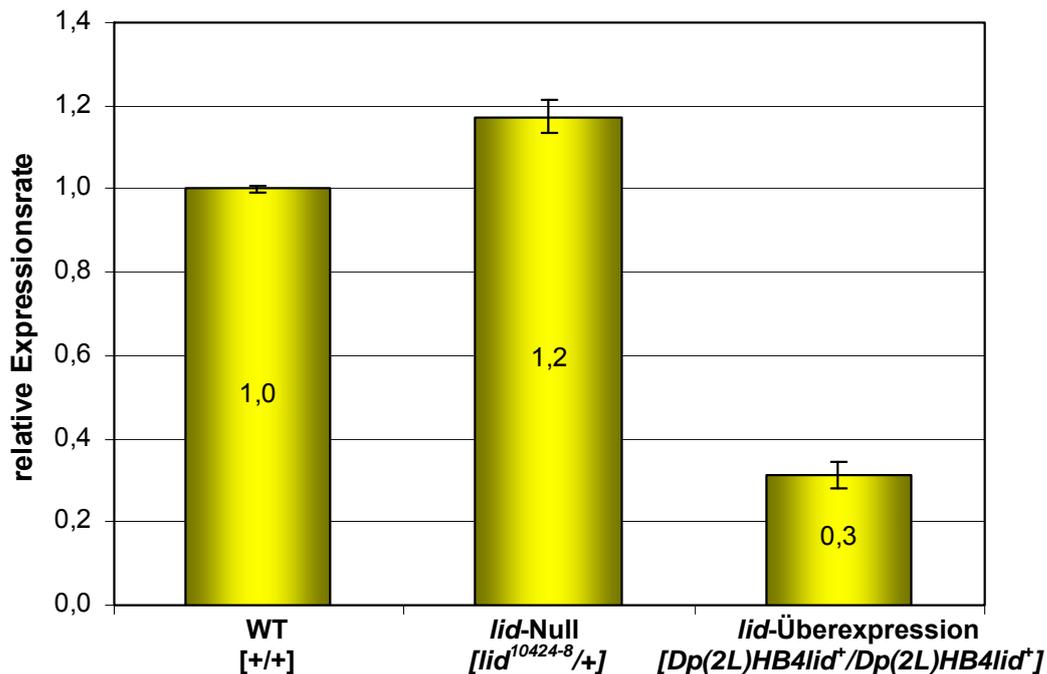


Abbildung 3.26: Quantitative Analyse des *Rpd3*-Transkripts an Embryonen von *Drosophila*.

Die mRNA-Analyse erfolgte an Embryonen des 14. Kernteilungszyklus von Wildtyp, heterozygoter *lid*-Nulltiere (*lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸) und einer *lid*-Überexpressionslinie (*Dp*(2L)*HB4lid*⁺). Normalisiert wurde über *rp49*. Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl (2001).

Euchromatin-spezifische H3K9-Acetylierung hemmt die Methylierung von H3K9 und Heterochromatin kann sich nicht etablieren (Ebert et al., 2006; Rudolph et al., 2007). Diese Hemmung führt in der *lid*-Überexpressionslinie zu einer Abnahme von H3K9me2 und me3 (Abb. 3.25 R und U) und spiegelt sich im Triplo-Suppressoreffekt wider (siehe Abb. 3.1). Die Abnahme von H3K9me2 wurde mittels ChIP-Analyse bestätigt (S. Lein, persönliche Mitteilung). In den *lid*-Nulltieren ist neben der Abnahme von H3K9ac eine Erhöhung von H3K9me2 und me3 zu beobachten (Abb. 3.25 Q und T), die sich im Haplo-Enhancereffekt zeigt (siehe Abb. 3.1). Eine

Veränderung der H3K9me1 konnte in den untersuchten *lid*-Genotypen nicht nachgewiesen werden (M. Schicht, persönliche Mitteilung).

Neben dLID wurde auch für ING2 (Inhibitor of Growth 2), einem Vertreter der humanen ING-Familie, H3K4 Trimethylbindung nachgewiesen (Pena et al., 2006; Shi et al., 2006). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass das *Drosophila*-Homologe dING2 auch H3K4me3 binden kann und mit LID um diese euchromatische Modifikation in *Drosophila melanogaster* konkurriert. Mit dem in dieser Arbeit hergestellten dING2-Antikörper (siehe Abb. 3.16) konnte eine euchromatische Verteilung der dING2-Bindung im Wildtyp (Abb. 3.25 V) nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine veränderte LID-Konzentration die dING2-Bindung beeinflusst (Abb. 3.25 W und X). Während in *lid*-Nulltieren die dING2-Konzentration erhöht ist, kommt es nach *lid*-Überexpression zur Reduktion.

Die erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass LID, als H3K4 Trimethyl-Demethylase, zur Aufrechterhaltung des Euchromatins und zum Schutz vor der Etablierung und Ausbreitung des Heterochromatins dient. LID steuert indirekt die Bindung von dING2. *In vitro*-Assays zeigen, dass dING2 H3K4me2 und H3K4me3 binden kann (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung). Das humane ING1, ein weiteres Mitglied der ING-Familie, kontrolliert die Aktivität von Histonacetyltransferasen (HATs) bzw. Histondeacetyltransferasen (HDACs, Feng et al., 2002). Bei ING2 aus der Maus wurde nachgewiesen, dass es den SIN3a-HDAC1-Komplex stabilisiert (Shi et al., 2007). Diese Ergebnisse ermöglichen den Schluss, dass H3K4-Trimethylierung über die Bindung von dING2 die Rekrutierung und Aktivität von HDAC reguliert und somit H3K9ac regeln könnte. Die H3K4-Trimethylierung wird von LID kontrolliert. LID schützt demnach euchromatische Regionen vor der Ausbreitung und Etablierung heterochromatischer Histonmarkierungen.

3.13 Einfluss von LID auf Histonmodifikationen in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*

Die in den frühen Embryonalstadien und in der Analyse der Zelllinien erhaltenen Ergebnisse wurden durch Untersuchungen polytärer Speicheldrüsenchromosomen überprüft. In *Drosophila melanogaster* sind die Chromosomen der Speicheldrüsen mehr als 1000-fach polytänisiert. Die Polytänisierung betrifft nur euchromatische Bereiche, während das perizentromäre Heterochromatin aller Chromosomen zum

Chromozentrum fusioniert. Die Differenzierung des Euchromatins in Banden und Interbanden entspricht der linearen Anordnung der Gene im Chromosom. Banden stellen transkriptionsinaktive Gene dar. In Polytäanchrosomen ist LID nur im Euchromatin zu finden, assoziiert ausschließlich mit Interbanden und ist mit H3K4me3 kolokalisiert (siehe Abbildung 3.17; Lee et al., 2007; Lee et al., 2009). Immunozytologische Analysen von Embryonen und S2-Zellen zeigen, dass LID *in vivo* H3K4me3 reguliert und die LID-Konzentration negativ mit der RPD3-, SU(VAR)3-3 und dING2-Bindung (siehe Abb. 3.25) korreliert. *Lid* wird früh zygotisch exprimiert und assoziiert mit Euchromatin. SU(VAR)3-3 ist eine spezifische H3K4me2- und H3K4me1-Demethylase, die früh embryonal präferentiell mit Heterochromatin assoziiert ist und hier eine protektive Funktion besitzt. Die chromosomale SU(VAR)3-3-Verteilung zeigt, dass die Demethylase genauso wie H3K4me2 und H3K4me1 in Interbanden kolokalisiert ist (Rudolph et al., 2007). Die Anwesenheit von SU(VAR)3-3 im Heterochromatin verhindert H3K4-Methylierung. In SU(VAR)3-3-Mutanten wird durch H3K4-Methylierung die Aktivität von SU(VAR)3-9 gehemmt und eine Reduktion von H3K9 Methylierung im Heterochromatin gefunden (Rudolph et al., 2007).

Zur Analyse der Histonmodifikationen und Proteine wurden polytäre Speicheldrüsenchromosomen des dritten Larvenstadiums von Wildtyp, *lid*⁻-Nullallelen und *lid*⁺-Duplikationen bzw. transgene Linien mit zusätzlicher *lid*-cDNA-Kopie analysiert (Abb. 3.27). In *lid*⁻-Speicheldrüsen (Abb. 3.27 H), genauso wie in *lid*⁻-Embryonen (siehe Abb. 3.25 E), ist eine Erhöhung der H3K4me3-Bindung zu beobachten, die sich nicht in das perizentromäre Heterochromatin und Banden ausbreitet (Daten nicht gezeigt). Während in Embryonen der *lid*-Überexpressionslinie H3K4me2 akkumuliert vorliegt (siehe Abb. 3.25 C), wird in Speicheldrüsen eine Reduktion (Abb. 3.27 F) beobachtet. Die Abnahme von H3K4me2 korreliert offensichtlich mit einer erhöhten chromosomalen SU(VAR)3-3-Bindung (Abb. 3.27 L) und die erhöhte LID-Menge mit einer Abnahme von H3K4me3 (Abb. 3.27 I). H3K4me2 liegt in *lid*⁻-Embryonen reduziert (siehe Abb. 3.25 B) und in Speicheldrüsen erhöht vor (Abb. 3.27 E), während die embryonale SU(VAR)3-3-Bindung erhöht (siehe Abb. 3.25 H) und die chromosomale Bindung reduziert (Abb. 3.27 K) ist. Für embryonales H3K4me1 wurde keine Änderung der Assoziation nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), während H3K4me1 in Speicheldrüsenchromosomen positiv mit H3K4me2 korreliert (Abb. 327 A-C). Daraus lässt sich schließen, dass LID im

3 Ergebnisse

Embryo SU(VAR3)-3 bei der Etablierung von Heterochromatin reguliert. Nachdem sich Heterochromatin etabliert hat, korreliert die Bindung von SU(VAR)3-3 mit LID. Das LID-Protein liegt vermutlich in einem Komplex mit der Histondemethylase dLSD1 vor oder beeinflusst direkt oder indirekt dessen Expression oder Funktion.

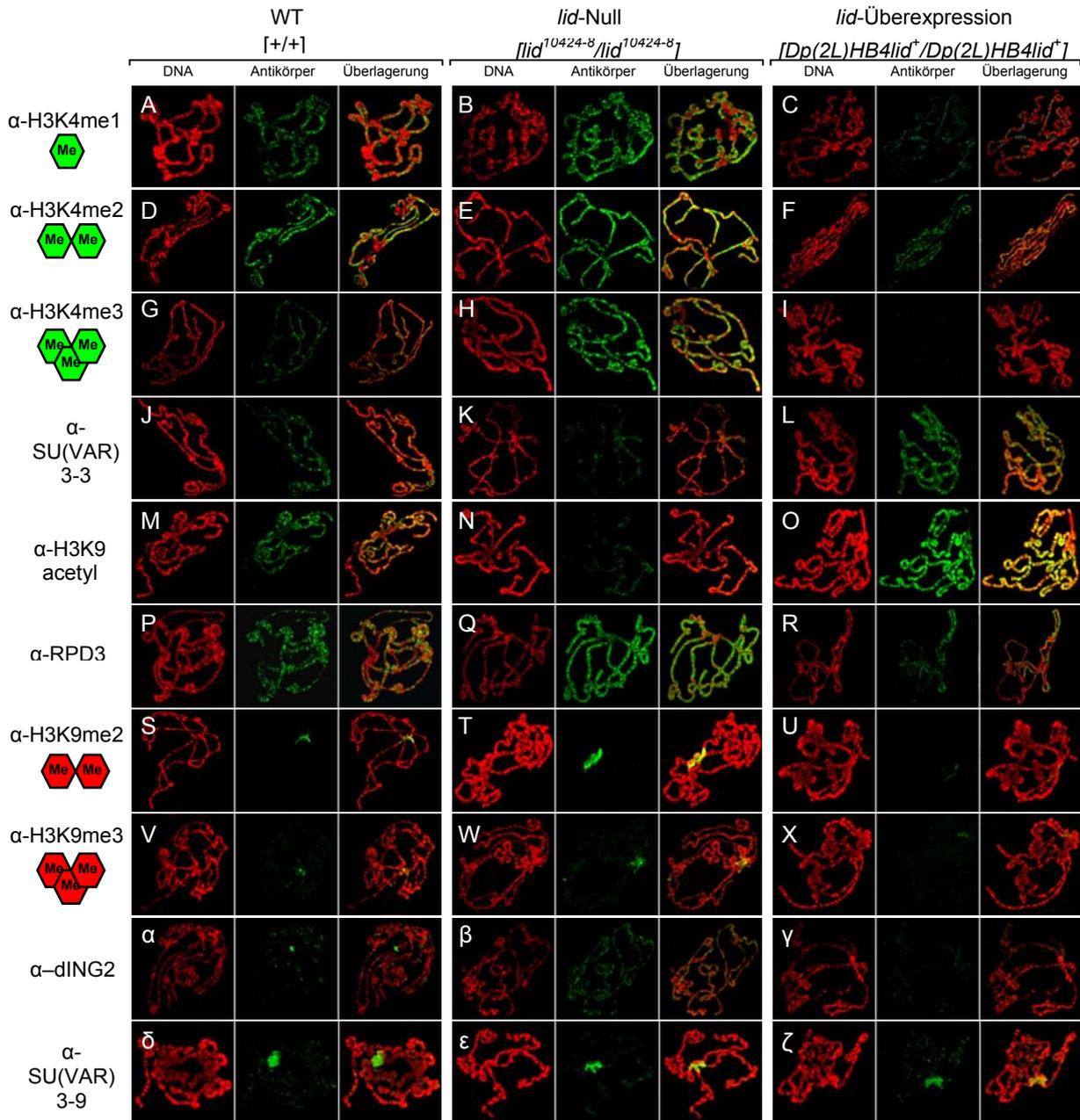


Abbildung 3.27: Einfluss von LID auf Histonmodifikationen und modifizierende Proteine in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*.

Nachweis von H3K4me1 (A-C), H3K4me2 (D-F), H3K4me3 (G-I), SU(VAR)3-3 (J-L), H3K9acetyl (M-O), RPD3 (P-R), H3K9me2 (S-U), H3K9me3 (V-X), dING2 (α-γ) und SU(VAR)3-9 (δ-ζ) erfolgte an Speicheldrüsenchromosomen vom Wildtyp (A, D, G, J, M, P, S, V, α und δ), von *lid*-Nulltieren, *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ (B, E, H, K, N, Q, T, W, β und ε) und einer *lid*-Überexpressionslinie, *Dp(2L)HB4lid*⁺ (C, F, I, L, O, R, U, X, γ und ζ). Die Histonmodifikationen und Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern (grün) detektiert und die DNA der Zellkerne zusätzlich mit DAPI (rot) angefärbt.

In Embryonen und Speicheldrüsenchromosomen korrelieren H3K4me3 und RPD3-Bindung. Eine erhöhte LID-Konzentration in Speicheldrüsen von *Dp(2L)HB4lid⁺* führt neben der Abnahme von H3K4me3 (Abb. 3.27 I) zur Erhöhung von H3K9ac (Abb. 3.27 O). Die Zunahme der H3K9-Acetylierung resultiert offensichtlich aus der Abnahme der RPD3-Bindung (Abb. 3.27 R). In *lid*-Nulltieren dagegen wird eine Reduktion von H3K9ac (Abb. 3.27 N) beobachtet, die mit einer Akkumulation von RPD3 (Abb. 3.27 Q) einhergeht. Während H3K9ac und RPD3 in Embryonen mit Euchromatin assoziiert, ist in den Speicheldrüsenchromosomen H3K9ac an Banden und RPD3 an Interbanden lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass die zelluläre Konzentration beider Enzyme einer exakten Kontrolle unterliegt. Veränderungen in der Konzentration dieser Enzyme führen zu signifikanten Änderungen der globalen Konzentration von H3K4 Trimethyl und H3K9 Acetyl (Abb. 3.27 G-I und M-O).

Die Erhöhung und die Reduktion der RPD3-Menge in den *lid*-Nulltieren bzw. der *lid*-Überexpression konnte in Speicheldrüsen quantitativ bestätigt werden (Abb. 3.28). Während in den *lid*-Nulltieren die RPD3-Konzentration aus einem erhöhten *rpd3*-mRNA-Level resultiert, ist in der *lid*-Überexpressionslinie die *rpd3*-mRNA-Menge reduziert.

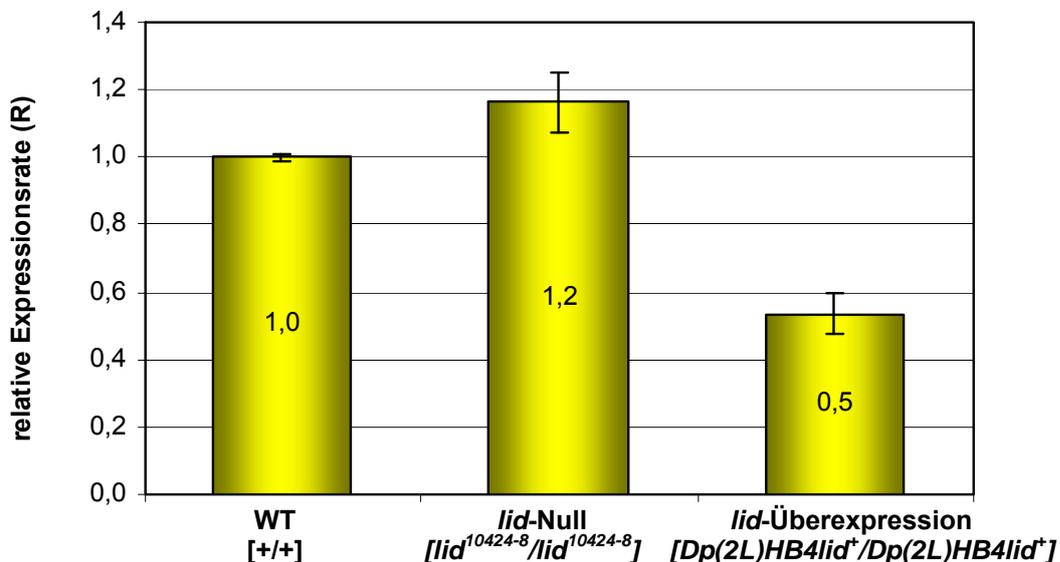


Abbildung 3.28: Quantitative Analyse des *Rpd3*-Transkripts an Speicheldrüsen von *Drosophila*.

Die mRNA-Analyse erfolgte an Speicheldrüsen vom Wildtyp, *lid*-Nulltieren (*lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸) und einer *lid*-Überexpressionslinie (*Dp(2L)HB4lid*⁺). Normalisiert wurde über *rp49*. Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl (2001).

In Embryonen und Speicheldrüsenchromosomen von *lid*-Überexpressionstieren wird neben der Abnahme von RPD3 und der daraus resultierenden Erhöhung von H3K9ac auch die Reduktion von H3K9me2 und me3 (Abb. 3.27 U und X) beobachtet, während in der Mutante eine Erhöhung von H3K9me2 und me3 (Abb. 3.27 T-W) nachgewiesen wurde. In polytären Speicheldrüsenchromosomen wird H3K9-Methylierung vorrangig im perizentrischen Chromatin und einigen euchromatischen Banden nachgewiesen (Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004; Ebert et al., 2006). Die in *Drosophila melanogaster* für H3K9me2 und me3 verantwortliche Methyltransferase ist SU(VAR)3-9 (Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004). In den untersuchten Genotypen ist in den Speicheldrüsenchromosomen die Bindung von SU(VAR)3-9 (Abb. 3.27 δ -ζ) und von H3K9me1 (Daten nicht gezeigt) unverändert. Da SU(VAR)3-9 unverändert vorliegt und für LID *in vitro* nur H3K4 Demethylierungs- und keine H3K9 Demethylierungsaktivität nachgewiesen wird (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung), reguliert LID nicht dessen Bindung, sondern direkt oder indirekt dessen Aktivität oder eine andere H3K9-Methylase. Die hohe H3K9ac-Assoziation im *lid*⁺-Hintergrund und die daraus resultierende reduzierte H3K9me2- und H3K9me3-Konzentration ist Ursache für die Hemmung der Etablierung von Heterochromatin, welche sich im Triplo-Suppressoreffekt widerspiegelt (siehe Abb. 3.2).

