

**Differentielle Kontrolle**  
**von Histon-Methylierung und Demethylierung**  
**bei der Etablierung des heterochromatischen**  
***Gensilencings in *Drosophila melanogaster****

**Dissertation**

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

vorgelegt dem

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

von Sandro Lein  
geb. am 14.01.1977 in Leipzig

Gutachter:      1. Prof. Dr. Gunter Reuter  
                     2. Prof. Dr. Axel Imhof  
                     3. Prof. Dr. Klaus Humbeck

Halle (Saale), den 16.03.2011

## Abkürzungsverzeichnis

ac	Acetylierung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EMS	Ethylmethansulfonat
<i>E(var)</i>	Enhancer of Variegation
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
HDAC	Histondeacetylase
H3K4	Lysin 4 von Histon H3
H3K9	Lysin 9 von Histon H3
H3K27	Lysin 27 von Histon H3
H4K20	Lysin 20 von Histon H4
KMTase	Histonmethyltransferase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	$\beta$ -Galactosidase
LSM	<i>Laser Scanning Mikroskopie</i>
me	Methylierung
NP40	Nonident P40
p	Phosphorylierung
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	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
SET	<i>Su(var)3-9</i> / Enhancer of zeste / Trithorax
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Su(var)</i>	Suppressor of Variegation
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	8
<b>2.1</b>	<b>Genetische Methoden</b> .....	8
2.1.1	Anzucht der Fliegen.....	8
2.1.2	Analyse der <i>Su(var)3-9<sup>pm</sup></i> -Mutanten.....	8
2.1.3	Generierung von transheterozygoten <i>Su(var)3-3</i> -Nullmutanten .....	8
2.1.4	Analyse der Suppressoreffekte von <i>tai-</i> , <i>EcR-</i> , <i>woc-</i> und <i>dib</i> -Mutanten ..	9
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	9
2.2.1	Verwendete Plasmide und Bakterienstämme .....	9
2.2.3	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	10
<b>2.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	12
2.3.1	Gelelektrophorese von Proteinen.....	12
2.3.2	Nachweis von Proteinen im Westernblot.....	12
2.3.3	Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen .....	13
2.3.4	Methyltransferase-Assay für SU(VAR)3-9 und G9a.....	13
2.3.5	Demethylase-Methyltransferase-Assay für SU(VAR)3-3 und SU(VAR)3-9.....	14
2.3.6	Herstellung von polyklonalen Antikörpern .....	14
<b>2.4</b>	<b>Immunzytologische Methoden</b> .....	14
2.4.1	Immunmarkierung von polytären Speicheldrüsenchromosomen.....	14
2.4.2	Immunmarkierung von Embryonen.....	15
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	17
<b>3.1</b>	<b>Molekulare Analyse der Methyltransferase SU(VAR)3-9</b> .....	17
3.1.1	SU(VAR)3-9 ist eine Methyltransferase für Histon H3 Lysin 9 .....	17
3.1.2	SU(VAR)3-9 ist für die Ausbreitung der H3K9-Dimethylierung verantwortlich .....	20
3.1.3	<i>pitkin<sup>D</sup></i> ist ein hypermorphes <i>Su(var)3-9</i> Allel.....	23
3.1.4	Protein-Ligand-Wechselwirkung von SU(VAR)3-9 mit AdoMet und AdoHcy .....	30
3.1.5	Die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 kann durch Homocystein- Hydrolasen beeinflusst werden.....	35

3.1.6	Generierung von hyperaktiven SU(VAR)3-9-Mutantenproteinen .....	38
<b>3.2</b>	<b>dG9a ist keine spezifische H3K9-Methyltransferase</b> .....	41
3.2.1	Generierung eines rekombinanten, funktionalen dG9aSET-Proteins.....	42
3.2.2	dG9a zeigt keine spezifische H3K4- und H3K9-Methyltransferase- aktivität .....	44
<b>3.3</b>	<b>Die H3K4-Demethylase SU(VAR)3-3 kontrolliert die Ausbreitung von Heterochromatin</b> .....	47
3.3.1	<i>Su(var)3-3</i> -Mutanten kompensieren die massive Heterochromatisie- rung in <i>Su(var)3-9<sup>pm</sup></i> .....	47
3.3.2	H3K4-Methylierung behindert die H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 .....	49
3.3.3	Die Demethylierung von Histon H3 Lysin 4 durch SU(VAR)3-3 ermöglicht die SU(VAR)3-9 vermittelte H3K9-Methylierung .....	50
3.3.4	In <i>Su(var)3-3</i> -Mutanten ist die Ausbreitung von H3K9me2 reduziert....	51
<b>3.4</b>	<b>TAMAN ist in die Kontrolle der Chromatindifferenzierung involviert..</b>	55
3.4.1	<i>taiman</i> ist ein dominanter Suppressor für PEV und beeinflusst die Ausbreitung von H3K9me2 .....	55
3.4.2	Generierung eines polyklonalen TAIMAN-spezifischen Antikörpers ...	59
3.4.3	TAIMAN ist ein Interbandenprotein in polytären Speicheldrüsen- chromosomen.....	60
3.4.4	<i>taiman</i> -Mutanten führen zu einer Veränderung der H3K9- und H3K27-Methylierung.....	61
3.4.5	<i>taiman</i> -Mutanten führen zu einer Veränderung der H3K4- Methylierung und H3K9-Acetylierung.....	65
3.4.6	<i>taiman</i> -Mutanten zeigen eine erhöhte Menge LID und RPD3 im Chromatin .....	67
3.4.7	Mutanten für <i>EcR</i> , <i>dib</i> und <i>woc</i> sind dominante Suppressoren für PEV	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	73
<b>4.1</b>	Heterochromatisches <i>Gensilencing</i> wird durch die SU(VAR)3-9-abhängige H3K9-Methylierung kontrolliert.....	73
<b>4.2</b>	dG9a ist keine spezifische H3K9-Methyltransferase.....	76
<b>4.3</b>	SU(VAR)3-3 ist eine H3K4 spezifische Demethylase und essentiell für die Etablierung von Heterochromatin.....	79
<b>4.4</b>	H3K4-Trimethylierung und die Kontrolle der H3K9-Acetylierung.....	80

4.5	Eine sequenzielle molekulare Reaktionsfolge führt zur Bildung von Heterochromatin .....	82
4.6	Die Chromatindifferenzierung wird durch Hormonsignale initiiert .....	84
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	93
6	<b>Literatur</b> .....	94

# 1 Einleitung

Die Zellen eines eukaryotischen Organismus enthalten überwiegend die gleichen genetischen Informationen, welche in Form der DNA gespeichert und an die nächste Generation weitergegeben werden. Trotzdem existiert eine Vielzahl von Zelltypen, die sich in Form und Funktion voneinander unterscheiden und die Komplexität eines Organismus ermöglichen. Dabei sind die spezifischen Expressionsmuster der Gene, welche an die nächste Zellgeneration weitergegeben werden können, von entscheidender Bedeutung. Die Epigenetik beschreibt die Mechanismen, welche die stabile Weitergabe der Expressionsmuster der Gene ermöglichen und verknüpft damit Vererbung, Entwicklung und Evolution (Waddington, 1942; Holliday, 1994). Das Chromatin, bestehend aus DNA, RNAs und Proteinen, eröffnet die Möglichkeit der Kontrolle der Genexpression. Zytologisch differenzierbar sind zwei Arten des Chromatins. Der Botaniker Emil Heitz verfolgte in Mooszellen mikroskopisch den Übergang von Mitose- zu Interphasechromosomen und beschrieb 1928 erstmals Heterochromatin (Heitz, 1928). Heitz beobachtete, dass sich die Chromosomen der Mooszellen in der Telophase nicht vollständig dekondensieren und sich die hochkondensierten Metaphasechromosomen nicht vollständig zu lockeren Interphasechromosomen entfalten (Heitz, 1928).

Euchromatische Bereiche bilden offene, transkriptionsaktive Strukturen und enthalten die Mehrheit der Gene. Konstitutive heterochromatische Bereiche bleiben während des Zellzyklus kondensiert, enthalten nur wenige Transkriptionseinheiten und bestehen größtenteils aus hoch- und mittelrepetitiven DNA-Sequenzen (Lima di Faria und Jaworska, 1968; Gatti und Pimpinelli, 1992; Lohe et al., 1993; Laurent et al., 1997). Heterochromatin ist besonders auf Zentromer- bzw. Telomerregionen konzentriert (Blackburn, 1994; Pardue, 1994). Es spielt bei der Kernorganisation, Chromosomensegregation, *Crossing-over*, Schutz gegenüber mobilen Elementen sowie *Gensilencing* eine Rolle (Henikoff und Matzke, 1997; Westphal und Reuter, 2002; Cremer et al., 2004).

Das Nucleosom stellt die kleinste Verpackungseinheit des Chromatins dar (Kornberg, 1974). Es setzt sich aus jeweils zwei der stark positiv geladenen Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 zusammen, um welche die negativ geladene DNA auf einer Länge von ca. 146 Basenpaaren gewunden ist (Luger et al., 1997). Die N-terminalen Enden der Histone ragen aus dem Nucleosom heraus und spielen bei der Etablierung und

Aufrechterhaltung von Chromatinstrukturen eine wesentliche Rolle. Bereits 1964 wurden acetylierte und methylierte Histone mit der Regulation der RNA-Synthese in Verbindung gebracht (Allfrey et al., 1964). Durch kovalente, posttranslationale Histonmodifizierungen, wie Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung, kann der Chromatinstatus definiert und kontrolliert werden (van Holde, 1988; Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis 2001). Histonmodifizierungen bilden die molekulare Grundlage für epigenetische Programmierung und werden von histonmodifizierenden Enzymen vermittelt. Verschiedene Modifizierungen und Modifizierungsmuster bilden dabei einen Histon-Code, der die Wechselwirkung zwischen DNA und Histonen bestimmt und Bindungsstellen für andere Proteine bildet mit entsprechenden Konsequenzen für Chromatinstruktur und Genexpression (Strahl und Allis, 2000). Die Verteilung von Histonmodifizierungen wurde in vielen verschiedenen Organismen untersucht. In Säugern und *Drosophila* wurden heterochromatische Histonmodifizierungen zuerst analysiert (Rea et al., 2000; Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002). Konstitutives Heterochromatin in Säugern ist durch H3K9-Trimethylierung (H3K9me3), H3K27-Monomethylierung (H3K27me1) und H4K20me3 gekennzeichnet (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003; Schotta et al., 2004). In *Drosophila* ist Heterochromatin durch alle Methylierungsstufen von H3K9, H3K27 und H4K20 markiert (Schotta et al., 2002 und 2004; Ebert et al., 2004). Im Gegensatz zu Säugern ist H3K9me3 in *Drosophila* eine unterrepräsentierte heterochromatische Modifizierung. Alle Methylierungsstufen von H3K4 und H3K36, Histonacetylierung und Histonphosphorylierung kennzeichnen aktives Chromatin (Wang et al., 2001; Zhang und Reinberg, 2001; Santos-Rosa et al., 2002; Ebert et al., 2004).

Neben histonmodifizierenden Enzymen sind DNA-Methyltransferasen, Chromatin-*Remodeling*-Faktoren, Transkriptionsfaktoren und RNAi-Komponenten für die Etablierung, Aufrechterhaltung und Weitergabe von Chromatinstrukturen nötig.

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Modellobjekt eignet sich besonders, um Chromatinstrukturen zu untersuchen. Das Chromozentrum und die perizentrischen Bereiche der Autosomen, das Y-Chromosom und große Teile des 4. Chromosoms sind heterochromatisch. Die Zentromerregion besteht aus hochrepetitiver Satelliten-DNA, die von großen *Arrays* mobiler Elemente flankiert wird (Pimpinelli et al., 1995). Das Y-Chromosom besteht vorwiegend aus mobilen Elementen und enthält nur wenige essentielle Gene (Zhang und Spradling, 1994).

Die Positionseffekt-Variegation (PEV) eignet sich besonders, um neue Kenntnisse über epigenetische Regulationsmechanismen von Chromatinzuständen zu gewinnen. PEV wurde zuerst in *Drosophila* beschrieben (Muller, 1930). Dabei wurde das *white*-Gen, das für die Ausprägung der roten Augenpigmentierung nötig ist, durch eine Inversion in die Nähe des zentromerischen Heterochromatins verlagert (Schultz, 1936). Durch die Nähe und Ausbreitung des Heterochromatins kommt es in Folge einer teilweisen Inaktivierung des *white*-Gens zu einer rot-weißen mosaikartigen Augenpigmentierung, dem *white-mottled*-Phänotyp (Muller, 1930; Tartof et al., 1984). Dieses Heterochromatin-induzierte *Gensilencing* stellt ein genetisches Modellsystem dar, um durch Mutagenese Modifikatoren zu identifizieren, die in epigenetische Prozesse involviert sind (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1983; Wustmann et al., 1989). Mutationen für *Su(var)*-Gene (Suppressor of Variegation) supprimieren PEV, während Mutationen für *E(var)*-Gene (Enhancer of Variegation) PEV verstärken (Wustmann et al. 1989). *Su(var)s* sind Gene, die direkt oder indirekt an der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung heterochromatischer Chromatinzustände beteiligt sind (Locke et al., 1988). Im Gegensatz dazu sind *E(var)s* Gene, welche die Ausbildung euchromatischer Chromatinstrukturen begünstigen und heterochromatischem *Gensilencing* entgegenwirken. Eine Vielzahl von Mutanten konnten auf diese Weise isoliert werden, die etwa 150 Gene repräsentieren (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1989).

Bisher identifizierte *E(var)s* kodieren für Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren oder Chromatin-*Remodeling*-Faktoren wie z.B. *mod(mdg4)*, *E2f*, *Trithorax-like* oder *brahma* (Tamkun et al., 1992; Dorn et al., 1993b; Farkas et al., 1994; Seum et al., 1996).

Einen besonders interessanten Enhancer für PEV stellt das *lid*-Gen dar. *Lid* zeigt bei Verringerung der Gendosis einen Haplo-Enhancereffekte und bei Erhöhung der Gendosis einen Triplo-Suppressoreffekt. LID gehört zur Gruppe der JUMONJI-Proteine, welche nach der Jmj-Domäne des *jmj*-Gens benannt wurden (Takeuchi et al., 1995). Die Jmj-Domäne ist bisher in über 100 Proteinen von Bakterien bis zum Menschen nachgewiesen. Zusätzlich zur JmjC-Domäne existiert in einer Gruppe von Proteinen die JmjN-Domäne. Die JmjN-Domäne ist in ihrer Sequenzstruktur zur JmjC-Domäne homolog und vermittelt vermutlich die Demethylierung verschiedener Methylierungszustände (Secombe et al., 2007). Sind beide Domänen in einem Protein vorhanden werden bevorzugt di- und trimethylierte Lysine demethyliert. Ist nur die JmjC-Domäne ohne JmjN-Domäne präsent, werden vorrangig mono- und dimethylierte Lysine demethyliert (Klose et al., 2006; Whetstone et al., 2006). Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass die evolutionär konservierte Histondemethylase LID durch

Demethylierung von H3K4me3 entscheidenden Einfluss am Aufbau und der Etablierung euchromatischer Strukturen inne hat (Eissenberg et al., 2007; Baisch, 2010).

Bisher identifizierte Suppressoren für PEV kodieren Chromatinproteine mit vielfältigen Funktionen. Dazu zählen z.B. Chromatin-*Remodeling*- und Assemblierungsfaktoren wie Domino und Acf1 (Ruhf et al., 2001; Fyodorov et al., 2004), RNA/DNA-bindende Proteine (z.B. Modulo; Perrin et al., 1998) oder Komponenten der DNA-Replikation (z.B. PCNA; Henderson et al., 1994; ORC2; Pak et al., 1997; HOAP; Badugu et al., 2003). *Su(var)3-3* wurde als einer der stärksten Suppressoren für PEV isoliert. Insgesamt konnten für dieses Gen 25 Allele identifiziert werden (Rudolph et al., 2007). Alle Allele zeigen eine keimbahnabhängige rezessive männliche und weibliche Sterilität (Szabad et al., 1988). Außerdem reagieren *Su(var)3-3* Allele sensitiv auf den Histon-Deacetylase-Inhibitor Natriumbutyrat (Reuter et al., 1982). Das SU(VAR)3-3-Protein besitzt eine N-terminale SWIRM Domäne und eine C-terminale Aminoxidase-Domäne. Die SWIRM-Domäne wurde nach den drei Proteinen Swi3p, Rsc8p und Moira benannt und kann Chromatin bzw. den N-Terminus von Histon H3 binden (Tochio et al., 2006). Die Aminoxidase-Domäne stellt die katalytisch aktive Region des Proteins dar. Sie bindet den für die Katalyse notwendigen Kofaktor FAD. LSD1 repräsentiert das humane Homologe zu SU(VAR)3-3 aus *Drosophila* (Rudolph et al., 2007). Die Aminoxidase-Domäne von LSD1 katalysiert die Demethylierung von mono- und dimethyliertem H3K4/H3K9 zu unmethyliertem Histon H3 (Shi et al., 2004; Metzger et al., 2005). Die Entfernung einer Trimethylierung ist auf Grund der katalysierten Reaktion nicht möglich. Das rekombinante Protein ist nur in der Lage, Peptide und freie Histone zu demethylieren. Die SWIRM-Domäne ist für die Katalyse nicht zwingend notwendig, da auch N-terminal verkürzte Varianten die volle katalytische Aktivität zeigen (Forneris et al., 2005).

Besonders interessante Suppressoren für PEV sind die Gene *Su(var)3-7*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-9*. Sie zeigen bei Verringerung der Gendosis Haplo-Suppressoreffekte und bei Erhöhung der Gendosis Triplo-Enhancereffekte (Wustmann et al., 1989). *Su(var)3-7* kodiert für ein Protein mit 7 Zinkfinger-Motiven und wurde als erstes Suppressorgen für PEV kloniert (Reuter et al., 1990). Die Zinkfingerbereiche stellen DNA-Bindedomänen dar, welche *in vitro* eine hohe Affinität gegenüber bestimmten Satelliten-Sequenzen aufweist (Cleard und Spierer, 2001). Durch Co-Immunopräzipitation und mittels Hefe-Dihybrid-Analysen konnte eine Interaktion von SU(VAR)3-7 mit HP1 und

SU(VAR)3-9 nachgewiesen werden (Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000; Schotta et al., 2002).

Das BESS-Motiv Im C-Terminus von SU(VAR)3-7 ist für die Dimerisierung des Proteins von Bedeutung (Altschul et al., 1997). Der C-terminale Bereich nach den Zinkfinger-Motiven dient der Interaktion mit anderen Proteinen und ist für eine spezifische Erkennung und Bindung des Proteins an das perizentrische Heterochromatin erforderlich (Jaquet et al., 2002).

*Su(var)2-5* kodiert das Protein HP1, das als erstes Heterochromatinprotein biochemisch aus *Drosophila* isoliert wurde (James und Elgin, 1986). Homologe Proteine konnten in zahlreichen Organismen von Hefen (*Schizosaccharomyces pombe*, Swi6p) bis zum Menschen identifiziert werden (Singh et al., 1991). Die HP1-Familie besteht aus drei Proteinen, HP1a, HP1b und HP1c in *Drosophila* (Smothers und Henikoff, 2001). HP1 besitzt zwei konservierte Domänen. Die Chromo-Domäne befindet sich im N-Terminus des Proteins (chromatin organization modifier, Paro und Hogness, 1991). Sie ist über eine Linker-Region mit der C-terminal gelegenen Chromo-Shadow-Domäne verbunden (Aasland und Stewart, 1995). Die Struktur der Chromo-Domäne wurde bereits aufgeklärt (Ball et al., 1997). Sie ermöglicht eine Dimerisierung und bindet mit hoher Affinität di- und trimethyliertes H3K9 (Lachner et al., 2001; Bannister et al., 2001). Die Chromo-Shadow-Domäne ist eine Homodimerisierungsdomäne, welche eine Oberfläche für Interaktionen mit anderen Proteinen darstellt. Die große Anzahl der identifizierten Interaktionspartner zeigt, dass HP1 in viele verschiedene *Silencing*-Prozesse involviert ist und eine Funktion als flexibles Linker-Modul im Heterochromatin ausübt (Eissenberg und Elgin, 2000). Immunzytologische Analysen von polytären Speicheldrüsenchromosomen in *Drosophila melanogaster* zeigen, dass HP1 vorwiegend im zentromerischen Heterochromatin, am vierten Chromosom, an Telomeren und einigen Stellen im Euchromatin lokalisiert ist (James et al., 1989; Fanti et al., 1998).

Einer der stärksten Suppressoren für PEV ist *Su(var)3-9* (Tschiersch et al., 1994). *Su(var)3-9*-Mutanten sind homozygot lebensfähig, zeigen aber eine stark reduzierte Fertilität. SU(VAR)3-9 ist von der Hefe bis zum Menschen evolutionär konserviert und besitzt neben der Chromo-Domäne die hoch konservierte SET-Domäne (SU(VAR)3-9, E(Z), TRITHORAX; Tschiersch et al., 1994). Sie wird von der cysteinreichen preSET- und postSET-Domäne eingeschlossen. Die genomische Organisation von *Su(var)3-9* in *Drosophila melanogaster* unterscheidet sich von anderen Organismen. In *Drosophila* liegt *Su(var)3-9* in Form einer bicistronischen Transkriptionseinheit mit dem

eukaryotischen Translationsfaktor eIF-2 vor. Durch alternatives Spleißen werden zwei unabhängige Transkripte generiert, wobei SU(VAR)3-9 die ersten beiden Exonen von eIF-2 erhält (Krauss und Reuter, 2000).

Im Hefe-Dihibrid-System konnte eine Interaktion von HP1 bzw. SU(VAR)3-7 über den N-Terminus mit SU(VAR)3-9 nachgewiesen werden (Schotta et al., 2002). Während der N-Terminus Initiationsstellen für die Etablierung von Heterochromatin erkennt, ist die Chromo-Domäne vermutlich an der Ausbreitung von SU(VAR)3-9 über das Heterochromatin beteiligt (Schotta et al., 2002). Die SET-Domäne als wichtigstes Modul von SU(VAR)3-9 bewirkt die Methylierung von Lysin 9 im Histon H3 (Schotta et al., 2002). Die Funktion als spezifische H3K9-Methyltransferase wurde zuerst bei dem Maus-Homologen SUV39H1 nachgewiesen (Rea et al., 2000). Die hohe Konservierung von SU(VAR)3-9 wird besonders deutlich, da das menschliche SUV39H1 in der Lage ist, in *Drosophila* die Funktion von SU(VAR)3-9 zu übernehmen und bei korrekter Expression den Mutantenphänotyp zu retten (Schotta et al., 2002). Die H3K9-Methyltransferaseaktivität der SET-Domäne stellt eine wesentliche Komponente für die Etablierung von *Gensilencing* dar, da die Methylierung von H3K9 eine Markierung bzw. Bindestelle für andere Proteine wie HP1 darstellt und essentiell für den Aufbau von Heterochromatin ist (Lachner et al., 2002). *Su(var)3-9* spielt somit eine bedeutende Rolle bei der Steuerung epigenetischer *Silencing*-Prozesse. Die Untersuchung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieses Gens ist deshalb von großer Bedeutung.

Durch die Analyse von *Su(var)*- und *E(var)*-Genen in *Drosophila* können molekulare Kontrollprozesse für höhergeordnete Chromatinstrukturen weiter entschlüsselt werden. Mit Hilfe der DrosDel *P*-Elementkollektion wurde ein *Screening* nach dominanten Suppressoren für PEV im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Hintergrund durchgeführt (Apelt, 2005). *Taiman* wurde in diesem *Screening* als dominanter Suppressor für PEV identifiziert (Apelt, 2005). TAIMAN ist ein Koaktivatorprotein für den EcR/USP Ecdyson-Rezeptorkomplex und homolog zu Steroidhormonrezeptor-Koaktivatoren der p160-Familie. Das TAI-Protein beinhaltet eine Helix-Loop-Helix-Domäne, zwei PAS-Domänen und LXXLL-Motive, welche für die Bindung an den Rezeptor nötig sind (McInemey et al., 1998). Der Ecdysonrezeptor aus *Drosophila* ist ein Dimer aus EcR und USP (Yao et al., 1992; Yao et al., 1993). In polytären Chromosomen und in *Border*-Zellen kolokalisiert TAI mit USP (Bai et al., 2000). In EcR-293 Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass TAI die Ecdyson-induzierte Transkription verstärkt (Bai et al., 2000). Die Transkriptionsaktivität war bis zu 5mal höher in Zellen, die

vorübergehend TAI exprimierten. Die Tatsache das *taiman* ein dominanter Suppressor für PEV ist, weist darauf hin, dass die epigenetische Differenzierung von somatischen und Keimbahnzellen während der frühen Embryonalentwicklung durch hormonelle Signale induziert wird. Die Entdeckung einer grundlegenden Funktion von TAIMAN bei epigenetischen Prozessen erlaubt die Identifizierung und funktionelle Analyse von Signalprozessen, welche die Chromatindifferenzierung in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* initiieren und steuern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfassende Funktions-Analysen von der Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9, der Histondemethylase SU(VAR)3-3, dem LSD1 Homologen aus *Drosophila* und dem Koaktivator TAIMAN durchgeführt.

## 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 (2% Agar, 10% Zucker, 0,1% Essigsäure und 2,25% Nipagin) verwendet.

#### 2.1.2 Analysen der *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>*-Mutanten

Transheterozygote *In(1)w<sup>m4h</sup>; +/Sco; Su(var)3-9<sup>Mut</sup>/Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* Fliegen wurden aus der Kreuzung *In(1)w<sup>m4h</sup>/In(1)w<sup>m4h</sup>; +/+; Su(var)3-9<sup>Mut</sup>/TM6* oder *In(1)w<sup>m4h</sup>/In(1)w<sup>m4h</sup>; +/+; Su(var)3-9<sup>Mut</sup>/TM3* × *In(1)w<sup>m4h</sup>/Y; Sco/T(2;3)ap<sup>Xa</sup>+In(2)Cy, CySu(var)3-9<sup>s</sup>/Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* generiert und bezüglich ihres Augenphänotyps untersucht. Transheterozygote *In(1)w<sup>m4h</sup>; P{c3-9<sup>ptn</sup>-EGFP}/+; Su(var)3-9<sup>Mut</sup>/Su(var)3-9<sup>17</sup>* Tiere wurden durch die Kreuzung *In(1)w<sup>m4h</sup>/In(1)w<sup>m4h</sup>; P{c3-9<sup>ptn</sup>-EGFP}/SM6; Su(var)3-9<sup>17</sup>/TM3* × *In(1)w<sup>m4h</sup>/Y; +/+; Su(var)3-9<sup>Mut</sup>/TM6* oder *In(1)w<sup>m4h</sup>/Y; +/+; Su(var)3-9<sup>Mut</sup>/TM3* generiert und bezüglich ihres Augenphänotyps untersucht.

#### 2.1.3 Generierung von transheterozygoten *Su(var)3-3*-Nullmutanten

Zur Analyse von *Su(var)3-3*-Nullmutanten im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Hintergrund wurden transheterozygote Fliegen generiert. Zuerst wurden Weibchen des Stammes *In(1)w<sup>m4h</sup>; PrDr/TM3* mit der Defizienz *Df(3L)XS572/TM3* (Ito und Rubin, 1999; Müller, 2004) gekreuzt. Dann wurden Weibchen des Stammes *In(1)w<sup>m4h</sup>; PrDr/TM3* mit F1-Männchen *In(1)w<sup>m4h</sup>/Y; Df(3L)XS572/TM3* gekreuzt. Der Stamm *In(1)w<sup>m4h</sup>; Df(3L)XS572/TM3* wurde durch die Kreuzung

$In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h};Df(3L)XS572/TM3$  x  $In(1)w^{m4h}/Y;Df(3L)XS572/TM3$  generiert. Transheterozygote Nullmutanten  $In(1)w^{m4h};Su(var)3-3^{09}/Df(3L)XS572$  wurden durch die Kreuzung  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h};Su(var)3-3^{09}/TM3$  x  $In(1)w^{m4h}/Y;Df(3L)XS572/TM3$  generiert.

#### 2.1.4 Analyse der Suppressoreffekte von *tai*- *EcR*-, *woc*- und *dib*-Mutanten

Die F1-Generationen aus der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};Df(2L)tai2/CyRoi$  x  $w^{m4h}/Y;+/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$  x  $w^{m4h}/Y;Df(2L)tai2/CyRoi$ , der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};EcR^{M554fs}/CyRoi$  x  $w^{m4h}/Y;+/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$  x  $w^{m4h}/Y;EcR^{M554fs}/CyRoi$ , der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};woc^{EY23360}/TM3$  x  $w^{m4h}/Y;+/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$  x  $w^{m4h}/Y;woc^{EY23360}/TM3$ , der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};dib^{e01927}/TM3$  x  $w^{m4h}/Y;+/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$  x  $w^{m4h}/Y;dib^{e01927}/TM3$  wurden bezüglich ihres Augenphänotyps untersucht.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5- $\alpha$  (Gibco/BRL 1987) verwendet. Zur Überexpression von Proteinen wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLys (Invitrogen) genutzt. Für Klonierungen wurden die Vektoren pGEM-T (Promega) und pZero-blunt (Invitrogen) verwendet. Zur Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden die Vektoren pGEX-6P-1, pGEX-6P-2 und pGEX-6P3 genutzt (Amersham Biosciences).

### 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 NucleoSpin-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. (Stratagene) nach Standardprotokoll (Seiki, 1990).

### 2.2.3 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

200 adulte Köpfe oder 300 mg Embryonen wurden mit 1,8% Formaldehyd in *X-link*-Puffer (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 100 mM NaCl) für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 125 mM Glycin wurde das *Crosslinking* gestoppt. Das fixierte Material wurde danach mit ChIP-wash-Puffer A (10 mM HEPES, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25% Triton X-100) und ChIP-wash-Puffer B (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.01% Triton X-100) bei 4 °C für 10 min gewaschen. Der Ultraschall erfolgte in 5 ml TEN140 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl) bei 4 °C 10 mal 30 sec. Nach Zugabe von 50 µl 10% SDS, 500 µl 1% DOC und 500 µl 10% Triton erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C. Danach wurde das Gesamtchromatin auf die entsprechende Anzahl der Antikörper verteilt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der DNA-Proteinkomplex wurde dann an 40µl Protein G Sepharose (Amersham Biosciences) in RIPA-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% DOC) gebunden. Nach 3 h wurden die Protein G Sepharose 5 mal mit RIPA-Puffer, einmal mit LiCl-Puffer (250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 0.5% DOC) und zweimal mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) gewaschen, dann in 100 µl TE-Puffer aufgenommen, für 30 min mit RNase A (50 µg/ml, Marligen Biosciences) und über Nacht mit Proteinase K (50 µg/ml, Fermentas) bei 37°C inkubiert. Die Aufhebung des *Crosslinks* wurde bei 65°C für 6h durchgeführt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Phenol-Chloroform

oder dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel). Die Analyse der DNA wurde mit *Real-Time-PCR* nach Dellino et al. (2004) durchgeführt.

**Tabelle 2.1:** Verwendete Primer.

Primer	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
<i>359bp sat</i>	ATAGGGATCGTTAGCACTGG	ATTTTATTACGAGCTCAGTGAG
<i>R1_front</i>	CGCGAATTAACAAGCGG	TCCTCCTTTGACGAGTCC
<i>R1_n.b.</i>	CGAATGCTTGCCCGATATAC	GCACATCCATTTTCATCCCC
<i>R1_end</i>	GGCCCATTTATCTGGGACATAC	ACCGACAGCTACGCACATAC
<i>n.b.</i>	TGCTTTGCATTGCGATTTTC	CTTTCCTTTTGGCTTTTCCAC
<i>white</i>	CAATCACCACCCCAATCACTC	TCCGCTATCTCTTTGCGCAC
<i>CG12498</i>	TGTCTCTAACCTGAACTTCACC	TGATGCCGATTTTCTGCTG
<i>CG14416</i>	TCCTTCACAACCTATTGCGAC	ACTTCTTCATAAAATCCCGACC
<i>CG3588</i>	GCAACGGAATACGGATTTTCAG	GCCAGCACACAATTAATCCAAC
<i>rst</i>	GCACCAGCACAAATCTCAC	AAAGCATTGATCCGAGCC
<i>β-tub</i>	AGCAAATTACTTGCAGAATTGG	GATTAGTGCGATTAGGACTTG
<i>G9A_pGEX</i>	ATAGTCGACGACAATGACAACAATACGGTGC	ATAGCGGCCGCGCGTGTCCAATTTTCTCCGTA
<i>TAI_pGEX</i>	GGATCCGACAACCTGCTCGATCCATCCGG	GCGGCCGCTCAGCCCCTCCGCTGGAATTGGAGC
<i>3' P-1</i>	ATACTATTCTTTCACTCGCAC	TGTCGTATTGAGTCTGAGTGAG
<i>3' P-2</i>	GCATACGTTAAGTGGATGTCTC	TGATTAACCCTTAGCATGTCCG
<i>5' P-1</i>	ACCCACTTTAATGATTGCGAG	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG
<i>5' P-2</i>	ACCAGTGGGAGTACACAACAG	CACACAACCTTCTCTCAAC

## **2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.3.1 Gelelektrophorese von Proteinen**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 5% und im Trenngel 7%-10%. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1% SDS) bei 20 mA für ein Minigel (10 x 15 cm) durchgeführt. Zur Kennzeichnung des Molekulargewichts wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (MBI Fermentas) eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 min in Coomassielösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% Methanol, 40% H<sub>2</sub>O, 10% Essigsäure) inkubiert und anschließend in Aqua bidest entfärbt.

### **2.3.2 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/cm<sup>2</sup> 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 Biosciences) nach Angaben des Herstellers.

### 2.3.3 Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen

Die Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 und entsprechende Mutantenproteine wurde als GST-Fusionsproteine (AS 218-635) in pGEX-6P-1 im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLys exprimiert. Das TAIMAN-Antigen (AS 342-555) wurde als GST-Fusionsprotein in pGEX-6P-2 exprimiert. Die Induktion und Expression erfolgten mit 0.1 mM IPTG über Nacht bei 18 °C. Die Aufreinigung wurde mit Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) nach der Batch Purification-Methode nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Abspaltung des GST-Tags erfolgte über Nacht bei 4 °C mit PreScission™ Protease. Die rekombinanten Proteine wurden mit Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheiten (Millipore) aufkonzentriert. Die Aufbereitung von SU(VAR)3-9 und den Mutantenproteinen SU(VAR)3-9<sup>32</sup>, SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> und für STD-NMR-Analysen erfolgte in Deuteriumoxid (99,85%, Merck) mit Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheiten nach Herstellerangaben.

### 2.3.4 Methyltransferase-Assay für SU(VAR)3-9 und G9a

Für die Methyltransferase-Reaktion wurden 1 µg des überexprimierten Proteins mit 1 µg Histon H3-Peptid (AS 1-20, Upstate Biotech) und 0.5 µl SAM (Amersham Biosciences, 1 µCi/µl) gemischt und mit HIM-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.5 mM DTT, Czermin et al., 2001) zu einem Reaktionsvolumen von 25 µl aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde zu bestimmten Zeitpunkten abgestoppt, auf P81 Filterpapier (Whatman) aufgetragen und dreimal für 30 min in 50 mM Natriumkarbonatlösung pH 9.2 gewaschen. Das Filterpapier wurde nach Lufttrocknung in ein Szintillationsfläschchen überführt und mit 5 ml Szintillations-Cocktail überschichtet. Die Bestimmung der am Papier verbleibenden Menge des radioaktiv markierten Peptids erfolgte nach Inkubation im Szintillations-Cocktail (Roth) mit einem Szintillationszähler (Beckmann).

### **2.3.5 Demethylase-Methyltransferase-Assay für SU(VAR)3-3 und SU(VAR)3-9**

3 µg rekombinantes SU(VAR)3-3 und jeweils 1 µg unmodifiziertes, K4 mono-methyliertes bzw. K4 di-methyliertes Histone H3 Peptid wurden über Nacht bei 25 °C in 16.7 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 100 mM KCl und 1.7% Glycerol in einem Gesamtvolumen von 25 µl inkubiert.

Danach wurden 2.5 µl 10fach HIM-Puffer, 1 µl 1.25 M Glycin, 0.5 µl SAM (1 µCi/µl), und 1 µg rekombinantes SU(VAR)3-9 hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde wie beschrieben gestoppt und die Menge des radioaktiv markierten Peptids erfolgte mit einem Szintillationszähler.

### **2.3.6 Herstellung von polyklonalen Antikörpern**

Das gereinigte rekombinante TAIMAN-Antigen wurde 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. Die erhaltenen Seren der entsprechenden Blutabnahmen wurden mittels Dotblot weiter charakterisiert. Aus den erhaltenen Seren wurde der Antikörper durch Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences) aufgereinigt.

## **2.4 Immunzytologische Methoden**

### **2.4.1 Immunmarkierung von polytären Speicheldrüsenchromosomen**

Für Präparation von polytären Speicheldrüsenchromosomen wurde die Methode nach Alfageme et al. (1980) angewendet. Die Speicheldrüsen wurden aus Larven im dritten Stadium 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 Antikörper wurden mit dem entsprechenden Präparat in PBST (PBS, 0.2% Tween 20), 5 % Trockenmilchpulver

(Biorad) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten 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).

### **2.4.2 Immunmarkierung von Embryonen**

Für die Immunmarkierung von *Drosophila*-Embryonen wurde die Methode nach Rothwell und Sullivan (2000) angewendet. Die gesammelten Embryonen wurden nach der Dechorionisierung in 10 ml Waschpuffer (0,7% NaCl, 0,05% Triton X-100) bei 100°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen auf Eis gestellt und durch Zugabe von kaltem Waschpuffer 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 15 min rehydriert. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C in PBTA mit den Embryonen auf einem Drehrad inkubiert. Nach 3 Waschschrritten in PBTA wurde der sekundäre Antikörper 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) ausgewertet.

**Tabelle 2.2:** Verwendete Antikörper für biochemische und immunzytologische Analysen.

Antikörper	Hersteller	Produktnr.	Lot-Nummer	Verdünnung Westernblot	Verdünnung Zytologie
polyclonal H3K4me1	abcam	ab8895	726668	1:1000	1:100
polyclonal H3K4me2	abcam	ab11946	239177	1:1000	1:100
monoclonal H3K4me3	abcam	ab1012	785696	1:1000	1:100
polyclonal H3K9me1	abcam	ab9045	800300	1:1000	1:100
monoclonal H3K9me2	abcam	ab1220	GR8729	1:1000	1:100
polyclonal H3K9me3	abcam	ab8898	484100	1:1000	1:100
polyclonal H3K9ac	abcam	ab10812	H884022	1:1000	1:100
polyclonal H3K27me1	Millipore	07-448	DAM1661077	1:1000	1:100
polyclonal H3K27me2	abcam	ab24684	808607	1:1000	1:100
polyclonal H3K27me3	abcam	ab6002	GR13255	1:1000	1:100
polyclonal LID	Baisch, 2010	-	-	-	1:75
polyclonal RPD3	abcam	ab1767	892974	1:1000	1:100
monoclonal $\alpha$ -Tubulin	Sigma	T6074	Clone B-5-1-2	1:5000	-
GAR 488	Invitrogen	A11008	792513	-	1:100
GAM 488	Invitrogen	A11001	861163	-	1:100
GAR HRP	Invitrogen	G21234	714260	1:1000	-
GAM HRP	Invitrogen	G21040	454184	1:1000	-

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Molekulare Analyse der Methyltransferase SU(VAR)3-9

*Su(var)3-9* ist einer der stärksten dominanten Suppressoren im PEV Modellsystem *In(1)w<sup>m4h</sup>*. Der Verlust einer Kopie von *Su(var)3-9* führt zur vollständigen Aktivierung des *white*-Gens (Tschiersch et al., 1994). Eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-9* verursacht hingegen ein verstärktes *Gensilencing* und führt zur kompletten Inaktivierung des *white*-Gens (Triplo-Enhancereffekt). Dem zufolge stellt SU(VAR)3-9 eine zentrale Komponente bei der Etablierung heterochromatischer Chromatinstrukturen dar.

#### 3.1.1 SU(VAR)3-9 ist eine Methyltransferase für Histon H3 Lysin 9

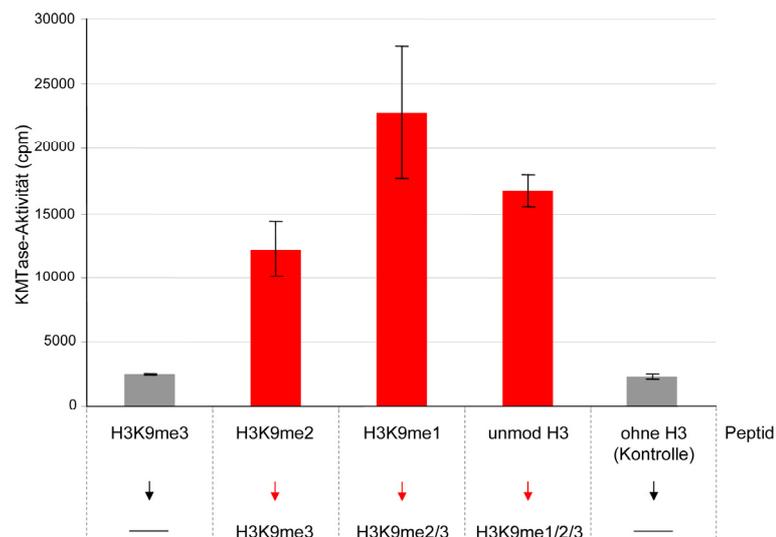
Biochemische Analysen zeigen, dass Lysine der Histone in mono-, di- oder trimethylierter Form vorliegen können (DeLange et al., 1973). In polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster* ist die H3K9-Monomethylierung im Chromozentrum und an vielen euchromatischen Banden zu finden (Ebert et al., 2004). Histon H3K9-Dimethylierung ist vorwiegend im Chromozentrum lokalisiert und mit einigen Banden und Telomeren assoziiert. Im 4. Chromosom ist ebenfalls H3K9me2 zu finden. Histon H3K9-Trimethylierung zeigt eine sehr spezifische Assoziation im inneren Bereich des Chromozentrums (Ebert et al., 2004). In Speicheldrüsenchromosomen von *Su(var)3-9*-Nullmutanten sind H3K9me2 und H3K9me3, außer im 4. Chromosom, in Telomeren und einigen euchromatischen Banden, sehr stark reduziert, aber H3K9me1 ist unverändert (Ebert et al., 2004).

