

**H3K4 Demethylierung durch die Histon-Demethylase
SU(VAR)3-3 kontrolliert die Heterochromatinbildung
in *Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Herrn Thomas Rudolph
geb. am 07.04.1973 in Leinefelde

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gunter Reuter
2. Prof. Dr. Harald Saumweber
3. Prof. Dr. Axel Imhof

Verteidigung : 25.04.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012159

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012159>]

Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EMS	Ethylmethansulfonat
E(var)	Enhancer of Variegation
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
H3-K4	Lysin 4 von Histon H3
H3-K9	Lysin 9 von Histon H3
H3-K27	Lysin 27 von Histon H3
H4-K20	Lysin 20 von Histon H4
HMTase	Histonmethyltransferase
HDMase	Histondemethylase
HDAC	Histondeacetylase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	β -Galactosidase
LSM	Laser Scanning Mikroskop
NP40	Nonident P40
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline + 0.2% Tween 20
PcG	Polycomb-Gruppenproteine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEV	Positionseffekt-Variegation
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA interference
SET	Su(var)3-9 / Enhancer of zeste / Trithorax
SDS	Natriumdodecylsulfat
Su(var)	Suppressor of Variegation
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactosid

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Genetische Methoden	10
2.1.1 Anzucht der Fliegen	10
2.1.2 Kartierung von <i>Su(var)3-3</i>	10
2.1.3 Untersuchungen zur genetischen Interaktionen verschiedener Suppressoren	11
2.1.4 Herstellung transgener <i>Drosophila</i> -Linien	11
2.1.5 Untersuchung des Effektes von <i>Su(var)3-3</i> auf heterochromatisches Gensilencing	11
2.2 Molekularbiologische Methoden	12
2.2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme	12
2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden	12
2.2.3 DNA-Isolation aus einzelnen Fliegen	13
2.2.4 Inverse PCR	13
2.2.5 Molekulare Analyse der <i>Su(var)3-3</i> Allele	14
2.2.6 Zellkultur	14
2.3 Proteinbiochemische Methoden	14
2.3.1 Herstellung von Kernextrakten aus <i>Drosophila</i> -Embryonen	14
2.3.2 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen	15
2.3.3 Herstellung von polyklonalen Antikörpern	16
2.3.4 Reinigung des SU(VAR)3-3 spezifischen Antikörpers	16
2.3.5 Gelelektrophorese von Proteinen	17
2.3.6 Nachweis von Proteinen im Westernblot	17
2.3.7 Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, RPD3 und HP1	18
2.4 Immunozytologische Methoden	18
2.4.1 <i>In vivo</i> -Detektion von EGFP	18
2.4.2 Enzymatischer Assay für <i>lacZ</i> -Expression in Speicheldrüsen	19
2.4.3 Immunmarkierung von Polytänchromosomen	19
2.4.4 Immunmarkierung von Embryonen	20

3 Ergebnisse	22
3.1 <i>Su(var)3-3</i> ist ein genereller Suppressor für heterochromatisches Gensilencing und epistatisch über den Triploenhancer-Effekt zusätzlicher Kopien von <i>Su(var)3-9</i> , <i>Su(var)3-7</i> und <i>Su(var)2-5</i>	22
3.1.1 Eine regulierte Überexpression von <i>Su(var)3-3</i> ist epistatisch über den Suppressor-Effekt von <i>Rpd3</i>	24
3.2 Klonierung von <i>Su(var)3-3</i>	25
3.3 Molekulare Analyse der <i>Su(var)3-3</i> Allele	28
3.4 Evolutionäre Konservierung von SU(VAR)3-3	31
3.5 SU(VAR)3-3 ist ein kernlokalisiertes Protein	32
3.6 Generierung eines polyklonalen SU(VAR)3-3 spezifischen Antikörpers	34
3.6.1 Testung der Spezifität des gereinigten SU(VAR)3-3 Antikörpers	35
3.7 Etablierung stabiler SU(VAR)3-3 exprimierender S2-Zelllinien	39
3.8 Präzipitation des SU(VAR)3-3 Proteins aus <i>Drosophila</i> S2 Zellen	41
3.8.1 Reinigung von FLAG-SU(VAR)3-3-V5-HIS aus stabilen Zelllinien	41
3.8.2 Reinigung von SU(VAR)3-3 Varianten mit Biotin-Tag	42
3.9 Präzipitation von SU(VAR)3-3 aus embryonalen Extrakten	45
3.10 SU(VAR)3-3 interagiert mit SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 <i>in vivo</i>	46
3.11 Zytologische Lokalisierung von SU(VAR)3-3 in verschiedenen Stadien der Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3.11.1 Verteilung von SU(VAR)3-3 und H3K4 Dimethylierung in frühen Embryonalstadien von <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3.11.2 Lokalisation von SU(VAR)3-3 im Verlauf des Zellzyklus	55
3.12 Einfluss von <i>Su(var)3-3</i> Null-Mutanten auf Histon-Modifizierungen in polytären Speicheldrüsenchromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	56
3.12.1 Analyse der H3K4 und H3K9 Methylierung im Wildtyp, in <i>Su(var)3-3</i> Null-Mutanten und in einer SU(VAR)3-3EGFP Überexpressionslinie	56
4 Diskussion	59
4.1. <i>SU(VAR)3-3</i> ist ein genereller Bestandteil heterochromatischer Proteinkomplexe und wirkt „upstream“ von SU(VAR)3-9 Silencingkomplexen	60
4.2 Die Aminoxidase-Domäne ist essentiell für die Funktion von SU(VAR)3-3	62
4.3 SU(VAR)3-3 interagiert zum Zeitpunkt der Etablierung von Heterochromatin mit SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3	63
4.4 SU(VAR)3-3 ist eine H3K4 spezifische Demethylase und essentiell für die Etablierung von Heterochromatin im Embryo von <i>Drosophila melanogaster</i>	64
4.5 Die Demethylaseaktivität von SU(VAR)3-3 induziert die transkriptionelle „Quiescence“ in der Keimbahn von <i>Drosophila</i>	67
4.6 SU(VAR)3-3 verhindert im Embryo eine zu frühe Aktivierung der zygotischen Transkription	68

4.7 SU(VAR)3-3 wird während der Mitose periodisch umverteilt	69
4.8 SU(VAR)3-3 ist eine H3K4 Dimethyl spezifische Demethylase in den Interbanden polytärer Speicheldrüsenchromosomen	69
4.9 Die Überexpression von SU(VAR)3-3EGFP führt zu einem drastischen Verlust der H3K4 und H3K9 Methylierung	70
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis	74
7 Anhang	86
7.1 Primerliste	86
7.2 Publikationsliste	88

1 Einleitung

Conrad Waddington (1905-1975) definierte Epigenetik als „Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, welche den Phänotyp hervorbringen“. Heute weiß man, dass die Komplexität eines Organismus mehr durch die zeitliche und räumlich präzise Kontrolle seiner Gene, als durch die Gene selbst bestimmt wird. Jeder eukaryotische Organismus besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, die alle die gleiche Erbinformation beinhalten, jedoch unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Etablierung eines bestimmten Zelltyps wird durch ein spezifisches Expressionsmuster bestimmter Gene initiiert und dann epigenetisch stabil gehalten. Sowohl das Expressionsmuster, als auch die epigenetische Stabilität wird entscheidend durch die Chromatinstruktur beeinflusst. Die Grundeinheit der Verpackung der DNA im Chromatin ist das Nucleosom, welches aus je zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 besteht (Luger et al., 1997). Die Art der Histonmodifikationen bestimmt die Bindung assoziierter Proteine und damit letztendlich die Art des Chromatins. Man unterscheidet generell zwischen Eu- und Heterochromatin, wobei letzteres spät in der Interphase repliziert wird (Lima di Faria und Jaworska, 1968) und nur wenige transkribierte Gene enthält (Gatti und Pimpinelli, 1992). Innerhalb des konstitutiven Heterochromatins sind die Nucleosomen regelmäßig angeordnet (Wallrath und Elgin, 1995). Es besteht größtenteils aus hoch- und mittelrepetitiven Sequenzen (Lohe et al., 1993). Die charakteristischen Modifikationen des Heterochromatins sind alle H3K9 und H3K27 Methylierungsstufen (Rea et al., 2000; Nakayama et al., 2001; Peters et al., 2002; Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004; Ebert et al., 2006) sowie das Vorhandensein von H4K20 Trimethylierung (Schotta et al., 2004). Im Gegensatz dazu enthält das Euchromatin die Mehrzahl der aktiv transkribierten Gene und ist durch H3K4 Methylierung gekennzeichnet (Zhang und Reinberg, 2001; Bernstein et al., 2002; Kouzarides et al., 2002). Die vielfältigen posttranslationalen Modifikationen der Histone, wie zum Beispiel Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitinierung (Strahl und Allis, 2000), bestimmen also ganz entscheidend den Verpackungsgrad der DNA. Dieser Verpackungsgrad determiniert

letztlich die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und reguliert dadurch die Genexpression. Die dynamische Veränderung der Modifikationsmuster der Histone geht also mit einer veränderten Organisation der Chromatinstruktur einher. Es wird postuliert, dass die Kombination verschiedener Modifikationsmuster einen so genannten Histon-Code ergibt, welcher dann von Nicht-Histon-Proteinen erkannt und interpretiert wird (Jenuwein und Allis, 2001). Die dynamische Veränderung der Histonmodifikationen durch antagonistisch arbeitende Enzyme wie Methylasen/Demethylasen, Acetylasen/Deacetylasen und Kinasen/Phosphatasen führt somit zur Etablierung eines Histon-Codes. Dieser Histon-Code, zusammen mit den für die Interpretation nötigen Faktoren, stellt folglich die strukturelle Basis epigenetischer Kontrollmechanismen dar. Die Identifikation der beteiligten Enzyme und Bindeproteine ist somit essentiell für das Verständnis epigenetischer Regulationsmechanismen.

Ein System, welches sehr gut geeignet ist, epigenetische Kontrollfaktoren zu identifizieren, stellt das Phänomen der Positioneffekt-Variation (PEV) dar. Euchromatische Gene gelangen dabei durch chromosomale Rearrangements in die Nähe heterochromatischer Bereiche und werden partiell stillgelegt. Wird beispielsweise das *white*-Gen, welches für die rote Augenpigmentierung verantwortlich ist, durch eine Inversion des X-Chromosoms in die Nähe heterochromatischer Bereiche verlagert, führt dieses zu einer variablen Inaktivierung. Diese Inaktivierung ist an einer rot-weißen mosaikartigen Augenpigmentierung (*white*-mottled-Phänotyp) erkennbar (Muller, 1930; Reuter et al., 1983; Tartof et al., 1984). Dieses Heterochromatin-Induzierte Gensilencing stellt ein exzellentes System zur Identifikation epigenetischer Kontrollfaktoren dar. In genetischen Screens konnten zahlreiche Modifikatoren für Positioneffekt-Variation identifiziert werden (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1983; Wustmann et al., 1989; Dorn et al., 1993). Die isolierten Modifikatoren supprimieren (Suppressor of Variegation [Su(var)s]) oder verstärken (Enhancer of Variegation [E(var)s]) PEV. Ein Suppressor für PEV kodiert damit für ein Genprodukt, das essentiell für den Aufbau oder die Erhaltung heterochromatischer Strukturen ist. Molekular bereits identifizierte Suppressoren sind beispielsweise die H3K9 Methyltransferase SU(VAR)3-9 (Tschiersch et al., 1994; Schotta et al., 2002), das H3K9 Methylierung bindende Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Eisenberg et al., 1990;

Lachner et al., 2001; Bannister et al., 2001) und das Zinkfingerprotein SU(VAR)3-7 (Reuter et al., 1990). Alle drei Suppressoren zeigen nach Überexpression einen triplo-abhängigen Enhancereffekt für PEV. Dieses bedeutet, dass Heterochromatin-Induziertes Gensilencing deutlich verstärkt wird (Reuter et al., 1990; Schotta et al., 2002).

Su(var)3-7 ist das erste klonierte Suppressorgen (Reuter et al., 1990). Charakteristisch für SU(VAR)3-7 sind sieben Zinkfinger-Motive, die eine Bindung an spezifische Satelliten-Sequenzen ermöglichen (Cleard und Spierer, 2001). Eine Bindung an heterochromatische Regionen konnte durch immunzytologische Methoden nachgewiesen werden (Cleard et al., 1997). Durch Co-Immunopräzipitation und Hefe-Dihybridanalysen konnte eine Interaktion zwischen HP1 und SU(VAR)3-7 gezeigt werden (Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000).

Der Suppressor *Su(var)2-5* kodiert für das HP1 Protein. Dieses Heterochromatinprotein wurde durch biochemische Methoden identifiziert (James und Elgin, 1986) und ist von der Hefe (Swi6p) bis zum Menschen (M31) evolutionär konserviert (Singh et al., 1991). Durch immunzytologische Methoden konnte sowohl eine Bindung an das Heterochromatin und das vorwiegend heterochromatische vierte Chromosom, als auch an Telomere und einige euchromatische Regionen nachgewiesen werden (James et al., 1989; Fanti et al., 1998). HP1 enthält sowohl eine Chromo-Domäne (Paro und Hogness, 1991) als auch eine Chromo-Shadow-Domäne (Aasland und Stewart, 1995). Eine am Histon H3 existierende Lysin 9 Methylierung wird durch HP1 erkannt und gebunden (Lachner et al., 2001; Nakayama et al., 2001).

Bei *Su(var)3-9* handelt es sich um einen der stärksten bisher identifizierten Suppressoren für PEV. *Su(var)3-9* Mutanten sind homozygot lebensfähig, zeigen aber eine stark reduzierte Fertilität. Das Protein enthält wie HP1 eine Chromo-Domäne und im C-terminalen Bereich eine SET-Domäne (Tschiersch et al., 1994). Es ist ebenfalls von *Schizosaccharomyces pombe* (Clr4p) bis zum Menschen evolutionär konserviert. Im Menschen gibt es mit SUV39H1 (Aagaard et al., 1999) und SUV39H2 (O'Carroll et al., 2000) zwei Orthologe. SUV39H1 ist in der Lage in *Drosophila* die Funktion von SU(VAR)3-9 zu übernehmen und bei korrekter Expression den Mutantenphänotyp zu retten. Dieses beweist, dass beide Proteine nicht nur evolutionär, sondern auch funktionell konserviert sind (Schotta et al., 2002). Für SU(VAR)3-9 konnte eine

Interaktion mit SU(VAR)3-7 und HP1 gezeigt werden. Die Identifizierung von SUV39H1 als Histon-Methyltransferase (Rea et al., 2000) war ein Meilenstein der Chromatinforschung. Die SET-Domäne als katalytisches Motiv der Histon-Methyltransferasen definierte eine neue Klasse von Protein-Methyltransferasen und erweiterte das Verständnis vom Aufbau des Chromatins grundlegend. Laut Datenbankanalysen verfügt *Drosophila* über 20 SET-Domänen-Proteine. Wenn man bedenkt, dass einige Methyltransferasen in der Lage sind verschiedene Lysin Positionen zu methylieren, ergibt sich eine große Anzahl möglicher Modifikationen und ihrer Kombination (Kouzarides, 2002). Momentan sind 17 Lysin-Positionen und 7 Arginin-Positionen bekannt, welche methyliert werden können. Wenn man nun noch die drei verschiedenen Methylierungsstufen mit einberechnet (Santos-Rosa et al., 2002) ergeben sich allein 3×10^{11} verschiedene Methylierungsmuster (Bannister und Kouzarides, 2005). Der, durch SU(VAR)3-9 vermittelten, heterochromatischen H3K9 Methylierung kommt eine Schlüsselfunktion in der Etablierung heterochromatischer Chromatinstrukturen zu. SU(VAR)3-9 ist in *Drosophila* nicht die einzige heterochromatin-spezifische H3K9 Methyltransferase, da auch in Embryonen von *Su(var)3-9* Null-Mutanten noch signifikante Methylierung im Chromozentrum nachweisbar ist. Außer SUV39H1/H2 können auch E(Z)(Czermin et al., 2002), G9A (Tachibana et al., 2001), EUHMTASE1 (Ogawa et al., 2002) und ESET (Yang et al., 2002) H3K9 Methylierungen katalysieren. Im Heterochromatin der Fruchtfliege ist aber nicht nur H3K9 Methylierung nachweisbar. Auch alle H3K27 und H4K20 Methylierungsstufen sind prominente Modifikationen in Chromozentren polytärer Speicheldrüsenchromosomen (Ebert et al., 2006).

Heterochromatische Modifikationen wie H3K9 und H3K27 Methylierung sind nicht nur spezifisch für die Chromozentren der Chromosomen, sondern auch wichtig für die Erhaltung totipotenter Stammzellen in der Keimbahn. Folglich sind beide Methylierungen in den Polzellen von *Drosophila*, welche die Primordialzellen der Keimbahn darstellen, stark angereichert. Die, durch diese Chromatinstruktur vermittelte Repression, auch „transcriptional Quiescence“ genannt, verhindert die Aktivierung somatischer Differenzierungswege in der Keimbahn (Pirrotta et al., 2002; Seydoux und Schedl, 2001; Wylie, 1999). Wichtig für die Initiierung der transkriptionellen Inaktivität

sind Gene wie *nanos*, *germ cell-less* und *pumilio*, da es in Mutanten dieser Gene zu einer vorzeitigen Aktivierung der Transkription kommt (Asaoka-Taguchi et al., 1999; Deshpande et al., 1999; Leatherman et al., 2002). In *nanos* Mutanten tritt H3K4 Dimethylierung in den Polzellen auf, wohingegen diese Modifikation in Polzellen des Wildtyps völlig fehlt. Das Auftreten dieser aktiven Markierung geht einher mit einer Reduktion der H3K9 Methylierung und einem Verlust der transkriptionellen Repression (Schaner et al., 2003).

Im Gegensatz dazu ist für Euchromatin das Vorhandensein von H3K4 und H3K36 Methylierung in den Interbanden sowie H3K27 und H4K20 Methylierung in den Banden charakteristisch (Ebert et al., 2006). Die Methyltransferasen für H3K27 und H4K20 Methylierung in *Drosophila* sind E(Z) und PR-SET7 (Czermin et al., 2002; Nishioka et al., 2002). Die HMTasen für H3K4 und H3K36 Methylierung sind bisher nur in Hefe analysiert worden. In diesem Organismus wird die H3K4 Methylierung durch Set1p und die H3K36 Methylierung durch Set2p etabliert. Für beide Proteine existieren *Drosophila*-Homologe, welche bisher noch nicht genauer analysiert worden sind. Set1p ist in *Saccharomyces cerevisiae* die einzige H3K4 Methyltransferase, da in Set1 Mutanten die gesamte H3K4 Methylierung ausfällt (Briggs et al., 2001; Boa et al., 2003). Set1p assoziiert hauptsächlich mit der kodierenden Region von RNA-Polymerase II transkribierten Genen. Diese Assoziation zwischen Serin 5 phosphorylierter RNA Pol II und Set1p erfolgt über den Paf1 Komplex (Krogan et al., 2003). Eine direkte Interaktion der Proteine des Paf1 Komplexes mit den Mitgliedern des Set1 Komplexes konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. H3K4 Methylierung in der Hefe ist abhängig von einer Ubiquitinierung am Lysin 123 des Histons H2B. Diese Modifikation wird durch Rad6/Bre1 etabliert (Hwang et al., 2003; Ng et al., 2003) und ist ebenfalls abhängig vom Vorhandensein des Paf1 Komplexes. Der Verlust des Paf1 Komplexes, als auch der Verlust der H2BK123 Monoubiquitinierung, führt zu einer verringerten H3K4 Di- und Trimethylierung. Die H3K4 Monomethylierung ist von diesen Veränderungen nicht betroffen und sollte somit durch andere Faktoren reguliert werden (Dehe et al., 2005). Die Schlussfolgerung aus diesen Daten war, das Paf1 sowohl die Bindung von Rad6/Bre1, als auch von Set1 an transkriptionsaktive Regionen kontrolliert und damit eine offene Chromatinstruktur durch H2BK123

Monoubiquitinierung und H3K4 Methylierung etabliert. Diese These wird auch dadurch untermauert, dass Paf1 auch für die Etablierung der H3K36 und K79 essentiell ist (Sims et al., 2004).

Die wichtige Frage, wie die einzelnen H3K4 Methylierungsstufen in einer transkribierten Region verteilt sind, konnte ebenfalls in Hefe beantwortet werden. Der Peak der höchsten H3K4 Trimethylierung befindet sich im Promotorbereich eines Gens. Innerhalb der transkribierten Region wird häufig eine Anreicherung der H3K4 Dimethylierung gemessen, welche am 3' Ende des Gens in Monomethylierung übergeht (Pokholok et al., 2005).

Auch die H3K4 Methylierung wird durch entsprechende Bindeproteine erkannt und gebunden. So bindet zum Beispiel der Transkriptionsfaktor BPTF (bromodomain PHD-finger transcription factor) spezifisch H3K4 trimethylierte Nucleosomen und rekrutiert so den NURF-Komplex. Diese Bindung ist beispielsweise für die Regulation der HOX-Gene während der Entwicklung essentiell (Wysocka et al., 2006). Die H3K4 Trimethylierung kann in *Drosophila* beispielsweise durch die SET-Domänen-Proteine ASH1, TRX und TRR etabliert werden (Beisel et al., 2002; Sedkov et al., 2003; Petruk et al., 2001; Smith et al., 2004; Papp et al., 2006).

In den Zellen höherer Eukaryoten besteht also eine genau definierte Balance zwischen Eu- und Heterochromatin. Jede der Chromatindomänen ist durch spezifische Modifikationen und die sie erkennenden Bindeproteine gekennzeichnet. Dieser epigenetische Code innerhalb des Chromatins muss verändert werden, um reprimierte Gene zu aktivieren, oder aktive stillzulegen. Den Histon-Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung kommt dabei eine ganz entscheidende Rolle zu. Eine genau definierte Balance zwischen Acetylierung und Deacetylierung bestimmt beispielsweise die transkriptionelle Kompetenz einer bestimmten Region. Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Deacetylasen (HDACs) katalysieren dabei entgegengesetzte Reaktionen, die die transkriptionelle Aktivität eines Gens regulieren. Basierend auf der thermodynamischen Stabilität von Histon-Methylierungen wurde lange Zeit vermutet, dass diese Modifikationen irreversibel sind. Die Aktivierung eines durch H3K9 Methylierung inaktivierten Gens wäre damit nur durch Ausdünnung der Modifikation während der Replikation, Histon-Turnover oder

den replikationsunabhängigen Austausch durch das Replacement-Histon H3.3 möglich (Tagami et al., 2004; Loyola et al., 2006). Alle diese Möglichkeiten erlauben nicht die schnelle Adaption eines Organismus auf sich ändernde Umwelteinflüsse, oder die sehr komplexen Veränderungen in der Genaktivität während der Embryonalentwicklung. Folglich war es nur eine Frage der Zeit bis zur Entdeckung der ersten Lysin-spezifischen Demethylase (LSD1) (Shi et al., 2004). Methylierungen an den Lysin-Seitenketten der Histone können durch zwei Klassen von Enzymen entfernt werden. Enzyme vom Typ der Aminoxidasen katalysieren die Entfernung von mono- und dimethyl-Gruppen während Enzyme der *Jumonji* Familie die Entfernung von di- und trimethyl-Gruppen katalysieren können (Tsukada et al., 2006; Yamane et al., 2006; Whetstine et al., 2006; Klose et al., 2006; Fodor et al., 2006). Ebenso wie Methyltransferasen eu- oder heterochromatische Modifikationen etablieren, können auch Demethylasen entweder repressive oder aktive Markierungen entfernen (Bannister und Kouzarides, 2005). LSD1 kann beispielsweise je nach gebundenem Co-Faktor, sowohl die Demethylierung von mono- und dimethyliertem Lysin 4 des Histons H3 (Shi et al., 2005), als auch die Entfernung einer repressiven H3K9 Methylierung katalysieren (Metzger et al., 2005).

LSD1 wurde in einer Reihe von Co-Repressorkomplexen, wie dem CoREST Komplex, dem CtBP Komplex und in einigen HADC Komplexen als Interaktionspartner identifiziert (Ballas et al., 2001; Hakimi et al., 2002, 2003; Humphrey et al., 2001; Shi et al., 2003; You et al., 2001). Die Demethylase fungiert in diesen Komplexen als transkriptioneller Co-Repressor, indem es H3K4 Methylierung entfernt (Shi et al., 2004). Das Protein besitzt eine N-Terminale SWIRM Domäne und eine C-Terminale Aminoxidase-Domäne (AOD). Die SWIRM-Domäne wurde nach drei sie beinhaltenden Proteinen (Swi3p, Rsc8p und Moira) benannt und kann Chromatin und den N-Terminus vom Histon H3 binden (Tochio et al., 2006). Die AOD stellt die katalytisch aktive Region des Proteins dar. Sie bindet den für die Katalyse notwendigen Co-Faktor FAD und katalysiert die Demethylierung von mono- und dimethyliertem H3K4/H3K9 zu unmethyliertem Histon H3. Die Entfernung einer Trimethylierung ist auf Grund der katalysierten Reaktion nicht möglich. Das isolierte rekombinante Protein ist nur in der Lage Peptide und freie Histone zu demethylieren. Das Vorhandensein der SWIRM-

Domäne ist für die Katalyse unerheblich, da auch N-Terminal verkürzte Varianten die volle katalytische Aktivität zeigen (Forneris et al., 2005). Das im Chromatin vorliegende nucleosomale Substrat kann nur dann demethyliert werden, wenn CoREST als Co-Faktor gebunden ist (Shi et al., 2005). CoREST besteht aus einer ELM2 (Egl-27 und MTA1 homology 2) und zwei SANT (SWI-SNF, ADA, N-CoR und TFIIB) Domänen. Ein C-terminales Fragment, das die SANT Domäne 2 enthält reicht aus, um LSD1 zu stimulieren. Die SANT Domäne 1 ist, im Gegensatz zur zweiten SANT Domäne, nicht in der Lage, LSD1 zu stimulieren (Shi et al., 2005). Diesen Ergebnissen widersprechen Daten, wonach sowohl SANT1 als auch SANT2 stimulierend auf die Demethylierung von Nucleosomen wirken (Lee et al., 2005). Die SANT Domäne findet sich in vielen Chromatin-Remodelling-Komplexen (Aasland et al., 1996; Boyer et al., 2004) und kann je nach Protein sowohl DNA- als auch Histon-bindend sein (Boyer et al., 2002; Mo et al., 2005; Tahirov et al., 2002; Yu et al., 2003). Für die SANT 2 Domäne von CoREST konnte experimentell eine Bindung an DNA gezeigt werden (Yang et al., 2006). Diese Bindung ist notwendig zur Demethylierung nucleosomaler Substrate. Die Punktmutanten mit verringerter DNA Bindungsaffinität zeigen auch eine verminderte Stimulierung der Demethylaseaktivität (Yang et al., 2006).