Neben dem LID-Protein in *Drosophila melanogaster* wurde auch für ING2 (Inhibitor of Growth 2), einem Vertreter der humanen ING-Familie, H3K4 Trimethylbindung nachgewiesen (Pena et al., 2006; Shi et al., 2006). Die Menge an dING2 wird in polytären Chromosomen larvaler Speicheldrüsen an Interbanden gefunden (Daten nicht gezeigt). In den untersuchten Embryonen wurde bei *lid*-Überexpression eine Abnahme und in den *lid*-Nulltieren eine Erhöhung der dING2-Bindung gezeigt (siehe Abb. 3.25 V-X). Diese Veränderungen korrelieren mit denen, die in polytären Speicheldrüsen beobachtet werden (Abb. 3.27α-γ). Des Weiteren wurde *in vitro* die H3K4me3-Bindung von mING2 (Maus ING2) und dING2 (*Drosophila* ING2) nachgewiesen (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung). Weiterhin wurde gezeigt, dass ING-Proteine die Rekrutierung von Deacetylasen an Chromatin kontrollieren (Pena et al., 2006; Shi et al., 2006). Verstärkungen von H3K4me3 führen somit über eine Erhöhung der ING2-Bindung auch zur verstärkten Rekrutierung von RPD3 und zur Reduktion von H3K9ac.

3.14 Funktionelle Interaktion der Demethylasen SU(VAR)3-3 und LID

LID und SU(VAR)3-3 sind H3K4 Demethylasen und assoziieren in Polytänchromosomen mit Interbanden (Lee et al., 2007; Rudolph et al., 2007; Lee et al., 2009). SU(VAR)3-3 demethyliert *in vivo* spezifisch H3K4me2 und H3K4me1 und LID H3K4me3. In *lid*⁺-Embryonen (*Dp(2L)HB4lid*⁺) wird eine Reduktion der embryonalen SU(VAR)3-3-Konzentration und eine Erhöhung von H3K4me2 nachgewiesen, während in *lid*-Nulltieren (*lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸) eine Erhöhung der zellulären SU(VAR)3-3-Menge und eine reduzierte Assoziation von H3K4me2 beobachtet wird (siehe Abb. 3.25). Die chromosomale Konzentration von SU(VAR)3-3 ist in Polytänchromosomen der *lid*-Überexpressionslinie gegenüber dem Wildtyp erhöht und in *lid*-Nulltieren (*lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸) reduziert (siehe Abb. 3.27). Hier korreliert H3K4me2 mit SU(VAR)3-3. In der *lid*-Überexpressionslinie ist eine Abnahme und in *lid*-Nulltieren eine Erhöhung von H3K4me2 zu beobachten. H3K4me3 liegt in Embryonen und in Polytänchromosomen der *lid*-Überexpressionslinie reduziert und in der *lid*-Nulllinie erhöht vor und korreliert negativ zur Menge an LID.

Um mehr über einen möglichen funktionellen Zusammenhang der beiden spezifischen Demethylasen, LID und SU(VAR)3-3 zu erfahren, wurde in Embryonen und polytänen Speicheldrüsen die Assoziation von LID untersucht. LID wurde embryonal und chromosomal im *Su(var)3-3*⁻-Nullgenotyp (*Df(3R)TR2Su(var)3-3*⁻/*Su(var)3-3*¹²) und einer *Su(var)3-3*⁺-Überexpression (*Dp(3L)TR3Su(var)3-3*⁺/*Dp(3L)TR3Su(var)3-3*⁺) überprüft (Abb. 3.29 A-F).

Im *Su(var)3-3*⁻-Nullgenotyp und nach *Su(var)3-3*⁺-Überexpression wurden im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede der zellulären (Abb. 3.29 A-C) und der chromosomalen LID-Konzentration festgestellt (Abb. 3.29 D-F). H3K4me3 wurde nach *Su(var)3-3*⁺-Überexpression in polytänen Speicheldrüsenchromosomen ebenso unverändert (Abb. 3.30 J) nachgewiesen, während H3K4me1 und me2 reduziert sind (Abb. 3.30 B und F). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die H3K4 Trimethyldemethylierung unabhängig von SU(VAR)3-3 geregelt ist. Hingegen die Bindung von dLSD1 über die Konzentration von LID geregelt wird.

3 Ergebnisse

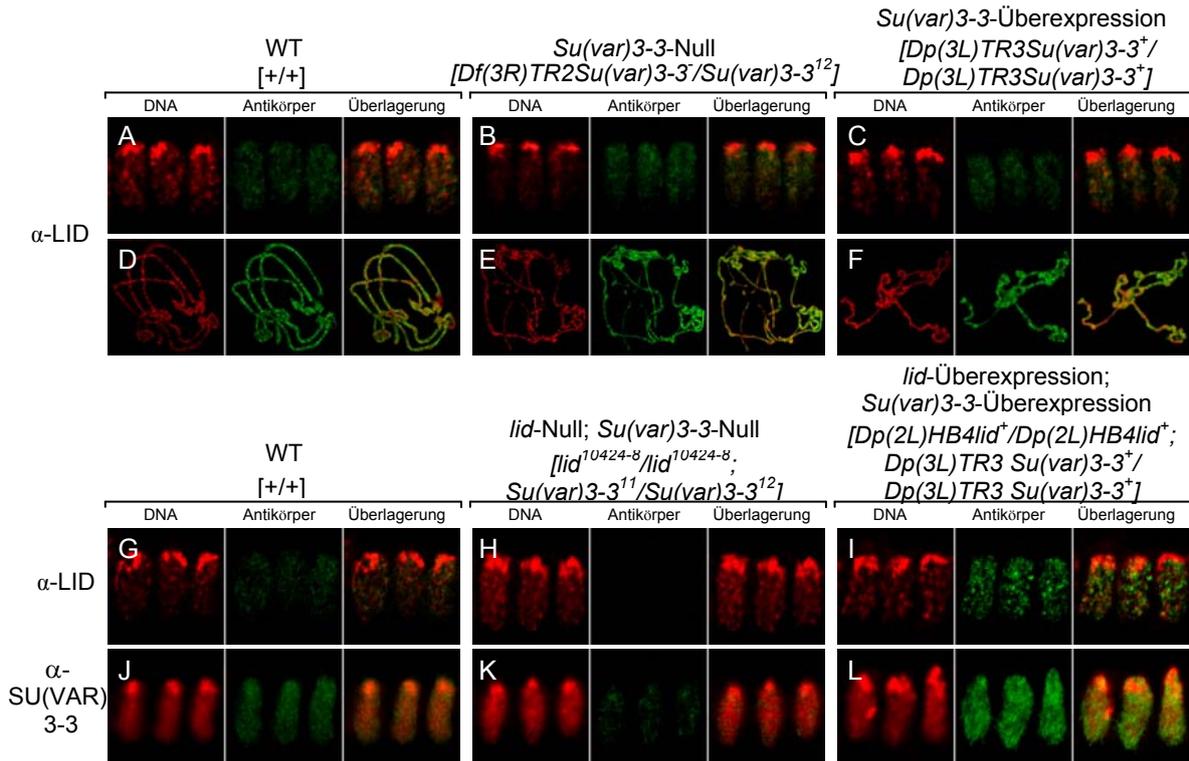


Abbildung 3.29: Einfluss von *lid*- und *Su(var)3-3*-Mutationen auf Embryonen des 14. Kernteilungszyklus und polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*.

Die Analyse von LID erfolgte im Wildtyp (A, D und G), im *Su(var)3-3*-Nullgenotyp (*Df(3R)TR2Su(var)3-3-/Su(var)3-3¹²*) (B und E) und in *Su(var)3-3*-Überexpressionstieren (*Dp(3L)TR3Su(var)3-3+/Dp(3L)TR3Su(var)3-3+*) (C und F) sowie in *lid*; *Su(var)3-3*-Doppelnullmutanten (*lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸; Su(var)3-3¹¹/Su(var)3-3¹²*) (H) bzw. in *lid*⁺; *Su(var)3-3*-Doppelüberexpressionstieren (*Dp(2L)HB4lid+/Dp(2L)HB4lid+; Dp(3L)TR3Su(var)3-3+/Dp(3L)TR3Su(var)3-3+*) (I). Die Analyse von SU(VAR)3-3 erfolgte im Wildtyp (J), in *lid*; *Su(var)3-3*-Doppelnullmutanten (*lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸; Su(var)3-3¹¹/Su(var)3-3¹²*) (K) bzw. in *lid*⁺; *Su(var)3-3*-Doppelüberexpressionstieren (*Dp(2L)HB4lid+/Dp(2L)HB4lid+; Dp(3L)TR3Su(var)3-3+/Dp(3L)TR3Su(var)3-3+*) (L). SU(VAR)3-3 und LID wurden mit spezifischen Antikörpern (grün) detektiert und die DNA zusätzlich mit DAPI (rot) angefärbt.

In den untersuchten *lid*-Genotypen wurden zelluläre und chromosomale Veränderungen der SU(VAR)3-3-Konzentrationen festgestellt (siehe Abb. 3.25 und Abb. 3.27), während LID in den untersuchten *Su(var)3-3*-Genotypen unverändert vorlag (Abb. 3.29). Um mehr über den funktionellen Zusammenhang von LID und SU(VAR)3-3 zu erfahren, wurden LID- und SU(VAR)3-3-Konzentrationen in einer *lid*⁺; *Su(var)3-3*-Doppelnullmutante (*lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸; Su(var)3-3¹¹/Su(var)3-3¹²*) bzw. in einer *lid*⁺; *Su(var)3-3*-Doppelüberexpressionslinie (*Dp(2L)HB4lid+/Dp(2L)HB4lid+; Dp(3L)TR3Su(var)3-3+/Dp(3L)TR3Su(var)3-3+*) analysiert (Abb. 3.29 G-L).

Erwartungsgemäß wird in der Doppelnullmutante ein Verlust der zellulären LID- (Abb. 3.29 H) und eine reduzierte SU(VAR)3-3-Konzentration nachgewiesen (Abb. 3.29 K), während in den Doppelüberexpressionen eine starke Erhöhung beider

3 Ergebnisse

Proteinkonzentrationen festgestellt wird (Abb. 3.29 I und L). Die in den Embryonen gezeigte negativ zu LID korrelierte SU(VAR)3-3-Bindung (siehe Abb. 3.25 G-I) konnte in Embryonen der *lid*⁺; *Su(var)3-3*⁺-Doppelüberexpressionslinie nicht bestätigt werden (Abb. 3.29 J-L).

Aufgrund dieser Daten wurden die H3K4-Methylierungen in Speicheldrüsenchromosomen überprüft (Abb. 3.30). Korrelierend liegen bei Verlust der beiden H3K4 Demethylasen alle drei Lysinmethylierungsstufen erhöht (Abb. 3.30 C, G und K) und bei *lid*- und *Su(var)3-3*-Überexpression reduziert vor (Abb. 3.30 D, H und L). Diese Ergebnisse spiegeln die Dosis-abhängigen Wirkungen beider Demethylasen auf heterochromatisches Gensilencing wider. Die Reduktion der H3K4-Methylierungen in den *lid*⁺; *Su(var)3-3*⁺-Doppelüberexpressionstieren führt zu additiven Effekten, da gleichzeitig das prospektive Heterochromatin durch SU(VAR)3-3 geschützt, jedoch durch die ebenfalls erhöhte LID-Menge die Etablierung von Euchromatin reguliert wird. Doppelnultiere erreichen nicht das adulte Stadium, da *lid* rezessiv letal wirkt. Ob SU(VAR)3-3 alleine oder in Kombination mit LID erhöht ist, zeigte keine Auswirkung auf die H3K4me1- und H3K4me2-Verteilung. H3K4me1, H3K4me2 und H3K4me3 sind in polytären Speicheldrüsenchromosomen der *lid*⁺; *Su(var)3-3*⁺-Doppelüberexpressionslinie reduziert (Abb. 3.30 D, H und L). Der Grund dafür ist die erhöhte LID- und SU(VAR)3-3-Konzentration (Abb. 3.29 I und L), die für das Überleben und die Fertilität der Fliegen ohne sichtbare Bedeutung ist. Der Anstieg der H3K4-Methylierungen in Fliegen der *lid*⁻; *Su(var)3-3*⁻-Doppelnultmutante (Abb. 3.30 C, G und K) lässt den Schluss zu, dass LID und SU(VAR)3-3 die wesentlichsten H3K4 Demethylasen sind. Werden beide Demethylasen in ihrer Konzentration beeinflusst, wird keine *lid*-abhängige SU(VAR)3-3-Bindung beobachtet, da die LID- und SU(VAR)3-3-Konzentrationen in der *lid*⁻; *Su(var)3-3*⁻-Doppelnultmutante erwartungsgemäß reduziert bzw. in der *lid*⁺; *Su(var)3-3*⁺-Doppelüberexpressionslinie erhöht nachgewiesen sind.

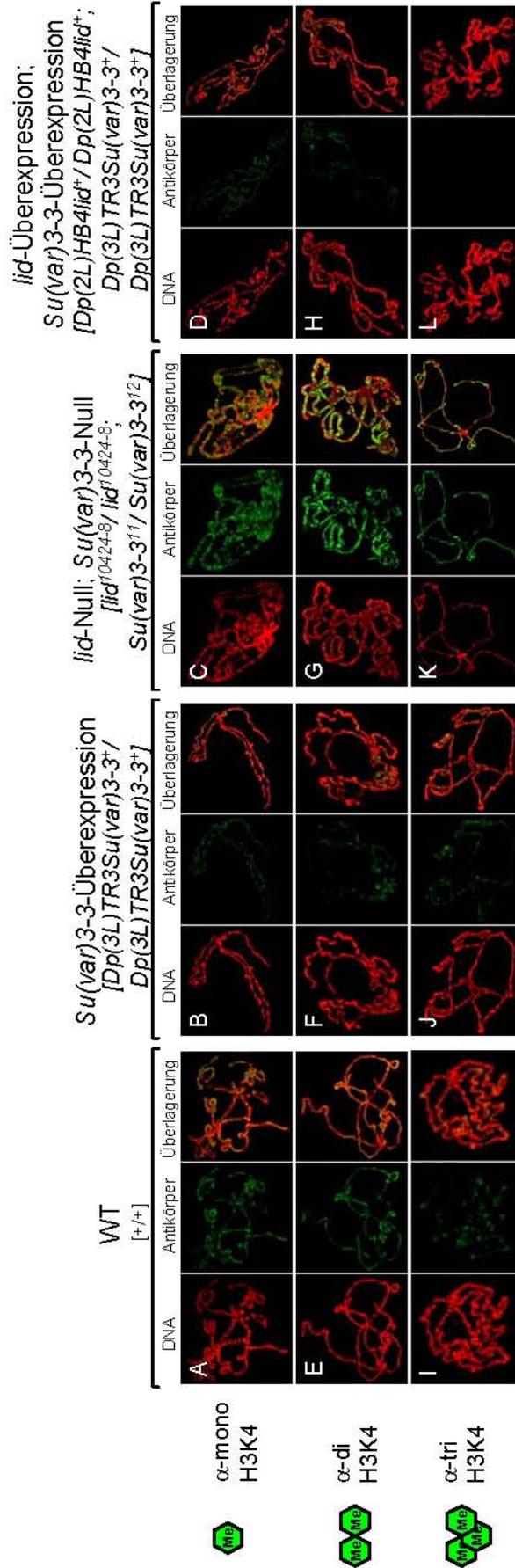


Abbildung 3.30: Einfluss von LID und SU(VAR)3-3 auf Histon H3K4-Methylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*.

Der Nachweis von H3K4me1 (A-D), H3K4me2 (E-H), H3K4me3 (I-L) erfolgte an Speicheldrüsenchromosomen vom Wildtyp (A, E und I), einem *Su(var)3-3*-Überexpressionsallel (*Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺*/*Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺*) (B, F und J) sowie einer *lid*; *Su(var)3-3*-Doppelnullmutanten (*lid*⁷⁰⁴²⁴⁻⁸/*lid*⁷⁰⁴²⁴⁻⁸; *Su(var)3-3¹¹*/*Su(var)3-3¹²*) (C, G und K) bzw. einer *lid⁺*; *Su(var)3-3⁺*-Doppelüberexpressionslinie (*Dp(2L)HB4lid⁺*/*Dp(2L)HB4lid⁺*; *Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺*/*Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺*) (D, H und L). Die Histonmodifikationen wurden mit spezifischen Antikörpern (grün) detektiert und die DNA der Zellkerne zusätzlich mit DAPI (rot) angefärbt.

4 Diskussion

Für die Entwicklung höherer Organismen ist es entscheidend, Genexpression zu kontrollieren. Die differentielle Aktivität der Gene spiegelt sich im spezifischen Expressionsmuster der verschiedenen Gewebe wider. Deren Fehlregulation ist häufig Ursache oder Folge von Krankheiten. Aus diesem Grund ist die Erforschung der Genregulation ein wichtiger Schritt auf der Suche nach Behandlungsmethoden gegen Krankheiten. Einen Mechanismus zur Regulation der Genaktivität stellen Histonmodifikationen dar. Bereits seit langem sind Histonmodifikationen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und Methylierungen (Okazaki und Moss, 1999; Strahl und Allis, 2000; Ito, 2007) bekannt. In den letzten 15 Jahren war es mit Hilfe des Modellsystems der Positionseffekt-Variegation in *Drosophila melanogaster* möglich, Komponenten zu identifizieren, die in Prozesse der epigenetischen Genregulation involviert sind (Reuter und Wolff, 1981; Reuter und Szidonya, 1983; Reuter und Spierer, 1992). Faktoren, die in heterochromatisches Gensilencing involviert sind und die Etablierung und Ausbreitung heterochromatischer Strukturen ermöglichen, konnten zum Beispiel mit SU(VAR)3-9 als H3K9-HMTase (Schotta et al., 2002) oder SU(VAR)3-3 als H3K4-HDMase (Rudolph et al., 2007) identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Haplo- und Triplo-abhängige Modifikator *lid* umfassend molekulargenetisch und funktionell charakterisiert.

4.1 LID ist Bestandteil euchromatischer Proteinkomplexe und *Su(var)s* sind epistatisch gegenüber dem *E(var)*-Effekt von *lid*

E(var)- und *Su(var)*-Mutationen beeinflussen im antagonistischen Sinne die Ausbreitung des Heterochromatins. Enhancermutationen verstärken und Suppressormutationen unterdrücken dessen Ausbreitung. Für die Differenzierung von Euchromatin während der frühen Embryonalentwicklung besitzt die Histon-demethylase LID eine primäre Rolle. Zunächst konnten durch genetische Analysen erste Hinweise auf eine solche Funktion von LID erhalten werden. LID wurde im *white*-mottled-Variegationssystem als Haplo-Triplo-abhängiger Modifikator identifiziert. Mutationen von *lid* verstärken und Überexpressionen von *lid*

supprimieren das Gensilencing. Der Triplo-Suppressoreffekt wurde nicht nur spezifisch im *white*-PEV-Variationssystem ($In(1)w^{m4h}$) beobachtet, sondern konnte auch mit anderen klassischen heterochromatischen PEV-Rearrangements wie *Stubble* ($T(2;3)Sb^V$), *brown* ($v;In(2R)bw^{vD1}$), *yellow* ($Dp(1;f)y^{238}$) und *lacZ* ($In(3L)BL1$) nachgewiesen werden. Das Grundprinzip der verschiedenen PEV-Variationssysteme beruht darauf, dass Gene, die in die Nähe von Heterochromatin gebracht werden, variable heterochromatisiert werden können. Diese epigenetischen Phänomene können anschließend phänotypisch beobachtet werden. In *lid* ist der Haplo-Enhancereffekt schwach ausgeprägt. Tatsächlich wird in *lid* ein Triplo-Suppressoreffekt im *brown*-PEV-Variationssystem gezeigt. Dieser Effekt ist für dieses PEV-Variationssystem spezifisch und weist auf eine noch unbekannte Funktion von LID in diesem Rearrangement hin. Die Etablierung und Aufrechterhaltung der Balance zwischen Eu- und Heterochromatin in den PEV-Rearrangements unterliegt der Wirkung vieler Faktoren (Weiler und Wakimoto, 1995). Diese Modifikatoren können in verschiedene Stoffwechselwege involviert sein und sind noch Gegenstand aktueller Forschung.