SUV39H1 realisiert über die SET-Domäne eine Aktivität als Methyltransferase, die spezifisch für Lysin 9 von Histon H3 ist (Rea et al., 2000). SU(VAR)3-9 ist das *Drosophila* Orthologe des humanen SUV39H1 und enthält neben einer Chromo-Domäne, wie auch SUV39H1, eine SET-Domäne.

Um die Abhängigkeit der H3K9-Di- und Trimethylierung von SU(VAR)3-9 *in vitro* zu zeigen, wurde ein rekombinantes GST-Fusionsprotein von SU(VAR)3-9 hergestellt, mit <sup>3</sup>H-markiertem AdoMet und N-terminalem Histon H3-Peptid (AS 1-20) inkubiert und die in das Peptid eingebaute Radioaktivität als das Maß für die Methyltransferase-

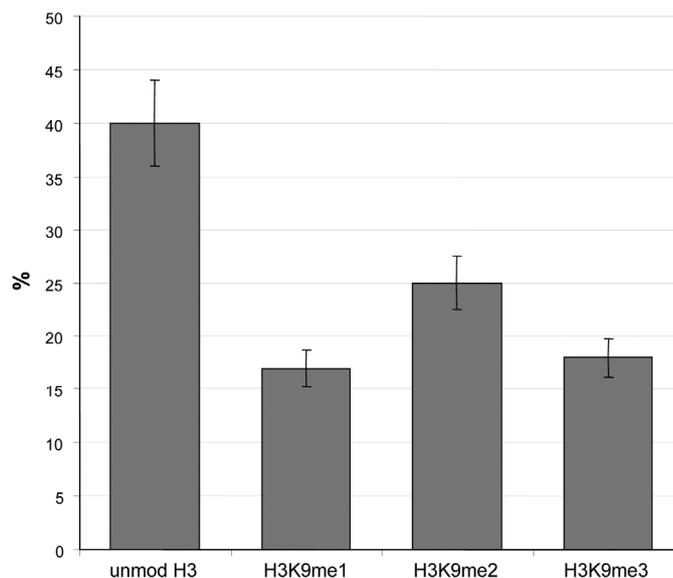
aktivität im Szintillationszähler bestimmt. Als Substrate dienten unmodifizierte bzw. an Lysin 9 prämethylierte H3-Peptide (AS 1-20).

Bei Verwendung des K9-trimethylierten H3-Peptids konnte keine KMTase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne H3-Peptid festgestellt werden. Dies zeigt die hohe Spezifität von SU(VAR)3-9 nur das Lysin 9 des H3-Peptids zu methylieren, da keine weitere Methylgruppe auf ein trimethyliertes Lysin übertragen werden kann (Abb. 3.1). Die anderen Lysine des H3-Peptides (K4, K14 und K18) werden nicht durch SU(VAR)3-9 methyliert. Eine Automethylierung kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Bei Einsatz eines dimethylierten H3-Peptids konnte eine Methyltransferaseaktivität detektiert werden. Dies bedeutet, dass SU(VAR)3-9 eine Methylgruppe auf das dimethylierte Lysin 9 übertragen und eine Trimethylierung vermitteln kann (Abb.3.1). Die Methyltransferaseaktivität ist jedoch geringer als bei der Verwendung von unmodifiziertem und monomethyliertem H3-Peptid als Substrat. Diese *in vitro* Daten zeigen die Korrelation zu den *in vivo* Analysen von polytären Speicheldrüsenchromosomen in *Su(var)3-9*-Nullmutanten. Die Trimethylierung an Lysin 9 ist dort nahezu vollständig verloren wobei anstelle der Trimethylierung nur im Kern des Chromozentrums eine Dimethylierung detektierbar ist (Ebert et al., 2004; Ebert, 2005). Die höchste Methyltransferaseaktivität konnte bei Einsatz des monomethylierten Peptids festgestellt werden. Dieses Peptid kann durch SU(VAR)3-9 zu di- oder trimethyliertem Peptid umgesetzt werden (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1:** Methyltransferaseassays mit rekombinantem SU(VAR)3-9. Die Reaktionen erfolgten nach Czermin et al. 2001. Jeweils 1µg unmodifiziertes bzw. mono-, di- oder trimethyliertes H3-Peptid (AS 1-20) wurde mit 1µg SU(VAR)3-9 und 0,5µCi SAM inkubiert. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde mittels eines Szintillationszähler bestimmt. Als Kontrolle wurde der Reaktionsansatz ohne H3-Peptid verwendet.

Diese *in vitro* Daten stimmen ebenfalls mit den *in vivo* Analysen in *Su(var)3-9*-Nullmutanten überein. In diesen Mutanten ist neben dem fast vollständigen Verlust von H3K9me3 auch H3K9me2 sehr stark verringert (Ebert et al., 2004). Bei Verwendung des unmodifizierten H3-Peptids konnte ebenfalls eine Methyltransferaseaktivität gezeigt werden. Dies bedeutet, dass SU(VAR)3-9 *in vitro* eine Methylgruppe auf ein noch nicht methyliertes H3-Peptid übertragen und eine Monomethylierung vermitteln kann (Abb. 3.1). Außerdem können dann weitere Methylgruppen auf das H3-Peptid übertragen werden. SU(VAR)3-9 ist somit *in vitro* in der Lage, Mono-, Di- und Trimethylierung zu vermitteln. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Stefan Kubicek (Arbeitsgruppe T. Jenuwein, IMP) bestätigt. Unmodifiziertes H3-Peptid wurde dabei mit rekombinantem SU(VAR)3-9 inkubiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass mono-, di- und trimethylierte H3-Peptide durch SU(VAR)3-9 entstehen können (Abb. 3.2). Die Übertragung der Methylgruppen durch SU(VAR)3-9 erfolgen dabei auf eine nicht-prozessive Weise (Eskeland et al., 2004).

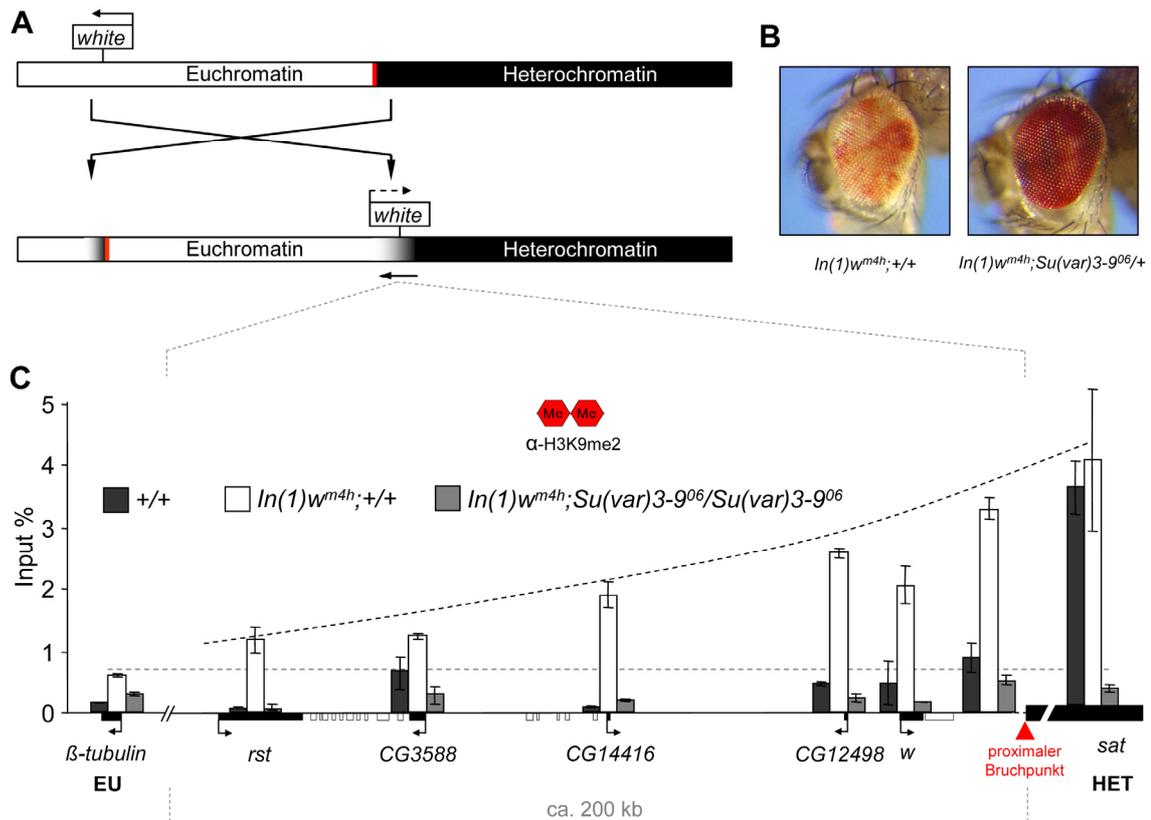


**Abbildung 3.2:** Massenspektrometrisch Analyse der H3K9-Methylierungsstufen. Unmodifiziertes H3-Peptid wurde mit rekombinantem SU(VAR)3-9 inkubiert und in Kollaboration mit Stefan Kubicek vom IMP in Wien massenspektrometrisch untersucht. SU(VAR)3-9 ist in der Lage, H3K9-Mono-, Di- und Trimethylierung zu vermitteln. Die relative Höhe einer einzelnen H3K9-Methylierungsstufe ist in Abhängigkeit zu der Summe aller H3K9-Modifikationen in den Histon H3-Peptiden dargestellt.

### 3.1.2 SU(VAR)3-9 ist für die Ausbreitung der H3K9-Dimethylierung verantwortlich

Methylierung von H3K9 stellt eine Markierung repressiven Chromatins dar (Fischle et al., 2003; Rougeulle et al., 2004). Unter Verwendung spezifischer Antikörper, die die Möglichkeit bieten, zwischen mono-, di- und trimethyliertem Zustand von H3K9 zu unterscheiden, konnte sowohl in Interphasechromatin als auch in mitotischen Chromosomen von Mauszellen eine spezifische Verteilung dieser Markierungen beobachtet werden (Peters et al., 2003). In *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, dass ausschließlich H3K9-Trimethylierung, vermittelt durch das SU(VAR)3-9-homologe Protein DIM-5, eine Voraussetzung für DNA-Methylierung darstellt (Tamaru et al., 2003). Die *in vivo*-Verteilung der drei verschiedenen H3K9-Methylierungsstadien in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster* wurde in Ebert et al., 2006 ausführlich beschrieben.

Um die Ausbreitung der H3K9-Methylierung (*Spreading*) molekularbiologisch zu analysieren, wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation die den proximalen Bruchpunkt flankierende, ca. 200 kb große *white-roughest*-Region im Rearrangement *In(1)w<sup>m4h</sup>* in adulten Fliegenköpfen untersucht. Die Inversion *In(1)w<sup>m4</sup>* (Muller, 1930) ist ein PEV-Rearrangement, welches sich besonders gut zur Identifizierung von Faktoren eignet, die am Heterochromatinaufbau beteiligt sind. Das *white*-Gen ist hier durch eine Inversion in die Nähe perizentrischen Heterochromatins gelangt (Abb. 3.3A; Schultz, 1936). Durch fakultative Heterochromatisierung wird es in einem Anteil der Augenzellen inaktiviert, was an einer mosaikartig, gefleckten Rotfärbung der Augen adulter Tiere sichtbar ist (Abb. 3.3B). Durch umfangreiche Experimente zur Identifizierung von Genen, die eine Inaktivierung des *white*-Gens beeinflussen, konnten eine Vielzahl von Mutanten isoliert werden, die etwa 150 Gene repräsentieren (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1989). *Su(var)3-9* ist einer der stärksten dominanten Suppressoren für PEV (Abb. 3.3B). Um die ChIP-Analysen im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement zu vervollständigen, wurden zwei Kontrollsequenzen verwendet. Das  $\beta$ -*tubulin 56D* dient als euchromatische Kontrollsequenz und liegt außerhalb der *white-roughest*-Region auf dem 2. Chromosom.

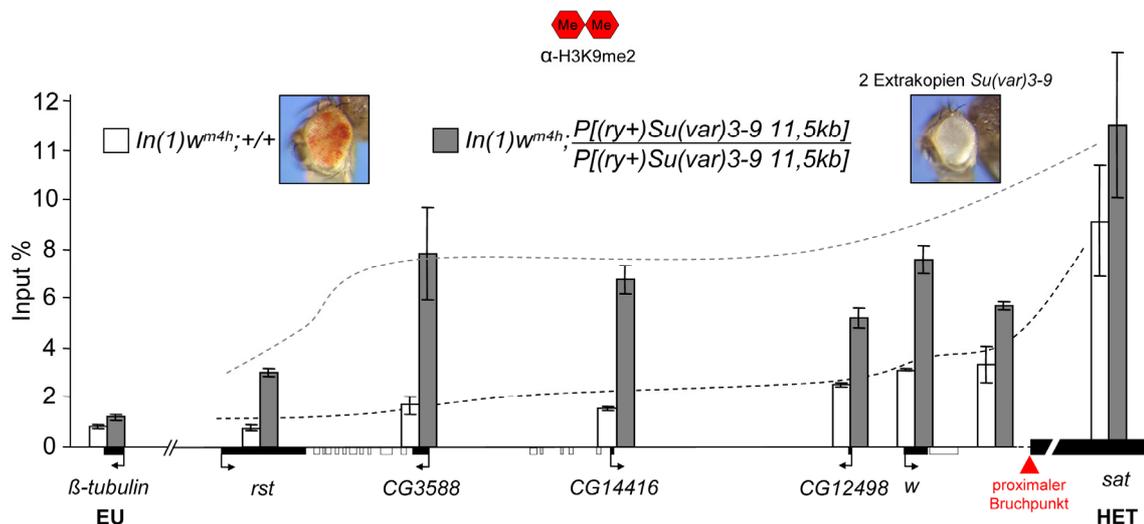


**Abbildung 3.3:** SU(VAR)3-9 kontrolliert die Ausbreitung der H3K9-Dimethylierung. (A) Schematische Darstellung des Rearrangements *In(1)w<sup>m4h</sup>*. Das *white*-Gen ist durch eine Inversion in die Nähe des X-Heterochromatins verlagert. (B) Eine teilweise Inaktivierung des *white*-Gens ist durch einen variierten Augenphänotyp (rote und weiße Facetten) gekennzeichnet. Durch eine dominante *Su(var)3-9* Mutation wird die Inaktivierung des *white*-Gens durch Heterochromatisierung unterdrückt. (C) Ausbreitung der H3K9-Dimethylierung über den proximalen Bruchpunkt des *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangements entlang der flankierenden, euchromatischen, ca. 200 kb großen *white-roughest*-Region. Ein H3K9me2-Gradient ist im *w<sup>m4h</sup>* (weiß) zu finden, der in *Su(var)3-9*-Mutanten nicht mehr vorhanden ist (grau). In Wildtypfliegen, die nicht die Inversion *In(1)w<sup>m4h</sup>* tragen, ist kein H3K9me2-Gradient zu finden (dunkelgrau).

Als heterochromatische Kontrollsequenz wurden die 359 bp *satellite repeats* verwendet, welches sich im proximalen Heterochromatin des X-Chromosoms befindet (Hsieh und Brutlac, 1979; Hilliker und Appels, 1982).

Aus adulten Köpfen von *Drosophila melanogaster* wurde das Gesamtchromatin isoliert und mit einem hochspezifischen Antikörper, der H3K9-Dimethylierung erkennt, versetzt. Die präzipitierte DNA wurde mit quantitativer *Real-Time-PCR* analysiert. Das Ausmaß der Amplifikation korreliert mit der Menge an H3K9me2. In der euchromatischen Kontrollsequenz *β-tubulin 56D* wird im Wildtyp kein H3K9me2 gefunden. Die *white-roughest*-Region im Wildtyp weist einen H3K9me2-Gradienten auf, wobei die Menge an H3K9me2 zunimmt, je näher die Sequenz zum proximalen

Bruchpunkt liegt (Abb. 3.3C). Diese ChIP-Untersuchungen erfolgten auch in Wildtypfliegen, die nicht die Inversion  $In(1)w^{m4h}$  tragen. In den euchromatischen Sequenzen konnte kein H3K9me2 detektiert werden. Die heterochromatische Kontrollsequenz zeigte jedoch eine deutliche Menge an H3K9me2 (Abb. 3.3 C). Um die Abhängigkeit von H3K9me2 von SU(VAR)3-9 weiter zu verdeutlichen, wurden die ChIP-Analysen in einer  $Su(var)3-9$ -Überexpressionslinie durchgeführt. Eine zusätzliche Kopie von  $Su(var)3-9$  führt zu einem Triplo-Enhancereffekt auf PEV (Tschiersch et al., 1994). Das bedeutet, dass das Markergen in dem jeweiligen PEV-Rearrangement aufgrund der Überexpression von SU(VAR)3-9 reprimiert wird. In dem PEV-Rearrangement  $In(1)w^{m4h}$  ist in Kombination mit einer zusätzlichen  $Su(var)3-9$ -Kopie eine komplette Inaktivierung des *white*-Gens zu verzeichnen. Zwei zusätzliche  $Su(var)3-9$ -Kopien verstärken diesen Effekt weiter (Abb. 3.4). Die ChIP-Untersuchungen in der *white-roughest*-Region im Hintergrund von zwei zusätzlichen  $Su(var)3-9$ -Kopien zeigen eine signifikante Erhöhung von H3K9me2. Die Inaktivierung des *white*-Gens korreliert mit der vorhandenen H3K9me2. Außerdem ist eine Ausbreitung von H3K9me2 über das *roughest*-Gen hinweg detektierbar. Diese Analysen stellen eine molekulare Bestätigung des *Spreading*-Modells dar und zeigen, dass SU(VAR)3-9 für die Ausbreitung der H3K9-Dimethylierung in *Drosophila melanogaster* verantwortlich ist.



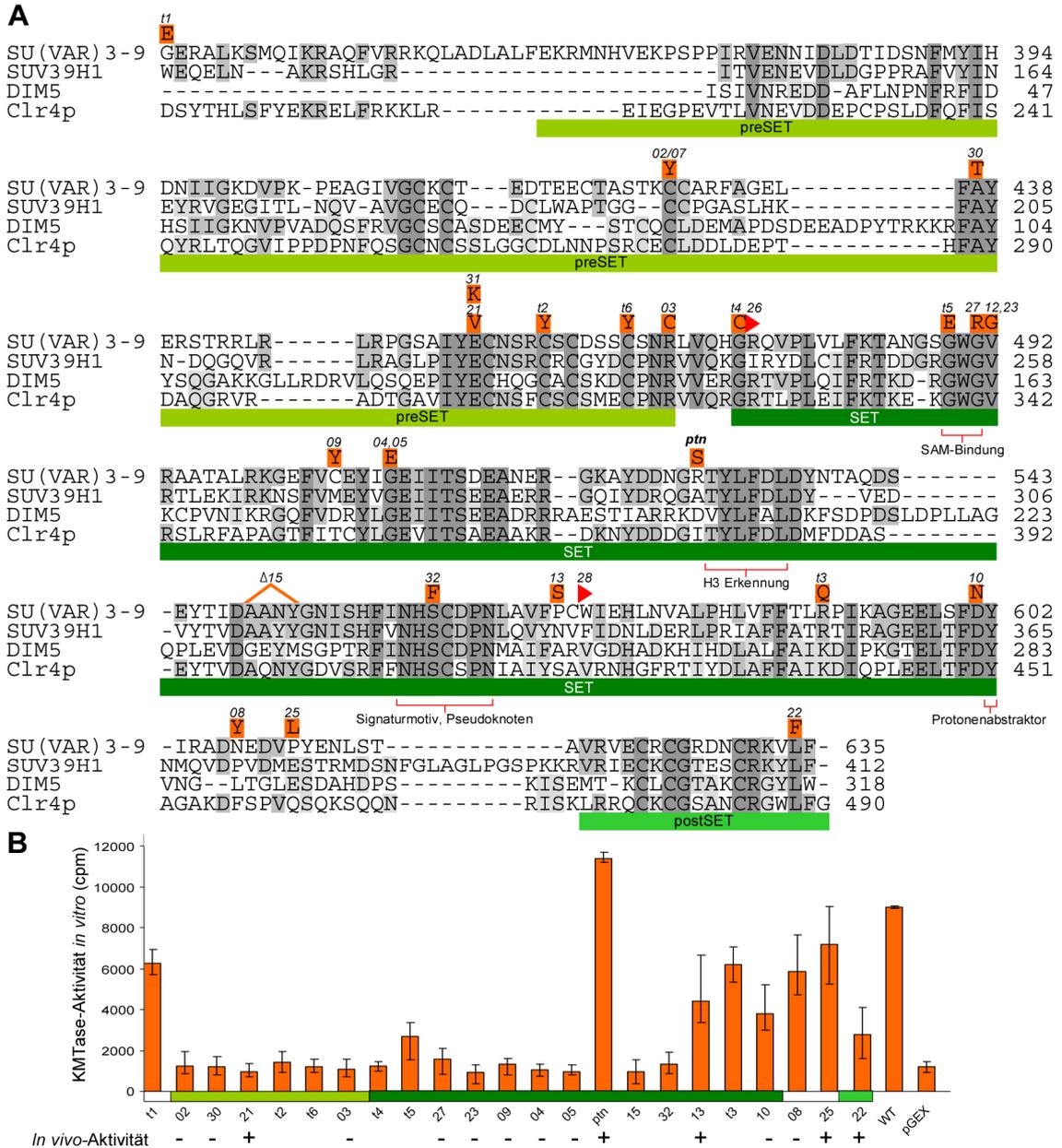
**Abbildung 3.4:** Ausbreitung der heterochromatischen H3K9-Dimethylierung über den proximalen Bruchpunkt des  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangements entlang der *white-roughest*-Region. Zwei zusätzlichen  $Su(var)3-9$ -Kopien verstärken die Inaktivierung des *white*-Gens und führen zu einem Enhancereffekt (weißer Augenphänotyp). Der H3K9me2-Gradient ist in der  $Su(var)3-9$ -Überexpressionslinie wesentlich erhöht (grau) im Vergleich zum  $w^{m4h}$  (weiß).

### 3.1.3 *pitkin<sup>D</sup>* ist ein hypermorphes *Su(var)3-9* Allel

SU(VAR)3-9 ist die wesentliche H3K9-Methyltransferase in *Drosophila* und spielt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung heterochromatischer *Gensilencings*. Mit Hilfe von EMS- bzw. Röntgenstrahlen-Mutagenese konnten 33 *Su(var)3-9*-Allele identifiziert werden (Reuter et al., 1986; Wustmann, 1988; Tschiersch, 1993; Krauss, 1995; Schotta, 2002; Ebert et al., 2004). Fast alle Mutantenallele, die Aminosäureaustausche darstellen, betreffen die SET-, bzw. pre-SET und post-SET-Domäne von SU(VAR)3-9 (Schotta, 2002; Ebert et al., 2004).

*Pitkin<sup>D</sup>* ist ein außergewöhnlich starker dominanter Enhancer für PEV und führt zu dominanter weiblicher Sterilität (Kuhfittig et al., 2001). Das Chromatin in *pitkin<sup>D</sup>* ist kompakter als im Wildtyp und eine ektopische Verteilung von SU(VAR)3-9 an vielen euchromatischen Banden in polytären Speicheldrüsenchromosomen ist erkennbar (Kuhfittig et al. 2001). Die H3K9-Di- und Trimethylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen dieser Mutante ist stark erhöht und ektopisch verteilt. Die H3K9-Monomethylierung ist unbeeinflusst (Ebert et al., 2004).

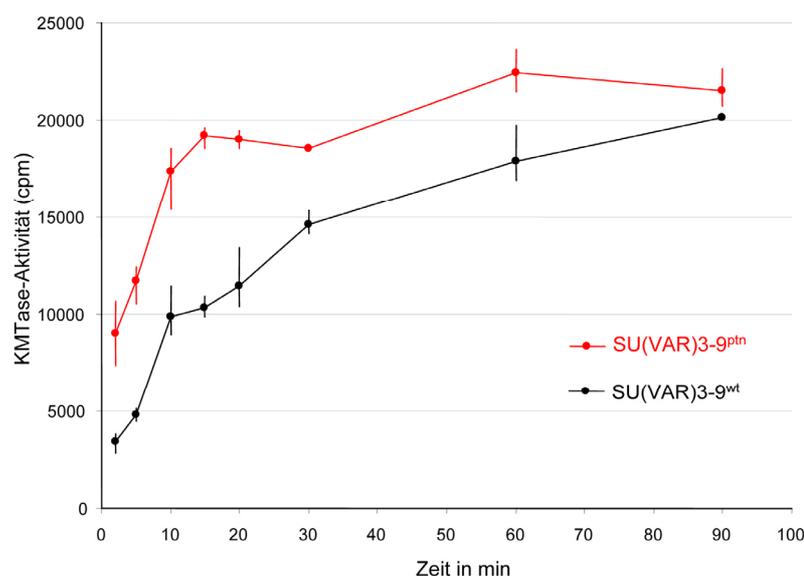
*Pitkin<sup>D</sup>* konnte im Verlauf der Mutantenanalysen ebenfalls als *Su(var)3-9*-Allel [*Su(var)3-9<sup>ptn</sup>*] identifiziert werden (Ebert et al., 2004). Diese Mutante resultiert aus einer Punktmutation innerhalb der SET-Domäne, welche zu einem Aminosäureaustausch (R529S) führt (Abb. 3.5A). Transgene Fliegen, welche SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup>-EGFP exprimieren, zeigen einen sehr starken Enhancereffekt auf die Inversion *In(1)w<sup>m4h</sup>* und eine Verteilung des Fusionsproteins im Chromozentrum und in zahlreichen euchromatischen Banden, welche eine große Überlappung mit der H3K9-Dimethylierung im Chromozentrum und in euchromatischen Banden aufweist (Ebert et al., 2004). Die H3K9-Trimethylierung in diesen transgenen Linien ist ebenfalls stark erhöht (Ebert et al. 2004). Um zu bestätigen, dass diese Punktmutation in *Su(var)3-9* tatsächlich *pitkin<sup>D</sup>* repräsentiert, wurde ein rekombinantes GST-Fusionsprotein hergestellt, welches den Aminosäureaustausch von Arginin 529 nach Serin enthält. Die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> wurde mit 22 anderen SU(VAR)3-9-Mutantenproteinen und dem Wildtypprotein [SU(VAR)3-9<sup>wt</sup>] verglichen (Abb. 3.5B). Fast alle Proteine der amorphen *Su(var)3-9*-Allele zeigen *in vitro* keine KMTase-Aktivität außer SU(VAR)3-9<sup>08</sup> und SU(VAR)3-9<sup>10</sup>, die nur noch eine schwache Aktivität *in vitro* aufweisen (Ebert et al., 2006).



**Abbildung 3.5:** Mutantenanalyse von *Su(var)3-9*. **(A)** *Multiple Sequence Alignment* der SET-Domäne von SU(VAR)3-9 mit seinen Homologen SUV39H1 (Säuger), DIM5 (*Neurospora crassa*) und Clr4p (*Schizosaccharomyces pombe*). Stark konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau unterlegt. Die durch Mutationen entstandenen Aminosäureaustausche in SU(VAR)3-9 sind in der oberen Reihe eingezeichnet. Die mit "t" gekennzeichneten Austausche zeigen Mutationen im *P{Su(var)3-9-EGFP}*-Transgen. Mutanten im endogenen Locus sind nur mit Zahlen bezeichnet. **(B)** *In vitro* KMTase-Aktivität der SU(VAR)3-9-Mutantenproteine. Die zugehörige Aktivität *in vivo* ist mit "-" für inaktiv bzw. "+" für aktiv gekennzeichnet (Ebert et al., 2006). Rekombinante SU(VAR)3-9 Proteine wurden mit Histon H3-Peptid und radioaktiv markiertem SAM inkubiert. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

Für die Proteine der hypermorphen Allele  $Su(var)3-9^{l3}$ ,  $Su(var)3-9^{t22}$  und  $Su(var)3-9^{t25}$  ist ebenfalls *in vitro* eine KMTase-Aktivität nachweisbar, die aber geringer ist als das Wildtypniveau. Die Proteine der Allele  $Su(var)3-9^{t3}$  und  $Su(var)3-9^{t5}$  weisen auch eine geringere KMTase-Aktivität *in vitro* auf (Ebert et al., 2006). Das Protein von  $Su(var)3-9^{t1}$ , welches als einziges Allel nicht die SET-Domäne betrifft, zeigt ebenfalls geringe Aktivität (Ebert et al., 2006). Die KMTase-Aktivität von  $SU(VAR)3-9^{ptn}$  übertrifft die Aktivität aller anderen Mutantenproteine und die des Wildtypproteins (Abb. 3.5B). Um einen noch genaueren Einblick in das Ausmaß der Hypermethylierung durch  $SU(VAR)3-9^{ptn}$  zu erlangen, wurde die KMTase-Aktivität *in vitro* von  $SU(VAR)3-9^{wt}$  und  $SU(VAR)3-9^{ptn}$  in Abhängigkeit von der Reaktionszeit untersucht (Abb. 3.6). In der Anfangsphase der Reaktion zeigte sich, dass  $SU(VAR)3-9^{ptn}$  nahezu doppelt so viel H3-Peptid methyliert wie  $SU(VAR)3-9^{wt}$ . Nach 40 min wird bei  $SU(VAR)3-9^{ptn}$  ein Plateau erreicht, welches beim Wildtypprotein erst nach 90 min bis 120 min eintritt (Abb. 3.6).

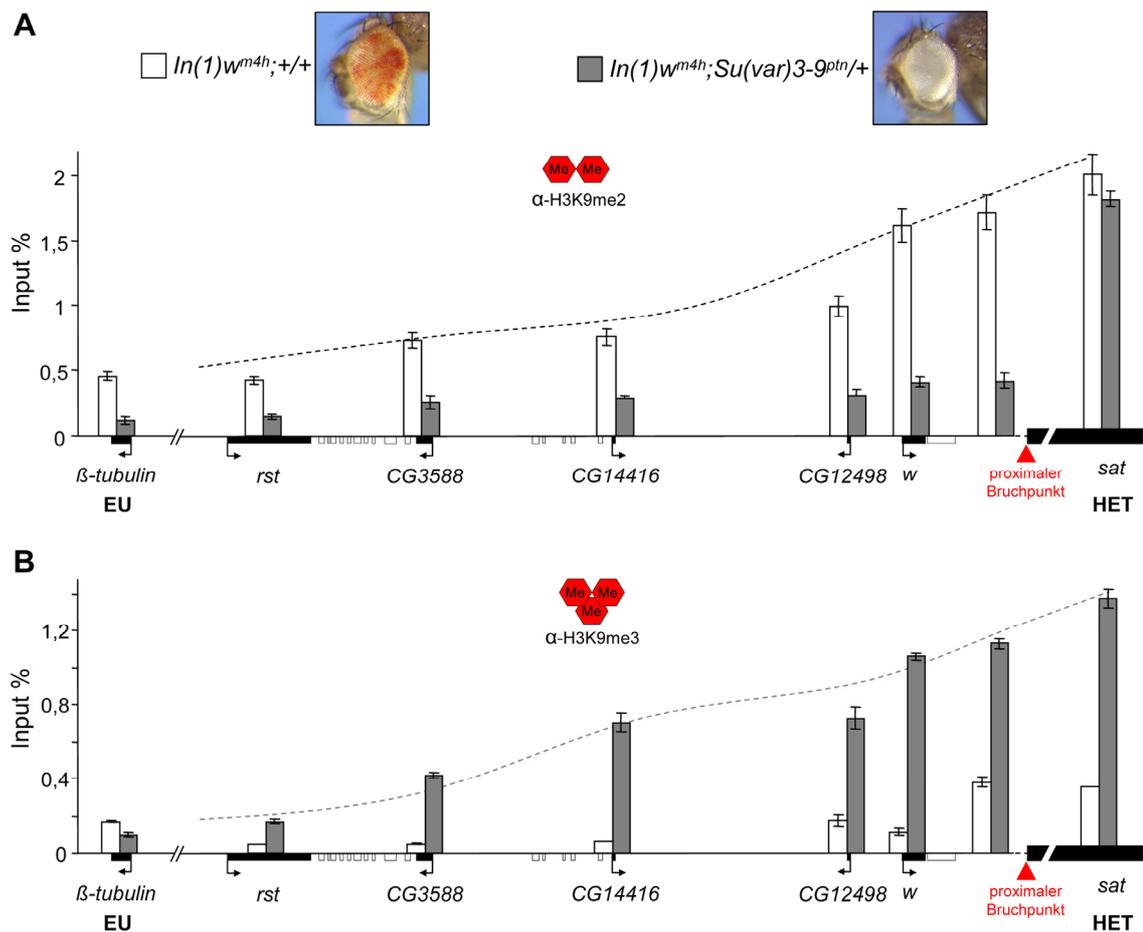
Um die Auswirkungen der Hyperaktivität der  $Su(var)3-9^{ptn}$  Mutante *in vivo* molekularbiologisch zu analysieren, wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation die Ausbreitung der H3K9-Di- und Trimethylierung in der *white-roughesht*-Region im Rearrangement  $In(1)w^{m4h}$  untersucht (Abb. 3.7). Dabei zeigte sich, dass das *Spreading* von H3K9me2 in  $Su(var)3-9^{ptn}/+$  heterozygoten Tieren stark reduziert ist (Abb. 3.7). Die Menge an H3K9me2 in den 359 bp *satellite repeats* ist jedoch unverändert im Vergleich zum Wildtyp ( $In(1)w^{m4h}; +/+$ ).



**Abbildung 3.6:** KMTase-Aktivität *in vitro* von  $SU(VAR)3-9^{wt}$  und  $SU(VAR)3-9^{ptn}$  in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die KMTase-Aktivität von  $SU(VAR)3-9^{ptn}$  ist wesentlich erhöht. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

H3K9-Trimethylierung ist im Wildtyp in den untersuchten euchromatischen Sequenzen und in den heterochromatischen *359 bp satellite repeats* nicht detektierbar. Dies bestätigt, dass die Dimethylierung die wesentliche heterochromatische Modifizierung an H3K9 in *Drosophila melanogaster* ist.

In den heterozygoten *Su(var)3-9<sup>ptm</sup>*-Mutanten ist eine signifikante Menge an H3K9me3 detektierbar. Anstelle des H3K9me2-Gradienten ist ein H3K9me3-Gradient vorhanden, der zur vollständigen Inaktivierung des *white*-Gens führt. Die Trimethylierung von H3K9 stellt somit ebenfalls eine reprimierende, heterochromatische Modifizierung in *Drosophila melanogaster* dar. Offenbar führt die H3K9me3 zu einer stärkeren Verpackung des Chromatins als H3K9me2, denn das *white*-Gen ist vollständig inaktiviert und das *roughest*-Gen partiell reprimiert, obwohl nur sehr geringe Mengen von H3K9me3 in der untersuchten *roughest*-Sequenz detektierbar sind.

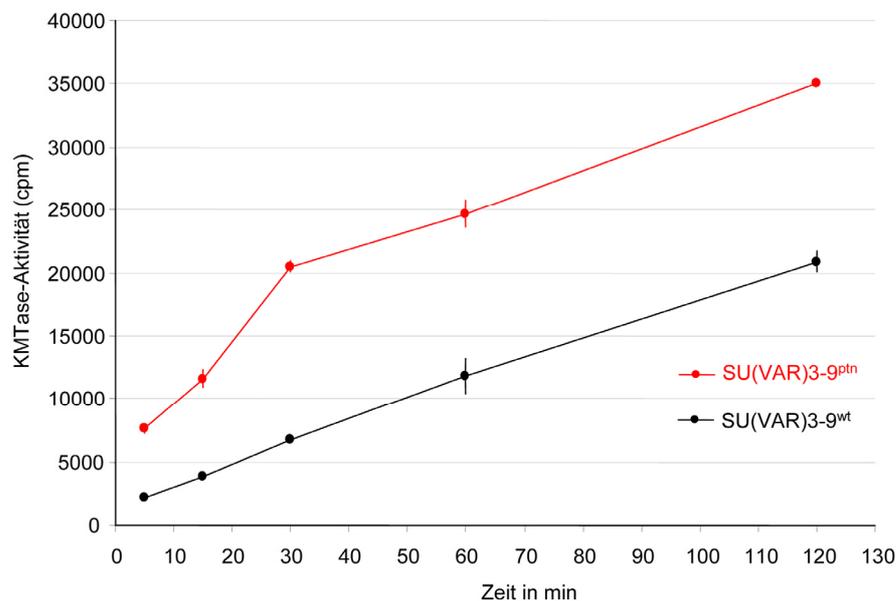


**Abbildung 3.7:** Ausbreitung der heterochromatischen H3K9-Methylierung über den proximalen Bruchpunkt des *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangements entlang der *white-roughest*-Region. (A) In der hypermorphen *Su(var)3-9<sup>ptm</sup>*-Mutante ist die Inaktivierung des *white*-Gens verstärkt. Dies führt zu einem Enhancereffekt. Der H3K9me2-Gradient ist in *In(1)w<sup>m4h</sup>;Su(var)3-9<sup>ptm</sup>/+* wesentlich reduziert (grau) im Vergleich zum Wildtyp (weiß). (B) H3K9-Trimethylierung ist im Wildtyp entlang der *white-roughest*-Region nicht vorhanden (weiß). Ein H3K9me3-Gradient ist in *Su(var)3-9<sup>ptm</sup>*-Mutanten zu finden (grau).

Um die verstärkte Konvertierung von H3K9me2 zu H3K9me3 durch SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> *in vitro* zu untersuchen, wurde die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> in Abhängigkeit von der Reaktionszeit an prä-dimethylierten H3-Peptiden untersucht (Abb. 3.8). Dabei zeigte sich, dass SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> wesentlich mehr H3K9me3 vermitteln kann als das Wildtypprotein.

Diese Daten charakterisieren SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> als hyperaktive H3K9-Methyltransferase und zeigen, dass der stark hypermorphe Charakter der Mutante *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* durch die Steigerung der enzymatischen Aktivität der SET-Domäne hervorgerufen wird.

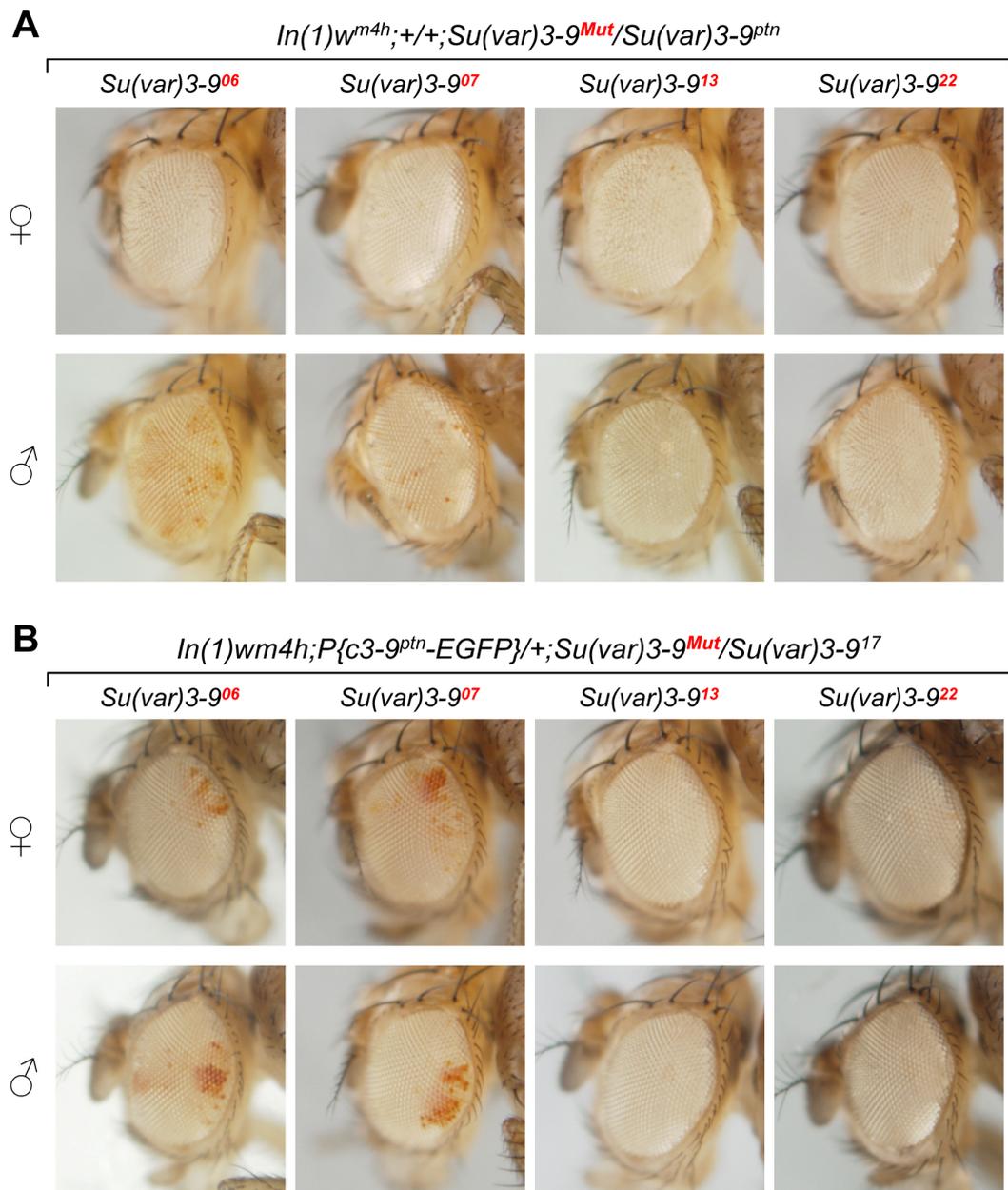
Um die Bedeutung der enzymatischen Aktivität der SET-Domäne und deren Einfluss auf die Inaktivierung des *white*-Gens weiter zu verdeutlichen, wurden die *Su(var)3-9*-Allele 06, 07, 13 und 22 im endogenen *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>*-Hintergrund und im transgenen *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>*-EGFP-Hintergrund untersucht. *Su(var)3-9<sup>06</sup>* ist aus einer Röntgenstrahl-Mutagenese hervorgegangen, beinhaltet eine ca. 6 kb große Insertion und repräsentiert ein Nullallel von *Su(var)3-9* (Reuter et al., 1986; Tschiersch et al., 1994; Schotta, 2002). Die Augen transheterozygoter *Su(var)3-9<sup>06</sup>/Su(var)3-9<sup>ptn</sup>*-Männchen weisen einen sehr schwachen *white-mottled*-Phänotyp auf, wohingegen Weibchen weiße Augen mit wenigen rauen Facetten zeigen (Abb. 3.9A).