Ein Bestandteil in zahlreichen LSD1 Komplexen ist die Histon-Deacetylase HDAC1. Das *Drosophila*-Enzym (RPD3) katalysiert die Deacetylierung von Lysin 9 des Histons H3. Inhibitoren dieser Deacetylierungsreaktion sind beispielsweise Trichostatin A oder Natriumbutyrat. In neueren Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Inhibitoren auch eine Demethylierung von H3K4 durch LSD1 inhibieren (Lee et al., 2006). HDAC1 benötigt ebenfalls CoREST zur Deacetylierung nucleosomaler Substrate und kann in seiner Aktivität durch LSD1 stimuliert werden. Beide Enzyme stimulieren sich demzufolge gegenseitig, um aktive Modifikationen an nucleosomalen Substraten zu entfernen (Lee et al., 2006). Diese am Beispiel von LSD1/HDAC1 nachgewiesene wechselseitige Regulation zeigt eindrucksvoll, wie wichtig eine präzise Regulation der Genaktivität für das Überleben eines Organismus in einer sich verändernden Umwelt ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassende Funktions-Analyse von SU(VAR)3-3, dem LSD1 Homologen aus *Drosophila*, durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeigen eine evolutionär konservierte Funktion der Histon-

Demethylase SU(VAR)3-3 im Prozess der H3K4 Demethylierung. *Su(var)3-3* wurde als einer der stärksten Suppressoren im System der PEV isoliert. Insgesamt konnten für dieses Gen 25 Allele identifiziert werden. Alle Allele zeigen eine rezessive männliche und weibliche Sterilität, welche keimbahnabhängig ist. Dieses konnte durch Polzelltransplantationen bewiesen werden und deutet auf eine essentielle Bedeutung des Genprodukts in der Keimbahn hin (Szabad et al., 1988). Außerdem reagieren *Su(var)3-3* Allele sensitiv auf den Histon-Deacetylase-Inhibitor Natriumbutyrat. Verabreicht man diesen mit dem Futter, sinkt die Anzahl homozygoter Fliegen signifikant (Reuter et al., 1982). Alle hier aufgeführten Daten deuten auf eine essentielle Funktion von SU(VAR)3-3 in der Etablierung der Keimbahn und im heterochromatischen Gensilencing 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 Schimmelbildung bzw. Bakterienwachstum wurden 0.1% Nipagin sowie 100 mM Ampicillin zugesetzt. Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18°C. Kreuzungen wurden 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 2,25% Nipagin zusammensetzt, verwendet. Zur Stimulation der Eiablage der Weibchen wurde Hefe auf die Platten gegeben.

2.1.2 Kartierung von *Su(var)3-3*

Das *Su(var)3-3⁰³* Allel wurde durch Rekombination in cis mit den beiden dominanten Marker *Lyra* und *Stubble* gebracht. Nach Kreuzung von Männchen des Genotyps $+/Y$; *CyO*, $H\{w^{+mC}=P2-3\}HoP2.1$; *Ly Su(var)3-3⁰³ Sb* / P-Element^x mit Weibchen des Genotyps w^{m4h} ; $+/+$ wurden *Ly+* oder *Sb+* Rekombinanten isoliert. Die selektierten Rekombinationsereignisse wurden stabilisiert, und auf ihren Suppressor-Phänotyp untersucht. In einem zweiten unabhängigen Test wurde eine Komplementationsanalyse mit dem *Su(var)3-3⁰⁹* Allel durchgeführt. Die transheterozygoten Nachkommen wurden anschließend auf männliche und weibliche Sterilität getestet. Defizienzen und Duplikationen für den *Su(var)3-3* Locus wurden mit Hilfe von Drosdel und Exelixis Insertionen durch FLP/FRT basierte Rekombination generiert (Ryder et al., 2004; Parks et al., 2004).

2.1.3 Untersuchungen zur genetischen Interaktionen verschiedener Suppressoren

Das Mutantallel $Su(var)3-3^{09}$ wurde mit Stämmen gekreuzt, die genomische Zusatzkopien von $Su(var)3-9$ ($P\{Su(var)3-9\}$), $Su(var)2-5$ ($P\{Su(var)2-5\}$) und $Su(var)3-7$ ($P\{Su(var)3-7\}$) enthalten. Die transheterozygoten Tiere der Nachkommenschaft wurden bezüglich ihres Effekts auf $In(1)w^{m4}$ beurteilt.

2.1.4 Herstellung transgener *Drosophila*-Linien

DNA-Moleküle, die als flankierende Sequenzen P-Element-Repeats enthalten, können mit Hilfe einer Transposase in das Genom von *Drosophila melanogaster* integriert werden (Rubin und Spradling, 1982). Dabei wird der Transformationsvektor zusammen mit einer Transposasequelle in Embryonen eines Stammes von *Drosophila melanogaster* injiziert, der eine Mutation für den entsprechenden Selektionsmarker, in diesem Fall des *white*-Gens, trägt. Nach Kreuzung der überlebenden Tiere mit dem für die Injektion verwendeten Stamm kann in der Nachkommenschaft auf transgene Individuen selektiert werden, die den Selektionsmarker ausprägen. Die für $Su(var)3-3$ erhaltenen Linie mit genauem Genotyp sind im Anhang aufgeführt.

2.1.5 Untersuchung des Effektes von $Su(var)3-3$ auf heterochromatisches Gensilencing

Der Suppressoreffekt von $Su(var)3-3^{09}$ wurde in den PEV-Rearrangements $Dp(1;f)\gamma 238$ (Le et al., 1995), welches eine variierte Ausprägung des *yellow*-Gens aufweist, $T(2;3)BL1$ (Lu et al., 1998), die $P[w+, HS-lacZ]$ welches Transgensilencing zeigt, sowie $T(2;3)Sb^v$ (Sinclair et al., 1983), was eine variable Inaktivierung des *Sb1*-Allels aufweist, analysiert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Zur Plasmidvermehrung wurde der *E.coli*-Bakterienstamm *DH5 α* (*F*, *end A1*, *hsd R17* (*r_{k-}*, *m_{k+}*), *sup E44*, *thi-1*, *I*, *rec A1*, *gyr A96*, *rel A1*, *80d*, *lacZ delta M15*) (Gibco/BRL 1987) verwendet. Für Klonierungen wurden die Vektoren pBluescript II KS(-) (Stratagene), pGEM-T (Promega) und pZero-blunt (Invitrogen) verwendet. Als Transformationsvektor für *Drosophila melanogaster* wurde der Vektor *pUAST-EGFP* eingesetzt.

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doley, 1979), Großpräparationen wurden mittels eines Plasmid-Midipräparationskits (Macherey-Nagel) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Isolation von Plasmid-DNA aus 6ml Übernacht-Kultur erfolgte mittels der Rapid Plasmid Miniprep nach Angaben des Herstellers (Marligen Biosciences INC). Restriktionen wurden mit Enzymen der Firma MBI Fermentas durchgeführt. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Nucleobond-Kit (Macherey-Nagel) bzw. der Quiaex II-Kit (Quiagen) benutzt. Für PCR-Reaktionen wurden Taq-Polymerase (GibcoBRL) bzw. Pfu-Polymerase (Stratagene) nach Standardprotokoll (Saiki, 1990) verwendet. Klonierungen von PCR-Fragmenten erfolgten mit dem pGEM-T Cloning Kit (Promega) oder dem pZero-blunt Kit (Invitrogen). Sequenzreaktionen wurden mit dem ABI PRISM dRhodamine Terminator 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.

2.2.3 DNA-Isolation aus einzelnen Fliegen

Für die Isolation geringer Mengen genomischer DNA aus einzelnen Larven oder adulten Tieren fand die single fly prep-Methode (Gloor und Engels, 1992) Anwendung. 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.

2.2.4 Inverse PCR

Die Methode der inversen PCR wurde zur Bestimmung des Insertionsorts von P-Elementen angewendet und erfolgte in Anlehnung an die Methode von Huang et al. (2000). Die PCR-Reaktionen am Ligationsansatz wurde zunächst mit den Primern 5'P forw-1 (5'-acc cac ttt aat gat tcg cag-3') und 5'P rev-1 (5'-ttt act cca gtc aca gct ttg-3') für das 5'-Ende des P-Elements bzw. 3'P forw-1 (5'- ata cta ttc ctt tca ctc gca c-3') und 3'P rev-1 (5'-tgt cgt att gag tct gag tga g-3') für das 3'-Ende des P-Elements vorgenommen. Bei zu geringer Produktausbeute wurden eine geschachtelte PCR mit entsprechenden Primerpaaren für den 5'-Bereich [5'P forw-2 (5'-acc agt ggg agt aca caa aca g-3') und 5'P rev-2 (5'-cac aca acc ttt cct ctc aac-3')] bzw. den 3'-Bereich [3'P forw-2 (5'-gca tac gtt aag tgg atg tct c-3') und 3'P rev-2 (5'-tga tta acc ctt agc atg tcc g-3')] durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden entweder in pGEM-T kloniert oder aber mit Primern sequenziert, die vom 5' P-Repeat [Sp1 (5'-aca caa cct ttc ctc tca aca a-3')] bzw. 3' P-Repeat [Pry2mod (5'-atg tct ctt gcc gac ggg acc acc tta tg-3')] in Richtung der angrenzenden genomischen DNA orientiert sind. Durch Datenbankvergleiche mit der Gesamtsequenz von *Drosophila melanogaster* konnten die entsprechenden Insertionsstellen identifiziert werden.

2.2.5 Molekulare Analyse der *Su(var)3-3* Allele

Die Sequenzierung der *Su(var)3-3* Allele erfolgte an *Su(var)3-3^X/Df(3L)TR2* transheterozygoten Tieren mit Hilfe der in Anhang beschriebenen Primerkombinationen. Die Selektion transheterozygoter Larven für zytologische Experimente erfolgte mit Hilfe GFP markierter Blancerchromosomen (Rudolph et al., 1999).

2.2.6 Zellkultur

Die Anzucht, Transfektion und Selektion stabiler S2 Zelllinien erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen). Für die Klonierung wurde der Vektor pMT-Flag-V5-HIS durch Verwendung des „Vector conversion kits“ (Invitrogen) Gateway kompatibel gemacht. Die Klonierung der Fragmente der *Su(var)3-3* Varianten erfolgte durch Rekombination entsprechend des Gateway Protokolls (Invitrogen). Die DNA-Fragmente für SU(VAR)3-3 (AS 151-890 und 251-890) wurden durch M.Yonezawa vom IMP in Wien zur Verfügung gestellt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Kernextrakten aus *Drosophila*-Embryonen

Für die Herstellung von embryonalen Kernextrakten wurden die Embryonen zunächst gewaschen. Die Chorionmembran der Embryonen wurde mit Natriumhypochloritlösung (Roth) entfernt. Die dechorionisierten Embryonen wurden anschließend entweder sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert. Für die Präparation der Kernextrakte aus *Drosophila melanogaster* wurde die Methode von Elgin und Hood (1973) angewendet und wie folgt modifiziert. Alle Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. 2 g dechorionisierte Embryonen wurden im Dounce-Homogenisator in 7,5 ml PufferII homogenisiert. Das erhaltene Homogenat

wurde durch Miracloth-Membran mit einer Porengröße von 100 µm filtriert und auf 2,5 ml 0,2 M Saccharose in PufferII gegeben. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in PufferII; PufferII+0,1% Triton-X100 und PufferII gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 2000x g abzentrifugiert. Die erhaltenen Kerne wurden in 17ml 0,2M Saccharose in PufferII resuspendiert, auf 19 ml 2,2 M Saccharoselösung in PufferIII geschichtet und für 100 Minuten bei 85,000x g (Rotor SW27, Beckmann, 4°C) sedimentiert, 3x in PufferII gewaschen und anschließend bei -80°C gelagert oder sofort durch entsprechende Aufschlusspuffer extrahiert.

PufferII: 0,05 M Tris-maleat, 0,005 M MgCl₂; 0,01 M β-Mercaptoethanol; 0,1 mM PMSF pH 7,4

PufferIII 0,01 M Tris-maleat; 0,005 M MgCl₂; 0,01 M β-Mercaptoethanol; 0,1 mM PMSF pH 7,4

2.3.2 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

Unter Verwendung des Expressionsvektors pDEST-17 (Invitrogen) wurden die rekombinanten Proteine intrazellulär als Fusionsproteine mit dem 6 x HIS-Tag exprimiert. Für analytische Ansätze wurden Einzelkolonien der mit den Expressionskonstrukten transformierten BL21 Zellen über Nacht in LB-Medium mit 100mg/ml Ampicillin inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 mit 3ml frischem LB-Medium (100mg/ml Ampicillin) verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD600 von 0,6-0,9 kultiviert. Es wurde jeweils 1ml Kulturmedium abgenommen, die Zellen durch 2 Minuten Zentrifugation bei 6000x g sedimentiert und bei -20°C aufbewahrt. Die verbleibenden Kulturen wurden durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 1 mM) induziert und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Induktion präparativer Ansätze erfolgte, wie für die analytischen Ansätze beschrieben, mit einem Endvolumen von 0,5-4l Medium. Die Aufarbeitung der präparativen Ansätze erfolgt nach Protokoll zur Reinigung HIS-getaggtter Proteine (Ni-NTA Agarose Protokoll Qiagen). Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4000x g abzentrifugiert, mit eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen und bei -80°C

aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 50ml Aufschlusspuffer pro ml Kulturvolumen resuspendiert. Die Zellen wurden an einem Ultraschallgerät (Bandelin Sonopuls GM 70) für je 4x 30s mit gepulstem Schall (70%) bei 42 W aufgeschlossen. Anschließend wurden die Lysate für 30 Minuten bei 20.000x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden für die Reinigung der löslichen Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie verwendet. Die Reinigung erfolgte über eine Ni-NTA-Agarose-Säule (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Das erhaltene Eluat wurde 24 h gegen Phosphatpuffer dialysiert und anschließend für 2 h bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Eine Abschätzung der erhaltenen Menge erfolgte durch Auftragung zusammen mit einem bekannten BSA-Standard auf PAA-Gelen.

2.3.3. Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Die gereinigten rekombinanten Proteine wurden für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Pro Injektion wurden für ein Kaninchen 100 µg Protein eingesetzt. Die Tiere wurden bei „PAB Produktions“ nach dem Standardprotokoll immunisiert. Aus den erhaltenen Seren wurde der Antikörper durch Protein-A-Sepharose (Amersham) Chromatographie gereinigt und durch 100 mM Glycinpuffer pH2.5 eluiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 1:10 Volumen 1 M Tris pH8.0.

2.3.4 Reinigung des SU(VAR)3-3 spezifischen Antikörpers

Das Serum der zehnten Blutabnahme eines mit nativem und eines mit denaturiertem Protein immunisierten Kaninchens wurde zur Aufreinigung und Konzentrierung des SU(VAR)3-3 Antikörpers eingesetzt. Die Antikörpermoleküle wurden an Protein A-Sepharose (Amersham) gebunden und durch einen basischen Elutionspuffer (100mM Ethanolamin) oder sauren Elutionspuffer (100 mM Glycinpuffer pH 2,5) eluiert. Dabei zeigte sich, dass nur durch den Glycinpuffer quantitative Mengen des Antikörpers eluiert wurden. Deshalb wurde in allen weiteren Experimenten nur noch dieser Puffer verwendet. Nach Neutralisierung, Umpufferung und Konzentrationsbestimmung wurde die Elutionsfraktion mit Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren. Aufgetaute

Aliquotes dieser Elutionsfraktion wurden für Westernblots und immunzytologische Analysen eingesetzt.

2.3.5 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5%, im Trenngel 7.5-15% (abhängig vom aufzutrennenden Molekulargewichtsbereich). Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS) bei 20 mA für ein Minigel (10x15 cm) durchgeführt. Die Molekulargewichtsstandards wurden von Invitrogen beziehungsweise MBI Fermentas bezogen. Zur Färbung der Proteine wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassielösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 in 40% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch Entfärbelösung oder durch Kochen der Gele in Aqua bidest für 20 min.

2.3.6 Nachweis von Proteinen im Westernblot

Die Proteine wurden im Anschluß an die Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran (Macherey-Nagel) durch Elektro-Blot-Transfer bei 0.8 mA/cm² für 2 Stunden transferiert (Blotpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol). Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0.2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure, 3% Sulfosalicylsäure) für fünf Minuten angefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Membran wurde anschließend eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) in PBST geblockt. Im Anschluss daran wurden die primären Antikörper in 5% Milchpulver in PBS verdünnt zugegeben und entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach 3 x 20 min Waschen in PBST (PBS, 0.2% Tween 20) wurden die entsprechenden sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper in 5% Trockenmilchpulver in PBS zugegeben und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend wiederum 3 x 20 min in PBST gewaschen. Danach

erfolgte die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Antikörper mit dem ECL Plus System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers.

2.3.7 Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, RPD3 und HP1

Kernextrakt aus 5g Embryonen (0-3 h) des Wildtyps wurde mit Protein-A-Sepharose (Amersham) gekoppeltem SU(VAR)3-3 Antikörper für 4h bei 4°C inkubiert. Die kovalente Bindung des Antikörpers an die Matrix erfolgte durch Dimethylpimelimidat. Anschließend wurden die Beads viermal mit Puffer A (50mM Tris-HCl, pH 7.5/150 mM NaCl/0.1 % NP-40) und fünfmal mit Puffer A plus 250 mM KCl gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 0.1 M Glycinpuffer, pH 2.5, eluiert und mit 1:10 Volumen 1 M Tris, pH 8.0 neutralisiert. Nach Zugabe von Rotiload (Roth) wurde das Eluat anschließend im PAA-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Proteine erfolgte im Westernblot mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern.

2.4 Immunozytologische Methoden

2.4.1 *In vivo*-Detektion von EGFP

Aus Larven des dritten Larvenstadiums wurden ganze Speicheldrüsen präpariert und in einem Tropfen PBS + 50% Glycerin auf einen Objektträger überführt. Nach Auflegen eines Deckgläschens konnte mit Hilfe des konfokalen Mikroskopes (LSM 510, Zeiss) die EGFP-Fluoreszenz in Kernen analysiert werden.

2.4.2 Enzymatischer Assay für *lacZ*-Expression in Speicheldrüsen

Zur Untersuchung der *lacZ*-Expression des Konstrukts *P[w+ HS-lacZ]* im PEV-Rearrangement *In(3L)B1* in Speicheldrüsen dritter Larven (Lu et al., 1998) wurden Larven für 30 min bei 37 °C hitzegeschockt. Nach 30 min Inkubation bei 18 °C wurden die Speicheldrüsen in PBS präpariert. Die Fixierung erfolgte in 5% Formaldehyd/PBS für 2 min. Nach kurzem waschen in PBS wurden die Speicheldrüsen über Nacht in einer X-Gal-Färbelösung (3.1 mM Kaliumferricyanid, 3.1 mM Kaliumferrocyanid, 10 mM Natriumphosphat, pH 6.8, 0.15 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10% DMSO und 0.1% X-Gal) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS wurden die Speicheldrüsen in 90% Glycerin/PBS eingebettet und mit einer CCD-Kamera an einem Zeiss Axioskop im Differenzial-Interferenzkontrast-Modus dokumentiert.

2.4.3 Immunmarkierung von Polytänchromosomen

Für Präparation von polytänen Speicheldrüsenchromosomen wurde die Methode von Silver und Elgin (1978) verwendet und wie folgt modifiziert. Speicheldrüsen aus Larven des dritten Larvenstadiums wurden in PBS präpariert und in Fixierlösung (45% Essigsäure, 2% Formaldehyd) 10 min inkubiert. Nach dem Spreiten der Chromosomen wurde das Deckgläschen in flüssigem Stickstoff entfernt und der Objektträger bis zur Antikörperfärbung in PBS bei 4 °C aufbewahrt. Für Immunmarkierungen mit anti-Histonmodifikations-Antikörpern beziehungsweise SU(VAR)3-3-Antikörper erfolgte die Präparation von polytänen Speicheldrüsenchromosomen nach Alfageme et al. (1980) mit folgenden Modifikationen. Larven im dritten Stadium wurden in PBS, 0.5% NP-40 präpariert und für 2 min in 2% Formaldehyd, 1% Triton X-100 fixiert. Nach einer Inkubation für 3 min in 45% Essigsäure, 2% Formaldehyd erfolgte das Spreiten der Chromosomen. Die Antikörpermarkierung erfolgte mit den in Tabelle 2.1 und 2.2 aufgeführten Antikörpern. Die Antikörper wurden mit dem entsprechenden Präparat in PBST (PBS, 0.2% Tween 20), 5 % Trockenmilchpulver (Biorad) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschriften in PBST für jeweils 5 min wurden die Präparate

mit den sekundären Antikörpern in PBST, 5 % Trockenmilchpulver für 2 h bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in PBST für jeweils 5 min erfolgte die Färbung der DNA mit DAPI. Nach Waschen in PBST für 5 min wurden die Präparate getrocknet, anschließend in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingebettet und mit Nagellack verschlossen. Die Auswertung der Immunmarkierungen erfolgte mit einem Konfokalmikroskop (LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der Standardfiltersätze.

2.4.4 Immunmarkierung von Embryonen

Für die Immunmarkierung von *Drosophila*-Embryonen wurde die Methode nach Rothwell und Sullivan (2000) wie folgt modifiziert: Die gesammelten Embryonen wurden nach der Dechorionisierung in 10 ml Waschpuffer bei 100°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen auf Eis gestellt und durch Zugabe von kaltem Waschpuffer auf RT abgekühlt. Die Embryonen wurden anschließend nach Zugabe von je 1 ml Heptan und Methanol durch kräftiges Schütteln devitellinisiert. Nach drei weiteren Methanolwaschschrritten wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Tag rehydriert. Dazu wurde zunächst das Methanol durch 3 Waschschrritte in PBTA (PBS, 1% BSA, 0.05% Triton X-100, 0.02% Natriumazid) entfernt. Anschließend wurden die Embryonen durch Inkubation mit PBTA für mindestens 2 h rehydriert. Der primäre Antikörper (Tab. 2.1) wurde über Nacht bei 4 °C in PBTA mit den Embryonen auf einem Drehrad inkubiert. Nach 3 Waschschrritten in PBTA wurde der sekundäre Antikörper (Tab. 2.2) verdünnt in PBTA zugegeben und mit den Embryonen für 2 h bei RT inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschrritten in PBTA erfolgte eine DNA-Färbung mit DAPI (0.5 µg/ml) in Mounting-Medium (PBS / 50%Glycerol). Die Immunmarkierungen wurden am konfokalen Mikroskop (LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der entsprechenden Filterkombinationen ausgewertet.

Tabelle 2.1: Verwendete primäre Antikörper für biochemische und immunzytologische Analysen

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Westernblot</u>	<u>Zytologie</u>
monoclonal GFP	Babco	1:1000	1:30
polyclonal GFP	Molecular Probes	1:1500	1:75
polyclonal HP1	Abcam	1:3000	1:300
polyclonal SU(VAR)3-9	A. Kegel	1:1000	1:50
polyclonal SU(VAR)3-3	T. Rudolph	1:3000	1:300
polyclonal RPD3	Abcam	1:1000	1:100
polyclonal H3-K4me1	Upstate Biotech	1:1000	1:100
polyclonal H3-K4me2	Upstate Biotech	1:2000	1:200
polyclonal H3-K4me3	Upstate Biotech	1:1000	1:100
polyclonal H3-K9 ac	Upstate Biotech	1:1000	1:100
polyclonal H3-K9me1	T. Jenuwein	1:1000	1:100
polyclonal H3-K9me2	T. Jenuwein	1:1000	1:100
polyclonal H3-K9me3	T. Jenuwein	1:500	1:50

Tabelle 2.2: Verwendete sekundäre Antikörper für biochemische und immunzytologische Analysen

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Westernblot/Zytologie</u>
Goat Anti-mouse-Peroxidase	Jackson Immuno Res	1:2000
Goat Anti-rabbit-Peroxidase	Jackson Immuno Res	1:5000
Goat Anti-mouse-Alexa 488	Molecular Probe	1:50 - 1:200
Goat Anti-rabbit-Alexa 488	Molecular Probes	1:50 - 1:200

3 Ergebnisse

3.1 *Su(var)3-3* ist ein genereller Suppressor für heterochromatisches Gensilencing und epistatisch über den Triploenhancer-Effekt zusätzlicher Kopien von *Su(var)3-9*, *Su(var)3-7* und *Su(var)2-5*

Su(var)3-3 Mutationen gehören zu den stärksten Suppressoren für heterochromatisches Gensilencing im w^{m4} Positionseffekt-Variations (PEV) Testsystem. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *Su(var)3-3* auf verschiedene heterochromatische Variations-Systeme untersucht. Die untersuchten Testsysteme betrafen das Silencing des *yellow*-Gens in *Dp(1;f)γ238* (Le et al. 1995), den Einfluss auf *brown*-Variation im Rearrangement $v;In(2R)bw^{vDI}$, die Variation von *Stubble* in der Translokation $T(2;3)Sb^v$ (Sinclair et al., 1992) und das Silencing von β -Galaktosidase der P-Insertion $P[(w^+),HS-lac-Z]$ im Rearrangement $T(2;3)BL1$ (Lu et al. 1998).

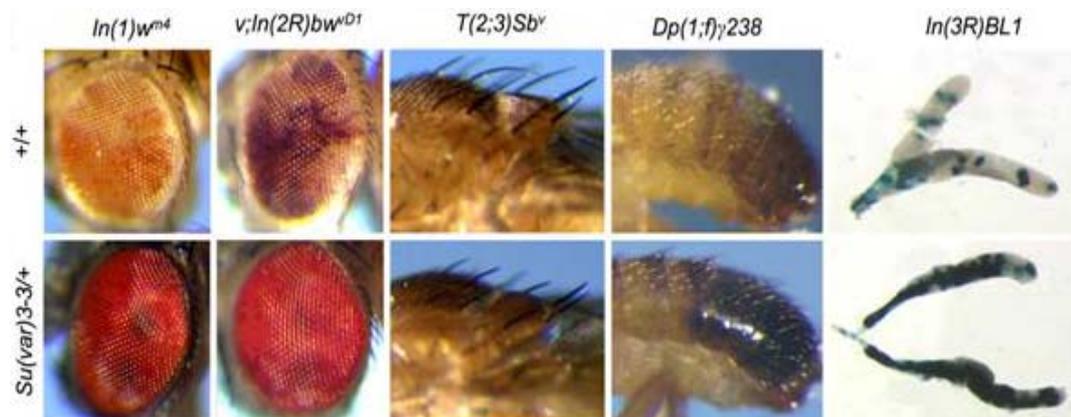


Abbildung 3.1: *Su(var)3-3* ist ein Suppressor für die Variegation von *white* in $In(1)w^{m4}$, *brown* in $v;In(2R)bw^{vDI}$, *Stubble* in $T(2;3)Sb^v$, *yellow* in $Dp(1;f)\gamma238$ und *lac-Z* in $T(2;3)BL1$. Die obere Reihe zeigt jeweils die variierten Kontrolltiere. In der unteren Reihe ist die Suppression der Variegation durch Einkreuzung der *Su(var)3-3* Mutante dargestellt.

Su(var)3-3 ist ein sehr starker Suppressor in allen getesteten heterochromatischen Rearrangements. Das Genprodukt von *Su(var)3-3* ist daher ein genereller Bestandteil heterochromatischer Proteinkomplexe und somit essentiell für die Etablierung heterochromatischer Strukturen.