Im Vergleich zu den Heterochromatin-assoziierten Proteinen SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9 und HP1, die einen Haplo-Suppressor- und einen Triplo-Enhancereffekt manifestieren (Wustmann et al., 1989; Eissenberg et al., 1990; Tschiersch et al., 1994; Rudolph et al., 2007), zeigt LID eine inverse, dosisabhängige Wirkung auf heterochromatisches Gensilencing. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass zum Beispiel am Bruchpunkt des $In(1)w^{m4h}$ PEV-Rearrangements eine Reduktion von LID die Ausbreitung des heterochromatischen Chromatinzustandes in das angrenzende Euchromatin begünstigt, während eine Erhöhung der Konzentration von LID im Euchromatin die Ausbreitung des euchromatischen Chromatinzustandes in das Heterochromatin bewirkt oder die Heterochromatisierung euchromatischer Regionen stärker blockiert und somit einen Suppressoreffekt ausprägt. ChIP-Analysen zur Verteilung der heterochromatischen H3K9-Dimethylierung entlang der euchromatischen Region am heterochromatischen Bruchpunkt $In(1)w^{m4h}$ bestätigen diese Annahme (S. Lein, persönliche Mitteilung). Somit ist anzunehmen, dass LID beim Aufbau euchromatischer Strukturen eine wichtige Rolle spielt und ein essentieller Bestandteil euchromatischer Proteinkomplexe ist.

Mutationen von *Su(var)2-5*, *Su(var)3-1*, *Su(var)3-3*, *Su(var)3-7*, *Su(var)3-9* und *Rpd3* hemmen das Gensilencing im $In(1)w^{m4h}$ PEV-Variationssystem und blockieren die

Heterochromatisierung euchromatischer Regionen, während zusätzliche Kopien die Ausbreitung des heterochromatischen Chromatinzustandes („Spreading“) in das angrenzende Euchromatin begünstigen (James und Elgin, 1986; Reuter et al., 1990; Tschiersch et al., 1994; Mottus et al., 2000; Czermin et al., 2001; Ebert et al., 2004; Greil et al., 2006; Rudolph et al., 2007). Im Hintergrund einer zusätzlichen *lid*-Kopie in den jeweiligen Mutationsstämmen ist dieses Spreading des Heterochromatins ins Euchromatin unterdrückt, während eine Mutation von *lid* keinen Einfluss auf die Haplo-Suppressoren zeigt. Daraus lässt sich schließen, dass die Etablierung des Heterochromatins am Bruchpunkt des *In(1)w^{m4h}*-Testsystems unabhängig von LID erfolgt, es aber eine stabilisierende Wirkung auf die Erhaltung des Euchromatins ausübt.

4.2 Einfluss von H3K4me3 auf Chromatin

Heterochromatin wird ab dem 10. Kernteilungszyklus mit dem Start der zygotischen Transkription etabliert und kann ab dem 14. Kernteilungszyklus eindeutig von euchromatischen Regionen unterschieden werden (Edgar und Schubigert, 1986). Wichtige Heterochromatin-assoziierte Chromatinregulatoren, deren Enzymaktivität die Ausbreitung des Chromatins regeln, sind mit SU(VAR)3-9 und SU(VAR)3-3 als Methylase bzw. Demethylase bereits beschrieben (Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2006; Rudolph et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte LID als weiterer bedeutender Chromatinregulator in der *Drosophila*-Entwicklung bestimmt werden.

LID kontrolliert durch seine H3K4me3-Demethylaseaktivität das Ausmaß von H3K4me3 im Euchromatin. Immunozytologische Analysen an frühen Embryonen und S2-Zellen konnten diese LID-Funktion bestätigen. Die JmjC-Domäne konnte nach ektopischer Überexpression eines Volllängen-*lid*-cDNA-Konstrukts bzw. einem Volllängen-*lid*-cDNA^{H637A}-Mutantenkonstrukts als enzymatisch aktive Domäne bestätigt werden. In *lid*-Nullembryonen wird eine signifikante Erhöhung von H3K4me3 nachgewiesen, während nach *lid*-Überexpression eine drastische Reduktion von H3K4me3 beobachtet wird. Das LID-Protein wird ausschließlich im Euchromatin detektiert. Würde nur das Ausmaß von H3K4me3 bei *In(1)w^{m4h}* die Ausbreitung von Heterochromatin ins benachbarte Euchromatin kontrollieren, sollte eine *lid*-Nullmutation durch die Erhöhung von H3K4me3 einen Suppressoreffekt und nicht einen Enhancereffekt manifestieren. Auch würde man erwarten, dass die

Überexpression von *lid* durch die Reduktion von H3K4me3 im Euchromatin einen *E(var)*-Effekt hervorrufen sollte. Phänotypisch manifestiert sich jedoch eine inverse, dosisabhängige Wirkung von LID und H3K4me3 auf die Ausbreitung von Heterochromatin. Eine Erklärung für diesen Gegensatz ist, dass weniger die H3K4me3-Modifikation an sich die Ursache für die Etablierung euchromatischer Regionen ist, sondern eher, dass andere H3K4me3-bindende Proteine zur aktivierenden Wirkung von LID führen (Eissenberg et al., 2006). Ein solcher Proteinkomplex ist der NURF-Komplex. Die Bindung von H3K4me3 durch den NURF-Komplex ermöglicht die räumlich kontrollierte Expression von HOX-Genen und in der Folge die Transkription verschiedenster Zellzyklus-regulierender Gene (Mellor et al., 2006; Wysocka et al., 2006). Das humane Chromo-Domänen-Protein1 (hChd1), welches mit Elongationsfaktoren interagiert und die Transkription aufrecht erhält (Sims et al., 2005; Eissenberg et al., 2007), oder dING2, das für die Rekrutierung von Histondeacetylasen und Acetyltransferasen bekannt ist (Feng et al., 2002; Li et al., 2006; Pena et al., 2006; Shi et al., 2006), binden ebenso H3K4me3. H3K4me3 führt demnach zur Regulierung der Balance zwischen Eu- und Heterochromatin.

4.3 LID kontrolliert euchromatische Chromatinzustände

Zygotisch exprimiertes LID wurde erstmals in somatischen Zellen des 12. Kernteilungszyklus im Euchromatin nachgewiesen. Immunozytologische Analysen von H3K9 Acetylierung in frühen Embryonen zeigen, dass die Funktion von LID bei der Etablierung eines euchromatischen Chromatinzustandes über die indirekte Kontrolle der Menge an H3K9ac erfolgt. In *lid*-Nullmutanten wird nicht nur eine Erhöhung von H3K4me3 sondern gleichzeitig eine Reduktion von H3K9ac detektiert. Nach Überexpression von *lid* wird neben der Reduktion von H3K4me3 eine Erhöhung von H3K9ac gefunden. Eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der H3K9 Acetylierung wird der Deacetylase RPD3 zugeschrieben (Mottus et al., 2000; Yang und Seto, 2008). Dies wird auch durch die im Rahmen der Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse unterstrichen. In *lid*-Nullembryonen lässt sich eine erhöhte Menge an RPD3 finden, während nach *lid*-Überexpression eine Reduktion von RPD3 nachgewiesen wird. Im Euchromatin embryonaler Kerne korreliert somit die Menge an H3K4me3 positiv mit der Menge an RPD3. Diese Ergebnisse legen nahe, dass

primär die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin durch H3K9 Acetylierung kontrolliert wird. Dadurch ist es ebenfalls möglich, den beobachteten *E(var)*-Effekt von *lid*-Mutationen auf PEV zu erklären. Durch eine Reduktion von H3K9ac wird die Methylierung von H3 am Lysin 9 weniger gehemmt und die heterochromatische H3K9-Methylierung kann sich besser ins angrenzende Euchromatin ausbreiten. Dies führt zu einer verstärkten Inaktivierung des *white*-Gens im *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement und somit zu einem *E(var)*-Effekt. Analog wird nach *lid*-Überexpression H3K4me3 reduziert. Dies korreliert mit einer Reduktion von RPD3 und führt zu einer Erhöhung von H3K9ac. Diese Verstärkung von H3K9ac führt nun zu einer signifikanten Reduktion des heterochromatischen Spreading-Effektes und zur Manifestierung des PEV-Suppressoreffektes.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Menge an H3K4me3 direkt das Ausmaß der Assoziation von RPD3 ans Chromatin kontrolliert. In Säugerzellen wurde gefunden, dass ING-Proteine H3K4me3 binden und zugleich mit Deacetylasen interagieren können (Feng et al., 2002; Becker, 2006; Pena et al., 2006; Shi et al., 2006). Bei *Drosophila* stellt somit das ING2-Protein einen potentiellen Kandidaten für diese Funktion dar. Mittels *in vitro*-Analysen konnte zunächst gezeigt werden, dass dING2 tatsächlich eine H3K4me3-Bindefunktion besitzt (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers, der dING2 spezifisch erkennt, war es möglich, erste Einsichten in die potentielle Rolle von dING2 bei der Kontrolle von H3K9ac in Abhängigkeit von H3K4me3 zu erhalten. In *lid*-Nullembryonen wird tatsächlich eine Erhöhung von dING2 im Euchromatin gefunden. Dies könnte die verstärkte Rekrutierung von RPD3 im Euchromatin erklären, wenn auch dING2 wie die ING-Proteine der Säuger mit RPD3 interagiert. Der Nachweis einer Proteininteraktion zwischen dING2 und RPD3 steht aber noch aus und soll durch Analyse früh-embryonaler RPD3-Komplexe geklärt werden. Eine verstärkte Rekrutierung von RPD3 würde auch die Reduktion von H3K9ac in *lid*-Nullembryonen erklären. Nach *lid*-Überexpression würde aufgrund der reduzierten Assoziation von H3K4me3 weniger dING2 binden. Dies könnte dann die geringe Menge von RPD3 und die daraus resultierende Verstärkung von H3K9ac im Euchromatin erklären. Alle bisher vorliegenden Ergebnisse unterstützen somit ein Modell (Abb. 4) bei dem die Kontrolle der Etablierung euchromatischer Chromatinzustände zwar durch die Menge an H3K4me3 initiiert aber durch die konzentrationsabhängige Bindung von dING2 an H3K4me3 und der daraus resultierenden Rekrutierung von RPD3 letztlich über die

Konzentration von H3K9ac entschieden wird. Beim Modellsystem *Drosophila* konnten somit erstmals wesentliche Schritte des molekularen Reaktionsweges zur Etablierung eines offenen euchromatischen Chromatinzustandes aufgeklärt werden.

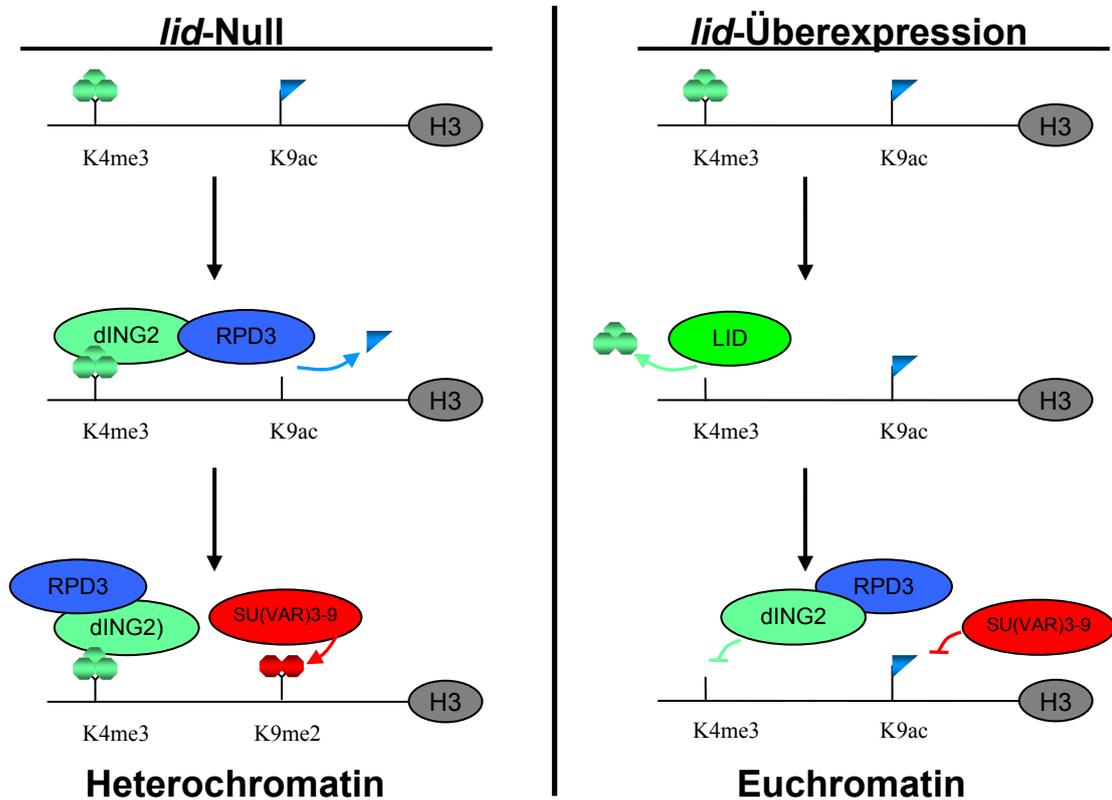


Abbildung 4: Die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin wird durch die Proteine dING2, RPD3 und LID reguliert. LID kontrolliert die Bindung des dING2-RPD3-Komplexes und führt zur Stabilisierung des Euchromatins. Demethylierung von H3K4me3 durch LID hemmt die Bindung des dING2-RPD3-Komplexes und blockiert stärker die Heterochromatisierung euchromatischer Regionen.

Eine dING2-unabhängige Regulation von H3K9ac wurde von Lee et al. beschrieben (2009). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass LID mit RPD3 in einem gemeinsamen Komplex vorliegt und *in vitro* die RPD3-Aktivität nach Zugabe von LID gehemmt ist (Lee et al., 2009). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Deacetylaseaktivität von RPD3 direkt und nicht indirekt über H3K4me3 und letztlich über die Rekrutierung durch dING2 geregelt sein könnte. Nach *lid*-Überexpression würde hier ebenfalls die Aktivität von RPD3 gehemmt sein und würde so die Erhöhung von H3K9ac und den Suppressoreffekt in *lid*⁺ erklären. Diese Daten lassen jedoch die Frage offen, warum RPD3 im Euchromatin nach *lid*-Überexpression

delokalisiert ist? Eine Erklärung wäre, dass RPD3 in einem Komplex mit LID und in einem mit dING2 vorliegt und so in unterschiedlichen Pathways wirken kann.

Der Anstieg von H3K9me2 und H3K9me3 in *lid*-Nulltieren bzw. deren Reduktion nach *lid*-Überexpression geht nicht mit einer Änderung der SU(VAR)3-9-Bindung einher (M. Schicht, persönliche Mitteilung). Es konnte gezeigt werden, dass SU(VAR)3-9 *in vitro* signifikant inhibiert wird, wenn das Substrat eine H3K4-Dimethylierung aufweist (S. Lein, persönliche Mitteilung). Nach *lid*-Überexpression liegt im Embryo eine solche Erhöhung der H3K4me2 vor und die H3K9-Methylase könnte inhibiert werden. In *lid*-Nullembryonen würde dagegen durch eine reduzierte H3K4me2-Assoziation SU(VAR)3-9 nicht gehemmt werden. Damit die H3K9-Methylase aktiv werden kann, müsste demnach zuerst H3K4me2 entfernt werden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass LID über die indirekte Regulation der H3K4me2 die SU(VAR)3-9-Aktivität regeln könnte. Durch Lein wurde jedoch auch gezeigt, dass H3K4me3 die HMTase SU(VAR)3-9 inhibieren kann (Lein, persönliche Mitteilung). Dies deutet nun darauf hin, dass die Änderung von H3K9me2 und H3K9me3 in Embryonen eher durch eine andere HMTase als durch SU(VAR)3-9 geregelt wird. SU(VAR)3-9 ist zwar die Hauptmethylase für H3K9 in *Drosophila melanogaster*, doch wird noch H3K9-Methylierung in *Su(var)3-9⁻* beobachtet (Ebert et al., 2004). In *Drosophila* könnten DmSETDB1 (EGGLESS) oder dG9a weitere H3K9-HMTasen sein (Mis et al., 2006; Seum et al., 2007; Brower-Toland et al., 2009). In Experimenten wurde gezeigt, dass die H3K9-Aktivität von DmSETDB1 unabhängig von SU(VAR)3-9 ist (Seum et al., 2007). Somit lassen diese Daten vermuten, dass LID nicht S(VAR)3-9 reguliert, sondern die Expression oder Aktivität einer anderen HMTase steuert. Bei Mutationen von *Suppressor of Underreplication* ist ebenfalls bekannt, dass SU(VAR)3-9 im Heterochromatin nicht zu detektieren ist, jedoch die H3K9-Methylierung im Heterochromatin völlig normal erscheint (Koryakov et al., 2006). Offenbar kompensiert in diesem Fall auch ein anderes Enzym den Ausfall von SU(VAR)3-9.

Auf der Basis von Sequenzhomologien konnten von LID bereits orthologe Proteine in Arten wie *Saccharomyces cerevisiae* (Liang et al., 2007; Metzger et al., 2007; Seward et al., 2007) *Schizosaccharomyces pombe* (Huarte et al., 2007), *Arabidopsis thaliana* (Lu et al., 2008; Lu et al., 2010), *C. elegans* (Christensen et al., 2007; Klose et al., 2006a) und dem Menschen (Secombe et al., 2007; Gildea et al., 2000; Christensen et al., 2007; Eissenberg et al., 2007) identifiziert werden. Die hohe

evolutionäre Konservierung aller an diesem Reaktionsweg beteiligten Faktoren lässt zugleich den Schluss zu, dass auch bei höheren Systemen ein gleichartiger Reaktionsweg zur Etablierung von Euchromatin nachweisbar sein sollte.

4.4 Bedeutung von LID, SU(VAR)3-3 und RPD3 während der Chromatindifferenzierung

LID ist ein Mitglied der Gruppe der Trithorax-Proteine (TrxG). Diese Proteine wirken transkriptionsaktivierend und fördern einen offenen Chromatinzustand. Polycomb-Proteine (PcG) hemmen Transkription und verstärken Silencing (Papp und Müller, 2006; Lee et al., 2009). Proteine beider Gruppen stellen Gegenspieler bei der Etablierung des Chromatins dar. SU(VAR)3-3 und RPD3 sind in *Drosophila melanogaster* maternalen als auch zygotischen Ursprungs, ab dem 4. Kernteilungszyklus im Chromatin zu beobachten und in einem früh embryonalem Komplex zusammen mit SU(VAR)3-9 nachgewiesen (Rudolph et al., 2007). Währenddessen ist LID ab dem 12. Kernteilungszyklus detektierbar, zygotischen Ursprungs und in einem Komplex gemeinsam mit RPD3 gefunden wurden (Lee et al., 2009). SU(VAR)3-3 ist während der embryonalen Kernteilungen meist heterochromatisch und LID als auch RPD3 sind euchromatisch assembliert (Rudolph et al., 2007).

Die erhaltenen Ergebnisse veranschaulichen zugleich, dass sowohl bei der Differenzierung von Heterochromatin als auch bei der Differenzierung von Euchromatin während der frühen Embryogenese H3K4 Demethylasen funktionell von zentraler Bedeutung sind. Für die Bildung von Heterochromatin ist die H3K4me1- und H3K4me2-Demethylase SU(VAR)3-3 essentiell (Rudolph et al., 2007), während für Euchromatindifferenzierung die Aktivität der H3K4me3-Demethylase LID von grundlegender Bedeutung ist. Dabei besitzt SU(VAR)3-3 eine protektive Funktion und verhindert die Etablierung von H3K4-Methylierung im prospektiven Heterochromatin, während bei der Etablierung von Euchromatin eine exakt kontrollierte Aktivität der H3K4me3-Demethylase entscheidend für die Konzentration von H3K9ac ist. Es kann somit angenommen werden, dass mehrere mütterliche als auch zygotische Faktoren die präzise Expression des *lid*-Gens bzw. die enzymatische Aktivität des LID-Proteins kontrollieren. Mutationen für diese Faktoren

können in Abhängigkeit von ihrer Funktion sowohl einen $E(var)$ - als auch einen $Su(var)$ -Effekt manifestieren.

Neben LID besitzt auch die RPD3 Histondeacetylase durch die Kontrolle der Menge an H3K9ac eine grundlegende Bedeutung für die Differenzierung euchromatischer Chromatinzustände. Mutationen für RPD3 (De Rubertis et al., 1996) sollten ähnlich wie *lid*-Mutationen theoretisch einen $E(var)$ -Effekt manifestieren. Verfügbare *Rpd3*-Mutationen zeigen jedoch einen $Su(var)$ -Effekt (Mottus et al., 2000; Czermin et al., 2001). Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass für die Balance zwischen euchromatischem und heterochromatischem Zustand am Bruchpunkt des $In(1)w^{m4h}$ PEV-Rearrangements die protektive Wirkung von RPD3 gegen H3K9ac im prospektiven Heterochromatin funktionell der Wirkung von RPD3 auf die Differenzierung von Euchromatin übergeordnet ist. Alternativ könnte es sich aber auch bei den vorhandenen *Rpd3*-Mutationen um spezifisch wirkende Allele handeln, die ausschließlich die Funktion von RPD3 im embryonalen Heterochromatin-Proteinkomplex beeinflussen. Zur weiteren Aufklärung der molekularen Funktion von RPD3 sind deshalb weiterführende genetische Analysen von grundlegender Bedeutung. Besonders wichtig ist es Nullmutationen zu isolieren und transgene Linien für einen Mutantenrescue zu etablieren.