**Abbildung 3.8:** Konvertierung von H3K9me2 zu H3K9me3 *in vitro* von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> setzt wesentlich mehr H3K9me2 zu H3K9me3 um als SU(VAR)3-9<sup>wt</sup>. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei transheterozygoten  $Su(var)3-9^{07}/Su(var)3-9^{pm}$  Tieren.  $Su(var)3-9^{07}$  enthält eine Punktmutation, die ebenfalls durch Röntgenstrahlen-Mutagenese entstanden ist, welche zu einem Aminosäureaustausch des hoch konservierten Cysteins 427 nach Tyrosin innerhalb der SET-Domäne führt (Abb.3.5). Dieser Austausch ist auch in  $Su(var)3-9^{02}$  zu finden, das durch EMS-Mutagenese entstanden ist und resultiert in einem funktionsunfähigen SU(VAR)3-9-Protein (Reuter et al., 1986; Ebert et al., 2004).  $Su(var)3-9^{13}$  ist aus einer EMS-Mutagenese hervorgegangen, führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin 571 nach Serin in der SET-Domäne und stellt ein hypomorphes Allel dar (Reuter et al., 1986; Ebert et al., 2004). Ein weiteres aus einer EMS-Mutagenese entstandenes hypomorphes Allel ist  $Su(var)3-9^{22}$ , das zu einem Aminosäureaustausch von Leucin 634 nach Phenylalanin führt (Ebert et al., 2004). Betrachtet man transheterozygote  $Su(var)3-9^{13}/Su(var)3-9^{pm}$  und  $Su(var)3-9^{22}/Su(var)3-9^{pm}$  Tiere, findet man nur weiße Augen bei Männchen und Weibchen mit einigen rauen Facetten, wobei bei  $Su(var)3-9^{13}/Su(var)3-9^{pm}$  Tieren mehr raue Facetten erkennbar sind (Abb. 3.9A). In den Hintergrund des  $Su(var)3-9^{pm}$ -EGFP-Transgens  $P\{c3-9^{pm}$ -EGFP}, welches auf dem 2. Chromosom inseriert ist, wurde zusätzlich das  $Su(var)3-9^{17}$ -Allel gebracht, um alle  $Su(var)3-9$ -Wildtypkopien zu entfernen.  $Su(var)3-9^{17}$  ist aus einer Röntgenstrahl-Mutagenese hervorgegangen, beinhaltet eine 8 bp große Deletion, die zu einem *Frameshift* an Position Threonin 93 führt und repräsentiert ein Nullallel von  $Su(var)3-9$  (Tschiersch et al., 1994). In diesem Hintergrund zeigte sich in den Allelen  $Su(var)3-9^{06}$  und  $Su(var)3-9^{07}$  bei Männchen und Weibchen ein schwacher *white-mottled*-Phänotyp (Abb. 3.9B). Das Transgen  $P\{c3-9^{pm}$ -EGFP} wird offenbar etwas schwächer exprimiert, als das endogene  $Su(var)3-9^{pm}$ .

In den Allelen  $Su(var)3-9^{13}$  und  $Su(var)3-9^{22}$  findet man bei Männchen und Weibchen nur weiße Augen, jedoch ohne raue Facetten (Abb. 3.9B). Diese Daten zeigen den stark hypermorphen Charakter von  $Su(var)3-9^{pm}$  und bestätigen den hypomorphen Charakter der  $Su(var)3-9$ -Allele 13 und 22, die noch in der Lage sind, im Gegensatz zu  $Su(var)3-9^{06}$  und  $Su(var)3-9^{07}$  die Reprimierung der *white-roughest*-Region zu verstärken. Die Mutante  $Su(var)3-9^{13}$  verursacht dabei eine etwas stärkere Reprimierung als  $Su(var)3-9^{22}$ , was mit den *in vitro* Analysen korreliert.

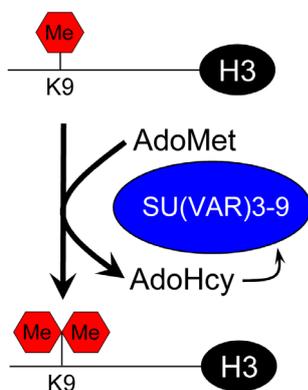


**Abbildung 3.9:** Genetische Klassifizierung der  $Su(var)3-9$ -Allele 06, 07, 23 und 22 im  $Su(var)3-9^{ptn}$ -Hintergrund. **(A)**  $Su(var)3-9^{Mut}$ -Allele wurden mit endogenen  $Su(var)3-9^{ptn}$ -Mutanten gekreuzt und der Effekt auf die Inversion  $In(1)w^{m4h}$  untersucht. Die amorphen Allele  $Su(var)3-9^{06}$  und  $Su(var)3-9^{07}$  zeigen nur in Männchen einen sehr schwachen *white-mottled*-Phänotyp, während die hypomorphen Allele  $Su(var)3-9^{22}$  und  $Su(var)3-9^{13}$  die Reprimierung des *white*-Gens verstärken und kein *white-mottled*-Phänotyp erkennbar ist. **(B)**  $Su(var)3-9^{Mut}$ -Allele wurden mit dem Transgen  $Su(var)3-9^{ptn}-EGFP$  im  $Su(var)3-9^{17}$ -Hintergrund gekreuzt und der Effekt auf die Inversion  $In(1)w^{m4h}$  untersucht. Die amorphen Allele  $Su(var)3-9^{06}$  und  $Su(var)3-9^{07}$  zeigen in Weibchen und Männchen einen schwachen *white-mottled*-Phänotyp, während die hypomorphen Allele  $Su(var)3-9^{13}$  und  $Su(var)3-9^{22}$  die Reprimierung des *white*-Gens verstärken und kein *white-mottled*-Phänotyp erkennbar ist.

### 3.1.4 Protein-Ligand-Wechselwirkung von SU(VAR)3-9 mit AdoMet und AdoHcy

Die SET-Domäne von SU(VAR)3-9 stellt die katalytisch aktive Domäne der Histonmethyltransferase dar. Das Kosubstrat *S*-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) und der N-Terminus des Histons binden an unterschiedlichen Seiten der SET-Domäne, die durch einen engen hydrophoben Kanal verbunden sind (Xiao et al., 2003). In diesen Kanal wird die Seitenkette des Lysins eingebracht und die Methylgruppe von AdoMet, die genau in diesen Kanal hineinragt auf die Aminogruppe übertragen (Kwon et al., 2003). Als Koproduct entsteht, wie bei jeder AdoMet-abhängigen Methylierungsreaktion, aus AdoMet *S*-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy, Abb.3.10). AdoHcy ist ein starker Inhibitor für AdoMet-abhängige Methyltransferasen (Borchardt and Wu, 1976; Usdin et al., 1982; Bacolla et al., 1999).

Um Wechselwirkungen des Kofaktors AdoMet und des Koproducts AdoHcy mit SU(VAR)3-9 zu untersuchen, wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Karsten Seeger und Christoph Räuber vom Institut für Analytische Chemie in Leipzig Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR-Untersuchungen (STD-NMR) mit rekombinanten SU(VAR)3-9-Proteinen durchgeführt. Die STD-NMR ist eine Liganden-basierte Methode, bei der keine Markierung des Proteins nötig ist, weil die Signale des Liganden detektiert werden (Salvatella und Giralt, 2003). Grundlage dieser Methode ist das unterschiedliche Verhalten des Liganden im gebundenen und im freien Zustand. Im Komplex mit dem Protein verhält sich der Ligand wie das Protein und gibt die gleichen Signale wie ein Makromolekül ab.

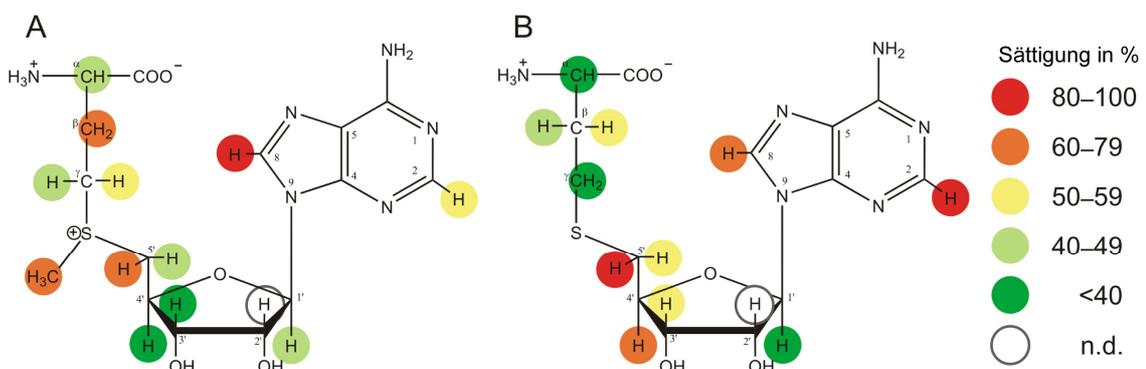


**Abbildung 3.10:** Schematische Darstellung der di-Methylierung des Histon H3 an Lysin 9 durch SU(VAR)3-9. Der Methylendonator ist *S*-Adenosyl-L-methionin (AdoMet). Als Koproduct der Reaktion entsteht *S*-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy).

Nach Dissoziation liegt der Ligand im freien Zustand vor und verhält sich wie ein kleines Molekül, besitzt nun aber noch Informationen aus dem Protein-Ligand-Komplex. Dieser Ligand kann dadurch detektiert werden.

Durch Subtraktion eines NMR-Spektrums ohne Proteinsättigung sind nur die Signale des bindenden Liganden detektierbar, während nicht-bindende Moleküle keine STD-Signale zeigen. Dabei erhalten Ligandenprotonen, die nahe an der Proteinoberfläche sind, einen stärkeren Sättigungstransfer als Ligandenprotonen, die von der Proteinoberfläche entfernt sind (Klein et al., 1999). Dadurch ist es möglich Protonen eines Moleküls zu identifizieren, die einen engen Kontakt zur Proteinoberfläche aufweisen und somit besonders essentiell für die Bindung sind (*epitope mapping*).

Für AdoMet und SU(VAR)3-9 konnte gezeigt werden, dass das Adeninproton H<sub>8</sub> den engsten Kontakt mit dem Protein besitzt (Abb. 3.11A, Seeger et al., 2005). H<sub>5''</sub>, H<sub>β</sub>, und die Methylgruppe des AdoMet weisen ebenfalls einen engen Kontakt auf. Weiter entfernt vom Protein sind H<sub>1'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>α</sub>, H<sub>γ'/γ''</sub> und H<sub>3'/4'</sub> (Abb. 3.11A; Seeger et al., 2005). Das Bindungsepitop von AdoMet mit SU(VAR)3-9 ist in Lösung ähnlich dem von AdoMet in der Kristallstruktur mit SET7/9 (Kwon et al., 2003). Somit ist auch die Struktur der Bindungstasche von SU(VAR)3-9 ähnlich der von SET7/9 (Seeger et al., 2005). Für das Koprodukt AdoHcy konnte auch eine Interaktion mit SU(VAR)3-9 nachgewiesen werden. Die Bindungsepitope von AdoHcy und AdoMet unterscheiden sich von einander. H<sub>2</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>4'</sub> und H<sub>8</sub> des AdoHcy zeigen einen engen Kontakt mit der Proteinoberfläche, während die Protonen des Homocysteins weiter entfernt sind (Abb. 3.11B; Seeger, 2006). Um eine mögliche Ursache für die Hyperaktivität von SU(VAR)3-9<sup>P<sup>tm</sup></sup> zu erhalten, wurden die STD-NMR-Untersuchungen auch mit rekombinantem SU(VAR)3-9<sup>P<sup>tm</sup></sup> durchgeführt und die Bindungsepitope von AdoMet und AdoHcy mit denen zum Wildtyp verglichen.

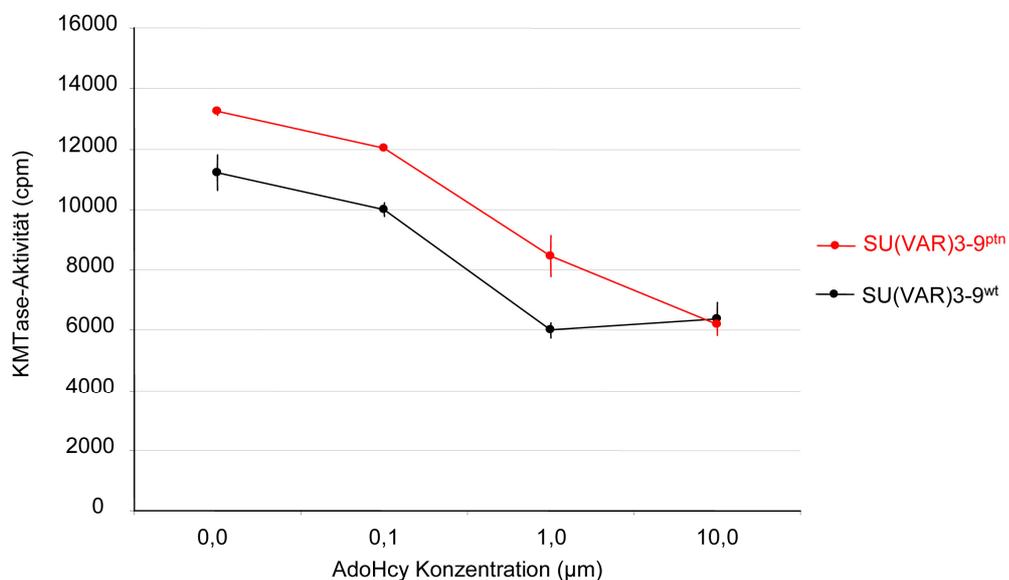


**Abbildung 3.11:** Bindungsepitope von (A) AdoMet und (B) AdoHcy mit SU(VAR)3-9 (Seeger et al., 2005; Seeger, 2006). Das Proton mit der höchsten Sättigung entspricht 100 % und ist der Proteinoberfläche am nächsten.

Sollte AdoHcy weniger stark an SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> binden, würde eine geringere Inhibierung durch das Koprodukt erfolgen und eine erhöhte KMTase-Aktivität wäre die Folge. Das Bindungsepitop von AdoMet für SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> entspricht dem für SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> (Tab. 3.1). Die Bindungstasche ist demnach identisch der von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> (Seeger, 2006). Das Bindungsepitop von AdoHcy für SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> scheint ähnlich dem für SU(VAR)3-9<sup>wt</sup>. Unterschiede im Bindungsverhalten von AdoHcy konnten für SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> nicht detektiert werden (Seeger, 2006).

Um den Einfluss von AdoHcy auf die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> im Vergleich zu SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> zu analysieren, wurden KMTase-Assays mit verschiedenen AdoHcy-Konzentrationen durchgeführt (Abb3.12). Dabei zeigte sich, dass die KMTase-Aktivität des Wildtyp- und des Mutantenproteins durch zusätzliches AdoHcy verringert wird. Die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> verringert sich dabei in gleichem Maße, wie die des Wildtyps (Abb3.12). Demzufolge erfolgt eine Hemmung durch AdoHcy nicht nur beim Wildtyp, sondern auch bei SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup>.

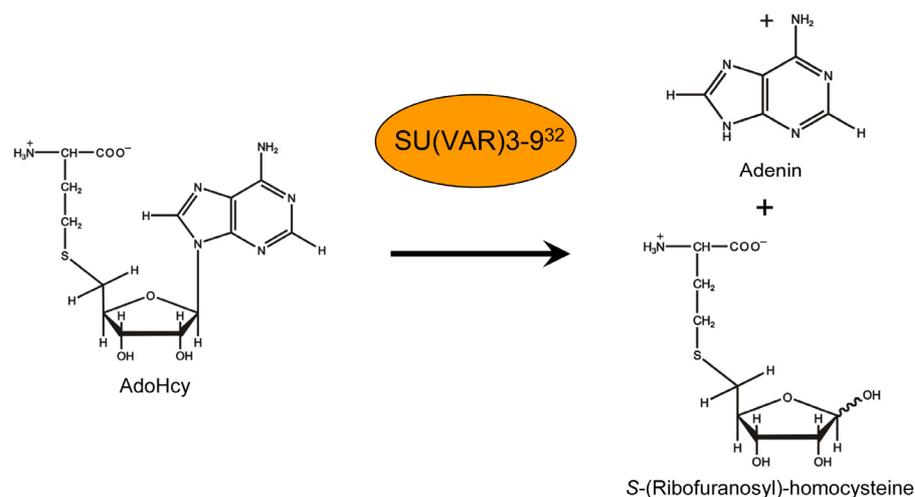
Diese Daten zeigen, dass eine verringerte Inhibierung durch AdoHcy bei SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> als Ursache für die Hyperaktivität ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 3.12:** KMTase-Aktivität *in vitro* von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> in Abhängigkeit von AdoHcy. SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>Ptn</sup> werden durch AdoHcy in ihrer Aktivität gehemmt. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde in Anwesenheit von verschiedenen AdoHcy-Konzentrationen mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

In allen Methyltransferasen ist besonders das NHSC-Motiv hoch konserviert. Dieses Signaturmotiv bildet eine knotenähnliche Struktur, die nur durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird (Xiao et al., 2003). Die Mutante *Su(var)3-9<sup>32</sup>* betrifft das Serin an Position 562 innerhalb des NHSC-Motivs (Abb. 3.5). *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>* besitzt keine KMTase-Aktivität *in vivo* und *in vitro* (Abb. 3.5). Um den Einfluss des NHSC-Motivs auf die Wechselwirkung mit AdoMet und AdoHcy zu untersuchen, wurden die STD-NMR-Analysen mit rekombinantem *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>* durchgeführt und die Bindungs epitope von AdoMet und AdoHcy mit denen zum Wildtyp verglichen. Dabei zeigte sich, dass die meisten Protonen weiter vom Protein entfernt sind. Das H<sub>2</sub> des Adeninteils ist der Proteinoberfläche jedoch deutlich näher (Tab. 3.1). Der Bindungsmodus von AdoMet in *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>* unterscheidet sich somit deutlich vom Wildtyp (Seeger, 2006). Das NHSC-Motiv ist neben dem GWG-Motiv (AS489-AS491) offenbar ebenfalls wichtig für eine korrekte Bindung des AdoMets. Eine Ursache für den Verlust der KMTase-Aktivität von *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>* könnte somit die fehlerhafte Bindung des AdoMets darstellen.

Für AdoHcy konnte ebenfalls eine Bindung in *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>* festgestellt werden. Große Abweichungen zum Wildtyp zeigen H<sub>5'/5''</sub>, H<sub>4'</sub> und H<sub>β''</sub> (Tab. 3.2). Die Lage dieser Protonen zum Protein ist durch den Austausch des Serins 562 nach Phenylalanin in *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>* verändert. Die veränderte Bindung des AdoHcy geht einher mit einer Veränderung der enzymatischen Aktivität von *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>*. Dieses Mutantenprotein ist in der Lage, die glycosidische Bindung des AdoHcy zu spalten (Abb. 3.13; Seeger, 2006).



**Abbildung 3.13:** Spaltung der glycosidischen Bindung von AdoHcy durch *SU(VAR)3-9<sup>32</sup>*. Die Produkte der Reaktion sind Adenin und S-(Ribofuranosyl)-Homocystein.

Das Prolin 571 in SU(VAR)3-9 betrifft einen Bereich der SET-Domäne, der keine Konservierung in Methyltransferasen aufweist. In SU(VAR)3-9<sup>13</sup> ist das Prolin 571 durch ein Serin ausgetauscht. Die KMTase-Aktivität des Mutantenproteins ist geringer als die des Wildtypproteins.

Für AdoMet und SU(VAR)3-9<sup>13</sup> konnte gezeigt werden, dass das Adeninproton H<sub>8</sub> ebenfalls den engsten Kontakt mit dem Mutantenprotein besitzt (Tab. 3.1). H<sub>5''</sub>, H<sub>β</sub>, und die Methylgruppe des AdoMet weisen auch einen engen Kontakt zum Mutantenprotein auf. Weiter entfernt vom Protein sind H<sub>1'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>α</sub>, H<sub>γ'/γ''</sub> und H<sub>3'/4'</sub> (Tab. 3.1). Das Bindungsepitop von AdoMet mit SU(VAR)3-9<sup>13</sup> entspricht somit dem des Wildtyps. Die Mutation in *Su(var)3-9*<sup>13</sup> hat offenbar keinen Einfluss auf die Struktur der Bindungstasche von SU(VAR)3-9.

Die Wechselwirkung von AdoHcy mit SU(VAR)3-9<sup>13</sup> ist ebenfalls mit dem Wildtyp vergleichbar. H<sub>2</sub>, H<sub>5'</sub>, und H<sub>4'</sub> des AdoHcy zeigen einen engen Kontakt mit der Proteinoberfläche, während die Protonen des Homocysteins weiter entfernt sind (Tab. 3.2). Diese Daten zeigen, dass eine veränderte Wechselwirkung von AdoMet und AdoHcy mit SU(VAR)3-9<sup>13</sup> als Ursache für die verringerte KMTase-Aktivität ausgeschlossen werden kann.

**Tabelle 3.1:** Bindungsepitope von AdoMet mit verschiedenen SU(VAR)3-9 Proteinen. Das Proton mit der höchsten Sättigung entspricht jeweils 100 % und ist der Proteinoberfläche am nächsten.

Proton	wt	ptn	13	32
H <sub>8</sub>	100	100	100	100
H <sub>2</sub>	55	48	58	90
H <sub>1'</sub>	43	35	45	39
H <sub>3'/H<sub>4'</sub></sub>	38	26	45	<u>13</u>
H <sub>5''</sub>	60	53	59	<u>34</u>
H <sub>5'</sub>	41	40	43	<u>11</u>
H <sub>α</sub>	46	32	57	<u>-2</u>
H <sub>γ'</sub>	51	32	57	<u>3</u>
H <sub>γ</sub>	49	39	42	<u>-12</u>
SCH <sub>3</sub> (-)	65	55	69	14
H <sub>β</sub>	66	59	70	<u>10</u>

**Tabelle 3.2:** Bindungsepitope von AdoHcy mit verschiedenen SU(VAR)3-9 Proteinen. Das Proton mit der höchsten Sättigung entspricht jeweils 100 % und ist der Proteinoberfläche am nächsten.

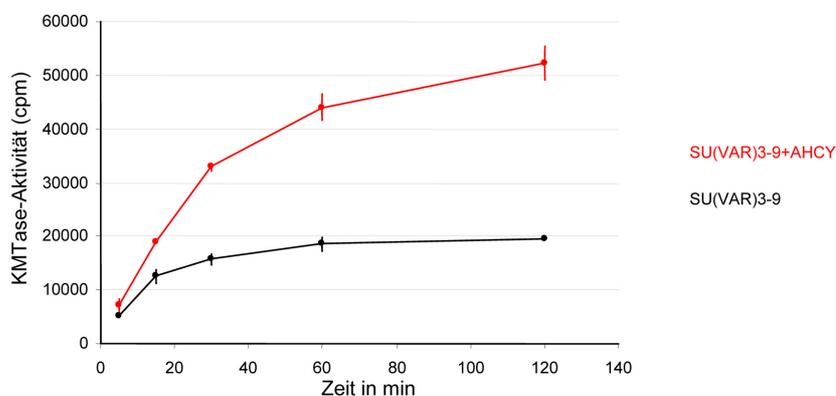
Proton	wt	ptn	13	32
H <sub>8</sub>	63	47	57	49
H <sub>2</sub>	90	86	100	100
H <sub>1'</sub>	32	36	51	24
H <sub>3'</sub>	51	39	57	26
H <sub>4'</sub>	70	100	60	20
H <sub>α</sub>	23	<u>41</u>	25	30
H <sub>5''</sub>	54	<u>18</u>	43	<u>2</u>
H <sub>5'</sub>	100	<u>73</u>	72	<u>19</u>
H <sub>γ</sub>	31	<u>46</u>	37	4
H <sub>β'</sub>	42	<u>73</u>	<u>37</u>	<u>12</u>
H <sub>β''</sub>	54	<u>80</u>	58	12

### 3.1.5 Die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 kann durch Homocystein-Hydrolasen beeinflusst werden

Bei jeder AdoMet-abhängigen Methylierungsreaktion entsteht aus AdoMet das Koprodukt *S*-Adenosyl-L-homocystein. AdoHcy ist ein starker Inhibitor für AdoMet-abhängige Methyltransferasen (Borchardt and Wu, 1976; Usdin et al., 1982; Bacolla et al., 1999).

Der Einfluss von AdoHcy auf die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9, wurde mittels KMTase-Assays mit verschiedenen AdoHcy-Konzentrationen untersucht. Die Aktivität des Wildtyp-SU(VAR)3-9 und des hyperaktiven Mutantenproteins SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> wurden durch zusätzliches AdoHcy verringert. Die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> verringert sich dabei in gleichem Maße, wie die des Wildtyps (Abb3.12).

Die Methylierung des Histon H3 ist durch die Hemmung der KMTase-Aktivität durch AdoHcy limitiert. Der Abbau des Koprodukts AdoHcy würde es ermöglichen, diese Beschränkung teilweise aufzuheben. *S*-Adenosyl-L-homocystein-Hydrolasen (AHCY) sind in der Lage, durch hydrolytische Spaltung AdoHcy zu Adenosin und Homocystein abzubauen (Cantoni und Scarano, 1954). Um den Einfluss einer AHCY auf die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zu untersuchen, wurden KMTase-Assays mit AHCY und ohne AHCY durchgeführt. (Abb. 3.14). In Anwesenheit der AHCY konnte eine wesentlich erhöhte KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 festgestellt werden.

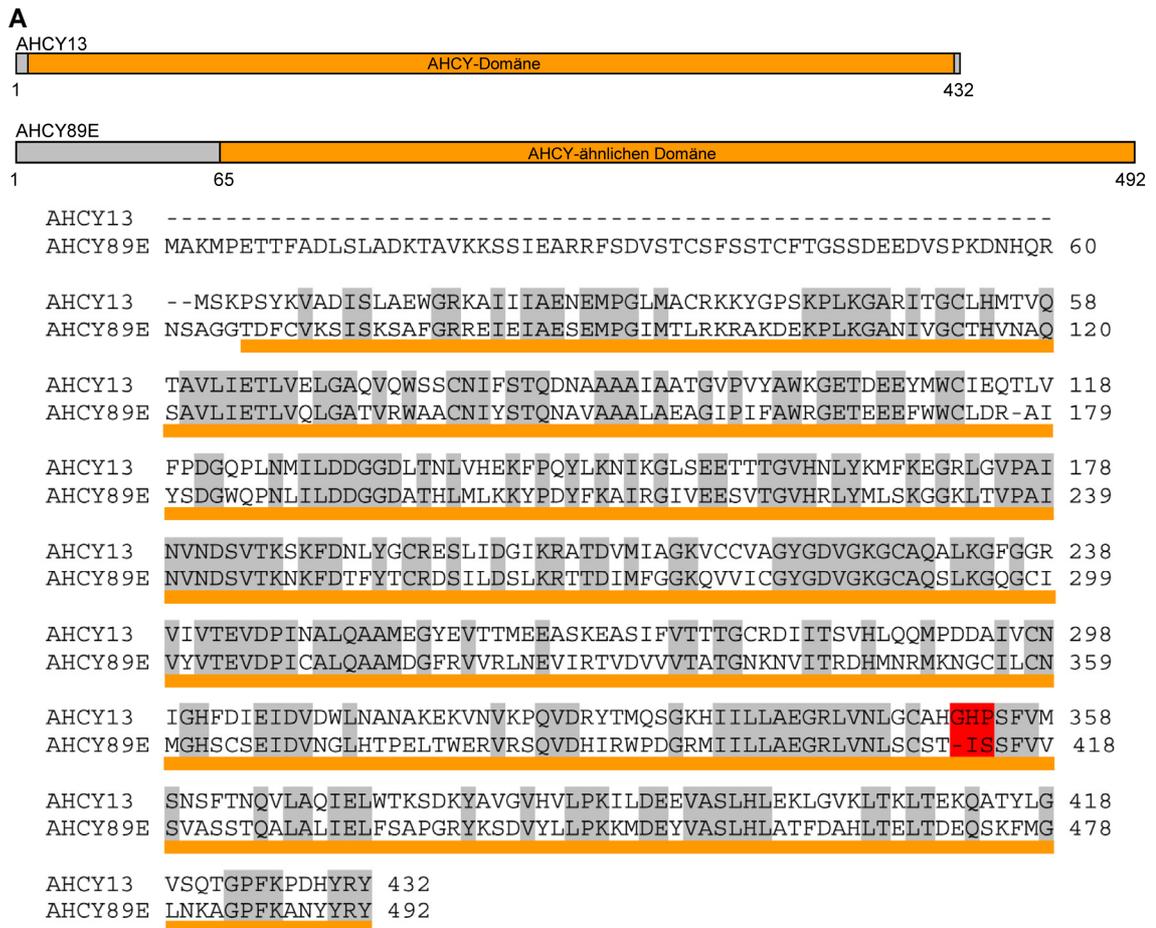
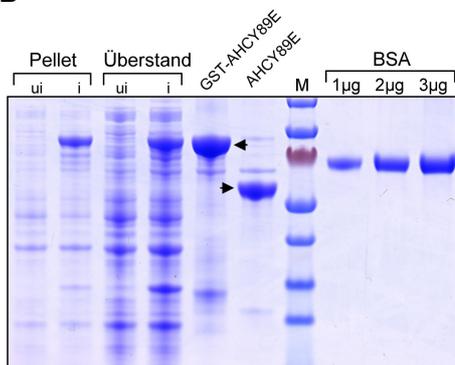
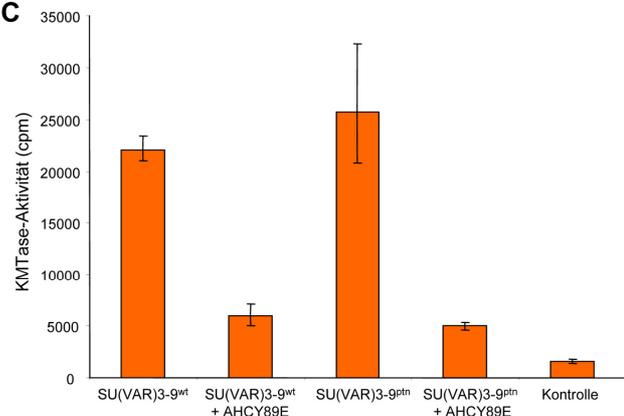


**Abbildung 3.14:** KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 mit und ohne AHCY. Die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 in Anwesenheit der AHCY ist wesentlich erhöht. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

Das Gen *Ahcy89E* in *Drosophila*, das für eine putative AHCY kodiert, ist in der Region 89E5 auf dem 3. Chromosom lokalisiert. Das Gen *Ahcy13* kodiert für eine funktionale AHCY (Caggese et al., 1997). AHCY89E gehört zu einer Gruppe von Proteinen, welche in der AHCY-ähnlichen Domäne Unterschiede in konservierten Aminosäuren aufweisen (Abb. 3.15A; Caggese et al., 1997). Daher werden sie als Familie der AHCY-ähnlichen Proteine zusammengefasst (AHCYL; Dekker et al., 2002; Bujnicki et al., 2003; Cooper et al., 2006). Das menschliche AHCYL1, das ebenfalls zu dieser Proteinfamilie gehört, ist in medikamentenresistenten Krebszellen herunterreguliert (Wittig et al., 2002). Der charakteristische Aminosäureunterschied zwischen AHCY- und AHCYL-Proteinen betrifft die AdoHcy-Bindungstasche. In AHCY-Proteinen befindet sich ein hoch konserviertes GHP-Motiv, das in AHCYL-Proteinen nicht vorkommt (Bujnicki et al., 2003).

Das AHCY-ähnliche Protein AHCY89E wurde bislang nicht funktionell charakterisiert. Globale Expressionsanalysen zeigen, dass *Ahcy89E* besonders im Embryo und in Larven exprimiert wird (Celniker et al., 2009). Um ein rekombinantes AHCY89E zu erhalten, wurde die cDNA von *Ahcy89E* kloniert (Gebhardt, pers. Mitteilung) und ein GST-AHCY89E-Fusionsprotein hergestellt (Abb. 3.15B). Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Christoph Räuber vom Institut für Analytische Chemie in Leipzig wurden STD-NMR-Analysen durchgeführt, um eine mögliche AdoHcy-Bindung zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass AHCY89E in der Lage ist, AdoHcy zu binden (Räuber, pers. Mitteilung).

Um den Einfluss von AHCY89E auf die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 zu untersuchen, wurden KMTase-Assays mit rekombinanten SU(VAR)3-9- und AHCY89E-Proteinen durchgeführt (Abb. 3.15C). Dabei zeigte sich, dass in Anwesenheit von AHCY89E die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>Ptm</sup> stark reduziert ist (Abb. 3.15C). Offenbar besteht eine Wechselwirkung zwischen SU(VAR)3-9 und AHCY89E, die eine Reduktion der KMTase-Aktivität hervorruft.

**B****C**

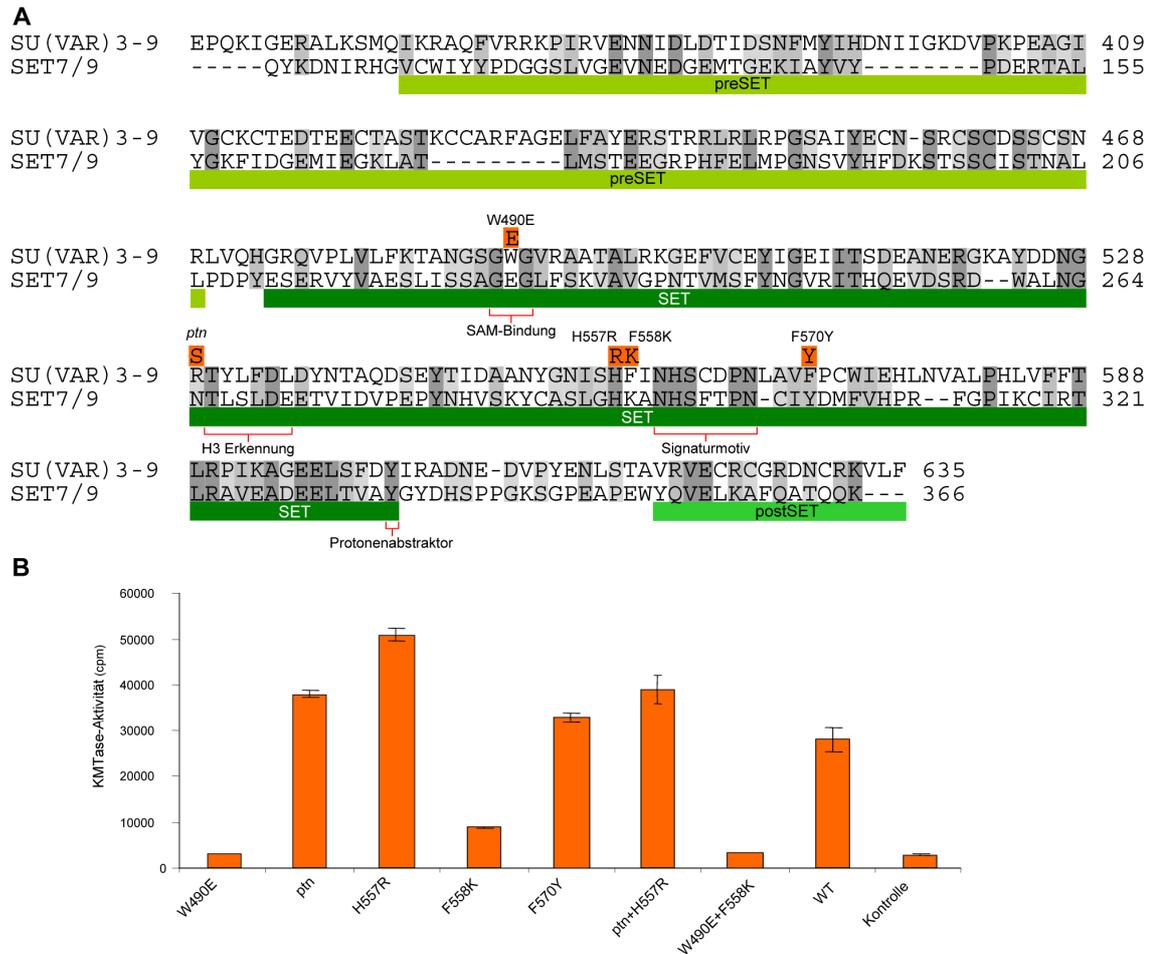
**Abbildung 3.15:** Wechselwirkung von AHCY89E und SU(VAR)3-9. **(A)** Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von AHCY13 und AHCY89E und *Multiple Sequence Alignment* von AHCY13 und AHCY89E. Der charakteristische Aminosäureunterschied zwischen AHCY- und AHCYL-Proteinen ist rot unterlegt. **(B)** Zur Herstellung des GST-AHCY89E-Fusionsproteins wurden die Aminosäuren 1-492 verwendet. Pellet und Überstand von IPTG-induzierten Testexpressionen in *E.coli* BL21-Zellen im Vergleich zum Pellet und Überstand uninduzierter Zellen und Aufreinigung des Fusionsproteins. Die Abspaltung des GST-Tags erfolgte mit PreScission<sup>TM</sup>-Protease. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt und als Leiter (M) der Molekulargewichtsstandard PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. **(C)** KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>ptm</sup>. In Anwesenheit von AHCY89E ist die KMTase-Aktivität stark reduziert.

### 3.1.6 Generierung von hyperaktiven SU(VAR)3-9-Mutantenproteinen

Im Rahmen einer Kooperation mit Marcel Ander vom Institut für Biochemie in Leipzig wurden auf Grundlage der STD-NMR-Analysen und einer computerbasierten Molekülmodellierung von SU(VAR)3-9 weitere Mutantenproteine durch *in vitro* Mutagenese hergestellt (Gebhardt, pers. Mitteilung).

Die H3K4-Methyltransferase SET7/9 aus *Homo sapiens* besitzt zwei nicht konservierte Aminosäuren (E228 und K294), die sich an Stelle von in anderen KMTasen konservierten Aminosäuren befinden (Abb. 3.16A). E228 betrifft das hoch konservierte AdoMet-Bindemotiv, welches in SU(VAR)3-9 als GWG-Motiv, in SET7/9 jedoch als GEG-Motiv auftritt. K294 befindet sich vor dem Signaturmotiv und ist in SU(VAR)3-9 durch F558 repräsentiert. Der jeweilige Austausch W490E im GWG-Motiv bzw. F558K sollte die Aktivität von SU(VAR)3-9 beeinflussen. Der Doppelaustausch von W490E und F558K sollte jedoch eine KMTase-Aktivität hervorrufen, die ähnlich ist, wie die des Wildtypproteins (Ander, 2007). Um die Auswirkungen dieser Aminosäureaustausche auf die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 zu untersuchen, wurden die drei entsprechenden, rekombinanten GST-Mutantenproteine hergestellt und KMTase-Assays mit unmodifizierten Peptiden durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle drei Mutantenproteine keine KMTase-Aktivität besitzen (Abb. 3.16B). Die vorhergesagte KMTase-Aktivität des Doppelaustausches W490E und F558K konnte nicht bestätigt werden.

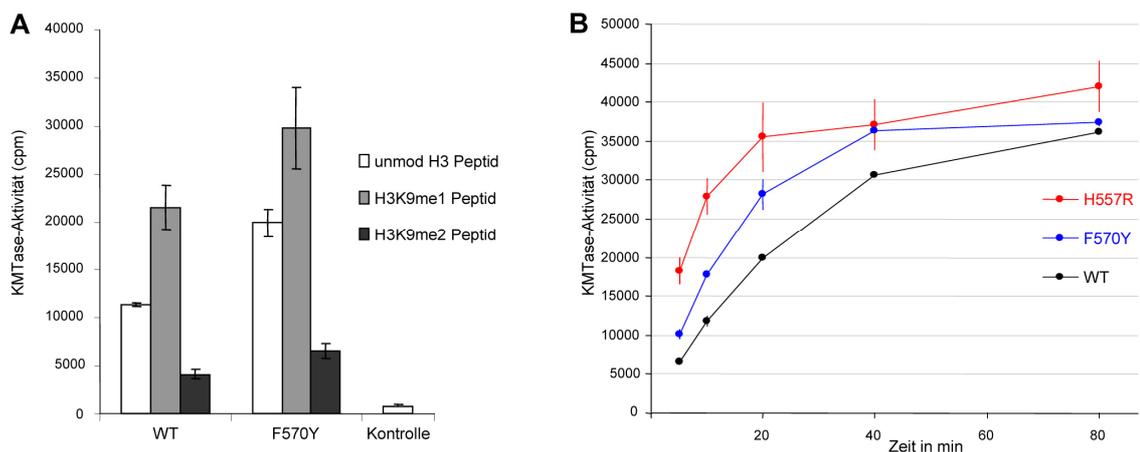
Als nächstes sollte überprüft werden, ob es möglich ist, SU(VAR)3-9, welches *in vitro* eine Mono-, Di- und Trimethylierung vermitteln kann, durch den Austausch einer Aminosäure in eine Monomethyltransferase zu konvertieren. Eine solche Konvertierung konnte für DIM5 und SET7/9 gezeigt werden (Zhang et al. 2003). SET7/9 vermittelt die Monomethylierung an H3K4 und besitzt an Position 305 ein Tyrosin. DIM5 und SU(VAR)3-9 weisen an der homologen Position ein Phenylalanin auf. Durch den Austausch Y305F in SET7/9 konnte eine Di- und Trimethylierung vermittelt werden, wohingegen von der Trimethyltransferase DIM5 durch den Austausch F281Y überwiegend Monomethylierung vermittelt wurde (Zhang et al. 2003). Für SU(VAR)3-9 wurde ein entsprechendes Mutantenprotein hergestellt, welches den Austausch F570Y enthält. Mit SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> wurden KMTase-Assays durchgeführt.



**Abbildung 3.16:** Mutantenanalyse von *Su(var)3-9*. **(A)** *Multiple Sequence Alignment* der SET-Domäne von SU(VAR)3-9 mit SET7/9. Hoch funktionelle Bereiche sind mit roten Klammern beschrieben. Stark konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau unterlegt. Aminosäureaustausche in SU(VAR)3-9 sind in der oberen Reihe eingezeichnet (orange). **(B)** KMTase-Aktivität *in vitro* der SU(VAR)3-9-Mutantenproteine. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt. Als Negativkontrolle wurde GST verwendet.