Neben *Su(var)3-3* zeigten auch *Su(var)3-9*, *Su(var)3-7* und *Su(var)2-5* ähnliche Einflüsse auf Gensilencing in heterochromatischen Rearrangements. Die Charakterisierung genetischer Wechselwirkungen zwischen diesen Suppressoren erfolgte durch Kreuzung eines Null-Allels von *Su(var)3-3* mit genomischen Zusatzkopien dieser Modifikatoren. Alle drei Suppressoren sind Triploenhancer für PEV im *In(1)w^{m4}* Testsystem. Eine *Su(var)3-3* Mutante ist in den analysierten transheterozygoten Fliegen epistatisch über den Enhancer-Effekt von Zusatzkopien der Gene *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7*. In Fliegen mit vier Kopien von *Su(var)3-9* ist eine leichte Reduktion der Suppression zu sehen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ist die beobachtete Suppression dennoch signifikant. Damit stellt *Su(var)3-3* einen übergeordneten Regulator für die Etablierung heterochromatischen Gensilencings dar. (Abb. 3.2)

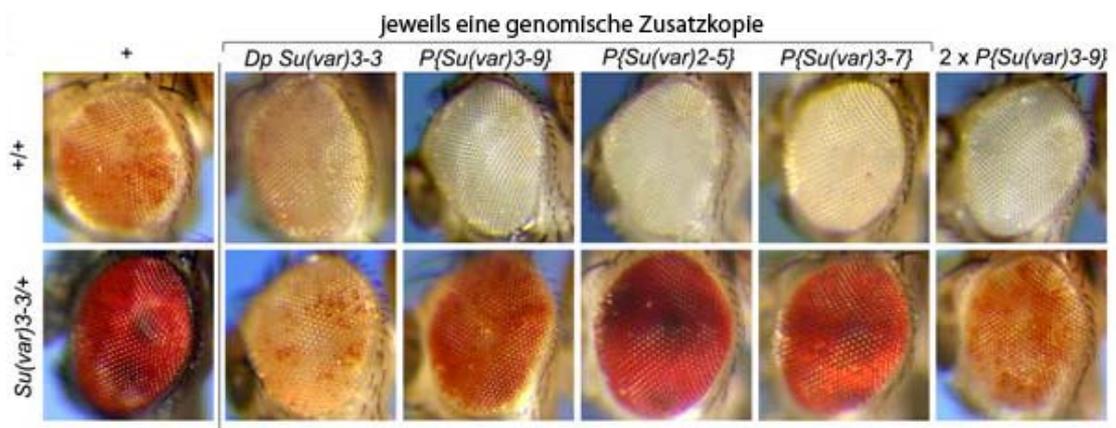


Abbildung 3.2: Genetische Interaktion zwischen *Su(var)3-3*, *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7*. Ein *Su(var)3-3* Allel wurde mit einer Duplikation für *Su(var)3-3* und genomischen Extrakopien für *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* gekreuzt. Dargestellt ist die *white*-Variegation der Kontrolltiere (obere Reihe) und der Einfluss des *Su(var)3-3* Allels (untere Reihe)

Eine genomische Zusatzkopie in Form einer Duplikation für den *Su(var)3-3* Locus zeigt keinen Triploenhancer-Effekt (Abb. 3.2, obere Reihe, Bild 2), ist aber in der Lage, den Suppressor-Effekt von *Su(var)3-3* Allelen vollständig zu retten (untere Reihe, Bild 2). Funktionell gesehen agiert SU(VAR)3-3 aufgrund dieser Daten „upstream“ der H3K9 Methyltransferase SU(VAR)3-9 und der Heterochromatinproteine SU(VAR)3-7 und HP1. Die enzymatische Funktion von SU(VAR)3-3 ist aus diesem Grund von essentieller Bedeutung für die Etablierung heterochromatischen Gensilencings.

3.1.1 Eine regulierte Überexpression von *Su(var)3-3* ist epistatisch über den Suppressor-Effekt von *Rpd3*

Die regulierte Überexpression von *Su(var)3-3* durch eine Duplikation zeigt, wie schon beschrieben keinen signifikanten Triploenhancer-Effekt (Abb. 3.2). In transheterozygoten *Rpd3/Dp Su(var)3-3* Fliegen wird der starke Suppressor-Effekt der *Rpd3*³²⁶ Mutation vollständig kompensiert (Abb. 3.3). SU(VAR)3-3 agiert aus diesem Grund ebenfalls „upstream“ der Histon-Deacetylase RPD3. SU(VAR)3-3 katalysiert somit einen der ersten bekannten Schritte der Heterochromatinbildung.

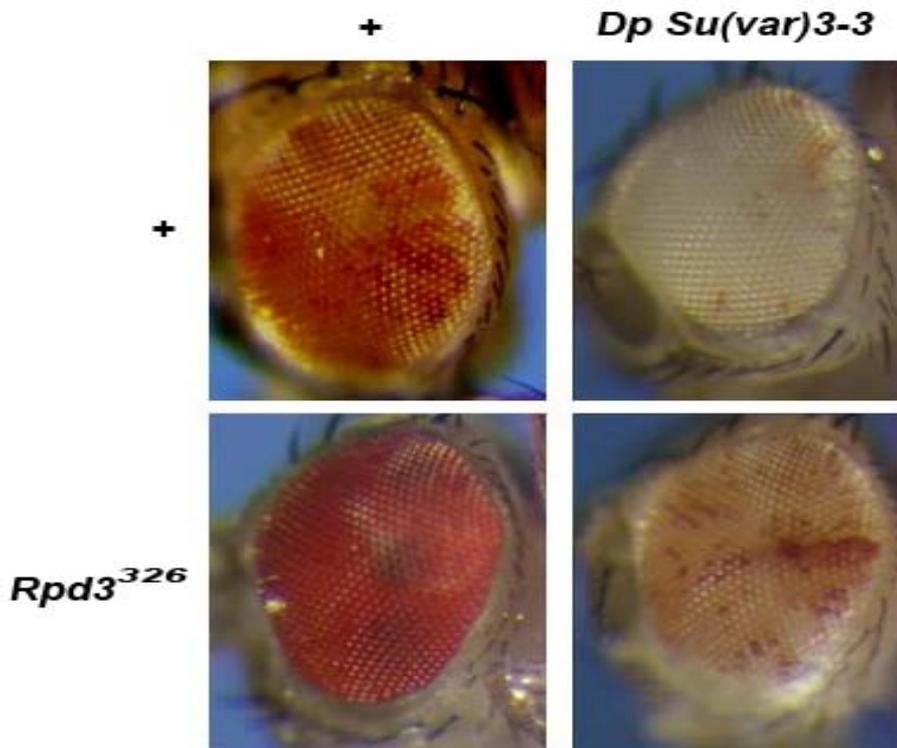


Abbildung 3.3: Die regulierte Überexpression von *Su(var)3-3* ist epistatisch über den Suppressor-Effekt von *Rpd3*.

3.2 Klonierung von *Su(var)3-3*

Su(var)3-3 Mutanten wurden durch ihren starken Suppressor-Effekt im System der PEV isoliert. Die Kartierung von *Su(var)3-3* erfolgte durch P-Element induzierte Rekombination im Männchen von *Drosophila melanogaster* (Chen et al., 1998). Normalerweise tritt in Männchen keine Rekombination auf. Das Rekombinationsereignis kann artifiziell durch Transposase induzierten Strangbruch am P-Element hervorgerufen werden. Um dieses Ereignis auszulösen und zu erkennen, wurde eine Fliegenlinie etabliert, die das Allel *Su(var)3-3⁰³* flankiert von den dominanten Marker-Mutationen *Lyra* (*Ly*) und *Stubble* (*Sb*) und eine Transposasequelle trägt. Nach Kreuzung von Männchen des Genotyps $+/Y; CyO, H\{w^{+mC}=P2-3\}HoP2.1 / +; Ly Su(var)3-3^{03} Sb / P\text{-Element}^X$ mit $w^{m4}; +/+$ Weibchen wurden *Ly*, *Sb+* und *Ly+*,

Sb Rekombinationsereignisse identifiziert und auf das Vorhandensein von *Su(var)3-3⁰³* analysiert. Es wurde sowohl auf den Suppressor-Effekt als auch auf Sterilität getestet. Durch Verwendung von fünf verschiedenen P-Elementen in der Region 76A-79B konnte der Bereich des *Su(var)3-3* Gens auf die Region 76D-77B eingengenommen werden. Stellvertretend für diese Analysen sind in Abbildung 3.4 drei P-Elemente dargestellt. Um die Richtigkeit des so kartierten Genlocus zu überprüfen wurden mit Hilfe der DROSDEL und Exelixis Kollektion (Ryder et al., 2004; Parks et al., 2004) verschiedene Deletionen und Duplikationen erzeugt. Der Vorteil dieses Systems ist, dass eine Deletion oder Duplikation zwischen zwei P-Elementen mit molekular bekanntem Insertionsort generiert wird. Die erhaltenen Deletionen wurden mit dem Allel *Su(var)3-3⁰³* komplementiert. Die transheterozygoten Nachkommen dieser Kreuzung wurden auf Sterilität getestet. Die in Abbildung 3.4 rot markierten Deletionen ergaben sterile Nachkommen. Der Locus für *Su(var)3-3* liegt deshalb innerhalb der deletierten Region der jeweiligen Defizienz. Mit Hilfe dieser Analysen konnte die putative Region auf die beiden Gene CG 17147 und CG 17149 eingengenommen werden. Im kodierenden Bereich des Gens CG 17149 befindet sich eine *piggyBac*-Insertion der Firma Exelixis. PBac(WH)CG17149/ *Su(var)3-3⁰³* transheterozygote Fliegen waren ebenfalls männlich und weiblich steril. Somit stellt diese Insertion ein neues *Su(var)3-3* Allel dar. Die in Abbildung 3.4 grün markierte Duplikation rettete den Suppressor-Effekt von *Su(var)3-3* Allelen vollständig.

3 Ergebnisse

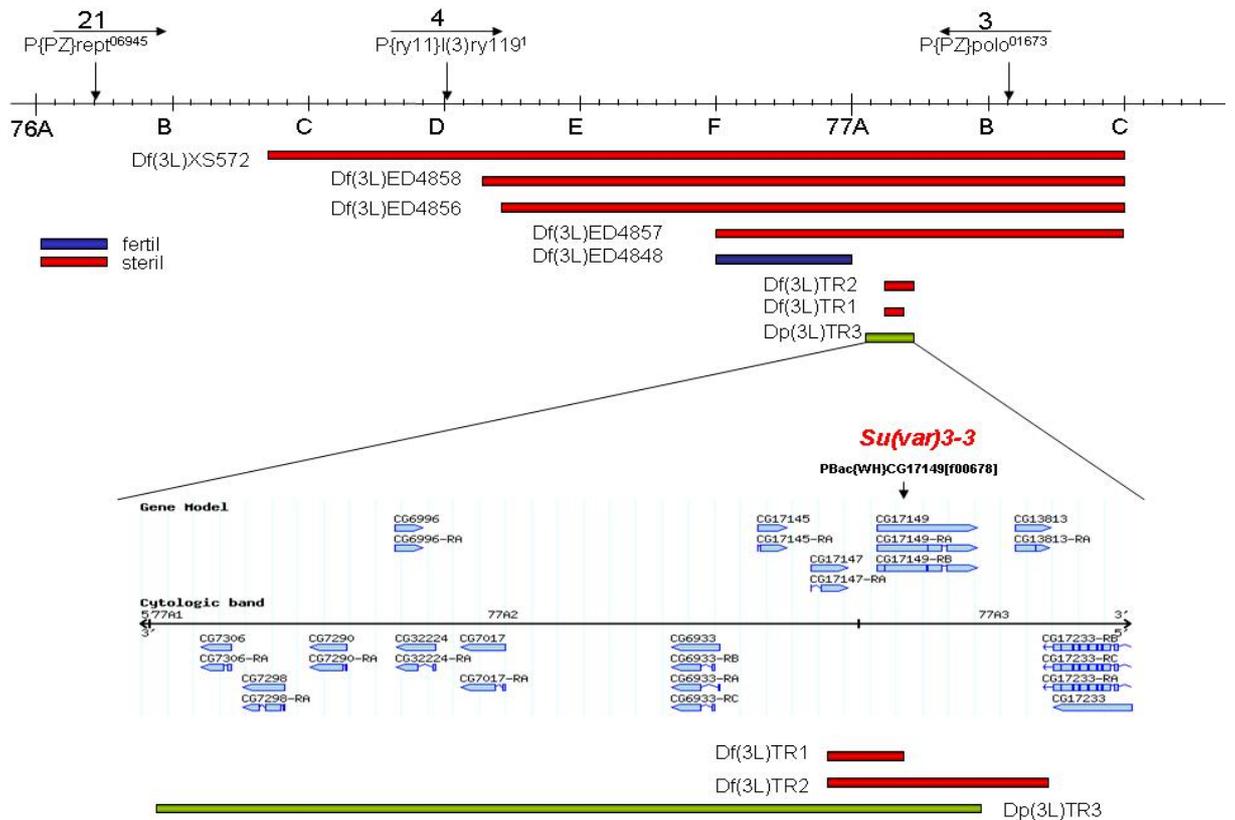


Abbildung 3.4: Genetische Analyse der *Su(var)3-3* Region. Kartierung von *Su(var)3-3* mittels P-Element induzierter Rekombination im Männchen und Deletionskartierung. Im oberen Teil sind die Ergebnisse der Rekombination dargestellt. Der Pfeil gibt die Richtung an, in der *Su(var)3-3* liegt. Die Zahl über dem Pfeil entspricht der Anzahl an isolierten Rekombinationsereignissen. Unter dem Pfeil befindet sich die Bezeichnung des Elements. Im unteren Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der Deletionskartierung zusammengefasst. Rote und blaue Balken entsprechen komplementierenden und nicht komplementierenden Defizienzen. In grün ist eine Duplikation dargestellt, welche den Mutantenphänotyp von *Su(var)3-3* vollständig rettet. Der Pfeil über CG 17149 markiert den Insertionsort des *piggyBac* Transposons.

3.3 Molekulare Analyse der *Su(var)3-3* Allele

Für die Sequenzierung der einzelnen *Su(var)3-3* Allele wurden diese in trans zu einer Deletion für den kompletten Genlocus gebracht. Aus den erhaltenen Fliegen wurde DNA isoliert, der ORF und die Exon-Intron Grenzen wurden amplifiziert und anschließend sequenziert. Jede identifizierte Veränderung wurde durch dreifache Überprüfung verifiziert. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse dieser Analysen zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Sequenzierung der *Su(var)3-3* Allele

Allel	Mutagen	Veränderung Basen Wildtyp→Allel	Veränderung Aminosäure Wildtyp→Allel	Position
<i>Su(var)3-3⁰¹</i>	EMS	ACA→ATA	T ₆₁₇ →I	2163
<i>Su(var)3-3⁰²</i>	EMS	GGG→GAG	G ₇₆₀ →E	2592
<i>Su(var)3-3⁰³</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3⁰⁴</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3⁰⁵</i>	EMS	10bp Deletion	Frameshift→stop	2634
<i>Su(var)3-3⁰⁶</i>	EMS	TGG→TAG	W ₆₄₆ →stop	2400
<i>Su(var)3-3⁰⁷</i>	EMS	GGC→GAC	G ₂₅₁ →D	1065
<i>Su(var)3-3⁰⁸</i>	EMS	GGG→GAG	G ₃₀₀ →E	1212
<i>Su(var)3-3⁰⁹</i>	EMS	GGA→CGA	G ₃₁₆ →R	1259
<i>Su(var)3-3¹⁰</i>	EMS	CAG→TAG	Q ₅₁ →stop	464
<i>Su(var)3-3¹¹</i>	EMS	GGC→AGC	G ₂₇₆ →S	1139
<i>Su(var)3-3¹²</i>	EMS	TCG→TAG	S ₁₈₈ →stop	876
<i>Su(var)3-3¹³</i>	Röntgenstrahlen	11bp Duplikation	Frameshift→stop	1966
<i>Su(var)3-3¹⁴</i>	EMS	TGC→TAC	C ₆₁₆ →Y	2160
<i>Su(var)3-3¹⁵</i>	EMS	GTC→GAC	V ₅₈₃ →D	2061
<i>Su(var)3-3¹⁶</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3¹⁷</i>	EMS	Splice Defekt		
<i>Su(var)3-3¹⁹</i>	Röntgenstrahlen	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3²⁰</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3²¹</i>	EMS	GAA→AAA	E ₂₉₄ →K	1193
<i>Su(var)3-3²²</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3²³</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3²⁴</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3²⁵</i>	EMS	Keine Veränderung		
<i>Su(var)3-3²⁶</i>	P-Element	Keine Veränderung		

Die EMS induzierten Mutationen sind größtenteils Transitionen (neun Allele). In zwei Allelen wurden Transversionen gefunden. Im Unterschied zu EMS, das meistens zu Basenpaaraustauschen führt, wurden durch Röntgenstrahlmutagenese größere genomische Umbauten induziert. Dieses war beim Allel *Su(var)3-3¹³* eine Duplikation von 11 bp. Im Fall von *Su(var)3-3¹⁹* entstand ein Umbau, welcher molekular bisher nicht zu definieren war. *Su(var)3-3¹⁷* ist eine Mutation im Splice-Akzeptor-Site des dritten Exons. Als Folge dieses Austausches kann das dritte Intron nicht mehr korrekt aus der prä-mRNA entfernt werden und es kommt auf der Ebene der cDNA zu einem „frame-shift“ mit vorzeitigem Stopp der Translation. Mit Ausnahme von *Su(var)3-3⁰⁷* befinden sich alle Aminosäureaustausche in der katalytisch wichtigen Aminoxidase-Domäne (Abb. 3.5)

Durch die Sequenzierung konnte in 15 der vorhandenen 25 Allele eine molekulare Veränderung nachgewiesen werden. In zehn Allelen konnte keine Veränderung im kodierenden Bereich gefunden werden. In diesen Allelen ist keine Transkription des *Su(var)3-3* Gens durch RT-PCR nachweisbar (K. Heidrich, persönliche Mitteilung) Die Allele sind somit als Null-Mutanten zu Klassifizieren und stellen Veränderungen im Promotorbereich oder in Enhancer-Elementen dar.

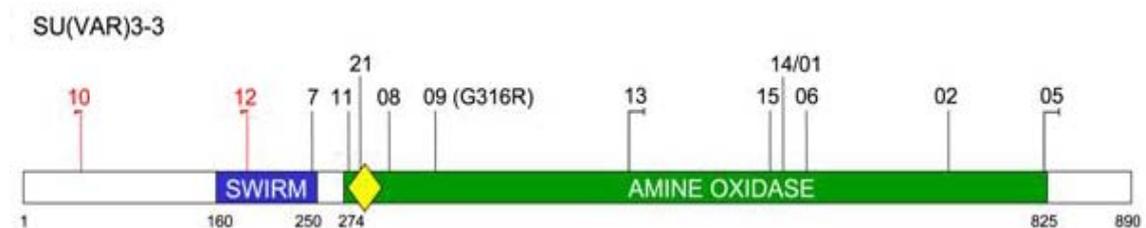


Abbildung 3.5: Proteinstruktur von SU(VAR)3-3 mit den Positionen der molekular identifizierten Mutationen

3 Ergebnisse

Ein Alignment von SU(VAR)3-3 mit dem homologen humanen LSD1 zeigt, dass alle Aminosäureaustausche in den Mutanten-Allelen an evolutionär hoch konservierten Positionen erfolgten (Abb. 3.6). Diese Aminosäurepositionen sind zwischen SU(VAR)3-3 aus *Drosophila melanogaster* und LSD1 identisch.

SU(VAR)3-3	MKPTQFGGSS	SKMTEPIEYV	TLISDSDS	GE	PTPKRNVNHP	PSALSAPNPG	-----
LSD1_human	MLSGKAAAA	AAAAAAAATG	TEAGPGTAGG		SENGSEVAAQ	PAGLSGPAEV	GPGAVGERTP
Consensus	M		T	G	V	P LS P	
		10					
	stop						
SU(VAR)3-3	QKQHEDEDS	NDAPATSDER	RTSRRNRPKV	DY	SNRPSGSG	DTASNDKSGS	ASMGPNNQQA
LSD1_human	RKKEPPRASP	PGGLAEPGGS	AGPQAGPTVV	PG	SATPMETG	IAETPEGRRT	SRRKRKRVVEY
Consensus	K P	A	V	S P G			
SU(VAR)3-3	ERRSQSQRTR	SEANATSSSV	SGPSAGNSR	---	PSQNGDS	KDRDAGTPTV	LSGQEGAVFQ
LSD1_human	REMDESLANL	SEDEYYSEEE	RNAKAKEKK	LPP	PPPQAPP	EEENESEPEE	PSGVEGAAFQ
Consensus	S	SE S	A	P		P	SG EGA FQ
			12				
			stop				
SU(VAR)3-3	SRLPFNKMT	NEEACFPDIS	RSGILGHRVF	LN	IRNSLHLM	WVDNPKIQLS	FEIALKNLPP
LSD1_human	SRLPHDRMTS	QEAACFPDI	SGPQQTQKVF	LF	IRNRTLQL	WLDNPKIQLT	FEATLQQLEA
Consensus	SRLP MT	E ACFPDI	VF	L IRN L	W DNPKIQL	FE L L	
			07			11	
			D			S	
SU(VAR)3-3	PFDSEPSLVR	RVHSFLERHG	FINFGIFKRL	KPI	PAKKLGK	VIVIGAGISG	LAVAHQLQQF
LSD1_human	PYNSDTVLVH	RVHSYLERHG	LINFGIYKRI	KPL	PKTKTGK	VIIIGSGVSG	LAAARQLQSF
Consensus	P S LV	RVHS LERHG	INFGI KR	KP P KK GK	VI IG G SG	LA A QLQ F	
		21	08	09			
		K	E	R			
SU(VAR)3-3	GMDVIVLEAR	DRVGGRISTF	RKNSYIADVG	AM	VVTGVYGN	PMTILSKQIG	MDLVP IQQTC
LSD1_human	GMDVTLLEAR	DRVGGRVATF	RKGNVYADLG	AM	VVTGLGGN	PMAVVSKQVN	MELAKIKQKC
Consensus	GMDV LEAR	DRVGGR TF	RK Y AD G	AMVVTG GN	PM SKQ	M L I Q C	
SU(VAR)3-3	PLYGPDGKPV	PKEKD DVIER	EFNRLLESAS	YLS	RLDFNY	AGDCPVSLGD	ALEWI ISMQE
LSD1_human	PLYEANGQAV	PKEKDEMVEQ	EFNRLLEATS	YLS	QLDFNV	LNNKPVSLGQ	ALEVVIQLQE
Consensus	PLY G V	PKEKD E	EFNRLLE S	YLSH LDFN		PVSLG	ALE I QE
SU(VAR)3-3	MQVMHKRQGH	MQETIATQTK	IIEQRRRLKT	LR	DTIGLIKLN	EHLAMINQRK	PKGTGDGLKY
LSD1_human	KHVKDEQIEH	WKKIVKTQEE	LKELLNKMVN	LKE	KIKELHQ	QYKEASEVKP	PRDIT-----
Consensus	V H	I TQ	E	L I L			P
SU(VAR)3-3	CYQEFNIRNT	QIKMEETIST	FHDLHAAEQ	ML	AKLHELEQ	NRPSDVYLSS	RDRILLDWHF
LSD1_human	--AEFLVKSK	HRDLTALCKE	YDELAETQGK	LEE	KLQELEA	NPPSDVYLSS	RDRQILDWHF
Consensus	EF		L	KL ELE	N PSDVYLSS	RDR ILDWHF	
			13			15	
			fs			D	
SU(VAR)3-3	ANLEFANATR	LNNLSLKHWD	QDDDFEFIGH	HT	TVRNGYSC	VPVALTENLD	IRVNSAVKEI
LSD1_human	ANLEFANATP	LSTLSLKHWD	QDDDFEFTGS	HL	TVRNGYSC	VPVALAEGLD	IKLNTAVRQV
Consensus	ANLEFANAT	L LSLKHWD	QDDDFEF G	H TVRNGYSC	VPVAL E LD	I N AV	
			14	01			
			Y L				
SU(VAR)3-3	KYGTKGVEVV	AENLKTSNSQ	MTYKADLVVC	TL	TLGVLKVA	VAHKESQQSN	TVKFD PPLPD
LSD1_human	RYTAGGCEVI	AVNTRSTSQT	FIYKCDAVLC	TL	PLGVLK--	-----QQPP	AVQFV PPLPE
Consensus	Y G EV	A N	YK D V C	TL LGVLK		QQ	V F PPLP
SU(VAR)3-3	WKQQA IKRLG	FGNLNKVVLC	FDRIFWDPNA	NL	FGHVGSTT	ASRGEMFLFW	SISSS P VLLA
LSD1_human	WKTSAVQRMG	FGNLNKVVLC	FDRVFWDP SV	NL	FGHVGSTT	ASRGELFLFW	NLYKAPILLA
Consensus	WK A R G	FGNLNKVVLC	FDR FWDP	NLFGHVGSTT	ASRGE FLFW		P LLA
						02	
						E	
SU(VAR)3-3	LVAGMAANLV	ESVTDIIIG	RCMSVLKKNIF	GNT	SVPQPKE	TVVTRWRSDP	WARGSYSYVS
LSD1_human	LVAGEAAGIM	ENISDDVIVG	RCLAAILK GIF	GSS	AVQPKE	TVVSRWRADP	WARGSYSYVA
Consensus	LVAG AA	E DD I G	RC LK IF	G VPQPKE	TVV RWR DP		WARGSYSYV

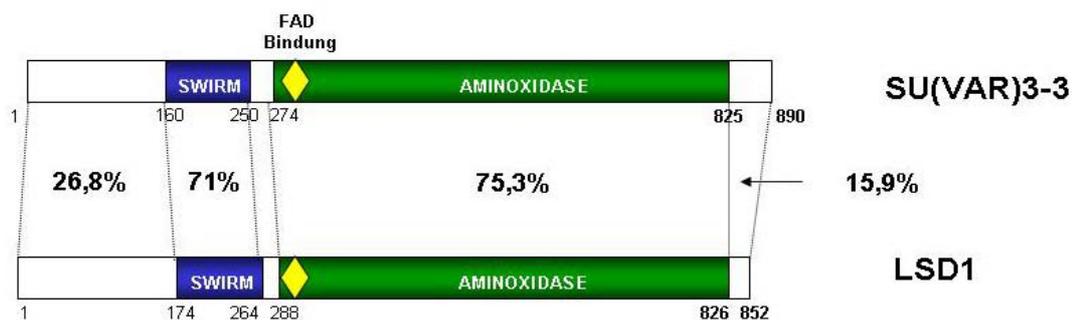


Abbildung 3.7: Vergleich der Domänenstruktur von SU(VAR)3-3 und LSD1 aus dem Menschen. Die Zahlenangaben in % geben die Homologie zwischen den verglichenen Domänen an.

3.5 SU(VAR)3-3 ist ein kernlokalisiertes Protein

Neben dem Nachweis des endogenen SU(VAR)3-3-Proteins mit spezifischen Antikörpern sollte die zelluläre Lokalisierung mit Hilfe eines EGFP markierten Fusionsproteins erfolgen. Durch diese Technik war es möglich, das markierte Protein *in vivo* unter Erhalt der nativen Zellstrukturen zu beobachten. Die cDNA von *Su(var)3-3* wurde in den Vektor pUAST-EGFP kloniert. Nach Injektion des Plasmids in *w⁻* Fliegen konnten acht unabhängige primäre Transgene isoliert werden.

Tabelle 3.2: Liste der primär transgenen *Su(var)3-3*-Linien

Transgene Linie	Insertion auf Chromosom	homozygot lebensfähig
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}1	2	+
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}2	2	-
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}3	3	-
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}4	x	+
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}5	2	+
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}6	3	+
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}7	3	-
p{UAST[<i>w⁺</i> ,EGFP (Su(var)3-3 cDNA)]}8	x	+

Die Expression des Proteins erfolgte unter Kontrolle des UAS-Promotors. Durch Kreuzung der transgenen Linien mit verschiedenen GAL4-Treiberlinien wurde die Expression des EGFP-Fusionsproteins induziert. In allen transgenen Linien konnte die Expression des SU(VAR)3-3-EGFP Fusionsproteins durch zytologische Methoden und Westernblot Analysen nachgewiesen werden. Das SU(VAR)3-3-EGFP Fusionsprotein ist in allen untersuchten Entwicklungsstadien und Geweben im Kern lokalisiert. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die vorhergesagte Lokalisation des SU(VAR)3-3 Proteins (30,4 % Plasmamembran [PSORT-Prediction]) falsch ist. Bei SU(VAR)3-3 handelt es sich eindeutig um ein kernlokalisiertes Protein. Diese Aussage konnte in weiteren Arbeiten ebenfalls durch den SU(VAR)3-3 spezifischen Antikörper bestätigt werden. Das SU(VAR)3-3-EGFP-Fusionsprotein bindet in zahlreichen Interbanden und ist dort mit dem endogenen SU(VAR)3-3 kolokalisiert (C. Schäfer, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zum endogenen SU(VAR)3-3 bindet das EGFP-Fusionsprotein ektopisch im Heterochromatin. Diese ektopische Bindung konnte ebenfalls mit dem SU(VAR)3-3 Antikörper bestätigt werden (Abb. 3.11.).

SU(VAR)3-3 Überexpression [Sgs3-GAL4 + SU(VAR)3-3EGFP]

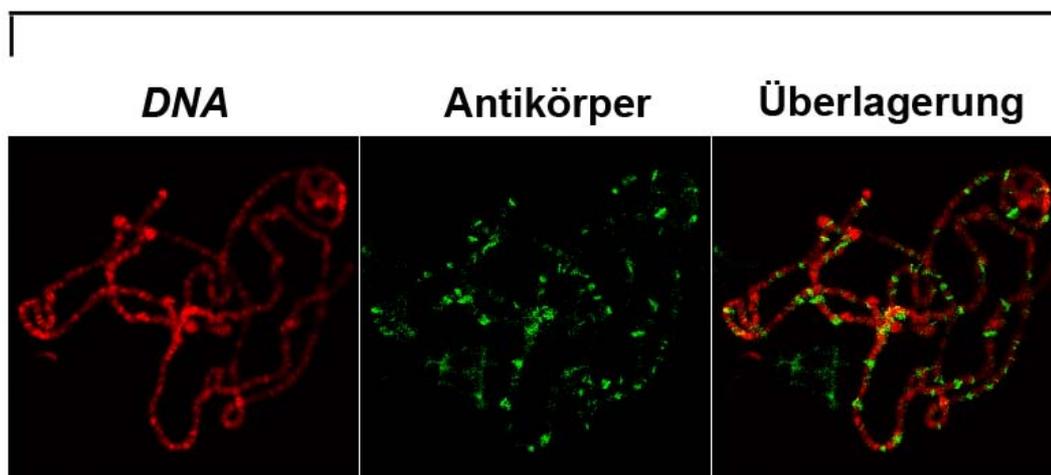


Abbildung 3.8: Verteilung des SU(VAR)3-3EGFP-Fusionsproteins in polytären Speicheldrüsenchromosomen. Der Nachweis des SU(VAR)3-3EGFP-Fusionsproteins erfolgte mit monoklonalem EGFP Antikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

3.6 Generierung eines polyklonalen SU(VAR)3-3 spezifischen Antikörpers

Zur Produktion eines SU(VAR)3-3 spezifischen Antiserums wurde ein 150 Aminosäuren großes Fragment aus dem N-Terminus von SU(VAR)3-3 rekombinant exprimiert. Ein DNA-Fragment, das für die AS 1-150 kodiert wurde in den Vektor pDEST 17 (Invitrogen) kloniert. Dieses Fragment wurde ausgewählt, weil es auf Proteinebene keine Homologie zu anderen *Drosophila*-Proteinen zeigt. Die Expression des Proteins erfolgte intrazellulär im *E. coli* Stamm BL21(DE3)Lys. Eine Testexpression ergab, dass bei 37°C das exprimierte Fusionsprotein vollständig löslich war und keine „inclusion bodies“ gebildet wurden. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte durch Chromatographie an Ni-NTA-Agarose (Quiagen). Die enthaltene Menge an löslichem Fusionsprotein wurde durch Auftragen auf ein PAA-Gel zusammen mit BSA-Standard abgeschätzt (Abb. 3.9).

Zwei Milligramm des gereinigten Proteins wurden zur Produktion des Antikörpers eingesetzt. Die nach der Immunisierung erhaltenen Antikörper zeigten eine hohe Reaktivität und Spezifität für das zur Immunisierung eingesetzte bakterielle Protein. Die Antiseren ab der zehnten Blutung wurden über Protein-A-Sepharose Chromatographie gereinigt. Die Elutionsfraktionen dieser Säule wurden vereinigt für alle im weiteren Verlauf der Arbeit dargestellten Experimente verwendet.

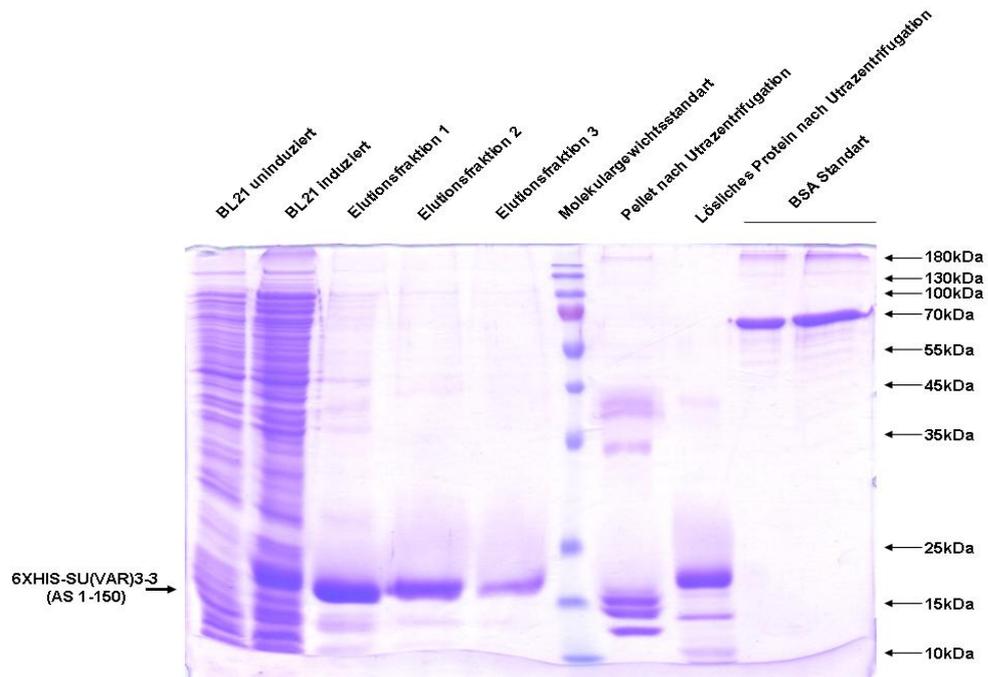


Abbildung 3.9: Reinigung des 6XHIS-SU(VAR)3-3 Fusionsproteins über Ni-NTA Agarose, Dialyse und Ultrazentrifugation. Zur Abschätzung der erhaltenen Proteinmenge wurden in der linken Bahn 0,8 μ g und in der rechten Bahn 1,6 μ g BSA geladen.

3.6.1 Testung der Spezifität des gereinigten SU(VAR)3-3 Antikörpers

Die Testung der Spezifität des Antikörpers im Westernblot (Abb.3.10) und in der Zytologie (Abb. 3.11) erfolgte durch Vergleiche zwischen Wildtyp-, EGFP-Überexpressions- und homozygotem Null-Mutanten-Linien.

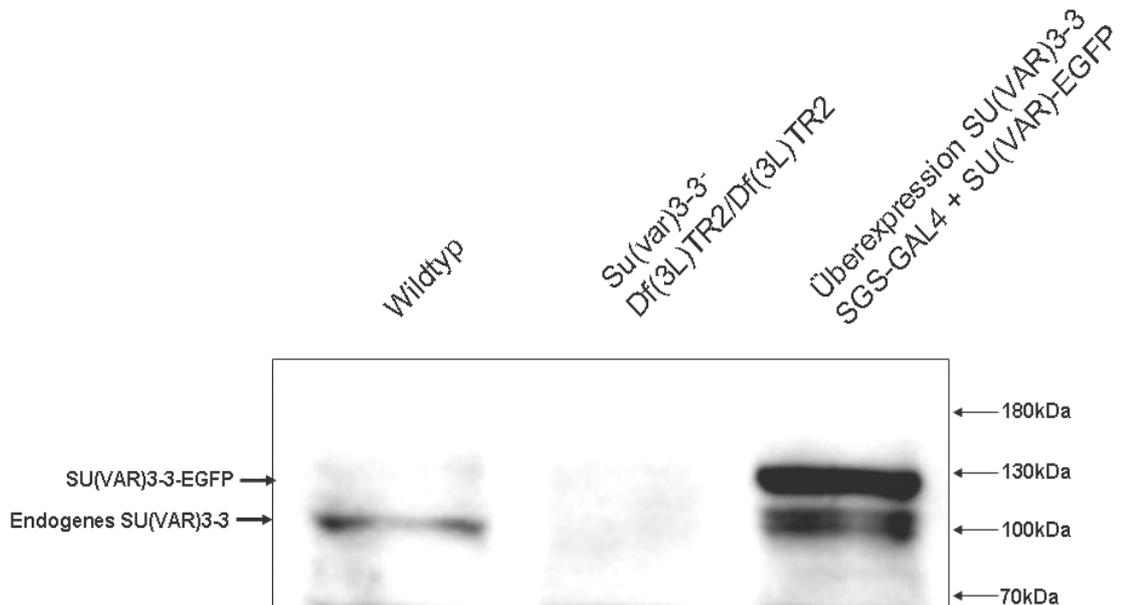


Abbildung 3.10: Nachweis der Expression von *Su(var)3-3* und der Spezifität des SU(VAR)3-3 Antikörpers. Der Westernblot erfolgte an Gesamtprotein-Extrakten von fünf Speicheldrüsen des Wildtyps, der *Su(var)3-3*-Nullmutante und einer SU(VAR)3-3-EGFP Überexpressionslinie.

Der SU(VAR)3-3 Antikörper detektiert in Speicheldrüsen des Wildtyps ein Protein von 100 kDa. Dieses Molekulargewicht entspricht dem berechneten Wert für das SU(VAR)3-3 Protein. Die Berechnung erfolgte auf der Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA Klon. Für den Westernblot wurden bewusst keine Kernextrakte, sondern Gesamtgewebe verwendet, um auch nicht kernlokalisierte Unspezifitäten des Antikörpers zu erkennen. In diesen Gesamtextrakten waren keine weiteren Banden detektierbar. Der erzeugte Antikörper ist somit hoch spezifisch für SU(VAR)3-3. Die prominente Bande in der Überexpressionslinie bei 130 kDa entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des EGFP-Fusionsproteins. Westernblotanalysen an embryonalen Proteinextrakten oder Extrakten aus adulten Fliegen zeigten identische Ergebnisse (M. Walther, persönliche Mitteilung). Eine Expression von *Su(var)3-3* konnte durch Westernblotanalysen in allen untersuchten Entwicklungsstadien vom Embryo bis zur adulten Fliege nachgewiesen werden

In den Interphasekernen des Embryos lässt sich das exakte Bindungsverhalten eines bestimmten Proteins nur sehr ungenau analysieren. Sehr viel besser sind hierzu polytäre Speicheldrüsenchromosomen geeignet. Sie ermöglichen eine genaue Lokalisation chromosomaler Proteine. An polytären Speicheldrüsenchromosomen des Wildtyps detektiert der Antikörper eine große Anzahl von Interbanden. Insgesamt wurden über 200 Bindungsstellen gezählt, die jedoch nicht genauer kartiert wurden. Diese Signale sind in homozygoten *Su(var)3-3*-Nullmutanten nicht zu beobachten. In der Überexpression ist ebenfalls eine Vielzahl von Interbanden erkennbar. Eine verstärkte Bindung von SU(VAR)3-3, erkennbar an intensiveren Signalen, ist nicht nachweisbar. Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zum Wildtyp ist eine ektopische Bindung des überexprimierten EGFP-Fusionsproteins am Chromozentrum polytärer Speicheldrüsenchromosomen. Diese ektopische Bindung konnte durch die Verwendung eines monoklonalen EGFP-Antikörpers bestätigt werden (Abb. 3.8).

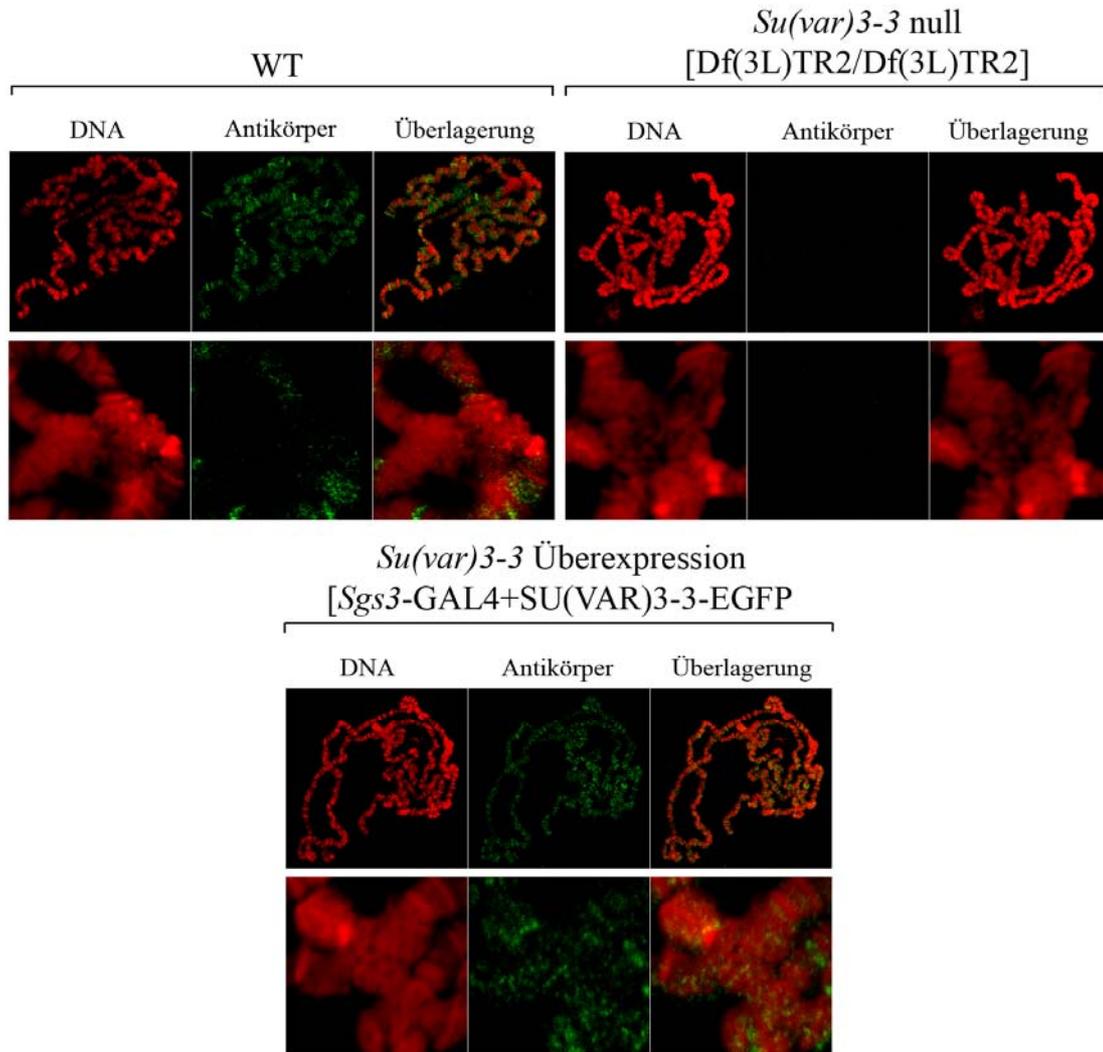


Abbildung 3.11: Testung der Spezifität des SU(VAR)3-3 Antikörpers an polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Verteilung des SU(VAR)3-3 Proteins in Wildtyp, *Su(var)3-3* Null-Mutanten und in Tieren, die ein SU(VAR)3-3-EGFP Fusionsprotein exprimierten. Der Nachweis des Proteins erfolgte durch den spezifischen Antikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

3.7 Etablierung stabiler SU(VAR)3-3 exprimierender S2-Zelllinien

Das Volllängenprotein SU(VAR)3-3 (AS 1-890) war in *E.coli* nur sehr schlecht löslich. Aus diesem Grund wurden stabil transfizierte S2 Zellkulturen generiert. S2 Zellen sind deshalb gut geeignet, weil diese Zelllinie aus Embryonen von *Drosophila melanogaster* gewonnen wurde. Alle mit SU(VAR)3-3 interagierenden Proteine, die für den Aufbau des SU(VAR)3-3 Komplexes essentiell sind, sollten daher endogen vorhanden sein. Zur Transfektion wurde ein modifizierter pMT-V5 Vektor (Invitrogen) verwendet. Dieser Vektor ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins mit C-terminalem V5-HIS Tag unter Kontrolle des Metallothionin-Promotors. Dieser Vektor wurde so modifiziert, dass N-Terminal eine Fusion mit einem FLAG-Tag möglich war. In diesen Vektor wurde der ORF von *Su(var)3-3* so kloniert, dass ein FLAG-SU(VAR)3-3-V5-HIS Fusionsprotein exprimiert wurde (Abb. 3.12).

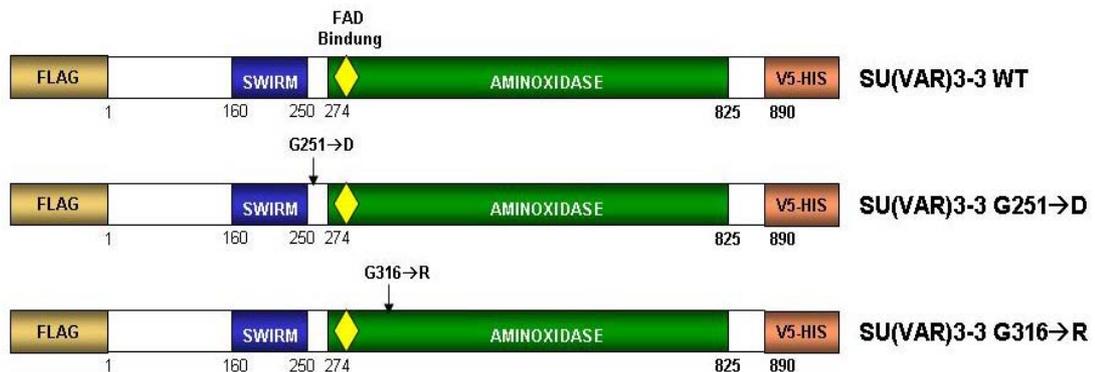


Abbildung 3.12: SU(VAR)3-3 Varianten mit N-terminalem FLAG-Tag und C-terminalem V5-HIS-Tag zur Etablierung stabiler S2 Zelllinien.

Von diesem Plasmid wurden noch zwei weitere Konstrukte mit Aminosäureaustauschen generiert. Variante 1 ist ein G→D Austausch an Position 251 und identisch mit dem Allel *Su(var)3-3⁰⁷*. Die zweite Punktmutation ist der G→R Austausch des Allels *Su(var)3-3⁰⁹* an Position 316. Für jedes Konstrukt konnten stabile Zelllinien erhalten werden, die nach Induktion des Metallo-Thionin Promotors mit Kupfersulfat ein FLAG-

3 Ergebnisse

SU(VAR)3-3-V5-HIS Fusionsprotein produzierten. Der Nachweis der Expression erfolgte durch Westernblot an Gesamtextrakten mit anti-V5 Antikörper oder anti-SU(VAR)3-3 Antikörper (Abb. 3.13). In beiden Westernblots konnte in den Extrakten aus den transfizierten Zellen ein Protein in der Größe des erwarteten Fusionsproteins detektiert werden. In den untransfizierten Kontrollen war mit dem anti-V5 Antikörper kein Protein und mit dem anti-SU(VAR)3-3 Antikörper nur das endogene SU(VAR)3-3 nachweisbar (Daten für anti-V5 Antikörper nicht gezeigt).

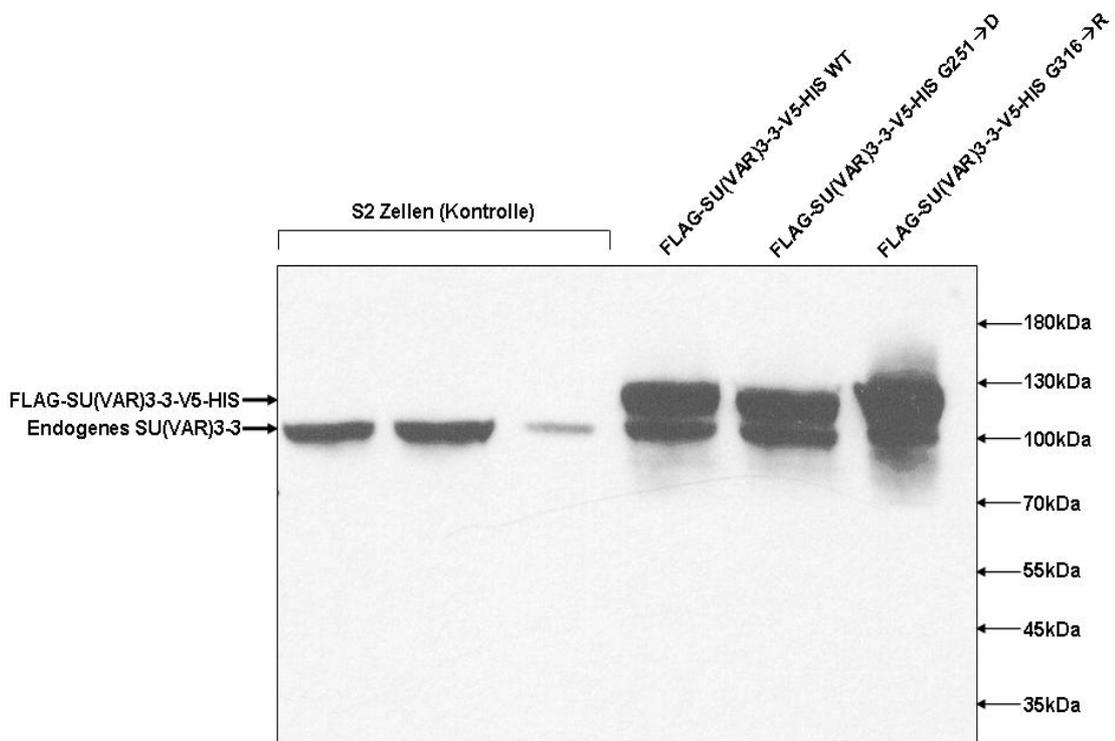


Abbildung 3.13: Nachweis der Expression der FLAG-SU(VAR)3-3-V5-HIS Varianten durch Westernblot an Gesamtzellextrakten mit anti-SU(VAR)3-3 Antikörper. Sowohl die stabilen Zelllinien als auch die S2 Zellen (Kontrolle) wurden durch Zugabe von Kupfersulfat zum Medium für 48h induziert.

3.8 Präzipitation des SU(VAR)3-3 Proteins aus *Drosophila* S2 Zellen

3.8.1 Reinigung von FLAG-SU(VAR)3-3-V5-HIS aus stabilen Zelllinien

Zur Reinigung des Komplexes wurde die stabile Zelllinie, welche das WT FLAG-SU(VAR)3-3-V5HIS Protein exprimiert in Schüttelkultur vermehrt. $5 \cdot 10^{09}$ Zellen der stabilen Linie und der untransfizierten S2 Kontrolle wurden für 48h mit Kupfersulfat induziert und anschließend geerntet. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Reinigung mit Flag-Agarose (Sigma) und anschließend ein weiterer Reinigungsschritt mit Ni-NTA Agarose (Qiagen). Die eluierten Proteine wurden auf einem PAA-Gradientengel aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Als Kontrolle für unspezifisch gebundene Proteine wurden untransfizierte S2 Zellen nach dem gleichen Protokoll parallel aufgearbeitet. Dieses Experiment wurde zweimal mit unabhängigen Kulturen wiederholt. Nach der Silberfärbung war in den Eluatn der transfizierten Zelllinie ein Protein in der für das FLAG-SU(VAR)3-3-V5HIS Protein vorhergesagten Größe von 118kDa sichtbar. Weitere co-präzipitierte Proteine im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle waren nicht detektierbar (Abb.3.14). Die Bande des putativen Fusionsproteins wurde aus dem Gel ausgeschnitten und durch S. Kubichek am IMP in Wien durch Maldi-MS analysiert. Es handelt sich bei dem detektierten Protein eindeutig um das SU(VAR)3-3 Fusionsprotein, da mehrere übereinstimmende Peptidfragmente gefunden wurden. Da durch dieses Experiment keine eindeutigen Interaktionspartner identifiziert werden konnten, wurde die Strategie geändert und der endogene Komplex aus frühen Embryonalstadien mit Hilfe des SU(VAR)3-3 Antikörpers präzipitiert.

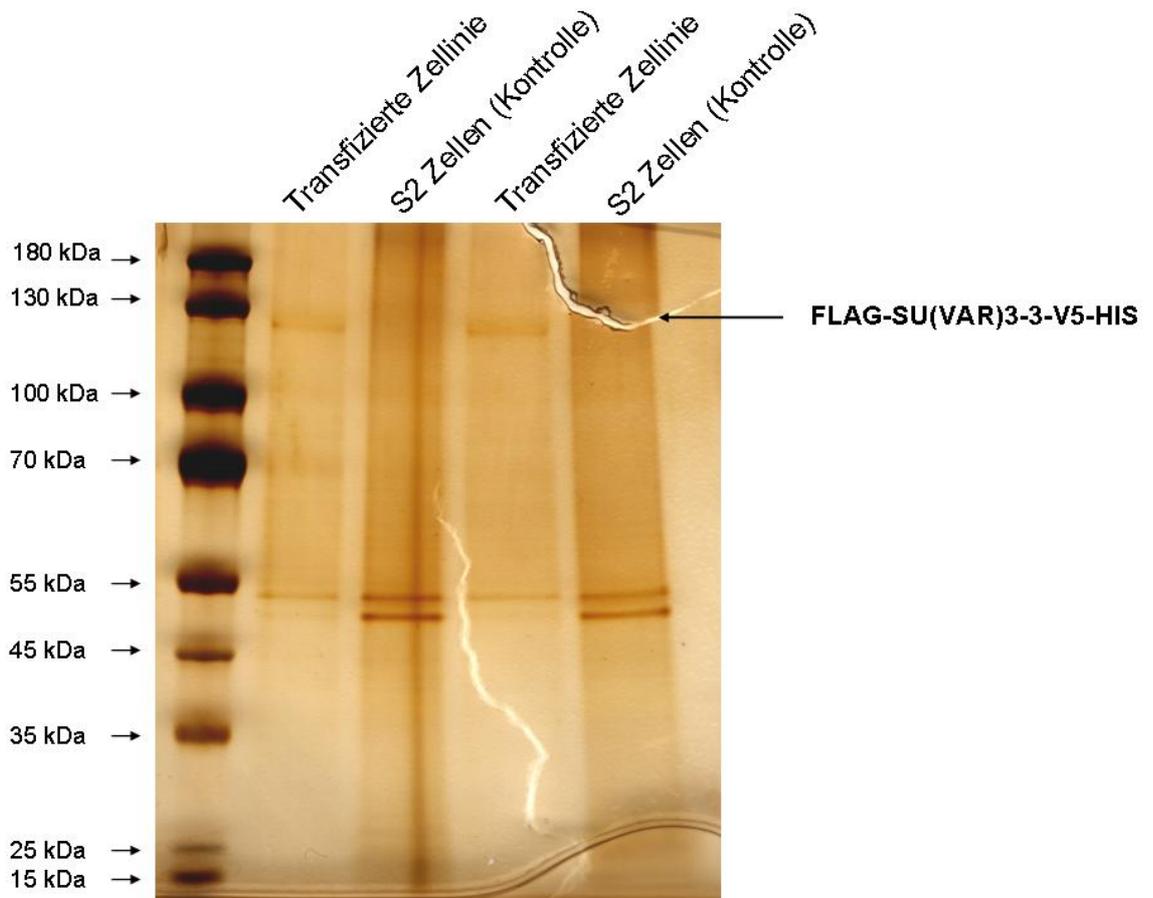


Abbildung 3.14: Reinigung des SU(VAR)3-3 Proteinkomplexes durch Flag/His Chromatographie aus stabil transfizierten S2 Zelllinien. Der Pfeil auf der rechten Seite markiert das erfolgreich gereinigte FLAG-SU(VAR)3-3-V5-HIS Protein.

3.8.2 Reinigung von SU(VAR)3-3 Varianten mit Biotin-Tag

Die Aufklärung der enzymatischen Aktivität von SU(VAR)3-3 ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Funktion des Proteins. Die schlechte Löslichkeit des in *E. coli* exprimierten Proteins erlaubte keine quantitative Reinigung und enzymatische *in vitro* Testung von SU(VAR)3-3. Aus diesem Grund wurden stabile S2 Zelllinien aufgebaut, welche verschiedene Varianten von SU(VAR)3-3 exprimieren. Als Reinigungs-Tag wurde die Bioease Sequenz (Invitrogen) gewählt. Diese

Aminosäuresequenz wird *in vivo* in den S2 Zellen biotinyliert und erlaubt dadurch eine quantitative Reinigung des Fusionsproteins durch die hochaffine Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin. Die Fragmente für SU(VAR)3-3 WT, SU(VAR)3-3G251→D, SU(VAR)3-3G316→R, SU(VAR)3-3 (AS 151-890) und SU(VAR)3-3 (AS 251-890) wurden in den Vektor pMT-Bioease (Invitrogen) kloniert und in S2 Zellen transfiziert (Abb.3.15).

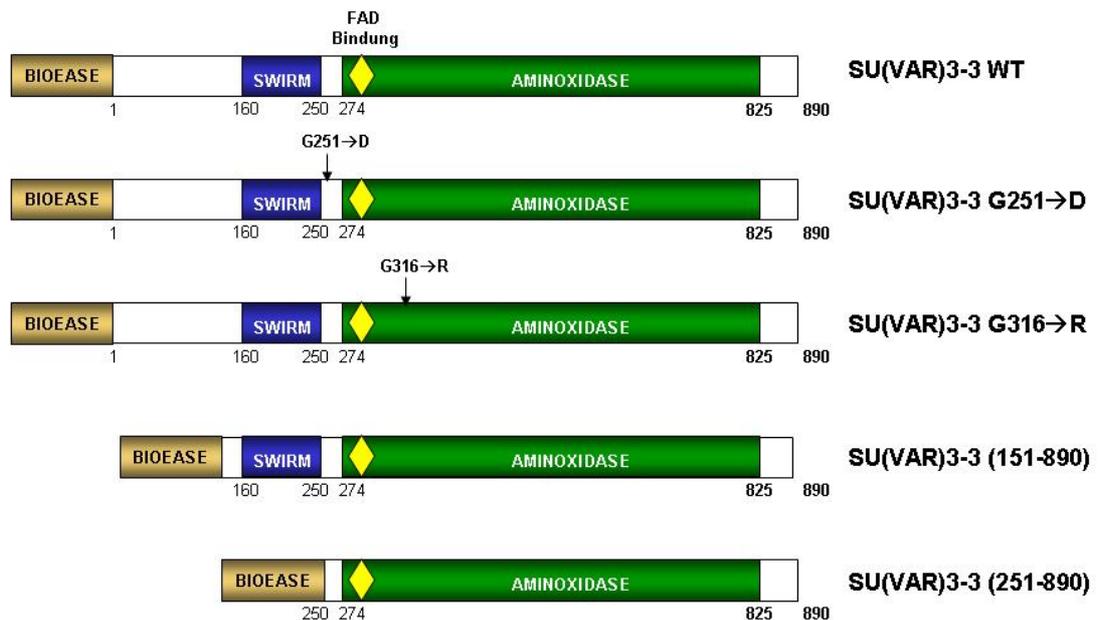


Abbildung 3.15: SU(VAR)3-3 Varianten mit N-terminalem Bioease-Tag zur Etablierung stabiler S2 Zelllinien.

Ein Nachweis der Expression war nur für die Vollängen Konstrukte möglich, da an der Streptavidin-Agarose sehr viele biotinylierte Proteine aus den S2 Zellen gebunden wurden. Dieses machte einen Nachweis mit Biotin-Antikörper unmöglich. Die Expression der Vollängen Konstrukte konnte jedoch mit Hilfe des SU(VAR)3-3 Antikörpers nachgewiesen werden. Da dieser Antikörper durch Immunisierung mit

einem Proteinfragment für die AS 1-150 von SU(VAR)3-3 generiert wurde, war ein Nachweis der verkürzten SU(VAR)3-3 Varianten nicht möglich (Abb. 3.16)

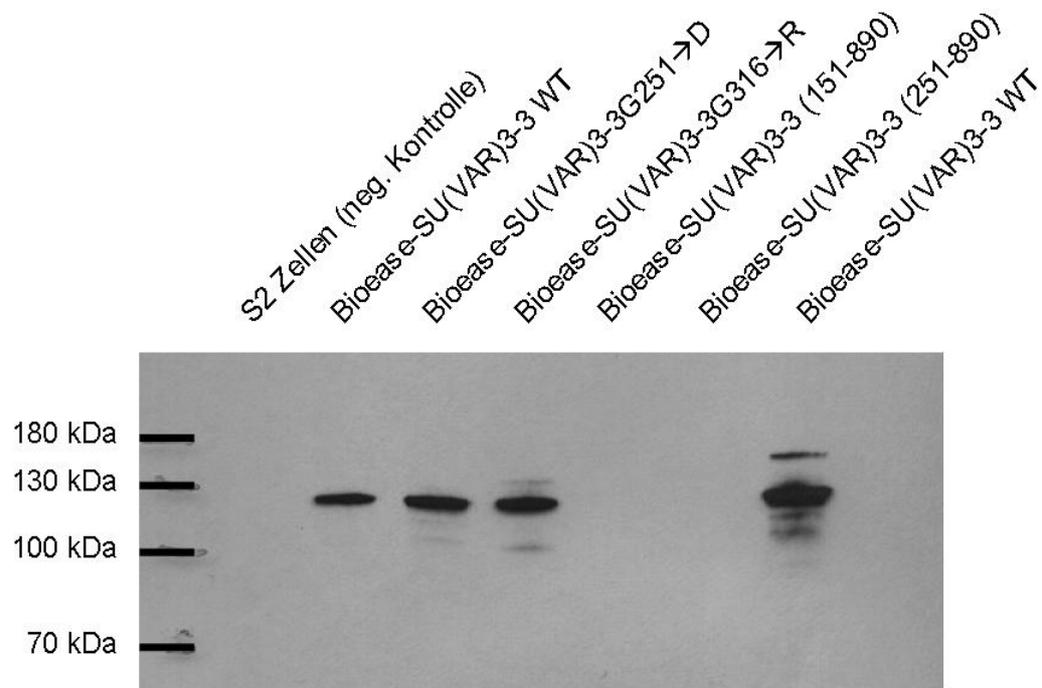


Abbildung 3.16: Westernblot mit anti-SU(VAR)3-3 Antikörper zur Kontrolle der Expression der Bioease-SU(VAR)3-3 Varianten. Der Nachweis erfolgte an Gesamt-Zellextrakten der jeweiligen Linien.

Die Bioease-SU(VAR)3-3 Varianten konnten aufgrund der Kontamination mit anderen biotinylierten Proteinen aus den S2 Zellen nicht in genügender Reinheit isoliert werden. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Nutzung von Kernextrakten, die Verunreinigungen zu entfernen. Kernextrakte als Ausgangsmaterial für die Präzipitation erbrachten nur eine leichte Reduktion der kontaminierenden Proteine im Vergleich zur Präzipitation aus Gesamtextrakten. Da zu diesem Zeitpunkt M. Yonezawa vom IMP in Wien im Rahmen einer Kooperation in der Lage war, SU(VAR)3-3 Protein in hoher Reinheit und großer Menge aus *Baculovirus* infizierten SF9 Zellen zu isolieren, wurde

die Strategie, der Reinigung biotinylierter Proteine aus stabil transfizierten S2 Zellen, nicht weiter verfolgt.

3.9 Präzipitation von SU(VAR)3-3 aus embryonalen Extrakten

Eine Reinigung des SU(VAR)3-3 Proteinkomplexes aus den stabilen Zellkulturen war nicht in entsprechender Reinheit und Menge möglich. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten versucht, den Komplex mit Hilfe des SU(VAR)3-3 Antikörpers zu präzipitieren. In ersten Vorexperimenten sollte getestet werden, welche Aufschluss- und Waschpuffer geeignet sind, endogenes SU(VAR)3-3 in großen Mengen und guter Reinheit zu präzipitieren. Für diese Experimente wurden Kerne aus 0-4h alten Embryonen mit verschiedenen Puffern extrahiert (Abb. 3.17). Die Bindung von SU(VAR)3-3 an die Säulenmatrix erfolgte durch den spezifischen Antikörper.

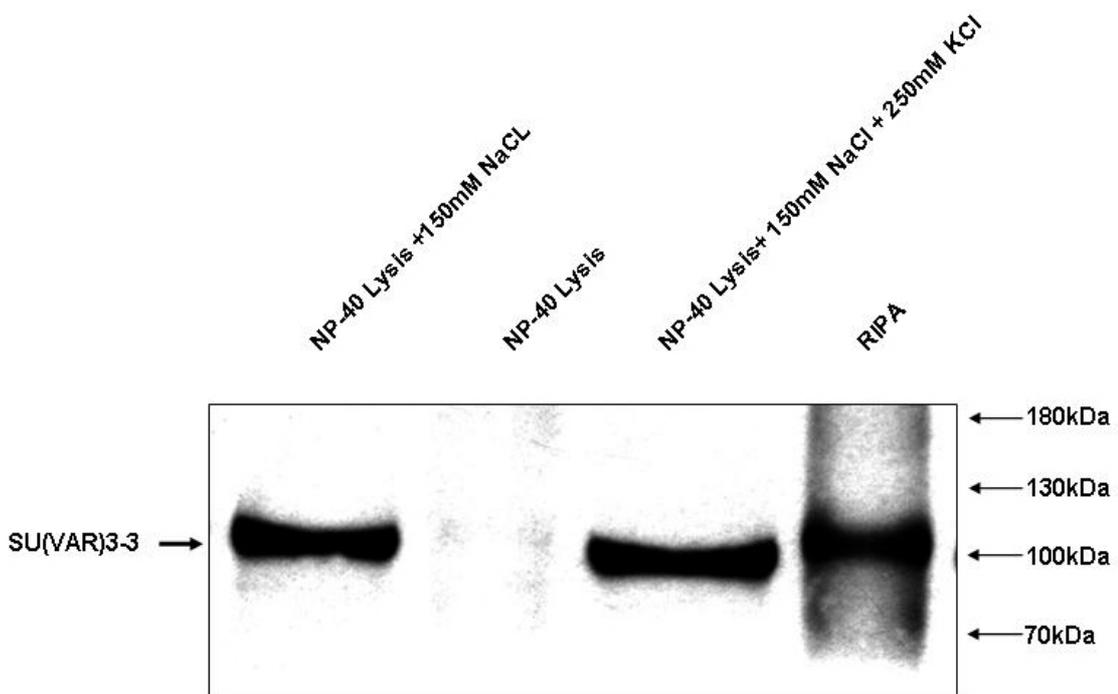


Abbildung 3.17: Immunopräzipitation von SU(VAR)3-3 mit SU(VAR)3-3 Antikörper aus embryonalen Kernextrakten. Die verwendeten Extraktions- und Waschpuffer sind über den einzelnen Bahnen wiedergegeben. Der Nachweis im Westernblot erfolgte ebenfalls durch SU(VAR)3-3 Antikörper.

Ab einer Konzentration von 150 mM NaCl im Extraktionspuffer war SU(VAR)3-3 gut extrahierbar. Ein Puffer ohne Salz (NP-40 Lysis) zeigte keine Extraktion. Die Präzipitation mit RIPA-Puffer lieferte ausreichende Mengen an SU(VAR)3-3, jedoch wurden mit diesem Aufschlusspuffer wesentlich mehr unspezifische Proteine präzipitiert. Das beste Signal zu Hintergrund Verhältnis war bei NP-40 Lysispuffer mit 150 mM NaCl und 250 mM KCl zu sehen. Da in diesem Puffer auch die zu testenden Interaktionspartner SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 gut zu extrahieren waren, wurde er in allen weiterführenden Experimenten benutzt.

3.10 SU(VAR)3-3 interagiert mit SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 *in vivo*

Neben der genetischen Interaktion zwischen *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* wurde auch eine Interaktion auf Proteinebene untersucht. In einer Publikation (Czermin et al., 2001) konnte eine Interaktion zwischen SU(VAR)3-9 und RPD3 gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde auch dieses Protein in die Analysen einbezogen. Die Identifikation putativer Wechselwirkungspartner erfolgte durch Co-Immuno-präzipitation aus embryonalen Kernextrakten mit anschließendem Nachweis der Proteine durch Westernblot. Es wurden Kernextrakte aus 0-3h alten Embryonen hergestellt und mit Extraktionspuffer extrahiert. Als Extraktionspuffer wurde der bereits erfolgreich getestete NP-40 Lysispuffer mit 150 mM NaCl und 250 mM KCl verwendet. Die sehr frühen Embryonalstadien (0-3h) wurden deshalb gewählt, weil SU(VAR)3-3 zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung an heterochromatischen Regionen bindet und sehr gut exprimiert ist. Die Präzipitation erfolgte mit α -SU(VAR)3-3 Antikörper, welcher kovalent an Protein A-Sepharose gekoppelt war. Die chemische Kopplung des Antikörpers an die Sepharose mit DMP war nötig, um eine Kontamination der Elutionsfraktionen mit den schweren und leichten Ketten des Antikörpers zu verhindern. Die Analyse der Extrakte, Überstände und Präzipitate erfolgte durch einen Westernblot mit polyklonalen SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 Antikörpern. Die Kontrolle der Spezifität der Interaktion erfolgte durch eine reverse Co-Immuno-präzipitation mit HP1 und RPD3 Antikörper. In beiden Fällen

konnte SU(VAR)3-3 im Präzipitat durch Westernblot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In diesem Experiment konnte die genetisch festgestellte Wechselwirkung zwischen SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 durch Co-Immunopräzipitation bewiesen werden (Abb. 3.18).

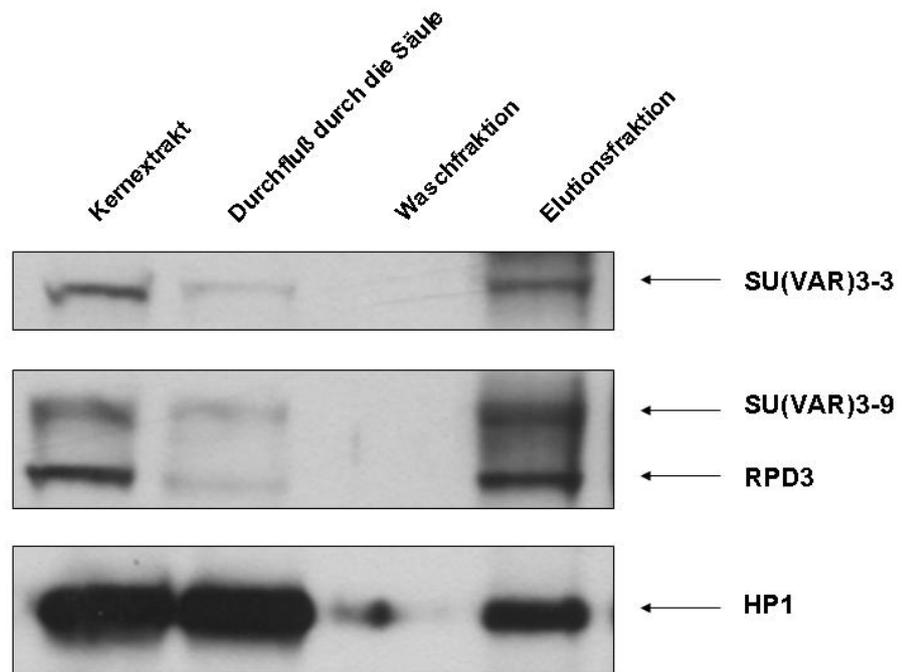


Abbildung 3.18: *In vivo*-Interaktion von SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3. Nach Coimmunopräzipitation aus embryonalen Kernextrakten mit polyklonalem SU(VAR)3-3 Antikörper konnten in der Durchflussfraktion und in der Elutionsfraktion SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 nachgewiesen werden. In der Waschfraktion war nur HP1 detektierbar.

3.11 Zytologische Lokalisierung von SU(VAR)3-3 in verschiedenen Stadien der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*

Eine hohe Spezifität des SU(VAR)3-3 Antikörpers konnte in mehreren Pilotexperimenten nachgewiesen werden. Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* mit Hilfe dieses Antikörpers analysiert. In den Analysen wurde besonderer Wert auf frühe Embryonalstadien gelegt, da zu diesem Zeitpunkt SU(VAR)3-3 im Heterochromatin lokalisiert ist.

3.11.1 Verteilung von SU(VAR)3-3 und H3K4 Dimethylierung in frühen Embryonalstadien von *Drosophila melanogaster*

Nach dem Ende der meiotischen Teilung befinden sich in der Eizelle 4 haploide weibliche Vorkerne. Nur einer dieser Vorkerne wird durch den haploiden männlichen Vorkern befruchtet. Die restlichen drei weiblichen Vorkerne bilden das Polarkörperchen. Die ersten syncytialen Furchungsteilungen finden im Inneren des Embryos statt. Ab dem Kernteilungszyklus 9 erfolgt die Wanderung der Kerne an die Oberfläche und das Blastodermstadium wird erreicht. Einige Kerne verbleiben im Inneren des Embryos und bilden die Dotterkerne. Die ersten Teilungen verlaufen im Syncytium, das heißt, es werden keine Zellmembranen gebildet. Erst nach der 14. Kernteilung erfolgt die Bildung dieser Membranen. Bis zum 14. Kernteilungszyklus verlaufen die Kernteilungen des Embryos synchron (Foe et al., 1993). Ab diesem Zeitpunkt der Entwicklung ist erstmals eine Unterscheidung von Eu- und Heterochromatin innerhalb des Kerns möglich. Das zu diesem Zeitpunkt entstehende Heterochromatin ist durch seine verstärkte Anfärbbarkeit mit DNA-Farbstoffen wie DAPI gekennzeichnet und befindet sich an der Peripherie der Kerne. Die euchromatischen Bereiche der Chromosomenarme sind nach innen zur Mitte des Embryos hin ausgerichtet (Abb. 3.19).

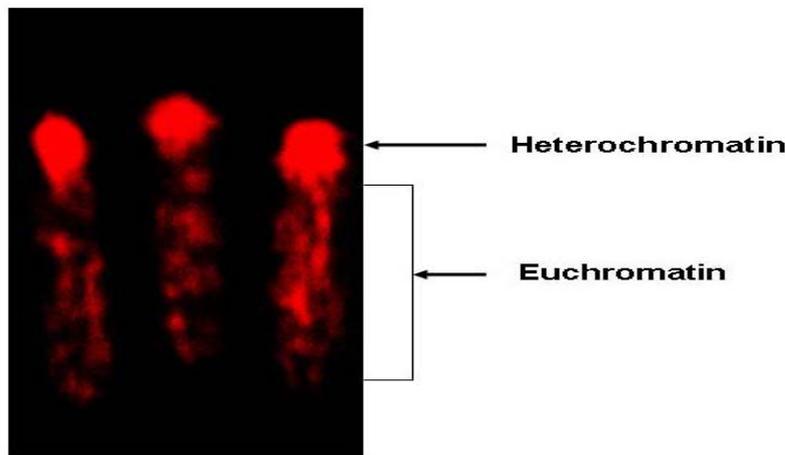


Abbildung 3.19: Unterscheidung von Eu- und Heterochromatin in Kernen des Kernteilungszyklus 14 anhand der Anfärbung mit DAPI. Die Bereiche dichter und starker DAPI Signale entsprechen dem Heterochromatin.

SU(VAR)3-3 ist ab dem zweiten Kernteilungszyklus im Kern nachweisbar. Bis zum 4. Teilungszyklus steigt die Menge an nachweisbarem SU(VAR)3-3 Protein stetig an, um dann über mehrere Zyklen konstant zu bleiben. Das Protein ist in den syncytialen Kernen bis zum Stadium 10 ubiquitär verteilt (Abb. 3.20). Das SU(VAR)3-3 Homologe LSD1 ist eine H3K4 Mono- und Dimethyl spezifische Demethylase. Diese Aktivität konnte auch für SU(VAR)3-3 *in vitro* gezeigt werden (M. Yonezawa, persönliche Mitteilung). Bis zum zehnten Kernteilungszyklus ist in den Furchungskernen keine H3K4 Methylierung nachweisbar (Abb. 3.20). Für eine Analyse der Mutantensituation standen nur die Embryonen heterozygoter Null-Mutanten Weibchen zur Verfügung, da homozygote Weibchen steril waren und keine Eier ablegten. In den Embryonen dieser Weibchen ist aufgrund der starken maternalen Komponente von *Su(var)3-3* während der frühen Furchungsteilungen keine Reduktion der Proteinmenge an SU(VAR)3-3 oder eine Änderung der H3K4 Methylierung nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

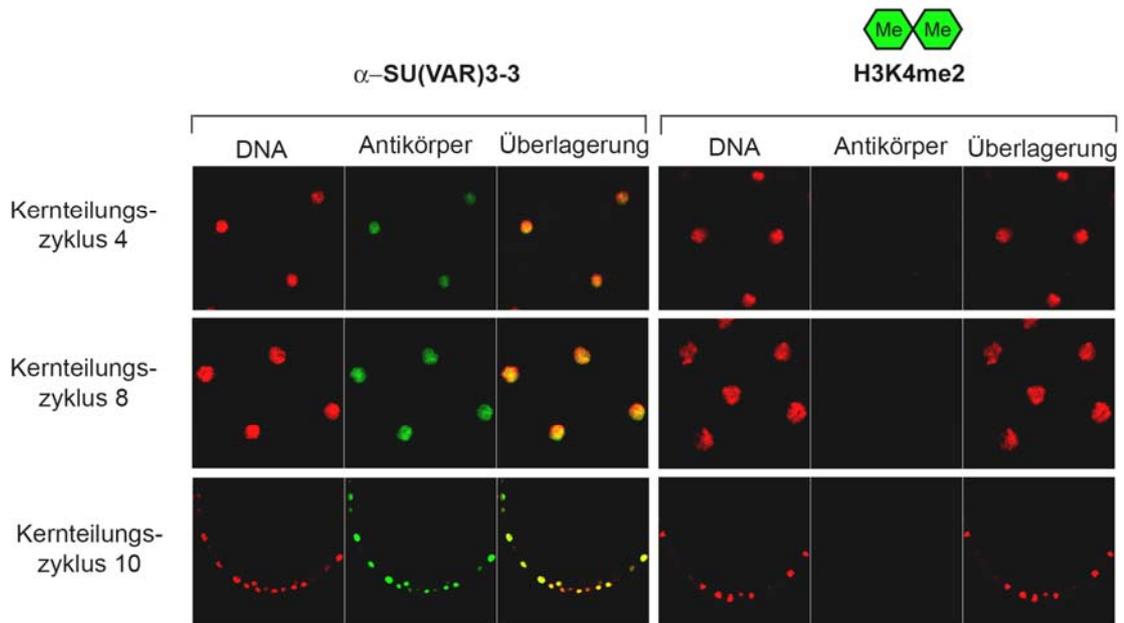


Abbildung 3.20: Verteilung von SU(VAR)3-3 und H3K4 Dimethylierung während der frühen Furchungsteilungen bis zum Kernteilungszyklus 10. Die Proteine wurden mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern detektiert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

Ab dem Kernteilungszyklus 14 ist in den Mutantenembryonen eine Reduktion der Menge an SU(VAR)3-3 detektierbar. Das Protein ist zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung präferentiell im Heterochromatin lokalisiert. Dieses ist bei einer starken Vergrößerung der Kerne, wie in Abbildung 3.23 besonders gut sichtbar. Die Histon-Deacetylase RPD3, welche *in vivo* mit SU(VAR)3-3 interagiert, ist ab diesem Entwicklungsstadium ebenfalls erstmals in allen Kernen nachweisbar. Diese verstärkte Expression von RPD3 geht einher mit einer signifikanten Reduktion der H3K9 Acetylierung (Abb. 3.21).

3 Ergebnisse

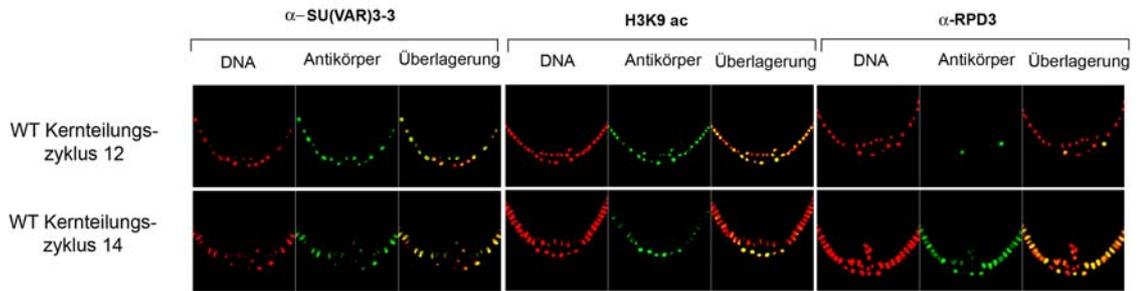


Abbildung 3.21: Verteilung von SU(VAR)3-3, RPD3 und H3K9 Acetylierung während der Kernteilungszyklen 12 und 14 von *Drosophila melanogaster*. Die Proteine wurden mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern detektiert. Die Anfärbung der DNA erfolgte mit DAPI.

Die H3K4 Dimethylierung ist ab dem Kernteilungszyklus 12 detektierbar. Die aktive Transkription des Embryos startet ebenfalls zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung. Diese Daten stimmen sehr gut mit der vorhergesagten transkriptionsaktivierenden Funktion dieser Methylierung überein. In den Kernen der Polzellen konnte im Wildtyp keine H3K4 Methylierung beobachtet werden. Das Fehlen dieser Modifikation in den Polzellen ist nötig um die für die Keimbahn typische transkriptionelle „Quiescence“ zu induzieren (Schaner et al., 2003). Für die Embryonen heterozygoter Null-Mutanten Weibchen ist neben einer Reduktion von SU(VAR)3-3 eine erhöhte H3K4 Dimethylierung charakteristisch. Diese Modifikation ist in den Mutanten auch in den Polzellkernen nachweisbar (Abb. 3.22). Die signifikant erhöhte Menge dieser Euchromatin typischen Modifikation geht einher mit einer Reduktion der heterochromatischen H3K9 Dimethylierung und einem fast vollständigen Verlust der H3K9 Trimethylierung. Dieser Verlust ist mit der Reduktion in einer Null-Mutante der H3K9 Methyltransferase *Su(var)3-9* vergleichbar. Die Reduktion der H3K9 Dimethylierung ist im Vergleich zu einer *Su(var)3-9* Mutante deutlich verstärkt (Abb. 3.22).

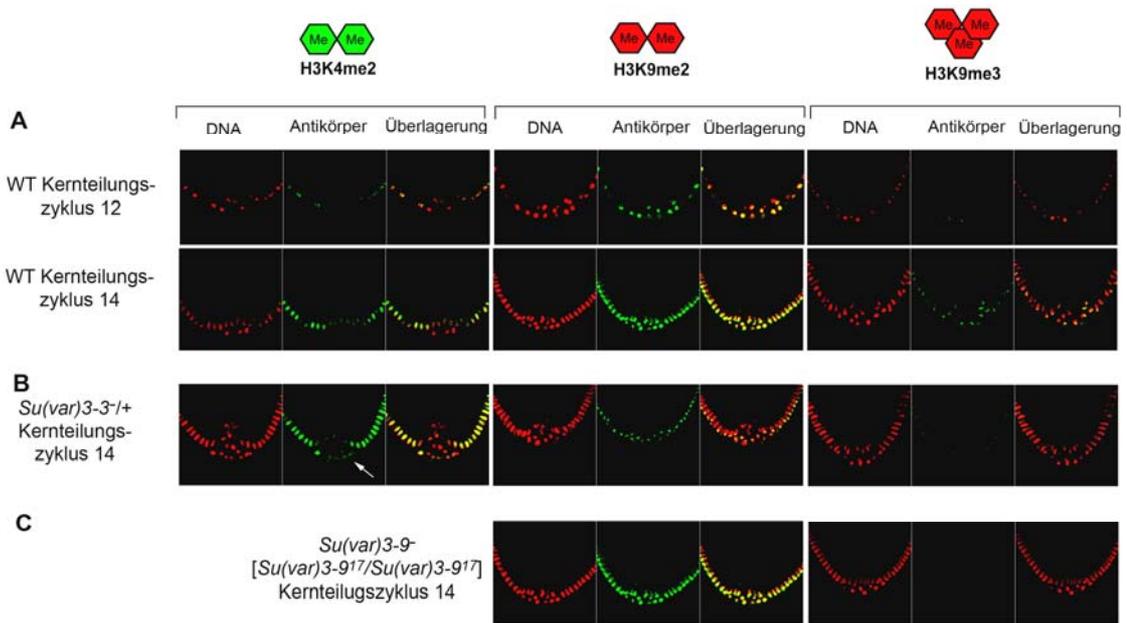


Abbildung 3.22: (A) Verteilung der euchromatischen H3K4 Dimethylierung und der heterochromatischen H3K9 Di- und Trimethylierung während der Kernteilungszyklen 12 und 14 von *Drosophila melanogaster*. (B) Analyse der Histonmodifikationen in Embryonen heterozygoter *Su(var)3-3* Null-Mutanten Weibchen. Der Pfeil markiert die Polzellen mit ektopischer H3K4 Dimethylierung. (C) Detektion von H3K9 Di- und Trimethylierung in Embryonen einer *Su(var)3-9* Null-Mutante. Die Histon-Modifikationen wurden mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern detektiert. Die Anfärbung der DNA erfolgte mit DAPI

Die Analyse der differentiellen Bindung von SU(VAR)3-3 erfolgte an Kernen der Kernteilungszyklen 13 bis 15. Diese Entwicklungszyklen wurden besonders intensiv untersucht, weil zu diesem Zeitpunkt die Differenzierung des Chromatins in Eu- und Heterochromatin erfolgt. Für diese Arbeiten wurden drei benachbarte Kerne stark vergrößert aufgenommen. Während des Kernteilungszyklus 13 ist SU(VAR)3-3 ubiquitär im Kern verteilt. Eine präferentielle Bindung des Proteins im Heterochromatin ist im Zyklus 14 zu beobachten. Diese verstärkte Bindung in heterochromatischen Regionen ändert sich nach der nächsten Teilung. Das Protein bindet nun bevorzugt die Grenzregion zwischen Eu- und Heterochromatin. Diese Lokalisation ist in den Embryonen heterozygoter Null-Mutanten Weibchen besonders gut zu sehen (Abb. 3.23). In diesen Embryonen ist in allen drei genauer untersuchten Kernteilungszyklen

eine signifikante Reduktion der Menge an SU(VAR)3-3 zu beobachten. Diese Reduktion kann sowohl auf eine verringerte maternale Komponente als auch auf den Verlust der zygotischen Expression zurückzuführen sein. Eine Genotypisierung der Embryonen durch Verwendung von GFP markierten Balancerchromosomen war in diesen frühen Entwicklungsstadien nicht möglich. Der Suppressor-Effekt von *Su(var)3-3* in den heterochromatischen Rearrangements ist eindeutig zygotischen Ursprungs und nicht maternal.

Zum Zeitpunkt des Kernteilungszyklus 14 ist in den Embryonen noch keine H3K4 Mono- und Trimethylierung nachweisbar. Diese wird erst zwei Kernteilungen später etabliert. Die Reduktion von SU(VAR)3-3 in den Mutantenembryonen führt zu einer verstärkten H3K4 Dimethylierung in den Kernen des Kernteilungszyklus 14. Diese für Euchromatin spezifische Modifikation ist bereits im Kernteilungszyklus 14 detektierbar und breitet sich durch das Fehlen der Demethylase im Heterochromatin aus. In den Mutantenembryonen führt die verringerte Menge an SU(VAR)3-3 neben einer verstärkten H3K4 Dimethylierung zu einer Reduktion der heterochromatischen H3K9 Dimethylierung. Die H3K9 Trimethylierung im Heterochromatin fällt vollständig aus. Zusätzlich kann eine ektopische H3K9 Trimethylierung in den euchromatischen Regionen der Kerne beobachtet werden. Diese Reduktion der heterochromatisch H3K9 Methylierung führt zu einer signifikant verringerten Bindung von HP1 im Heterochromatin (Abb. 3.23).

Die Histon-Deacetylase RPD3 wird in den Embryonen heterozygoter Null-Mutanten Weibchen normal lokalisiert. Eine verringerte Bindung des Proteins ist nicht zu beobachten. Die durch dieses Enzym katalysierte Deacetylierung der H3K9 Position ist in den Mutantenembryonen signifikant geringer. Die H3K9 Acetylierung breitet sich ähnlich der H3K4 Dimethylierung in heterochromatische Regionen aus.

Diese Daten belegen eine protektive Funktion von SU(VAR)3-3 in der Etablierung von Heterochromatin. Das Enzym verhindert im Komplex mit der Histon-Deacetylase RPD3 eine Ausbreitung euchromatischer Modifikationen in das Heterochromatin. Ein ektopisches „Spreading“ der H3K4 Dimethylierung in das Heterochromatin führt zu einer signifikant verringerten H3K9 Methylierung in heterochromatischen Regionen.

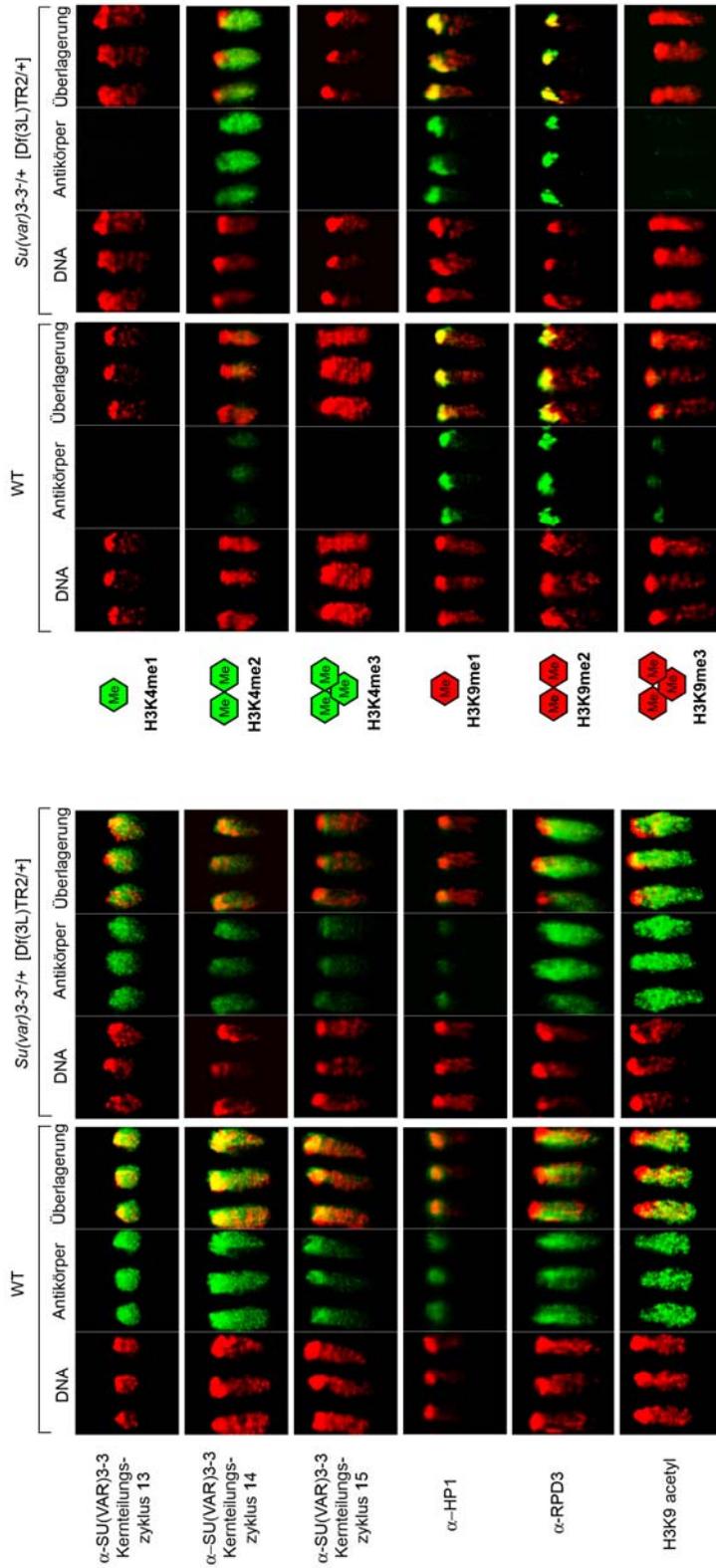


Abbildung 3.23: Analyse der Bindung von SU(VAR)3-3, HP1, und RPD3 und der Verteilung von Histonmodifikationen in Kernen des Kernteilungszyklus 14. Die linke Spalte zeigt jeweils die Situation im Wildtyp im Vergleich zu Embryonen heterozygoter *Su(var)3-3* Null-Mutanten Weibchen in der rechten Spalte. Die Antikörperfärbung erfolgte mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

3.11.2 Lokalisation von SU(VAR)3-3 im Verlauf des Zellzyklus

Wie in Abb. 3.20 gezeigt wurde, ist SU(VAR)3-3 in der Interphase des Zellzyklus kernlokalisiert. Während der Prophase, wenn die Kondensation der Chromosomen beginnt, ist SU(VAR)3-3 am Chromatin gebunden. Mit Beginn der Metaphase ist das Protein zu beiden Seiten, der in der Metaphasenplatte angeordneten Chromosomen, zu finden. Furchungskerne in der Anaphase zeigen keine Färbung mit den SU(VAR)3-3 spezifischen Antikörper (Abb.3.24). Nach dem Ende der Telophase lässt sich eine Reassoziierung von SU(VAR)3-3 mit dem Chromatin nachweisen (Daten nicht gezeigt).

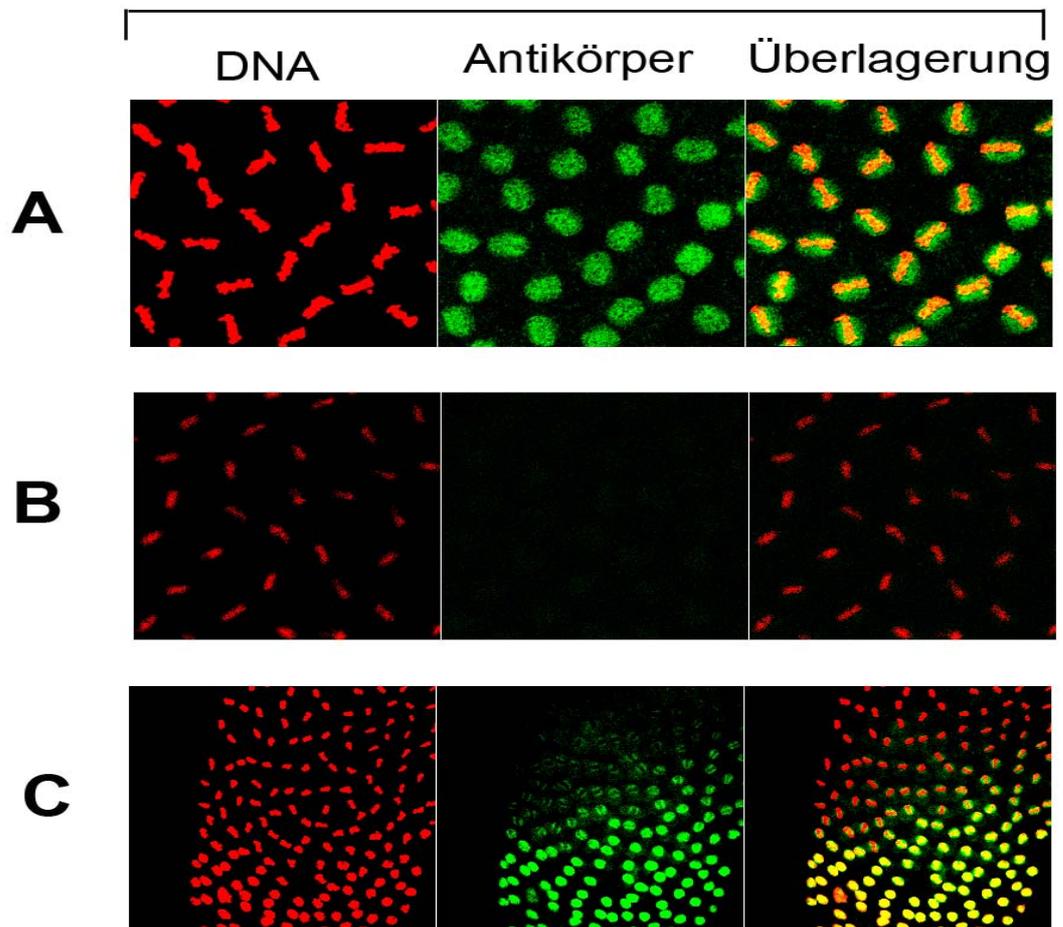


Abbildung 3.24: Verteilung von SU(VAR)3-3 während des Zellzyklus. Detektion von SU(VAR)3-3 in der Metaphase (A) und Anaphase (B) des Zellzyklus. Die Bilder in (C) zeigen den Ausschnitt eines Embryos in der Mitose. Die Detektion von SU(VAR)3-3 erfolgte mit dem spezifischen Antikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

3.12 Einfluss von *Su(var)3-3* Null-Mutanten auf Histon-Modifizierungen in polytänen Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*

Die in den frühen Embryonalstadien erhaltenen Ergebnisse wurden durch die Analyse polytärer Speicheldrüsenchromosomen verifiziert. SU(VAR)3-3 ist zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung wie bereits beschrieben nicht im Heterochromatin lokalisiert. Alle im Heterochromatin beobachteten Veränderungen sollten aus diesem Grund auf epigenetische Stabilität zurückzuführen sein. Das heißt, dass früh in der Embryonalentwicklung determinierte Strukturen bis in die polytänen Speicheldrüsenkerne epigenetisch stabil gehalten werden.

3.12.1 Analyse der H3K4 und H3K9 Methylierung im Wildtyp, in *Su(var)3-3* Null-Mutanten und in einer SU(VAR)3-3EGFP Überexpressionslinie

H3K4 Dimethylierung ist in *Drosophila melanogaster* spezifisch für euchromatische transkriptionsaktive Regionen. Die Antikörpersignale für diese Methylierungsstufe korrelieren mit den Interbanden der polytänen Speicheldrüsenchromosomen (Ebert et al., 2006). Einige dieser Interbanden werden auch durch SU(VAR)3-3 gebunden. Betrachtet man im Vergleich die H3K4 Dimethylierung im Wildtyp und in *Su(var)3-3* Null-Mutanten, so ist in der Mutante eine signifikant erhöhte H3K4 Dimethylierung zu beobachten. In den Embryonen führte eine Verringerung der Menge an SU(VAR)3-3 zu einer Reduktion der H3K9 Di- und Trimethylierung in den heterochromatischen Regionen der Kerne. Diese deutliche Reduktion ist auch in den polytänen Chromosomen der Speicheldrüsen zu sehen. Auch die bereits beschriebene ektopische H3K9 Trimethylierung außerhalb des Chromozentrums konnte bestätigt werden. Die Analyse der polytänen Speicheldrüsenchromosomen zeigte, im Gegensatz zur Färbung in Embryonen, eine Reduktion der H3K9 Monomethylierung im Chromozentrum und in

den Banden der Chromosomenarme (Abb. 3.25 [B]). Eine verringerte Menge an SU(VAR)3-9, der *Drosophila* H3K9 Methyltransferase, konnte durch immunozytologische Methoden nicht nachgewiesen werden (C. Schäfer, pers. Mitteilung). Die beobachtete Reduktion, insbesondere der heterochromatischen H3K9 Di- und Trimethylierung, korreliert sehr gut mit dem gemessenen Suppressor-Effekt in den einzelnen Rearrangements und ist mit einem Verlust von SU(VAR)3-9 zu vergleichen. Bei einer regulierten Überexpression in Form einer Duplikation für *Su(var)3-3* oder auch im *in vitro* Essay demethyliert SU(VAR)3-3 spezifisch Mono- und Dimethyliertes Lysin 4 des Histons H3. Diese Demethylierung ist auch nach ektopischer Überexpression von SU(VAR)3-3EGFP zu beobachten (Abb. 3.25 [C]). Die H3K4 Dimethylierung in den Interbanden ist in der Überexpressionslinie sehr stark reduziert. Diese ektopische Überexpression hat auch eine erhebliche Reduktion der H3K9 Di- und Trimethylierung im Chromozentrum zur Folge. Die H3K9 Monomethylierung bleibt nach Überexpression unverändert. Auch für LSD1 wurde eine *in vitro* Demethylierung von Dimethyl-H3K9 beschrieben. In diesem speziellen Fall geht das Protein eine Wechselwirkung mit dem Androgen-Rezeptor ein und erlangt dadurch die enzymatische Fähigkeit zur Demethylierung von H3K9 (Metzger et al., 2005). Funktionell sollte die beobachtete Demethylierung von H3K9 im Heterochromatin zu einem Suppressor-Effekt führen. Dieser konnte durch Messung der *Stubble*-Variegation bestätigt werden. Die Überexpression von SU(VAR)3-3EGFP ist ein starker Suppressor für PEV im *Stubble*-Rearrangement. In der Kontrolle sind 51% aller ausgewerteten Borsten *Stubble*. Durch die Überexpression von SU(VAR)3-3EGFP erhöht sich der Anteil der *Stubble*-Borsten auf 83%. Auch in diesem Fall besteht also eine direkte Korrelation zwischen der Menge an H3K9 Di- und Trimethylierung und der Stärke des Silencings eines heterochromatischen Rearrangements. Alle durch immunozytologische Methoden identifizierten Veränderungen in der Modifikation der Histone konnten durch Westernblot-Analysen bestätigt werden (M. Walther, persönliche Mitteilung).

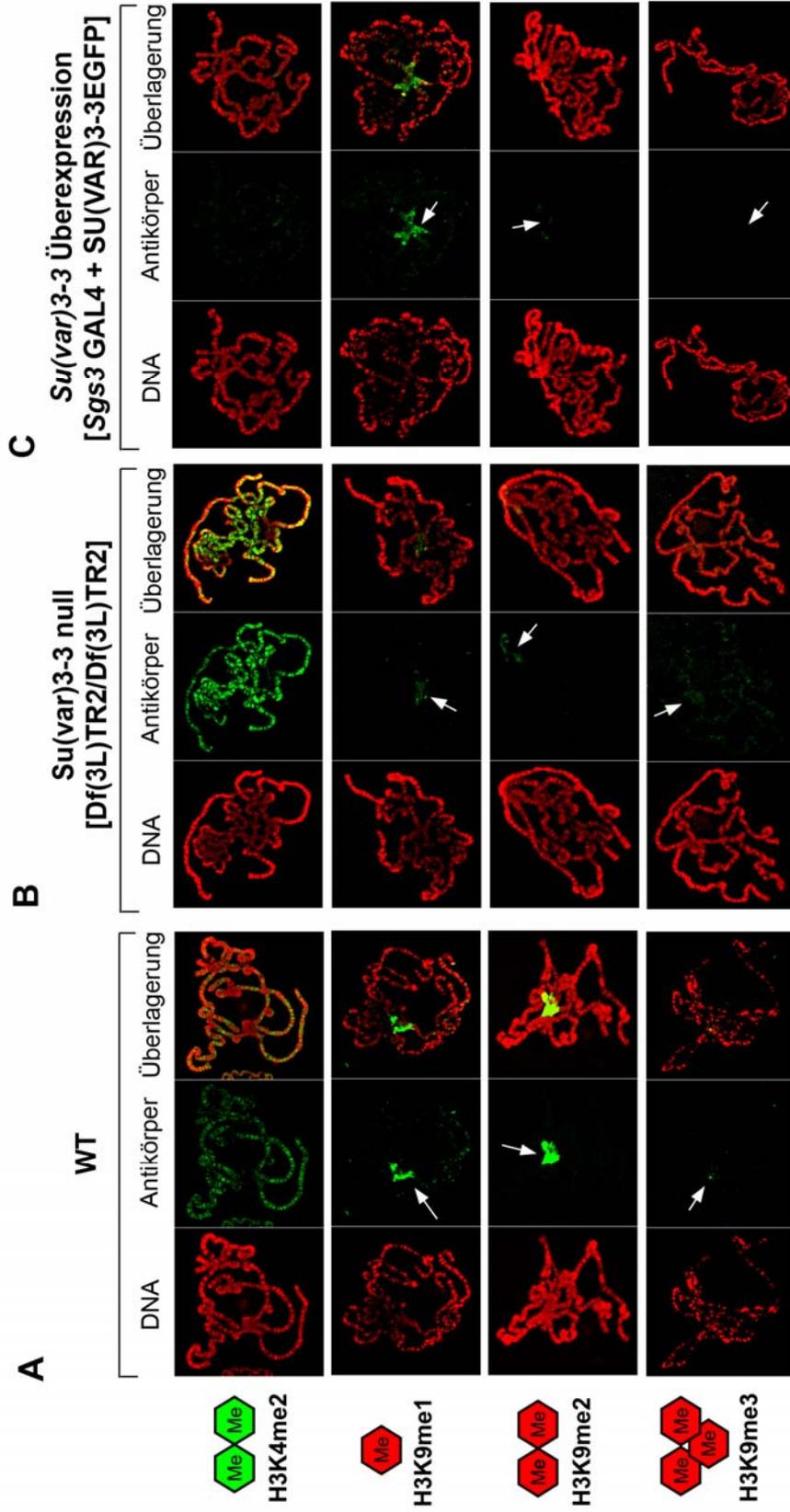


Abbildung 3.25: Analyse der Verteilung von Histonmodifikationen in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. (A) Situation im Wildtyp. (B) Einfluss einer Su(var)3-3 Null-Mutante auf die untersuchten Modifikationen. (C) Auswirkungen einer ektopischen Überexpression von SU(VAR)3-3EGFP auf die analysierten Histonmodifikationen. Die Antikörperfärbung erfolgte mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit C. Schäfer aus unserer Arbeitsgruppe.

4 Diskussion

Die komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms eröffnete ein neues Zeitalter der Molekularbiologie und Medizin (Davies et al., 2001). Eine wesentliche Frage blieb jedoch auch nach der Sequenzierung unbeantwortet. Wie schafft es der Organismus mit 35000-50000 Genen hunderte verschiedene Zelltypen und Funktionen zu generieren? Eine mögliche Antwort ist eine sehr effiziente Regulation der Genaktivität in den verschiedenen Zelltypen. Durch die Aktivierung oder Repression bestimmter Gene werden die einzelnen Zelllinien etabliert und aufrechterhalten. Aus diesem Grund ist die Erforschung der Regulation der Gene ein wichtiger, wenn nicht sogar der bestimmende Schritt auf der Suche nach neuen Behandlungsmethoden. Die Modifikationen der Histon N-Termini stellen einen Mechanismus zur Regulation der Genaktivität dar. Eine Vielzahl von Modifikationen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und Methylierungen sind bereits seit langem bekannt. Allein die Kenntnis der Modifizierungen erlaubt jedoch keine Aussagen zur Funktion dieser Modifikationen. Ein gutes Modellsystem zur Erforschung der Funktion ist daher das Ausschalten der Enzyme für bestimmte Modifikationen. In *Drosophila melanogaster* wurde mit der Positionseffekt-Variegation ein Modellsystem etabliert, das die Identifizierung solcher Mutanten erlaubt. Durch genetische Screens wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, die Faktoren für heterochromatisches Gensilencing kodieren (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1983; Reuter und Szidonya, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde der PEV-Suppressor *Su(var)3-3* analysiert. Mutationen für dieses Gen gehören zu den stärksten isolierten Modifikatoren für PEV, reagieren sensibel auf Butyrat und sind rezessiv steril. Diese Sterilität ist keimbahnabhängig, was durch Polzell-Transplantationen gezeigt werden konnte (Szabad et al., 1988).

4.1. *SU(VAR)3-3* ist ein genereller Bestandteil heterochromatischer Proteinkomplexe und wirkt „upstream“ von *SU(VAR)3-9* Silencingkomplexen

Su(var)3-3 wurde als Suppressor für white-Gensilencing im Rearrangement w^{m4} isoliert. Mutationen in diesem Gen sind nicht spezifisch für dieses Silencing-System, sondern auch in der Lage als Suppressoren in anderen heterochromatischen Rearrangements zu fungieren. Das Genprodukt von *Su(var)3-3* ist damit ein genereller Bestandteil heterochromatischer Proteinkomplexe und damit funktionell den bereits beschriebenen Suppressoren *Su(var)3-9* (Tschiersch et al., 1994), *Su(var)2-5* (James und Elgin, 1986) und *Su(var)3-7* (Reuter et al., 1990) gleichzusetzen. Alle drei Gene kodieren für essentielle Bestandteile des Heterochromatins und zeigen die gleichen Effekte in den getesteten heterochromatischen Rearrangements (S. Phalke, persönliche Mitteilung). Eine Überexpression von *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* führt zu einer Verstärkung des Silencing im $In(1)w^{m4}$ Testsystem und einem „spreading“ des Heterochromatins ins Euchromatin. Im Hintergrund einer Mutation für *Su(var)3-3* ist dieses Spreading des Heterochromatins ins Euchromatin nicht möglich. Die gleiche Wirkung zeigen Mutationen in der Histondeacetylase *Rpd3* (Czermin et al., 2001) und in der *Jil-1* Kinase (Ebert et al., 2004). Auch diese Mutationen sind Suppressoren für PEV (Mottus et al., 2000; Ebert et al., 2004) und blocken ein Spreading des Heterochromatins in das Euchromatin. Auf Grund der genetischen Daten stellen *SU(VAR)3-3*, *RPD3* und *JIL-1* Funktionen dar, die der H3K9 Methylierung durch *SU(VAR)3-9* vorgeschaltet sind. Eine erhöhte Methylierung und damit mehr Silencing ist also von der Funktion von *SU(VAR)3-3*, *RPD3* und *JIL-1* abhängig. Diese drei Proteine könnten beispielsweise einen „Spreading-Komplex“ aufbauen, der mit *SU(VAR)3-9* interagiert und ein Spreading des Heterochromatins in das Euchromatin erst ermöglicht (Abb. 4.1). In diesem Modell entfernen *SU(VAR)3-3* und *RPD3* die euchromatischen Markierungen der Histone und die *JIL-1* Kinase ist für die Stimulierung oder Aktivität des Komplexes notwendig. Es wäre aber auch denkbar, dass *JIL-1* die Funktion von *SU(VAR)3-9* selbst, zum Beispiel durch Phosphorylierung,

reguliert (A. Imhof, persönliche Mitteilung). Eine weitere mögliche Auswirkung von JIL1/SU(VAR)3-1 ist eine erhöhte H3S10 Phosphorylierung im Bereich des w^m -Bruchpunktes. Ein Serin 10 phosphorylierter N-Terminus des Histons H3 stellt kein Substrat für LSD1 dar und kann dementsprechend nicht mehr demethyliert werden (Forneris et al., 2005). Eine erhöhte H3S10 Phosphorylierung würde in dieser Situation ebenfalls ein „spreading“ des Heterochromatins blockieren.

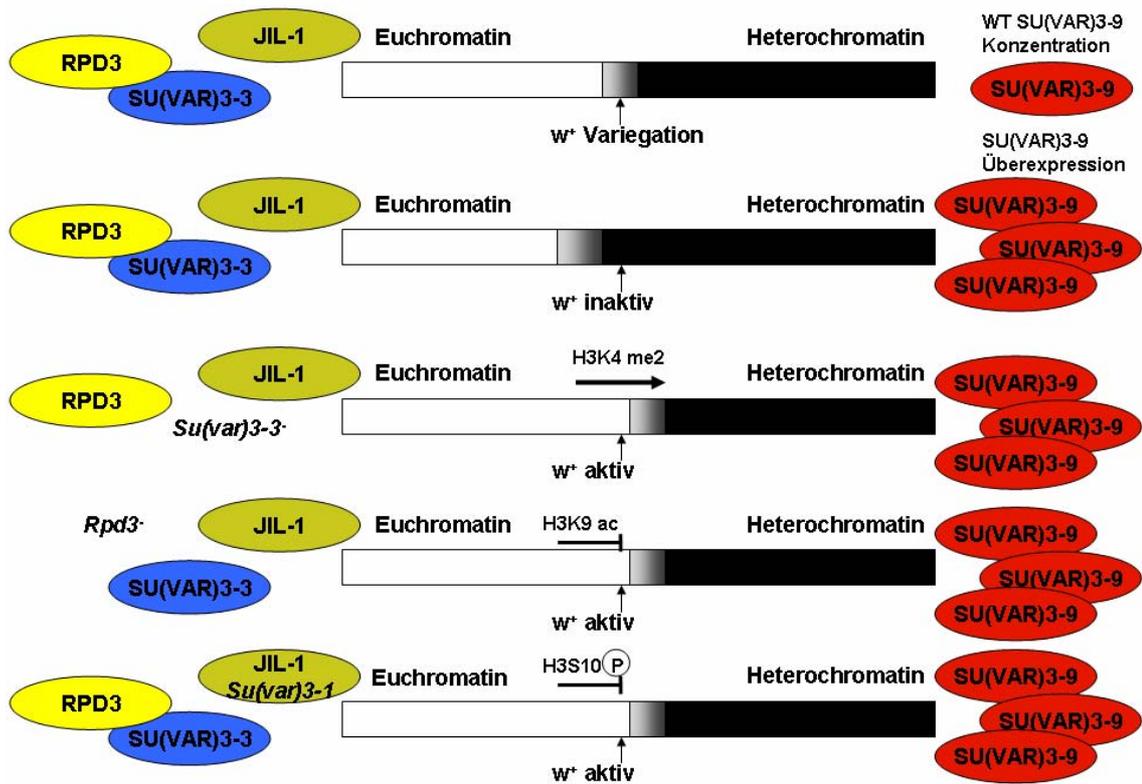


Abbildung 4.1: *Su(var)3-3*, *Rpd3*, *Su(var)3-1* und *Su(var)3-9* regulieren die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin. Die antagonistische Funktion von *Su(var)3-3*, *Rpd3* und *Su(var)3-1* etabliert eine Grenze zwischen eu- und heterochromatischen Strukturen. Durch die Überexpression von SU(VAR)3-9 kommt es zu einer Ausbreitung des Heterochromatins ins Euchromatin. Diese Ausbreitung wird durch Mutationen in *Su(var)3-3*, *Rpd3* und *Su(var)3-1* geblockt.

4.2 Die Aminoxidase-Domäne ist essentiell für die Funktion von SU(VAR)3-3

SU(VAR)3-3 ist das *Drosophila* Orthologe des humanen LSD1. Innerhalb der Aminoxidase Domäne befinden sich alle identifizierten Mutationen mit Ausnahme von *Su(var)3-3⁰⁷*. Viele Mutationen betreffen die FAD Binderegion. In dieser Region ist auch das „Rossmann-fold“, die Dinucleotidbinde-Domäne kodiert (Rossmann *et al.*, 1974). Die klassische „Rossmann-fold“ Topologie entspricht einem $\beta\alpha\beta$ -Motiv. Es ist bekannt, dass die verschiedenen Dinucleotid-Bindedomänen eine sehr niedrige Sequenzhomologie untereinander aufweisen (Branden und Tooze, 1991) jedoch zeigen alle Rossmann-fold-Motive die glycinreiche Phosphatbinde-Schleife (Wierenga *et al.*, 1985). Drei konservierte Glycin-Resten, die in einem GXGXXG-Motiv angeordnet sind, bilden diese Schleife. Die Mutation einer dieser konservierten Glycin-Reste korreliert mit einer Eliminierung der Enzymaktivität (Rescigno und Perham, 1994). In *Su(var)3-3¹¹* konnte ein Aminosäureaustausch des Glycins an der Position 276 festgestellt werden. Bei dieser Aminosäure handelt es sich um das dritte konservierte Glycin in der glycinreichen-Phosphatbindeschleife (GXGXXG). Ebenfalls innerhalb des „Rossmann-fold“-Motivs befindet sich die Mutation *Su(var)3-3²¹*. In dieser Mutante wird eine Glutaminsäure gegen Lysin ausgetauscht. Die negative Ladung an dieser Position ist essentiell für die Interaktion des Rossmann-fold mit den Hydroxygruppen der Adenin-Ribose. Eine Mutation in der durch Kristallisation vorhergesagten Substratbinderegion konnte nicht identifiziert werden (Yang *et al.*, 2006). Da das kokristallisierte Peptid keine genauen Signale ergab, wurde seine Position modelliert. Entweder ist das Modell in dieser Hinsicht ungenau oder es wurde in diesen Positionen aufgrund der ungenügenden Sättigung der Screens keine Mutation identifiziert. Sehr wichtig für die Katalyse scheint der Bereich 2061-2163 zu sein, da in dieser Region mehrere Mutationen identifiziert wurden. Für eine genaue Analyse der Mutationen und ihres Einflusses auf die Proteinstruktur ist eine genaue Modellierung anhand der Daten des humanen LSD1 unumgänglich. Diese Modellierung soll in weiterführenden Arbeiten durchgeführt werden. Da alle identifizierten Aminosäureaustausche an Positionen erfolgten, die zwischen LSD1 und SU(VAR)3-3 identisch sind, kann von einer essentiellen Bedeutung dieser Positionen ausgegangen werden. Für die SWIRM Domäne von SWI3 konnte eine

Bindung an freie DNA und Oligonucleosomen nachgewiesen werden (Da et al., 2006). Die Bindung von SWI3 an das Chromatin durch die SWIRM Domäne ist essentiell für die korrekte Etablierung und Funktion des Komplexes. Innerhalb der SWIRM Domäne von SU(VAR)3-3 wurden keine Mutationen identifiziert. Dieses kann ebenfalls an der ungenügenden Sättigung liegen. Alternativ kann die Bindung von SU(VAR)3-3 an das Chromatin oder die DNA durch mehrere kooperative Bindungen in verschiedenen Regionen des Proteins abgesichert werden. Diese Vermutung wird auch durch die Daten für SWI3 bestätigt, da alle *in vitro* Mutanten in der SWIRM-Domäne von SWI3 korrekt in den SWI/SNF Komplex assembliert werden.

4.3 SU(VAR)3-3 interagiert zum Zeitpunkt der Etablierung von Heterochromatin mit SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3

Die genetische Analyse von *Su(var)3-3* ließ eine Wechselwirkung von SU(VAR)3-3 mit SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 vermuten. Die Daten legten einen Komplex nahe, der euchromatische Markierungen entfernt. In einem zweiten Schritt wird dann, durch den SU(VAR)3-9 Komplex, eine H3K9 Methylierung etabliert. Diese dient als Basis für heterochromatisches Gensilencing und die Bindung von HP1 (Lachner et al., 2001; Nakayama et al., 2001). Die kooperative Wechselwirkung beider Komplexe ist nur zur Etablierung des Heterochromatins im Embryo des Kernteilungszyklus 14 oder zum Spreading des Heterochromatins in das Euchromatin notwendig. Der vermutete Komplex konnte *in vivo* durch Co-Immunopräzipitation erstmals bewiesen werden. Die Interaktion mit SU(VAR)3-9 und HP1 ist spezifisch für den Zeitpunkt der Etablierung von Heterochromatin im frühen Embryo von *Drosophila melanogaster*. Zu einem späteren Zeitpunkt ist das Protein nicht mehr im Heterochromatin lokalisiert. Eine Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)3-9 oder HP1 aus 12 bis 24 h alten Embryonen war nicht mehr möglich (Daten nicht gezeigt). Ob eine direkte Bindung von SU(VAR)3-3 an SU(VAR)3-9, HP1 oder RPD3 erfolgt, muss in weiteren Analysen durch GST-pull down Experimente untersucht werden.

SU(VAR)3-3 könnte in späteren Entwicklungsstadien als Demethylase in andere Komplexe rekrutiert werden. Diese wären zum Beispiel die Corepressor Komplexe in

denen auch LSD1 als Bestandteil identifiziert wurde. LSD 1 konnte unter anderem in Corepressor Komplexen wie dem CtBP Komplex (Shi et al., 2003), dem NRD Komplex (Tong et al., 1998) und dem Co-Rest Komplex (You et al., 2001) nachgewiesen werden. Außerdem wurde LSD1 in einigen HDAC Komplexen (Hakimi et al., 2002, 2003; Humphrey et al., 2001) als Interaktionspartner identifiziert. Erste Versuche diese späteren Komplexe in Zelllinien nachzuweisen führten zu keinem Erfolg. Durch Präzipitation mit Flag/HIS-Agarose oder eine komplette TAP-Tag Reinigung konnte nur das überexprimierte Protein, nicht aber der Komplex gereinigt werden. Eine der Ursachen für die misslungene Reinigung des Komplexes könnte die hohe Expressionsrate des endogenen *Su(var)3-3* in den Zellen sein. Aus diesem Grund wird nur wenig FLAG-SU(VAR)3-3-HIS in den Komplex eingebaut und die Aufreinigung erfolgte mit geringen Ausbeuten. Dieses Problem wurde in der Literatur schon für andere Reinigungsversuche von Proteinkomplexen beschrieben (Forler et al., 2003). Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, wäre die beschriebene Expression des humanen Orthologen, also von LSD1 und der Knock-down des endogenen SU(VAR)3-3 durch RNAi. LSD1 sollte so in den *Drosophila*-Komplex eingebaut werden. Das humane Protein kann dann durch FLAG/HIS Präzipitation oder eine TAP-Tag Reinigung zusammen mit dem Komplex isoliert werden.

4.4 SU(VAR)3-3 ist eine H3K4 spezifische Demethylase und essentiell für die Etablierung von Heterochromatin im Embryo von *Drosophila melanogaster*

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die genaue Lokalisation einer Histon-Demethylase durch immunzytologische Methoden im Detail untersucht. Endogenes SU(VAR)3-3 wird während der Etablierung von Heterochromatin präferentiell im Chromozentrum gebunden. Dort agiert das Protein als H3K4 Demethylase. In Embryonen mit einer verringerten Menge an SU(VAR)3-3 kommt es zu einer Ausbreitung der H3K4 Dimethylierung und einer gleichzeitigen Reduktion der H3K9 Di- und Trimethylierung. Diese Daten lassen eine Schutzfunktion der Demethylase vermuten.

Die Aktivität des Enzyms schützt die zu etablierenden heterochromatische Regionen der Kerne vor einer aktivierenden euchromatischen H3K4 Dimethylierung. Für die H3K9 Methyltransferase SU(VAR)3-9 konnte durch Sandro Lein aus unserer Arbeitsgruppe *in vitro* eine signifikante Inhibierung des Enzyms gezeigt werden, wenn das Substrat eine H3K4 Methylierung aufweist. Die Entfernung oder Verhinderung der H3K4 Dimethylierung hat aus diesem Grund vor der Etablierung der heterochromatischen H3K9 Methylierung zu erfolgen. Die Entfernung der H3K9 Acetylierung ist ebenfalls zwingend notwendig um H3K9 Methylierung katalysieren zu können. Die durch Co-Immunopräzipitation gezeigte Wechselwirkung von RPD3 und SU(VAR)3-3 ist somit auch rein mechanistisch von Vorteil. Beide Enzyme katalysieren die Entfernung euchromatischer Modifikationen und interagieren mit dem SU(VAR)3-9/HP1 Silencing-Komplex um die Etablierung von Heterochromatin zu ermöglichen. Ein mögliches Modell der Etablierung von Heterochromatin ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Durch Lee et al. (2006) konnte kürzlich eine gegenseitige Stimulation beider Enzyme bei der Demethylierung/Deacetylierung nucleosomaler Substrate gezeigt werden. Diese Wechselwirkung ist auch in *Drosophila* zu vermuten, da *Su(var)3-3* Allele sensitiv auf den Histon-Deacetylase Inhibitor Trichostatin A reagieren (Reuter et al., 1982) und eine Duplikation für *Su(var)3-3* den Suppressor-Effekt von *Rpd3* kompensieren kann. In diesem Fall sollte es zu einer Stimulierung der verbliebenen RPD3 Moleküle und Rekrutierung dieser zur Grenzregion zwischen Eu- und Heterochromatin kommen.

Die verringerte Menge an SU(VAR)3-3 in den Embryonen heterozygoter Weibchen kann sowohl maternalen als auch zygotischen Ursprungs sein. Das während der frühen Furchungsteilungen detektierte Protein ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine maternale Komponente zurückzuführen. Im Gegensatz dazu sind alle PEV Effekte zygotischen Ursprungs. Keines der Allele zeigt einen maternalen Suppressor-Effekt. Dieses wirft die Frage auf, wann Heterochromatin während der Embryonalentwicklung determiniert wird und ob einmal etablierte heterochromatische Regionen epigenetisch stabil sind. Die Entscheidung, ob eine chromosomale Region aktiv oder inaktiv ist, kann früh in der Embryonalentwicklung erfolgen. Dieser einmal eingestellte Zustand kann dann, durch epigenetische Stabilität, bis ins adulte Tier aufrechterhalten werden. Ein Beispiel dafür ist die Inaktivierung von Entwicklungsgenen durch POLYCOMB-

Komplexe (Pirrotta, 1997). Auch für das SU(VAR)3-9 vermittelte heterochromatische Gensilencing konnte, durch FLP basierte mitotische Rekombination, eine epigenetische Stabilität nachgewiesen werden (G. Reuter, persönliche Mitteilung). Die in *Su(var)3-9/+* Tieren durch mitotische Rekombination erzeugten Wildtyp- Zellklone zeigten nur dann wieder normale Variegation, wenn sie sehr früh in der Embryonalentwicklung generiert wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt war der Suppressor-Effekt epigenetisch stabil. Diese Tatsache wird auch durch Analysen gestützt wonach Heterochromatin zu Beginn der Gastrulation epigenetisch stabil etabliert wird (Lu et al., 1998). Die Interaktion von SU(VAR)3-3 mit SU(VAR)3-9/HP1 braucht also nur lokal und zeitlich begrenzt im zukünftigen Heterochromatin erfolgen. Danach wird der einmal eingestellte Chromatinstatus durch SU(VAR)3-9 und andere maintenance-Methyltransferasen epigenetisch stabil gehalten. Eine dieser maintenance Funktionen könnte die *Suv4-20* vermittelte H4K20 Trimethylierung sein (Schotta et al., 2004). In diesem Modell der schrittweisen Etablierung von Heterochromatin bindet HP1 an H3K9 di- und trimethylierte Nucleosomen (Lachner et al., 2001; Jacobs und Khorasanizadeh, 2002) und rekrutiert daraufhin SUV4-20, welches dann H4K20 Trimethylierung etablieren kann. Die SUV4-20 vermittelte Trimethylierung erfolgt erst im späten Embryo (S. Phalke, persönliche Mitteilung) wenn das Heterochromatin bereits etabliert ist und könnte damit die postulierte maintenance Funktion darstellen.

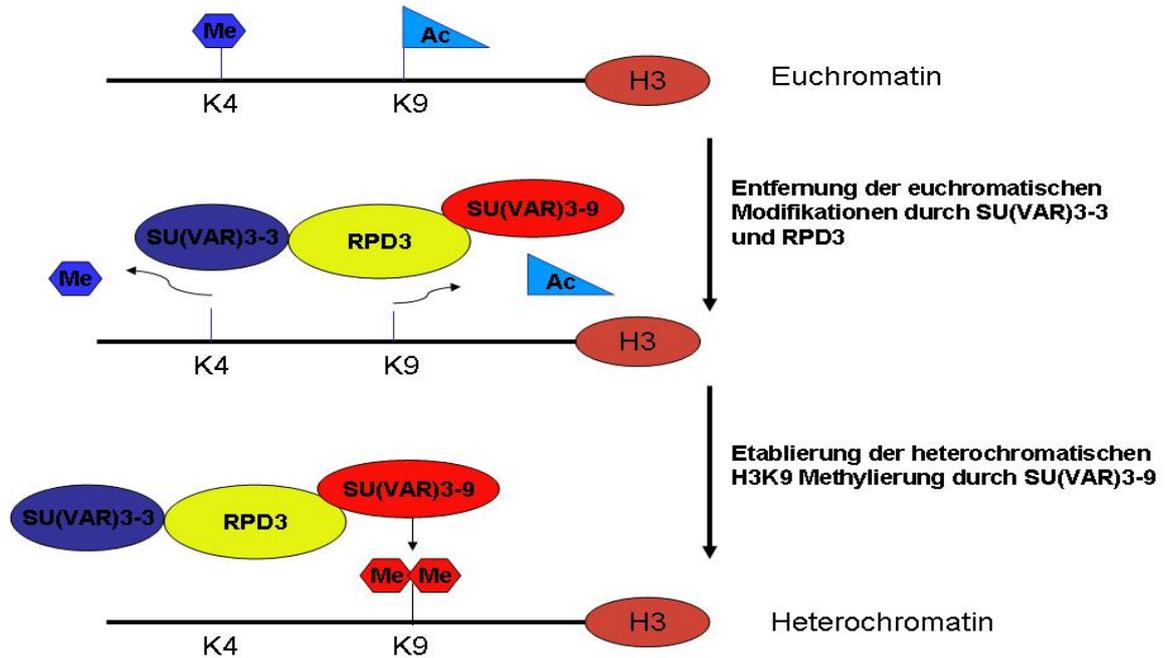


Abbildung 4.2: Modell des Übergangs vom euchromatischen zum heterochromatischen Verpackungszustand des Chromatins.

4.5 Die Demethylaseaktivität von SU(VAR)3-3 induziert die transkriptionelle „Quiescence“ in der Keimbahn von *Drosophila*

Gene wie *nanos*, *pumilio* und *germ cell-less* sind für die Etablierung und Aufrechterhaltung der transkriptionellen „Quiescence“ in *Drosophila* verantwortlich. Mutationen führen zu einer vorzeitigen Aktivierung der Transkription in den Keimbahnzellen (Asaoka-Taguchi et al., 1999; Deshpande et al., 1999; Leatherman et al., 2002). Ebenso wie *nanos* (Schaner et al., 2003) ist auch *Su(var)3-3* nötig, um eine H3K4 Dimethylierung in den Polzellen zu verhindern und eine repressive H3K9 Di- und Trimethylierung zu etablieren. In den Embryonen heterozygoter Null-Mutanten Weibchen konnte eine signifikante H3K4 Dimethylierung in allen Polzellkernen beobachtet werden. Der Effekt von *Su(var)3-3* Allelen auf diese Modifikation ist dementsprechend stärker als der beschriebene Phänotyp von *nos*⁻ Embryonen. Diese zeigen H3K4 Dimethylierung nur in 50% der Polzellkerne. In den Polzellen von *nos*⁻

Embryonen ist CTD phosphorylierte RNA Polymerase nachweisbar. Diese Form der RNA Pol 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 auch in *Su(var)3-3* Mutanten diese Form der RNA Pol II nachweisbar ist und es in *nos*⁻ Embryonen zu einer Inhibierung oder Delokalisation von SU(VAR)3-3 führt, muss in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Das Auftreten einer H3K4 Dimethylierung in den Polzellen heterozygoter *Su(var)3-3* Null-Mutanten deutet auf jeden Fall auf einen Verlust der Quiescence. Homozygote *Su(var)3-3* Mutanten Weibchen sind steril und entwickeln keine Oocyten in ihren Eikammern. Die Entwicklung stoppt im Stadium 3 bis 4 (Szabad et al., 1988). SU(VAR)3-3 ist dementsprechend ebenfalls ein essentieller Faktor während der Oogenese von *Drosophila*.

4.6 SU(VAR3-3) verhindert im Embryo eine zu frühe Aktivierung der zygotischen Transkription

In den frühen Kernteilungszyklen bis zum Zyklus 12 ist keine H3K4 Dimethylierung in den Furchungskernen nachweisbar. SU(VAR)3-3 ist ab dem Kernteilungszyklus 4 in den Interphasekernen nachweisbar und könnte, ähnlich der Funktion in den Keimbahnzellen, aktiv eine zu frühe transkriptionelle Aktivierung verhindern. Die H3K4 Methyltransferasen von *Drosophila melanogaster* sind beispielsweise TRX, TRR und ASH1 (Roguev et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Beisel et al., 2002; Sedkov et al., 2003; Byrd und Shearn, 2003). Eine oder mehrere dieser Methyltransferasen könnten ebenfalls als maternale Komponente mit in den Embryo gegeben werden. Das Signal für eine beginnende transkriptionelle Aktivität wäre dann die Etablierung einer euchromatischen H3K4 Methylierung. Bis zum Zyklus 12, also dem Start der Transkription im Wildtyp, könnte SU(VAR)3-3 aktiv einen zu frühen Start der Transkription unterbinden, indem es aktiv H3K4 Methylierungen entfernt. Um dieses Modell zu beweisen wäre es möglich frühe Embryonen der Mutante mit Antikörpern zu färben, die CTD phosphorylierte RNA Pol II erkennen. In diesen Embryonen sollte dann, im Vergleich zum Wildtyp eine zu frühe Initiation der Transkription erkennbar sein. Da

dieser Effekt wahrscheinlich durch die starke maternale Komponente überlagert wird, ist es nötig eine Null-Mutanten Situation in den Embryonen zu erzeugen. Dieses wäre durch Injektion von Inhibitoren von potenten Inhibitoren wie Pargyline oder Chlorgyline theoretisch möglich und soll in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

4.7 SU(VAR)3-3 wird während der Mitose periodisch umverteilt

Während der frühen Furchungsteilungen und im Blastodermstadium ist SU(VAR)3-3 in der Interphase kernlokalisiert. In der Metaphase dissoziiert das Protein von den Chromosomen und reassoziert mit ihnen am Ende der Telophase. Eine zellzyklusabhängige Assoziation mit dem Chromatin wurde auch für einige sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren beschrieben (Martinez-Balbas et al., 1995). Die Dissoziation vom mitotischen Chromatin ist oft auf die Reduktion negativer Ladungen durch Histondeacetylierung und Polyaminbindung zurückzuführen. Eine Dissoziation vom Chromatin während der Mitose wurde nicht nur für Transkriptionsfaktoren beobachtet. Ein ähnliches Verhalten zeigt auch SU(VAR)3-7 (Cleard *et al.* 1997). Auch die drei Polycombgruppenproteine Polycomb, Posterior Sex Combs und Enhancer of Zeste sind während der Metaphase nicht mit den Chromosomen assoziiert (Buchenau et al., 1998).

4.8 SU(VAR)3-3 ist eine H3K4 Dimethyl spezifische Demethylase in den Interbanden polytärer Speicheldrüsenchromosomen

SU(VAR)3-3 bindet in polytären Speicheldrüsenchromosomen spezifisch in Interbanden. In Null-Mutanten führt der Verlust von SU(VAR)3-3 zu einer signifikanten Erhöhung der H3K4 Dimethylierung in den Interbanden. Das Signal wird stärker, bleibt aber auf die Interbanden beschränkt. Innerhalb definierter Banden ist auch in den Null-Mutanten kein Signal für diese Methylierung detektierbar. Anhand dieser Daten könnte es in *Su(var)3-3* Mutanten zur verstärkten Transkription bestimmter Gene kommen. Diese Gene sollen in weiteren Arbeiten durch CHIP-Analysen mit Hilfe des Mutantenmaterials identifiziert werden. Kandidatengene hierfür wären zum Beispiel die durch den Co-REST Komplex reprimierten neuronalen Gene (Ballas et al., 2001). Eine erhöhte H3K4

Dimethylierung muss aber nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Transkription führen. Eventuell definiert diese Modifikation auch nur einen offenen und zugänglichen Chromatinstatus. Kommt es nicht zu weiteren Modifikationen des Chromatins oder zu einer verstärkten Bindung von Transkriptionsfaktoren, hat die erhöhte H3K4 Dimethylierung keine Auswirkungen. Aus diesem Grund wurden verschiedene euchromatischen Modifikationen in *Su(var)3-3* Null-Mutanten analysiert. Keine der untersuchten Modifikationen war in der Null-Mutante verändert.

In den Chromozentren der Speicheldrüsenchromosomen von *Su(var)3-3* Null-Mutanten ist ebenfalls die bereits im Embryo gefundene Reduktion der H3K9 Methylierung zu beobachten. Da zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung *SU(VAR)3-3* nicht mehr im Heterochromatin lokalisiert ist, sollte dieser Effekt auf epigenetische Stabilität zurückzuführen sein. Das bedeutet, dass die im Embryo durch Ausbreitung der H3K4 Dimethylierung induzierte Reduktion der H3K9 Di und Trimethylierung bis in die Speicheldrüsen epigenetisch stabil weitergegeben wurde.

4.9 Die Überexpression von *SU(VAR)3-3-EGFP* führt zu einem drastischen Verlust der H3K4 und H3K9 Methylierung

Das *SU(VAR)3-3-EGFP* Fusionsprotein wird nach ektopischer Überexpression in den Kern importiert. Dort bindet es die gleichen Interbanden wie das endogene Protein (C. Schäfer, persönliche Mitteilung) und das Chromozentrum. Ein großer Teil des exprimierten Proteins wird nicht an den Chromosomen gebunden sondern liegt im Nucleoplasma vor. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass das Protein zur Bindung an das Chromatin entweder einen Cofaktor benötigt, oder nur eine begrenzte Anzahl von Bindungssites besetzen kann. Ein Grund, weshalb keine verstärkte Bindung des Proteins nachgewiesen wurde, könnte das Fehlen der zur Bindung notwendigen Co-Faktoren sein. Ein denkbarer stimulierender Wechselwirkungspartner wäre beispielsweise *DmCoREST*. An den polytären Speicheldrüsenchromosomen bindet das überexprimierte Protein im Bereich der Interbanden. Diese Interbanden sind unter anderem auch Bereiche einer signifikanten H3K4 Dimethylierung (Ebert et al., 2006). Die DNA innerhalb der Interbanden liegt dekondensiert vor (Zhimulev, 1999) und die Insertion von P-Elementen

in Interbanden führt zur Ausbildung neuer Banden (Semeshin et al., 1989). Die molekulare Analyse einiger Interbanden ergab, dass diese Regionen viele kurze Repeats enthalten und möglicherweise eine Kontrollfunktion haben (Demakov et al., 1993). In diesen Interbanden bindet neben SU(VAR)3-3 auch JIL-1 (Wang et al., 2001), die elongierende Form der RNA Pol II (Kaplan et al., 2000) oder die Proteine Z4 und CHRIZ (Eggert et al., 2004; Gortchakov et al., 2005). Außer der H3K4 Dimethylierung ist auch die H3S10 Phosphorylierung und die H3K36 Methylierung spezifisch für Interbanden. Alle diese Daten legen eine offene transkriptionsaktive Chromatinstruktur innerhalb der Interbanden nahe. Sowohl nach Expression durch die ubiquitär induzierende *TubGAL4* Linie, als auch nach speicheldrüsenspezifischer *Sgs3GAL4* Induktion konnte in den polytänen Speicheldrüsenchromosomen ein fast völliger Verlust der H3K4 Dimethylierung beobachtet werden. Dieser Verlust korreliert nicht mit reduzierter Lebensfähigkeit oder Sterilität der Fliegen. Entweder ist die noch schwach zu detektierenden H3K4 Dimethylierung ausreichend, um einen aktiven Zustand aufrecht zu erhalten oder eine andere Histonmodifikation kann diesen Verlust kompensieren. Auch *ash1* Mutanten zeigen in polytänen Speicheldrüsenchromosomen einen völligen Verlust der H3K4 Dimethylierung und sind als Larven homozygot lebensfähig (Byrd und Shearn, 2003). Diese Daten belegen, dass der Verlust bestimmter Enzyme oder Modifikationen sehr gut durch andere Mechanismen kompensiert werden kann. Ein weiteres Beispiel für eine solche Kompensation ist *Suppressor of Underreplication*. In diesen Mutanten ist SU(VAR)3-9 nicht mehr im Heterochromatin detektierbar, die H3K9 Methylierung im Heterochromatin ist aber völlig normal. In diesem Fall kompensiert also ein anderes Enzym den Ausfall von SU(VAR)3-9. Für die SU(VAR)3-3 Überexpression ist es wahrscheinlich eine andere Modifikation, die den Verlust der H3K4 Dimethylierung kompensieren kann. Kandidaten hierfür wären die ebenfalls in Interbanden zu findenden H3K36 und H3K79 Methylierungen (Ebert et al., 2006). In der Überexpressionslinie ist ebenfalls ein nahezu völliger Verlust der H3K9 Methylierung zu beobachten. Dieser korreliert mit dem starken Suppressor-Effekt dieser Linien im *Stubble*-Rearrangement. Da auch die Trimethylierung ausfällt kann in diesem Fall nicht von einer aktiven Demethylierung durch SU(VAR)3-3 ausgegangen werden. Entweder SU(VAR)3-9 wird durch die ektopische Bindung von SU(VAR)3-3-EGFP im Heterochromatin in seiner

Bindung und Katalyse gestört, oder die ständige Entfernung von H3K9 Dimethyl durch SU(VAR)3-3 verhindert einen weiteren Umsatz zur Trimethyl-Stufe. Auf jeden Fall ist der beobachtete Verlust der H3K9 Methylierung als ektopisch anzusehen, da eine regulierte Überexpression in Form genomischer Extrakopien für *Su(var)3-3* keinen Einfluss auf die H3K9 Methylierung im Chromozentrum hat. Dementsprechend zeigen vier Kopien von *Su(var)3-3* keinen Suppressor-Effekt auf PEV. Auch für LSD1 wurde eine aktive H3K9 Demethylierung im Komplex mit dem Androgen-Rezeptor beschrieben (Metzger et al., 2005). SU(VAR)3-3 ist *in vitro* nicht in der Lage eine Methylierung am Lysin 9 zu entfernen. Die beobachteten Effekte nach Überexpression lassen aber vermuten, dass auch in *Drosophila* ein Faktor existiert, der diese Katalyse ermöglichen kann. Ein möglicher Ort der aktiven H3K9 Demethylierung könnte der *Suppressor of Stelate* Locus auf dem Y-Chromosom sein. *Su(var)3-3* Mutanten Männchen sind rezessiv steril. In ihren primären Spermatozyten konnten Kristalle beobachtet werden (G. Reuter, persönliche Mitteilung). Diese Kristalle entstehen, wenn Komponenten des RNAi „Pathways“ ausfallen oder der *Su(Ste)* Locus auf dem Y-Chromosom nicht aktiv wird (Tritto et al., 2003). Da das Y-Chromosom heterochromatisch und stark H3K9 methyliert ist, könnte SU(VAR)3-3 in diesem speziellen Fall als H3K9 Demethylase fungieren und die Transkription von *Su(Ste)* erst ermöglichen. Dieser Fakt würde auch die beobachtete Sterilität im Männchen sehr gut erklären. In weiterführenden Arbeiten soll die Funktion von SU(VAR)3-3 am *Suppressor of Stelate* Promotor durch Chip Analysen untersucht werden. SU(VAR)3-3 agiert also in *Drosophila melanogaster* als aktive H3K4 Demethylase und kann eventuell in Kombination mit einem noch zu findenden Cofaktor auch eine H3K9 Demethylierung katalysieren.

5 Zusammenfassung

Epigenetische Stabilität beruht auf der Indizierung bestimmter Chromatindomänen durch Modifikation der Nucleosomen und der um sie gewundenen DNA. Die Etablierung dieser Chromatindomänen wird durch die koordinierte Funktion antagonistischer Enzymklassen gesteuert. Dieses Wechselspiel zwischen Kinasen/Phosphatasen, Acetyltransferasen/Deacetylasen ist bereits seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Durch die Charakterisierung von Histon-Methyltransferasen und den antagonistisch wirkenden Histon-Demethylasen wurde eine neue Ebene der Regulation entdeckt. SU(VAR)3-3 ist das *Drosophila* Orthologe der humanen H3K4/H3K9 Demethylase LSD1. Das *Drosophila* Enzym ist nötig, um Heterochromatin korrekt zu etablieren. Mutationen in *Su(var)3-3* sind dominante Suppressoren für heterochromatisches Gensilencing und epistatisch über den Triplo-Enhancereffekt zusätzlicher Kopien von *Su(var)3-9*, *Su(var)3-7* und *Su(var)2-5*. Überexpression von SU(VAR)3-3EGFP führt zu einer fast vollständigen Reduktion der H3K4 Dimethylierung in den Interbanden polytärer Speicheldrüsenchromosomen und zu einer ektopischen Bindung des Fusionsproteins an das Chromozentrum. Dieses geht einher mit einer ebenfalls ektopischen Reduktion der H3K9 Di- und Trimethylierung. SU(VAR)3-3 ist ein abundantes Protein während der Furchungsteilungen und im syncytialen Blastoderm. Während des Kernteilungszyklus 14 bindet das Protein an das spätere Heterochromatin und verhindert dort, wie auch in den Polzellen, aktiv das Auftreten einer euchromatischen H3K4 Methylierung. In den Embryonen heterozygoter Mutanten-Weibchen ist die Menge an SU(VAR)3-3 signifikant reduziert. Dieses führt zu einer Expansion der H3K4 Dimethylierung in heterochromatische Regionen und zu einer Reduktion der H3K9 Di- und Trimethylierung im späteren Heterochromatin und in den Polzellen. Durch Co-Immunopräzipitation konnte eine Wechselwirkung zwischen SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, RPD3 und HP1 in frühen Embryonalstadien von *Drosophila melanogaster* gezeigt werden.

6 Literatur

Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. 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. 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.

Aasland, R., Stewart, A.F. und Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 87-88.

Alfageme, C.R., Rudkin, G.T. und Cohen, L.H. (1980). Isolation, properties and cellular distribution of DL, a chromosomal protein of *Drosophila*. *Chromosoma* *78*, 1-31.

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.

Ballas, N., Battaglioli, E., Atouf, F., Andres, M.E., Chenoweth, J., Anderson, M.E., Burger, C., Moniwa, M., Davie, J.R., Bowers, W.J., et al. (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. und Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature* *436*, 1103-1106.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. und Sauer, F. (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator *Ash1*. *Nature* *419*, 857-862.

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 Lys4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 8695-8700.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* *100*, 243-255.

Boa, S., Coert, C. und Patterton, H.G. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* Set1p is a methyltransferase specific for lysine 4 of Histone H3 and is required for efficient gene expression. *Yeast* 20, 827-835.

Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M. und Peterson, C.L. (2002). Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodelling enzymes. *Mol. Cell* 10, 935-942.

Boyer, L.A., Latek, R.R. und Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique Histone-tail-binding molecule? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 158-164.

Branden, C. und Tooze, J. (1991). Enzymes that bind nucleotides. In *Introduction to protein structure*. Garland Publishing, New York 1st ed., pp, 141-159.

Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F. und Allis, C.D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 15, 3286-3295.

Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H. und Arndt-Jovin, D.J. (1998). The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: Impact on models for silencing. *J. Cell. Biol.* 141, 569-481.

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.

Chen, B., Chu, T., Harms, E., Gergen, J.P. und Strickland, S. (1998). Mapping of *Drosophila* mutations using site-specific male recombination. *Genetics* 149, 157-163.

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.

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.

Czermin, B., Schotta, G., Hülsmann, B.B., Brehm, A., Becker, P.B., Reuter, G. und Imhof, A. (2001). Physical and functional interaction of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 2, 915-919.

-
- Da, G., Lenkart, J., Zhao, K., Shiekhattar, R., Cairns, B.R. und Marmorstein, R. (2006). Structure and function of the SWIRM domain, a conserved protein module found in chromatin regulatory complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *103*, 2057-2062.
- Davies, K. (2001). After the genome: DNA and human disease. *Cell* *104*, 465-467.
- Dehe, P.M., Pamblanco, M., Luciano, P., Lebrun, R., Moinier, D., Sendra, R., et al. (2005). Histone H3 lysine 4 mon-methylation does not require ubiquitination of histone H2B. *J. Mol. Biol.* *353*, 477-484.
- 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.
- Dellino, G. I., Schwartz, Y.B., Farkas G., McCabe D. und Elgin, S.C.R. (2004). Polycomb Silencing Blocks Transcription Initiation. *Mol. Cell*, *13*, 887-893.
- 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.
- 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. (1993). 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.
- 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.
- 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.
- Eggert, H., Gortchakov, A. und Saumweber, H. (2004). Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chromosomal structure. *J. Cell. Sci.* *15*, 4253-4264.
- 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.

Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M. und Pimpinelli, S. (1998). The Heterochromatin Protein 1 Prevents Telomere Fusions in *Drosophila*. *Mol Cell*. 2, 527–538.

Flybase, 2006. The *Drosophila* database. Available from World Wide Web at the URLs <http://morgan.harvard.edu> and <http://www.ebi.ac.uk/flybase/>.

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, 1557-1562.

Foe, V.E., Odell, G.M. und Edgar B.A. (1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: Point and counterpoint. In *The development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A.Martinez-Arias, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) Vol.1, pp. 149-300.

Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E. und Wilm, M. (2003). An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat. Biotechnol*. 21, 89-92.

Fornieris, 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.

Gloor, G. und Engels, W. (1992). Single-Fly DNA Preps for PCR. *D I S*, 71, 148-149.

Gortchakov, A.A., Eggert, H., Gan, M., Mattow, J., Zhimulev, I.F. und Saumweber, H. (2005). Chriz, a chromodomain protein specific for the interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 114, 54-66.

Hakimi, M.A., Bochar, D.A., Chenoweth, J., Lane, W.S., Mandel, G. und Shiekhattar, R. (2002). A core-BRAF 35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7420-7425.

Hakimi, M.A., Dong, Y., Lane, W.S., Speicher, D.W. und Shiekhattar, R. (2003). A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes. *J. Biol. Chem*. 278, 7234-7239.

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.

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.

Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C. und Madhani, H.D. (2003). A conserved RING finger protein required for Histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol. Cell* **11**, 261-266.

Jacobs, S.A. und Khorasanizadeh, S. (2002). Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-Methylated Histone H3 Tail. *Science* **295**, 2080–2083.

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.

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.

Jaquet, Y., Delattre, M., Spierer, A. und Spierer, P. (2002). Functional dissection of the *Drosophila* modifier of variegation *Su(var)3-7*. *Development* **129**, 3975–3982.

Jenuwein, T. und Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.

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.

Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. und Zhang, Y. (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl Histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* **442**, 312-316.

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.

Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 198-209.

Krogan, N.J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A. et al. (2003). The Paf1 complex is required for Histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to Histone methylation. *Mol. Cell* **11**, 721-729.

Kubicek, S. und Jenuwein, T. (2004). A crack in histone lysine methylation. *Cell* **119**, 903-906.

- 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. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 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.
- Le, M.H., Duricka, D. und Karpen, G.H. (1995) Islands of complex DNA are widespread in *Drosophila* centric heterochromatin. *Genetics* 141, 282-303.
- Lee, G.M., Wynder, C., Cooch, N. und Shiekhatar, R. (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437, 432-435.
- Lee, G.M., Wynder, C., Bochar, D.A., Hakimi, M.-A., Cooch, N. und Shiekhatar, R. (2006). Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6395-6402.
- Lima di Faria, A. und Jaworska H. (1968) Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature* 217, 138-142.
- Lohe, A.R., Hilliker, A.J. und Roberts, P.A. (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134, 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.
- Lu, B.Y., Ma, J. und Eissenberg, J.C. (1998) Developmental regulation of heterochromatin-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development* 125, 2223-2234.
- 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.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassel, R., Dubois, D., 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.
- Ng, H.H., Dole, S. und Struhl, K. (2003). The Rtf1 component of the Paf1 transcriptional elongation complex is required for ubiquitination of Histone H2B. *J. Biol. Chem.* 278, 625-633.

- Martinez-Balbas, M.A., Dey, A., Rabindran, K., Ozato, K. und Wu, C. (1995). Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell* 83, 29-38.
- 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 androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437, 436-439.
- Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Laumonier, Y., Xu, H. und Leutz, A. (2005). Histone H3 tail positioning and acetylation by the cMyb but not by the v-Myb DNA-binding SANT domain. *Genes Dev.* 19, 2447-2457.
- 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.
- 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.
- 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, 479-489.
- 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.
- 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.
- 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, 2041-2054.
- 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., et al. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.* 36, 288-92.

-
- 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.
- 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.
- Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens J.H. und Jenuwein, T. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*, 12, 1577–1589
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M. und Mazo, A. (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* 294, 1331-1334.
- Pirrotta, V. (2002). Silence in the germ. *Cell* 110, 661-664.
- Pirrotta, V. (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 249–258.
- 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.
- 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.
- Rescigno, M. und Perham, R.N. (1994). Structure of the NADPH-binding motif of glutathion reductase: Efficiency determined by evolution. *Biocemistry* 33, 5721-5727.
- Reuter, G., Dorn, R. und Hoffmann, H-J. (1982). Butyrate sensitive suppressor of position-effect variegation mutations in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 188, 480-485.
- Reuter, G., Dorn, R., Wustmann, G., Friede, B. und Rauh, G. (1986) Third chromosome suppressor of position-effect variegation loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 202, 481-487.
- 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 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. und Wolff, I. (1981). Isolation of dominant suppressor mutations for positioneffect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 182, 516–519.
- Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R. und Stewart, A.F. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J.* 20, 7137-7148.
- Rossmann, M.G., Moras, D. und Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, 250, 194-199.
- Rothwell, W.F. und Sullivan, W. (2000). Fluorescent analysis of *Drosophila* embryos. In *Drosophila* Protocols, W. Sullivan, M. Ashburner, and R.S. Hawley, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), pp. 141-158.
- Rudolph, T., Lu, B., Westphal, T., Szidonya, J., Eissenberg, J.C. und Reuter, G. (1999). New type of CyO and TM3 green balancers. *D I S*, 82, 99–100.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G., et al. (2004) The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 797-813.
- Saiki, R.K., Gelfand, 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.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. und Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.
- 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, 747-757.
- 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., 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.

- 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.
- Semeshin, V.F., Demakov, S.A., Zhimulev, I.F. (1989). Characteristics of structures of *Drosophila* polytene chromosomes formed by transposable DNA fragments. *Genetica (Russ)* 25, 1968-1978.
- Seydoux, G. und Schedl, T. (2001). The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. *Int. Rev. Cytol.* 203, 139-185.
- 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, 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.
- Sims, R.J., III, Belotserkovskaya, R. und Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and the long of it. *Genes Dev.* 18, 2437-2468.
- 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, 789-794.
- Smith, S.T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E. und Mazo, A. (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin modifying complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 162-167.
- Strahl, B.D. und Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Szabad, J., Reuter, G. und Schröder, M.B. (1988). The effect of two mutations connected with chromatin functions on female germ-line cells of *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 211, 56-62.

- 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.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. und Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* *116*, 51-61.
- Tahirov, T.H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., et al. (2002). Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* *108*, 57-70.
- Tartof, K.D., Hobbs, C. und Jones, M. (1984). A structural basis for variegating position effects. *Cell* *37*, 869-878.
- Tochio, N., Umehara, T., Koshiha, S., Inoue, M., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Watanabe, S., Tomo, Y., Hanada, M., et al. (2006). Solution structure of the SWIRM domain of human Histone Demethylase LSD1. *Structure* *14*, 457-468.
- Tritto, P., Specchia, V., Fanti, L., Spinelli, L., Berloco, M., D'Alessandro, R., Pimpinelli, S., Palumbo, G. und Bozzetti, M.P. (2003). Structure, regulation and evolution of the crystal-Stellate system of *Drosophila*. *Genetica* *117*, 247-257.
- 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*, 3822–3831.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. und Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* *439*, 811-816.
- Wallrath, L.L. und Elgin, S.C.R. (1995) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.*, *9*, 1263-1277.
- 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.
- Whetstine, J.R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G. Colaiacovo, M. und Shi, Y. (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of Histone demethylases. *Cell* *125*, 467-481.
- Wirenga, R.K., De Maeyer, M.C.H. und Hol, W.G.J. (1985). Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* *24*, 1346-1357.

-
- Wustmann, G., Szidonya, J., Taubert, H. und Reuter, G. (1989). The genetics of position-effect 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., et al. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86-90.
- Yang, M., Gocke, C.B., Luo, X., Borek, D., Tomchik, D.R., Machius, M., Otwinowski, Z. und Yu, H. (2006). Structural basis for CoREST-dependent demethylation of nucleosomes by the human LSD1 histone Demethylase. *Molecular Cell* 23, 377-387.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M.G. und Lazar, M.A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the Histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J.* 22, 3403-3410.
- Zhang, Y. und Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343-2368.
- Zhimulev, I.F. (1999). Genetic organization of polytene chromosomes. *Advanc. Genet.* 39, 1-599.

7 Anhang

7.1 Primerliste

AR-Primer 5`-TAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3`
T7-Primer 5`-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3`
pGEM-T forw 5`-GCG AAT TGG GCC CGA CGT CGC ATG CTC -3`
pGEM-T back 5`-GTG AGC GAG GAA GCG GAA GAG CGC CC -3`
CG17149-1 5`-CCA GAA CGG TAT AAA CAA TTT TTA TAT TTT GC -3`
CG17149-2 5`-TGG ATT GCC ATA GAC GCC GGT AAC C -3`
CG17149-3 5`-AAG AAC AGC TAT ATT GCC GAT GTG GG -3`
CG17149-4 5`-GAT GAA TAG GAT AAG CAA ATG CC -3`
CG17149-5 5`-GTG ATG TGA CTT TTG GCA TTT GCT TAT CC -3`
CG17149-6 5`-CAG CGA GCC CCA GTT GTA TGA TAC -3`
KH Seq 1 5`-ATA AAA TCA CGG AAC AAT CAG -3`
KH Seq 2 5`-ACC GCC TCC AAT GAC AAG TCA GG -3`
KH Seq 3 5`-AGG AGG TAG CAT TGG CTT CTG -3`
KH Seq 4 5`-CGG ATA TCT ACG TTT CGG AAG -3`
KH Seq 5 5`-GGA ACT AGG TCC ATA CCG ATC TG -3`
KH Seq 6 5`-CCA TGC CGA GGA AAA GCA GAT G -3`
KH Seq 7 5`-GGC AAA ATG CCA GTC CAA G -3`
KH Seq 8 5`-GAC ACG TGG GCA GCA CGA CGG -3`
KH Seq 9 5`-CGA CTA GAG CGA GCA ACA CCG -3`
KH Seq10 5`-AAC ACC GCC GGA CAT TGG C -3`
M13 forw 5`-GTA AAA CGA CGG CCA G -3`
M13 back 5`-CAG GAA ACA GCT ATG AC -3`
5`P KK forw 5`-ACC CAC TTT AAT GAT TCG CAG -3`
CG17149-RT1 5`-AGC AGA ACC GAC CTA GCG ATG T -3`
CG17149-RT2 5`-AAC AGA AAC ATT TCT CCT CTA CTC GC -3`

rp49 forw 5`-TGT CCT TCC AGC TTC AAG ATG ACC ATC -3`

rp49 reverse 5`-CTT GGG CTT GCG CCA TTT GTG -3`

pEGFP hs back 5`-CTT GTG GCC GTT TAC GTC -3`

*Bgl*III forward 5`-ATA AGA TCT CGG CAA TAT TCC GGT TTG
GTG GAC -3`

*Not*I reverse 5`-ATA GCG GCC GCG CTG TAG CTC CGT AGA
GTC GGC AGT GTT TGA G -3`

7.2 Publikationsliste

Rudolph, T., Lu, B., Westphal, T., Szidonya, J., Eissenberg, J.C. und Reuter, G. (1999). New type of CyO and TM3 green balancers. *D I S*, 82, 99–100.

Schulz, I., Zeitschel, U., Rudolph, T., Ruiz-Carrillo, D., Rahfeld, J.U., Gerhartz, B., Bigl, V., Demuth, H.U. und Roßner, S. (2005). Subcellular localization suggests novel functions for prolyl endopeptidase in protein secretion. *J. Neurochem.* 94, 970-979.

Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schäfer, C., Phalke, S., Walther, M., Jenuwein, T. und Reuter, G. Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol. Cell*, submitted.

Reißmann, J., Rudolph, T., Szabad, J., Küllertz, G., Reuter, G., und Fischer, G. The *Drosophila melanogaster* Cyp20.3 is the first essential Cyclophilin required for cell proliferation, wing disc development and function in female germ-line. In preparation.

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Halle, den 09.11.2006

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Rudolph, Thomas
Anschrift	Gneisenaustraße 11, 06120 Halle
Geburtsdatum	07.04.1973
Geburtsort	Leinefelde
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1980 - 1990	Besuch der Polytechnischen Oberschule „Ernst Thälmann“ in Leinefelde
1990 - 1992	Besuch des Gymnasiums in Leinefelde; Abitur 1992
1992 - 1993	Grundwehrdienst

wissenschaftlicher Werdegang

Okt. 1993 - Sept.1994	Studium der Betriebswirtschaft an der Georg-August-Universität Göttingen
Okt. 1994 - Jan. 2000	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2000	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thema: Identifizierung eines neuen maternalen SET-Domänen-Proteins bei <i>Drosophila melanogaster</i> Betreuer: Prof. Dr. Gunter Reuter
seit Feb. 2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Betreuer: Prof. Dr. Gunter Reuter

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Reuter für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung und Förderung der Arbeit, sowie die fachlichen Diskussionen.

Ich danke Herrn Dr. R. Dorn für viele Anregungen und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der molekularen Arbeiten

Dr. T. Westphal danke ich ebenfalls für seine ständige Diskussionsbereitschaft in genetischen Fragestellungen.

Bei Prof. J. Szidonya möchte ich mich für die schöne Zeit, die ich am Genetischen Institut in Szeged verbringen durfte, bedanken.

Insbesondere möchte ich Kathleen Heidrich, Christiane Schäfer und Matthias Walther für Sequenzdaten, zytologische Analysen und Westernblot-Daten danken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik des Instituts für Genetik der MLU Halle für die harmonische Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Eltern, die mich immerfort unterstützt haben.