4.5 LID sichert transkriptionelle „Quiescence“ in der Keimbahn von *Drosophila* ab

Gene wie *germ-cell-less*, *nanos* und *pumilio* sind für die Etablierung und Aufrechterhaltung der transkriptionellen „Quiescence“ in Polzellen von *Drosophila* verantwortlich. Mutationen dieser Gene führen zu Proliferations- und Migrationsdefekten der Keimzellen (Asaoka-Taguchi et al., 1999; Deshpande et al., 1999; Leatherman et al., 2002). Neben NANOS verhindert auch SU(VAR)3-3 die Etablierung aktiver H3K4me2 in den Polzellen (Schaner et al., 2003; Rudolph et al., 2007), während LID die Assemblierung von H3K4me3 kontrolliert. Die Reduktion der H3K4-Methylierungen in den Keimbahnzellen ist erforderlich, um die repressiven Markierungen H3K9me2 und me3 zu etablieren.

In Polzellen von *lid*-Nullmutanten wird neben dem Verlust von LID eine Erhöhung der H3K4me2 und me3 gefunden, was auf einen Verlust der Quiescence hindeutet (M.

Schicht, persönliche Mitteilung). Hingegen wird in somatischen Zellen der *lid*-Nullembryonen neben einer Erhöhung von H3K4me3 eine Reduktion von H3K4me2 beobachtet, die mit einer Erhöhung von SU(VAR)3-3 korreliert. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass im Soma der Embryonalzellen und in den Polzellen Faktoren existieren, die den Aufbau von verschiedenen LID-Komplexen ermöglichen oder unterschiedlich regulieren. Auch in Polzellen heterozygoter *Su(var)3-3*-Nullmutanten wird eine Erhöhung von H3K4me2 beobachtet (Rudolph et al., 2007). Tatsächlich sind homozygote *Su(var)3-3*-Mutantenweibchen steril und entwickeln in ihren Eikammern keine Oocyten (Szabad et al., 1988). Das lässt den Schluss zu, dass die H3K4-Demethylasen LID und SU(VAR)3-3 essentielle Faktoren der Polzellen sind, da der Abbau von H3K4me2 und me3 zwingend notwendig ist, um die transkriptionelle Quiescence in den frühen Embryonalstadien aufrechtzuerhalten (Schaner et al., 2003).

Ferner wird in allen Polzellkernen von *lid*-Nulltierembryonen eine signifikante Erhöhung von H3K4-Methylierung beobachtet. In *nos*⁻-Embryonen ist dieser Effekt nur für einen Teil der Polzellkerne beschrieben (Schaner et al., 2003). In Polzellen von *nos*⁻-Embryonen ist zusätzlich CTD-phosphorylierte RNA-Polymerase nachgewiesen worden. Diese Form der RNA-Polymerase II ist die transkriptionsaktive Form (Komarnitsky et al., 2000) und deutet auf eine aktive Transkription und den Verlust der Quiescence in den Polzellen hin. Ob in den untersuchten *lid*-Genotypen diese Form der RNA-Pol II nachzuweisen ist und ob LID in *nos*⁻-Embryonen als auch in *Su(var)3-3*⁻-Embryonen gehemmt oder delokalisiert vorliegt, muss in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

4.6 H3K4me3-spezifische Demethylase LID bindet an Interbanden polytärer Speicheldrüsenchromosomen

Vergleichende Analysen der Wirkung von LID auf die Differenzierung von Euchromatin in frühen Embryonen und der Wirkung von LID auf euchromatische Regionen in polytären Speicheldrüsenchromosomen zeigen, dass der früh etablierte Chromatinzustand stabil über die nachfolgende Individualentwicklung erhalten wird. In polytären Chromosomen der larvalen Speicheldrüsen ist LID ausschließlich an Interbanden lokalisiert. Somit wird für LID eine Kolo-kalisation mit H3K4me3 gefunden.

Auch SU(VAR)3-3 ist ausschließlich an Interbanden zu finden. Ob beide Proteine in einem gemeinsamen Proteinkomplex vorkommen, ist momentan noch unbekannt. Die molekulare Analyse einiger Interbanden ergab, dass diese Regionen viele kurze Repeats enthalten und möglicherweise eine Kontrollfunktion haben (Demakov et al., 1993). In Interbanden wird neben H3K4me3 auch H3K4me1 und H3K4me2 gefunden. Im Detail konnte in Hefe in einer Genomweiten ChIP-on-chip-Analyse H3K4me3 im Promotorbereich, H3K4me2 in kodierenden Regionen und H3K4me1 am 3' Ende kodierender Gene nachgewiesen werden (Bernstein et al., 2002; Pokholok et al., 2005). Weitere Histonmodifikationen, die ausschließlich an Interbanden gefunden werden, sind H3S10-Phosphorylierung und alle Stufen der H3K36-Methylierung (Ebert et al., 2006). Eine Analyse der Wirkung von *lid*-Mutationen bzw. *lid*-Überexpressionen auf H3K36-Methylierung und H3S10-Phosphorylierung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen und sollte noch überprüft werden.

Die Ergebnisse aus Embryonalkernanalysen lassen vermuten, dass die Menge an H3K4me3 direkt das Ausmaß der Assoziation von RPD3 am Euchromatin reguliert. Neben LID und ING2, einem Vertreter der humanen ING-Familie, wurde auch für das *Drosophila*-Homologe dING2 H3K4 Trimethylbindung nachgewiesen (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung; Pena et al., 2006; Shi et al., 2006). Für ING2 wurde weiterhin gezeigt, dass es neben der Kolokalisation mit H3K4me3 an Interbanden auch mit Deacetylasen interagieren kann (Feng et al., 2002; Becker, 2006). Die Deacetylase RPD3 wird ebenfalls an Interbanden polytärer Chromosomen larvaler Speicheldrüsen detektiert und kolokalisiert mit H3K4-Methylierungen, während H3K9ac an Banden gefunden wird. In *lid*-Nullmutationen wird an polytären Speicheldrüsenchromosomen als auch in Embryonalkernen eine erhöhte Menge an RPD3 und eine Reduktion von H3K9ac beobachtet. In Embryonen und Speicheldrüsenchromosomen von *lid*-Überexpressionstieren wird eine Reduktion an RPD3 und eine Erhöhung von H3K9ac detektiert. Wenn nun dING2-Proteine, wie auch die ING-Proteine der Säuger, mit RPD3 interagieren, wäre es möglich, dass die Rekrutierung von RPD3 durch die konzentrationsabhängige dING2-Bindung an Interbanden-spezifische H3K4me3 letztlich über die Konzentration von H3K9ac an den Banden polytärer Speicheldrüsenchromosomen in *Drosophila* entscheidet. Ob dING2 mit RPD3 interagiert, ist noch unbekannt und soll durch die Analyse von früh embryonalen RPD3-Komplexen geklärt werden.

Da H3K9ac in *Drosophila* an den Banden polytärer Speicheldrüsenchromosomen assoziiert aber RPD3, LID und H3K4me3 an den Interbanden lokalisiert ist, besteht nun die Frage, wie RPD3 die Acetylierung von H3K9 regulieren kann? Eine Erklärung wäre, dass RPD3 über noch unbekannte Proteine an H3K9ac delokalisiert werden könnte oder aber das H3K9ac durch eine andere Deacetylase der HDAC-Familie deacetyliert wird (Yang und Seto, 2008). RPD3 könnte aber auch Histonacetylasen wie zum Beispiel *Gcn5* oder einen anderen Faktor des Chromatin-Remodeling-Komplexes regulieren und somit die Erhöhung oder Reduktion von H3K9ac an den Banden bewirken. Ob H3K9ac direkt durch RPD3 oder über einen anderen Weg reguliert wird, bleibt noch offen und muss in weiteren Analysen geklärt werden.

Die dosisabhängigen Effekte von LID in den Speicheldrüsenchromosomen betreffen sowohl die epigenetischen Markierungen von Interbanden (Menge an H3K4me3, RPD3 und dING2) als auch von Banden (Menge an H3K9ac). Somit kann angenommen werden, dass diese Unterschiede früh embryonal, noch bevor eine Differenzierung von Banden und Interbanden erfolgt, etabliert werden und das nachfolgend die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin stabil erhalten wird (Maintenance). Faktoren, die diese „Maintenance“ der epigenetischen Differenzierung des euchromatischen Zustandes kontrollieren, sind völlig unbekannt. Für die Differenzierung des heterochromatischen Chromatinzustandes konnte auch epigenetische „Maintenance“ nachgewiesen werden (Rudolph et al., 2007). Offensichtlich wird nicht nur Heterochromatin sondern auch Euchromatin früh in der Embryonalentwicklung differenziert und der einmal etablierte Zustand präzise während der nachfolgenden Entwicklung erhalten und stabil auf die Tochterzellen vererbt.

4.7 Funktionelle Interaktion von LID und SU(VAR)3-3 in *Drosophila melanogaster*

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu möglichen funktionellen Interaktionen zwischen molekularen Prozessen der Differenzierung von Eu- und Heterochromatin an Embryonen und Polytänchromosomen durchgeführt. Die Histondemethylase SU(VAR)3-3 besitzt bei der Etablierung des Heterochromatins

während der frühen Embryogenese eine protektive Funktion und verhindert die Etablierung von H3K4me1 und H3K4me2 im prospektiven Heterochromatin (Rudolph et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist bei der Etablierung von Euchromatin eine exakt kontrollierte Aktivität der H3K4me3-Demethylase LID entscheidend. SU(VAR)3-3 ist in den frühen embryonalen Stadien von *Drosophila* im Heterochromatin lokalisiert, während LID im Euchromatin gefunden wird. In polytären Chromosomen larvaler Speicheldrüsen sind beide Demethylasen mit Interbanden assoziiert (Lee et al., 2007; Rudolph et al., 2007) und kolokalisieren mit H3K4-Methylierungen. Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass bei der Differenzierung von Eu- und Heterochromatin während der frühen Embryogenese H3K4-Demethylasen funktionell von zentraler Bedeutung sind.

Die immunozytologischen Analysen von *lid*-Nullembryonen zeigen bei einem Verlust von LID eine Erhöhung von H3K4me3. Gleichzeitig ist die Menge an SU(VAR)3-3 erhöht und H3K4me2 reduziert. Nach *lid*-Überexpression wird neben LID auch H3K4me2 erhöht beobachtet, während H3K4me3 und SU(VAR)3-3 reduziert nachgewiesen werden. Durch Reduktion von H3K4me3 nach *lid*-Überexpression sollte eine verstärkte Ausbreitung des Heterochromatins und nicht eine Hemmung der Ausbreitung erwartet werden. Hingegen sollte in *lid*-Nulltieren bei Erhöhung von H3K4me3 ein Suppressoreffekt und nicht ein Enhancereffekt manifestiert werden. Dieser inverse Effekt resultiert in den *lid*-Nulltieren aus der reduzierten und nach *lid*-Überexpression aus der erhöhten zellulären H3K4me2-Assoziation. Es konnte gezeigt werden, dass H3K4-methyliertes Substrat *in vitro* SU(VAR)3-9 signifikant inhibiert (S. Lein, persönliche Mitteilung). Nach Überexpression von *lid* liegt im Embryo eine Erhöhung von H3K4me2 vor. Falls LID auch *in vivo* die Aktivität von SU(VAR)3-9 steuert, könnte SU(VAR)3-9 über die Menge der H3K4-Methylierung, die Etablierung der heterochromatischen Histonmodifizierungen H3K9me2 und H3K9me3 regulieren. In *lid*-Nulltieren ist H3K4me2 reduziert. Dadurch käme es nicht zur Hemmung der H3K9-Methylase und nach Methylierung von H3K9 könnte sich Heterochromatin ausbilden. Die Erhöhung von H3K9me2 und H3K9me3 in *lid*-Nulltieren und die Reduktion der H3K9-Methylierungen nach *lid*-Überexpression korreliert mit einem Enhancer- und einem Suppressoreffekt.

In polytären Speicheldrüsenchromosomen von *lid*-Nulltieren ist neben dem Verlust an LID und SU(VAR)3-3 eine Erhöhung von H3K4me1, H3K4me2 und H3K4me3 zu finden, während nach *lid*-Überexpression eine Erhöhung von LID und SU(VAR)3-3

als auch eine Reduktion der H3K4-Methylierungen nachgewiesen werden. In Embryonen von *lid*-Nulltieren, als auch von *lid*-Überexpressionstieren, korreliert die Menge an SU(VAR)3-3 negativ mit der Menge an LID. Hingegen wird in polytänen Chromosomen larvaler Speicheldrüsen eine positive Korrelation der beiden Demethylasen beobachtet.

Weiterhin wird weder in *Su(var)3-3*-Nulltieren (*Df(3R)TR2Su(var)3-3⁻/Su(var)3-3¹²*) noch nach *Su(var)3-3*-Überexpression (*Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺/Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺*) in Embryonen als auch in polytänen Speicheldrüsenchromosomen eine Änderung der LID-Menge beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass im Embryo, während das Chromatin in Eu- und Heterochromatin differenziert wird, LID neben der Demethylierung von H3K4me3 die Menge an H3K4me2 über das heterochromatisch lokalisierte SU(VAR)3-3 regelt. LID wirkt jedoch unabhängig von SU(VAR)3-3, obwohl dLSD1 funktionell upstream von LID angeordnet ist. Wenn die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin einmal eingestellt ist, wird SU(VAR)3-3 im Heterochromatin nicht mehr benötigt und in der weiteren Entwicklung an Interbanden polytärer Speicheldrüsenchromosomen umgelagert (Rudolph et al., 2007). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nachdem das Chromatin in den frühen Embryonalstadien in Eu- und Heterochromatin differenziert ist, der früh etablierte Chromatinzustand stabil über die nachfolgende Individualentwicklung erhalten bleibt und eine Lid-abhängige inverse SU(VAR)3-3 Regelung nicht mehr notwendig ist. Weiterhin lässt sich vermuten, dass beide H3K4-Demethylasen in einem gemeinsamen Komplex vorkommen. Ob dies der Fall ist, muss noch in der Analyse früh embryonaler Proteinkomplexe überprüft werden.

Um den funktionellen Zusammenhang der Demethylasen weiter zu untersuchen, wurden eine *lid⁻; Su(var)3-3⁻*-Doppelnulmutante (*lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸; Su(var)3-3¹¹/Su(var)3-3¹²*) und eine *lid⁺; Su(var)3-3⁺*-Doppelüberexpression (*Dp(2L)HB4lid⁺/Dp(2L)HB4lid⁺; Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺/Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺*) hinsichtlich LID, SU(VAR)3-3 und die Methylierungen von K4 des Histons H3 analysiert. In der Doppelnulmutante als auch in der Doppelüberexpression ist wie zu erwarten eine Reduktion bzw. eine Erhöhung der beiden H3K4-Demethylasen nachgewiesen, obwohl in den *lid*-Nulltieren und nach *lid*-Überexpression SU(VAR)3-3 gegenüber LID in den Embryonen negativ korreliert ist. Die embryonalen Mengen der beiden Demethylasen in der Doppelnulmutante und der Doppelüberexpression korrelieren somit positiv mit den chromosomalen Mengen an LID und SU(VAR)3-3

von polytären Speicheldrüsenchromosomen der *lid*-Nulltiere und der *lid*-Überexpression. H3K4me1, H3K4me2 und H3K4me3 sind in der Doppelnulmutante erhöht, während nach Doppelüberexpression die euchromatischen Markierungen reduziert sind. Wird SU(VAR)3-3 alleine oder in Kombination mit LID erhöht, ist kein Unterschied in der reduzierten Menge der H3K4me1- und H3K4me2-Assoziation zu beobachten, während nur in den Doppelüberexpressionstieren H3K4me3 reduziert zu finden ist. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten, die in polytären Speicheldrüsenchromosomen nach *lid*-Überexpression für H3K4me1 und H3K4me2 gefunden werden. Nach *lid*-Überexpression wird bei Vorhandensein von zwei *Su(var)3-3*-Kopien und vier *lid*-Kopien die Menge an SU(VAR)3-3 erhöht beobachtet. In den Doppelüberexpressionstieren liegen neben vier *lid*-Kopien auch vier *Su(var)3-3*-Kopien vor. Es ist in diesem Doppelüberexpressions-Genotyp nicht zu unterscheiden, ob die Reduktion von H3K4me1 und H3K4me2 durch die erhöhte Menge an SU(VAR)3-3, die aus den 4 *Su(var)3-3*-Kopien hervorgegangen ist oder durch die LID-regulierte erhöhte SU(VAR)3-3-Aktivität katalysiert wird. Mit Transkriptionsanalysen und Aktivitätstests wäre diese Frage in weiteren Arbeiten zu klären.

Während eine *Su(var)3-3*-Mutation die Ausbreitung des Heterochromatins ins benachbarte Euchromatin (Haplo-Suppressoreffekt) hemmt, führt eine zusätzliche Kopie des Suppressors *Su(var)3-3* am Bruchpunkt des *In(1)w^{m4h}*-Testsystems zu einer verstärkten Ausbreitung des Heterochromatins (Triplo-Enhancereffekt). In einer *lid*-Mutante kommt es durch die Reduktion von H3K9ac zur Ausprägung des Haplo-Enhancereffekts, während eine zusätzliche Kopie von *lid* die Ausprägung des Heterochromatins hemmt und ein Triplo-Suppressoreffekt manifestiert wird. Werden der Haplo-Suppressor mit dem Haplo-Enhancer kombiniert, erreichen aufgrund der rezessiven Letalität der *lid*-Mutanten keine homozygoten Fliegen das adulte Stadium. In transheterozygoten Doppelnulmutieren fördert die drastische Erhöhung aller drei H3K4-Methylierungen einen offenen Chromatinzustand, bei dem die Ausbreitung des Heterochromatins ins Euchromatin gehemmt wird. Daraus kann geschlossen werden, dass *Su(var)3-3*-Mutationen epistatisch über dem Enhancereffekt der *lid*-Mutationen sind. Auch lässt dies den Schluss zu, dass LID und SU(VAR)3-3 die wesentlichsten H3K4-Demethylasen in *Drosophila melanogaster* darstellen. Die Reduktion aller drei Methylierungszustände in den Doppelüberexpressionen führt zur Ausprägung eines additiven Effektes. Dabei kommt es weder zur Ausbreitung des

Heterochromatins durch eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-3* noch zur Hemmung des Heterochromatins durch eine zusätzliche Kopie von *lid* am Bruchpunkt des *In(1)w^{m4h}*-Testsystems und spiegelt sich in der Ausprägung einer rot-weißen mosaikartigen Augenpigmentierung wieder. Die Reduktion der H3K4-Methylierungen ist für das Überleben und die Fertilität der Fliegen ohne sichtbare Bedeutung. Ob die Menge an RPD3 durch die erhöhte bzw. reduzierte H3K4me3-Assoziation über die Rekrutierung von dING2 und letztlich durch das Ausmaß an H3K9ac reguliert wird, muss in weiteren immunozytologischen Analysen überprüft werden. Ob SU(VAR)3-3 mit LID in einem gemeinsamen Komplex existiert, ist ebenso durch Analyse früh embryonaler Proteinkomplexe zu klären. Letztlich konnte gezeigt werden, dass LID in Verbindung mit SU(VAR)3-3 in *Drosophila melanogaster* die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin in den frühen Embryonalstadien reguliert und dass dieser Chromatinzustand, während der weiteren Entwicklung, aufrechterhalten wird.