Als Substrate dienten unmodifizierte bzw. an Lysin 9 mono- und dimethylierte H3-Peptide. Sollte SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> nur noch Monomethylierung vermitteln können, dürfte nur eine stark verringerte Aktivität bei Verwendung der mono- und dimethylierten Peptide auftreten. Bei diesen Experimenten zeigte sich jedoch, dass SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> trotzdem Di- und Trimethylierung konvertieren kann (Abb. 3.17A). Außerdem konnte wider Erwarten eine erhöhte KMTase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bei allen verwendeten Peptiden festgestellt werden. Um einen genauen Einblick in das Ausmaß der Hypermethylierung durch SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> zu erlangen, wurde die KMTase-Aktivität *in vitro* von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> in Abhängigkeit von der Reaktionszeit untersucht (Abb. 3.17B). Dabei zeigte sich, dass SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> zu jedem Zeitpunkt eine signifikant höhere Methyltransferaseaktivität aufweist.

Als nächstes sollte durch einen Aminosäureaustausch in SU(VAR)3-9 die KMTase-Aktivität gezielt gesteigert werden. Für das humane Homologe von SU(VAR)3-9 SUV39H1 konnte eine solche Steigerung gezeigt werden (Rea et al., 2000). SUV39H1 besitzt an Position 320 ein Histidin. Durch den Austausch H320 nach Arginin in SUV39H1 wurde eine massive Erhöhung der KMTase-Aktivität verursacht. Für SU(VAR)3-9 wurde ein entsprechendes Mutantenprotein hergestellt. Die homologe Position in SU(VAR)3-9 betrifft das H557, das zu einem Arginin ausgetauscht wurde. Von SU(VAR)3-9<sup>H557R</sup> wurde die KMTase-Aktivität bestimmt und mit der Aktivität der anderen Proteine verglichen. Dabei zeigte sich, dass SU(VAR)3-9<sup>H557R</sup> die höchste Aktivität aller Proteine aufweist und sogar die Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> übertrifft (Abb. 3.16B). Außerdem wurde die Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>H557R</sup> in Abhängigkeit von der Reaktionszeit untersucht und mit dem Wildtypprotein verglichen (Abb. 3.17B). Dabei zeigte sich, dass SU(VAR)3-9<sup>H557R</sup> zu jedem Zeitpunkt eine erhöhte Methyltransferaseaktivität aufweist. Auf dieser Grundlage sollte nun ein SU(VAR)3-9-Mutantenprotein hergestellt werden, welches einen Doppelaustausch enthält und eine noch höhere KMTase-Aktivität aufweist als SU(VAR)3-9<sup>H557R</sup>. Zum einen sollte dieses Protein den Austausch von SU(VAR)3-9<sup>ptn</sup> enthalten, zum anderen den Austausch H557R. Die vorhergesagte KMTase-Aktivität des Doppelaustausches ptn und H557R konnte jedoch nicht bestätigt werden. Dennoch weist SU(VAR)3-9<sup>ptn+H557R</sup> eine höhere KMTase-Aktivität als der Wildtyp auf (Abb. 3.16B)



**Abbildung 3.17:** KMTase-Assays mit hyperaktiven SU(VAR)3-9-Mutantenproteinen. **(A)** Jeweils 1µg unmodifiziertes bzw. mono- oder dimethyliertes H3-Peptid (AS 1-20) wurde mit 1µg SU(VAR)3-9 bzw. SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> und 0,5µCi SAM inkubiert. Die Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> ist generell höher, als die des Wildtypproteins. **(B)** KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup>, SU(VAR)3-9<sup>F570Y</sup> und SU(VAR)3-9<sup>H557R</sup> an unmodifizierten H3-Peptiden (AS 1-20) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die KMTase-Aktivität der Mutantenproteine ist wesentlich erhöht. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

### 3.2 dG9a ist keine spezifische H3K9-Methyltransferase

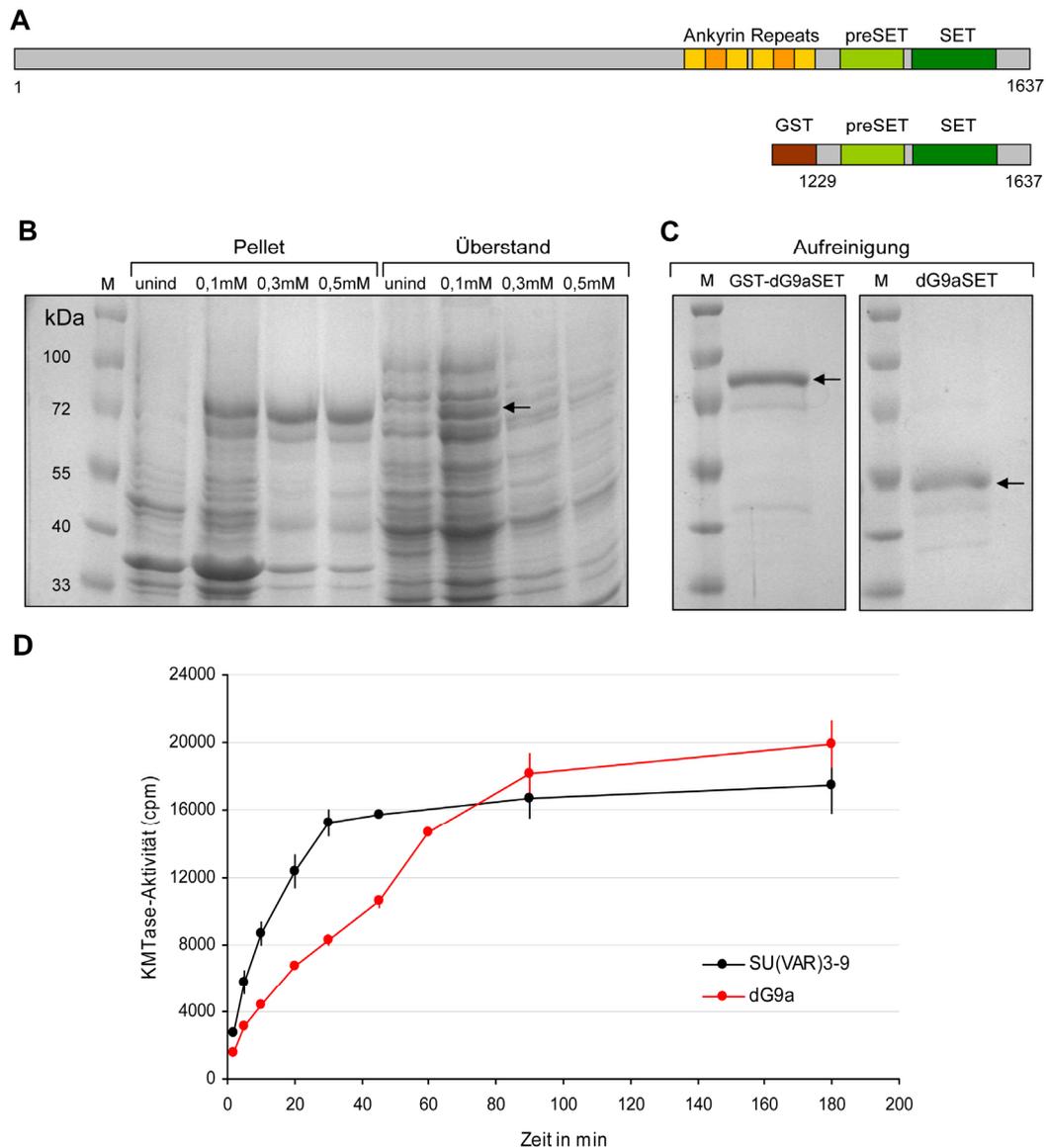
Die Methylierung von Lysinen am Histon H3 und Histon H4 durch Methyltransferasen spielt eine Schlüsselrolle bei der Etablierung von Chromatinstrukturen. Die Methylierung von H3K9 ist generell mit Heterochromatin und *Gensilencing* verbunden (Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001). Das humane SUV39H1 und das *Drosophila* homologe SU(VAR)3-9 sind heterochromatische H3K9-Methyltransferasen (Schotta et al., 2002; Peters et al., 2003; Ebert et al., 2004). SUV39H1 vermittelt die H3K9me3 im perizentrischen Heterochromatin wohingegen mG9a H3K9me1 und H3K9me2 im Euchromatin reguliert. In *Drosophila* sind zwei H3K9-spezifische Methyltransferasen sehr gut charakterisiert. SU(VAR)3-9 di- und trimethyliert H3K9 im Chromozentrum und ist somit eine heterochromatinassoziierte H3K9-Methyltransferase (Schotta et al. 2002; Ebert et al. 2004; Ebert et al. 2006). In polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Su(var)3-9*-Nullmutanten ist die H3K9me1 nicht signifikant verändert. Im Gegensatz dazu ist H3K9me2 im Chromozentrum stark reduziert und H3K9me3 nahezu vollständig verloren (Ebert et al. 2004). Im 4. Chromosom von *Su(var)3-9*-Null-Larven ist die H3K9-Methylierung unbeeinflusst (Ebert et al. 2004). Der Kern des Chromozentrums, der in Wildtypchromosomen mit H3K9me3 angereichert ist, ist in *Su(var)3-9*-Mutanten H3K9 dimethyliert (Ebert et al., 2006). Für die H3K9-Methylierung im 4. Chromosom ist SETDB1 verantwortlich (Seum et al. 2007a). SETDB1 mono- und dimethyliert H3K9 in einigen Banden im Euchromatin, dimethyliert H3K9 im 4. Chromosom und ist nötig für Transgen-*Silencing* im 4. Chromosom (Seum et al. 2007a). Zumindest eine weitere H3K9-Methyltransferase muss in die H3K9-Methylierung involviert sein, da H3K9me1 im Chromozentrum, H3K9me2 an den Telomeren und H3K9me1 und H3K9me2 in einigen euchromatischen Banden nicht durch SU(VAR)3-9 oder SETDB1 vermittelt werden. Ein Kandidat für diese H3K9-Methyltransferase ist dG9a, das *Drosophila* Homologe von G9a aus Säugern (Abb. 3.18). CG2995 (*dG9a*) wurde durch Sequenzanalysen als das *Drosophila* Homologe zum Säugerprotein mG9a identifiziert (Mis et al., 2006; Stabell et al., 2006). *dG9a* ist in Region 1A1 auf dem X-Chromosom lokalisiert. mG9a ist eine euchromatische H3K9-Mono- und Dimethyltransferase und involviert in das *Silencing* von entwicklungsabhängig regulierten Genen (Tachibana et al., 2001; Tachibana et al., 2002; Rice et al., 2003; Roopra et al., 2004; Feldman et al., 2006).

### 3.2.1 Generierung eines rekombinanten, funktionalen dG9aSET-Proteins

Zur Herstellung eines funktionalen dG9aSET-Proteins wurde ein 409 Aminosäuren großes Fragment, welches die SET-Domäne von G9a enthält, rekombinant exprimiert. Ein 1224bp großes DNA-Fragment, das für die AS 1229-1637 kodiert, wurde in den Vektor pGEM-T (Promega) subkloniert (Abb. 3.19A). Über SalI und NotI wurde das DNA-Fragment in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) kloniert. Dieser Vektor enthält neben der GST-Sequenz auch eine Sequenz, welche für eine Schnittstelle der PreScission<sup>TM</sup>-Protease kodiert und gibt somit die Möglichkeit der Abspaltung des GST-Tags. Die Expression des ca. 74 kDa großen GST-Fusionsproteins erfolgte intrazellulär im *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLys.



**Abbildung 3.18:** Proteinstruktur von G9a. **(A)** Schematische Darstellung der Proteinstruktur von dG9a und mG9a (Säuger). **(B)** Multiple Sequence Alignment der SET-Domäne von dG9a mit seinem Homologen mG9a. Stark konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau unterlegt.



**Abbildung 3.19:** Überexpression und KMTase-Aktivität der SET-Domäne von dG9a. **(A)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von dG9a und des GST-dG9aSET-Fusionsproteins. Zur Herstellung des Proteins GST-dG9aSET wurden die Aminosäuren 1229-1637 verwendet. **(B)** Pellet und Überstand von IPTG-induzierten (0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM) Testexpressionen in *E.coli* BL21-Zellen im Vergleich zum Pellet und Überstand uninduzierter Zellen. **(C)** Aufreinigung des GST-dG9aSET-Fusionsproteins. Die Aufreinigung des ca. 75 kDa großen Fusionsproteins erfolgte mit Glutathione-Sepharose® 4B. Die Abspaltung des GST-Tags vom ca. 45 kDa großen dG9aSET-Protein erfolgte mit PreScission™-Protease. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt und als Leiter (M) der Molekulargewichtsstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. **(D)** KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 und dG9a in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die Aktivität von SU(VAR)3-9 ist zu Beginn wesentlich höher. Erst nach 80 min ist die KMTase-Aktivität von dG9a höher. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

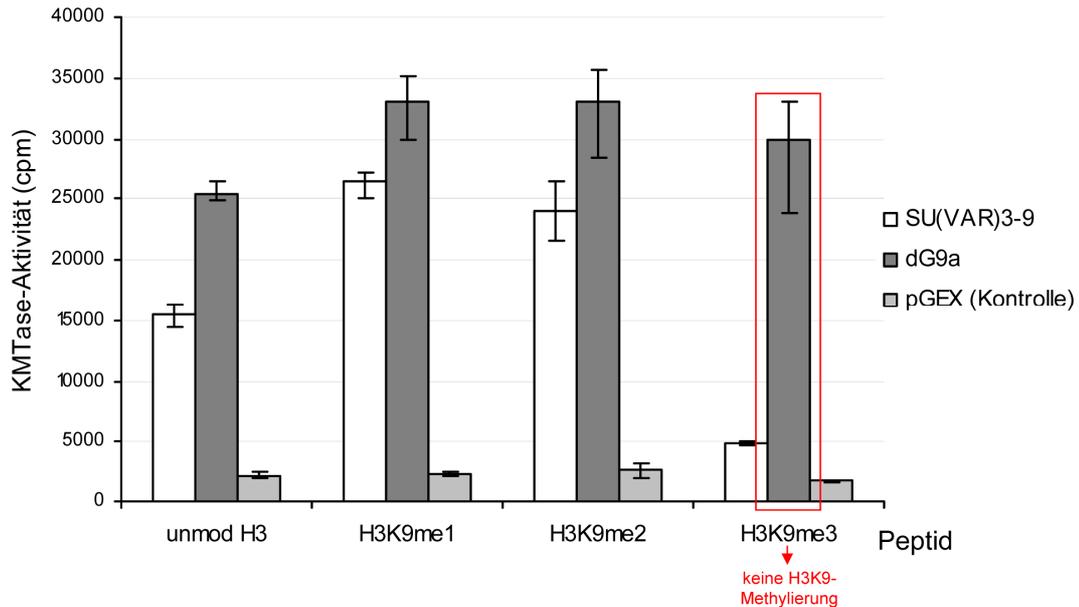
Die induzierten Testexpressionen über Nacht bei 18°C und einer IPTG-Konzentration von 0.1 mM, 0.3 mM und 0.5 mM ergaben ein lösliches GST-Fusionsprotein (Abb. 3.19B).

Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte über Glutathione-Sepharose® 4B-Chromatographie (Amersham Biosciences). Der GST-Tag wurde durch eine Pre-Scission™-Protease-Behandlung abgespalten (Abb. 3.19C). Um das erhaltene Protein aufzukonzentrieren, wurde eine Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheit (Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet.

Um die KMTase-Aktivität des rekombinanten dG9a-Proteins zu untersuchen, wurde die KMTase-Aktivität *in vitro* von SU(VAR)3-9 und dG9a in Abhängigkeit von der Reaktionszeit untersucht (Abb. 3.19D). Dabei konnte eine deutliche KMTase-Aktivität von dG9a nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum humanen mG9a, welches im Vergleich zu SUV39H1 hyperaktiv ist (Tachibana et al. 2001), ist die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 in der Anfangsphase der Reaktion höher als die von dG9a. Erst nach 80 min ist die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 geringer als die von dG9a.

### **3.2.2 dG9a zeigt keine spezifische H3K4- und H3K9-Methyltransferaseaktivität**

Das humane G9a ist in der Lage, *in vitro* Methylgruppen auf H3K9 und auf H3K27 zu übertragen (Tachibana et al. 2001). *In vivo* jedoch ist mG9a eine euchromatische H3K9-Mono- und Dimethyltransferase (Tachibana et al., 2002; Peters et al., 2003; Rice et al., 2003). Um die Abhängigkeit der H3K9-Methylierung von dG9a *in vitro* zu untersuchen, wurde das rekombinante GST-dG9aSET-Fusionsprotein bzw. das rekombinante GST-SU(VAR)3-9-Fusionsprotein mit <sup>3</sup>H-markiertem AdoMet und N-terminalen Histon H3-Peptiden inkubiert und die in das Peptid eingebaute Radioaktivität als das Maß für die Methyltransferaseaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Als Substrate dienten unmodifizierte bzw. an Lysin 9 prämethylierte H3-Peptide. Beim Einsatz von unmodifiziertem, K9me1 und K9me2 H3-Peptid konnte bei dG9a und bei SU(VAR)3-9 KMTase-Aktivität nachgewiesen werden. Bei Verwendung des an Lysin 9 trimethylierten H3-Peptids konnte im Gegensatz zu SU(VAR)3-9 bei dG9a eine KMTase-Aktivität gezeigt werden (Abb. 3.20).

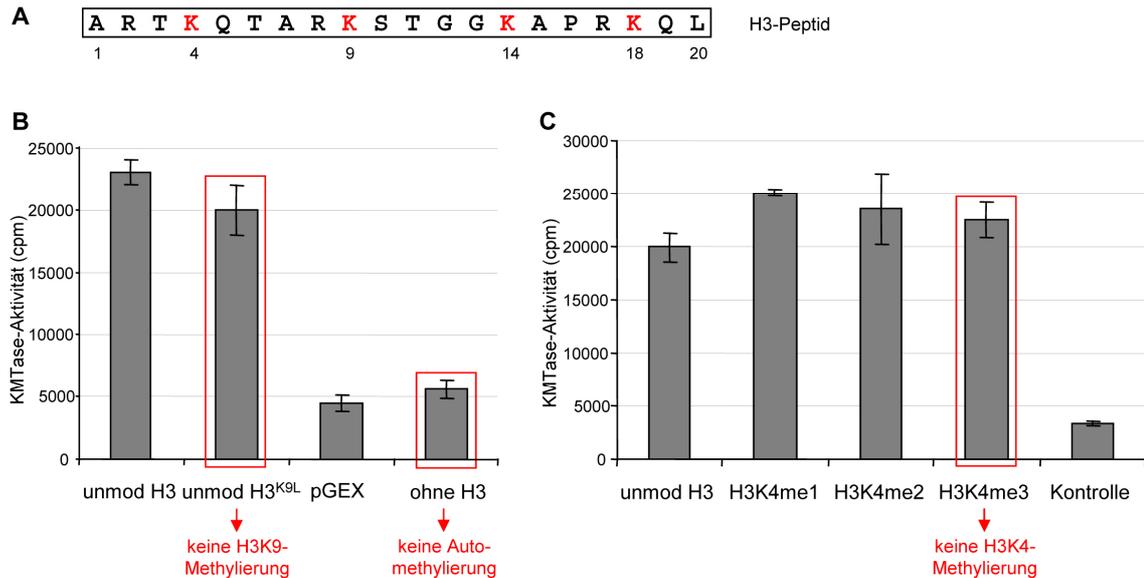


**Abbildung 3.20:** KMTase-Assays mit SU(VAR)3-9 und dG9a an modifizierten H3-Peptiden (AS 1-20). Jeweils 1µg unmodifiziertes bzw. an Lysin9 mono-, di- oder tri-methyliertes H3-Peptid wurde mit 1µg SU(VAR)3-9 bzw. dG9a und 0,5µCi SAM inkubiert. Die Aktivität von dG9a an H3K9me3-Peptid zeigt keine Spezifität für H3K9 (rot). Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

Da keine weitere Methylgruppe auf ein trimethyliertes Lysin übertragen werden kann, ist offenbar ein anderes oder mindestens ein weiteres Lysin von der Methylierung durch dG9a betroffen.

Das H3-Peptid enthält neben Lysin 9 noch weitere Lysine an Position 4, 14 und 18 (Abb. 3.21A). Um die Methylierung von möglichen anderen Lysinen durch dG9a zu bestätigen, wurde ein KMTase-Assay mit einem H3-Peptid durchgeführt, welches an Stelle von Lysin 9 ein Leucin trägt. Unter Verwendung dieses Peptids ist ebenfalls eine KMTase-Aktivität von dG9a nachweisbar (Abb.3.21B). Eine Automethylierung von dG9a kann ausgeschlossen werden, da keine KMTase-Aktivität erkennbar ist, wenn die Reaktion ohne H3-Peptid durchgeführt wird (Abb. 3.21B).

Methylierungen an H3 Lysin 14 oder Lysin 18 sind bis jetzt nicht bekannt. Die Methylierung an H3K4 kennzeichnet generell aktives Chromatin (Zhang und Reinberg, 2001; Bernstein et al., 2002). Um zu prüfen, ob die H3K4-Methylierung einen Einfluss auf die KMTase-Aktivität von dG9a hat oder H3K4 ein mögliches Ziel von dG9a ist, wurden KMTase-Assays mit unmodifizierten bzw. an Lysin 4 prämethylierten H3-Peptiden durchgeführt.



**Abbildung 3.21:** KMTase-Assays mit dG9a an modifizierten H3-Peptiden. **(A)** Aminosäuresequenz des H3-Peptids. Die Lysine sind rot markiert. **(B)** 1µg unmodifiziertes H3-Peptid bzw. H3-Mutantenpeptid (K9L) wurde mit 1µg dG9a und 0,5µCi SAM inkubiert. Die Aktivität von dG9a an dem H3-Mutantenpeptid (K9L) zeigt keine Spezifität für H3K9. Bei Inkubation von dG9a mit 0,5µCi SAM ohne H3-Peptid ist keine Aktivität erkennbar (keine Automethylierung). **(C)** Jeweils 1µg unmodifiziertes bzw. an Lysin 4 mono-, di- oder trimethyliertes H3-Peptid (AS 1-20) wurde mit 1µg dG9a und 0,5µCi SAM inkubiert. Die Aktivität von dG9a an dem H3Kme3-Peptid zeigt keine Spezifität für H3K4. Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

Bei Verwendung des an Lysin 4 mono-, di- bzw. trimethylierten H3-Peptids konnte keine Reduktion der KMTase-Aktivität von dG9a im Vergleich zur Positivkontrolle ohne Prämethylierung festgestellt werden (Abb. 3.21C). Die Aktivität von dG9a an H3K4-trimethyliertem Peptid zeigt, dass ein anderes oder mindestens ein weiteres Lysin von der Methylierung durch dG9a betroffen sein muss, da keine weitere Methylgruppe auf ein trimethyliertes Lysin übertragen werden kann. Diese Daten zeigen, dass zumindest *in vitro* dG9a keine spezifische H3K4- und H3K9-Methyltransferaseaktivität besitzt und im Gegensatz zu SU(VAR)3-9 offenbar relativ unspezifisch Lysine methylieren kann. Mittels massenspektrometrischer Analysen von Peptiden, die durch dG9a methyliert wurden, könnte man untersuchen, ob die Lysine 14 und 18 ebenfalls Ziele von dG9a darstellen. Die Verwendung von Doppel- bzw. Dreifachmutanten des H3 Peptids, in dem entsprechende Lysine ausgetauscht sind, könnte auch Aufschluss über weitere Ziellysine von dG9a geben.

Für dG9a sind weitere Lysine bekannt, die *in vitro* methyliert werden. Lysin 27 von Histon H3, Lysin 8 von Histon H4 und Lysin 12 oder 16 von Histon H4 werden ebenfalls durch dG9a *in vitro* methyliert (Stabell et al., 2006).

### 3.3 Die H3K4-Demethylase SU(VAR)3-3 kontrolliert die Ausbreitung von Heterochromatin

Auf Grund der thermodynamischen Stabilität von Histon-Methylierungen wurde lange Zeit angenommen, dass diese Modifikationen irreversibel sind. Die Entdeckung der ersten lysinspezifischen Demethylase LSD1 zeigte, dass LSD1 je nach gebundenem Kofaktor sowohl die Demethylierung von mono- und dimethyliertem Lysin 4 des Histons H3, als auch die Entfernung einer repressiven H3K9-Methylierung katalysieren kann (Shi et al., 2004, Metzger et al., 2005). SU(VAR)3-3 stellt das *Drosophila* Homologe zu LSD1 dar und besitzt ebenfalls eine SWIRM-Domäne und eine Aminoxidase-Domäne.

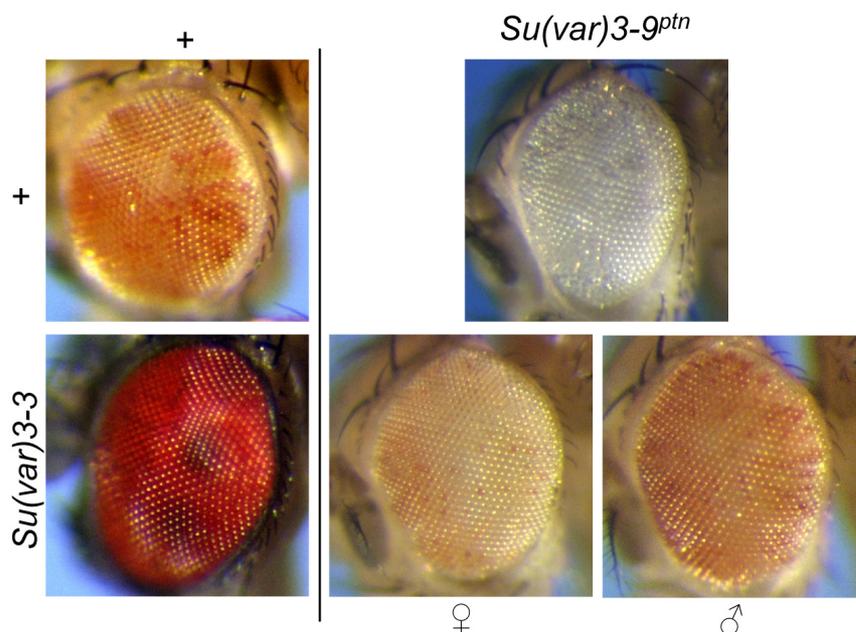
#### 3.3.1 *Su(var)3-3*-Mutanten kompensieren die massive Heterochromatisierung in *Su(var)3-9<sup>tm</sup>*

*Su(var)3-3*-Mutanten gehören zu den stärksten dominanten Suppressoren im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement (Wustman et al., 1989). Homozygote *Su(var)3-3*-Mutanten Weibchen sind steril und entwickeln keine Oocyten in ihren Eikammern, wohingegen in Männchen nur bewegungsunfähige Spermien zu finden sind (Szabad et al., 1988). Diese Mutanten sind außerdem butyratsensitiv und zeigen eine rezessiv letale Interaktion mit zusätzlichem Heterochromatin (Reuter et al., 1982). 22 Mutanten konnten für *Su(var)3-3* isoliert werden (Rudolph et al., 2007). Es wurde bereits beschrieben, dass eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-9* einen Triplo-Enhancereffekt auf PEV aufweist (Tschiersch et al., 1994). Das bedeutet, dass das Markergen in dem jeweiligen PEV-Rearrangement aufgrund der Überexpression des SU(VAR)3-9-Proteins reprimiert wird. In dem PEV-Rearrangement *In(1)w<sup>m4h</sup>* ist in Kombination mit einer zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopie eine komplette Inaktivierung des *white*-Gens zu beobachten. Ein solcher Triplo-Enhancereffekt zeigt sich auch für zusätzliche Kopien von *Su(var)3-7* und *Su(var)2-5*. Eine *Su(var)3-3* Mutante ist in transheterozygoten Fliegen epistatisch über den Enhancereffekt von Zusatzkopien der Genen *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* (Rudolph et al., 2007).

In Fliegen mit zwei Extrakopien von *Su(var)3-9* ist ebenfalls eine signifikante Suppression der Inaktivierung des *white*-Gens erkennbar, wenn eine *Su(var)3-3* Mutante vorhanden ist (Rudolph et al., 2007).

Um das Ausmaß des Einflusses von *Su(var)3-3* auf heterochromatisches *Gensilencing* weiter zu verdeutlichen, wurden transheterozygote Tiere generiert, die eine *Su(var)3-3* Mutante im Hintergrund von *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* tragen. Die hypermorphe Mutation *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* stellt, wie schon beschrieben, den stärksten bisher identifizierten Enhancer für PEV dar. In der Inversion *In(1)w<sup>m4h</sup>* wird durch *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* nicht nur eine komplette Inaktivierung des *white*-Gens, sondern selbst eine teilweise Reprimierung des ca. 180 kb distal lokalisierten *roughest*-Gens hervorgerufen (Kuhfttig et al., 2001).

In transheterozygoten *In(1)w<sup>m4h</sup>;Su(var)3-3/Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* Tieren ist eine deutliche Verminderung der Ausbreitung des Heterochromatins nachweisbar, sichtbar an einer deutlichen Unterdrückung des Enhancereffekts der *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>*-Mutante und der teilweisen Reaktivierung des *white*-Gens bzw. der kompletten Aktivierung des *roughest*-Gens (Abb. 3.22). Dies verdeutlicht, dass SU(VAR)3-3 einen übergeordneten Regulator für die Etablierung heterochromatischen *Gensilencings* darstellt. Außerdem bestätigen diese Daten, dass SU(VAR)3-3 funktionell vor, also „*upstream*“ der Methyltransferase SU(VAR)3-9 agiert.

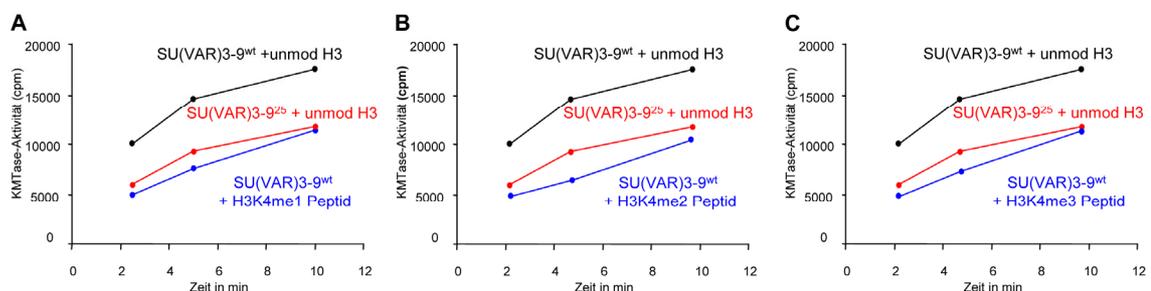


**Abbildung 3.22:** *Su(var)3-3*-Mutanten kompensieren die massive Heterochromatisierung durch *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>*. *Su(var)3-3*-Mutanten gehören zu den stärksten Suppressoren für heterochromatisches *Gensilencing* im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement. *Su(var)3-9<sup>ptn</sup>* zeigt eine komplette *white*- und teilweise *roughest*-Inaktivierung, die in Anwesenheit von *Su(var)3-3*-Mutanten unterdrückt ist.

### 3.3.2 H3K4-Methylierung behindert die H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9

H3K4- und H3K9-Methylierung stellen antagonistische Histonmodifizierungen dar. Im Gegensatz zu heterochromatischen Regionen, die H3K9-Methylierung aufweisen, sind euchromatische Regionen bzw. aktiv transkribierte Gene durch H3K4-Methylierung gekennzeichnet (Zhang und Reinberg, 2001; Bernstein et al., 2002; Kouzarides, 2002). In polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila* ist H3K4-Methylierung überwiegend in Interbanden vorhanden, wobei H3K4me2 auch eine selektive, punktierte Markierung bestimmter Regionen im Chromozentrum zeigt (Ebert, 2005; Ebert et al., 2006). Die Aktivität der humanen H3K9-Methyltransferase SUV39H1 wird durch H3K4-Methylierung stark verringert. Rekombinantes SUV39H1 wurde mit K4-prämethylierten H3-Peptiden inkubiert und zeigte eine verringerte Aktivität (Nishioka et al., 2002).

Um zu untersuchen, welche Auswirkung H3K4-Methylierung auf die KMTase-Aktivität der H3K9-Methyltransferase SU(VAR)3-9 hat, wurde ein rekombinantes GST-Fusionsprotein von SU(VAR)3-9 mit  $^3\text{H}$ -markiertem SAM und Histon H3-Peptid inkubiert und die in das Peptid eingebaute Radioaktivität als das Maß für die Methyltransferaseaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Als Substrate dienten unmodifizierte bzw. an Lysin 4 prämethylierte H3-Peptide. Bei Verwendung des an Lysin 4 mono-, di- und trimethylierten H3-Peptids konnte eine starke Reduktion der KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 im Vergleich zur Positivkontrolle ohne Prämethylierung festgestellt werden (Abb. 3.23). Um diese Reduktion vergleichen zu können, wurde das Mutantenprotein SU(VAR)3-9<sup>25</sup> eingesetzt.



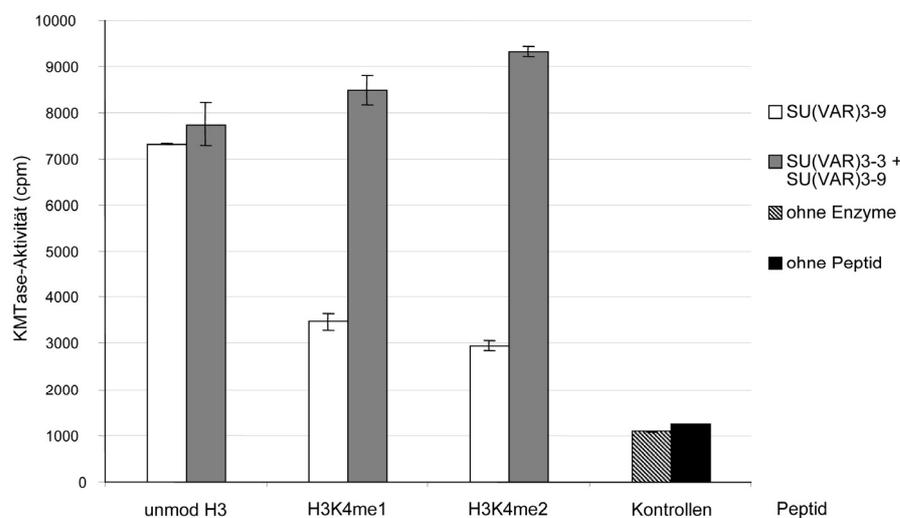
**Abbildung 3.23:** H3K4-Methylierung behindert die H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9. KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> und SU(VAR)3-9<sup>25</sup> an unmodifiziertem H3 Peptid (schwarz und rot) und (A) SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> inkubiert mit H3K4-monomethyliertem Peptid (blau), (B) SU(VAR)3-9<sup>wt</sup> inkubiert mit H3K4-dimethyliertem Peptid (blau) und (C) SU(VAR)3-9 inkubiert mit H3K4-trimethyliertem Peptid (blau). Die auf das H3-Peptid übertragene Radioaktivität wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

In dem hypermorphen Allel *Su(var)3-9<sup>25</sup>* ist ebenfalls eine KMTase-Aktivität nachweisbar, die aber geringer ist als das Wildtypniveau und dennoch einen dominanten Suppressoreffekt aufweist. Diese verminderte KMTase-Aktivität ist offenbar Ursache für den Suppressoreffekt von *Su(var)3-9<sup>25</sup>*, da das *Silencing*-Potenzial von SU(VAR)3-9 mit der KMTase-Aktivität korreliert (Ebert et al., 2004). Die Aktivität von SU(VAR)3-9 und H3K4me1, me2 bzw. me3-Peptiden ist geringer als die Aktivität des Mutantenproteins SU(VAR)3-9<sup>25</sup>.

Dieses Ergebnis zeigt, dass H3K4-Methylierung einen inhibitorischen Effekt auf die H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 ausübt.

### 3.3.3 Die Demethylierung von Histon H3 Lysin 4 durch SU(VAR)3-3 ermöglicht die SU(VAR)3-9 vermittelte H3K9-Methylierung

Die humane Demethylase LSD1 und das *Drosophila* homologe SU(VAR)3-3 sind in der Lage, spezifisch H3K4me1 und H3K4me2 zu entfernen (Shi et al., 2004; Rudolph et al., 2007). Außerdem interagiert das *Drosophila*-Homologe SU(VAR)3-3 in einem Komplex mit HP1, RPD3 und SU(VAR)3-9 (Rudolph et al., 2007). Um zu prüfen, ob SU(VAR)3-3 H3K4-Demethylierung vermittelt und eine H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 ermöglicht, wurde ein rekombinantes SU(VAR)3-3 Protein mit K4-methylierten H3-Peptiden inkubiert und anschließend mit SU(VAR)3-9 und <sup>3</sup>H-markiertem SAM versetzt.



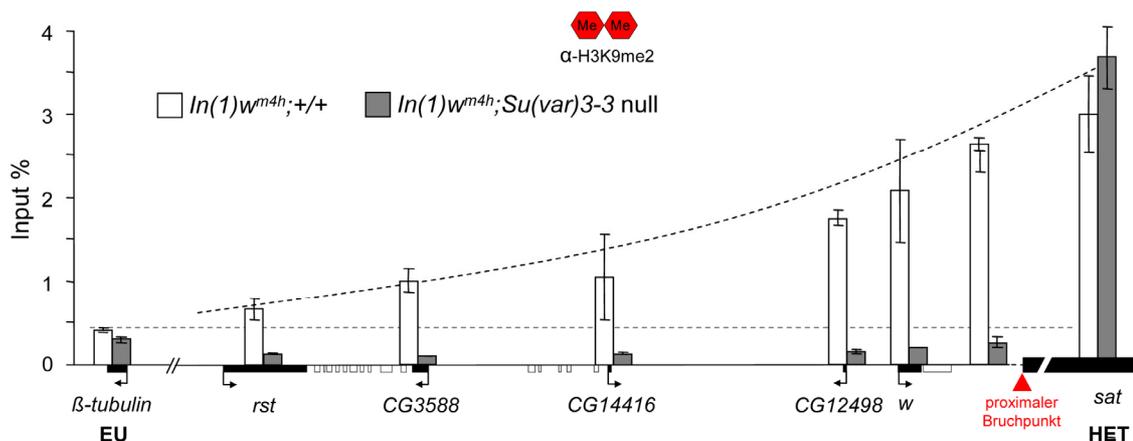
**Abbildung 3.24:** SU(VAR)3-3 ist eine Demethylase für H3K4. Die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 wird durch H3K4me1 und H3K4me2 inhibiert (weiß). Durch Präinkubation der H3-Peptide mit SU(VAR)3-3 erfolgte eine Demethylierung von K4. Die Wildtyp-KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 wird an demethylierten H3-Peptiden nachgewiesen (grau).

Die in das Peptid eingebaute Radioaktivität diente als Maß für die Methyltransferaseaktivität von SU(VAR)3-9 und als Indikator für die Demethylaseaktivität von SU(VAR)3-3. Masato Yonezawa vom IMP in Wien stellte im Rahmen einer Kooperation das rekombinante, aus *Baculovirus* infizierten SF9 Zellen isolierte SU(VAR)3-3 Protein zur Verfügung.

Dieser Versuch zeigte, dass die KMTase-Aktivität von SU(VAR)3-9 auch bei Verwendung der ursprünglich an K4 methylierten und mit SU(VAR)3-3 präinkubierten H3-Peptide nicht beeinträchtigt war (Abb. 3.24). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass SU(VAR)3-3 eine Demethylase für H3K4me1 und H3K4me2 ist und die Methylierung von H3K9 durch SU(VAR)3-9 begünstigt. Die Demethylaseaktivität von SU(VAR)3-3 wurde mit Westernblot-Assays und massenspektrometrischen Analysen durch Masato Yonezawa bestätigt (Rudolph et al., 2007).

### 3.3.4 In *Su(var)3-3*-Mutanten ist die Ausbreitung von H3K9me2 reduziert

In den Embryonen von heterozygoten *Su(var)3-3*-Mutantenweibchen ist ab dem Kernteilungszyklus 14 eine Reduktion der Menge an SU(VAR)3-3 detektierbar. Die Reduktion von SU(VAR)3-3 in den Mutantenembryonen führt zu einer verstärkten H3K4-Dimethylierung in den Kernen des Kernteilungszyklus 14 (Rudolph et al., 2007). Diese für Euchromatin spezifische Modifikation ist durch das Fehlen der Demethylase in bestimmten Bereichen des Heterochromatins detektierbar (Rudolph et al., 2007).



**Abbildung 3.25:** Ausbreitung der heterochromatischen H3K9-Dimethylierung über den proximalen Bruchpunkt des *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangements entlang der *white-roughest*-Region. Der H3K9me2-Gradient ist in *Su(var)3-3*-Nullmutanten nicht detektierbar (grau) im Vergleich zum Wildtyp (weiß).