5 Zusammenfassung

Epigenetische Stabilität beruht auf der dynamischen Balance zwischen Eu- und Heterochromatin. Dieses Gleichgewicht wird durch die koordinierte Funktion antagonistischer Enzymklassen geregelt, deren Wechselspiel bereits seit vielen Jahren intensiv erforscht wird. Mit der Charakterisierung von Demethylasen, die gegenüber den Methyltransferasen antagonistisch wirken, wurde eine neue Ebene der Regulation entdeckt. H3K4-Methylierungen sind N-terminale Modifizierungen an H3, die zur Etablierung eines aktiven Chromatinzustandes führen. Nachdem dLSD1 als H3K4me1- und H3K4me2-Demethylase bestätigt wurde (Rudolph et al., 2007), wird die Funktion der H3K4me3-Demethylase LID während der Differenzierung von Euchromatin in dieser Arbeit beschrieben.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein *E(var)*, der im System der PEV für einen Haplo-Enhancer- und Triplo-Suppressoreffekt verantwortlich ist, lokalisiert und umfassend genetisch charakterisiert. Genetische Analysen von Deletions- und Duplikationsmutanten zeigen, dass der *E(var)26B2* mit *lid* identisch ist. Mutationen von *lid* haben keinen Einfluss auf die Haplo-Suppressoren *Su(var)2-5*, *Su(var)3-1*, *Su(var)3-3*, *Su(var)3-7*, *Su(var)3-9* und *Rpd3*, während eine zusätzliche *lid*-Kopie das Spreading des Heterochromatins ins Euchromatin dieser Triplo-Enhancer unterdrückt. *Lid* stellt somit gegenüber diesen Suppressoren bei der Etablierung des heterochromatischen Gensilencings eine untergeordnete Funktion dar. Die Analyse von 12 *lid*-Revertanten-Allelen, *lid*¹⁰⁴²⁴⁻¹ bis *lid*¹⁰⁴²⁴⁻⁸ und *lid*^{k06801-1} bis *lid*^{k06801-3} (*P{PZ}lid*¹⁰⁴²⁴ bzw. *P{lacW}lid*^{k06801}), zeigt, dass alleine die Insertion der P-Elemente ausreichend ist, um die Expression von *lid* zu unterbinden.

Funktionelle Analysen ergaben, dass dLID eine evolutionär hoch konservierte H3K4me3-spezifische Demethylase ist, ab der 12. Furchungsteilung im Euchromatin und den Polzellen nachweisbar ist und in polytären Speicheldrüsenchromosomen mit H3K4me3 an Interbanden kolokalisiert. Dabei hat LID bei der Differenzierung von Euchromatins durch die Regulierung von H3K4me3 entscheidenden Einfluss.

Durch Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen LID und gegen dING2 konnte ein Einfluss auf das Bindeverhalten von dING2 und SU(VAR)3-3 untersucht werden. Überexpression von *lid* führt zu einer fast vollständigen Reduktion von H3K4me3 und ein Verlust von *lid* zu einem starken Anstieg der H3K4-Methylierung.

Neben der Reduktion von H3K4me3 wird nach *lid*-Überexpression in Embryonalzellen und in polytären Chromosomen larvaler Speicheldrüsen eine Erhöhung von H3K9ac bei einer Reduktion von RPD3, dING2 und H3K9me2 als auch von H3K9me3 beobachtet, während in *lid*-Nulltieren diese Markierungen negativ korrelieren.

Die Menge an SU(VAR)3-3 wird in Embryonalkernen negativ zur Menge von LID reguliert, während in Speicheldrüsenchromosomen SU(VAR)3-3 positiv zur LID-Konzentration zu finden ist. LID wird hingegen unabhängig von SU(VAR)3-3 im Embryo und an Interbanden gebunden. LID und SU(VAR)3-3 zeigen in *lid*⁻; *Su(var)3-3*⁻-Doppelnullembryonen und nach *lid*⁺; *Su(var)3-3*⁺-Doppelüberexpression eine erwartete Reduktion bzw. Erhöhung. Dabei sind H3K4me1, H3K4me2 und H3K4me3 in der Doppelnullemutante erhöht, während die euchromatischen Markierungen nach Doppelüberexpression reduziert sind. Letztendlich deuten alle Ergebnisse auf eine essentielle Funktion von LID bei der Differenzierung von Euchromatin und beim Aufbau einer dynamischen Balance zwischen Eu- und Heterochromatin hin.

6 Literaturverzeichnis

- Aagaard L., Laible G., Selenko P., Schmid M., Dorn R., Schotta G., Kuhfittig S., Wolf A., Lebersorger A., Singh P.B., Reuter G. und 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.
- Aasland R., Gibson T.J. und Stewart A.F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends. Biochem. Sci.*, **20**(2): 56-59.
- Aasland R. und Stewart A.F. (1995). The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic. Acids. Res.*, **23**, 3163–3173.
- Agger K., Cloos P.A., Christensen J., Pasini D., Rose S., Rappsilber J., Issaeva I., Canaani E., Salcini A.E. und Helin K. (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature.*, **449**(7163): 731-734.
- Ahmad K. und Henikoff S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell.*, **9**, 1191–1200.
- Akhtar A. und Becker P.B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell*, **5**(2): 367-375.
- Alfageme C.R., Rudkin G.T. und Cohen L.H. (1980). Isolation, properties and cellular distribution of DI, a chromosomal protein of *Drosophila*. *Chromosoma*, **78**, 1-31.
- Allshire R.C., Javerzat J.P., Redhead N.J. und Cranston G. (1994). Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell*, **76**(1): 157-169.
- Allshire R.C., Nimmo E.R., Ekwall K., Javerzat J.P. und Cranston G. (1995). Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev*, **9**(2): 218-233.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Miller W. und Lippman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.*, **25**: 3389-3402.
- Asaoka-Taguchi M., Yamada M., Nakamura A., Hanyu K. und Kobayashi S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germ line development in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell. Biol.*, **1**, 431-437.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A und Struhl K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. *New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience*.

- Ayoub N., Goldschmidt I., Cohen A., (1999). Position effect variegation at the mating-type locus of fission yeast: a cis-acting element inhibits covariegated expression of genes in the silent and expressed domains. *Genetics*, **152** (2):495-508.
- Badugu R., Shareef M.M. und Kellum R. (2003). Novel Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations. *J. Biol. Chem.*, **278**(36): 34491-34498.
- Baksa K., Moravietz H., Dombradi V., Axton M., Taubert H., Szabo G., Török I., Udvardy A., Gyurkovics H., Szöör B., Glover D., Reuter G. und Gausz J. (1993). Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position effect variegation and mitosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **135**: 117-125.
- Balciunas D. und Ronne H. (2000). Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends Biochem Sci.*, **5**(6):274-276.
- Ball L.J., Murzina N.V., Broadhurst R.W., Raine A.R., Archer S.J., Stott F.J., Murzin A.G., Singh P.B., Domaille P.J. und Laue E.D. (1997). Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein1. *EMBO J.*, **16**(9): 2473–2481.
- Ballas N., Battaglioli E., Atouf F., Andres M.E., Chenoweth J., Anderson M.E., Burger C., Moniwa M., Davie J.R., Bowers W.J., Federoff H.J., Rose D.W., Rosenfeld M.G., Brehm P. und Mandel G. (2001). Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron*, **31**, 353-365.
- Bannister A.J., Zegerman P., Patridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C. und Kouzarides T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Bannister A.J., Schneider R. und Kouzarides T. (2002). Histone Methylation: Dynamic or Static? *Cell*, **109**, 801–806.
- Bannister A.J. und Kouzarides T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature*, **436**(7054): 1103-1106.
- Barr M.L. und Bertram E.G. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, **163**: 676–677.
- Becker P.B. (2006). Gene regulation: a finger on the mark. *Nature.*, **442**(7098): 31-32.
- Beisel C., Imhof A., Greene J., Kremmer E. und Sauer F. (2002). Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator *Ash1*. *Nature.*, **419**(6909): 857-862.

- Bell O., Wirbelauer C., Hild M., Scharf A.N., Schwaiger M., MacAlpine D.M., Zilbermann F., van Leeuwen F., Bell S.P., Imhof A., Garza D., Peters A.H. und Schübeler D. (2007). Localized H3K36 methylation states define histone H4K16 acetylation during transcriptional elongation in *Drosophila*. *EMBO J.*, **26**(24): 4974-4984.
- Belyaeva E.S., Koryakov D.E., Pokholkova G.V., Demakova O.V. und Zhimulev I.F. (1997). Cytological study of the brown dominant position effect. *Chromosoma.*, **106**(2): 124-132.
- Berger S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447**: 407-412.
- Bernstein B.E., Humphrey E.L., Erlich R.L., Schneider R., Bouman P., Liu J.S., Kouzarides T. und Schreiber S.L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **25**, 8695–8700.
- Bienz M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.*, **31**(1): 35-40.
- Birchler J.A., Bhadra M.P. und Bhadra U. (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr Opin Genet Dev*, **10**(2): 211-216.
- Birnboim H.C. und Doley J. (1979). A rapid alkaline extraction for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.*, **7**: 1513–1523.
- Blackburn E.H. (1994). Telomeres: no end in sight. *Cell*, **77**(5): 621-623.
- Boumil R.M. und Lee J.T. (2001). Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*, **10**(20): 2225-2232.
- Brower-Toland B., Riddle N.C., Jiang H., Huisinga K.L. und Elgin S.C. (2009). Multiple SET methyltransferases are required to maintain normal heterochromatin domains in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 181:1303-1319.
- Brown S.W. und Nur U. (1964). Heterochromatic Chromosomes in the Coccids: The process of heterochromatization and the function of heterochromatin in coccid insects are reviewed. *Science*, **145**, 130-136.
- Brown S.W. (1966). Heterochromatin. *Science*, **151**(709): 417-425.
- Büchner K., Roth P., Schotta G., Krauss V., Saumweber H., Reuter G. und Dorn R. (2000). Genetic and molecular complexity of the position effect variegation modifier *mod(mdg4)* in *Drosophila*. *Genetics*, **155**(1): 141-157.
- Byrd K.N. und Shearn A. (2003). ASH1, a *Drosophila* trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**: 11535-11540.

- Carre C., Szymczak D., Pidoux J. und Antoniewski C. (2005). The Histone H3 Acetylase *dGcn5* Is a Key Player in *Drosophila melanogaster* Metamorphosis. *Mol Cell Biol.*, **25**(18): 8228-8238.
- Champagne K.S. und Kutateladze T.G. (2009). Structural insight into histone recognition by the ING PHD fingers. *Curr. Drug. Targets.*, **10**(5): 432-441.
- Chen Z., Zang J., Whetstine J.R., Hong X., Davrazou F., Kutateladze T.G., Simpson M., Mao Q., Pan C.H., Dai S., Hagman J., Hansen K., Shi Y. und Zhang G. (2006). Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell*. **125**(4): 691-702.
- Christensen J., Agger K., Cloos P.A., Pasini D., Rose S., Sennels L., Rappsilber J, Hansen K.H., Salcini A.E., Helin K. (2007). RBP2 Belongs to a Family of Demethylases, Specific for Tri- and Dimethylated Lysine 4 on Histone 3. *Cell*, **128**: 1063-1076.
- Cleard F., Delattre M. und Spierer P. (1997). SU(VAR)3-7, a *Drosophila* heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation. *EMBO J.*, **16**, 5280–5288.
- Cleard F. und Spierer P. (2001). Position-effect variegation in *Drosophila*: the modifier *Su(var)3-7* is a modular DNA-binding protein. *EMBO Rep.*, **2**, 1095–1100.
- Clissold P.M. und Ponting C.P. (2001). JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2 β . *TRENDS in Biochemical Sciences*, **26**(1): 7-9.
- Coller H.A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E.S., Eisenman R.N. und Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**: 3260–3265.
- Craig J.M. (2005). Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays*, **27**(1): 17-28.
- Cremer T., Kupper K., Dietzel S. und Fakan S. (2004). Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell*, **96**(8): 555-567.
- Czermin B., Schotta G., Hulsman B.B., Brehm A., Becker P.B., Reuter G., and Imhof A. (2001). Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.*, **2**: 915–919.
- Czermin B., Melfi R., McCabe D., Seitz V., Imhof A. und Pirrotta V. (2002). *Drosophila* Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites. *Cell*, **111**, 185-196.
- Davies K. (2001). After the genome: DNA and human disease. *Cell*, **104**, 465-467.

- Delattre M., Spierer A., Tonka C.H. und Spierer P. (2000). The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*: Interaction between the heterochromatin-associated proteins Su(var)3-7 and HP1. *J. Cell. Sci.*, **113**, 4253–4261.
- Delattre M., Spierer A., Jaquet Y. und Spierer P. (2004). Increased expression of *Drosophila* Su(var)3-7 triggers Su(var)3-9-dependent heterochromatin formation *Journal of Cell Science.*, **117**, 6239-6247.
- Demakov S.A., Semeshin V.F. und Zhimulev I.F. (1993). Cloning and molecular genetic analysis of *Drosophila melanogaster* interband DNA. *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 437-443.
- De Rubertis F., Kadosh D., Henchoz S., Pauli D., Reuter G., Struhl K. und Spierer P. (1996). The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature*, **384**(6609): 589–591.
- Deshpande G., Calhoun G., Yanowitz J.L. und Schedl P.D. (1999). Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell.*, **99**, 271-281.
- Dorn R., Krauss V., Reuter G. und Saumweber H. (1993a). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, *E(var)3-93D*, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**: 11376-11380.
- Dorn R., Szidonya J., Korge G., Sehnert M., Taubert H., Archoukieh E., Tschiersch B., Morawietz H., Wustmann G., Hofmann G. und Reuter G. (1993b). *P* Transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **133**: 279-290.
- Dover J., Schneider J., Boateng M.A., Wood A., Dean K., Johnston M. und Shilatifard A. (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J. Biol. Chem.*, **277**, 28368–28371.
- Doyon Y., Cayrou C., Ullah M., Landry A.J., Côté V., Selleck W., Lane W.S., Tan S., Yang X.J. und Côté J. (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell.*, **21**(1): 51-64.
- Drysdale R. (2003). The *Drosophila melanogaster* genome sequencing and annotation projects: A status report. *BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS*. **2**(2): 128–134.
- Ebert A., Schotta G., Lein S., Kubicek S., Krauss V., Jenuwein T. und Reuter G. (2004). *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **18**, 2973-2983.
- Ebert A. (2005). *Su(var)*-Gene regulieren die Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin in *Drosophila Melanogaster*. Promotionsarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Ebert A., Lein S., Schotta G. und Reuter G. (2006). Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromos. Res.*, **14**, 377-392.
- Edgar B. und Schubigert G. (1986). Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. *Cell*, **44**: 871-877.
- Eissenberg J., James T., Foster-Harnett D., Hartnett T., Ngan V. und Elgin S. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 9923–9927.
- Eissenberg J.C. und Elgin S.C.R. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **10**: 204-210.
- Eissenberg J.C., Lee M.G., Schneider J., Ilvarsonn A., Shiekhattar R. und Shilatifard A. (2007). The trithorax-group gene in *Drosophila* little imaginal discs encodes a trimethylated histone H3 Lys4 demethylase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**(4): 344-346.
- Elgin S.C und Hood L.E. (1973). Chromosomal proteins of *Drosophila* embryos. *Biochemistry.*, **12**(24):4984-4991.
- Erwin J.A. und Lee J.T. (2008). New twists in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol.*, **20**(3): 349–355.
- Fang J., Feng Q., Ketel C.S., Wang H., Cao R., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Simon J.A. und Zhang Y. (2002). Purification and Functional Characterization of SET8, a Nucleosomal Histone H4-Lysine 20-Specific Methyltransferase. *Curr. Biol.*, **12**(13): 1086-1099.
- Fanti L., Giovinazzo G., Berloco M. und Pimpinelli S. (1998). The Heterochromatin Protein 1 Prevents Telomere Fusions in *Drosophila*. *Mol. Cell.*, **2**, 527–538.
- Farkas G., Gausz J., Galloni M., Reuter G., Gyurkovics H. und Karch F. (1994). The Trithoraxlike gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature*, **371**(6500): 806-808.
- Felsenfeld G. und Groudine M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, **421**(6921): 448-453.
- Feng X., Hara Y. und Riabowol K. (2002). Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol.*, **12**(11): 532-538.
- Fischer A. (1997). Molekulargenetische Untersuchung heterochromatin-assoziiierter Proteine mit Hilfe des Hefe-Dihybridensystems und des Telomer-Positionseffektes in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Flybase (2006). The *Drosophila* database. Available from World Wide Web at the URLs <http://morgan.harvard.edu/> <http://www.ebi.ac.uk/flybase/> and www.flybase.org/ .

- Fodor B.D., Kubicek S., Yonezawa M., O'Sullivan R.J., Sengupta R., Perez-Burgos L., Opravil S., Mechtler K., Schotta G. und Jenuwein T. (2006). Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev.*, **20**(12): 1557-1562.
- Foe V.E. und Alberts B.M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell. Sci.*, **61**: 31-70.
- Forneris F., Binda C., Vanoni M.A., Battaglioli E. und Mattevi A. (2005). Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *J. Biol. Chem.*, **280**, 41360-41365.
- Gatti M. und Pimpinelli S. (1992). Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu Rev Genet.*, **26**, 239-275.
- Gildea J.J., Lopez R. und Shearn A. (2000). A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics*, **156**, 645-663.
- Girton J.R. und Johansen K.M. (2008). Chromatin structure of gene expression: the lesson of PEV in *Drosophila*. *Adv. Genet.*, **61**: 1-43.
- Gloor G. und Engels W. (1992). Single-Fly DNA Preps for PCR. *Dros. Inf. Serv.*, **71**, 148-149.
- Goldberg A.D., Allis C.D. und Bernstein E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, **128**(4): 635-638.
- Golic K. und Golic M. (1996). Engineering the *Drosophila* genome: Chromosome Rearrangements by Design. *Genetics*, **144**: 1693-1711.
- Gozani O., Karuman P., Jones DR., Ivanov D., Cha J., Lugovskoy A.A., Baird C.L., Zhu H., Field S.J., Lessnick S.L., Villasenor J., Mehrotra B., Chen J., Rao V.R., Brugge J.S., Ferguson C.G., Payrastre B., Myszka D.G., Cantley L.C., Wagner G., Divecha N., Prestwich G.D. und Yuan J. (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*; **114**(1): 99-111.
- Grandori C., Cowley S.M., James L.P. und Eisenman R.N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **16**: 653-699.
- Grewall S.I. und Klar A.J. (1997). A recombinationally repressed region between *mat2* and *mat3* loci shares homology to centromeric repeats and regulates directionality of mating-type switching in fission yeast. *Genetics*, **146**(4): 1221-1238.
- Griswold A.J., Chang K.T., Runko A.P., Knight M.A. und Min K-T. (2008). Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **105**(25): 8673-8678.

- Grunstein M. (1997). Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**(3): 383-387.
- Hawley R.S., Irick H., Zitron A.E., Haddox D.A., Lohe A., New C., Whitley M.D., Arbel T., Jang J. und McKim K. (1992). There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila* females, one of which requires heterochromatic homology. *Dev Genet*, **13**(6): 440-467.
- Heitz E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jb wiss Bot*, **69**: 762-818.
- Heitz E. (1929). Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. *Ber dtsch Bot Ges*, **47**: 274-284.
- Henderson D.S., Banga S.S., Grigliatti T.A. und Boyd J.B. (1994). Mutagen sensitivity and suppression of position-effect variegation result from mutations in *mus209*, the *Drosophila* gene encoding PCNA. *EMBO J.*, **13**: 1450-1459.
- Henikoff S. und Matzke M.A. (1997). Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet*, **13**: 293-295.
- Huang A.M., Rehm E.J. und Rubin G.M. (2000). *Drosophila Protocols*, Kap. Recovery of DNA Sequences Flanking P-element Insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue. *Cold Spring Harbor Lab Press*, 429-447.
- Huarte M., Lan F., Kim T., Vaughn M.W., Zaratiegui M., Martienssen R.A., Buratowski S. und Shi Y. (2007). The fission yeast Jmj2 reverses histone H3 Lysine 4 trimethylation. *J. Biol. Chem.*, **282**(30): 21662-21670.
- Huisinga K.L., Brower-Toland B. und Elgin S.C. (2006). The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma*, **115**(2): 110-122.
- Humphrey G.W., Wang Y., Russanowa V.R., Hirai T., Qin J., Nakatani Y. und Howard B.H. (2001). Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6817-6824.
- Ian J. Okazaki, Joel Moss (1999). Characterization of Glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-Ribosyltransferases. *Annual Review of Nutrition*, **19**, 485-509.
- Ito T. (2007). Role of Histone Modification in Chromatin Dynamics. *J. Biochem.*, **141**(5): 609-614.
- Ivanova A.V., Bonaduce M.J., Ivanov S.V. und Klar A.J.S. (1988) The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature Genet.*, **19**(2): 192-195.
- Jacobs S.A., Taverna S.D, Zhang Y., Briggs S.D., Li J., Eisenberg J.C. Allis C.D und Khorasanizadeh S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J.*, **20**(18): 5232-5241

- James T.C. und Elgin S.C.R. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3862–3872.
- James T.C., Eissenberg J.C., Craig C., Dietrich V., Hobson A. und Elgin S.C.R. (1989). Distribution pattern of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol.*, **50**, 170–180.
- Jaquet Y., Delattre M., Spierer A. und Spierer P. (2002). Functional dissection of the *Drosophila* modifier of variegation Su(var)3-7. *Development*, **129**(17): 3975-3982.
- Jenuwein T., Laible G., Dorn R. und Reuter G. (1998). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**(1): 80-93.
- Jenuwein T. und Allis C.D. (2001). Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Johansen K.M. und Johansen J. (2006). Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Research*, **14**(4):393-404.
- Kaplan C.D., Morris J.R., Wu C. und Winston F. (2000). Spt5 and Spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev.*, **14**, 2623-2634.
- Kiefer J.C. (2007). Epigenetics in development. *Dev. Dyn.*, **236**(4):1144-1156.
- Kleff S., Andrulis E.D., Anderson C.W., Sternglanz R. (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **270**(42):24674-24677.
- Klose R.J. und Bird A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, **31**(2): 89-97.
- Klose R.J., Kallin E.M. und Zhang Y. (2006a). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.*, **7**(9): 715-727.
- Klose R.J., Yamane K., Bae Y., Zhang D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J. und Zhang Y. (2006b). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl Histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*, **442**, 312-316.
- Klymenko T. und Müller J. (2004). The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep.*, **5**(4): 373-377.
- Komarnitsky P., Cho E.J. und Buratowski S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* **14**, 2452-2460.

- Koryakov D.E., Reuter G., Dimitri P. und Zhimulev I.F. (2006). The SuUR gene influences the distribution of heterochromatic proteins HP1 and SU(VAR)3-9 on nurse cell polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **115** (4): 296-310.
- Kornberg R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, **184**(139): 868-871.
- Kortschak R.D., Tucker P.W. und Saint R. (2000). ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci.*, **25**(6): 294-299.
- Kotake T., Takada S., Nakahigashi K., Ohto M. und 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 and Cell Physiology*, Vol. **44**(6): 555-564.
- Kouzarides T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**(2): 198-209.
- Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**(4): 693-705.
- Krauss V. (1995). Mutantanalyse, evolutionäre Konservierung und Interaktionen des *Su(var)3-9*-Gens - ein dosisabhängiges Modifikatorgen für Positionseffekt-Variation bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Krauss V. und Reuter G. (2000). Two Genes Become One: The Genes Encoding Heterochromatin Protein SU(VAR)3-9 and Translation Initiation Factor Subunit eIF-2 Are Joined to a Dicistronic Unit in Holometabolic Insects. *Genetics*, **156**(3): 1157-1167.
- Krogan N.J., Kim M., Ahn S.H., Zhong G., Kobor M.S., Cagney G., Emili A., Shilatifard A., Buratowski S. und Greenblatt J.F. (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 6979–6992.
- Krogan N.J., Dover J., Wood A., Schneider J., Heidt J., Boateng M.A., Dean K., Ryan O.W., Golshani A., Johnston M., Greenblatt J.F. und Shilatifard A. (2003a). The Paf1 complex is required for Histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to Histone methylation. *Mol. Cell.*, **11**, 721-729.
- Krogan N.J., Kim M., Tong A., Golshani A., Cagney G., Canadien V., Richards D.P., Beattie B.K., Emili A., Boone C., Shilatifard A., Buratowski S. und Greenblatt J. (2003b). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **23**(12): 4207-4218.
- Kuzmichev A., Zhang Y., Erdjument-Bromage H., Tempst, P. und Reinberg D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 835–848.

- Kwon S.Y., Xiao H., Wu C. und Badenhorst P. (2009). Alternative splicing of NURF301 generates distinct NURF chromatin remodeling complexes with altered modified histone binding specificities. *P. LoS. Genet.*, **5**(7): e1000574.
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K. und Jenuwein T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lan F., Bayliss P.E., Rinn J.L., Whetstone J.R., Wang J.K., Chen S., Iwase S., Alpatov R., Issaeva I., Canaani E., Roberts T.M., Chang H.Y. und Shi Y.A. (2007). Histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.*, **449**(7163): 689-694.
- Le M.H., Duricka D. und Karpen G.H. (1995). Islands of complex DNA are widespread in *Drosophila* centric heterochromatin. *Genetics*, **141**, 282-303.
- Leatherman J.L., Levin L., Boero J. und Jongens T.A. (2002). Germ cell-less acts to repress transcription during establishment of the *Drosophila* germ cell lineage. *Curr. Biol.*, **12**, 1681-1685.
- Lechner M.S., Schultz D.C., Negorev D., Maul G.G. und Rauscher F.J. (2005). The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**(4): 929-937.
- Lee N., Zhang J., Klose R.J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S. und Zhang Y. (2007). The trithorax-group protein Lid is a histone H3 trimethyl-Lys4 demethylase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**(4): 341-343.
- Lee N., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S. und Zhang Y. (2009). The H3K4 Demethylase LID Associates with and inhibites Histone Deacetylase RPD3. *Mol. Cell .Biol.*, **29**(6): 1401-1410.
- Lee W.Y., Lee D., Chung W.I. und Kwon C.S. (2009a). Arabidopsis ING and Alfin1-like protein families localize to the nucleus and bind to H3K4me3/2 via plant homeodomain fingers. *Plant J.*, **58**(3): 511-524.
- Lehnertz B., Ueda Y., Derijck A.A., Braunschweig U., Perez-Burgos L., Kubicek S., Chen T., Li E., Jenuwein T. und Peters A.H. (2003). Suv39h-mediated histone h3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.*, **13**(14): 1192-1200.
- Li F., Huarte M., Zaratiegui M., Vaughn M.W., Shi Y., Martienssen R. und Zacheus Cande W.Z. (2008). Lid2 is required for coordinating H3K4 and H3K9 Methylation of Heterochromatin and Euchromatin. *Cell*, **135**(2), 272-283.
- Li H., Ilin S., Wang W., Duncan E.M., Wysocka J., Allis C.D. und Patel D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature.*, **442**(7098): 91-95.

-
- Liang G., Klose R.J., Gardner K.E. und Zhang Y. (2007). Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nature Structural & Molecular Biology*, **14**(3), 243 – 245.
- Lima di Faria A. und Jaworska H. (1968). Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature*, **217**, 138–142.
- Lloret-Llinares M., Carré C., Vaquero A., de Olano N. und Azorín F. (2008). Characterization of *Drosophila melanogaster* JmjC+N histone demethylases. *Nucleic Acids Research*, **36**(9), 2852-2863.
- Lo W.S., Duggan L., Emre N.C., Belotserkovskya R., Lane W.S., Shiekhattar R. und Berger S.L. (2001). Snf1 -- a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, **293**(5532): 1142-1146.
- Locke J., Kotarski M. und Tartof K. (1988). Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics*, **120**: 181-198.
- Lohe A.R., Hilliker A.J. und Roberts P.A. (1993). Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **134**(4), 1149-1174.
- Loyola A., Bonaldi T., Roche D., Imhof A. und Almouzni G. (2006). PMTs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Molecular Cell*, **24**, 309-316.
- Loyola A. und Almouzni G. (2007). Marking histone H3 variants: how, when and why? *Trends. Biochem. Sci.*, **32**(9): 425-433.
- Lu B.Y., Ma J. und Eisenberg J.C. (1998). Developmental regulation of heterochromatin-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development*, **125**, 2223-2234.
- Lu F., Li G., Cui X., Liu C., Wang X-J. und Cao X. (2008). Comparative Analysis of JmjC Domain-containing Proteins Reveals the Potential Histone Demethylases in *Arabidopsis* and Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**(7): 886–896.
- Lu F., Cui X., Zhang S., Liu C. und Cao X. (2010). JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in *Arabidopsis*. *Cell research*, **20**(3): 387–390.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F. und Richmond T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- LUGER K. (2003). Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*, **13**(2):127.135.
- Lyon M. F. (1961). Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus. Musculus* L.). *Nature*, **190**(4773): 372-373.

- Margueron R., Trojer P. und Reinberg D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Current Opinion in Genetics & Development*, **15**(2): 163-176.
- McPherson M.J., Quirke P. und Taylor G.R. (1991). PCR 1: A Practical Approach (Practical Approach Series) (Gebundene Ausgabe)
- McPherson M.J., Taylor G.R., Hames B.D. (1995). PCR 2: A Practical Approach: 002 (Practical Approach Series) (Gebundene Ausgabe)
- Mellor J. (2006). It takes a PHD to read the histone code. *Cell*, **126**, 22–24.
- Metzger E., Wissmann M., Yin N., Müller J.M., Schneider R., Peters A.H.F.M., Günther T., Buettner R. und Schüle R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgene-receptor-dependent transcription. *Nature*, **437**, 436-439.
- Metzger E. und Schüle R. (2007). The expanding world of histone lysine demethylases. *Nature Structural & Molecular Biology*, **14**, 252 – 254.
- Mottus R., Sobel R.E. und Grigliatti T.A. (2000). Mutational analysis of a histone deacetylase in *Drosophila melanogaster*: missense mutations suppress gene silencing associated with position effect variegation. *Genetics*, **154**, 657–668.
- Muller H. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics*, **22**, 299-334.
- Nakahigashi K., Jasencakova Z., Schubert I. und Goto K. (2005). The *Arabidopsis* HETEROCHROMATIN PROTEIN1 Homolog (TERMINAL FLOWER2) Silences Genes Within the Euchromatic Region but not Genes Positioned in Heterochromatin. *Plant and Cell Physiology*, **46**(11):1747-1756.
- Nakamura T., Mori T., Tada S., Krajewski W., Rozovskaia T., Wassell R., Dubois G., Mazo A., Croce C.M. und Canaani E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell.*, **10**: 1119-1128.
- Nakayama J., Rice J.C., Strahl B.D., Allis C.D. und Grewal S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**, 110-113.
- Németh A. und Längst G. (2003). Chromatin higher order structure: Opening up chromatin for transcription. *Brief Funct Genomic Proteomic*. Volumen 2. No.4.: 334–343.
- Mis J., Ner S.S. und Grigliatti T.A. (2006). Identification of three histone methyltransferases in *Drosophila*: dG9a Is a suppressor of PEV and is required for gene silencing. *Mol Genet Genomics*, **275**: 513–526.

- Newman B.L., Lundblad J.R., Chen Y. und Smolik S.M. (2002). A *Drosophila* homologue of *sir2* modifies position-effect variegation but does not affect life span. *Genetics*, **162**(4): 1675-1685.
- Nielsen S.J., Schneider R., Bauer U.M., Bannister A.J., Morrison A., O'Carroll D., Firestein R., Cleary M., Jenuwein T., Herrera R.E. und Kouzarides T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **12**(6846): 561-565.
- Nishioka K., Chuikov S., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Allis C.D., Tempst P. und Reinberg D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.*, **16**(4): 479-489.
- Nur U. (1990). Heterochromatization and euchromatization of whole genomes in scale insects (Coccoidea: Homoptera). *Dev Suppl*, 29–34.
- O'Carroll D., Scherthan H., Peters A.H., Opravil S., Haynes A.R., Laible G., Rea S., Schmid M., Lebersorger A., Jerratsch M., Sattler L., Mattei M.G., Denny P., Brown S.D., Schweizer D. und Jenuwein T. (2000). Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 9423–9433.
- O'Connell S., Wang L., Robert S., Jones C.A., Saint R. und Jones R.S. (2001). Polycomb-like PHD fingers mediate conserved interaction with enhancer of zeste protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 43065–43073.
- O'Connell B.C., Cheung A.F., Simkevich C.P., Tam W., Ren X.J., Mateyak M.K. und Sedivy J.M. (2003). A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J. Biol. Chem.*, **278**: 12563–12573.
- Ogawa H., Ishiguro K., Gaubatz S., Livingston D.M. und Nakatani Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, **296**, 1132-1136.
- Oskarsson T. und Trumpp A. (2005). The Myc trilogy: Lord of RNA polymerases. *Nat. Cell Biol.*, **7**: 215–217.
- Papp B. und Müller J. (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev.*, **20**(15): 2041–2054.
- Pardue M.L. (1994). The ends and the middle: putting chromosomes together. *Curr Opin Genet Dev*, **4**(6): 845-850.
- Paro R. und Hogness D.S. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 263–267.

- Parks A.L., Cook K.R., Belvin M., Dompe N.A., Fawcett R., Huppert K., Tan L.R., Winter C.G., Bogart K.P., Deal J.E. Deal-Herr M.E., Grant D., Marcinko M., Miyazaki W.Y., Robertson S., Shaw K.J., Tabios M., Vysotskaia V, Zhao L., Andrade RS., Edgar K.A., Howie E., Killpack K., Milash B., Norton A., Thao D., Whittaker K., Winner M.A., Friedman L, Margolis J., Singer M.A., Kopczynski C., Curtis D., Kaufman T.C., Plowman G.D., Duyk G., Francis-Lang H.L. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.*, **36**(3), 288-92.
- Patel J.H., Loboda A.P., Showe M.K., Showe L.C. und McMahon S.B. (2004). Opinion—Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat. Rev. Cancer*, **4**: 562–568.
- Pardue M.L. und Hennig W. (1990). Heterochromatin: junk or collectors item? *Chromosoma*, **100**(1): 3-7.
- Peña P.V., Davrazou F., Shi X., Walter K.L., Verkhusha V.V., Gozani O., Zhao R. und Kutateladze T.G. (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature.*, **442**(7098): 100-103.
- Perrin L., Demakova O., Fanti L., Kallenbach S., Saingery S., Mal'ceva N.I., Pimpinelli S., Zhimulev I. und Pradel J. (1998). Dynamics of the sub-nuclear distribution of Modulo and the regulation of position-effect variegation by nucleolus in *Drosophila*. *J. Cell. Sci.*, **111**: 2753-2761.
- Peters A.H., Mermoud J.E., O'Carroll D., Pagani M., Schweizer D., Brockdorff N. und Jenuwein T. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat. Genet.* **30**, 77-80.
- Peterson C.L. und Laniel M.A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol.*, **14**(14): 546-551.
- Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**(9): 2002-2007.
- Pile L.A. und Wassarman D.A. (2000). Chromosomal localization links the SIN3-RPD3 complex to the regulation of chromatin condensation, histone acetylation and gene expression. *EMBO J.*, **19**(22): 6131-6140.
- Pimpinelli S., Berloco M., Fantil L., Dimitri P., Bonaccorsi S., Marchetti E., Caizzi R., Caggese C. und Gatti M. (1995). Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**(9): 3804-3808.
- Pirrotta V. (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**, 249–258.
- Pirrotta V. (1998). Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell.*, **93**(3): 333-336.
- Pirrotta V. (2002). Silence in the germ. *Cell*, **110**, 661-664.

- Pokholok D.K., Harbison C.T., Levine S., Cole M., Hannett N.M., Lee, T.I., et al. (2005). Genome wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, **122**, 517-527.
- Powers J.A. und Eissenberg J.C. (1993). Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding. *J. Cell. Biol.*, **120**(2): 291-299.
- Poux S., Horard B., Sigrist C.J. und Pirrotta V. (2002). The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development*, **129**(10): 2483-2493.
- 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. und Jenuwein T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-599.
- Rehm E.J. (2008). Quick Fly Genomic DNA Prep. *Berkley Drosophila Genome Project*, (BDGB).
- Reuter G. und Wolff I. (1981). Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, **182**(3), 516–519.
- Reuter G., Werner W. und Hoffmann H.J. (1982). Mutants affecting position-effect heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **85**(4): 539-551.
- Reuter G. und Szidonya J. (1983). Cytogenetic analysis of variegation suppressors and a dominant temperature-sensitive lethal in region 23-26 of chromosome 2L in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **88**, 277–285.
- Reuter G., Guiarre M., Farah J., Gausz J., Spierer A. und Spierer P. (1990). Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of a gene encoding an unusual zinc-finger protein. *Nature*, **344**, 219–223.
- Reuter G. und Spierer P. (1992). Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays*, **14**(9): 605-612.
- Richards E.J. UND Elgin S.C.R. (2002). Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects. *Cell*, **108**(4): 489-500.
- Robertson H.M., Preston C.R., Phillis R.W., Johnson-Schlitz D.M., Benz W.K. and Engels W.R. (1988). A stable genomic source of *P* element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**: 461-470.
- Robzyk K., Recht J., und Osley M.A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, **287**, 501–504.
- Roguev A, Schaft D, Shevchenko A et al. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J* 20: 7137Y7148.

- Rothwell W.F. und Sullivan W. (2000). Fluorescent Analysis of *Drosophila* Embryos, Chapter 9, in *Drosophila Protocols. Cold Spring Harbor, NY, USA*, 141-158.
- Rubin G.M. und Spradling A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila melanogaster* with transposable element vectors. *Science*, **218**(4570): 348-353.
- Rudolph T., Lu B., Westphal T., Szidonya J., Eissenberg J.C. und Reuter G. (1999). New type of CyO and TM3 green balancers. *Dros. Inf. Serv.*, **82**, 99–100.
- Rudolph T., Yonezawa M., Lein S., Heidrich K., Kubicek S., Schäfer CH., Phalke S., Walther M., Schmidt A., Jenuwein T. und Reuter G. (2007). Heterochromatin Formation in *Drosophila* Is Initiated through Active Removal of H3K4 Methylation by the LSD1 Homolog SU(VAR)3-3. *Mol. Cell*, **26**(1):103-115.
- Ryder E., Blows F., Ashburner M., Bautista-Llacer R., Coulson D., Drummond J., Webster J., Gubb D., Gunton N., Johnson G., O'Kane C.J., Huen D., Sharma P., Aszталos Z., Baisch H., Schulze J, Kube M., Kittlaus K., Reuter G., Maroy P., Szidonya J., Rasmuson-Lestander A., Ekström K., Dickson B., Hugentobler C., Stocker H., Hafen E., Lepesant J.A., Pflugfelder G., Heisenberg M., Mechler B., Serras F., Corominas M., Schneuwly S., Preat T., Roote J. und Russell S. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **167**(2), 797-813.
- Ryder E., Ashburner M., Bautista-Llacer R., Drummond J., Webster J., Johnson G., Morley T., Chan Y.S., Blows F., Coulson D., Reuter G., Baisch H., Apelt C., Kauk A., Rudolph T., Kube M., Klimm M., Nickel C., Szidonya J., Maróy P., Pal M., Rasmuson-Lestander A., Ekström K., Stocker H., Hugentobler C., Hafen E., Gubb D., Pflugfelder G., Dorner C., Mechler B., Schenkel H., Marhold J., Serras F., Corominas M., Punset A., Roote J. und Russell S. (2007). The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics*, **177**(1): 615-629.
- Saiki R.K., Gelfrand D.H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K. und Erlich, H.A. (1988). Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-489.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989). Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**(22), 5463-5467.
- Schaner C.E., Deshpande G., Schedl P.D. und Kelly W.G. (2003). A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. *Dev Cell*, **5**(5): 747-757.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T: (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell. Biol.*, **6**(1): 73-77.

- Schneider J. und Shilatifard A. (2006). Histone demethylation by hydroxylation: chemistry in action. *ACS. Chem. Biol.*, **1**(2): 75-81.
- Schotta G., Ebert A., Krauss V., Fischer A., Hoffmann J., Rea S., Jenuwein T., Dorn R. und 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., Ebert A., Dorn R. und Reuter G. (2003). Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **14**(1): 67-75.
- Schotta G., Lachner M., Sarma K., Ebert A., Sengupta R., Reuter G., Reinberg D. und Jenuwein T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.*, **18**, 1251-1262.
- Schultz J. (1936). Variegation in *Drosophila* and the inert heterochromatic regions. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, **22**:27-33.
- Schultz J., Milpetz F., Bork P. und Ponting C.P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signalling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 5857-5864.
- Secombe J., Li L., Carlos L. und Eisenmann R. N. (2007). The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth. *Genes and Development*. **21**(5):537-51.
- Secombe J und Eisenmann R.N. (2007a). The Function and Regulation of the JARID1 Family of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *Cell Cycle*. **6**(11): 1324-1328.
- Sedkov Y., Cho E., Petruk S., Cherbas L., Smith S.T., Jones R.S., Cherbas P., Canaani E., Jaynes J.B. und Mazo A. (2003). Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature*, **426**: 78-83.
- Selleck W., Fortin I., Sermwittayawong D., Côté J. und Tan S. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Piccolo NuA4 histone acetyltransferase complex requires the Enhancer of Polycomb A domain and chromodomain to acetylate nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 5535–5542.
- Seward D.J., Cubberley G., Kim S., Schonewald M., Zhang L, Tripet B. und Bentley D.L. (2007). Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 in vivo by JARID1 JmjC proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**(3):240-242.
- Seum C., Spierer A., Pauli D., Szidonya J., Reuter G. und Spierer P. (1996). Position-effect variegation in *Drosophila* depends on dose of the gene encoding the E2F transcriptional activator and cell cycle regulator. *Development*, **122**(6): 1949-1956.
- Seum C., Reo E., Peng H., Rauscher F.J., Spierer P. und Bontron S (2007). *Drosophila* SETDB1 is required for chromosom 4 silencing. *PLoS Genetic*, **3**(5):e76.

- Seydoux G., Mello C.C., Pettitt J., Wood W.B., Priess J.R. und Fire A. (1996). Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature*, **382**, 713–716.
- Seydoux G. und Schedl T. (2001). The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. *Int. Rev. Cytol.*, **203**, 139-185.
- Shi Y., Sawada J., Sui G., Affar E.B., Whetstine J.R., Lan F., Ogawa H., Luke M.P., Nakatani Y. und Shi Y. (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, **422**, 735-738.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A. und Shi Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
- Shi Y., Matson C., Lan F., Iwase S., Baba T. und Shi Y. (2005). Regulation of LSD1 demethylase activity by its associated factors. *Mol. Cell.*, **19**, 857-864.
- Shi X., Hong T., Walter K.L., Ewalt M., Michishita E., Hung T., Carney D., Peña P., Lan F., Kaadige M.R., Lacoste N., Cayrou C., Davrazou F., Saha A., Cairns B.R., Ayer D.E., Kutateladze T.G., Shi Y., Côté J., Chua K.F. und Gozani O. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature.*, **442**(7098): 96-99.
- Silver L.M. und Elgin S.C.R. (1978). Production and characterization of antisera against three individual NHC proteins; a case of a generally distributed NHC protein. *Chromosoma*, **68**(2): 101-104.
- Sims III R.J., Chen C.F., Santos-Rosa H., Kouzarides T., Patel S.s. und Reinberg D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem.* 280 (51): 41789-41792.
- Sims III R.J., Millhouse S., Chen C., Lewis B.A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Manley J.L. und Reinberg D. (2007). Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Post-Initiation Factors and premRNA Splicing. *Mol Cell.*, **28**(4): 665–676.
- Sinclair D.A.R., Mottus R.C und Grigliatti T.A. (1983). Genes which suppress position effect variegation in *Drosophila melanogaster* are clustered. *Mol. Gen. Genet.*, **191**: 326-333.
- Singh P.B., Miller J.R., Pearce J., Kothary R., Burton R.D., Paro R., James T.C. und Gaunt S.J. (1991). A sequence motif found in *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic. Acids. Res.*, **19**(4): 789-794.
- Smolik S. und Jones K. (2007). *Drosophila* dCBP is involved in establishing the DNA replication checkpoint. *Mol Cell Biol.*, **27**(1): 135-46.
- Spofford J.B. (1976). The Genetics and Biology of *Drosophila*, Kap. Position-effect variegation in *Drosophila*, Seiten 955–1018. Academic Press, New York, 1976.

- Stabell M., Larsson J., Aalen R.B. und Lambertsson A. (2007). Drosophila dSet2 functions in H3-K36 methylation and is required for development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**(3): 784-789.
- Strahl B.D. und Allis C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**(6765): 41-45.
- Sun F.L., Cuaycong M.H. und Elgin S.C. (2001). Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in Drosophila melanogaster pericentric heterochromatin. *Mol Cell Biol*, **21**: 2867–2879.
- Sun X.J., Wei J., Wu X.Y., Hu M., Wang L., Wang H.H., Zhang Q.H., Chen S.J., Huang Q.H. und Chen Z. (2005). Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **280**: 35261–35271.
- Tachibana M., Sugimoto K., Fukushima T. und Shinkai Y. (2001). Set domain containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone Methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25309–25317.
- Takeuchi T., Yamazaki Y. Katoh-Fukui Y., Tsuchiya R., Kondo S., Motoyama J., Higashinakagawa T. (1995). Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev.*, **9**(10): 1211-1222.
- Tartof K.D., Hobbs C. und Jones M. (1984). A structural basis for variegating position effects. *Cell*, **37**(3): 869-878.
- Thiru A., Nietlispach D., Mott H.R., Okuwaki M., Lyon D., Nielsen P.R., Hirshberg M., Verreault A., Murzina N.V. und Laue E.D. (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.*, **23**(3): 489-499.
- The FlyBase Consortium (1999) The FlyBase Database of the Drosophila Genome Projects and community literature. *Nucleic Acid Research*, **27**(1): 85-88.
- Trewick S.C., McLaughlin P.J., und Allshire R.C. (2005). Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep.*, **6**, 315–320.
- Tschiersch B., Hofmann A., Krauss V., Dorn R., Korge G. und 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**(16): 3822-3831.
- Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**(22): 4673-4680.

- Tochio N., Umehara T., Koshiba S., Inoue M., Yabuki T., Aoki M., Seki E., Watanabe S., Tomo Y., Hanada M., Ikari M., Sato M., Terada T., Nagase T., Ohara O., Shirouzu M., Tanaka A., Kigawa T. und Yokoyama S. (2006). Solution structure of the SWIRM domain of human Histone Demethylase LSD1. *Structure*, **14**, 457-468.
- Tripoulas N. A., Hersperger E., La Jeunesse D. und Shearn A. (1994). Molecular genetic analysis of the *Drosophila melanogaster* gene absent, small or homeotic discs1 (*ash1*). *Genetics*, **137**, 1027–1038.
- Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P. und Zhang Y. (2005). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **439**, 811-816.
- Turner B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, **22**(9): 836-845.
- Van Holde K.E. Chromatin. *New York: Springer Verlag*, 1988.
- Verdone L., Caserta M. und Mauro E.D. (2005). Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochemistry & Cell Biology*, **83**(3): 344-353.
- Wakimoto B.T. (1998). Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell*, **93**(3): 321-324.
- Wallrath L.L. und Elgin S.C. (1995). Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev*, **9**(10): 1263-1277.
- Wallrath L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Gen Dev*, **8**(2): 147-153.
- Wang Y., Zhang W., Jin Y., Johansen J. und Johansen K.M. (2001). The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell*, **105**: 433–443.
- Wang Y., Wysocka J., Sayegh J., Lee Y.H., Perlin J.R., Leonelli L., Sonbuchner L.S., McDonald C.H., Cook R.G., Dou Y., Roeder R.G., Clarke S., Stallcup M.R., Allis C.D. und Coonrod S.A. (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science*, **306**(5694): 279-283.
- Weber M. und Schübeler D. (2007). Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current Opinion in Cell Biology*, **19**(3): 273-280.
- Weiler K.S. und Wakimoto B.T. (1995). Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, **29**:577-605.
- Westphal T. und Reuter G. (2002). Recombinogenic effects of suppressors of position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics*, **160**(2): 609-621.

- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y. (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell.*, **125**(3): 467-481.
- Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne T.A., Kwon S.Y., Landry J., Kauer M., Tackett A.J., Chait B.T., Badenhorst P., Wu C. und Allis C.D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature.*, **442**(7098): 86-90.
- Wines D.R. und Henikoff S. (1992). Somatic instability of a *Drosophila* chromosome. *Genetics*, **131**(3): 683-691.
- Wolffe A.P. und Matzke M.A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*, **286**: 481-486.
- Wood A., Krogran N.J., Dover J., Schneider J., Heidt J., Boateng M.A., Dean K., Golshani A., Zhang Y., Greenblatt J.F., et al. (2003). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol. Cell.*, **11**, 267–274.
- Wreggett K.A., Hill F., James P.S., Hutchings A., Butcher G.W. und Singh P.B. (1994). A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **66**: 99-103.
- Wustmann G. (1983). *Cytogenetische Analysen von Modifikatorgenen für Positioneffekt-Variation bei Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle.
- Wustmann G., Szidonya J., Taubert H. und Reuter G. (1989). The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, **217**: 520-527.
- Wylie C. (1999). Germ cells. *Cell.*, **96**, 165-174.
- Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne T.A., Kwon S.Y., Landry J., Kauer M., Tackett A.J., Chait B.T., Badenhorst P., Wu C. und Allis C.D.A. (2006). PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature.*, **442**(7098): 86-90.
- Yamane K., Toumazou C., Tsukada Y., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J. und Zhang Y. (2006). JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, **125**, 1-13.
- Yamane K., Tateishi K., Klose R.J., Fang J., Fabrizio L.A., Erdjument-Bromage H., Taylor-Papadimitriou J., Tempst P. und Zhang Y. (2007). PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol. Cell.*, **25**(6): 801-812.
- Yang X.J. und Seto E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**(3):206–218.

- Yang L., Xia L., Wu D.Y., Wang H., Chansky H.A., Schubach W.H., Hickstein D.D. und Zhang Y. (2002). Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific Methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene*, **21**, 148–152.
- Ye Q., Callebaut I., Pezhman A., Courvalin J.C. und Worman H.J. (1997). Domainspecific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J. Biol. Chem.*, **272**(23): 14983–14989.
- You A., Tong J.K., Grozinger C.M. und Schreiber S.L. (2001). CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 1454-1458.
- Yoshida H., Liu J., Samuel S., Cheng W., Rosen D. und Naora H. (2005). Steroid receptor coactivator-3, a homolog of Taiman that controls cell migration in the *Drosophila* ovary, regulates migration of human ovarian cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.*, **245**(1-2): 77-85.
- Zegerman P., Cannas B., Pappin D. und Kouzarides T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodelling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11621–11624.
- Zhang P. und Spradling A.C. (1994). Insertional mutagenesis of *Drosophila* heterochromatin with single P elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**(9): 3539–3543.
- Zhang Y. und Reinberg D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, **15**, 2343-2360.
- Zhang Y. (2006). It takes a PHD to interpret histone methylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 572-574.

7 Anhang

7.1 Primerliste

Tabelle 7.1: Verwendete Primer

Primerbezeichnung	Sequenz 5'→3'
HP1-dup-forw	GGAATAAAATTGATAACTGTGC
HP1-del-forw	CCATTTATCTTGCCATTGCG
HP1-dup-rev	GCAACGAAGCTTTCTCTCC
HP1-del-rev	GGTGTTGTTGTTGTACTTGC
HP1-del-rev1	CGTATTTACTCTCGTCGCC
Lid-dup-forw	GCCCCACAAAAGTTTCGGG
Lid-del-forw	GCTTTGTACGCAATTTACCC
Lid-dup-rev	GCGAGGAATATCGTGATCG
Lid-del-rev	CCTATGGATGTTTCAAGTCC
Lid-pGS-forw	ATAGCGGCCGCATGTACCATAATAGTTGTCCTCATCCC
Lid-pGS-forw1	ATAGCGGCCGCATGGGTACATCAATGCCGACATTAG
Lid-pGS-forw2	ATAGCGGCCGCATGAAGCTACGCTTTGTGCCACGTG
Lid-pGS-677-rev	ATAGCGGCCGCAGATGTAGCAGGCAGTAGCGATG
Lid-pGS-432-rev	ATAGCGGCCGCACTCCACCATCTCAGTGGGCAC
Lid-pGS-241-rev	ATAGCGGCCGCAGCGACGTGTGTTTGTCTCGTTG
Lid-pGS-103-rev	ATAGCGGCCGCACTGGACACGTGGCACAAGCG
Lid-pGEX-forw1:	ATAGCGGCCGCATGGTACATCAATGCCGACATTAG
Lid-pGEX-forw:	ATAGCGGCCGCATTACCATAATAGTTGTCCTCATCCC
Lid-677aa-rev:	ATAGCGGCCGCTCAGATGTAGCAGGCAGTAGCGATG
Lid-432aa-rev:	ATAGCGGCCGCTCACTCCACCATCTCAGTGGGCAC
Lid-241aa-rev:	ATAGCGGCCGCTCAGCGACGTGTGTTTGTCTCGTTG
Lid-103aa-rev:	ATAGCGGCCGCTCACTGGACACGTGGCACAAGCG
lid-cDNA-H637A	TCCTCGTTGGCCCAGCAG
lid-cDNA-Δ 624-740	AGCCAATCGGCAGGTGCCGGAGCGTTCATGCCGC
lid-cDNA-H637Arev	CCAGCAGAAGGCTGCGAAG
lid-cDNA-H637Afor	GCCAACGAGGACCACTGG
lid-cDNA-624 rev	CGGAGCGTTCATGCCGCT
lid-cDNA-740 for	GCACCTGCCGATTGGCTG
lid-cDNA-587rev	CGGCAACAAATATAACGAGCTC
lid-cDNA-590rev	TTGGTCGCCCCGGCAACAAAT
lid-cDNA-159rev	TGGCGGCGTGTCAAAGTGGA
lid-cDNA-207forw	GTGGACAAGCTACGCTTTGTG
lid-cDNA-222rev	GAGCTCATTCAGCCGCTGGA
lid-cDNA-332forw	ACACCCGTCAAATTGGAGGAC
5'P forw-1	ACCCACTTTAATGATTCGCAG
5'P forw-2	ACCAGTGGGAGTACACAAACAG
5'P rev-1	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG
5'P rev-2	CACACAACCTTTCCTCTCAAC
3'P forw-1	ATACTATTCCTTTCACTCGCAC
3'P forw-2	GCATACGTAAAGTGGATGTCTC
3'P rev-1	TGTCGTATTGAGTCTGAGTGAG
3'P rev-2	TGATTAACCCTTAGCATGTCCG

BAC_lid_f1	ATCACGCAGTGCGACGGCTCC
BAC_lid_r1	TGTCGCACGTCAGTCATGTGGGC
BAC_lid_ApaIII_f1	TGGGCCCATCACGCAGTGCAGCGGCTCC
BAC_lid_ApaIII_r1	TGGGCCCTGTTCGCACGTCAGTCATGTGGGC
pGEMT_T_forw	GCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTC
pGEMT_T_back	GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCC
lid cDNA1f	TCAGCCAGCAAAAAGTACC
lid cDNA2f	TGAGCTCGAGGCAAAGAC
lid cDNA3f	GCACACCCGTCAAATTGG
lid cDNA4f	ACTGATGAAGTACATTTGCC
lid cDNA5f	TTGCACACAATGGATCACG
lid cDNA6f	CTGGTGACCATTATGAACC
lid cDNA7f	GCAAATCGCTTTTGGAGTG
lid cDNA8f	TCATCGATCGCCTTAATGC
lid cDNA9f	CTGAAGCAGTGCAAGTGG
lid cDNA10f	AACCACGTCACATATTGCC
lid cDNA11f	CGATATGTTCTGCTTGTGC
lid cDNA12f	AAGCGATTATGGCGCAGC
lid cDNA13f	GCATTCTAGAAACGATGCC
lid cDNA14f	TGCCGAGAATAAGCAGGC
lid-cDNA-H637A	TCCTCGTTGGCCCAGCAG
5' lid-cDNA-pGS	ATAGCGGCCGCATGTCCGCCAAAAGTGGGCGG
3' lid-cDNA-pGS	ATAGCGGCCGCACCGCGCCGATTGCACCGCC
5' lid-cDNA	ATAGCGGCCGCATTCCGCCAAAAGTGGGCGGAC
3' lid-cDNA	ATAGCGGCCGCTCACCGCGCCGATTGCACCGC
3' 2.E-lid	CGGAGTTGCTGTTCCATTCCG
3' 2.E-lid 2	GGTACTGCATCCGGTTGG
3.E-lid-rev	AGCATTAAAGGCGATCGATG
3.E-lid-rev1	TCTCAGTGGGCACCAAGTG
2.E-lid-forw3	AGGACGGAGGTGGAACCG
lid-394aa-forw	ATAGCGGCCGCATGTGAAGGCGCACAGCTTCGAG
lid-394aa-rev	ATAGCGGCCGCTCAAAGTTCGCGCATATCGAG CAG
ding2_20aa_AB1_f	ATAGAATTCCCCAAGGCGCAGTTCCTCAAAGAAGTGGGA GCGCTACAACAAGGAAAAGGAGGAGAAGACCTGATAG CGGCCGCATA
ding2_20aa_AB1_r	TATGCGGCCGCTATCAGGTCTTCTCCTCCTTTTCCTTGT TGTAGCGCTCCAGTTCTTTGAGGAACTGCGCCTTGGGG AATTCTAT
5' dING2-cDNA-pGS	ATAGCGGCCGCATGATAAACCCCATTCATCCGAG
3' dING2-cDNA-pGS	ATAGCGGCCGCAGGTCTTCTCCTCCTTTTCCTTGT
dING2_Del_forw	TGACGTAGACGTCGATAGCATTG
dING2_Del_rev	AGGTACGGTCACTCGGCAACTG
dING2_Dp_forw	CCAGATACCCAATCATGTCCACG
dING2_Dp_rev	GACAGCTGACTGCTTTGATTTGC
lid_2E_forw_RT	CTGCGACGACAGCTACCACACC
lid_3E_rev_RT	CCTGCGGTTTGCTTACTTCCTCG
Rpd3_2E_forw_RT	CATGACCCACAACCTGCTGCTC
Rpd3_3E_rev_RT	GTACTIONGTCGAGTGGAACTTGGTC
rp49_RT-F	GATGACCATCCGCCAGCATAAC
rp49_RT-B	AGTAAACGCGGTTCTGCATGAGC
rp49_E_2forw_RT	CAGCATAACAGGCCAAGATCGTG

rp49_E_3rev_RT	CTTGAAGCGGCGACGCACTC
rp49_2E_forw1_RT	GCCACCAGTCGGATCGATATGC
rp49_3E_rev1_RT	AATCCGGTGGGCAGCATGTG
β-Tub56D_forw_RT	GAGGGAAATCGTTCACATCCAAGC
β-Tub56D_rev_RT	CACCGGACGCCTCATTGTAGTACAC
UAS-F	TGCAACTACTGAAATCTGCC
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
pGEMT-AR	AATACTCAAGCTATGCATCC
Sp1	ACACAACCTTTCTCTCAACAA
Pry2mod	ATGTCTCTTGCCGACGGGACCACCTTATG
pAc/MT-for	ATAGAATTCAAAGCTATGTCCGCCAAAACCTGAG
pMT-V5-forw1	TCTCAGTGCAACTAAAGGGG
pMT-V5-rev1	GTCTGGATCTTAGAAGGCAC
pAC5.1-V5-forw1	ACAAAGCCGCTCCATCAGC
pAC5.1-V5-rev1	CTCAGGCCTTAGAAGGCAC

7.2 Antikörperliste

Tabelle 7.2: Verwendete Antikörper

Antikörperbezeichnung	Verdünnung/Zytologie	Hersteller/ LOT-Nr.
polyclonal H3K4 mono-methyl	1:100	Upstate/24402/ cat 07-436
polyclonal H3K4 di-methyl	1:100	Upstate/26335/cat 07-030
polyclonal H3K4 tri-methyl	1:100	Upstate/32497/ cat 07-473
polyclonal H3K4 tri-methyl	1:100	Abcam/242125/ab8580-28
polyclonal H3K4 tri-methyl	1:100	Abcam/287912/ab8580-25
polyclonal H3K4 tri-methyl	1:100	Abcam/224576/ab8580-25
polyclonal H3K9 acetyl	1:100	Upstate/23997/cat 06-942
polyclonal H3K9 mono-methyl	1:100	Upstate/24441/cat 07-460
polyclonal H3K9 di-methyl	1:100	Upstate/0608038250
polyclonal H3K9 di-methyl	1:100	Upstate/30309/cat 07-441
polyclonal H3K9 tri-methyl	1:100	Abcam/275887/ab 8898-25
polyclonal α-LID-Ak	1:75	Heiko Baisch
polyclonal H3-S10 phospho.	1:100	Abcam/35682/ab 5176-25
polyclonal HP1	1:100	Abcam/165642/ab 24724
polyclonal HP1	1:100	S. Elgin
polyclonal HDAC1 (RPD3)	1:50	Abcam/269532/ab 1767-00
polyclonal SU(VAR)3-3 Ak.	1:100	Th. Rudolph
polyclonal H4K20 tri-methyl	1:50	Abcam/232666/ab9053-100

polyclonal H3K36 tri-methyl	1:100	Upstate/26796/cat 07-540
polyclonal H3K36 di-methyl	1:100	Upstate/26796/cat 07-540
polyclonal H3K27 di-methyl	1:50	Upstate/32530/cat 07-452
polyclonal H4K8 acetyl	1:100	Upstate/30399/cat 07-328
polyclonal WHSC 1 (MES1)	1:50	Matthias Walter
polyclonal 2-1-Ak	1:100	Matthias Walter
polyclonal PP1	1:20	Sandro Lein/ Serum
Goat-anti-mouse-Peroxidase (GAM)	1:2000 (Western)	Jackson Immuno Research
Goat-anti-rabbit-Peroxidase (GAR)	1:5000 (Western)	Jackson Immuno Research

7.3 Kreuzungsschema zur Herstellung von w^+ Deletionen und w^+ Duplikationen aus P-Elementen

$w/w; RS3r/SM6; +/+$	X	$w/Y; RS5r/SM6; +/+$
$w/w; RS3r/RS5r; +/+$	X	$w/Y; SM6/Sco; +/+$
$w/w; Df,Dp/SM6; +/+$	X	$w/Y; SM6/Sco; +/+$

Analyse: $w/Y; Df,Dp/ SM6; +/+ \rightarrow$ Ausnahmefliegen

Abbildung 7.1: Kreuzungsschema zum Stammaufbau von w^+ Defizienz- und Duplikationsallelen für das 2. Chromosom. (RS3r/RS5r= remnant P-Element; Df= Defizienzallel; Dp= Duplikationsallel)

7.4 Kreuzungsschema zur Herstellung von w^- Deletionen und w^- Duplikationen aus P-Elementen

$W^{m4h}/W^{m4h}; RS5r/SM6; +/+$	X	$w^{m4h}/Y; RS5r/SM6; +/+$
$W^{m4h}/W^{m4h}; RS5r/RS5r; +/+$	X	$w^{m4h}/Y; SM6/Sco; +/+$
$W^{m4h}/W^{m4h}; Df,Dp/SM6; +/+$	X	$w^{m4h}/Y; SM6/Sco; +/+$

Analyse: $w^{m4h}/Y; Df,Dp/ SM6; +/+ \rightarrow$ Ausnahmefliegen

Abbildung 7.2: Kreuzungsschema zum Stammaufbau von w^- Defizienz- und Duplikationsallelen am Beispiel von RS5remnant-Elementen für das 2. Chromosom. (RS5r= remnant P-Element; Df= Defizienzallel; Dp= Duplikationsallel)

7.5 Kreuzungsschema zur Herstellung von neuen Mutantenallelen durch P-Elementremobilisierung

$w^-/w^-; SM6a/Sco; +/+$	X	$w^-/Y; +/+; \Delta 2-3Dr/TM6c$
$w^-/w^-; SM6a/+; \Delta 2-3Dr/+$	X	$+/Y; P-Element/SM6; +/+$
$w^{m4h}/w^{m4h}; SM1/T(2;3)ap^{Xa}, Su(var)2-1^{01}/Sb$	X	$w^-/Y; P-Element/SM6a; \Delta 2-3Dr/+$

Analyse: $w^{m4h}/Y; P-Element/T(2;3)ap^{Xa}, Su(var)2-1^{01}/+$ → Ausnahmefliegen

Abbildung 7.3: Kreuzungsschema zur Remobilisierung von P-Elementen mit anschließenden Test auf Enhancereffekt. (P-Element= $P\{PZ\}lid^{10424}$ oder $P\{lacW\}lid^{k06801}$)

7.6 Kreuzungsschema zur Herstellung transgener lid- und ding2-Linien

$v/v; SM6/T; ry/ry$	X	$+/Y; P/SM6; +/+$
$v/+; P/T; ry/+$	X	$w/Y; SM6/Sco; +/+$
$w/w; SM6/Sco; +/+$	X	$v/Y; P, T/SM6; +/+$

Analyse: $v/Y; Pr, T/SM6; +/+$ → Ausnahmefliegen

Abbildung 7.4: Kreuzungsschema zum Stammbaufbau von lid- und ding2-Allelen für das 2. Chromosom. (T= Transgen; P= Promotor; v= vermilion; ry= rosy)

7.7 Transgene lid- und ding2- Fliegenstämme

Tabelle 7.3: Hergestellte lid- und ding2- Fliegenstämme.

Stammbezeichnung	Anzahl	Genotyp
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴	1	+/+; <i>Cn</i> ¹ , <i>Pry</i> ^{+i7.2} =PZ <i>lid</i> 10424/CyO; <i>ry</i> ^{RK} / <i>ry</i> ^{RK}
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻¹	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻¹ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻²	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻² /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻³	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻³ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁴	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁴ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁵	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁵ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁶	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁶ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁷	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁷ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁸	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁸ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁹	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁹ /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁸ -GFP	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁸ /T(2;3)CyO, GFP, TM3, Ser, <i>w</i> ⁺ , <i>e</i> / <i>Sb</i> ¹
<i>lid</i> ^{k06108}	1	Y, <i>w</i> ^{67c23} ; P{lacW(<i>w</i> ⁺)} <i>lid</i> k06801/CyO; +/+
<i>lid</i> ^{k06108-1}	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ^{k06801-1} /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ^{k06108-2}	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ^{k06801-2} /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>lid</i> ^{k06108-3}	1	<i>w</i> ^{m4h} /Y; <i>lid</i> ^{k06801-3} /T(2;3) <i>ap</i> ^{Xa} <i>Su</i> (var)2-1 ⁰¹ /+
<i>dING2</i> -cDNA-2	3	<i>v</i> ⁻ ; pGS{UAS, <i>dING2</i> -cDNA, eGFP, <i>v</i> ⁺ }/CyO; <i>ry</i> ^{RK} / <i>ry</i> ^{RK}
<i>dING2</i> -cDNA-3	8	<i>v</i> ⁻ ; +/+; pGS{UAS, <i>dING2</i> -cDNA, eGFP, <i>v</i> ⁺ }, <i>ry</i> ^{RK} /TM3, <i>Sb</i> ¹ , Ser, <i>ry</i> ^{RK}
<i>dING2</i> -Y360A-2	4	<i>v</i> ⁻ ; pGS{UAS, <i>dING2</i> -cDNA(Y360A), eGFP, <i>v</i> ⁺ }/CyO; <i>ry</i> ^{RK} / <i>ry</i> ^{RK}
<i>dING2</i> -Y360A-3	12	<i>v</i> ⁻ ; +/+; pGS{UAS, <i>dING2</i> -cDNA(Y360A), eGFP, <i>v</i> ⁺ }, <i>ry</i> ^{RK} /TM3, <i>Sb</i> ¹ , Ser, <i>ry</i> ^{RK}
<i>lid</i> -cDNA-3Sgs	3	<i>v</i> ⁻ ; +/+; Sgs3GAL4, pGS{UAS, <i>lid</i> -cDNA, eGFP, <i>v</i> ⁺ }, <i>ry</i> ^{RK} /TM3, <i>Sb</i> ¹ , Ser, <i>ry</i> ^{RK}
Δ <i>lid</i> 587-740aa-2Ac	1	<i>v</i> ⁻ ; AcGAL4, pGS{UAS, <i>lid</i> -cDNA Δ JmjC 587-740, eGFP, <i>v</i> ⁺ }/CyO; <i>ry</i> ^{RK} / <i>ry</i> ^{RK}
Δ <i>lid</i> 587-740aa-2Sgs	1	<i>v</i> ⁻ ; Sgs3GAL4, pGS{UAS, <i>lid</i> -cDNA Δ JmjC 587-740, eGFP, <i>v</i> ⁺ }/CyO; <i>ry</i> ^{RK} / <i>ry</i> ^{RK}
Δ <i>lid</i> 587-740aa-3Ac	1	<i>v</i> ⁻ ; +/+; AcGAL4, pGS{UAS, <i>lid</i> -cDNA Δ JmjC 587-740, eGFP, <i>v</i> ⁺ }, <i>ry</i> ^{RK} /TM3, <i>Sb</i> ¹ , Ser, <i>ry</i> ^{RK}
Δ <i>lid</i> 624-740aa-2Ac	2	<i>v</i> ⁻ ; AcGAL4, pGS{UAS, <i>lid</i> -cDNA Δ JmjC 624-740, eGFP, <i>v</i> ⁺ }/CyO; <i>ry</i> ^{RK} / <i>ry</i> ^{RK}
Δ <i>lid</i> 624-740aa-2Sgs	1	<i>v</i> ⁻ ; Sgs3GAL4, pGS{UAS, <i>lid</i> -cDNA Δ JmjC 624-740,

7 Anhang

		<i>eGFP, v⁺}/CyO; ry^{RK}/ry^{RK}</i>
<i>Δlid 624-740aa-3Ac</i>	1	<i>v⁻; +/+; AcGAL4, pGS{UAS,lid-cDNA ΔJmjC 624-740, eGFP, v⁺}, ry^{RK}/TM3, Sb¹, Ser, ry^{RK}</i>
<i>Δlid 624-740aa-3Sgs</i>	1	<i>v⁻; +/+; SgsGAL4, pGS{UAS,lid-cDNA ΔJmjC 624-740, eGFP, v⁺}, ry^{RK}/TM3, Sb¹, Ser, ry^{RK}</i>
<i>lid-cDNA-Xhs</i>	1	<i>v⁻/P{GS.v⁺, hs(cDNA-lid) EGFP3⁺}/v⁻/P{GS.v⁺, hs(cDNA-lid) EGFP3⁺}; +/+; ry^{RK}/ry^{RK}</i>
<i>lid-cDNA-2hs</i>	2	<i>v⁻; P{GS.v⁺, hs(cDNA-lid) EGFP3⁺}/CyO; ry^{RK}/ry^{RK}</i>
<i>lid-cDNA-3hs</i>	1	<i>v⁻; +/+; P{GS.v⁺, hs(cDNA-lid) EGFP3⁺}, ry^{RK}/TM3, Sb¹, Ser, ry^{RK}</i>
<i>lid-cDNA-2-w^{m4h}</i>	1	<i>w^{m4h}; P{GS.v⁺, hs(cDNA-lid) EGFP3⁺}/CyRoi</i>
<i>lid-cDNA-3-w^{m4h}</i>	1	<i>w^{m4h}; +/+; P{GS.v⁺, hs(cDNA-lid) EGFP3⁺}/TM3, Ser</i>
<i>Df(2L)HB4lid⁻/Su(var)3-3¹¹</i>	1	<i>w¹; Df(2L)HB4lid⁻/T(2;3)CyO, GFP, TM3, Ser, w⁺, e/Su(var)3-3¹¹</i>
<i>Df(2L)HB4lid⁻/Su(var)3-3¹²</i>	1	<i>w¹; Df(2L)HB4lid⁻/T(2;3)CyO, GFP, TM3, Ser, w⁺, e/Su(var)3-3¹²</i>
<i>lid⁺/Su(var)3-3⁺</i>	1	<i>w¹; Dp(2L)HB4lid⁺/Dp(2L)HB4lid⁺; Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺/Dp(3L)TR3Su(var)3-3⁺</i>
<i>lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/Su(var)3-3¹¹</i>	1	<i>w¹; lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/T(2;3)CyO, GFP, TM3, Ser, w⁺, e/Su(var)3-3¹¹</i>
<i>lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/Su(var)3-3¹²</i>	1	<i>w¹; lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸/T(2;3)CyO, GFP, TM3, Ser, w⁺, e/Su(var)3-3¹²</i>
<i>Df(2L)HB1Su(var)2-5⁻</i>	2	<i>w^{m4h}; Df(2L)HB1Su(var)2-5⁻/Df(2L)HB1Su(Var)2-5⁻; +/+</i>
<i>Dp(2L)HB1Su(var)2-5⁺</i>	2	<i>w^{m4h}; Dp(2L)HB1Su(var)2-5⁺/Dp(2L)HB1Su(Var)2-5⁺; +/+</i>
<i>Df(2L)HB4lid⁻</i>	2	<i>w^{m4h}; Df(2L)HB4lid⁻/Df(2L)HB4lid⁻; +/+</i>
<i>Dp(2L)HB4lid⁺</i>	2	<i>w^{m4h}; Dp(2L)HB4lid⁺/Dp(2L)HB4lid⁺; +/+</i>
<i>Dp(3R)HB22ding2⁺</i>	2	<i>w^{m4h}; +/+; Dp(3R)HB22ding2/ Dp(3R)HB22ding2</i>

7.8 Evolutionäre Konservierung

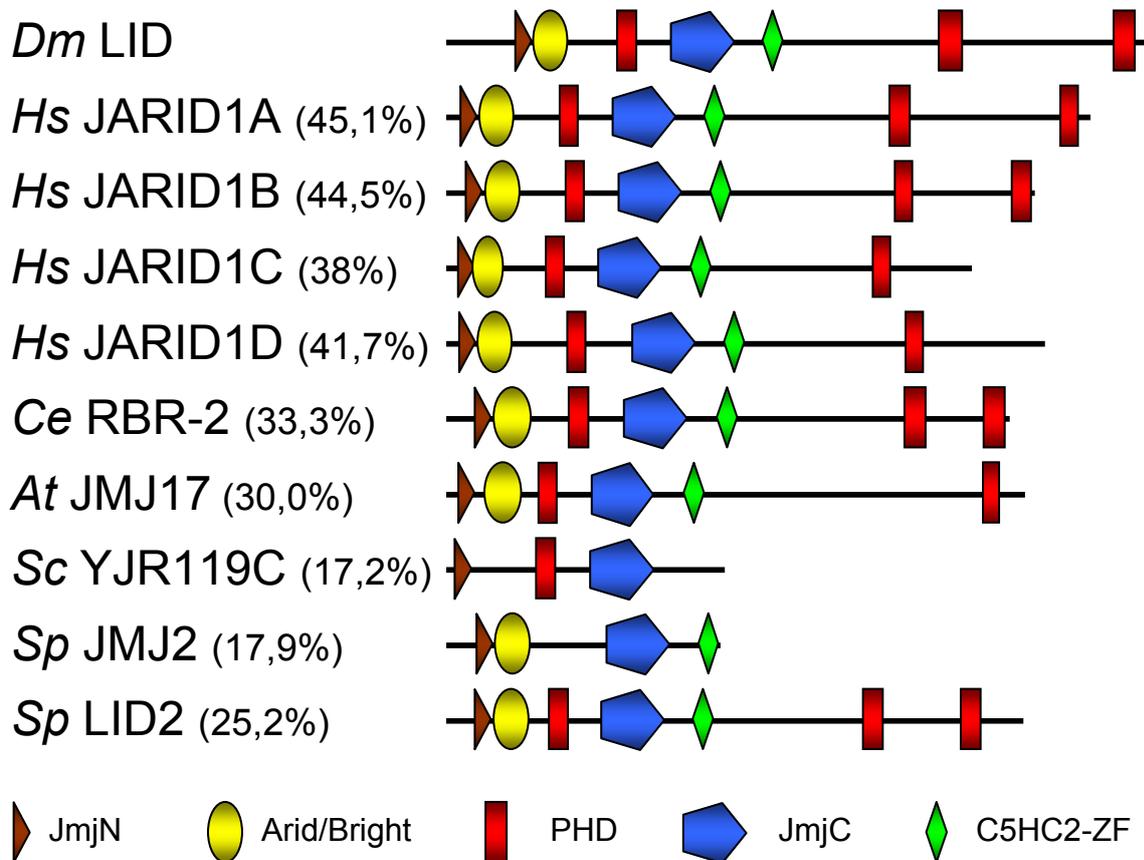


Abbildung 7.5: Homologievergleich der Domänenorganisation. Vergleich des *Drosophila melanogaster* Proteins *Dm LID* mit homologen Mitgliedern der humanen JARID1-Familie (P29375, Q9UGL1, P41229 und Q9BY66), *Ce RBR-2* (Q23541), dem einzigen Mitglied aus *Ceanorhabditis elegans*, den beiden Homologen *Sp LID2* (Q9HDV4) und *Sp JMJ2* (Q9US53) aus *Schizosaccharomyces pombe* und *Sc YJR119C* (P47156) aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie *At JMJ17* (Q9SH34), dem Homologen aus *Arabidopsis thaliana*. Der Anteil der Sequenzübereinstimmung der Gesamtproteine mit *Dm LID* ist in Prozent angegeben und mit dem Programm Genebee erstellt.

7.9 Publikationsliste

Ryder E., Blows F., Ashburner M., Bautista-Llacer R., Coulson D., Drummond J., Webster J., Gubb D., Gunton N., Johnson G., O'Kane C.J., Huen D., Sharma P., Asztalos Z., Baisch H., Schulze J, Kube M., Kittlaus K., Reuter G., Maroy P., Szidonya J., Rasmuson-Lestander A., Ekström K., Dickson B., Hugentobler C., Stocker H., Hafen E., Lepesant J.A., Pflugfelder G., Heisenberg M., Mechler B., Serras F., Corominas M., Schneuwly S., Preat T., Roote J. und Russell S. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **167**(2), 797-813.

Ryder E., Ashburner M., Bautista-Llacer R., Drummond J., Webster J., Johnson G., Morley T., Chan Y.S., Blows F., Coulson D., Reuter G., Baisch H., Apelt C., Kauk A., Rudolph T., Kube M., Klimm M., Nickel C., Szidonya J., Maróy P., Pal M., Rasmuson-Lestander A., Ekström K., Stocker H., Hugentobler C., Hafen E., Gubb D., Pflugfelder G., Dorner C., Mechler B., Schenkel H., Marhold J., Serras F., Corominas M., Punset A., Roote J. und Russell S. (2007). The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics*, **177**(1): 615-629.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „**Die H3K4me3 Histondemethylase LID reguliert die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin in *Drosophila melanogaster***“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die den genutzten Werken wörtlich bzw. inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde von mir an keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt.

Halle, den

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname Baisch, Heiko
Anschrift Carl-Robert-Staße 2, 06114 Halle
Geburtsdatum 27.05.1974
Geburtsort Querfurt
Nationalität deutsch
Familienstand ledig, 1 Kind

Schulbildung und beruflicher Werdegang

1980 – 1990 Besuch der Polytechnischen Oberschule „Hans Beimler“ in
Karsdorf
1990 – 1994 Lehrausbildung zum Industrieelektroniker
1994 – 1995 Berufstätig als Elektroniker und Elektriker
1995 – 1997 Besuch der „Schule des Zweiten Bildungsweges“ (Kolleg) in
Halle, Abschluss mit Abitur (Gesamtnote: 1,8)

Studium und wissenschaftlicher Werdegang

1997 – 2002 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg (Gesamtnote: 1,7)
2002 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dr. Thomas Braun am Institut für
Physiologische Chemie der MLU-Halle/Wittenberg zum Thema:
„Charakterisierung und funktionelle Analyse regulatorischer
Elemente im Promotor des NSCL-2-Gens“
2002 – 2008 Promotion bei Prof. Dr. Gunter Reuter am Institut für Biologie der
MLU-Halle/Wittenberg zum Thema: „Die H3K4me3
Histondemethylase LID reguliert die Balance zwischen Eu- und
Heterochromatin in *Drosophila melanogaster*“
2008 – 2009 Absolvierung des Zertifikates „Informatik für Nanotechnologie
und bildgebende Meßverfahren“ in Halle
2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Fa. CBA in Leipzig
2009 – 2010 Absolvierung des europäischen Sprachenzertifikates „TELC-
English B1 Business“ in Halle (Gesamtnote: 1)
seit 07.2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie und
Zellbiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Reuter für die Überlassung des interessanten Themas, die beständige, fördernde Unterstützung sowie die fachlichen Diskussionen. Sein Vertrauen, motivierende Worte und die exzellente Betreuung haben wesentlich dazu beigetragen, dass die Arbeit abgeschlossen werden konnte.

Weiterhin möchte ich Dr. Rainer Dorn, Dr. Andreas Fischer, Dr. Ingo Hofmann und Dr. Thomas Rudolph für all die wissenschaftlichen Diskussionen während meiner Dissertation danken.

Ein großer Dank gehört auch meinen Diplomanden Dennis und Martin. Sie haben mich in meiner Arbeit immer unterstützt und zum Gelingen meiner Promotion beigetragen.

Bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik, insbesondere Kathleen Gebhardt (geb. Heidrich), Matthias Walther, Sandro Lein, Claudia Nickel, Sandy Mietzsch, Olaf Nickel, Christian Apelt, Dr. Christiane Linder (geb. Schäfer) und unseren indischen und technischen Mitarbeitern möchte ich für das harmonische und freundschaftliche Arbeitsklima und sozialen Aktivitäten danken.

Meiner Familie, Freunden und besonders meiner Tochter Alina danke ich für die unablässige Unterstützung, Hilfe, Geduld und Liebe, ohne die diese Arbeit nie ein Ende gefunden hätte.