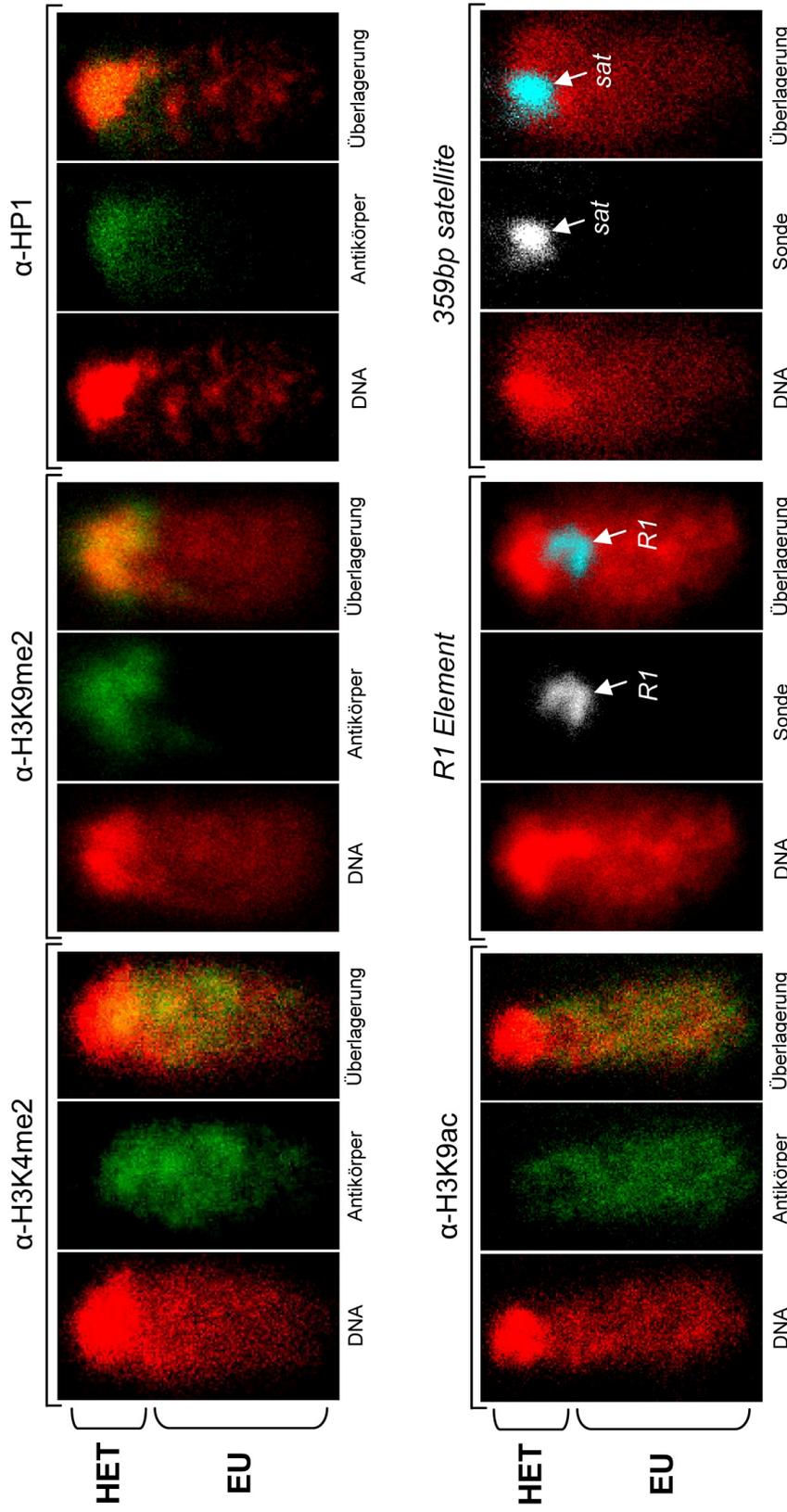
In den Mutantenembryonen führt die verringerte Menge an SU(VAR)3-3 neben einer verstärkten H3K4-Dimethylierung zu einer Reduktion der heterochromatischen H3K9-Dimethylierung (Rudolph et al., 2007). Die H3K9-Trimethylierung im Heterochromatin ist vollständig verloren. Diese Reduktion der heterochromatischen H3K9-Methylierung führt zu einer signifikant verringerten Bindung von HP1 im Heterochromatin (Rudolph et al., 2007). In polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Su(var)3-3*-Nullmutanten ist die H3K4me2 in Interbanden ebenfalls erhöht und die H3K9me2 verringert.

Um die Auswirkungen einer *Su(var)3-3* Nullmutante auf die Ausbreitung der SU(VAR)3-9 vermittelten H3K9-Dimethylierung molekular zu analysieren, wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation die den proximalen Bruchpunkt flankierende, ca. 200 kb große *white-roughest*-Region im Rearrangement *In(1)w<sup>m4h</sup>* untersucht. Dazu wurden transheterozygote *Su(var)3-3*-Nullmutanten mit dem Genotyp *In(1)w<sup>m4h</sup>;Su(var)3-3<sup>09</sup>/Df(3L)XS572* generiert und die adulten Fliegenköpfe analysiert. Die Deletion *Df(3L)XS572* schließt die Region zwischen 76B6-77C1 ein (Ito und Rubin, 1999). Dabei zeigte sich, dass der Gradient aus H3K9me2 in *Su(var)3-3*-Mutanten vollständig verloren ist (Abb. 3.25). Die H3K9me2 in den heterochromatischen *359 bp satellite repeats* ist jedoch unverändert im Vergleich zum Wildtyp [*In(1)w<sup>m4h</sup>;+/+*].

Obwohl die H3K9me2 in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Su(var)3-3*-Nullmutanten verringert ist, sind trotzdem noch H3K9me2 Signale im zentralen Bereich des Chromozentrums detektierbar.

Um einen genaueren Einblick in die Abhängigkeit der Ausbreitung von H3K9me2 von SU(VAR)3-3 zu erhalten, wurde eine weitere heterochromatische Sequenz in die Analysen einbezogen. Diese heterochromatische Sequenz betrifft ein 5357 bp großes *Typ1* retrotransposables Element (*RI*-Element), welches unter anderem in Tandemanordnung distal zu dem rDNA-Cluster auf dem X-Chromosom lokalisiert ist (Kidd und Glover, 1980; Hilliker und Appels, 1982; Jakubczak et al., 1990).

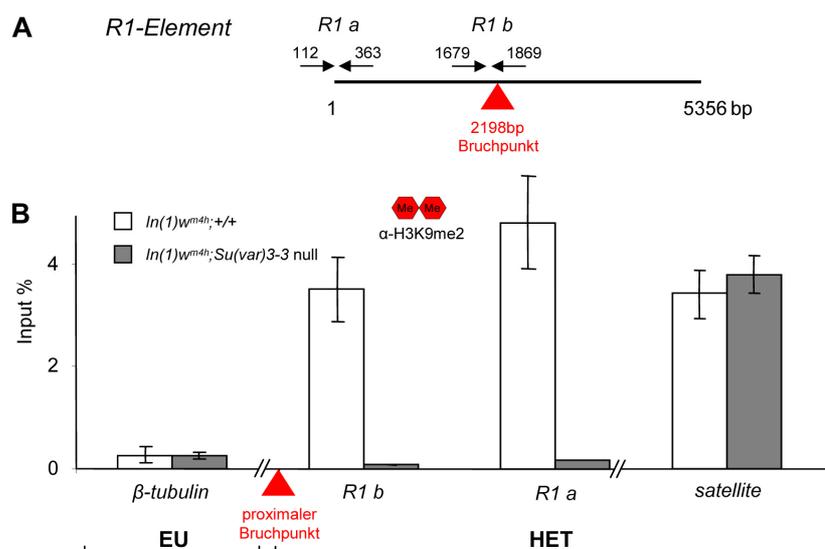
Der distale und der proximale Bruchpunkt der Inversion *In(1)w<sup>m4h</sup>* wurden kloniert und molekular charakterisiert (Ebert, 1999). Dabei zeigte sich, dass der proximale Bruchpunkt in Position 2198 innerhalb eines 5357 bp großen *RI*-Elementes liegt (Ebert, 1999). Mittels FISH wurde die zytologische Lage des *RI*-Clusters in Zyklus 14 Embryonen vergleichend analysiert (Abb. 3.26). Ab Zyklus 10/11 ist erstmals eine Unterscheidung von Eu- und Heterochromatin innerhalb des Kerns möglich. Es bildet sich zu diesem Zeitpunkt eine typische Rab1-Konformation aus (Foe et al., 1993).



**Abbildung 3.26:** Differenzierung von Eu- und Heterochromatin in Kernen des 14. Mitosezyklus. H3K4me2 und H3K9ac kennzeichnen euchromatische, basale Bereiche. H3K9me2 und HP1 kennzeichnen heterochromatische, apikale Bereiche. Die 359 bp satellite repeats zeigen eine Assoziation mit zentralen, heterochromatischen Strukturen. Die R1-Elemente sind hingegen im äußeren Bereich des Heterochromatins detektierbar.

Das zu diesem Zeitpunkt entstehende Heterochromatin ist durch seine verstärkte Anfärbbarkeit mit DNA-Farbstoffen wie DAPI gekennzeichnet und befindet sich am apikalen Pol der Kerne. Euchromatin ist weniger stark mit DAPI färbbar und weist eine basale Orientierung auf (Abb. 3.26). Außerdem sind die aktivierenden Histonmodifizierung H3K4me2 und H3K9ac ausschließlich in den euchromatischen Armen der Chromosomen detektierbar. H3K9me2 kennzeichnet heterochromatische Strukturen im apikalen Bereich der Kerne und überlagert mit der verstärkten DAPI-Färbung. HP1, das mit SU(VAR)3-9 interagiert und H3K9me2 binden kann (Lachner et al., 2001; Schotta et al. 2002; Ebert. 2005), ist ebenfalls an den heterochromatischen Strukturen im apikalen Bereich der Kerne detektierbar. Die Signale, welche mittels FISH für die *359 bp satellite repeats* erhalten wurden, zeigen eine Assoziation mit zentralen, heterochromatischen Strukturen (Abb. 3.26). Die Signale für die *R1*-Elemente sind hingegen im äußeren Bereich des Heterochromatins an der Grenze zwischen Eu- und Heterochromatin erkennbar.

Die heterochromatische H3K9-Dimethylierung in den *R1*-Elementen wurde mit ChIP in *Su(var)3-3*-Nullmutanten untersucht (Abb. 3.27). Im Wildtyp ist an den *R1*-Elementen eine vergleichbare Menge an H3K9me2 zu finden, wie in den *359 bp satellite repeats*. In *Su(var)3-3*-Nullmutanten ist im Gegensatz zu den *359 bp satellite repeats* keine H3K9me2 in den *R1*-Elementen erkennbar. Diese Analysen zeigen, dass SU(VAR)3-3 für die Etablierung und die Ausbreitung von H3K9me2 in perizentrische heterochromatische Bereiche und in flankierende euchromatische Regionen nötig ist.



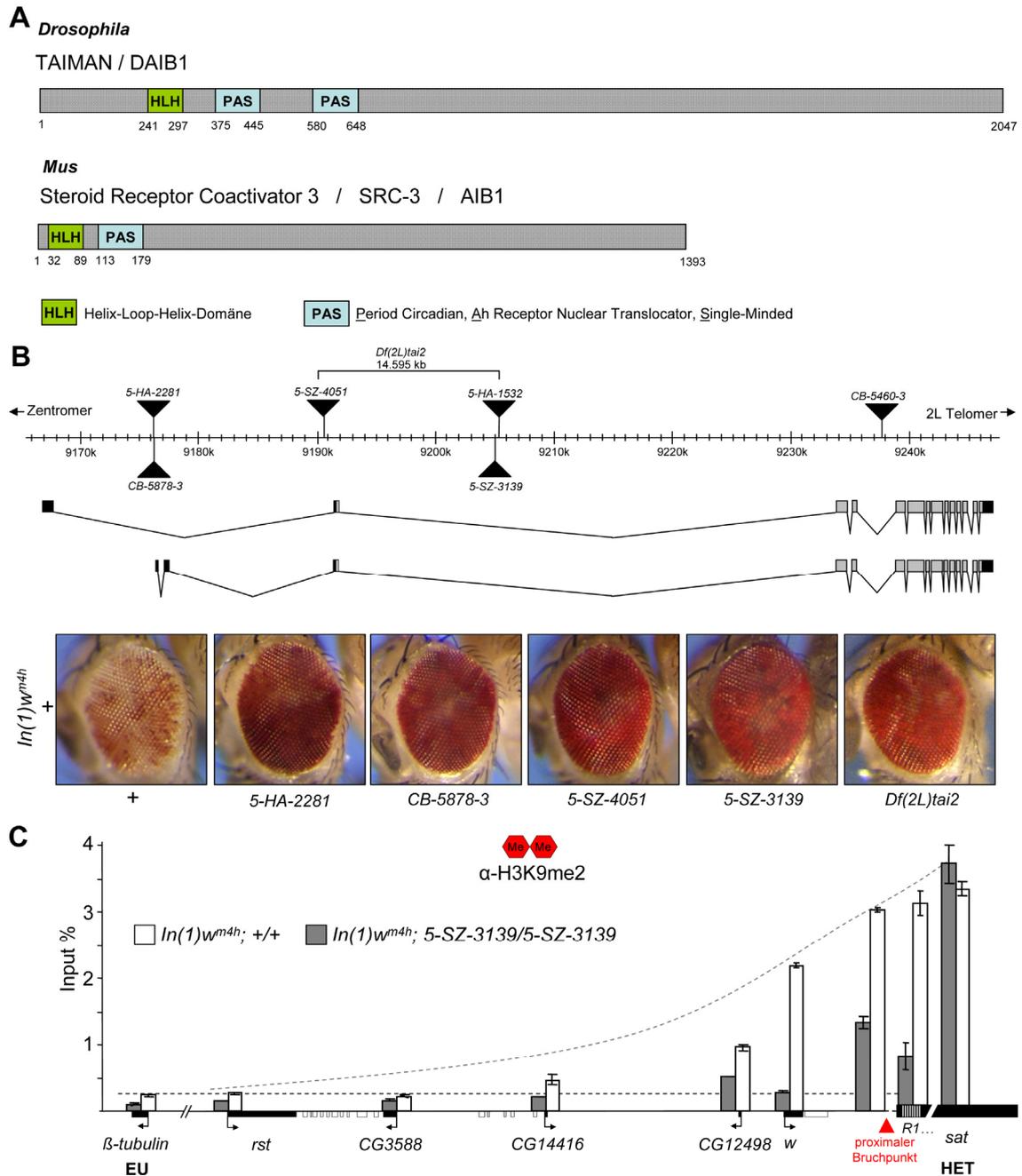
**Abbildung 3.27:** Ausbreitung der heterochromatischen H3K9-Dimethylierung in den *R1*-Elementen. (A) Schematische Darstellung des *R1*-Elements. (B) H3K9me2 ist in *Su(var)3-3*-Nullmutanten an den *R1*-Elementen nicht detektierbar (grau) im Vergleich zum Wildtyp (weiß).

### 3.4 TAIMAN ist in die Kontrolle der Chromatindifferenzierung involviert

Die Differenzierung von Eu- und Heterochromatin erfolgt bei *Drosophila* in der frühen Embryogenese. Die H3K4-Demethylase SU(VAR)3-3, ein Homolog des humanen LSD1, definiert die Grenze zwischen Hetero- und Euchromatin durch Blockierung der Ausbreitung von H3K4me<sub>2</sub> ins Heterochromatin und fördert H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 über Interaktion mit der Deacetylase RPD3 (Rudolph et al., 2007). In einem parallelen Reaktionsweg kontrolliert auch die H3K4me<sub>3</sub>-Demethylase LID die RPD3 Ausbreitung ins Heterochromatin und beeinflusst ebenfalls H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 (Baisch, 2010). Durch die Isolation von *Su(var)*- und *E(var)*-Mutationen für *Gensilencing* bei Positionseffekt-Variegation wurde die Analyse der Chromatindifferenzierung ermöglicht. Molekulare Signale, die die Chromatindifferenzierung in der Embryogenese initiieren, sind unbekannt. Mit der Identifikation des Ecdysonrezeptor-Koaktivatorproteins TAIMAN als *Su(var)* ist es erstmals möglich, molekulare Signale der Initiation dieser Prozesse aufzuklären. Das TAI-Protein beinhaltet eine Helix-Loop-Helix-Domäne und zwei PAS-Domänen. Das homologe Protein aus Säugern ist der Steroidrezeptor-Coaktivator 3 (Abb. 3.28A).

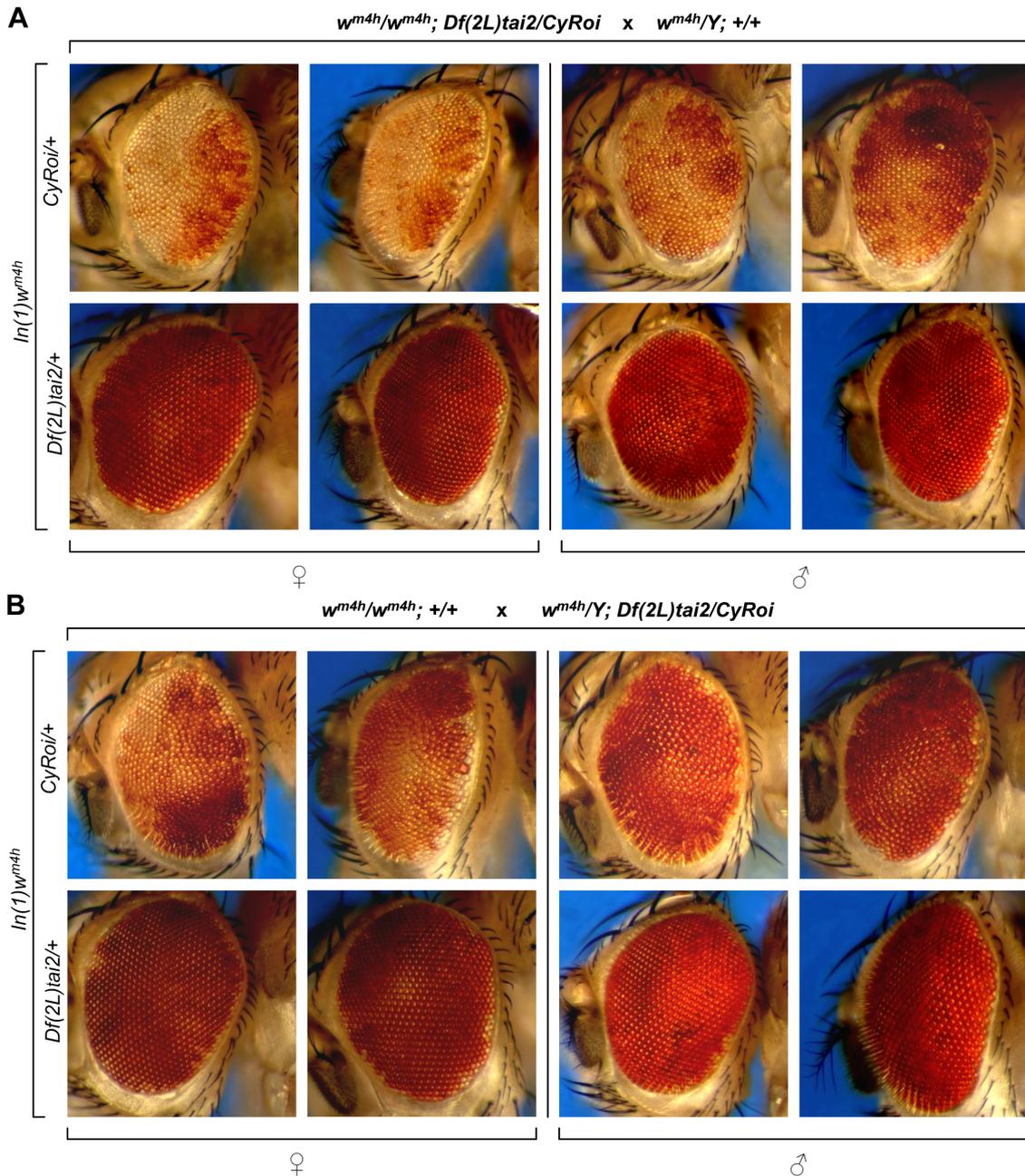
#### 3.4.1 *taiman* ist ein dominanter Suppressor für PEV und beeinflusst die Ausbreitung von H3K9me<sub>2</sub>

Mit Hilfe der DrosDel *P*-Elementkollektion wurde ein *Screening* nach dominanten Suppressoren für PEV im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Hintergrund durchgeführt (Apelt, 2005). *Taiman* wurde in diesem *Screening* als dominanter Suppressor für PEV identifiziert (Apelt, 2005). Neben fünf Insertionsmutanten wurde eine interne, semiletale Deletionsmutante [*Df(2L)tai2*] hergestellt, welche einen Teil eines Exons von *taiman* einschließt (Abb. 3.28B; Apelt, pers. Mitteilung). Alle diese *tai*-Mutanten sind dominante Suppressoren für PEV und eine Duplikation, welche *taiman* einschließt, rettet spezifisch die *Su(var)*-Effekte der *tai*-Mutanten (Apelt, pers. Mitteilung). Die *P*-Element-Insertionslinie *CB-5460-3* trägt eine Insertion im 4. Intron von *taiman* und weist keinen Suppressoreffekt auf. Die *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* (*w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>*; *5-SZ-3139/5-SZ-3139*) ist homozygot lebensfähig und kann als Stamm gehalten werden. Der Suppressoreffekt der Mutanten zeigt, dass *taiman* einen Einfluss auf heterochromatisches *Gensilencing* hat.



**Abbildung 3.28:** *taiman* ist ein dominanter Suppressor für PEV und beeinflusst die Ausbreitung von H3K9me2. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von TAIMAN und des homologen Säugerproteins Steroidrezeptor-Coaktivator 3. (B) Genomische Struktur des *taiman*-Locus und Lage der Insertionsmutanten. Die Deletion *Df(2L)tai2* wurde durch FRT-abhängige Rekombination zwischen den *RS5r*-Elementen 5-SZ-4051 und 5-HA-1532 erzeugt (Apelt, pers. Mitteilung). Mutationen des *taiman*-Gens sind dominante Suppressoren für PEV. Eine teilweise Inaktivierung des *white*-Gens ist durch einen variierten Augenphänotyp (rote und weiße Facetten) gekennzeichnet. In den Insertionsmutanten und der Deletionsmutante wird die Inaktivierung des *white*-Gens durch Heterochromatisierung unterdrückt (rote Facetten). (C) Ausbreitung der heterochromatischen H3K9-Dimethylierung in frühen Embryonen über den proximalen Bruchpunkt des *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangements entlang der *white-roughest*-Region. Ein H3K9me2-Gradient ist in der frühen Embryonalentwicklung erkennbar (weiß). Der H3K9me2-Gradient ist in der hypomorphen, homozygoten *taiman*-Insertionsmutante 5-SZ-3139 signifikant reduziert (grau) im Vergleich zum Wildtyp (weiß). H3K9me2 im heterochromatischen *R1*-Element ist ebenfalls stark reduziert in *taiman*-Mutanten.

In der Kreuzung von  $w^{m4h}/w^{m4h}; Df(2L)tai2/CyRoi$  x  $w^{m4h}/Y; +/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; +/+$  x  $w^{m4h}/Y; Df(2L)tai2/CyRoi$  wurde der Suppressoreffekt der  $Df(2L)tai2$ -Deletion auf die Reprimierung des *white*-Gens in der Inversion  $In(1)w^{m4h}$  analysiert. Dabei zeigte die *tai*-Deletion einen dominanten Suppressoreffekt, unabhängig davon, ob die Mutation maternal oder paternal vererbt wurde (Abb. 3.29).



**Abbildung 3.29:** *tai*man ist ein dominanter Suppressor für PEV. (A) Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; Df(2L)tai2/CyRoi$  x  $w^{m4h}/Y; +/+$ . (B) Augen der F1-Generation aus der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; +/+$  x  $w^{m4h}/Y; Df(2L)tai2/CyRoi$ .

Die H3K9me2 stellt ein wesentliches Mark für heterochromatisches *Gensilencing* in *Drosophila* dar (Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004). Um die Auswirkungen einer *tai*-Mutante auf die Ausbreitung der SU(VAR)3-9 vermittelten H3K9me2 molekular zu analysieren, wurden frühe Embryonen der *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* verwendet und mittels Chromatin-Immunopräzipitation die den proximalen Bruchpunkt flankierende, ca. 200 kb große *white-roughest*-Region im Rearrangement  $In(1)w^{m4h}$  untersucht (Abb. 3.28C).

Dabei zeigte sich, dass der Gradient aus H3K9me2, wie er in adulten Köpfen vorhanden ist, schon in der frühen Embryonalentwicklung etabliert wird und in der *tai*-Mutante signifikant verringert ist (Abb. 3.28C). H3K9me2 in den heterochromatischen *359 bp satellite repeats* ist jedoch unverändert im Vergleich zum Wildtyp [ $In(1)w^{m4h}; +/+$ ].

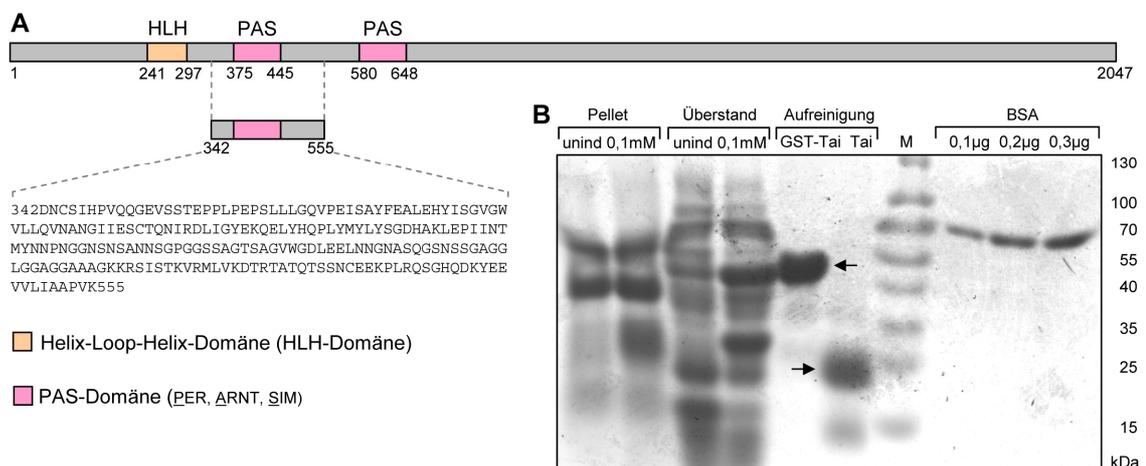
Die heterochromatische H3K9-Dimethylierung in den *RI*-Elementen wurde ebenfalls mit ChIP in der Insertionsmutante untersucht (Abb. 3.28B). Im Wildtyp ist in den *RI*-Elementen eine hohe Menge an H3K9me2 zu finden, ähnlich wie in den *359 bp satellite repeats*. In der Insertionsmutante ist im Gegensatz zu den *359 bp satellite repeats* eine starke Verringerung von H3K9me2 in den *RI*-Elementen erkennbar. TAIMAN ist demnach für die Ausbreitung von H3K9me2 in perizentrische, heterochromatische Bereiche und in flankierende euchromatische Regionen nötig.

Der Suppressoreffekt der Mutanten und die starke Reduktion von H3K9me2 in der *white-roughest*-Region im Rearrangement  $In(1)w^{m4h}$  zeigen, dass das Ecdysonrezeptor-Koaktivatorprotein TAIMAN in die Kontrolle der Heterochromatinbildung und die Etablierung von heterochromatischem *Gensilencing* involviert ist.

### 3.4.2 Generierung eines polyklonalen TAIMAN-spezifischen Antikörpers

Zur Herstellung eines TAIMAN spezifischen Antiserums wurde ein 214 Aminosäuren großes Fragment aus TAIMAN rekombinant exprimiert. Ein 642 bp großes DNA-Fragment, das für die AS 342-555 kodiert, wurde in den Vektor pGEM-T (Promega) subkloniert (Abb. 3.30A). Über BamHI und NotI wurde das DNA-Fragment in den Expressionsvektor pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences) kloniert. Dieser Vektor enthält neben der GST-Sequenz auch eine Sequenz, welche für eine Schnittstelle der Pre-Scission<sup>TM</sup>-Protease kodiert und gibt somit die Möglichkeit der Abspaltung des GST-Tags. Die Expression des ca. 53 kDa großen GST-Fusionsproteins erfolgte intrazellulär im *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLys. Die induzierte Testexpression über Nacht bei 18°C und einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM ergab ein vollständig lösliches GST-Fusionsprotein ohne Bildung von *inclusion bodies* (Abb. 3.30B).

Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte über Glutathione-Sepharose<sup>®</sup> 4B-Chromatographie (Amersham Biosciences). Um eine Antikörperbildung gegen den GST-Tag zu vermeiden, wurde dieser durch eine Pre-Scission<sup>TM</sup>-Protease-Behandlung abgespalten (Abb. 3.30B).



**Abbildung 3.30:** Überexpression und Reinigung des TAIMAN-Proteinfragments zur Antikörperherstellung. **(A)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von TAIMAN. Zur Antigenherstellung wurden die Aminosäuren 342-555 verwendet. **(B)** Extrakt einer IPTG-induzierte Testexpression in *E. coli* BL21-Zellen im Vergleich zum Extrakt uninduzierter Zellen. Die Aufreinigung des ca. 53 kDa großen Fusionsproteins erfolgte mit Glutathione-Sepharose<sup>®</sup> 4B. Die Abspaltung des GSTs vom TAIMAN-Proteinfragment erfolgte mit PreScission<sup>TM</sup>-Protease. Zur Bestimmung der erhaltenen Proteinmenge wurden 1 µg, 2 µg bzw. 3 µg eines BSA-Standarts (≈70kDa) aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt und als Leiter der Molekulargewichtsstandard PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

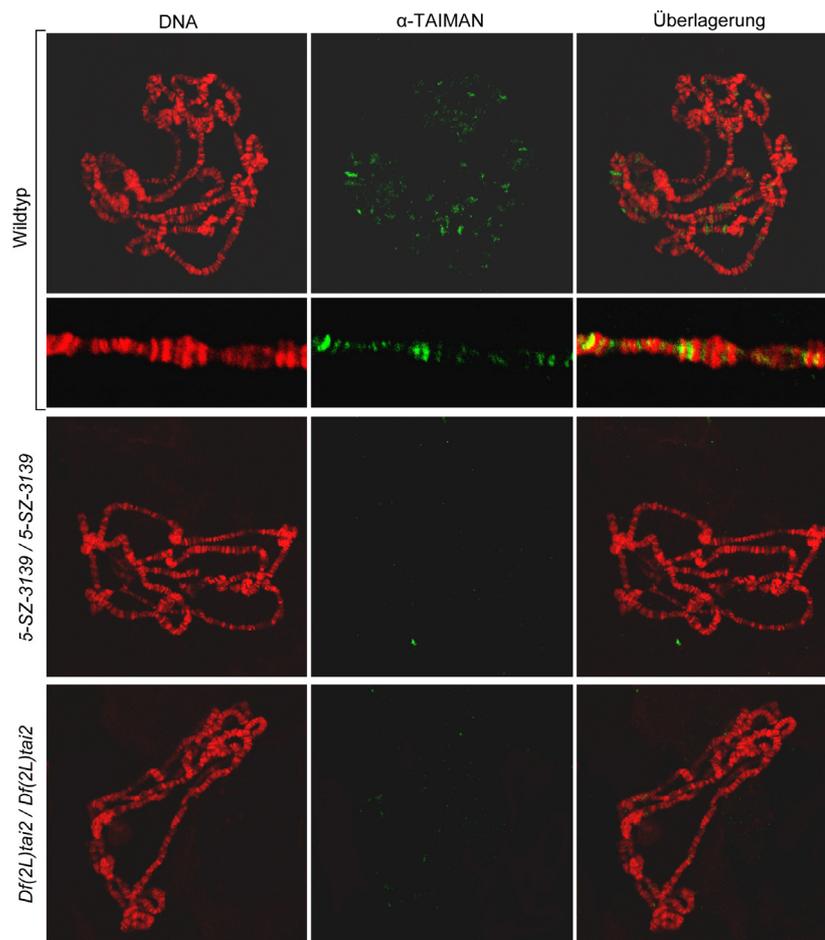
Die erhaltene Menge des löslichen TAIMAN-Proteinfragments wurde durch Auftragen auf ein PAA-Gel zusammen mit einem BSA-Standard bestimmt (Abb. 3.30B). Um das erhaltene Protein aufzukonzentrieren wurde eine Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheit (Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 10kDa verwendet. 2 mg des gereinigten TAIMAN-Proteinfragments wurden zur Immunisierung von Kaninchen für die Herstellung des polyklonalen Antikörpers eingesetzt. Die nach der Immunisierung erhaltenen Blutseren wurden immunozytologisch an Speicheldrüsenchromosomen, Embryonen und mittels Westernblot getestet.

### 3.4.3 TAIMAN ist ein Interbandenprotein in polytären Speicheldrüsenchromosomen

Die Spezifität des TAIMAN-Antikörpers wurde an Speicheldrüsenchromosomen des Wildtyps, der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139 ( $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; 5-SZ-3139/5-SZ-3139) und der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2* untersucht. Einige *tai*-Deletionsmutanten [ $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; *Df(2L)tai2/Df(2L)tai2*] erreichen das adulte Stadium.

Zur Selektion von homozygoten Larven der *tai*-Deletionsmutante wurden heterozygote Tiere ( $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; *Df(2L)tai2/T(2;3)CyO*, *P{w[+m]hsp70:GAL4}* *P{w[+m]UAS:GFP}*; *TM3*, *y[+]* *ri[1]* *p[p]* *bx[34e]* *e[s]* *Ser[1]* *P{w[+m]hsp70:GAL4}* *P{w[+m]UAS:GFP}/+*) gekreuzt und in den Larven der Nachkommen unter UV-Licht auf Fluoreszenz untersucht. Die homozygoten Larven der *tai*-Deletionsmutante weisen keine GFP-Fluoreszenz auf.

An Speicheldrüsenchromosomen des Wildtyps bindet der TAIMAN-Antikörper spezifisch in Interbanden (Abb. 3.31). In der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139 und der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2* ist keine spezifische Bindung des TAIMAN-Antikörpers erkennbar (Abb. 3.31). Diese Untersuchungen zeigen, dass der TAIMAN-Antikörper spezifisch für TAIMAN ist und die TAIMAN-Proteinmenge in den Mutantenlinien deutlich reduziert ist. TAIMAN ist demnach ein euchromatisches Protein und bindet in Interbanden von polytären Speicheldrüsenchromosomen.



**Abbildung 3.31:** TAIMAN bindet in Interbanden von polytären Speicheldrüsenchromosomen. Verteilung von TAIMAN im Wildtyp, in *5-SZ-3139*-Mutanten und in der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2*. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

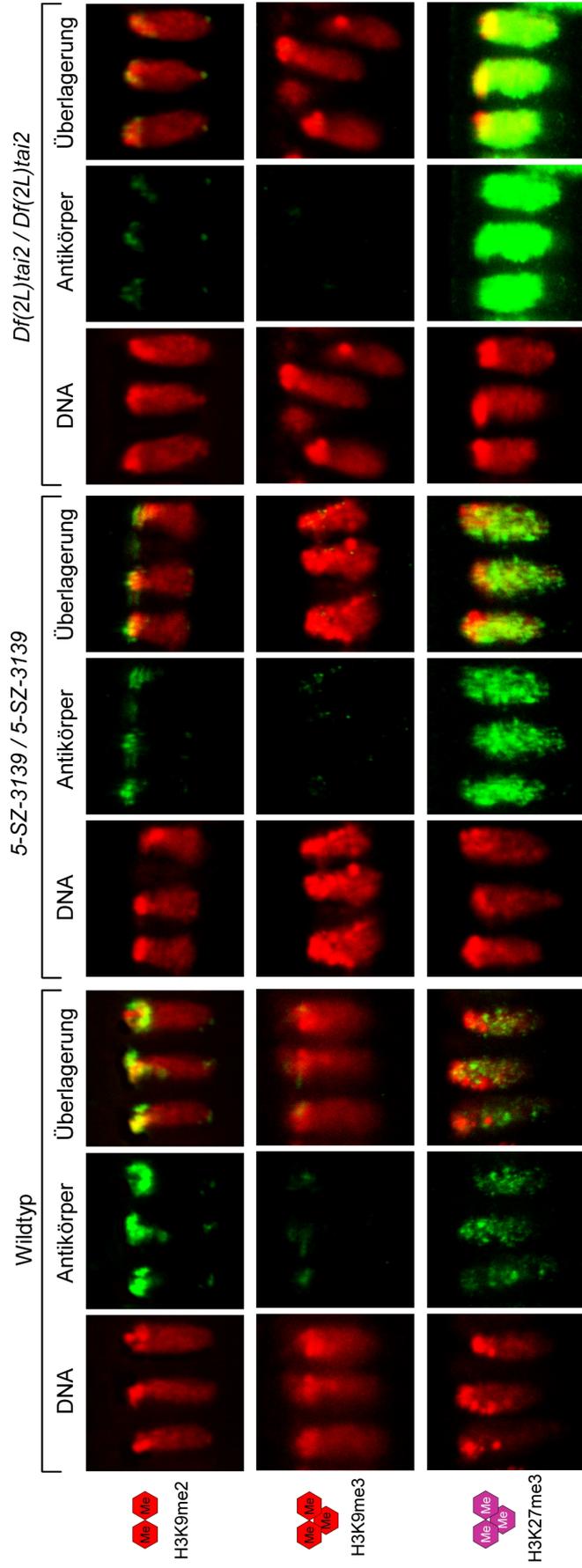
### 3.4.4 *taiman*-Mutanten führen zu einer Veränderung der H3K9- und H3K27-Methylierung

Während der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* erfolgen die ersten Furchungsteilungen im Inneren des Embryos. Diese Teilungen erfolgen im Syncytium ohne Bildung einer Zellmembran. Zu Beginn des 9. Kernteilungszyklus erfolgt die Wanderung der Kerne an die Oberfläche des Embryos und ein syncytiales Blastoderm entsteht. Einige Kerne verbleiben im Inneren des Embryos und bilden die Dotterkerne. Erst nach der 14. Kernteilung erfolgt die Bildung des zellulären Blastoderms. Bis zum 14. Kernteilungszyklus verlaufen die Kernteilungen des Embryos synchron (Foe et al., 1993).

Ab Zyklus 10-11 ist erstmals eine Unterscheidung von Eu- und Heterochromatin innerhalb des Kerns möglich. Das zu diesem Zeitpunkt entstehende Heterochromatin befindet sich am apikalen Pol der Kerne. Die euchromatischen Bereiche der Chromosomenarme weisen eine basale Orientierung auf.

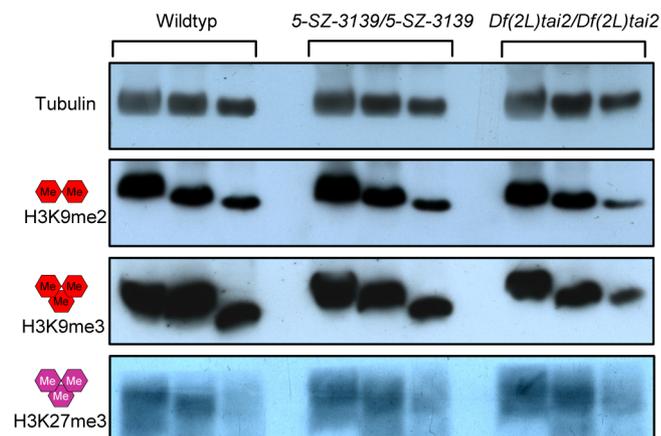
Um neben der starken Reduktion von H3K9me2 in der *white-roughest*-Region im Rearrangement *In(1)w<sup>m4h</sup>* der Insertionsmutante 5-SZ-3139 globale Effekte und Auswirkungen einer Reduktion der TAIMAN-Proteinmenge auf repressive Histonmethylierungsmarks zu untersuchen, wurden Embryonen der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139 (*w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>*; 5-SZ-3139/5-SZ-3139), homozygote Embryonen der Deletionsmutante *Df(2L)tai2* [*w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>*; *Df(2L)tai2/Df(2L)tai2*] und Embryonen des Wildtyps vergleichend immunozytologisch analysiert. Der maternale Effekt von *tai* ermöglicht nach Kreuzung heterozygoter *tai*-Deletionsmutanten homozygote *tai*-Deletionsmutanten zu erhalten. Um homozygote Embryonen zu erhalten, wurden homozygote Jungfrauen der *tai*-Deletionsmutante gesammelt und mit homozygoten Männchen der *tai*-Deletionsmutante verkreuzt.

Für die Analysen wurden drei benachbarte somatische Kerne des 14. Mitosezyklus stark vergrößert aufgenommen. In *tai*-Mutanten sind H3K9me1, H3K27me1 und H3K27me2 nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Die repressive H3K9-Dimethylierung kennzeichnet heterochromatische Strukturen im apikalen Bereich der Kerne und überlagert mit der verstärkten DAPI-Färbung (Abb. 3.32). In den *tai*-Mutanten ist eine Verringerung von H3K9me2 detektierbar, wobei in der homozygoten *tai*-Deletionsmutante die Verringerung am stärksten ist (Abb. 3.32).



**Abbildung 3.32:** Verteilung der H3K9-Di- und Trimethylierung und der H3K27 tri-Methylierung in Embryonen (Kernteilungszyklus 14) des Wildtyps, der homozygoten 5-SZ-3139-Mutante und der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2*. DNA-Färbung mit DAPI.

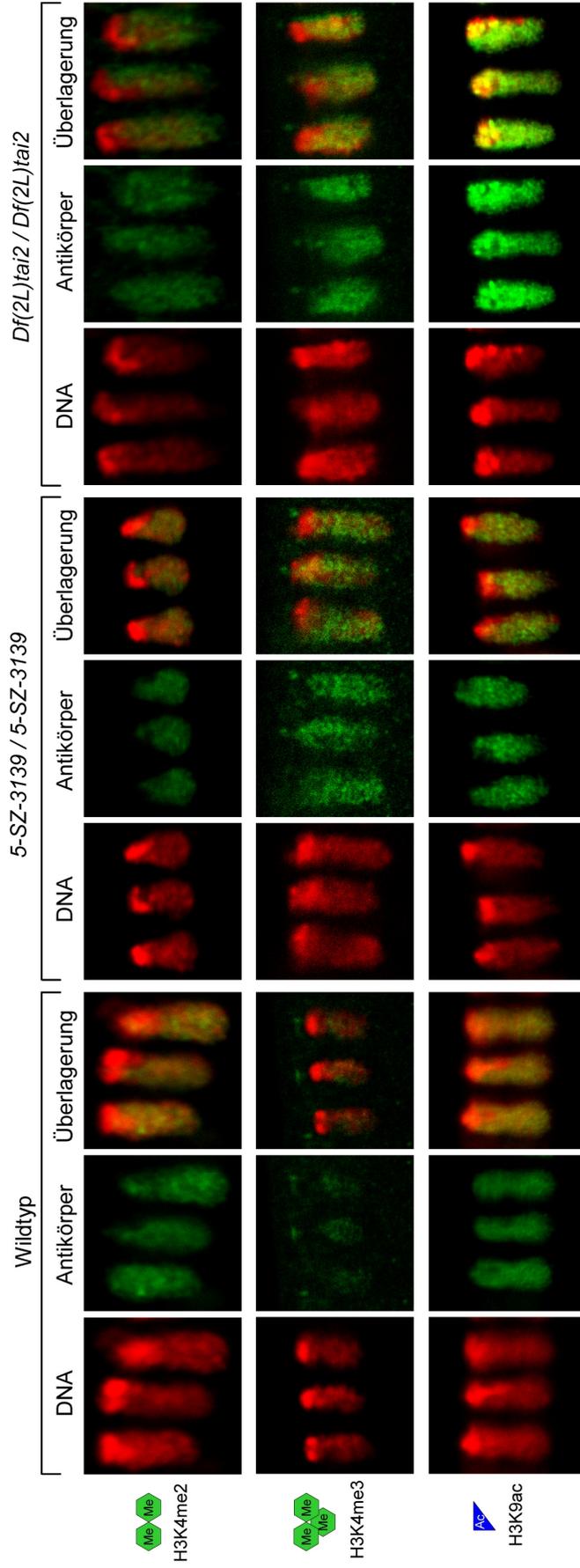
H3K27me3 ist im Wildtyp in euchromatischen Bereichen der Chromosomenarme zu finden und weist eine punktuelle Verteilung auf (Abb. 3.32). In der Insertionsmutante *5-SZ-3139* ist im Gegensatz zu H3K9me2 eine starke Erhöhung von H3K27me3 erkennbar. Die homozygote *tai*-Deletionsmutante zeigt eine massive Erhöhung von H3K27me3 (Abb. 3.32). Diese Analysen zeigen, dass offenbar H3K9me2, H3K9me3 und H3K27me3 in *tai*-Mutanten völlig dereguliert sind. In Westernblotanalysen von 0-4 h alten Wildtypembryonen konnte mit Hilfe eines H3K9me2- und H3K9me3-Antikörpers signifikante Mengen H3K9me2 und H3K9me3 nachgewiesen werden, die in *tai*-Mutantenembryonen gleichen Alters reduziert sind (Abb. 3.33). H3K27me3 konnte ebenfalls in Westernblotanalysen mittels eines H3K27me3-Antikörpers nachgewiesen werden, wobei der Antikörper für immunozytologische Analysen besser geeignet ist. Eine Erhöhung von H3K27me3 konnte in *tai*-Mutanten festgestellt werden (Abb. 3.33). Vergleichende immunozytologische Analysen an Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp-Larven, Larven der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* und der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2* zeigen ebenfalls eine Verringerung von H3K9me2 und eine Erhöhung von H3K27me3 in den *tai*-Mutanten (Apelt, pers. Mitteilung).



**Abbildung 3.33:** Westernblotanalysen der TAIMAN-abhängigen Änderung von H3K9me2, H3K9me3 und H3K27me3. Gleiche Mengen Embryoextrakt von 0-4 h alten Embryonen des Wildtyps, der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* und der Deletionsmutante *Df(2L)tai2* wurden in einer 3-stufigen Verdünnungsreihe für Westernblots verwendet und mit Tubulin-, H3K9me2-, H3K9me3- und H3K27me3-Antikörper markiert.

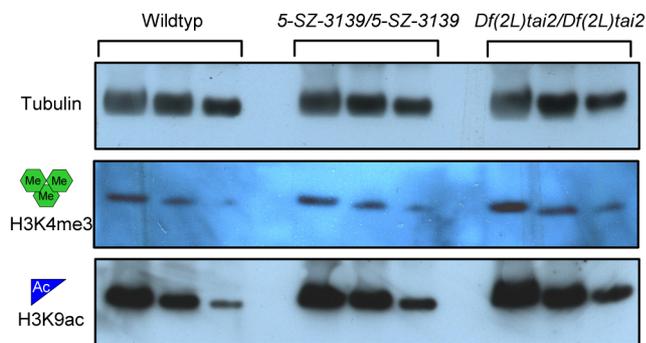
### 3.4.5 *taiman*-Mutanten führen zu einer Veränderung der H3K4-Methylierung und H3K9-Acetylierung

H3K9-Methylierung kann andere Modifikationen benachbarter Aminosäuren des N-Terminus von Histon H3, wie beispielsweise Acetylierung und Phosphorylierung, beeinflussen (Peters et al., 2001). Die *Set9*-vermittelte Methylierung von H3K4 beispielsweise, verhindert die Bindung des NuRD-Komplexes und unterstützt damit die Aktivierung der Transkription (Noma et al., 2001; Nishioka et al., 2002). Die Methylierung an H3K4 beeinträchtigt darüber hinaus die SUV39H1-abhängige, aber nicht *mG9a*-abhängige H3K9-Methylierung (Nishioka et al., 2002). In *mG9a*-defizienten Mäusen ist aufgrund der reduzierten H3K9me2 die Methylierung von H3K4 sowie die Acetylierung von H3K9 stark erhöht (Tachibana et al., 2002). Methyliertes H3K9 kann *in vitro* die Phosphorylierung von H3S10 durch die Ipl1/aurora-Kinase beeinflussen (Rea et al., 2000). Die Phosphorylierung an H3S10 wiederum erleichtert die Acetylierung von H3K14 durch die Acetyltransferase GCN5 (Cheung et al., 2000). Die Abhängigkeiten und gegenseitigen Beeinflussung von Histonmodifikationen sowie deren Auswirkung auf den Chromatinstatus ist ein generelles Prinzip der Chromatinregulation. Auf Grund der generellen Reduktion von H3K9me2 und H3K9me3 und der Erhöhung von H3K27me3 in *tai*-Mutanten wurden der Methylierungsstatus von H3K4 sowie die Acetylierung von H3K9 in *tai*-Mutanten untersucht. Posttranslationale Histonmodifikationen wie H3K4-Methylierung und H3K9-Acetylierung bestimmen das Euchromatin. Diese Markierungen werden bereits in den frühen Embryonalstadien ab dem 10. Embryonalzyklus etabliert (Rudolph et al., 2007). Für die Analysen wurden drei benachbarte somatische Kerne des 14. Mitosezyklus stark vergrößert aufgenommen. Die aktivierenden Histonmodifizierung H3K4me1 (Daten nicht gezeigt) H3K4me2, H3K4me3 und H3K9ac sind im Wildtyp ausschließlich in den euchromatischen Armen der Chromosomen detektierbar (Abb. 3.34). Für H3K4me1 und H3K4me2 sind keine signifikanten Veränderungen in *tai*-Mutanten erkennbar (Abb. 3.34). H3K4me3 und H3K9ac sind in der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Eine deutliche Zunahme von H3K4me3 und H3K9ac ist in homozygoten Embryonen der Deletionsmutante *Df(2L)tai2* detektierbar (Abb. 3.34).



**Abbildung 3.34:** Verteilung der H3K4-Di- und Trimethylierung und der H3K9 Acetylierung in Embryonen (Kernteilungszyklus 14) des Wildtyps, der homozygoten 5-SZ-3139-Mutante und der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2*. DNA-Färbung mit DAPI.

Um die Veränderungen von H3K4me3 und H3K9ac zu quantifizieren, wurden Westernblotanalysen durchgeführt. In diesen Westernblotanalysen von 0-4 h alten Wildtypembryonen konnte mit Hilfe eines H3K4me3- und H3K9ac-Antikörpers eine H3K4me3 und H3K9ac nachgewiesen werden, die in *tai*-Mutantenembryonen gleichen Alters erhöht ist (Abb. 3.35). Vergleichende immunozytologische Analysen an Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp-Larven, Larven der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* und der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2* zeigen ebenfalls eine Erhöhung von H3K9ac in den *tai*-Mutanten (Apelt, pers. Mitteilung). Diese Daten zeigen, dass das Chromatin in *tai*-Mutanten offenbar einer Deregulation unterliegt. Die erhöhte H3K9ac würde dabei die Reduktion von H3K9me2 und H3K9me3 nach sich ziehen.



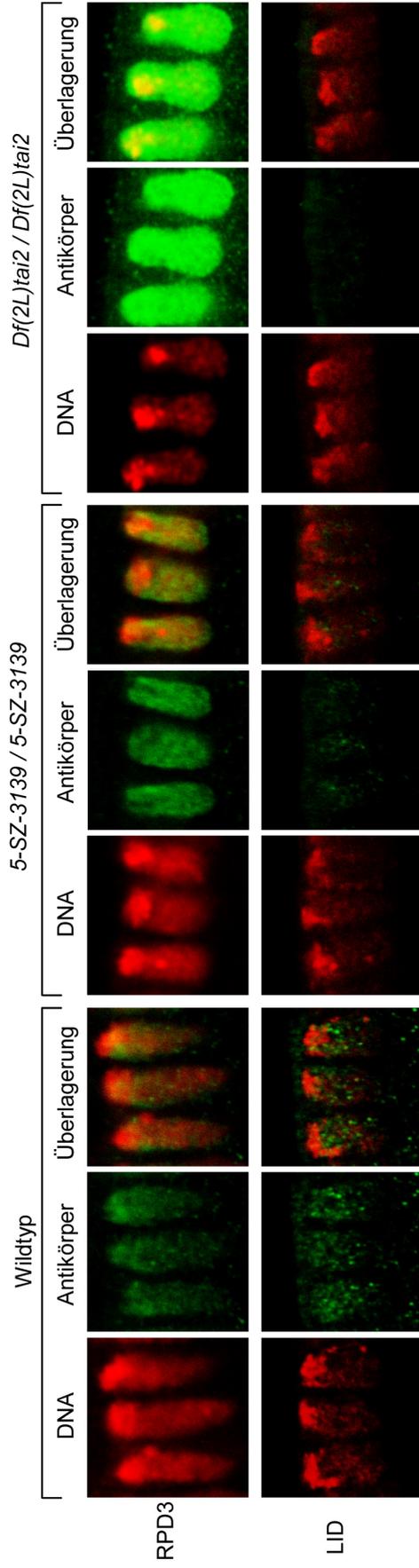
**Abbildung 3.35:** Westernblotanalysen der TAIMAN-abhängigen Änderung von H3K4me3 und H3K9ac. Gleiche Mengen Embryoextrakt von 0-4 h alten Embryonen des Wildtyps, der homozygoten *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* und der Deletionsmutante *Df(2L)tai2* wurden in einer 3-stufigen Verdünnungsreihe für Westernblots verwendet und mit Tubulin-, H3K4me3- und H3K9ac-Antikörper markiert.

### 3.4.6 *taiman*-Mutanten zeigen eine erhöhte Menge LID und RPD3 im Chromatin

Die Veränderung von Histonmodifikationen in *tai*-Mutanten legt eine Regulation von chromatinmodifizierenden Faktoren durch TAIMAN nahe. Die H3K4-Methylierung wird direkt durch Methyltransferasen und Demethylasen beeinflusst. Die SET-Domänenproteine ABSENT SMALL HOMEOTIC 1 (ASH1) und TRITHORAX (TRX), Mitglieder der Trithorax-Gruppe, sind in der Lage die H3K4-Methylierung zu vermitteln (Roguev et al., 2001; Beisel et al., 2002; Czermin et al., 2002; Byrd and Shearn, 2003). TRITHORAX-RELATED (TRR) kann H3K4-Trimethylierung

katalysieren und scheint die aktive H3K4-Methyltransferase in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* zu sein (Sedkov et al., 2003). TRR enthält vier Kernrezeptor-Interaktionsmotive und interagiert *in vitro* über diese mit EcR und USP, welche den Hauptteil des Ecdysonrezeptors bilden (Sedkov et al., 2003). Neben der genetischen Interaktion von *trr*-Mutationen mit der temperatursensitiven *ecdysone-less*-Mutation *ecd<sup>l</sup>* wurde auch eine hormonabhängige Interaktion zwischen EcR und TRR durch Isolation und Aufreinigung von TRR-Komplexen gezeigt (Sedkov et al., 2003). Des Weiteren colokalisieren TRR und EcR in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila*. Offenbar kontrolliert TRR die H3K4-Methylierung an Ecdyson-induzierbaren Promotoren (Sedkov et al., 2003). Eine andere Möglichkeit H3K4-Methylierung direkt zu regulieren, ist die Entfernung von Methylgruppen durch Demethylasen. Die Demethylierung von H3K4me1 und H3K4me2 kann durch SU(VAR)3-3 erfolgen. Die Demethylierung von H3K4me3 wird durch das JUMONJI-Protein LID vermittelt (Eissenberg et al., 2007; Secombe et al., 2007). *lid* wurde als Haplo-Enhancer mit Triplo-Suppressoreffekt im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-System charakterisiert (Baisch, 2010). In Embryonen sowie in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *lid*-Mutanten ist, wie auch in *tai*-Mutanten, eine erhöhte Menge an H3K4me3 zu finden (Schicht, 2007; Baisch, 2010). Da H3K4me1 und H3K4me2 auch in *lid*-Mutanten unverändert sind, legt die erhöhte H3K4me3 in *tai*-Mutanten eine Deregulation von H3K4me3-Demethylase LID nahe. Um dies zu analysieren, wurden Embryonen des 14. Mitosezyklus mit einem LID-spezifischen Antikörper (Baisch, 2010) vergleichend analysiert. LID ist ein euchromatisches Protein und kennzeichnet im Wildtyp die euchromatischen Arme der Chromosomen (Abb. 3.36). In den *tai*-Mutanten ist eine signifikante Verringerung der LID-Proteinmenge erkennbar. In der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2* ist kein Signal des LID-Antikörpers detektierbar, was auf eine stark verringerte Proteinmenge von LID schließen lässt.

Des Weiteren ist in *tai*-Mutanten eine starke Erhöhung der H3K9-Acetylierung vorhanden. Die Histonacetylierung wird direkt durch Acetyltransferasen, wie MOF, dGCN5 oder dTip60 und Deacetylasen wie RPD3 (HDAC1) beeinflusst. MOF ist Bestandteil des MSL-Komplexes, der die H4K16-Acetylierung vermittelt und nötig ist für die Dosiskompensation (Brownell et al., 1996, Hilfiker et al., 1997; Smith et al., 2000).



**Abbildung 3.36:** Analyse der Bindung von RPD3 und LID in Embryonen (Kernteilungszyklus 14) des Wildtyps, der homozygoten 5-SZ-3139-Mutante und der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2*. DNA-Färbung mit DAPI.

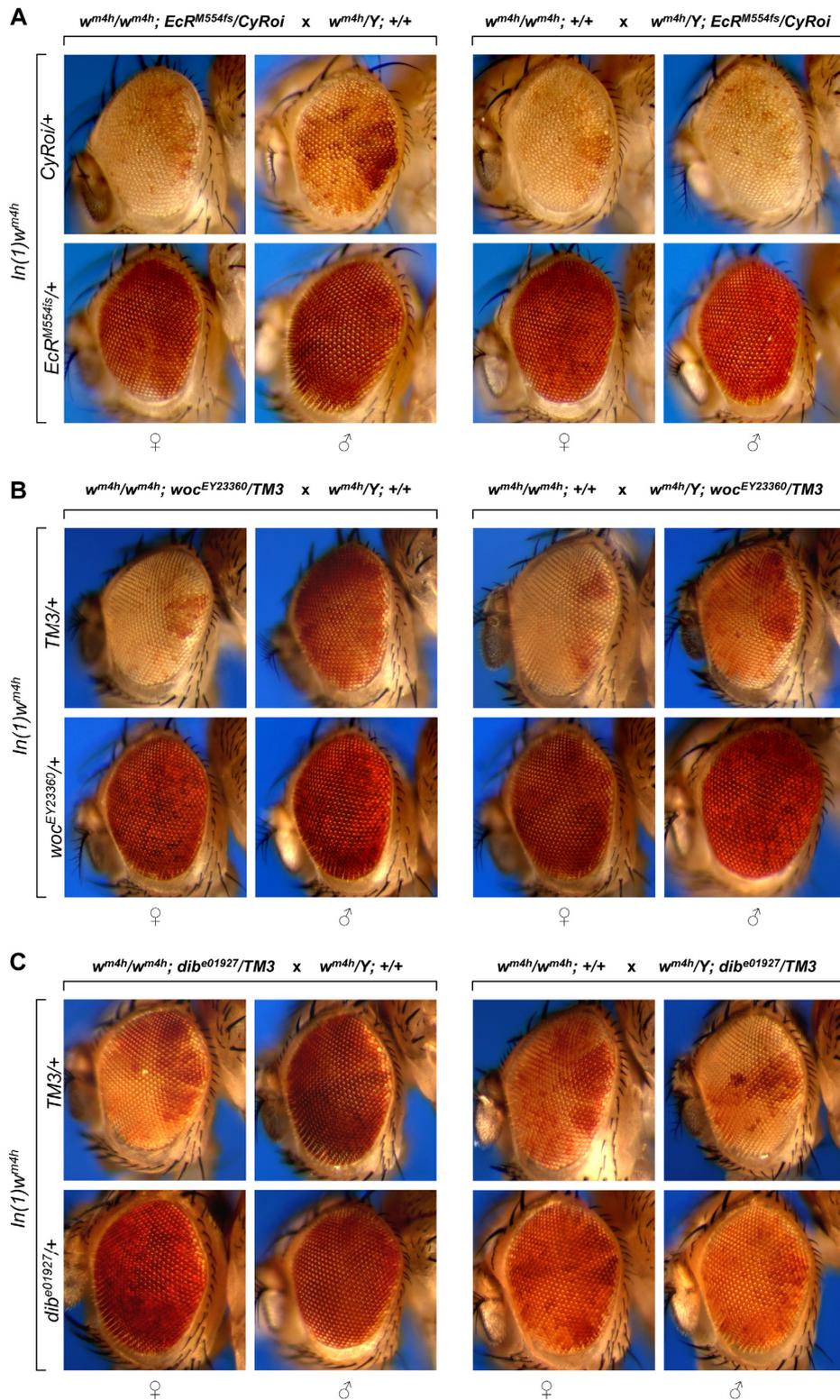
GCN5 stellt die histonmodifizierende Untereinheit des transkriptionsregulierenden dSAGA Komplexes dar (Kusch et al., 2003). In vitro zeigt GCN5 eine 10fach höhere Acetyltransferaseaktivität, wenn Serin 10 im Histon H3 phosphoryliert ist (Cheung et al., 2000; Agalioti et al., 2002). GCN5 und E2F1 stimulieren außerdem gemeinsam die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) durch H3K9-Acetylierung an entsprechenden Reparaturstellen (Guo et al., 2011). Tip60 wurde zuerst identifiziert als ein Protein, welches mit dem Tat Protein aus HIV interagiert (Kamine et al., 1996). Die Acetylierung der Histonvariante H2Av durch dTip ist nötig für den Austausch von H2Av an Stellen mit DNA-Schäden (Kusch et al., 2004). Die erste Histondeacetylase (HDAC1) wurde aus Kuh-Proteinextrakten gereinigt und als Orthologes des globalen Regulators RPD3 aus Hefen identifiziert (Vidal et al., 1991; Taunton et al., 1996). EMS induzierte Punktmutationen in *Rpd3* zeigen einen dominanten Suppressoreffekt im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-System (Mottus et al., 2000; Doheny et al., 2008). Interessant ist, dass die Nullallele *HDAC1<sup>def8</sup>* und *HDAC1<sup>def24</sup>* keinen dominanten Effekt im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-System aufweisen (Mottus et al., 2000). H3K9ac ist in *lid*-Mutanten ebenso verändert, wie auch die Menge an RPD3 (Schicht, 2007; Baisch, 2010). Zwischen LID und RPD3 besteht somit offenbar ein Zusammenhang (Baisch, 2010). Da in *tai*-Mutanten H3K9ac sowie auch die Menge an LID verändert ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch ein Effekt in Bezug auf RPD3 vorhanden ist. Um diese Vermutung zu analysieren, wurden Embryonen des 14. Mitosezyklus mit einem RPD3-spezifischen Antikörper vergleichend analysiert. RPD3 ist ein euchromatisches Protein und kennzeichnet, wie auch LID, im Wildtyp die euchromatischen Arme der Chromosomen (Abb. 3.36). In den *tai*-Mutanten ist tatsächlich eine Veränderung der RPD3-Proteinmenge erkennbar. Offenbar ist eine sehr stark erhöhte RPD3-Proteinmenge in *tai*-Mutanten vorhanden. In der homozygoten Deletionsmutante *Df(2L)tai2* ist darüber hinaus ein extrem starkes Antikörpersignal detektierbar, was auf eine stark erhöhte Proteinmenge von RPD3 schließen lässt.

### 3.4.7 Mutanten für *EcR*, *dib* und *woc* sind dominante Suppressoren für PEV

Die Tatsache, dass *taiman* als ein dominanter Suppressor für PEV identifiziert werden konnte, lässt vermuten, dass auch andere Komponenten des Ecdysonsignalwegs einen Einfluss auf PEV aufweisen. Tatsächlich zeigt auch die Temperatur-sensitive *ecdysoneless*-Mutante *ecd<sup>l</sup>* einen dominanten Suppressoreffekt (Apelt, pers. Mitteilung). In der *ecd<sup>l</sup>*-Mutante ist der Ecdysongehalt bei einer Temperatur von 29°C stark reduziert (Garen et al., 1977; Redfern and Bownes, 1983; Warren et al., 1996). Da TAIMAN ein Koaktivatorprotein für den EcR/USP Ecdyson-Rezeptorkomplex darstellt, wurde eine Mutante für *EcR* im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Hintergrund auf PEV untersucht. In dem *EcR<sup>M554fs</sup>*-Allel sind 22 bp deletiert. Diese Deletion führt zu einem *Frameshift* (Bender et al., 1997). In der Kreuzung von *w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>;EcR<sup>M554fs</sup>/CyRoi* × *w<sup>m4h</sup>/Y;+/+* und der reziproken Kreuzung *w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>;+/+* × *w<sup>m4h</sup>/Y;EcR<sup>M554fs</sup>/CyRoi* wurde der Einfluss des *EcR<sup>M554fs</sup>*-Allels auf die Reprimierung des *white*-Gens in der Inversion *In(1)w<sup>m4h</sup>* analysiert. Dabei zeigte die *EcR*-Mutante einen dominanten Suppressoreffekt, unabhängig davon, ob die Mutation maternal oder paternal vererbt wurde (Abb. 3.37A). Da auch die *ecdysoneless*-Mutante *ecd<sup>l</sup>* einen dominanten Suppressoreffekt zeigt, wurden zwei weitere Gene, welche in die Ecdysonsynthese involviert sind, auf PEV untersucht. Das Zinkfingerprotein WOC reguliert die Aktivität der 7,8-Dehydrogenase, welche den ersten Schritt in der Ecdysonsynthese aus Cholesterol katalysiert (Warren et al., 2001). In den Nachkommenschaften aus der Kreuzung von *w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>;woc<sup>EY23360</sup>/TM3* × *w<sup>m4h</sup>/Y;+/+* und der reziproken Kreuzung *w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>;+/+* × *w<sup>m4h</sup>/Y;woc<sup>EY23360</sup>/TM3* wurde der Einfluss des *woc<sup>EY23360</sup>*-Allels auf die Reprimierung des *white*-Gens in der Inversion *In(1)w<sup>m4h</sup>* analysiert. Bei diesem Allel befindet sich ein *P*-Element im ersten Intron des *woc*-Gens (Bellen et al., 2004). Auch für die *woc*-Mutante wurde ein dominanter Suppressoreffekt beobachtet, unabhängig von der paternalen Herkunft der Mutante (Abb. 3.37B).

Das Gen *disembodied* kodiert für das Cytochrom P450 Enzym Disembodied, welches in die Synthese von Ecdyson involviert ist (Chávez et al., 2000). Nach Kreuzung von *w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>;dib<sup>e01927</sup>/TM3* × *w<sup>m4h</sup>/Y;+/+* und der reziproken Kreuzung *w<sup>m4h</sup>/w<sup>m4h</sup>;+/+* × *w<sup>m4h</sup>/Y;dib<sup>e01927</sup>/TM3* wurde der Einfluss des *dib<sup>e01927</sup>*-Allels auf die Reprimierung des *white*-Gens in der Inversion *In(1)w<sup>m4h</sup>* analysiert. Das *dib<sup>e01927</sup>*-Allel enthält im Promotorbereich des *dib*-Gens ein *P*-Element (Thibault et al., 2004). Die *dib*-Mutante

zeigte nur nach maternaler Herkunft einen dominanten Suppressoreffekt in den Nachkommen, der sich aber nicht in der reziproken Kreuzung zeigte (Abb.3.37C).



**Abbildung 3.37:** Mutanten von *EcR*, *dib* und *woc* sind dominante Suppressoren für PEV. (A) Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; EcR^{M554fs}/CyRoi$  x  $w^{m4h}/Y; +/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; +/+$  x  $w^{m4h}/Y; EcR^{M554fs}/CyRoi$ . (B) Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; woc^{EY23360}/TM3$  x  $w^{m4h}/Y; +/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; +/+$  x  $w^{m4h}/Y; woc^{EY23360}/TM3$ . (C) Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; dib^{e01927}/TM3$  x  $w^{m4h}/Y; +/+$  und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}; +/+$  x  $w^{m4h}/Y; dib^{e01927}/TM3$ .

## 4 Diskussion

Heterochromatisierung stellt einen entscheidenden Kontrollprozess für *Gensilencing* in der Entwicklung eukaryotischer Organismen dar. Das  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement in *Drosophila melanogaster* ermöglicht die Identifizierung von Komponenten, die am Aufbau heterochromatischer Strukturen beteiligt sind.  $Su(var)3-9$  und  $Su(var)3-3$  sind zwei der stärksten Suppressoren für PEV und somit Schlüsselfaktoren des heterochromatischen *Gensilencings*. Ein molekulares Signal für Chromatindifferenzierung stellt der Koaktivator des Ecdyson-Rezeptorkomplex TAIMAN dar, welcher ebenfalls als dominanter Suppressor für PEV isoliert wurde. Durch die Analyse dieser Faktoren wurden grundlegende Kenntnisse über die molekularen Prozesse bei der Chromatindifferenzierung und deren Kontrolle erlangt.

### 4.1 Heterochromatisches *Gensilencing* wird durch die SU(VAR)3-9-abhängige H3K9-Methylierung kontrolliert

$Su(var)3-9$  ist einer der stärksten dominanten Suppressoren im PEV Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$ . Bei einem Verlust einer Kopie von  $Su(var)3-9$  kommt es zu einer vollständigen Aktivierung des *white*-Gens (Tschiersch et al., 1994), wohingegen eine zusätzliche Kopie von  $Su(var)3-9$  ein verstärktes *Gensilencing* verursacht und zu einer kompletten Inaktivierung des *white*-Gens führt. Demzufolge stellt SU(VAR)3-9 eine zentrale Komponente bei der Etablierung höhergeordneter Chromatinstrukturen dar. Der Suppressoreffekt von  $Su(var)3-9$ -Nullmutanten dominiert über die meisten Enhancermutationen und über den Triplo-Enhancereffekt einer zusätzlichen *HPI*- bzw.  $Su(var)3-7$ -Kopie (Schotta et al., 2002).  $Su(var)3-9$  wurde erstmals in *Drosophila* mittels Transposon-Tagging kloniert (Tschiersch et al., 1994) und ist von der Hefe bis zum Menschen evolutionär hoch konserviert. Diese strukturelle und funktionelle Konservierung wird besonders deutlich durch das Einbringen des homologen Säugerproteins SUV39H1 in *Drosophila*, denn *SUV39H1* ist in der Lage, den Suppressoreffekt von  $Su(var)3-9$ -Mutanten zu kompensieren (Schotta et al., 2002). Inzwischen konnten in über 40 verschiedenen Arten SU(VAR)3-9 Homologe identifiziert werden (Ivanova et al., 1998; Baumbusch et al., 2001; Tamura und Selker 2001; Naumann et al., 2005; Krauss et al., 2006). SU(VAR)3-9 enthält eine Chromo-

Domäne und eine C-terminale SET-Domäne. Diese Domäne wurde zuerst in SU(VAR)3-9, ENHACER of ZESTE und TRITHORAX entdeckt (Jones und Gelbart 1993; Tschiersch et al., 1994) und stellt ein wesentliches funktionelles Modul von SU(VAR)3-9 dar. Die enzymatische Funktion der SET-Domäne in der H3K9-Methylierung wurde zuerst für das humane SUV39H1 gezeigt. SU(VAR)3-9 ist in der Lage *in vitro* H3K9me1, H3K9me2 und H3K9me3 zu vermitteln. Die Transferierung der Methylgruppen durch SU(VAR)3-9 erfolgen dabei auf eine nicht-prozessive Weise (Eskeland et al., 2004). In *Su(var)3-9*-Nullmutanten ist H3K9me2 und H3K9me3 stark reduziert, aber H3K9me1 ist unverändert (Ebert et al. 2004). Im zentralen Bereich des Chromozentrums von polytären Speicheldrüsenchromosomen ist H3K9me3 detektierbar. In *Su(var)3-9*-Nullmutanten ist in diesem Bereich H3K9me2 zu finden (Ebert et al., 2004). ChIP-Analysen im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement in der *white-roughest*-Region zeigen einen vollständigen Verlust von H3K9me2 in *Su(var)3-9*-Nullmutanten, von dem auch die heterochromatischen 359 bp satellite repeats betroffen sind. H3K9me3 ist im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement in der *white-roughest*-Region nicht detektierbar. Offenbar wird auch *in vivo* nur eine Methylgruppe durch SU(VAR)3-9 übertragen. Im perizentrischen Heterochromatin konvertiert SU(VAR)3-9 H3K9me1 zu H3K9me2. Im zentralen Bereich des Chromozentrums wird H3K9me2 durch SU(VAR)3-9 trimethyliert. Mit Hilfe von EMS- bzw. Röntgenstrahlenmutagenese konnte eine Vielzahl an dominanten Suppressoren für das PEV-Rearrangement *In(1)w<sup>m4h</sup>* selektiert werden (Tschiersch, 1993; Reuter et al., 1986; Wustmann, 1988; Ebert et al., 2004). Durch Komplementations- und Sequenzanalysen konnten insgesamt 33 *Su(var)3-9*-Allele identifiziert werden (Krauss, 1995; Schotta, 2002). Die Tatsache, dass fast alle Mutantenallele, die in Aminosäureaustauschen resultieren, die SET-, bzw. pre-SET und postSET-Domäne betreffen, zeigt deren fundamentale Bedeutung für die Etablierung von heterochromatischen Chromatindomänen. Bisher wurde keine Mutation im Bereich der Chromo-Domäne isoliert, obwohl die Mutagenese weitestgehend sättigend war (Ebert et al., 2006). Die genetische Klassifizierung der Mutanten wurde im Hintergrund einer Extrakopie von *Su(var)3-9* durchgeführt (*w<sup>m4h</sup>*; *Su(var)3-9<sup>Mut</sup>/Su(var)3-9 + P[Su(var)3-9]*). In diesem Hintergrund ergeben *Su(var)3-9*-Nullmutanten den normalen *white-mottled*-Phänotyp, wohingegen hypomorphe Allele einen Enhancereffekt verursachen (Ebert et al., 2004). Die genetische Klassifizierung der *Su(var)3-9*-Allele 06, 07, 23 und 22 im *Su(var)3-9<sup>ptm</sup>*-Hintergrund ergab ein vergleichbares Ergebnis. *Su(var)3-9<sup>Mut</sup>*-Allele wurden mit endogenen *Su(var)3-9<sup>ptm</sup>* Mutanten bzw. dem Transgen *Su(var)3-9<sup>ptm</sup>-EGFP* im *Su(var)3-9<sup>l7</sup>*-Hintergrund

gekreuzt und der Effekt auf die Inversion  $In(1)w^{m4h}$  untersucht. Die amorphen Allele  $Su(var)3-9^{06}$  und  $Su(var)3-9^{07}$  zeigen keine Verstärkung der Reprimierung des *white*-Gens. Die hypomorphen Allele  $Su(var)3-9^{22}$  und  $Su(var)3-9^{13}$  verstärken die Reprimierung des *white*-Gens, was in einem Enhancereffekt sichtbar ist.

Für 23 verschiedene SU(VAR)3-9-Mutantenproteine wurden außerdem KMTase-Assays durchgeführt. Alle genetisch als Nullmutanten klassifizierten Allele sind ohne enzymatische Aktivität, wohingegen die hypomorphen  $Su(var)3-9$ -Mutanten reduzierte KMTase-Aktivität aufweisen.

Die Tatsache, dass die phänotypischen Effekte der  $Su(var)3-9$ -Mutanten mit deren KMTase-Aktivität korrelieren, zeigt, dass das *Silencing*-Potenzial von SU(VAR)3-9 direkt durch die KMTase-Aktivität, welche die SET-Domäne vermittelt, bestimmt wird. Im Verlauf dieser Analysen konnte ebenfalls der extrem starke Enhancer *pitkin<sup>D</sup>* als  $Su(var)3-9$ -Allel identifiziert werden (Kuhfittig et al., 2001; Ebert et al., 2004).  $Su(var)3-9^{p^{tm}}$  verursacht eine massive Verdichtung des Chromatins in der frühen Embryogenese und verstärkt die Rekrutierung von SU(VAR)3-9 an viele euchromatische Bereiche, welche mit endogenen SU(VAR)3-9-Bindestellen übereinstimmen (Greil et al., 2003). Eine Punktmutation (R529S) innerhalb der SET-Domäne von SU(VAR)3-9<sup>p<sup>tm</sup></sup> verursacht eine verstärkte KMTase-Aktivität. Diese führt zu einer Erhöhung von H3K9me2 und H3K9me3 im perizentrischen Heterochromatin und in vielen euchromatischen Banden. Die Ausbreitung der H3K9-Dimethylierung über den proximalen Bruchpunkt des  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangements entlang der flankierenden, euchromatischen, ca. 200 kb großen *white-roughest*-Region ist in  $Su(var)3-9^{p^{tm}}$ -Mutanten reduziert. Dafür ist in dieser Region ein H3K9me3-Gradient vorhanden. Offenbar ist ein großer Teil von H3K9me2 in der Region zu H3K9me3 konvertiert. Da  $Su(var)3-9^{p^{tm}}$ -Mutanten einen starken Enhancereffekt zeigen, führt auch die H3K9me3 in *Drosophila* zu einem verstärkten *Silencing*.

Im Gegensatz zum *Drosophila* SU(VAR)3-9 vermittelt das SUV39H1 in Säugern H3K9-Trimethylierung. Transgene Fliegen, welche das humane SUV39H1-EGFP Fusionsprotein exprimieren, zeigen eine komplette Rettung des Verlustes des endogenen *Drosophila* SU(VAR)3-9-Proteins, wenn es korrekt während der Entwicklung exprimiert wird (Schotta et al., 2002). Das SUV39H1-EGFP Fusionsprotein ist, wie auch das endogene SU(VAR)3-9 mit dem Chromozentrum assoziiert. Interessant ist, dass das humane SUV39H1 in *Drosophila* nicht zu einer signifikanten Erhöhung der H3K9-Trimethylierung in der *white-roughest*-Region im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement führt. Möglicherweise werden die einzelnen H3K9-

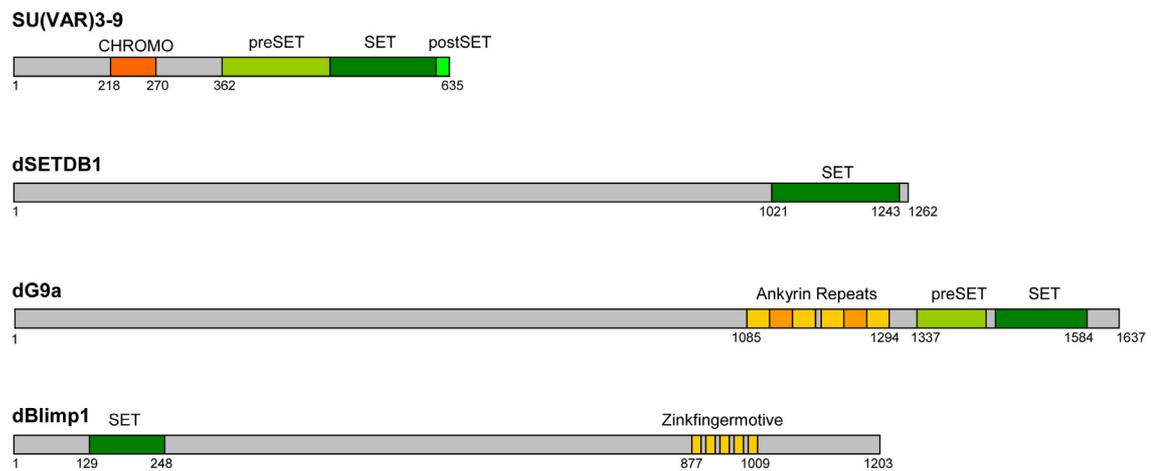
Methylierungsstufen in verschiedenen Spezies spezifisch kontrolliert. Da sich jedoch im Hintergrund des humanen SUV39H1-EGFP eine Kopie des genomischen *Su(var)3-9* befand, könnte die Beschränkung der H3K9-Methylierungsstufen auch durch das endogene SU(VAR)3-9 verursacht worden sein. Sinnvoll wäre demnach auch eine Analyse der durch SUV39H1-EGFP verursachten H3K9-Methylierungsstufen im *Su(var)3-9*-Nullhintergrund. Die Tatsache, dass das humane SUV39H1-EGFP den Verlust des endogenen *Drosophila* SU(VAR)3-9-Proteins retten kann, zeigt die hohe Konservierung der SU(VAR)3-9-Methyltransferasen auf struktureller und funktioneller Ebene. Die 3D-Struktur der SET-Domäne als katalytisches Zentrum von Methyltransferasen und somit die funktionelle Bedeutung von verschiedenen Strukturmotiven wurden für Clr4p aus *Schizosaccharomyces pombe*, DIM5 aus *Neurospora crassa* und SET7/9 aus Säugern ermittelt (Min et al., 2002; Zhang et al., 2002; Jacobs et al., 2002). Hoch konserviert in allen SET-Domänen sind die Motive für die AdoHcy-Bindung, die H3-Erkennung und das NHS-Motiv, welches der SET-Domäne ermöglicht, eine knotenförmige Struktur auszubilden. STD-NMR-Analysen mit rekombinantem SU(VAR)3-9, dem Kofaktor S-Adenosyl-L-Methionin und dem Koproduct S-Adenosyl-L-homocystein ermöglichten die Bestimmung der Bindungsepitope von AdoMet und AdoHcy (Seeger et al., 2005; Seeger 2006). Dabei wurde im Vergleich zur Kristallstruktur eine gleichartige Bindung beider Kofaktoren in Lösung nachgewiesen (Seeger et al., 2005; Seeger 2006).

## 4.2 dG9a ist keine spezifische H3K9-Methyltransferase

In *Drosophila* muss neben SU(VAR)3-9 und SETDB1 eine weitere H3K9-Methyltransferase existieren, die H3K9me1 bzw. H3K9me2 im Chromozentrumkern vermittelt. dSETDB1 katalysiert hauptsächlich H3K9me2 im 4. Chromosom und in Telomerregionen (Seum et al., 2007a; Tzeng et al., 2007). In humanen Zellen wurde gezeigt, dass die H3K9-Methyltransferasen SUV39H1, G9a, GLP und SETDB1 auch in einem multimeren Komplex vorkommen und zusammenwirken können (Fritsch et al., 2010). Ein ähnlicher multimerer Proteinkomplex könnte auch in *Drosophila* existieren, wobei dSETDB1 vornehmlich in der frühen Embryonalentwicklung aktiv ist und SU(VAR)3-9 die Aufrechterhaltung der H3K9-Methylierung verstärkt in der weiteren Entwicklung übernimmt. Ein Kandidat für eine weitere H3K9-Methyltransferase ist dG9a, das *Drosophila* Homologe von G9a aus Säugern. In Säugern erfolgt die

euchromatische H3K9-Mono- und Dimethylierung durch G9a (Tachibana et al., 2001; Tachibana et al., 2002; Rice et al., 2003). G9a ist involviert in das *Silencing* von entwicklungsabhängig regulierten Genen (Roopra et al., 2004; Feldman et al., 2006). Für das *Drosophila* Homologe dG9a konnte *in vitro* eine Histonmethyltransferaseaktivität nachgewiesen werden (Stabell et al. 2006). Mittels massenspektrometrischer Analysen wurde gezeigt, dass dG9a *in vitro* H3K9 mono-, di- und trimethylieren kann (Stabell et al. 2006). H3K27, K8, K12 oder K16 in Histon H4 können ebenfalls durch dG9a methyliert werden (Stabell et al., 2006).

**A**



**B**

Modifizierung	Region	Enzym
 H3K9	HET, (EU)	dBlimp-1? dG9a?
 H3K9	Chromozentrum 4.Chr., Telomere	SU(VAR)3-9 SETDB1
 H3K9	Zentromer	SU(VAR)3-9

**Abbildung 4.1:** H3K9-Methyltransferasen in *Drosophila*. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von dBlimp-1. dBlimp-1 besteht aus 1203 Aminosäuren und ist ein ca. 134kDa großes Protein. Die SET-Domäne im N-Terminus und die Zinkfinger motive im C-terminalen Bereich bestimmen die Domänenstruktur von dBlimp-1. (B) Methylierungsstufen der H3K9-Methyltransferasen *in vivo*. dBlimp-1 im Komplex mit dG9a könnte die H3K9-Monomethylierung vermitteln. (HET: Heterochromatin, EU: Euchromatin).

Die Tatsache, dass ein Histonpeptid mit den Aminosäuren 1-20 und einem Aminosäureaustausch an Position 9 bzw. einer bereits vorhandenen H3K9-Trimethylierung trotzdem durch dG9a methyliert wird, zeigt deutlich, dass dG9a *in vitro* noch weitere Lysine methylieren kann. Welche Funktion dG9a *in vivo* erfüllt, ist immer noch ungeklärt. Für eine homozygote Deletionsmutante, in welcher der gesamte ORF von *dG9a* deletiert ist, wurde in polytären Speicheldrüsenchromosomen keine Veränderung der H3K9-Mono-, Di- und Trimethylierung festgestellt (Seum et al., 2007). dG9a ist somit offenbar nicht für die H3K9-Methylierung in polytären Speicheldrüsen von *Drosophila* verantwortlich. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass *dG9a*-Mutanten Defekte in der Oozytendetermination aufweisen (Lee et al., 2010). Dennoch ist auch in Ovarien die H3K9-Methylierung nicht durch dG9a beeinflusst (Lee et al., 2010). Da dG9a nachweislich Methyltransferaseaktivität zeigt, besteht die Möglichkeit, dass dG9a Nichthistonproteine methyliert und somit eine regulatorische Funktion zumindest in der Keimbahn aufweist.

Ein anderer Kandidat für eine H3K9-Methyltransferase in *Drosophila* ist dBlimp-1, das Homologe zu B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) aus Säugern (Schotta et al., 2004; Agawa et al., 2007). *dBlimp-1* befindet sich auf dem Chromosomenarm 3L in Region 64E1 (3L: 5,624,083..5,642,049 [+]). Das Protein enthält eine SET-Domäne und eine DNA-Bindedomäne, bestehend aus fünf Zinkfingermotiven (Abb. 4.1A). Die SET-Domäne von dBlimp-1 befindet sich, im Gegensatz zu SU(VAR)3-9, SETDB1 und dG9a, im N-terminalen Bereich des Proteins. Um einen möglichen Einfluss von *dBlimp-1* auf PEV zu untersuchen, müssten *dBlimp-1*-Mutanten isoliert und im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement analysiert werden. Immunozytologische Analysen an polytären Speicheldrüsenchromosomen und frühen Embryonen von *Drosophila* könnten Aufschluss geben, ob dBlimp-1 einen Effekt auf die H3K9-Methylierung ausübt. Eine mögliche Histonmethyltransferaseaktivität könnte mittels Histonmethyltransferase-Assays untersucht werden. Interessant ist, dass für den humanen Blimp-1-Komplex eine spezifische Histonmethyltransferaseaktivität für Histon H3 Lysin 9 nachgewiesen werden konnte (Gyory et al., 2004). Diese H3K9-Methyltransferaseaktivität wird jedoch nicht durch Blimp-1 vermittelt, sondern durch G9a. Blimp-1 interagiert direkt über die Zinkfinger motive mit G9a (Gyory et al., 2004). Eine direkte Interaktion von dBlimp-1 und dG9a könnte auch in *Drosophila* vorhanden sein.

### 4.3 SU(VAR)3-3 ist eine H3K4 spezifische Demethylase und essentiell für die Etablierung von Heterochromatin

Neben der H3K9- und H3K27-Methylierung, welche repressive Histonmodifizierungen darstellen, kennzeichnet die Methylierung an H3K4 aktive Chromatinzustände (Santos-Rosa et al., 2002; Ebert et al. 2006). ASH1, TRR und TRX sind Enzyme, die H3K4-Methylierung vermitteln können (Roguev et al. 2001, Nakamura et al. 2002, Beisel et al. 2002, Sedkov et al. 2003, Byrd & Shearn 2003). Die Entdeckung der ersten lysinspezifischen Demethylase LSD1 zeigte, dass LSD1 die Demethylierung von mono- und dimethyliertem Lysin 4 des Histons H3 katalysieren kann (Shi et al., 2004). SU(VAR)3-3 stellt das *Drosophila* Homologe zu LSD1 dar. *Su(var)3-3*-Mutanten gehören zu den stärksten dominanten Suppressoren im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement (Wustman et al., 1989). Dies zeigt, dass offenbar eine H3K4 Demethylase für die Etablierung heterochromatischer Strukturen nötig ist.

Eine *Su(var)3-3* Mutante ist außerdem in transheterozygoten Fliegen epistatisch über den Triplo-Enhancereffekt von Zusatzkopien der Gene *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* (Rudolph et al., 2007). Wenn zwei Extrakopien von *Su(var)3-9* vorhanden sind, ist ebenfalls eine signifikante Suppression der Inaktivierung des *white*-Gens in *Su(var)3-3*-Mutanten erkennbar (Rudolph et al., 2007). *Su(var)3-3*-Mutanten kompensieren außerdem die massive Heterochromatisierung in *Su(var)3-9<sup>pm</sup>*. Diese Daten zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen SU(VAR)3-3 und SU(VAR)3-9. Tatsächlich ist die heterochromatische, SU(VAR)3-9 vermittelte H3K9me2 in *Su(var)3-3*-Mutanten in der *white-roughest*-Region nicht mehr detektierbar.

SU(VAR)3-3 kann, wie das humane Homologe LSD1, H3K4me1 und H3K4me2 demethylieren. Tatsächlich beeinflusst die Methylierung an H3K4 die SUV39H1-abhängige H3K9-Methylierung (Nishioka et al., 2002). Für SU(VAR)3-9 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass alle drei Methylierungsstufen an H3K4 die KMTase-Aktivität behindern. Durch Präinkubation mit SU(VAR)3-3 wurde eine Demethylierung von H3K4me1 und H3K4me2 initiiert und die H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 ermöglicht. Damit konnte ein molekularer Mechanismus entschlüsselt werden, der für die Etablierung heterochromatischer Strukturen nötig ist. Neben der genetischen Wechselwirkung von SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9, HP1 und RPD3 wurde durch Co-Immunopräzipitation gezeigt, dass diese Proteine in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* in einem Komplex vorliegen (Rudolph et al., 2007). Dieser Komplex ist

zur Etablierung des Heterochromatins im Embryo des Kernteilungszyklus 14 nötig. Endogenes SU(VAR)3-3 wird zu diesem Zeitpunkt präferentiell im Chromozentrum von Blastodermzellen gebunden (Rudolph et al., 2007). 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 von H3K9me2 und H3K9me3. SU(VAR)3-3 schützt demnach heterochromatische Bereiche vor H3K4-Methylierung und ermöglicht die Methylierung von H3K9. Neben der Bildung der Euchromatin-Heterochromatin-Grenzen in Blastodermzellen spielt SU(VAR)3-3 in primordialen Keimbahnzellen eine frühe und induktive, regulatorische Rolle. Ebenso wie z.B. *nanos* ist auch *Su(var)3-3* nötig, um eine H3K4me in den Polzellen zu verhindern, eine repressive H3K9me zu etablieren und damit die *Quiescence* in der Keimbahn aufrecht zu erhalten (Schaner et al., 2003; Rudolph et al., 2007).

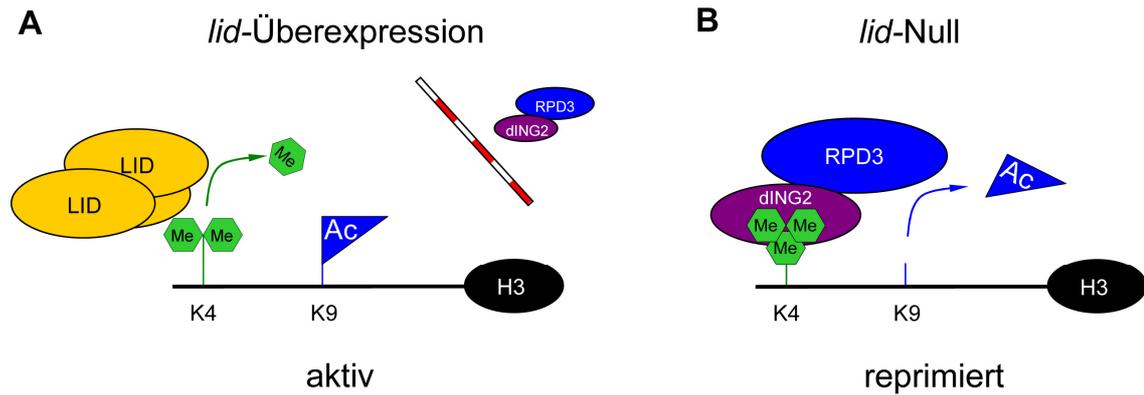
#### 4.4 H3K4-Trimethylierung und die Kontrolle der H3K9-Acetylierung

Die Demethylierung von H3K4me3 erfolgt durch das JUMONJI-Protein LID, welches eine JmjN- und eine JmjC-Domäne besitzt (Eissenberg et al., 2007; Secombe et al., 2007). Aminoxidasen sind in ihrer Aktivität beschränkt auf mono- und dimethylierte Lysine, bedingt durch den FAD-abhängigen Mechanismus dieser Demethylierung. Dabei entsteht eine Doppelbindung zwischen dem Stickstoffatom des Lysins und der Methylgruppe, welche dann hydrolysiert wird. Die Methylgruppe wird dadurch in Form von Formaldehyd entfernt. Die Möglichkeit auch Trimethylierung zu entfernen, stellt die Hydroxylierung dar. Das *lid*-Gen wurde als Haplo-Enhancer mit Triplo-Suppressoreffekt im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-System charakterisiert (Baisch, 2010). Der dominante Enhancereffekt von *lid* zeigt, dass der Verlust einer Kopie des *lid* Gens zu einer verstärkten Heterochromatisierung und somit zu einer Inaktivierung des *white*-Gens führt. In Embryonen sowie in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *lid* Nullmutanten ist eine Erhöhung von H3K4me3 zu finden (Schicht, 2007; Baisch, 2010). Die Erhöhung von H3K4me3 ist jedoch ausschließlich in euchromatischen Bereichen detektierbar. Heterochromatische Bereiche sind nicht von einer Veränderung von H3K4me3 betroffen. Die Bedeutungen der Demethylasen LID und SU(VAR)3-3 unterscheiden sich offenbar von einander, da LID ein Enhancer und kein Suppressor für

PEV ist. LID ist im Gegensatz zu SU(VAR)3-3 in der frühen Embryonalentwicklung nicht in heterochromatischen Bereichen detektierbar (Schicht, 2007). Eine protektive Funktion im Heterochromatin, wie sie für SU(VAR)3-3 und die Demethylierung von H3K4me2 zutrifft, scheint für LID und die Demethylierung von H3K4me3 nicht zu existieren. Bei weiteren Untersuchungen von *lid*-Nullembryonen ist erkennbar, dass die Erhöhung von H3K4me3 mit einer Verringerung von H3K9ac und einer Erhöhung von H3K9me2 einher geht, obwohl die H3K4-Trimethylierung die SU(VAR)3-9-vermittelte H3K9-Methylierung *in vitro* inhibiert. Da jedoch heterochromatische Bereiche nicht von der erhöhten Menge an H3K4me3 betroffen sind, sollte die Methylierung von H3K9 durch SU(VAR)3-9 in diesen Bereichen nicht behindert sein.

H3K4me3 ist vorzugsweise in euchromatischen Regionen zu finden und begünstigt die Genexpression (Santos-Rosa et al., 2002). Jedoch kommt der aktivierenden Funktion dieser Modifizierung eine reprimierende hinzu, abhängig von den Komplexen, die an H3K4me3 gebunden sind. Für ING2 wurde gezeigt, dass dessen PHD-Domäne spezifisch H3K4me3 bindet und in einem Komplex mit HDAC1 die Deacetylierung von H3 bewirkt (Shi et al., 2006). Diese Deacetylaseaktivität wird durch eine Hypermethylierung von H3K4me3 verstärkt (Shi et al., 2006). Eine erhöhte H3K4-Trimethylierung ist auch in *lid*-Nullmutanten vorhanden, welche eine Erhöhung der RPD3 Menge und somit die Deacetylierung von H3K9 bedingt (Schicht, 2007). Die Deacetylierung von H3K9 durch RPD3 macht dann die SU(VAR)3-9-vermittelte H3K9-Methylierung möglich (Schotta, 2002). In Zusammenarbeit mit Masato Yonezawa vom IMP in Wien konnte gezeigt werden, dass dING2 an H3K4-Trimethylierung binden kann. Außerdem ist die Menge an dING2 in *lid*-Nullmutanten erhöht (Baisch, 2009).

Eine zusätzliche Kopie des *lid*-Gens verursacht einen Suppressoreffekt im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-System und bewirkt die vollständige Aktivierung des *white*-Gens. In Embryonen einer LID-Überexpressionslinie ist eine Verringerung von H3K4me3, eine Erhöhung von H3K9ac und eine Verminderung von H3K9me2 erkennbar. CHIP-Analysen der heterochromatischen H3K9-Dimethylierung über den proximalen Bruchpunkt des *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangements entlang der *white-roughest*-Region zeigen ebenfalls eine Verminderung von H3K9me2, von der auch die *R1*-Elemente betroffen sind. LID wirkt demnach der Deacetylierung von H3K9 entgegen indem die H3K4-Trimethylierung entfernt wird (Abb. 4.2).



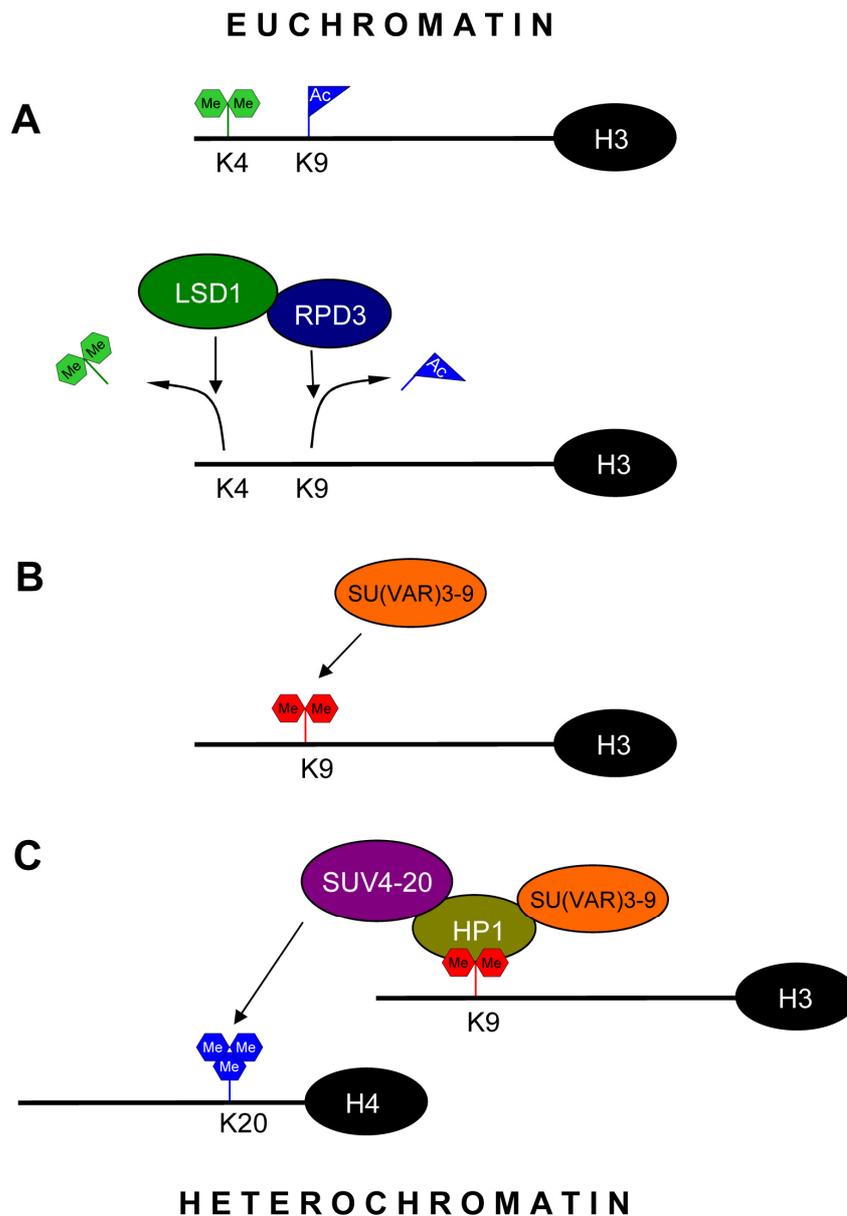
**Abbildung 4.2:** LID wirkt der reprimierenden Funktion von H3K4me3 entgegen. **(A)** Die Demethylierung von H3K4me3 durch LID verhindert die Bindung von dING2 und RPD3 und bewirkt die Aufrechterhaltung der H3K9-Acetylierung (aktiv). **(B)** Der Verlust von LID führt zur Bindung von dING2 und RPD3 und zur Deacetylierung von H3K9 (reprimiert).

#### 4.5 Eine sequenzielle molekulare Reaktionsfolge führt zur Bildung von Heterochromatin

Die Organisation euchromatischer Chromatinomänen wird bei der Stilllegung von genomischen Regionen grundlegend verändert. Damit verbunden ist auch eine Veränderung von Histonmarkierungen. Euchromatische Bereiche sind unter anderem durch Hyperacetylierung von Lysinen in Histonen gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu sind heterochromatische Regionen deacetyliert und weisen Methylierung von H3K9 und H3K27 sowie H4K20 auf. Die Deacetylierung von Histonen ist demnach eine essentielle Voraussetzung für die Etablierung heterochromatischer Chromatinzustände. *Rpd3*-Mutanten zeigen einen starken dominanten Suppressoreffekt auf *In(1)w<sup>m4</sup>* und unterdrücken somit heterochromatisches *Gensilencing* (Mottus et al., 2000). *Rpd3*-Mutanten dominieren über den Triplo-Enhancereffekt einer zusätzlichen *Su(var)3-9* Kopie. *SU(VAR)3-9* und *RPD3* liegen in vivo assoziiert in einem Komplex vor (Czermin et al., 2001; Nakayama et al., 2001). Eine Deacetylierung von H3K9 ist somit eine entscheidende Voraussetzung für die nachfolgende *SU(VAR)3-9*-abhängige H3K9-Methylierung (Abb. 4.3A).

H3K4-Methylierung hat ebenfalls eine antagonistische Wirkung auf die KMTase-Aktivität von *SU(VAR)3-9*. *SU(VAR)3-3* ist in der Lage, H3K4me1 und H3K4me2 zu demethylieren (Abb. 4.3A). In der frühen Embryonalentwicklung schützt *SU(VAR)3-3*

heterochromatische Bereiche vor H3K4-Mono- und Dimethylierung und ermöglicht die Methylierung von H3K9 durch SU(VAR)3-9 (Rudolph et al., 2007). Eine Schlüsselfunktion während der Etablierung von Heterochromatin nimmt die SU(VAR)3-9 abhängige H3K9-Methylierung ein (Abb. 4.3B). HP1 kann di- und trimethyliertes H3K9 mittels der Chromo-Domäne binden (Lachner et al., 2001). Zum Zeitpunkt der Etablierung von Heterochromatin in der frühen Embryonalentwicklung liegt HP1 in einem Komplex mit SU(VAR)3-9, SU(VAR)3-3 und RPD vor (Rudolph et al., 2007).



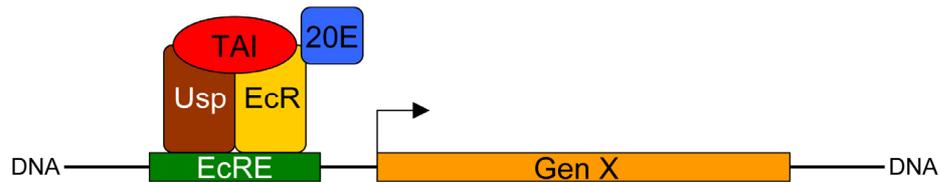
**Abbildung 4.3:** Molekulare Reaktionsfolge zur Etablierung von Heterochromatin. (A) Histonmodifizierungen, die den aktiven Chromatinzustand definieren, werden durch SU(VAR)3-3 (H3K4me<sub>2</sub>) und RPD3 (H3K9ac) entfernt. (B) Eine Schlüsselfunktion während der Etablierung von Heterochromatin nimmt die SU(VAR)3-9 abhängige H3K9-Methylierung ein. (C) HP1 bindet methyliertes H3K9 und rekrutiert SUV4-20, welches die Trimethylierung von H4K20 vermittelt.

In *HPI*-Nullmutanten bindet SU(VAR)3-9 an weitere Chromosomenbereiche. Dies führt zu ektopischer H3K9-Methylierung und Letalität (Schotta et al., 2002). Des Weiteren ist die Trimethylierung von H4K20, vermittelt durch die Methyltransferase SUV4-20, in *HPI*-Nullmutanten stark verringert (Schotta et al., 2004). Mit HP1 interagiert demnach auch SUV4-20 (Abb. 4.3C). Interessant ist die Frage, ob H3K9-Methylierung alleine schon ausreicht, um Heterochromatin zu etablieren. Der Suppressoreffekt von *Suv4-20*-Mutanten lässt vermuten, dass neben der H3K9-Methylierung die H4K20-Trimethylierung eine Voraussetzung für Heterochromatin darstellt. *Suv4-20*-Mutanten weisen einen dominanten Suppressoreffekt auf und unterdrücken heterochromatisches *Gensilencing* (Schotta et al., 2004; Phalke et al., 2009). H4K20me3 stellt somit ebenfalls eine repressive Histonmodifizierung dar. In *Su(var)3-9*-Mutanten ist die H4K20-Trimethylierung stark reduziert, da die Bindung von HP1 an das Chromatin nicht mehr möglich ist (Schotta et al., 2004). Die H4K20-Trimethylierung könnte demnach die finale Markierung für Heterochromatin darstellen. In *Suv4-20*-Mutanten könnte die H3K9-Dimethylierung völlig unbeeinflusst sein. Des Weiteren könnte eine Reduktion der Menge an H4K20me3 aufgrund der molekularen Reaktionsfolge auch in *Su(var)3-3*-Mutanten vorhanden sein.

#### **4.6 Die Chromatindifferenzierung wird durch Hormonsignale initiiert**

Während der Entwicklung muss die Zelldifferenzierung in den korrekten Bereichen und zu den richtigen Zeitpunkten auftreten. Steroidhormonsignale spielen bei der Steuerung von Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle. Mit der Identifizierung von *taiman* als dominanten Suppressor für PEV konnte gezeigt werden, dass Hormonsignale auch bei der Chromatindifferenzierung in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* eine wichtige Funktion innehaben. TAIMAN ist ein Koaktivatorprotein für den EcR/USP Ecdyson-Rezeptorkomplex und homolog zu Steroidhormonrezeptor-Koaktivatoren der p160-Familie. Neben *taiman* weist auch die Temperatur-sensitive *ecdysoneless*-Mutante *ecd1* einen dominanten Suppressoreffekt in der nicht-permissiven Temperatur auf (Apelt, pers. Mitteilung). In der *ecd1*-Mutante ist der Ecdysongehalt bei einer Temperatur von 29°C stark reduziert (Garen et al., 1977; Redfern and Bownes, 1983; Warren et al., 1996). Mutanten für den Ecdysonrezeptor *EcR* selbst zeigen ebenfalls dominante Suppressoreffekte. Das Zinkfingerprotein WOC reguliert die

Aktivität der 7,8-Dehydrogenase, welche den ersten Schritt in der Ecdysonsynthese aus Cholesterol katalysiert (Warren et al., 2001). Auch *woc*-Mutanten zeigen einen dominanten Suppressoreffekt für PEV im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Hintergrund. Das Cytochrom P450 Enzym Disembodied ist in die Synthese von Ecdyson involviert (Chávez et al., 2000). Die *disembodied*-Mutante weist ebenfalls einen Suppressoreffekt auf. Diese Daten zeigen, dass das Steroidhormon Ecdyson beim Aufbau von Chromatinstrukturen eine entscheidende Rolle spielt. Dies bestätigen auch die Veränderungen von Histonmodifizierungen in frühen Embryonen von *tai*-Mutanten. Neben einer Erhöhung von H3K27me3 weisen *tai*-Mutanten eine signifikante Verringerung der H3K9-Di- und Trimethylierung auf. Außerdem sind die euchromatische H3K4me3 und die H3K9ac stark erhöht, wobei die erhöhte H3K9ac eine Reduktion der repressiven H3K9-Di- und Trimethylierung bewirkt. Die erhöhte H3K4me3 lässt sich durch die starke Reduktion der Proteinmenge der H3K4me3-Demethylase LID erklären. In *lid*-Nullmutanten führt eine erhöhte H3K4me3 zu einer verstärkten Rekrutierung der Deacetylase RPD3 und somit zu einer Verringerung von H3K9ac. Interessant ist, dass auch in *tai*-Mutanten eine stark erhöhte Proteinmenge von RPD3 detektierbar ist, jedoch keine Verringerung der Menge an H3K9ac erfolgt. Offenbar wird RPD3 verstärkt rekrutiert, allerdings erfolgt keine H3K9-Deacetylierung. Dabei könnte der dING2-RPD3-*Silencing*-Komplex durch das Fehlen bestimmter Komplexpartner nicht vollständig funktionsfähig sein. Da eine erhöhte H3K4me3 sowie eine erhöhte RPD3-Proteinmenge in *tai*-Mutanten vorhanden sind, wäre auch eine erhöhte dING2-Proteinmenge möglich. Ob die Proteinmenge von dING2 in *tai*-Mutanten verändert ist, könnte mittels eines Antikörpers für dING2 untersucht werden. In Hefen und Säugern konnte gezeigt werden, dass RPD3/HDAC1 und ING1/2 Bestandteile eines großen *Silencing*-Komplexes sind, dessen Gerüst SIN3 bilden kann (Laherty., et al 1997; Zhang., et al 1997; Skowyra et al., 2001; Kuzmichev., et al., 2002; Doyon., et al., 2006). Die Hauptbestandteile des SIN3-Komplexes sind neben HDAC1/2 und ING1/2 die Proteine SAP30, SDS3/SAP45, SAP130, SAP180, RBP1 und BRMS1 (Alland et al., 1997; Hassig et al., 1997; Lechner et al., 2000; Fleischer et al., 2003; Meehan et al., 2004; Shiio et al., 2006; Zang et al., 2006). Eine Vielzahl von anderen Proteinen ist ebenfalls Teil des SIN3-Komplexes wie z.B. SMRT, MeCP2, Mad1, KLF Repressor, REST und ESET (Nagy et al., 1997; Nan et al., 1998; Yang et al., 2003). TAIMAN ist ein Koaktivatorprotein für den EcR/USP Ecdyson-Rezeptorkomplex und verstärkt die Ecdyson-induzierte Transkription (Bai et al., 2000).



**Abbildung 4.4:** Schematische Struktur und Funktionsweise des Ecdyson-Rezeptorkomplexes. EcR und USP binden an ein EcR-Responselement (EcRE). Die aktivierte Form von Ecdyson, 20-Hydroxyecdysone (20E) und TAI binden an den Rezeptorkomplex und induzieren die Transkription.

EcR und USP bilden ein Dimer und stellen die *Core*-Einheit des Ecdyson-Rezeptorkomplexes dar (Yao et al., 1992; Yao et al., 1993). Durch Ecdyson (20-Hydroxyecdysone, 20E) wird die Transkription induziert (Abb. 4.4).

Die Bildung von Puffs ist ein Anzeichen von Genaktivierung in Polytänchromosomen. Ein zeitliches Muster für Puffbildung wird durch das Steroidhormon Ecdyson kontrolliert (Ashburner, 1971). Eine geringe Anzahl von Genen reagiert durch die Bildung von Puffs innerhalb von wenigen Minuten nach Zugabe von Ecdyson, während eine wesentlich höhere Anzahl erst nach Stunden reagiert (Ashburner, 1972). Die zeitliche Ausprägung von Puffs unterliegt dabei einer genetischen Hierarchie (Ashburner und Garcia-Bellido, 1973; Thummel, 1990; Guay und Guild 1991). Frühe Puffs sind dabei unabhängig von einer Proteinsynthese, während spätere Puffs eine Proteinsynthese voraussetzen (Ashburner, 1974). Proteinsynthese-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Entstehung der frühen Puffs, was darauf hinweist, dass deren Induzierung durch Ecdyson das primäre Ereignis ist (Ashburner, 1974). EcR wird zu Beginn der Genaktivierungs-Kaskade direkt durch Ecdyson induziert (Karim und Thummel, 1992; Huet et al., 1995). Die Veränderungen der Histonmodifizierungen in *tai*-Mutanten können durch die Veränderung der Proteinmenge von histonmodifizierenden Enzymen entstehen. LID ist eine Demethylase spezifisch für H3K4me3. Die Proteinmenge von LID ist in *tai*-Mutanten signifikant verringert, wohingegen die H3K4-Trimethylierung erhöht ist. Die verringerte Proteinmenge von LID legt eine Veränderung der Transkription von *lid* in *tai*-Mutanten nahe. Tatsächlich konnte eine Reduktion der *lid*-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen werden (Nickel, pers. Mitteilung). Um einen Überblick über veränderte Transkripte in *tai*-Mutanten zu erhalten, wurden genomweite Microarray-Analysen durchgeführt. Für diese Analysen wurde die homozygote *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* verwendet. Auf dem Microarray befanden sich 18952 DNA-Markierungen. 2234 Gene wurden als signifikant in ihrer Expression im Hintergrund der *tai*-Mutante

gewertet (Schmidt, 2009). Unter diesen Genen befinden sich 1322 hochregulierte Gene und 912 herunterregulierte Gene. Unter den am stärksten hochregulierten Genen sind Gene für putative Proteasen und Gene der *Jonah*-Familie, welche ebenfalls für Proteasen kodieren (Ross et al., 2003; Tab. 4.1).

**Tabelle 4.1:** Stark hochregulierte Gene der P-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139.

Gen	Region	Regulationsfaktor	mögliche Funktion
<i>CG13445</i>	72A1	4.220	Transmembranprotein
<i>CG9672</i>	15A3	4.169	Protease
<i>CG18179</i>	67C3	3.762	Protease
<i>Jon25Bi</i>	25B4	3.759	Protease (Ahrens und Mahoney, 1998)
<i>CG3819</i>	75E6	3.709	Endonuclease
<i>nol</i>	68A8	3.700	Transmembrandomäne, essentiell für Neurogenese (Koizumi et al., 1995)
<i>CG10205</i>	51C4	3.180	?
<i>CG12303</i>	67E3	3.153	Transmembranprotein
<i>CG3868</i>	70D6	2.905	?
<i>fzr2</i>	60A13	2.901	<i>Cdh1</i> -Homolog (Jacobs et al., 2002)
<i>CG2657</i>	21A5-21B1	2.882	Glutamatrezeptor
<i>CG7710</i>	91C1	2.856	?
<i>nvd</i>	3L:24,317,967.. 24,394,755 [+]	2.835	Rieske-Domäne, Protein essentiell für Ecdyson-Synthese (Yoshiyama et al., 2006)
<i>CG4691</i>	35B5	2.817	?
<i>PGRP-SC1a</i>	44E2	2.807	essentiell für Toll-Signaling (Garver et al., 2006)
<i>CG6036</i>	97A9	2.802	Phosphatase
<i>regucalcin</i>	11A1	2.800	Seneszenz-Marker-Homolog (Fujita, 1999; Nakajima und Natori, 2000)
<i>Jon66Ci</i>	66C10	2.789	Protease (Ross et al., 2003)
<i>CG17344</i>	37C1	2.747	?
<i>dro5</i>	63D1	2.677	Drosomycin-5, Pilzabwehr (Yang et al., 2006)
<i>CG4520</i>	89A3	2.636	Porin
<i><math>\beta</math>-Trypsin</i>	47F4	2.620	Protease (David et al., 1985)
<i>CG30025</i>	47F4-47F5	2.616	Protease
<i>Jon65Ai</i>	65A4	2.536	Protease (Ross et al., 2003)
<i>CG33124</i>	22D4	2.513	Transmembranprotein
<i>CG31661</i>	22A2	2.507	Peptidase
<i>CG6452</i>	97C2	2.484	Transmembranprotein
<i>PH4alphaSG1</i>	99F6	2.451	ER-Enzym, Hydroxylierung von Proteinen (Abrams et al., 2006).

Des Weiteren befinden sich unter den stark hochregulierten Genen, solche die für Proteine mit Transmembran-Domänen kodieren.

Das Gen *neverland* kodiert für ein Protein, das eine Rieske-Domäne beinhaltet und ist ebenfalls stark hochreguliert. Diese Domäne enthält 2-Eisen-2-Schwefel-Cluster (Rieske et al., 1964). Mutanten für *nvd* weisen eine Unterbrechung der Häutung und des Wachstums während der *Drosophila*-Entwicklung auf (Yoshiyama et al., 2006). Dieser Phänotyp kann durch Zugabe von 20-Hydroxyecdysen oder die Vorstufe 7-Dehydrocholesterol gerettet werden. Nvd könnte Oxidations- oder Hydroxylierungs-Reaktionen während der Ecdysteroid-Biosynthese katalysieren (Yoshiyama et al., 2006). Die Gene *PGRP-SC1a* und *dro5* sind stark hochreguliert und spielen bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle. Ebenso stark hochreguliert in frühen Embryonen der homozygote *P*-Element-Insertionslinie *5-SZ-3139* ist das Gen *regucalcin*, welches für einen Seneszens-Marker kodiert (Fujita, 1999; Nakajima und Natori, 2000). In Juvenilhormon-defizienten Fliegen, die keine *Corpora allata*-Zellen aufweisen, ist dieses Gen ebenfalls stark hochreguliert (Liu et al., 2009). Während der Entwicklung von *Drosophila* lösen 20-Hydroxyecdysen und das Juvenilhormon die Larvalhäutung aus. Sinkt die Konzentration an Juvenilhormon unter einen bestimmten Schwellenwert, erfolgt eine Verpuppung (Riddiford, 1994; Riddiford et al., 2003).

Unter den am stärksten herunterregulierten Genen sind Gene, die für Proteine mit putativen Transmembran-Domänen kodieren, ein Gen für eine putative Protease, eine GTPase und eine Oxidoreduktase (Tab. 4.2). Das Gen *dsx* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Geschlechtsdifferenzierung in Weibchen und Männchen von *Drosophila* reguliert und ist stark herunterreguliert. Durch geschlechtsspezifisches RNA-Splicing entstehen weibliche und männliche *dsx*-Isoformen (Burtis und Baker, 1989). *CcapR* kodiert für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der PRXamid-Peptide binden kann (Brody und Cravchik, 2000). *Cyp4s3* kodiert für ein Cytochrom P450, das in der Ecdysteroid-Synthese eine Rolle spielen könnte (Tijet et al., 2001; Gilbert, 2004). *Laf* kodiert für ein Protein, das mit Labial interagiert (Megraw und Kaufman, 1996). Labial wird von dem homeotischen Gen *lab* kodiert (Mlodzik et al., 1998). Die Gene *lz* und *cato* kodieren für Transkriptionsfaktoren (Lebestky et al., 2003; zur Lage und Jarman, 2010) und sind stark herunterreguliert. Der Transkriptionsfaktor Cato beinhaltet, wie auch TAIMAN, eine Helix-Loop-Helix-Domäne (zur Lage und Jarman, 2010; Tab. 4.2).

**Tabelle 4.2:** Stark herunterregulierte Gene der *P*-Element-Insertionslinie 5-*SZ-3139*.

Gen	Region	Regulationsfaktor	mögliche Funktion
<i>CG1136</i>	64A5	-3.135	Cuticulaprotein
<i>CG32167</i>	73E4	-2.927	?
<i>CG14356</i>	88A9	-2.769	Transmembranprotein
<i>CG18557</i>	23B4	-2.765	Protease
<i>dsx</i>	84E5-84E6	-2.647	Transkriptionsfaktor, somatische geschlechtsspezifische Entwicklung (Burtis und Baker, 1989)
<i>CG14341</i>	21F1	-2.607	?
<i>CcapR</i>	96F8	-2.502	G-Protein gekoppelter Rezeptor (Brody und Cravchik, 2000)
<i>Cyp4s3</i>	13A12	-2.399	Cytochrom P450 (Tijet et al., 2001)
<i>CG3703</i>	1D2	-2.374	GTPase
<i>CG14358</i>	88A8	-2.329	Transmembranprotein
<i>laf</i>	82E1	-2.316	Labial Protein Interactor (Megraw und Kaufman, 1996)
<i>CG3280</i>	67C2	-2.280	Transmembranprotein
<i>CG3635</i>	40F2-40F3	-2.251	?
<i>CG14098</i>	76B6	-2.153	?
<i>lz</i>	8D5-8D6	-2.148	Transkriptionsfaktor, essentiell für Entwicklung der Kristallzellen (Lebestky et al., 2003)
<i>yellow-f2</i>	87D7	-2.042	Dopachrome-Konversion, Melanisation (Han et al., 2002)
<i>CG30356</i>	44E3	-2.109	?
<i>rho-6</i>	33D2	-2.017	Peptidase, EGF-Rezeptor-Signaling (Wassermann et al., 2000)
<i>cato</i>	53A4	-2.014	bHLH-Transkriptionsfaktor, involviert in Neurogenese (zur Lage und Jarman, 2010)
<i>GABA-B-R1</i>	35B8	-1.977	Neurotransmitter-Rezeptor (Mezler et al., 2001)
<i>CG13404</i>	12E6	-1.973	?
<i>CG6938</i>	68F1	-1.955	?
<i>CG9518</i>	12F6-12F7	-1.950	Oxidoreduktase
<i>CG15376</i>	4A5	-1.926	?
<i>CG30281</i>	58B9	-1.926	Fibrinogen

Neben diesen stark hoch- bzw. herunterregulierten Genen zeigt eine Vielzahl von Chromatingenen eine Veränderung der Transkription in der *P*-Element-Insertionslinie 5-*SZ-3139* (Tab. 4.3; Schmidt, 2009).

*E(z)* kodiert für eine Methyltransferase, die für alle Methylierungsstufen von H3K27 verantwortlich ist (Ebert et al., 2004). In *tai*-Mutanten sind H3K27me1 und H3K27me2 unverändert. Die H3K27-Trimethylierung ist jedoch stark erhöht. Die homozygote *tai*-Deletionsmutante zeigt sogar eine massive Erhöhung von H3K27me3. Die Veränderung

der H3K27-Trimethylierung geht einher mit der Veränderung der Transkriptmenge von *E(z)*. *E(z)* ist in Embryonen der *P*-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139 hochreguliert (Tab. 4.3). Des Weiteren ist eine erhöhte Proteinmenge der Histondeacetylase RPD3 in *tai*-Mutanten erkennbar.

**Tabelle 4.3:** Transkriptionsveränderung von Chromatingenen der *P*-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139.

Gen	Region	Regulationsfaktor	mögliche Funktion
<i>E(z)</i>	67E5	0.986	H3K27-Methyltransferase (Czermin et al. 2002, Ebert et al. 2004)
<i>CG13902</i>	61D2	0.783	JmjC-Domäne
<i>lid</i>	26B2	-0.700	H3K4me3-Demethylase (Eissenberg et al., 2007)
<i>Sin3A</i>	49B5-49B7	-0.677	Komplekspartner von RPD3, Transkriptionsrepressor (Hassig et al., 1997)
<i>Caf1-105</i>	47A9	0.612	Chromatin-Assemblierung (Smith und Stillman, 1989)
<i>piwi</i>	32C1	-0.585	Bestandteil des RISC-Komplex, RNAi, Bindung von piRNAs (Girard et al., 2006; Lu und Clark, 2010)
<i>Rpd3</i>	64B12	0.546	Histondeacetylase (Czermin et al., 2001)
<i>Rbf</i>	1C5	-0.511	Komponent des E2F DNA-Bindungs-Komplexes (Du et al., 1996)
<i>Pc</i>	78C6	0.481	Repressor von homeotischen Genen (Lewis, 1978)
<i>HP1c</i>	94C4	0.438	HP1-Isoform, nicht im Heterochromatin, Interaktion mit WOC (Smothers und Henikoff, 2001; Font-Burgada et al., 2008)
<i>cid</i>	50A11	0.434	H3-ähnlich, zentromerspezifisch (Henikoff et al., 2000)
<i>mSl-3</i>	65E4	-0.426	Dosiskompensation (Gorman et al, 1995)
<i>Sir2</i>	34A7	-0.418	Histondeacetylase (Barlow et al., 2001)
<i>H4r</i>	88C9	0.404	Austausch-Histon H4 (Akhmanova et al., 1996)
<i>gpp</i>	83E6-83E7	-0.377	H3K79-Methyltransferase (Feng et al., 2001)
<i>His3.3B</i>	8C14	0.336	H3-Variante (Fretzin et al., 1991)
<i>Acf1</i>	100D2	-0.328	Chromatinassemblierungs- und Remodeling- Faktor (Ito et al., 1997)
<i>dLSD1</i>	77A3	-0.325	H3K4-Demethylase, SU(VAR)3-3 (Shi et al., 2004; Rudolph et al., 2007)
<i>brm</i>	72C1	-0.314	Transkriptionsaktivierung homeotischer Gene (Tamkun et al., 1992)
<i>Su(var)3-9</i>	88E6	0.299	H3K9-Methyltransferase (Schotta et al. 2002)
<i>trr</i>	2B14	-0.298	H3K4-Methylierung (Sedkov et al., 2003)
<i>mod(mdg4)</i>	93D7-93D9	0.273	Enhancer für PEV (Dorn et al., 1993)
<i>HP1</i>	28F2	0.269	Heterochromatinprotein 1 (James und Elgin, 1986)
<i>snr1</i>	83A4	0.238	Komplekspartner von brm, Transkription homeotischer Gene (Dingwall et al., 1995)
<i>nej</i>	8F7-8F9	-0.229	Histoneacetyltransferase (Ludlam et al., 2002)
<i>CoRest</i>	18C8	0.194	Bestandteil von Histondeacetylase-LSD1- Komplexen (Yu et al., 2003; Lee et al., 2005)

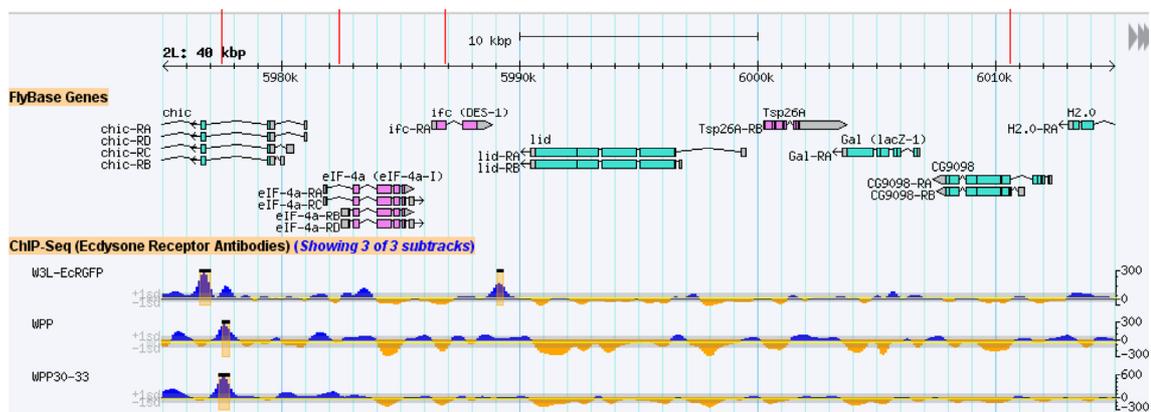
Dies korreliert ebenfalls mit einer erhöhten Transkription von *Rpd3* (Tab. 4.3). Dennoch ist auch eine verstärkte Menge an H3K9ac in *tai*-Mutanten erkennbar. Interessant ist die Tatsache, dass neben einer erhöhten Transkription von *Rpd3* tatsächlich auch die Transkription von *Sin3A* verändert ist. *Sin3A* kodiert für SIN3, das wie schon beschrieben, neben RPD3 zu einem *Silencing*-Komplex gehört (Laherty., et al 1997; Zhang., et al 1997; Skowrya et al., 2001; Kuzmichev., et al., 2002; Doyon., et al., 2006). Außerdem herunterreguliert ist die Transkription von *Sir2*, welches für eine Histondeacetylase kodiert (Barlow et al., 2001). SIR2 ist die Histondeacetylase, welche die höchste evolutionären Konservierung aufweist (Brachmann et al., 1995). *Sir*-Nullmutanten verstärken den *extra-sex-combs*-Phänotyp von bestimmten *Polycomb*-Mutanten (Furuyama et al., 2004). Außerdem supprimieren *Sir*-Mutanten die Variegation eines PRE-mini-*white* Transgen, was eine Funktion von SIR2 im Polycomb-Silencing nahe legt (Furuyama et al., 2004). Tatsächlich interagiert SIR2 mit der Histonmethyltransferase E(Z) und ist mit einem E(Z)-Komplex assoziiert (Furuyama et al., 2004). Neben einer Erhöhung der Transkriptmenge von *E(z)* ist auch *Pc* in Embryonen der *P*-Element-Insertionslinie 5-SZ-3139 hochreguliert.

Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte eine Reduktion der *lid*-Expression nachgewiesen werden (Nickel, pers. Mitteilung). Die genomweiten Microarray-Analysen zeigen ebenfalls eine Herunterregulation von *lid* (Schmidt, 2009).

Die Proteinmenge der H3K4me3-Demethylase LID ist in *tai*-Mutanten signifikant reduziert, wohingegen die H3K4-Trimethylierung erhöht ist.

Möglicherweise erfolgt eine direkte Regulation der *lid*-Expression durch TAIMAN und den Ecdyson-Rezeptorkomplex. Die Bindung des Ecdysonrezeptors kann an das Konsensusmotiv 5'-ANR(TT)NANTGA(CA)CY-3' erfolgen. In einem Bereich von ca. 10kb *up*- und *downstream* von *lid* konnten 4 putative EcR-Bindestellen durch Sequenzanalysen identifiziert werden (Abb. 4.5; Schmidt, 2009). Im Rahmen des modENCODE-Projektes wurden mittels ChIP-Seq EcR-Bindestellen für verschiedene Entwicklungsstadien (3. Larve, Präpuppe, Präpuppe + 30-33h) von *Drosophila* bestimmt (Abb. 4.5; Celniker et al., 2009). Eine postulierte EcR-Bindestelle betrifft das Gen *chic*, in dem tatsächlich mittels ChIP-Seq EcR-Bindestellen nachgewiesen wurden. Eine weitere EcR-Bindestelle wurde *downstream* von *lid* mittels ChIP-Seq im 3. Larvenstadium gezeigt (Celniker et al., 2009), die jedoch nicht vorhergesagt wurde. Im Gen *eIF-4a* wurde ebenfalls eine putative EcR-Bindestelle postuliert. In diesem Bereich befindet sich die *P*-Elementinsertion  $P\{hsneo.ry^+\}eIF-4a^{162-3}$ , welche einen Enhancereffekt aufweist (Dorn et al., 1993a). Der Enhancereffekt wird jedoch nicht

durch *eIF-4a* hervorgerufen. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte die veränderte Transkription des Gens *lid* darstellen, da *lid*-Mutanten ebenfalls einen Enhancereffekt im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Hintergrund aufweisen. Die putative EcR-Bindestelle und somit eine mögliche EcR-Bindung in *eIF-4a* könnte durch die *P*-Elementinsertion gestört sein und die Transkription von *lid* verändern. Um dies zu untersuchen, müssten RT-PCR-Analysen im Hintergrund der *P*-Elementinsertion *P{hsneo.ry<sup>+</sup>}eIF-4a<sup>l62-3</sup>* durchgeführt werden. Außerdem könnten ChIP-Analysen mit EcR-spezifischen Antikörpern darüber Aufschluss geben, ob mögliche zusätzliche EcR-Bindestellen in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* in dieser Region existieren.



(<http://www.modencode.org>)

**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung der genomischen *lid*-Region. Putative EcR-Bindestellen sind mit roten Linien gekennzeichnet (Schmidt, 2009). Im Rahmen des modENCODE-Projektes wurden mittels ChIP-Seq EcR-Bindestellen für verschiedene Entwicklungsstadien (3. Larve: W3L, Präpuppe: WPP, Präpuppe + 30-33h: WPP30-33) von *Drosophila* bestimmt (Celniker et al., 2009).

## 5 Zusammenfassung

Posttranslationale Modifizierungen von Histonen stellen wichtige epigenetische Markierungen dar. Das *Drosophila Su(var)3-9* ist ein dominanter Suppressor für PEV und kodiert für eine H3K9-spezifische Methyltransferase. *Gensilencing* in PEV ist erklärbar mit dem *Spreading* von Heterochromatin. In Wildtyp-Fliegen konnte mittels ChIP eine molekulare Bestätigung des *Spreading*-Modells etabliert werden. In adulten *Su(var)3-9*-Nullmutanten ist kein *Spreading* von H3K9me2 in der *white-roughest*-Region im Rearrangement *In(1)w<sup>m4h</sup>* vorhanden. Das funktionelle Modul von SU(VAR)3-9 ist die SET-Domäne. Alle molekular charakterisierten Punktmutanten liegen innerhalb der preSET-, SET-, bzw. postSET-Domäne. Das *Silencing*-Potenzial von SU(VAR)3-9 beruht auf der enzymatischen Aktivität der SET-Domäne und korreliert mit der KMTase-Aktivität. Die hypermorphe Punktmutante *Su(var)3-9<sup>pm</sup>* zeigt eine massiv erhöhte KMTase-Aktivität, was in einer Konversion des H3K9me2- zu H3K9me3-*Spreadings* in der *white-roughest*-Region resultiert. Neben SU(VAR)3-9 und SETDB1 als spezifische H3K9-Methyltransferasen weist dG9a keine spezifische H3K9-Methyltransferaseaktivität auf. Die antagonistische Enzymklasse zu KMTasen bilden Histondemethylasen. SU(VAR)3-3 ist das *Drosophila* Orthologe der humanen H3K4/H3K9-Demethylase LSD1. *Su(var)3-3*-Mutanten sind dominante Suppressoren für heterochromatisches *Gensilencing* und kompensieren sogar die massive Heterochromatisierung in *Su(var)3-9<sup>pm</sup>*. H3K4-Methylierung behindert die SU(VAR)3-9-vermittelte H3K9-Methylierung. Die Demethylierung von H3K4me1/2 durch SU(VAR)3-3 ermöglicht die Methylierung von H3K9 durch SU(VAR)3-9 während der Chromatindifferenzierung. In adulten *Su(var)3-3*-Nullmutanten ist kein H3K9me2-*Spreading* in der *white-roughest*-Region im Rearrangement *In(1)w<sup>m4h</sup>* vorhanden. Die Chromatindifferenzierung erfolgt in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Mit der Identifikation des Ecdysonrezeptor-Koaktivatorproteins TAIMAN als *Su(var)* konnte gezeigt werden, dass Hormonsignale bei der Initiation der Chromatindifferenzierung eine wichtige Rolle spielen. Mutationen in *taiman* führen zu einer Erhöhung der H3K9-Acetylierung und einer Verringerung von H3K9me2 und H3K9me3. Die Transkription der H3K4me3-Demethylase LID ist in *tai*-Mutanten verringert, was zu einem geringeren LID-Proteinlevel führt und zu einer Erhöhung von H3K4me3. Des Weiteren ist in *tai*-Mutanten die Transkription der H3K27-Methyltransferase E(Z) verstärkt und die H3K27-Trimethylierung erhöht.

## 6 Literatur

- Abrams EW, Mihoulides WK, Andrew DJ (2006) Fork head and Sage maintain a uniform and patent salivary gland lumen through regulation of two downstream target genes, *PH4aSG1* and *PH4aSG2*. *Development* **133**: 3517-3527.
- Aasland R und Stewart AF (1995) The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res* **23**: 3163-3173.
- Agalioti T, Chen G, Thanos D (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**: 381-392.
- Agawa Y, Sarhan M, Kageyama Y, Akagi K, Takai M, Hashiyama K, Wada T, Handa H, Iwamatsu A, Hirose S, Ueda H (2007) *Drosophila* Blimp-1 is a transient transcriptional repressor that controls timing of the ecdysone-induced developmental pathway. *Mol Cell Biol* **27**: 8739-8747.
- Ahrens JE, Mahoney PA (1998) Isolation and cloning of Ser4, a gene encoding a trypsin-like serine protease in *Drosophila melanogaster*. *Biochim biophys Acta* **1395**: 141-144.
- Akhmanova A, Miedema K, Hennig W (1996) Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Lett* **388**: 219-222.
- Alland L, Muhle R, Hou H Jr, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**: 49-55.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Miller W und Lippman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Ander M (2007) Untersuchung der strukturellen Eigenschaften und Ligandeninteraktion von Histonmethyltransferasen. Diplomarbeit, Universität Leipzig.
- Apelt C (2005) Genetische Analyse neuer Chromatingene von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Ashburner M (1971) Induction of puffs in polytene chromosomes of *in vitro* cultured salivary glands of *Drosophila melanogaster* by ecdysone and ecdysone analogues. *Nature New Biol* **230**: 222-224.
- Ashburner M (1972) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. VI. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melanogaster* cultured *in vitro*. *Chromosoma* **38**: 255-281.
- Ashburner M und Garcia-Bellido A (1973) Ecdysone induction of puffing activity in salivary glands of *Drosophila melanogaster* grown in adult abdomens. *Development Genes and Evolution* **172**: 166-170.
- Ashburner M (1974) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. The effects of inhibitors of protein synthesis. *Dev Biol* **39**: 141-157.
- Bai J, Uehara Y, Denise J, Montell DJ (2000) Regulation of Invasive Cell Behavior by Taiman, a *Drosophila* Protein Related to AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast Cancer. *Cell* **103**: 1047–1058.
- Bacolla A, Pradhan S, Roberts RJ, Wells RD (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steadystate kinetics reveal allosteric activation by methylated dna. *J Biol Chem* **274**: 33011–33019.
- Badugu R, Shareef MM, Kellum R (2003) Novel *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations. *J Biol Chem* **278**: 34491-34498.
- Ball LJ, Murzina NV, Broadhurst RW, Raine AR, Archer SJ, Stott FJ, Murzin AG, Singh PB, Domaille PJ, Laue ED (1997) Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein1. *EMBO J* **16**: 2473–2481.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120–124.
- Baisch H (2010) Die H3K4me3 Histondemethylase LID reguliert die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin in *Drosophila*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V (2001) The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionary conserved classes. *Nucleic Acids Res* **29**: 4319-4333.

- Barlow AL, van Drunen CM, Johnson CA, Tweedie S, Bird A, Turner BM (2001) dSIR2 and dHDAC6: two novel, inhibitor-resistant deacetylases in *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res* **265**: 90-103.
- Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F (2002) Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* **419**: 857-862.
- Bellen HJ, Levis RW, Liao G, He Y, Carlson JW, Tsang G, Evans-Holm M, Hiesinger PR, Schulze KL, Rubin GM, Hoskins RA, Spradling AC (2004) The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**: 761-781.
- Bender M, Imam FB, Talbot WS, Ganetzky B, Hogness DS (1997) *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* **91**: 777-788.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL (2002) Methylation of histone H3 Lys4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8695-8700.
- Blackburn EH (1994) Telomeres: no end in sight. *Cell* **77**: 621-623.
- Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression and chromosome stability. *Genes Dev* **9**: 2888-2902.
- Brody T und Cravchik A (2000) *Drosophila melanogaster* G Protein-coupled Receptors. *J Cell Biol* **150**: 83-88.
- Borchardt R, Wu Y (1976) S-aristeromycinyl-l-homocysteine, a potent inhibitor of s-adenosylmethionine-dependent transmethylation. *J Med Chem* **19**: 197-198
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**: 843-851.
- Bujnicki JM, Prigge ST, Caridha D, Chiang PK (2003) Structure, evolution, and inhibitor interaction of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Plasmodium falciparum*. *Proteins* **52**: 624-632.
- Burtis KC und Baker BS (1989) *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* **56**: 997-1010.
- Byrd KN, 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.

- Caggese C, Ragone G, Barsanti P, Moschetti R, Messina A, Massari S, Caizzi R (1997) The S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase of *Drosophila melanogaster*: identification, deduced amino acid sequence and cytological localization of the structural gene. *Mol Gen Genet* **253**: 492-498.
- Cantoni GL und Scarano E (1954) The formation of S-adenosylhomocysteine in enzymatic transmethylation reactions. *J Am Chem Soc* **76**: 4744.
- Celniker SE, Dillon LA, Gerstein MB, Gunsalus KC, Henikoff S, Karpen GH, Kellis M, Lai EC, Lieb JD, MacAlpine DM, Micklem G, Piano F, Snyder M, Stein L, White KP, Waterston RH; modENCODE Consortium (2009) Unlocking the secrets of the genome. *Nature* **459**: 927-930.
- Chávez VM, Marqués G, Delbecque JP, Kobayashi K, Hollingsworth M, Burr J, Natzle JE, O'Connor MB (2000) The *Drosophila disembodied* gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* **127**: 4115-4126
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* **5**: 905-915.
- 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.
- Cooper BJ, Key B, Carter A, Angel NZ, Hart DN, Kato M (2006) Suppression and overexpression of adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1 (AHCYL1) influences zebrafish embryo development: a possible role for AHCYL1 in inositol phospholipid signaling. *J Biol Chem* **281**: 22471-22484.
- Cremer T, Kupper K, Dietzel S und Fakan S (2004) Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell* **96**: 555-567.
- Czermin B, Schotta G, Hülsmann BB (2001) Physical and functional interaction of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep* **2**: 915-919.
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002) *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**: 185-196.

- Davis CA, Riddell DC, Higgins MJ, Holden JJ, White BN (1985) A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. *Nucleic Acids Res* **13**: 6605-6619.
- Dekker JW, Budhia S, Angel NZ, Cooper BJ, Clark GJ, Hart DN, Kato M (2002) Identification of an S-adenosylhomocysteine hydrolase-like transcript induced during dendritic cell differentiation. *Immunogenetics* **53**:993-1001.
- Delange RJ, Hooper JA, Smith EL (1973) Histone 3. 3. Sequence studies on the cyanogen bromide peptides; complete amino acid sequence of calf thymus histone 3. *J Biol Chem* **248**: 3261-3274.
- Delattre M, Spierer A, Tonka CH 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.
- Dingwall AK, Beek SJ, McCallum CM, Tamkun JW, Kalpana GV, Goff SP, Scott MP (1995) The *Drosophila* snr1 and brm proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. *Mol Biol Cell* **6**: 777-791
- Doheny JG, Mottus R, Grigliatti TA (2008) Telomeric Position Effect - A Third Silencing Mechanism in Eukaryotes. *PLoS ONE* **12**: e3864
- Dorn R, Morawietz H, Reuter G, Saumweber H (1993a) Identification of an essential *Drosophila* gene that is homologous to the translation initiation factor eIF-4A of yeast and mouse. *Mol Gen Genet* **237**: 233-240.
- Dorn R, Krauss V, Reuter G, Saumweber H (1993b) 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.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Côté V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Côté J (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**: 51-64.
- Du W, Vidal M, Xie JE, Dyson N (1996) RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**: 1206-1218.
- Ebert A (2005) *Su(var)*-Gene regulieren die Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**: 2973-2983.

- Ebert A, Lein S, Schotta G, Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Research* **14**, 377-392.
- Eissenberg JC und Elgin SCR (2000) The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Gen Dev* **10**: 204–210.
- Eissenberg JC, Lee MG, Schneider J, Ilvarsonn A, Shiekhattar R, Shilatifard A. (2007) The trithorax-group gene in *Drosophila* little imaginal discs encode a trimethylated histone H3 Lys4 demethylase. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 344-346.
- Eskeland R, Czermin B, Boeke J, Bonaldi T, Regula JT, Imhof A (2004) The N-terminus of *Drosophila* SU(VAR)3-9 mediates dimerization and regulates its methyltransferase activity. *Biochemistry* **43**: 3740-3749.
- Fanti L, Giovinazzo G, Berloco M, Pimpinelli S (1998) The Heterochromatin Protein 1 Prevents Telomere Fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* **2**: 527–538.
- Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F (1994) The Trithoraxlike gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* **371**: 806-808.
- Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y (2006) G9a mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* **8**: 188–194.
- Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**:1870-1881.
- Fleischer TC, Yun UJ, Ayer DE (2003) Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Mol Cell Biol* **23**: 3456-3467.
- Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Battaglioli E, Mattevi A (2005) Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *J Biol Chem* **280**: 41360-41365.
- Fretzin S, Allan BD, van Daal A, Elgin SC (1991) A *Drosophila melanogaster* H3.3 cDNA encodes a histone variant identical with the vertebrate H3.3. *Gene* **107**: 341-342.
- Fritsch L, Robin P, Mathieu JRR, Souidi M, Hinaux H, Rougeulle C, Harel-Bellan A, Ameyar-Zazoua M, Ait-Si-Ali S (2010) A Subset of the Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 Participate in a Multimeric Complex. *Mol Cell* **37**: 46-56.
- Fujita T (1999) Senescence marker protein-30 (SMP30): structure and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 1-4.

- Furuyama T, Banerjee R, Breen TR, Harte PJ (2004) SIR2 is required for polycomb silencing and is associated with an E(Z) histone methyltransferase complex. *Curr Biol* **14**: 1812-1821.
- Fyodorov DV, Blower MD, Karpen GH, Kadonaga JT (2004) Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev* **18**: 170-183.
- Garen A, Kauvar L, Lepesant J-A (1977) Roles of ecdysone in *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5099-5103.
- Garver LS, Wu J, Wu LP (2006) The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 660-665.
- Gatti M und Pimpinelli S (1992) Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu Rev Genet* **26**: 239-275.
- Gilbert LI (2004) Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* **215**: 1-10.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* **442**: 199-202.
- Gorman M, Franke A, Baker BS (1995) Molecular characterization of the male-specific *lethal-3* gene and investigations of the regulation of dosage compensation in *Drosophila*. *Development* **121**: 463-475.
- Greil F, van der Kraan I, Delrow J, Smothers JF, de Wit E, Bussemaker HJ, van Driel R, Henikoff S, van Steensel B (2003) Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes Dev* **17**: 2825-2838.
- Grzenda A, Lomberk G, Zhang JS, Urrutia R (2009) Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochim Biophys Acta* **1789**: 443-450
- Guo R, Chen J, Mitchell DL, Johnson DG (2011) GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res* **39**: 1390-1397
- Guay PS and Guild GM (1991) The Ecdysone-Induced Puffing Cascade in *Drosophila* Salivary Glands: A Broad-Complex Early Gene Regulates Intermolt and Late Gene Transcription. *Genetics* **129**: 169-175.
- Gyory I, Wu J, Fejér G, Seto E, Wright KL (2004) PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol* **5**: 299-308.

- Han Q, Fang J, Ding H, Johnson JK, Christensen BM, Li J (2002) Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochem J* **368**: 333-340.
- Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, Ayer DE (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* **89**: 341-347.
- Henikoff S und Matzke MA (1997) Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet* **13**: 293-295.
- Henikoff S, Ahmad K, Platero JS, van Steensel B (2000) Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 716-721.
- Henderson DS, Banga SS, Grigliatti TA, Boyd JB (1994) Mutagen sensitivity and suppression of position-effect variegation result from mutations in *mus209*, the *Drosophila* gene encoding PCNA. *EMBO J* **13**: 1450-1459.
- Heitz E (1928) Das Heterochromatin der Moose. *I Jb wiss Bot* **69**: 762-818.
- Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Pannuti A, Lucchesi JC (1997) mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *EMBO J* **16**: 2054-2060.
- Hilliker AJ und Appels R (1982) Pleiotropic effects associated with the deletion of heterochromatin surrounding rDNA on the X chromosome of *Drosophila*. *Chromosoma* **86**: 469-490.
- Holliday R (1994) Epigenetics: an overview. *Dev Genet* **15**: 453-457.
- Huet F, Ruiz C, Richards G (1995) Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development* **121**: 1195-1204.
- Hsieh T und Brutlac D (1979) Sequence and sequence variation within the 1.688 g/cm<sup>3</sup> satellite DNA of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* **135**: 465-481.
- Ito T, Bulger M, Pazin MJ, Kobayashi R, Kadonaga JT (1997) ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* **90**: 145-155.
- Ito N und Rubin GM (1999) Gigas, a *Drosophila* homolog of tuberous sclerosis gene product-2, regulates the cell cycle. *Cell* **96**: 529-539.
- Ivanova AV, Bonaduce MJ, Ivanov SV, Klar AJS (1998) The chromo and SET domains of the Clr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature Genet* **19**: 192-195.

- Jacobs AS, Harp JM, Devarakonda S, Kim Y, Rastinejad F, Khoasanizadeh S (2002) The active site of the SET domain is constructed on a knot. *Nature Struct Biol* **9**: 833-838.
- Jacobs HW, Richter DO, Venkatesh TR, Lehner CF (2002) Completion of mitosis requires neither *fzr/rap* nor *fzr2*, a male germline-specific *Drosophila* Cdh1 homolog. *Curr Biol* **12**: 1435-1441.
- James TC, Eissenberg JC, Craig C, Dietrich V, Hobson A, Elgin SC (1989) Distribution pattern of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* **50**:170–180.
- James TC und Elgin SCR (1986) Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* **6**: 3862–3872.
- Jakubczak JL, Xiong Y, Eickbusch TH (1990) *Type I* (R1) and *Type II* (R2) ribosomal DNA insertions of *Drosophila melanogaster* are retrotransposable elements closely related to those of *Bombyx mori*. *J Mol Biol* **212**: 37-52.
- 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 CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- Jones RS und Gelbart WM (1993) The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol* **13**: 6357-6366.
- Kamine J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G (1996) Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* **216**:357-366.
- Karim FD, Thummel CS (1992) Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J* **11**: 4083-4093.
- Klein J, Meinecke R, Mayer M, Meyer B (1999) Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J Am Chem Soc* **121**: 5336-5337.
- Klose RJ, 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.
- Koizumi K, Nakao K, Hotta Y (1995) *no optic lobe*, gene that is essential for larval neurogenesis. *A Dros Res Conf* **36**: 333B.

- Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**: 868-871.
- Kouzarides T (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 198-209.
- Krauss V, Fassl A, Fiebig P, Patties I, Sass H (2006) The evolution of the histone methyltransferase gene Su(var)3-9 includes a fusion with and a re-fission from a functionally unrelated gene. *BMC Evol Biol* **6**: 18.
- Kusch T, Guelman S, Abmayr SM, Workman JL (2003) Two *Drosophila* Ada2 homologues function in different multiprotein complexes. *Molec Cell Biol* **23**: 3305-3319.
- Kusch T, Florens L, Hayes MacDonald W, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR, Abmayr SM, Washburn MP, Workman JL (2004) Acetylation by Tip60 Is Required for Selective Histone Variant Exchange at DNA Lesions. *Science* **306**: 2084-2087.
- Kuzmichev A, Zhang Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002) Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* **22**: 835-848.
- Kwon T, Chang JH, Kwak E, Lee CW, Joachimiak A, Kim YC, Lee JW, Cho Y (2003) Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9-AdoMet. *EMBO J* **22**: 292-303.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**:116-120.
- Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN (1997) Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **89**: 349-356.
- Laurent AM, Puechberty J, Prades C, Gimenez S und Roizes G (1997) Site-specific retrotransposition of L1 elements within human alphoid satellite sequences. *Genomics* **15**: 127-132.
- Lebestky T, Jung SH, Banerjee U (2003) A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev* **17**: 348-353.
- Lechner T, Carrozza MJ, Yu Y, Grant PA, Eberharter A, Vannier D, Brosch G, Stillman DJ, Shore D, Workman JL (2000) Sds3 (suppressor of defective silencing 3) is an integral component of the yeast Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex and is required for histone deacetylase activity. *J Biol Chem* **275**: 40961-40961.
- Lee MG, Wynder C, Cooch N, Shiekhhattar R (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* **437**: 432-435.

- Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.
- Lima Di Faria A und Jaworska H (1968) Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature* **217**: 138-142.
- Liu Y, Sheng Z, Liu H, Wen D, He Q, Wang S, Shao W, Jiang RJ, An S, Sun Y, Bendena WG, Wang J, Gilbert LI, Wilson TG, Song Q, Li S (2009) Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in *Drosophila*. *Development* **136**: 2015-2025.
- Locke J, Kotarski M, Tartof K (1988) Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* **120**: 181-198.
- Lohe AR, Hilliker AJ und Roberts PA (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**: 1149-1174.
- Ludlam WH, Taylor MH, Tanner KG, Denu JM, Goodman RH, Smolik SM (2002) The acetyltransferase activity of CBP is required for wingless activation and H4 acetylation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **22**: 3832-3841.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260.
- Lu J, Clark AG (2010) Population dynamics of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) and their targets in *Drosophila*. *Genome Res* **20**: 212-227.
- McInemey EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Kronen A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* **12**: 3357-3368.
- Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE, Carozza MJ, Shevde LA, Workman JL, Eckert KA, Verderame MF, Welch DR (2004) Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem* **279**: 1562-1569.
- Megraw TL und Kaufman TC (1996) Characterization of a novel labial protein interactor. *A Dros Res Conf* **37**: 196.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AHFM, Günther T, Buettner R, Schüle R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**: 436-439.

- Mezler M, Muller T, Raming K (2001) Cloning and functional expression of GABA<sub>B</sub> receptors from *Drosophila*. *Europ J Neurosci* **13**: 477-486.
- Min J, Zhang X, Cheng X, Grewal SS, Xu R-M (2002) Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nature Struct Biol* **9**: 828-832.
- Mis J, Ner SS, Grigliatti TA (2006) Identification of three histone methyltransferases in *Drosophila*: dG9a is a suppressor of PEV and is required for gene silencing. *Mol Genet Genomics* **275**: 513–526.
- Mlodzik M, Fjose A, Gehring WJ (1988) Molecular structure and spatial expression of a homeobox gene from the labial region of the Antennapedia-complex. *EMBO J* **7**: 2569-2578.
- Mottus R, Sobel RE, Grigliatti TA (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.
- Müller E (2004) Molekulare Charakterisierung der Suppressoren für Gensilencing *Su(var)3-3* und *Su(var)2-1* in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**: 373-380.
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W (2002) ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**: 1119-1128.
- Nakajima Y und Natori S (2000) Identification and characterization of an anterior fat body protein in an insect. *J Biochem* **127**: 901-908.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1997) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.
- Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, Hause G, Aurich A-C, Dorn R, Jenuwein T, Reuter G (2005) Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J* **24**: 1418-1429
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, 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.
- Noma K, Allis CD, Grewal SI (2001) Transitions in distinct histone h3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* **293**: 1150-1155.
- Pak DT, Pflumm M, Chesnokov I, Huang DW, Kellum R, Marr J, Romanowski P, Botchan MR (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eucaryotes. *Cell* **91**: 311-323.
- Pardue ML (1994) The ends and the middle: putting chromosomes together. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 845-850.
- Paro R und Hogness DS (1991) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 263–267.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**: 323-337.
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**: 1577-1589.
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, Marchetti E, Caizzi R, Caggese C, Gatti M (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3804–3808.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Stahl BD, Sun Z-W, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593–599.
- Redfern CPF, Bownes M (1983) Pleiotropic effects of the 'ecdysoneless-1' mutation of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **189**:432 -440.
- Reuter G und Wolff I (1981) Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **182**: 516-519.
- Reuter G, Dorn R, Hoffmann HJ (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, Rauh G (1986) Third chromosome suppressor of position-effect variegation loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **202**: 481–487.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* **12**: 1591–1598.
- Rieske JS, MacLennan DH, Coleman R (1964) Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **15**: 338-344.
- Riddiford LM (1994) Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv Insect Physiol* **24**: 213-274.
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA (2003) Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 1327-1338.
- Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, Pijnappel WW, Wilm M, Aasland R, Stewart AF (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J* **20**: 7137-7148.
- Ross J, Jiang H, Kanost MR, Wang Y (2003) Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* **304**: 117-131.
- Rougeulle C, Chaumeil J, Sarma K, Allis CD, Reinberg D, Avner P, Heard E (2004) Differential histone H Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol Cell Biol* **24**: 5475-5484.
- Roopra A, Qazi R, Schoenike B, Daley T J, Morrison J F (2004) Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell* **14**: 727–738.
- Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Kubicek S, Schäfer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T, Reuter G (2007) Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* **26**: 103-115.
- Ruhf ML, Braun A, Papoulas O, Tamkun JW, Randsholt N, Meister M (2001) The domino gene of *Drosophila* encodes novel members of the SWI/SNF2 family of DNAdependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. *Development* **128**: 1429-1441.

- Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J, Johnson G, Morley T, Chan YS, Blows F, Coulson D, Reuter G, Baisch H, Apelt C, Kauk A, Rudolph T, Kube M, Klimm M, Nickel C, Szidonya J, Maróy P, Pal M, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Stocker H, Hugentobler C, Hafen E, Gubb D, Pflugfelder G, Dorner C, Mechler B, Schenkel H, Marhold J, Serras F, Corominas M, Punset A, Roote J, Russell S (2007) The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* **177**: 615-629.
- Ryder E, Blows F, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Coulson D, Drummond J, Webster J, Gubb D, Gunton N, Johnson G, O'Kane CJ, Huen D, Sharma P, Asztalos Z, Baisch H, Schulze J, Kube M, Kittlaus K, Reuter G, Maroy P, Szidonya J, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Dickson B, Hugentobler C, Stocker H, Hafen E, Lepesant JA, Pflugfelder G, Heisenberg M, Mechler B, Serras F, Corominas M, Schneuwly S, Preat T, Roote J, Russell S (2004) The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**: 797-813.
- Szabad J, Reuter G, Schröder MB (1988) The effect of two mutations connected with chromatin functions on female germ-line cells of *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **211**: 56-62.
- Salvatella X und Giralt E (2003) NMR-based methods and strategies for drug discovery. *Chemical Society Reviews* **32**: 365-372.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407-411.
- Schicht M (2007) Die molekulargenetische Analyse einer Histon-Demethylase von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schaner CE, Deshpande G, Schedl PD, Kelly WG (2003) A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. *Dev Cell* **5**: 747-757.
- Schmidt C (2009) Bioinformatische Evaluierung von epigenetisch kontrollierten Genexpressionsmustern. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.
- Schotta G (2002) Struktur-Funktionsanalyse von SU(VAR)3-9, einem integralen Bestandteil von heterochromatischen Proteinkomplexen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**: 1251–1262.
- Schultz J (1936) Variegation in *Drosophila* and the inert heterochromatic regions. *Proc Nat Acad Sci U S A* **22**: 27-33
- Secombe J, Li L, Carlos L, Eisenman RN (2007) The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth. *Genes Dev* **21**: 537-551.
- Sedkov Y, Cho E, Petruk S, Cherbas L, Smith ST, Jones RS, Cherbas P, Canaani E, Jaynes JB, Mazo A (2003) Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature* **426**: 78-83.
- Seeger K, Lein S, Reuter G, Berger S (2005) STD-measurements with SU(VAR)3-9 and S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry* **44**: 6208-6213.
- Seeger K (2006) Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und eines *de novo* entworfenen coiled-coil peptides mit NMR. Dissertation, Universität Leipzig.
- Seum C, Spierer A, Pauli D, Szidonya J, Reuter G, Spierer P (1996) Position-effect variegation in *Drosophila* depends on dose of the gene encoding the E2F transcriptional activator and cell cycle regulator. *Development* **122**: 1949-1956.
- Seum C, Reo E, Peng H, Rauscher FJ, Spierer P, Bontron S (2007a) *Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing. *PLoS Genet.* **3**: 709–719.
- Seum C, Bontron S, Reo E, Delattre M, Spierer P (2007b) *Drosophila* G9a is a nonessential gene. *Genetics* **177**: 1955-1957.
- Shiio Y, Rose DW, Aur R, Donohoe S, Aebersold R, Eisenman RN (2006) Identification and characterization of SAP25, a novel component of the mSin3 corepressor complex. *Mol Cell Biol* **26**: 1386-1397.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96-99.
- Sinclair DA, Mottus RC, Grigliatti TA (1983) Genes which suppress position effect variegation in *Drosophila melanogaster* are clustered. *Mol Gen Genet* **191**:326-333.

- Sinclair DA, Lloyd VK, Grigliatti TA (1989) Characterization of mutations that enhance position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **216**: 328–333.
- Skowyra D, Zeremski M, Neznanov N, Li M, Choi Y, Uesugi M, Hauser CA, Gu W, Gudkov AV, Qin J (2001) Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* **276**: 8734–8739.
- Smith S und Stillman B (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* 1989 **58**:15–25.
- Smith ER, Pannuti A, Gu W, Steurnagel A, Cook RG, Allis CD, Lucchesi JC (2000) The *Drosophila* MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol Cell Biol* **20**: 312–318.
- Smothers JF und Henikoff S (2001) The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of hp1-like proteins. *Mol Cell Biol* **21**: 2555–2569.
- Stabell M, Eskeland R, Bjorkmo M, Larsson J, Aalen RB(2006) The *Drosophila* G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development. *Nucleic Acids Res* **34**: 4609–4621.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41–45.
- Szabad J, Reuter G, Schröder MB (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, 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**: 9–7.
- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev* **16**: 1779–1791.
- Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Kondo S, Motoyama J, Higashinakagawa T (1995) Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev* **9**: 1211–1222.
- Tamaru H, Selker EU (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277–283.

- Tamaru H, Zhang X, McMillen D, Singh PB, Nakayama J, Grewal SI, Allis CD, Cheng X, Selker EU (2003) Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* **34**: 75-79.
- Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA (1992) brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**: 561-572.
- Tartof KD, Hobbs C und Jones M (1984) A structural basis for variegating position effects. *Cell* **37**: 869-878.
- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**: 408-411.
- Thummel CS (1990) Puffs and gene regulation--molecular insights into the *Drosophila* ecdysone regulatory hierarchy. *Bioessays* **12**: 561-568.
- Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL, Ryner L, Cheung LM, Chong A, Erickson C, Fisher WW, Greer K, Hartouni SR, Howie E, Jakkula L, Joo D, Killpack K, Laufer A, Mazzotta J, Smith RD, Stevens LM, Stuber C, Tan LR, Ventura R, Woo A, Zakrajsek I, Zhao L, Chen F, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Winberg ML, Margolis J (2004) A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* **36**: 283-287.
- Tochio N, Umehara T, Koshiha S, Inoue M, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Watanabe S, Tomo Y, Hanada M (2006) Solution structure of the SWIRM domain of human Histone Demethylase LSD1. *Structure* **14**, 457-468.
- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge, 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.
- Turner BM, Birley AJ, Lavender J (1992) Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* **69**: 375-384.
- Tzeng TY, Lee CH, Chan LW, Shen CK (2007). Epigenetic regulation of the *Drosophila* chromosome 4 by the histone H3K9 methyltransferase dSETDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **31**: 12691-12696.
- Usdin E, Borchardt RT, Creveling CR (1982) Biochemistry of *S*-adenosylmethionine and related compounds. *MacMillan Press Ltd*: 595-602.
- VanHolde KE (1988) Chromatin. *New York, Springer*.

- Vidal M und Gaber RF (1991) RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 6317-6327.
- Waddington CH (1942) The Epigenotype. *Endeavour* **1**: 18-20.
- Warren JT, Bachmann JS, Dai JD, Gilbert LI (1996) Differential incorporation of cholesterol and cholesterol derivatives into ecdysteroids by the larval ring glands and adult ovaries of *Drosophila melanogaster*: a putative explanation for the *l(3)ecd<sup>l</sup>* mutation. *Insect Biochem Mol Biol* **26**: 931-943.
- Warren JT, Wismar J, Subrahmanyam B, Gilbert LI (2001) *Woc* (*without children*) gene control of ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* **181**: 1-14.
- Wasserman JD, Urban S, Freeman M (2000) A family of *rhomboid*-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev* **14**: 1651-1663.
- Westphal T und Reuter G (2002) Recombinogenic effects of suppressors of position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics* **160**: 609-621.
- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**: 467-481.
- Wittig R, Nessling M, Will RD, Mollenhauer J, Salowsky R, Münstermann E, Schick M, Helmbach H, Gschwendt B, Korn B, Kioschis P, Lichter P, Schadendorf D, Poustka A (2002) Candidate genes for cross-resistance against DNA-damaging drugs. *Cancer Res* 2002 **62**: 6698-6705.
- Wustmann G, Szidonya J, Taubert H, Reuter G (1989) The genetics of position-effect modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **217**: 520-527.
- Xiao B, Jing C, Wilson JR, Walker PA, Vasisht N, Kelly G, Howell S, Taylor IA, Blackburn GM, Gamblin SJ (2003) Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* **421**: 652-656
- Xiao B, Wilson JR, Gamblin SJ (2003) SET domains and histone methylation. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 699-705.
- Yang L, Mei Q, Zielinska-Kwiatkowska A, Matsui Y, Blackburn ML, Benedetti D, Krumm AA, Taborsky GJ Jr, Chansky HA (2003) An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J* **369**: 651-657.

- Yang WY, Wen SY, Huang YD, Ye MQ, Deng XJ, Han D, Xia QY, Cao, Y (2006). Functional divergence of six isoforms of antifungal peptide Drosomycin in *Drosophila melanogaster*. *Gene* **379**: 26-32.
- Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**: 63-72.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* **366**: 476-479.
- Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Kataoka H, Niwa R (2006) Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* **133**: 2565-2574.
- You A, Tong JK, Grozinger CM, Schreiber SL (2003) CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1454-1458.
- Zhang P und Spradling AC (1994) Insertional mutagenesis of *Drosophila* heterochromatin with single *P* elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3539–3543.
- Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* **89**: 357-364.
- 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.
- Zhang Y, Zhang Z, Demeler B, Radhakrishnan I (2006) Coupled unfolding and dimerization by the PAH2 domain of the mammalian Sin3A corepressor. *J Mol Biol* **360**: 7-14.
- Zhang X, Tamaru H, Khan SI, Horton JR, Keefe LJ, Selker EU, Cheng X (2002) Structure of the *Neurospora* SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell* **111**: 117-127.
- Zhang X, Yang Z, Khan SI, Horton JR, Tamaru H, Selker EU, Xiaodong C (2003) Structural basis for the product specificity of histone Lysine Methyltransferases. *Mol Cell* **12**: 177-185.
- zur Lage PI und Jarman AP (2010) The function and regulation of the bHLH gene, *cato*, in *Drosophila* neurogenesis. *BMC Dev Biol* **10**: 34.

## Publikationsliste

- Koryakov DE, Ebert A, Walter M, Lein S, Reuter G, Zhimulev IF (2011) The SUUR protein is involved in binding of SU(VAR)3-9 and methylation of H3K9 and H3K27 in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosome Research* (in press).
- Demidov D, Hesse S, Tewes A, Rutten T, Fuchs J, Ashtiyani RK, Lein S, Fischer A, Reuter G, Houben A (2009) Auroral phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in *Arabidopsis*. *Plant J* **59**: 221-230.
- Reuter G, Lein S (2009) Coordinated demethylation and methylation of histones controls heterochromatin formation and gene silencing. *Chromosomes to Genome*: 41-59 (Buchartikel).
- Hiller M, Findeiss S, Lein S, Marz M, Nickel C, Rose D, Schulz C, Backofen R, Prohaska SJ, Reuter G, Stadler PF (2009) Conserved introns reveal novel transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research* **19**: 1289-1300.
- Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Kubicek S, Schäfer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T, Reuter G (2007) Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* **26**: 103-115.
- Ebert A, Lein S, Schotta G, Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Research* **14**: 377-392.
- Lein S, Reuter G (2005) Heterochromatin und "Gene silencing". *Med Genetik* **3**: 254-259.
- Seeger K, Lein S, Reuter G, Berger S (2005) STD-measurements with SU(VAR)3-9 and S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry* **44**: 6208-6213.
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**: 2973-2983.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gunter Reuter für die Überlassung des interessanten Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft, die sehr gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung genetischer Arbeiten. Prof. Dr. Gunnar Schotta und Dr. Anja Ebert danke ich für die intensive Zusammenarbeit in Bezug auf die umfangreichen Analysen zu *Su(var)3-9*. Prof. Dr. Vincenzo Pirrotta und Dr. Yuri B. Schwartz danke ich für den Aufenthalt in Genf und das Erlernen von ChIP-Analysen. Prof. Dr. Stefan Berger, Prof. Dr. Karsten Seeger und Christoph Räuber danke ich für die ausgiebige Zusammenarbeit und die NMR-Analysen der SU(VAR)3-9-Proteine. Ich danke Dr. Thomas Rudolph, Masato Yonezawa, Stefan Kubicek und Prof. Dr. Thomas Jenuwein für die Zusammenarbeit besonders bei dem *Su(var)3-3*-Projekt. Prof. Dr. Peter F. Stadler und seiner gesamten Bioinformatik-Arbeitsgruppe in Leipzig danke ich für die gute Zusammenarbeit bei dem mlncRNA-Projekt. Kathleen Gebhardt danke ich für die Zusammenarbeit bei der Herstellung neuer SU(VAR)3-9-Mutantenproteine und bei dem *Su(var)3-3*-Projekt. Claudia Nickel danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei dem mlncRNA-Projekt und bei den Transkriptanalysen von *tai*-Mutanten. Ich danke Dr. Dimitry E. Koryakov für die sehr gute Zusammenarbeit bei den Interaktionsstudien von SUUR und SU(VAR)3-9. Matthias Walther danke ich ebenfalls für Zusammenarbeit bei den Interaktionsstudien von SUUR und SU(VAR)3-9 und bei dem *Su(var)3-3*-Projekt. Sandy Mietzsch, Martin Schicht und Christian Apelt danke ich für die sehr intensive Zusammenarbeit bei der Herstellung und Analyse von *taiman*-Mutanten. Prof. Dr. Hans-Jörg Hofmann und Marcel Ander danke ich für die Zusammenarbeit bei der Analyse neuer SU(VAR)3-9-Mutantenproteine. Dr. Andreas Huben und Dr. Andreas Fischer danke ich für die Kooperation bei der SUVR4-Analyse. Ramona Abe, Maria Kube, Melanie Klimm und Katrin Kittlaus danke ich für die stete Bereitstellung von Fliegenmaterialien und Sequenzanalysen. Olaf Nickel, Sandra Brückner, Dr. Heiko Baisch, Janet Schulze, Stefanie Bley und allen Freunden danke ich für die Unterstützung und Freundschaft. Allen Kollegen am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich meiner Familie für die Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 16.03.2011

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname: Lein, Sandro  
Geburtsdaten: 14.01.1977 in Leipzig  
Nationalität: deutsch  
Zivilstand: ledig

### Werdegang

1983 – 1991 Allgemeinbildende Oberschule in Schönebeck  
1991 – 1995 Dr.-Tolberg-Gymnasium Schönebeck; Abitur 1995  
1995 – 1996 Studium des Bauwesens an der FH Magdeburg  
1996 – 1997 Grundwehrdienst in Verden  
1997 – 2002 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität  
Halle/Wittenberg  
2002 – 2003 Diplomarbeit: "Molekulare Analyse von Kontrollfaktoren des  
heterochromatischen *Gensilencings* bei *Drosophila  
melanogaster*" am Institut für Genetik der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg  
2003 – 2011 Promotionsstudium am Institut für Genetik der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg