

Struktur-Funktionsanalyse von $SU(VAR)_{3-9}$, einem integralen Bestandteil von heterochromatischen Proteinkomplexen



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Herrn Gunnar Schotta
geb. am: 21.01.1972 in: Meißen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Reuter, Halle
2. Prof. Dr. Renato Paro, Heidelberg
3. Dr. Thomas Jenuwein, Wien

Halle/Saale, den 16. September 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004369

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004369>]

Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DIC	Differential Interferenz Kontrast
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
EST	expressed sequence tags
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
GST	Glutathion-S-Transferase
H3-K9	Lysin 9 von Histon H3
HMTase	Histonmethyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
NP40	Nonident P40
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEV	Positionseffekt-Variegation
PMEF	Primary Mouse Embryo Fibroblasts
PMSF	Phenylmethansufonylfluorid
preSET	cysteinreiche Domäne vor der SET-Domäne
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase

postSET	cysteinreiche Domäne nach der SET-Domäne
PVDF	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
SAM	S-adenosyl-[methyl- ³ H]-l-methionin
SET	<u>S</u> (var)3-9 / <u>E</u> nhancer of zeste / <u>T</u> rithorax
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TOTO-3	DNA Farbstoff (Molecular Probes)
TR	Texas Red (Fluoreszenzfarbstoff)
TRAX	<i>in vitro</i> -Transkriptionsextrakt
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactosid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	7
2.1	Genetische Methoden	7
2.1.1	Anzucht der Fliegen	7
2.1.2	Verwendete Stämme und Stabilisierungschromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	7
2.1.3	Untersuchung der Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9	8
2.1.4	Untersuchung der genetischen Interaktionen verschiedener Suppressoren	8
2.1.5	Herstellung transgener <i>Drosophila</i> -Linien	8
2.1.6	<i>In vivo</i> -Interaktion von SU(VAR)3-9 und HP1	10
2.2	Molekularbiologische Methoden	10
2.2.1	Verwendete Plasmide und Bakterienstämme	10
2.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	11
2.2.3	Das pP{GS}-Vektor-System	11
	Selektionsmarker	11
	Protein Tags	11
	Promoter Module	12
	pP{GS}-Vektoren	12
2.2.4	Konstruktion der verwendeten Transformationsvektoren	12
2.3	Proteinbiochemische Methoden	13
2.3.1	Gelelektrophorese von Proteinen	13
2.3.2	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	14
2.3.3	Nachweis von Proteinen im Westernblot	14
2.3.4	Koimmunpräzipitation von SU(VAR)3-9-EGFP und HP1	14
2.3.5	Herstellung von <i>in vitro</i> -Transkriptionsextrakt (TRAX) aus <i>Drosophila</i> -Embryonen	16
2.3.6	Methyltransferase-Assay für SU(VAR)3-9	16
2.4	Immunzytologische Methoden	17
2.4.1	<i>In vivo</i> -Detektion von EGFP	17
2.4.2	Enzymatischer Test auf <i>lacZ</i> -Expression	17
2.4.3	Immunmarkierung von Polytäanchromosomen	17
2.4.4	Immunmarkierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	18
2.5	Sequenzierung von <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten im endogenen Locus und im Transgen	18
2.5.1	Inverse PCR	18
2.5.2	Sequenzierung der Mutanten	19

3	Ergebnisse	21
3.1	Das pP{GS} Vektor System	21
3.2	SU(VAR)3-9 ist ein heterochromatisches Protein	23
3.3	<i>Su(var)3-9</i> modifiziert PEV in verschiedenen Rearrangements und interagiert genetisch mit anderen Heterochromatinproteinen	27
3.4	SU(VAR)3-9 interagiert mit HP1	31
3.5	Evolutionäre Konservierung von SU(VAR)3-9	31
3.6	Struktur-Funktionsanalyse von SU(VAR)3-9	34
3.6.1	Kontrolle der Heterochromatinbindung von SU(VAR)3-9	34
3.6.2	Mutanten der SET-Domäne verursachen eine veränderte Verteilung von SU(VAR)3-9 im Chromozentrum	35
3.6.3	Die Verteilung der SU(VAR)3-9-Proteinvarianten wird vom endogenen SU(VAR)3-9-Protein beeinflusst	35
3.6.4	Wechselseitige Beeinflussung der Heterochromatinbindung von SU(VAR)3-9 und HP1	37
3.7	SU(VAR)3-9 ist eine Methyltransferase für Histon H3	38
3.8	Isolation und molekulare Analyse von <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten	41
3.8.1	Isolation von <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten im endogenen Locus und im P{c3-9}r-Transgen	41
3.8.2	Molekulare Analyse der <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten	46
4	Diskussion	54
4.1	Heterochromatisches Gen-Silencing bei PEV wird durch <i>Su(var)3-9</i> -abhängige H3-K9-Methylierung kontrolliert	54
4.2	SU(VAR)3-9 ist eine limitierende Komponente für Gen-Silencing bei Positionseffekt-Variation	58
4.3	Kontrolle der Heterochromatin-Bindung von SU(VAR)3-9	62
4.4	Funktionen der SET-Domäne	64
4.5	Ist die H3-K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 eine epigenetische Markierung für Gen-Silencing?	68
5	Zusammenfassung	71
6	Anhang	72
6.1	Transgene <i>Su(var)3-9</i> -Linien	72
6.2	Verwendete Primer	74
6.3	Publikationsliste	76
A	Literaturverzeichnis	77

1 Einleitung

Die Entwicklung eines Organismus ist gekennzeichnet durch die räumlich und zeitlich spezifische Ausprägung seiner Gene. Das Verständnis von Regulationsmechanismen der Genexpression ist daher von großer Bedeutung für die gezielte Beeinflussung von Entwicklungsvorgängen. Ein wesentliches Kontrollelement der Genexpression ist die Ausbildung einer bestimmten Chromatinstruktur, bei der DNA durch Proteine und RNA's in verschiedene höhergeordnete Strukturen verpackt wird. Die kleinste Einheit der Verpackung ist das Nukleosom, welches aus einem Oktamer-Komplex der Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht, um den jeweils 146 Basenpaare DNA gewunden sind. Die Nukleosomen bilden eine 10 nm dicke Faser aus, die wiederum helikal in 30 nm dicke Chromatin-Fasern gefaltet sind, welche weiter kondensiert die typischen Metaphasechromosomen bilden. Zwei zytologisch sichtbare Verpackungsstufen des Chromatins im Interphasekern wurden zuerst von Heitz (1928, 1929) beschrieben. Das Euchromatin bildet offene Strukturen aus und weist eine hohe transkriptionelle Aktivität auf, während das Heterochromatin besonders kompakt, spät replizierend (Lima di Faria und Jaworska, 1968) und nur wenig transkriptionell aktiv ist (Gatti und Pimpinelli, 1992).

Heterochromatische Bereiche, die während des gesamten Zellzyklus kondensiert bleiben, bezeichnet man als konstitutives Heterochromatin (Brown, 1966). Es wird vorwiegend im Zentromerbereich (perizentrisches und zentromerisches Heterochromatin), aber auch an Telomeren ausgebildet (Blackburn, 1994; Pardue, 1994); in vielen Spezies ist ausserdem eines der beiden Geschlechtschromosomen (Y oder W) konstitutiv heterochromatisiert. Die Hauptbestandteile konstitutiven Heterochromatins sind Arrays von verschiedenen Retrotransposons und anderen mobilen Elementen, sowie hochrepetitiver Satelliten-DNA (Carmena und Gonzalez, 1995; Lohe et al., 1993). Essentielle Gene werden hingegen nur vereinzelt gefunden (Gatti und Pimpinelli, 1992). Die Funktionen dieser heterochromatischen Bereiche sind möglicherweise mit der Genom-Stabilität, aber auch -Variabilität, durch Kontrolle der mobilen Elemente (Birchler et al., 2000), sowie

Mitose- und Meiosefunktionen (Wines und Henikoff, 1992; Hawley et al., 1992; Westphal und Reuter, 2002) verbunden.

Manche Bereiche werden nicht in allen Zellen bzw. Zellstadien gleichermaßen heterochromatisiert. Man spricht hier von fakultativem Heterochromatin. Das bekannteste Beispiel ist das X-Chromosom von weiblichen Säugern (Eutheria), bei dem entweder das väterliche oder das mütterliche Allel scheinbar zufällig inaktiviert wird und im Kern als Barr-Körperchen vorliegt (Barr und Bertram, 1949). Bei manchen Schildläusen kann sich der heterochromatisierende Effekt sogar auf ganze haploide Chromosomensätze ausdehnen. Hier werden in Somazellen von Männchen alle väterlichen Chromosomen inaktiviert (Nur, 1990). Die transkriptionelle Inaktivierung durch fakultatives Heterochromatin zeigt klar einen Einfluß der Chromatinstruktur auf die Regulation der Genaktivität. Damit kommt Genen, die in den Aufbau heterochromatischer Strukturen involviert sind, eine große Bedeutung für das Verständnis der Genregulation zu.

Ein elegantes Modellobjekt zur Analyse von Heterochromatinproteinen ist die Taufliege *Drosophila melanogaster*. Das Chromozentrum und die perizentrischen Bereiche der Autosomen, sowie das Y-Chromosom und große Teile des 4. Chromosoms sind heterochromatisch, also etwa 30% des gesamten Genoms. Wie auch in anderen höheren Organismen besteht die Zentromerregion aus hochrepetitiver Satelliten-DNA, die von großen Arrays mobiler Elemente flankiert wird (Pimpinelli et al., 1995). Auch das Y-Chromosom besteht vorwiegend aus mobilen Elementen und enthält nur wenige essentielle Gene (Zhang und Spradling, 1994).

Proteine, die am Aufbau des Heterochromatins in *Drosophila melanogaster* beteiligt sind, können durch das System der Positioneffekt Variegation (PEV) identifiziert werden. Gene, welche durch chromosomale Rearrangements oder Transposition in die Nähe von heterochromatisierten Bereichen gebracht werden, können fakultativ heterochromatisiert und damit inaktiviert werden (Spofford, 1976). Proteine, die wichtig für den Heterochromatinaufbau sind, können identifiziert werden, da Mutationen zu einer verminderten Inaktivierung der sonst fakultativ heterochromatisierten Gene führen (Reuter und Spierer, 1992; Weiler und Wakimoto, 1995).

Die Inversion $In(1)w^{m4}$ (Muller, 1930) ist ein PEV-Rearrangement, welches sich besonders gut zur Identifizierung von Genen, die am Heterochromatinaufbau beteiligt sind, eignet. Das *white*-Gen ist hier durch eine Inversion in die Nähe perizentrischen Heterochromatins gelangt (Schultz, 1936). Durch fakultative Heterochromatisierung wird es in manchen Zellen inaktiviert, was an einer mosaikartig gefleckten Rotfärbung der Augen adulter Tiere sichtbar ist. 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). Dabei lassen sich zwei wesentliche Gruppen von Modifikatoren unterscheiden (Reuter und Spierer, 1992; Wustmann et al., 1989): Mutationen in Enhancergenen führen zu einer verstärkten Inaktivierung des *white*-Gens. Damit sind deren Wildtyp-Genprodukte offenbar an der Etablierung offener Chromatinstrukturen beteiligt. Entgegengesetzt wirken Mutationen für Suppressorgene. Sie führen zu einer geringeren Inaktivierung des *white*-Gens, was an einer verstärkten Rotfärbung der Augen erkennbar ist. Diese Gene sollten demnach die Etablierung heterochromatischer Strukturen direkt oder indirekt beeinflussen. Einige Modifikatoren zeigen auch bei erhöhter Dosis Effekte auf PEV (Triplo-Enhancer- bzw. Triplo-Suppressoreffekte, Wustmann et al., 1989) und sind besonders interessant, da ihre Genprodukte wahrscheinlich in den Aufbau multimerer Proteinkomplexe involviert sind, die direkt an der Ausbreitung heterochromatischer Strukturen beteiligt sind (Locke et al., 1988).

Unter den bisher identifizierten Enhancergenen befinden sich Transkriptionsaktivatoren wie *mod(mdg4)* (Dorn et al., 1993; Büchner et al., 2000), E2F (Seum et al., 1996) oder der GAGA Faktor (Farkas et al., 1994). Die klonierten Suppressorgene kodieren Proteine verschiedenster Funktionen. SU(VAR)2-10 ist offenbar eine chromosomale Strukturkomponente (Hari et al., 2001). Die Modifizierung von Histonen wird unter anderem durch die Histondeacetylase *HDAC1* (Rubertis et al., 1996; Mottus et al., 2000) und indirekt über das noch nicht klonierte *Su(var)2-1*-Gen reguliert. Das *modulo*-Gen kodiert ein DNA-bindendes Protein mit einer Spezifität für repetitive Elemente (Perrin et al., 1998). Drei weitere Gene, die sich genetisch durch ihren Haplo-Suppressor- / Triplo-Enhancereffekt ähneln, sind *Su(var)2-5* (Eissenberg et al., 1990), *Su(var)3-7* (Reuter et al., 1990) und *Su(var)3-9* (Tschiersch et al., 1994).

Das *Su(var)2-5*-Gen kodiert das HP1 Protein, welches als erstes Heterochromatinprotein biochemisch aus *Drosophila melanogaster* isoliert wurde (James und Elgin, 1986) und evolutionär von der Hefe (Swi6p) bis zum Menschen (M31) konserviert ist (Singh et al., 1991). Immunzytologische Analysen von polytären Speicheldrüsenchromosomen in *Drosophila melanogaster* zeigen, daß das Protein vorwiegend im zentromerischen Heterochromatin, im vierten Chromosom, aber auch an Telomeren und einigen Stellen im Euchromatin lokalisiert ist (James et al., 1989; Fanti et al., 1998). HP1 besteht aus 206 AS und weist 2 konservierte Domänen auf, die N-terminal gelegene Chromo-Domäne (chromatin organization modifier, Paro und Hogness, 1991) und die C-terminal über eine flexible Linker-Region verbundene Chromo-Shadow-Domäne (Aasland und Stewart, 1995). Die

Struktur der Chromo-Domäne wurde bereits aufgeklärt und die Möglichkeit einer Hetero- bzw. Homodimerisierung beschrieben (Ball et al., 1997). Auch die Struktur der Chromo-Shadow-Domäne konnte bestimmt werden und auch für diese Domäne besteht die Möglichkeit einer Dimerisierung (Brasher et al., 2000). In beiden Fällen bietet die dimerisierte Domäne Flächen für weitere Interaktionen, so daß davon ausgegangen wird, daß HP1 eine Funktion als flexibles Linker-Modul im Heterochromatin ausübt (Eissenberg und Elgin, 2000). Die Bindung an die Chromo-Shadow-Domäne kann über ein konserviertes Pentapeptid erfolgen, welches jedoch nicht in allen Interaktoren vorkommt (Smothers und Henikoff, 2000). Die große Menge der identifizierten Interaktionspartner zeigt, daß HP1 in viele verschiedene Silencing-Prozesse involviert ist. Eine Interaktion mit dem Lamin-B Rezeptor (Ye und Worman, 1996; Ye et al., 1997) deutet auf eine Funktion bei der Anheftung des Heterochromatins an die Kernmembran (Pyrpasopoulou et al., 1996). Daneben kommt HP1 in Komplexen mit Untereinheiten des "Origin Replication Complex" (ORC) vor (Pak et al., 1997), wobei die Interaktion mit DmORC2 offenbar wichtig für die Heterochromatinbindung von HP1 ist (Huang et al., 1998). Ausserdem wurde eine Interaktion mit KAP-1, einem Korepressor von KRAB (Krüppel-associated box) enthaltenden Zinkfinger-Proteinen gefunden, die zum Silencing der betroffenen Gene notwendig ist (Ryan et al., 1999; Lechner et al., 2000). Weitere HP1-Interaktionspartner sind die p150 Untereinheit des "Chromatin-Assembly Factor" CAP-1 (Murzina et al., 1999), sowie Arp4 (Frankel et al., 1997) und SP100 (Lehming et al., 1998; Seeler et al., 1998). Die physiologischen Funktionen dieser letztgenannten Interaktionen sind jedoch noch nicht genügend untersucht.

Su(var)3-7 wurde als erstes Suppressorgen für PEV kloniert (Reuter et al., 1990). Für *Su(var)3-7* existieren bislang keine Punktmutanten, die Defizienz *Df(3L)Ace^{HD1}* schließt jedoch das Gen ein und zeigt einen signifikanten Suppressoreffekt, während genomische Zusatzkopien einen starken Enhancereffekt auf *In(1)w^{m4}* bewirken. Das Protein besitzt 7 Zinkfinger-Motive, die für die Bindung repetitiver DNA verantwortlich sind (Cleard und Spierer, 2001). Immunzytologische Analysen zeigen eine klare Heterochromatinassoziation von SU(VAR)3-7 (Cleard et al., 1997). Im Hefe-Diybrid-System und mittels Koimmunpräzipitation konnte HP1 als Interaktionspartner identifiziert werden und die Bindungsstellen auf die Zinkfinger 2, 5 und 7 bzw. eine C-terminal nach den Zinkfingern gelegene Region eingegrenzt werden (Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000).

Su(var)3-9 ist einer der stärksten bisher identifizierten Suppressoren für PEV und damit offenbar in Schlüsselfunktionen im Prozeß des heterochromatischen Gen-Silencings involviert (Tschiersch et al., 1994). Mutanten von *Su(var)3-9* sind

zwar homozygot lebensfähig, zeigen aber eine stark reduzierte Fertilität (Ebert, persönliche Mitteilung). Der Suppressor-Phänotyp von *Su(var)3-9*-Mutanten und auch die reduzierte Fertilität kann durch ein genomisches 11.5 kb Fragment, welches den vollständigen *Su(var)3-9*-Locus umfaßt und einen starken Triplo-Enhancer-Effekt auf *In(1)w^{m4}* zeigt, gerettet werden (Tschiersch et al., 1994).

Das Gen liegt in Form einer bicistronischen Transkriptionseinheit mit dem eukaryotischen Translationsfaktor eIF2 γ vor (Abb. 1.1A). Durch alternatives Spleißen werden zwei Transkripte generiert, wobei SU(VAR)3-9 die ersten beiden Exonen von eIF2 γ erhält, die 80 Aminosäuren kodieren (Krauss und Reuter, 2000). Das SU(VAR)3-9 Protein weist neben der Chromo-Domäne die ebenfalls evolutionär konservierte SET-Domäne (SU(VAR)3-9, E(Z), TRITHORAX, Tschiersch et al. (1994)) auf (Abb. 1.1B). Die SET-Domäne wird in SU(VAR)3-9 von der cysteinreichen preSET- und postSET-Domäne eingeschlossen.

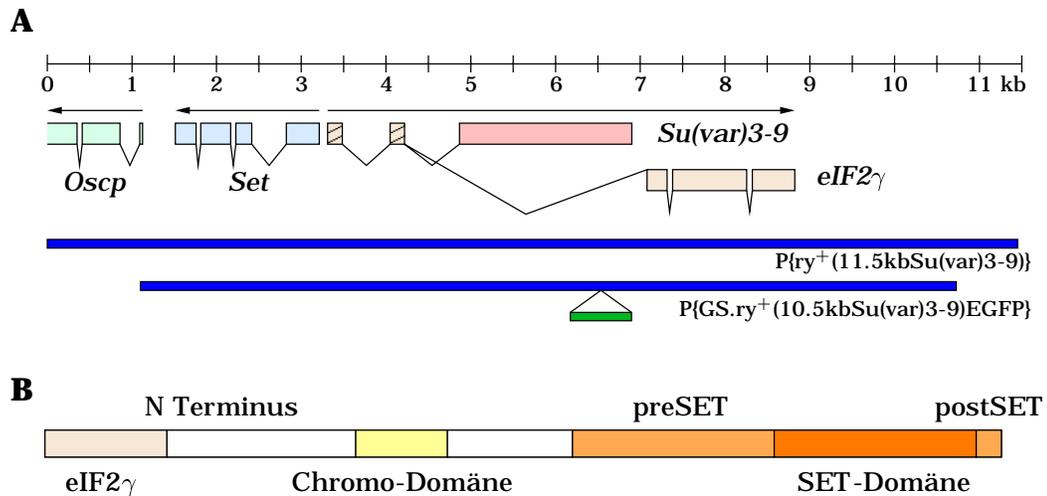


Abbildung 1.1: *Su(var)3-9*-Locus und Proteinstruktur von SU(VAR)3-9. **(A)** Genomische Struktur des *Su(var)3-9*-Locus. Die blauen Balken stellen die Bereiche dar, die in genomischen Konstrukten zur Mutantenrettung verwendet wurden. Der grüne Balken kennzeichnet die Position des EGFP. *Oscp* - Oligomycin sensitivity-conferring protein, *Set* - Nucleosome assembly protein. **(B)** Proteinstruktur und konservierte Domänen von SU(VAR)3-9. Die Aminosäuren 1-80 stammen durch alternatives Spleißen von eIF2 γ .

SU(VAR)3-9 ist evolutionär von der Hefe bis zum Menschen konserviert. Das orthologe Protein aus *Schizosaccharomyces pombe* Clr4p (Ivanova et al., 1998) unterscheidet sich vor allem durch ein völliges Fehlen des N-Terminus vor der Chromo-Domäne. Im Menschen gibt es zwei Orthologe, SUV39H1 (Aagaard et al.,

1999) und SUV39H2 (O'Carroll et al., 2000), die ähnlich dem *Drosophila*-Protein aufgebaut sind. Neben der strukturellen scheint auch eine funktionelle Konservierung von SU(VAR)3-9 vorzuliegen, da neben dem *Drosophila*-Gen sowohl das Hefe-Homologe (Allshire et al., 1995), als auch die menschlichen Homologen (Aagaard et al., 1999) in Prozesse des Gen-Silencings involviert sind.

Durch umfangreiche Suchen mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems konnte neben mehreren putativen Interaktoren von SU(VAR)3-9 auch HP1 identifiziert werden (Fischer, 1997). Die Interaktionsdomänen wurden mit spezifischen Proteinvarianten im Hefe-Dihybrid-System auf einen N-terminalen Bereich in SU(VAR)3-9 (AS 81-188) und die Chromo-Shadow-Domäne von HP1 eingegrenzt (Fischer, 1997). Auch das SU(VAR)3-7-Protein interagiert im Hefe-Dihybrid-System mit der N-terminalen Region von SU(VAR)3-9 und einer nicht näher spezifizierten Region im anschließenden C-Terminus (AS 188-635) des Proteins. Bei SU(VAR)3-7 liegt die Interaktionsstelle in einem C-terminalen Bereich nach den Zinkfingern (Fischer, 1997). Die mögliche Interaktion mit diesen heterochromatischen Proteinen legt nahe, daß auch SU(VAR)3-9 ein Heterochromatinprotein ist, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte.

Ein Durchbruch bei der Analyse der Funktion von SU(VAR)3-9 war die Entdeckung der für Lysin 9 von Histon H3 (H3-K9) spezifischen Methyltransferaseaktivität der SET-Domäne der menschlichen und Maus-Homologen SUV39H1 und Suv39h1 (Rea et al., 2000) bzw. des Maus-Homologen Suv39h2 (O'Carroll et al., 2000). Diese Aktivität wird wesentlich durch vorhandene Modifikationen am N-Terminus von Histon H3 beeinflusst. So verhindert eine vorhandene Acetylierung an K9 oder Phosphorylierung von S10, welche durch die Ipl1/aurora Kinase normalerweise vor der Mitose durchgeführt wird, die Übertragung der Methylgruppen (Rea et al., 2000). Auch für das *Drosophila*-Protein (Czermin et al. (2001) und vorliegende Arbeit) sowie Clr4p (Nakayama et al., 2001) konnte diese Aktivität nachgewiesen werden. Die H3-K9-Methylierung kann von Proteinen wie HP1 erkannt werden (Lachner et al., 2001; Nakayama et al., 2001) und stellt somit die Grundlage für den Aufbau heterochromatischer Strukturen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassende Struktur-Funktions-Analyse von SU(VAR)3-9 durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeigen zahlreiche Parallelen zu Silencing-Prozessen auf, die zeitgleich auch in anderen Modell-Organismen beschrieben wurden und eine zentrale, evolutionär konservierte Funktion der SU(VAR)3-9-Methyltransferase im Prozeß des heterochromatischen Gen-Silencing zeigen.

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.

2.1.2 Verwendete Stämme und Stabilisierungschromosomen von *Drosophila melanogaster*

Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Mutationen und Stabilisierungschromosomen ist in Lindsley und Zimm (1992) zu finden. Die Bezeichnungen, der durch Transformation von P-Element-Vektoren erhaltenen transgenen Linien sind in Tab. 2.1 verzeichnet. Die dabei etablierten Stämme sind im Anhang (Abschnitt 6.1) aufgeführt.

P-Element-Vektor	Bezeichnung	Referenz
P{GS.ry ⁺ hs(cDNASu(var)3-9)EGFP3}	P{c3-9}	vorl. Arbeit
P{GS.ry ⁺ (10.5kbSu(var)3-9)EGFP}	P{g3-9}	vorl. Arbeit
P{GS.ry ⁺ hs(cDNASUV39H1)EGFP3}	P{SUV39H1}	vorl. Arbeit
P{GS.ry ⁺ hs(cDNAHP1)EGFP3}	P{cHP1}	vorl. Arbeit
P{GS.ry ⁺ (1.9kbSu(var)2-5)}	P{Su(var)2-5}	vorl. Arbeit
P{ry ⁺ (10kbSu(var)3-7)}	P{Su(var)3-7}	Reuter et al. (1990)
P{ry ⁺ (11.5kbSu(var)3-9)}	P{Su(var)3-9}	Tschiersch et al. (1994)

Tabelle 2.1: Abkürzungen, die für die Bezeichnung transgener Linien verwendet werden.

2.1.3 Untersuchung der Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9

Folgende autosomale PEV-Rearrangements mit Bruchpunkten im Heterochromatin von 2L, 2R, 3L und 3R (Abb. 2.1) wurden über ein CyOGFP, P{w⁺m hsp70:Gal4} p{w⁺m UAS:GFP} Chromosom (Rudolph et al., 1999) balanciert und die heterozygoten Männchen mit homozygoten P{c3-9} Weibchen gekreuzt: *In(2L)TE62var7*, *In(2LR)TE62var25*, *In(2LR)TE80var24*, *In(2LR)TE196var2*, *T(2;3)TE62var20*, *T(2;3)TE301var1*, *T(2;3)TE62var18*, *T(2;3)TE80var35* und *T(2;3)TE80var40* (Reuter, persönliche Mitteilung), sowie *In(2LR)bw^{v1}*, *In(2LR)bw^{v32g}*, *In(2LR)Rev*, *In(2L)It^{m12}*, *In(2R)bw^{v34k}*, *In(2R)bw^{vDe1}*, *In(2R)bw^{vDe2}*, *T(2;3)bw^{v5}*, *T(2;3)bw^{vDe4}* und *T(2;3)bw^{vDe3}* (FLYBASE, 2002). Larven der Nachkommenschaft, die das entsprechende Rearrangement enthielten, konnten durch Fehlen der starken GFP-Fluoreszenz des Balancerchromosoms identifiziert werden. Um die X-chromosomalen Rearrangements zu analysieren, wurden homozygote P{c3-9} Weibchen mit *In(1)w^{m51b}* bzw. *In(1)w^{m4}* Männchen gekreuzt, wobei alle sich entwickelnden Larven analysiert werden konnten.

2.1.4 Untersuchung der genetischen Interaktionen verschiedener Suppressoren

Die Mutantenallele *Su(var)3-1⁰²* (Reuter, persönliche Mitteilung), *Su(var)3-9¹⁷* (Krauss, 1995), *Su(var)2-5⁰⁵*, die *Su(var)3-7* umfassende Defizienz *Def(3L)Ace^{HD1}* (Reuter et al., 1990) sowie die *HDAC1*-Allele *HDAC1³⁰³*, *HDAC1³¹³* und *HDAC1³²⁶* (Mottus et al., 2000) wurden mit Stämmen gekreuzt, die genomische Zusatzkopien von *Su(var)3-9* (P{*Su(var)3-9*}, Tschiersch et al., 1994), *Su(var)2-5* (P{*Su(var)2-5*}) und *Su(var)3-7* (P{*Su(var)3-7*}, Reuter et al., 1990) enthalten. Die transheterozygoten Tiere in der Nachkommenschaft wurden bezüglich des Effekts auf *In(1)w^{m4}* beurteilt.

2.1.5 Herstellung transgener *Drosophila*-Linien

DNA-Templates, die als flankierende Sequenzen P-Element-Repeats enthalten, können mit Hilfe einer Transposase in das Genom von *Drosophila melanogaster* integriert werden (Rubin und Spradling, 1982). Dabei wird der Transformationsvektor zusammen mit einer Transposasequelle (p π 25.1-Derivat) in Embryonen eines Stammes von *Drosophila melanogaster* injiziert, der eine Mutation für den entsprechenden Selektionsmarker des Transformationsvektors trägt. Nach Kreuzung der überlebenden Tiere mit dem für die Injektion verwendeten Stamm kann

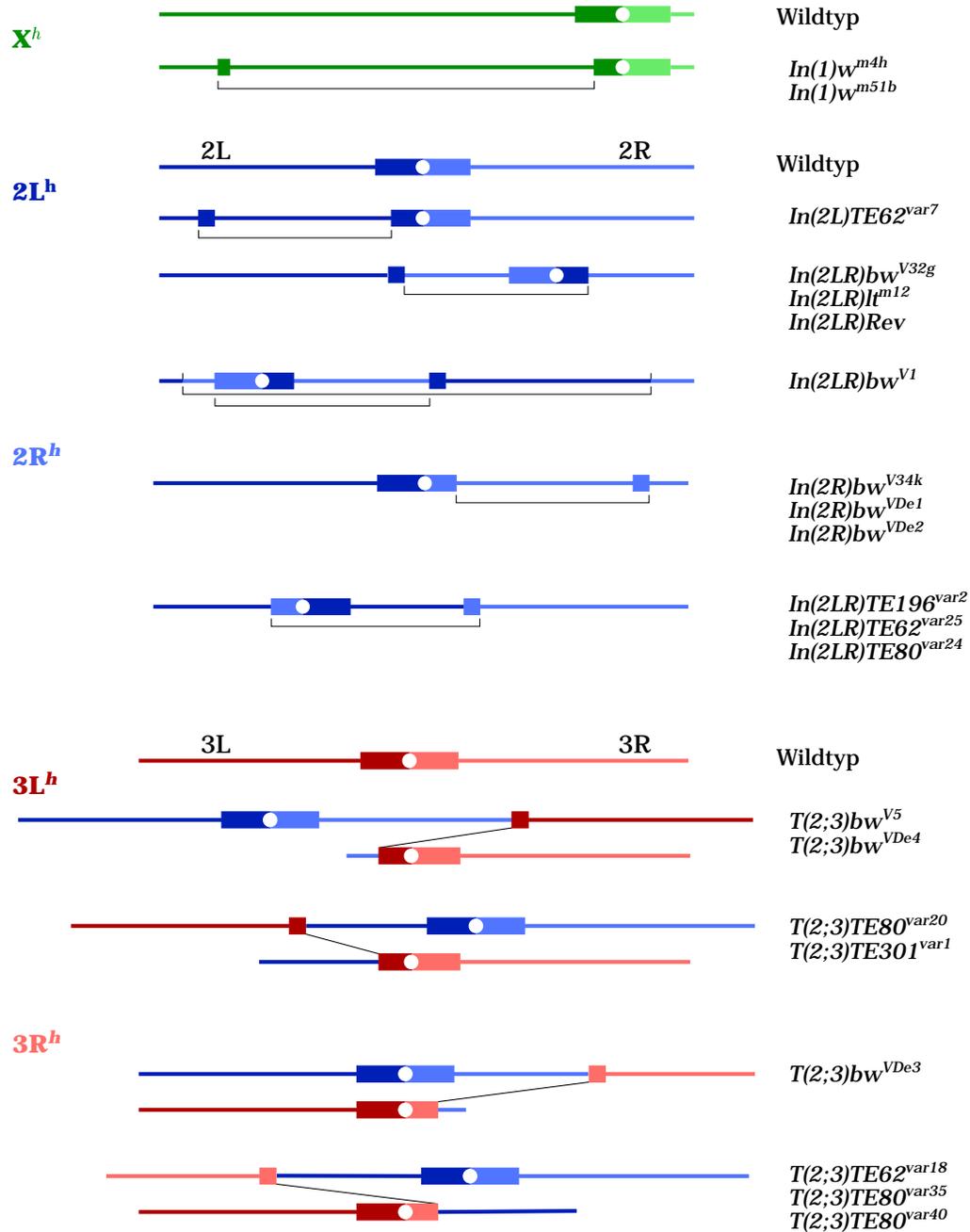


Abbildung 2.1: PEV-Rearrangements, die für die Analyse der Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9 verwendet wurden. Die Chromosomenarme von X, 2L, 2R, 3L und 3R sind verschiedenfarbig markiert. Ähnliche Rearrangements sind in Gruppen zusammengefasst.

in der Nachkommenschaft auf transgene Tiere selektiert werden, die den Selektionsmarker ausprägen.

Zur genetischen Lokalisierung des Integrationsorts werden Kreuzungen mit Balancerchromosomen für das zweite (*CyO*) und dritte (*TM3 Sb*) Chromosom durchgeführt. Das Segregationsverhalten des Selektionsmarkers relativ zum Balancerchromosom ermöglicht, auf den Einbau im entsprechenden Chromosom zu schließen. Wird der Selektionsmarker X-gekoppelt vererbt, ist ein Einbau im X-Chromosom erfolgt.

2.1.6 *In vivo*-Interaktion von SU(VAR)3-9 und HP1

HP1 und Proteine, die mit HP1 interagieren, werden durch ein chimäres HP1-Protein mit POLYCOMB Chromo-Domäne (HP1-PC) an euchromatische Bindungsstellen lokalisiert (Platero et al., 1996). Im Fall der EGFP-markierten SU(VAR)3-9 Proteinvarianten konnte das durch *in vivo*-Beobachtung der EGFP-Fluoreszenz in Kernen von Speicheldrüsenchromosomen untersucht werden. Eine HP1-PC exprimierende Linie (HP1-PC/*CyO*-GFP) wurde mit den zu testenden Transgenen gekreuzt. F1-Larven, die nicht den GFP-Balancer (*CyO*-GFP) trugen, wurden 30 min hitzegeschockt und nach Inkubation für 2 h bei 18°C konnte die EGFP-Fluoreszenz analysiert werden.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden zur Plasmidvermehrung bzw. Proteinexpression verwendet:

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
E. coli, DH5 α	F ⁻ , end A1, hsd R17 (r_k^- , m_k^+), sup E44, thi-1, I ⁻ , rec A1, gyr A96, rel A1, ϕ 80d, lacZ Δ M15	Gibco/BRL 1987
E. coli, XL1-blue	end A1, hsd R17 (r_k^- , m_k^+), sup E44, thi-1, rec A1, gyr A96, rel A1, [F ^r , proAB, lacqZ Δ M15, Tn10, (tet ^r)]	Bullock, Stratagene 1987

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der alkalischen Lyse-Methode (Birnboim und Doley, 1979), Großpräparationen wurden mit Plasmid-Midipräparationskits (Quiagen) durchgeführt.

Restriktionen wurden mit Enzymen der Firmen GibcoBRL bzw. MBI Fermentas durchgeführt. Zur Fragmentelution aus Agarosegelen wurde der Nucleobond-Kit (Macherey-Nagel) bzw. der Quiaex II-Kit (Quiagen) benutzt.

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

Für PCR-Reaktionen wurden Taq-Polymerase (GibcoBRL) bzw. Pfu-Polymerase (Stratagene) nach Standardprotokoll (Seiki, 1990) verwendet. Klonierungen von PCR-Fragmenten erfolgten mit dem pGEM-T Cloning Kit (Promega).

Sequenzreaktionen wurden mit dem ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit nach Herstellervorgaben durchgeführt.

Für PCR-Klonierungen verwendete Primer sind im Anhang (Abschnitt 6.2) aufgelistet.

2.2.3 Das pP{GS}-Vektor-System

Basis für den Aufbau des pP{GS} Transformationsvektorsystems war der Vektor pEGFP (Schotta, 1997). Um den Grundvektor pP{GS} zu erhalten, wurde das EGFP mit *NotI* und *SaII* ausgeschnitten und durch einen Linker, bestehend aus den Primern linker1 und linker2, ersetzt.

Selektionsmarker

Als Selektionsmarker-Modul für das Vektorsystem kamen *rosy*, *vermilion* oder *white* zum Einsatz. Das *rosy*-Modul ist ein *HindIII*-Fragment aus Carnegie20 (Rubin und Spradling, 1983) und das *vermilion*-Modul ein *HindIII*-Fragment aus PYC1.8 (Fridell und Searles, 1991). Das mini-*white*-Modul wurde über PCR-Klonierung mit den Primern casper1 und casper2 aus pUAST (Brand und Perrimon, 1993) hergestellt.

Protein Tags

Neben dem EGFP, welches als *NotI*-*SaII*-Modul bereits vorlag (Schotta, 1997) wurde ein *NotI*-*SaII* EBFP-Modul über PCR-Klonierung mit den Primern EGFP-

start und EGFP-end an pEBFP-C1 (Clontech) hergestellt. Als weiteres Protein-Tag wurde die DNA-bindende Domäne des lexA-Proteins als *NotI-SalI* Fragment verwendet (Ebert, 1999).

Promoter Module

Neben dem *XbaI-ApaI hsp70*-Modul aus dem Vektor pEGFP_hs (Schotta, 1997) wurde ein *XbaI-ApaI UAS/hsp70*-Modul verwendet, das über PCR-Klonierung mit den Primern UAS-start und hsp70-end an pUAST (Brand und Perrimon, 1993) hergestellt wurde. Als Transkriptionsterminations-Modul wurde das 3'23gt *AvrII*-Fragment aus pEGFP_hs (Schotta, 1997) verwendet.

pP{GS}-Vektoren

Durch Kombination der verschiedenen Module (Abb. 3.2) war es möglich, eine breite Palette von Vektoren für die unterschiedlichsten Aufgabenstellungen herzustellen. Dies erfolgte durch Einbau der entsprechenden Module in den Grundvektor pP{GS} bzw. durch einen Austausch von Modulen in bereits klonierten Vektoren.

2.2.4 Konstruktion der verwendeten Transformationsvektoren

Alle *Su(var)3-9*-Konstrukte basieren auf dem pP{GS}-Vektorsystem (Schotta und Reuter, 2000). Folgende cDNA-Konstrukte wurden durch Einbau der entsprechenden PCR-Fragmente in den Vektor pP{GS.ry⁺hsEGFP3'} hergestellt (Abb. 2.2): NTerm (As 1-206) mit dem Primerpaar NTerm-forw – NTerm-back, Δ Chromo (Δ As 207-267) durch Einbau eines mit den Primern Δ chromo-forw und c3-9end erzeugten PCR-Fragmentes in das NTerm-Konstrukt, Δ SET (Δ As484-653) mit dem Primerpaar c3-9 start und Δ SET back. Die Konstrukte SET13 und SET15 sind cDNA-Konstrukte der entsprechenden *Su(var)3-9*-Allele *Su(var)3-9^{l3}* (P571S) und *Su(var)3-9^{l5}* (Δ 549AANY552) und wurden durch PCR an revers transkribierter RNA dieser Mutanten (Krauß, persönliche Mitteilung) erhalten.

Das N-Terminus Konstrukt mit dem Austausch P177T wurde mittels überlappender PCR unter Nutzung der Primer NTerm forw, NTerm back und des überlappenden Primers NTerm P177T back, der die Mutation einführt, hergestellt und in pP{GS.ry⁺hsEGFP3'} kloniert.

Die SU(VAR)3-9/TRITHORAX-Chimäre (c3-9/TRX) wurde durch Amplifizierung der TRX SET-Domäne (AS 3586-3726) mit den Primern c3-9/trx forw und c3-9/trx back und anschließender Klonierung in Δ SET hergestellt.

Das SUV39h1-EGFP Konstrukt wurde durch Amplifizierung des ORF mit den Primern SUV39h1 forw und SUV39h1 back unter Nutzung einer cDNA als Template (Aagaard et al., 1999) angefertigt und ebenfalls in pP{GS.ry⁺hsEGFP3} kloniert.

Ein 1.9 kb großes genomisches Fragment des *Su(var)2-5*-Locus wurde über PCR an CantonS-DNA mit den Primern HP1gen forw und HP1gen back amplifiziert und in pP{GS.ry⁺} kloniert (P{*Su(var)2-5*}). Das HP1-EGFP Konstrukt wurde mittels PCR an einer im Hefe-Dihybrid-System isolierten cDNA mit den Primern HP1cDNA forw und HP1cDNA back amplifiziert und in pP{GS.ry⁺hsEGFP3} kloniert (P{cHP1}).

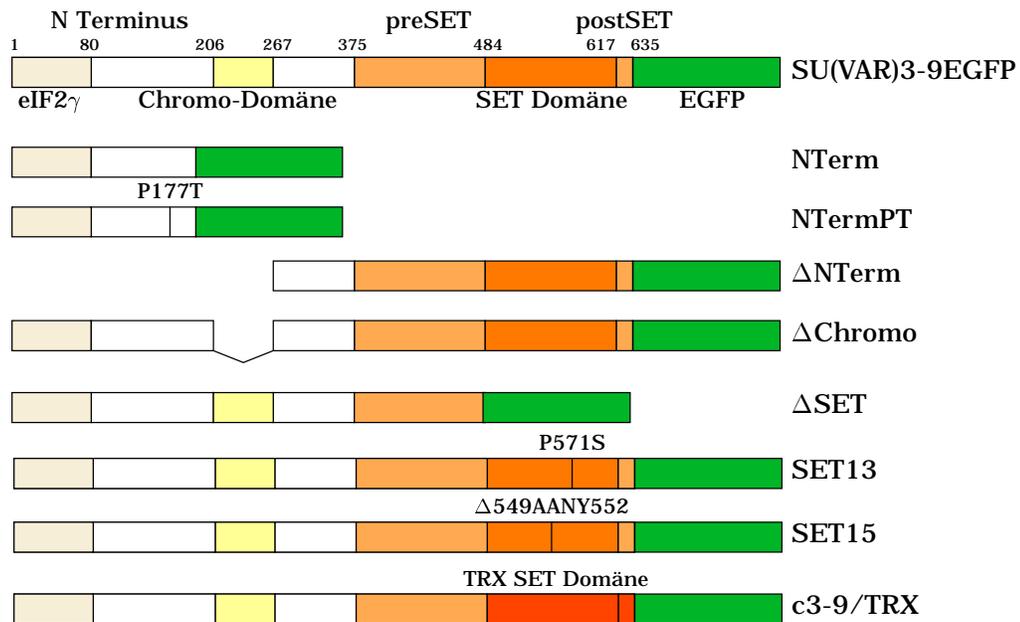


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der SU(VAR)3-9-Proteinvarianten, die für die Struktur-Funktionsanalyse verwendet wurden

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel be-

trug 5%, im Trenngel 7.5-15% (abhängig vom aufzutrennenden Molekulargewichtsbereich). Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS) bei 20 mA für ein Minigel (10x15 cm) bzw 40 mA für ein 18x12 cm Gel durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandards wurden Proteinleitern von Gibco BRL bzw. MBI Fermentas eingesetzt.

2.3.2 Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Färbung der Proteine wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassielösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 in 40% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch 20 min Kochen der Gele in Aqua bidest.

2.3.3 Nachweis von Proteinen im Westernblot

Die Proteine wurden im Anschluß an die Elektrophorese auf eine PVDF-Membran (Macherey-Nagel) durch Elektro-Blot-Transfer bei 0.8 mA/cm² für 2 Stunden transferiert (Blotpuffer: 192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% Methanol). Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers wurden auf der Membran die Proteine mit Ponceau-S-Lösung (0.2% Ponceau S ; 3% Trichloressigsäure; 3% Sulfosalicylsäure) für 10 Minuten angefärbt und mit Wasser entfärbt.

Die Membran wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver (Biorad) in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4) geblockt. Im Anschluß daran wurden die primären Antikörper (Tab. 2.2) in 5% Milchpulver oder 3% BSA in PBS verdünnt zugegeben und entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x 15 Minuten Waschen in PBST (1x PBS; 0.2% Tween20) wurden die entsprechenden sekundären Antikörper (Tab. 2.2) in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde wiederum 3x 15 Minuten in PBST gewaschen. Danach erfolgte die Detektion der Peroxidasegekoppelten Antikörper mit dem ECL- bzw. ECL Plus System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers.

2.3.4 Koimmunpräzipitation von SU(VAR)3-9-EGFP und HP1

Embryonen (0-12 h) der Linie P{c3-9} E5 wurden 30 min bei 37°C hitzegeschockt, 2 h bei 18°C inkubiert und anschließend mit Natriumhypochloritlösung dechorionisiert. Die Präparation der Kernextrakte erfolgte nach Elgin und Hood (1973): Je 1 g der dechorionisierten Embryonen wurden im Dounce-Homogenisator in

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
primäre Antikörper:		
monoclonal GFP	Babco	1:1000
polyclonal GFP	Molecular Probes	1:1000
polyclonal dimeth H3-K9	Upstate Biotech	1:1000
monoclonal myc (9E10)	T. Jenuwein	1:1000
polyclonal HP1-AK (chromo Peptid)	J. Eissenberg	1:7500
polyclonal HP1-AK (Gesamtprotein)	J. Eissenberg	1:2000
polyclonal SU(VAR)3-9 (As285-465)	preink. mit <i>Su(var)3-9^{l7}</i>	1:1000
sekundäre Antikörper:		
Goat-Anti mouse-Peroxidase	Jackson Immunres.	1:2000
Goat-Anti rabbit-Peroxidase	Jackson Immunres.	1:5000

Tabelle 2.2: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für Westernblots

10 ml PBS homogenisiert und durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 100 μm filtriert. Das Homogenat wurde auf 0.3 M Saccharose in PBS geschichtet und 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in IP-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 10% Glycerin; pH 7.5) aufgenommen und 3×10 sec ultraschallbehandelt. Nach Zentrifugation bei 10000 g wurde vom Überstand die Proteinkonzentration bestimmt und mit IP-Puffer auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Alternativ wurden IP-Reaktionen mit *in vitro* Transkriptionsextrakt (siehe 2.3.5) durchgeführt.

Der Kernextrakt wurde über Nacht mit 1 μl polyklonalem GFP-Antikörper (Molecular Probes) inkubiert. Durch Zugabe von 50 μl Protein-G-Sepharose (Amersham-Pharmacia) wurde der Immunkomplex über den GFP-Antikörper gebunden. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung nicht gebundenen Proteins aufbewahrt. Nach zweimaligem Waschen mit IP-Puffer wurden die gebundenen Proteine mit 50 μl Rotiload (Roth) bei 95°C eluiert.

Der Kernextrakt, der Überstand und das Eluat wurden auf ein Proteingel aufgetragen und im Westernblot mit einem monoklonalen GFP-Antikörper (Babco) auf SU(VAR)3-9-EGFP und mit einem polyklonalen HP1-Antikörper (Eissenberg, persönliche Mitteilung) auf HP1 getestet.

2.3.5 Herstellung von *in vitro*-Transkriptionsextrakt (TRAX) aus *Drosophila*-Embryonen

Für die Herstellung von *in vitro*-Transkriptionsextrakt (TRAX) aus transgenen Linien mit cDNA-Konstrukten, die unter Kontrolle des Hitzeschockpromoters liegen, wurden Embryonen 30 min bei 37°C hitzegeschockt und nach Inkubation für 2 h bei 18°C mit Natriumhypochloritlösung dechorionisiert. Die Embryonen wurden danach entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Für die Herstellung von TRAX aus Wildtypembryonen wurden die gesammelten Embryonen ohne vorherigen Hitzeschock dechorionisiert.

Danach erfolgte die Präparation der Kerne: 1 g Embryonen wurde in 1 ml NU-I Puffer (15 mM Hepes-KOH, pH 7.6; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA, pH 8.0; 0.5 mM EGTA, pH 8.0; 350 mM Saccharose) suspendiert und in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zugabe von weiteren 6 ml NU-I Puffer wurden die Kerne für 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Das Kernpellet wurde in 1 ml NU-II Puffer (15 mM Hepes, pH 7.6; 110 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert und in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 4 M Ammoniumacetat wurden die Röhrchen für 20 min rotiert. Nach Abzentrifugation bei 35000 rpm für 30 min konnte der Kernextrakt entnommen und die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.3.6 Methyltransferase-Assay für SU(VAR)3-9

Zu 100 µl TRAX wurden 400 µl IPH-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, 0.2 mM PMSF) und 1 µl Antikörper (polyklonaler GFP-Antikörper, bzw. polyklonaler HP1-Antikörper) gegeben. Nach Inkubation für 3 h bei 4°C wurden 20 µl Protein-G Beads (Pharmacia) zugegeben und die Ansätze eine weitere Stunde rotiert. Die Beads wurden schließlich zweimal mit 1 ml Puffer IPH 300 (300 mM NaCl anstatt 150 mM) und noch zweimal mit IPH 50 (50 mM NaCl anstatt 150 mM) gewaschen und in 60 µl Reaktionspuffer suspendiert. Für die eigentliche Reaktion wurden 20 µl der Beads mit 1 µg Histon H3-Peptid (AS 1-20, Upstate Biotech), 0.5 µl SAM (Amersham, 1 µCi/ml) und 3.5 µl destilliertem Wasser gemischt und bei 30°C für 40 min inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Beads wurden 20 µl des Reaktionsgemisches auf P81 Filterpapier (Whatman) aufgetragen und anschließend dreimal mit 50 mM Natriumkarbonatlösung (pH 9.2) gewaschen. Die Bestimmung der am Papier verbleibenden Menge des radioaktiv markierten Peptids erfolgte mit einem Scintillationszähler.

2.4 Immunzytologische Methoden

2.4.1 *In vivo*-Detektion von EGFP

Aus Larven im dritten Stadium wurden ganze Speicheldrüsen präpariert und in einem Tropfen PBS + 10% Glycerin auf einem Objektträger überführt. Nach Auflegen eines Deckgläschens konnte mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss) die Fluoreszenz in Kernen untersucht werden. Die gleiche Prozedur wurde auch für andere Larven- bzw. Adultgewebe verwendet.

Um ganze Kerne aus Speicheldrüsen zu isolieren, wurden 10-20 Speicheldrüsen isoliert, in 100 μ l PBS + 1% Triton X-100 für 1 min gevortext und dann bei 1000 rpm sedimentiert.

Für die Konfokalmikroskopie wurde ein invertiertes Carl-Zeiss LSM 510 Mikroskop mit einem Plan Apo 63xN.A. 1.2 Wasser-Immersionsobjektiv benutzt. Zur Analyse von EGFP wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet und die Fluoreszenz nach einem 505-550 nm Bandpass-Filter mittels Photomultiplier detektiert. Differential Interference Contrast (DIC) Bilder wurden gleichzeitig mit dem Fluoreszenzbild unter Benutzung des Lasers als Transmissions-Lichtquelle aufgenommen.

2.4.2 Enzymatischer Test auf *lacZ*-Expression

Die Untersuchung der *lacZ*-Expression des Konstrukts P[w⁺ HS-*lacZ*] in den beiden Rearrangements *In(3L)BL1* und *Tp(3;Y)BL2* erfolgte in Speicheldrüsen dritter Larven (Lu et al., 1996). Die Larven wurden für 30 min bei 37°C hitzegechockt und nach 30 minütiger Inkubation bei 18°C die Speicheldrüsen in PBS präpariert. Nach einer Fixierung in 5% Formaldehyd/PBS für 2 min wurden sie kurz in PBS gewaschen und für mindestens 2 h in eine X-Gal-Färbelösung (3.1 mM Kaliumferrizyanid, 3.1 mM Kaliumferrocyanid, 10 mM Natriumphosphat, pH 6.8, 0.15 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10% DMSO und 0.1% X-Gal) überführt. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS wurden sie in 90% Glycerin/PBS eingebettet und mit einer CCD-Kamera an einem Zeiss Axioskop im Differenzial-Interferenzkontrast-Modus dokumentiert.

2.4.3 Immunmarkierung von Polytänchromosomen

Aus Larven im dritten Stadium wurden nach der Methode von Silver und Elgin (1978) Speicheldrüsen in einer 0.7% NaCl-Lösung präpariert und in einer Fixierlösung (45% Essigsäure, 1.85% Formaldehyd) 10 min inkubiert. Nach dem

Spreiten der Chromosomen wurde der Objektträger bis zur Antikörperfärbung in PBS bei 4°C aufbewahrt. Die Antikörpermarkierung erfolgte mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern. Die primären Antikörper wurden mit dem entsprechenden Präparat in PBS + 5% Trockenmilchpulver (Biorad) in der Regel über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Auswertung der Färbung erfolgte ebenfalls mit einem Konfokalmikroskop (LSM 510) unter Nutzung der Standardfiltersätze für FITC, TR, Propidiumiodid und TOTO-3 (Zeiss).

2.4.4 Immunmarkierung von *Drosophila*-Embryonen

Für die Färbung von *Drosophila*-Embryonen wurde die Methode nach Mitchison und Sedat (1983) wie folgt modifiziert: Die gesammelten Embryonen wurden nach der Dechorionisierung in 1 ml eines 1:1-Gemischs aus n-Heptan und 3.7% Formaldehyd in PBS gegeben und 15 min fixiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Embryonen durch Zugabe von 1 ml Methanol und anschließendes kräftiges Schütteln devitellinisiert. Nach fünf weiteren Methanolwaschschritten wurden die Embryonen entweder bei -20°C eingefroren, oder der Antikörperfärbung unterzogen. Zunächst wurde das Methanol durch 3 Waschschrte mit PBST (PBS + 0.2% Tween-20) entfernt und die Embryonen durch Inkubation mit 10% Ziegen Serum in PBST zugleich rehydriert. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4°C in 10% Ziegen Serum in PBST mit den Embryonen inkubiert; nach 3 Waschschrten mit PBST wurde der sekundäre Antikörper gleichzeitig mit einer RNaseA-Behandlung (40 µg/ml) bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Nach wiederum 3 Waschschrten mit PBST erfolgte eine DNA-Färbung mit Propidiumiodid (5 µg/ml) und nach erneutem Waschen mit PBST wurden die Embryonen in Citifluor eingebettet. Die Färbungen wurde am konfokalen Mikroskop (LSM 510) unter Nutzung der entsprechenden Filterkombinationen ausgewertet.

2.5 Sequenzierung von *Su(var)3-9*-Mutanten im endogenen Locus und im Transgen

2.5.1 Inverse PCR

Die Methode der inversen PCR wurde zur Bestimmung des Insertionsorts von P-Elementen angewendet und erfolgte in Anlehnung an Huang et al. (2000) mit folgenden Modifikationen. Die PCR-Reaktionen am Ligationsansatz wurde zunächst mit den Primern 5'P forw-1 und 5'P back-1 für das 5'-Ende des Elements

bzw. 3'P forw-1 und 3'P back-1 für das 3'-Ende des P-Elements vorgenommen. Bei zu geringer Produktausbeute wurden geschachtelte PCR's mit entsprechenden Primerpaaren (5'P forw-2 - 5'P back-2 bzw. 3'P forw-2 - 3'P back-2) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit Primern sequenziert, die vom 5'- bzw. 3' P-Repeat in Richtung der angrenzenden genomischen DNA orientiert sind (Sp1 bzw. Pry2mod). Durch Datenbankvergleich der an das P-Element angrenzenden Sequenz mit der Gesamtsequenz von *Drosophila* konnten die entsprechenden Insertionsstellen identifiziert werden. Die verwendeten Primer sind im Anhang (Abschnitt 6.2) aufgeführt.

2.5.2 Sequenzierung der Mutanten

Für die Sequenzierung der *Su(var)3-9*-Mutanten im P{c3-9}-Transgen wurde ein PCR-Produkt vom *hsp70*-Promoter bis zum EGFP amplifiziert (Primerpaar: pHT4-vorn, pEGFPsback). Falls die Produktausbeute nicht ausreichend war, wurden 2 verschachtelte PCR's mit den Primern pHT4-vorn - 3-9-3back und 3-9-4forw - pEGFPsback durchgeführt. Die Produkte wurden mit folgenden Primern sequenziert: pHT4vorn, 3-9-3back, 3-9-4forw, 3-9-4back, 3-9-5forw, pEGFPsback (Abb. 2.3A).

Für die Sequenzierung der *Su(var)3-9*-Mutanten im endogenen Locus mußten zunächst homozygote Tiere isoliert werden. Dazu wurden die Mutanten mit dem TM3-GFP-Balancer (Rudolph et al., 1999) gekreuzt. Die F₁-Tiere wurden untereinander gekreuzt und in deren Nachkommenschaft Larven isoliert, die keine GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Die gesamte kodierende Region des endogenen Locus wurde mit verschiedenen Primerpaaren (3-9-1forw - 3-9-2back, 3-9-2forw - 3-9-4back, 3-9-4forw - 3-9-5back) amplifiziert und sequenziert (Abb. 2.3B).

Alternativ wurden verschiedene Mutanten im endogenen Locus mit homozygoten *Su(var)3-9⁰⁶*-Tieren gekreuzt und die transheterozygoten F₁-Tiere analysiert. Da das *Su(var)3-9⁰⁶*-Allel eine große Insertion am Beginn des dritten Exons enthält, kann nur von dem zu analysierenden Mutanten-Chromosom ein PCR-Produkt gebildet werden (Abb. 2.3C).

Die Auswertung des Sequenzdaten und das Assemblieren der Sequenz-Contigs erfolgte mit dem Staden-Package, Version 2001.0. Für die Identifikation der Mutationsorte mittels Alignment der sequenzierten Contigs mit der Wildtyp-Sequenz wurde das GCG-Package, Version 10.2, genutzt.

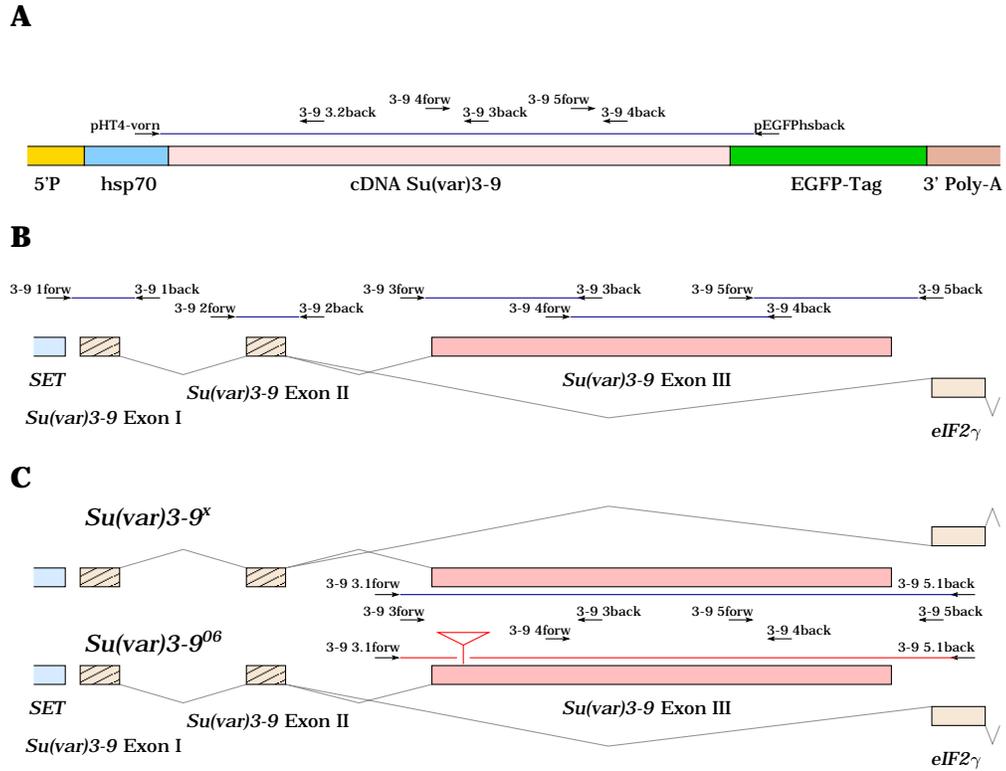


Abbildung 2.3: Sequenzierungsstrategie und benutzte Primer zur molekularen Analyse von Mutanten im P{c3-9}-Transgen (**A**) und im endogenen Locus (**B,C**). Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang (Abschnitt 6.2) verzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Das pP{GS} Vektor System

Ein wichtiges genetisches Hilfsmittel zur funktionellen Analyse bei *Drosophila melanogaster* ist die Nutzung transgener Linien, die die einfache Analyse von Genen und ihren Kontrollelementen ermöglicht. Für eine effiziente Analyse der hier untersuchten Gene wurde ein neues P-Element Transformationsvektorsystem entwickelt, das sich durch eine besondere Flexibilität auszeichnet.

Durch Ersetzen des EGFP-Moduls im Vektor pEGFP (Schotta, 1997) mit einem Linker, der mehrere neue Restriktionsschnittstellen enthielt, wurde der Basisvektor pP{GS} erhalten. Der Polylinker dieses Vektors enthält Schnittstellen für vierzehn 6bp-Restriktionsenzyme und drei 8bp-Restriktionsenzyme (Abb. 3.1).

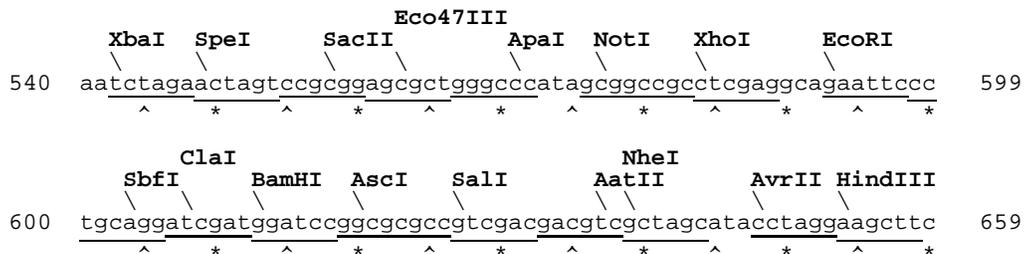


Abbildung 3.1: Polylinker des pP{GS}-Vektors

Die Flexibilität des Vektorsystems wird durch die Herstellung verschiedener Module erreicht, die Promotoren, Proteintags und Markergene zur Verfügung stellen. Eine Kombination dieser Module (Abb. 3.2) ermöglicht beispielsweise die Verwendung einer einmal klonierten cDNA zur Expression des Proteins mit oder ohne Proteintag sowie dessen Expression unter der Kontrolle verschiedener Promotoren. Für die wichtigsten Anwendungen wurden bereits Vektoren hergestellt, die die entsprechende Modul-Kombination enthalten (Tab. 3.1).

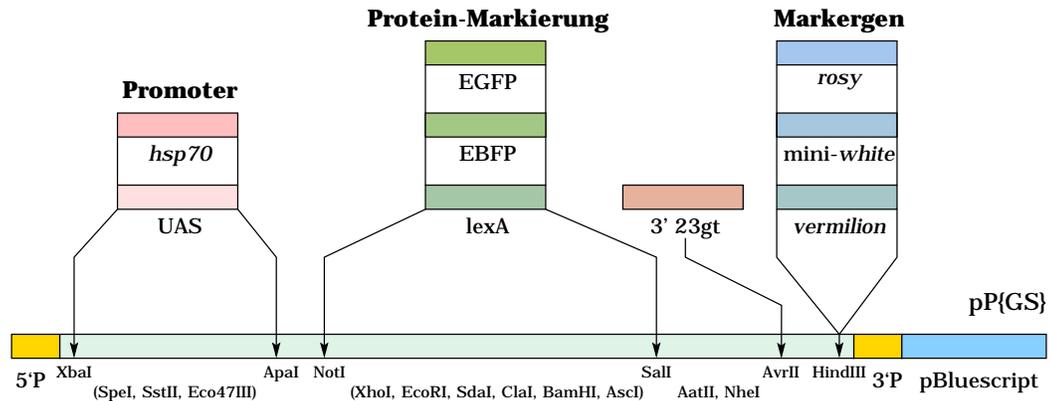


Abbildung 3.2: Module für das pP{GS}-Vektor-System. Durch Kombination der verschiedenen Module in den Grundvektor pP{GS} können P-Element Vektoren für verschiedene Anwendungen erhalten werden.

Markergen	Promoter	Protein-Tag	Bezeichnung des Vektors
7.2 kb <i>rosy</i>	—	—	pP{GS.ry ⁺ }
	<i>hsp70</i>	—	pP{GS.ry ⁺ hs}
	—	EGFP	pP{GS.ry ⁺ EGFP}
	<i>hsp70</i>	EGFP	pP{GS.ry ⁺ hsEGFP3'}
	<i>hsp70</i>	EBFP	pP{GS.ry ⁺ hsEBFP3'}
	UAS	EGFP	pP{GS.ry ⁺ UASEGFP}
1.8 kb <i>vermillion</i>	—	—	pP{GS.v ⁺ }
	—	EGFP	pP{GS.v ⁺ EGFP}
	—	lexA	pP{GS.v ⁺ lexA}
	<i>hsp70</i>	EGFP	pP{GS.v ⁺ hsEGFP}
	UAS	EGFP	pP{GS.v ⁺ UASEGFP}
	<i>hsp70</i>	lexA	pP{GS.v ⁺ hslexA}
4.1 kb <i>mini-white</i>	—	—	pP{GS.w ⁺ mS}

Tabelle 3.1: P-Element Vektoren, die durch Kombination der verschiedenen Module des pP{GS}-Vektor-Systems hergestellt wurden (<http://www.biologie.uni-halle.de/Genetics/drosophila/pGS/vectors/vectors.html>).

3.2 SU(VAR)3-9 ist ein heterochromatisches Protein

Neben dem Nachweis des endogenen SU(VAR)3-9-Proteins mit spezifischen Antikörpern sollte die zelluläre Lokalisierung mit Hilfe eines EGFP-markierten Fusionsproteins erfolgen. Damit ist es möglich, das markierte Protein *in vivo*, unter Erhalt der nativen Zellstrukturen, zu beobachten. Die cDNA von *Su(var)3-9* wurde in den Vektor pP{GS.ry⁺hsEGFP3} kloniert (P{c3-9}) und entsprechende Transgene isoliert. Da hier die Expression des Proteins unter Kontrolle des Hitzeschockpromoters liegt, der schon bei geringem Hitzeschock relativ hohe Expressionslevel erzeugt, eignen sich diese Linien insbesondere zur Analyse des überexprimierten Proteins. Nach Remobilisierung des Transgens (Reuter, persönliche Mitteilung) konnte eine Linie erhalten werden (P{c3-9}r), bei der die Basisexpression des Hitzeschockpromoters offenbar so gesteuert ist, daß eine Rettung des Mutantenphänotyps von *Su(var)3-9* zumindest im ventralen Teil des Auges erfolgen kann (Abb. 3.3). Um eine Expression entsprechend der endogenen Verhältnisse zu gewährleisten, wurde ein weiteres Konstrukt hergestellt, das ein 10.5 kb-Fragment der genomischen Region von *Su(var)3-9* enthält, in welches an den ORF ein EGFP-Tag eingefügt wurde (P{g3-9}), siehe auch Abb. 1.1A). Auch bei diesem Konstrukt wurde die EGFP-Fluoreszenz in einer Linie analysiert, die den Mutantenphänotyp von *Su(var)3-9* rettet (Abb. 3.3).

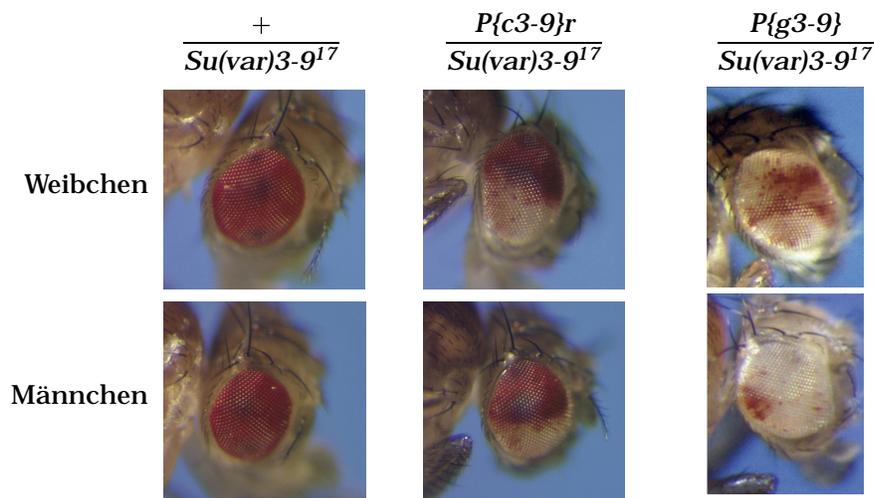


Abbildung 3.3: Rettung des Mutantenphänotyps von *Su(var)3-9* durch Expression von SU(VAR)3-9-EGFP in der remobilisierten Linie P{c3-9}r und der P{g3-9}-Linie CII.

Da bei *Drosophila melanogaster* die Kerne von Speicheldrüsenchromosomen polytänisiert und besonders groß sind, ist hier eine genaue Analyse der chromosomalen Verteilung von Proteinen möglich. Aus diesem Grund wurde die Verteilung des SU(VAR)3-9-EGFP-Proteins zunächst in Speicheldrüsen analysiert. Dabei wurde sowohl bei den P{c3-9}-Linien nach einem schwachen Hitzeschock von 5 min, als auch bei den P{g3-9}-Linien eine Assoziierung mit zentromerischem Heterochromatin gefunden (Abb. 3.4A-F). Nach Immunmarkierung von Polytänchromosomen einer P{c3-9}-Linie mit einem monoklonalen GFP-Antikörper (Babco) konnte eine Assoziierung von SU(VAR)3-9-EGFP mit dem 4. Chromosom, allen Telomeren, sowie wenigen autosomalen Banden festgestellt werden (Abb. 3.4G-H und Hoffmann (2000)). Nach intensiveren Hitzeschocks bis zu 1 h konnte eine Färbung weiterer autosomaler Banden, insbesondere im X-Chromosom festgestellt werden (Hoffmann, 2000). Die Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP nach leichtem Hitzeschock entspricht der Verteilung des endogenen Proteins, wie durch Färbung mit SU(VAR)3-9 spezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte (Ebert, persönliche Mitteilung).

Um zu untersuchen, an welche heterochromatischen Regionen SU(VAR)3-9 binden kann, wurde die Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP im Hintergrund verschiedener heterochromatischer Rearrangements in Kernen von Speicheldrüsenchromosomen analysiert (siehe auch Material und Methoden, Abb. 2.1). In allen autosomalen Rearrangements wurde ein außerhalb des Heterochromatins liegender EGFP-Spot variabler Größe identifiziert (Abb. 3.5). Beim X-chromosomalen *In(1)w^{m4}*-Rearrangement wurden jedoch EGFP-Spots gefunden, die immer noch mit dem zentromerischen Heterochromatin verknüpft waren (Abb. 3.5). Diese Verbindung mit dem Chromozentrum ist bei immunmarkierten polytänen Speicheldrüsenchromosomen in der Regel vom Chromozentrum getrennt (Ebert, persönliche Mitteilung).

Die Verteilung in Speicheldrüsenchromosomen wurde vorwiegend in P{c3-9}-Linien untersucht, da hier die P{g3-9}-Linien nur eine schwache Fluoreszenz zeigten. Um Hinweise auf eine gewebespezifische Expression zu erhalten, wurden verschiedene Entwicklungsstadien der P{g3-9}-Linien auf die Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP untersucht. In diesen Linien wird SU(VAR)3-9-EGFP bereits in präblastodermalen Embryonalstadien exprimiert (Ebert, persönliche Mitteilung). Im ersten und zweiten Larvenstadium ist es sehr stark, im dritten Larvenstadium nur noch schwach in Speicheldrüsen exprimiert. In allen Larvalstadien kann dagegen eine starke Expression in Imaginalscheiben nachgewiesen werden (Abb. 3.6A-C). In Ovarien adulter Weibchen wird SU(VAR)3-9-EGFP vorwiegend in Nährzellen, aber auch in Follikelzellen gefunden (Abb. 3.6D-E). Eine Besonder-

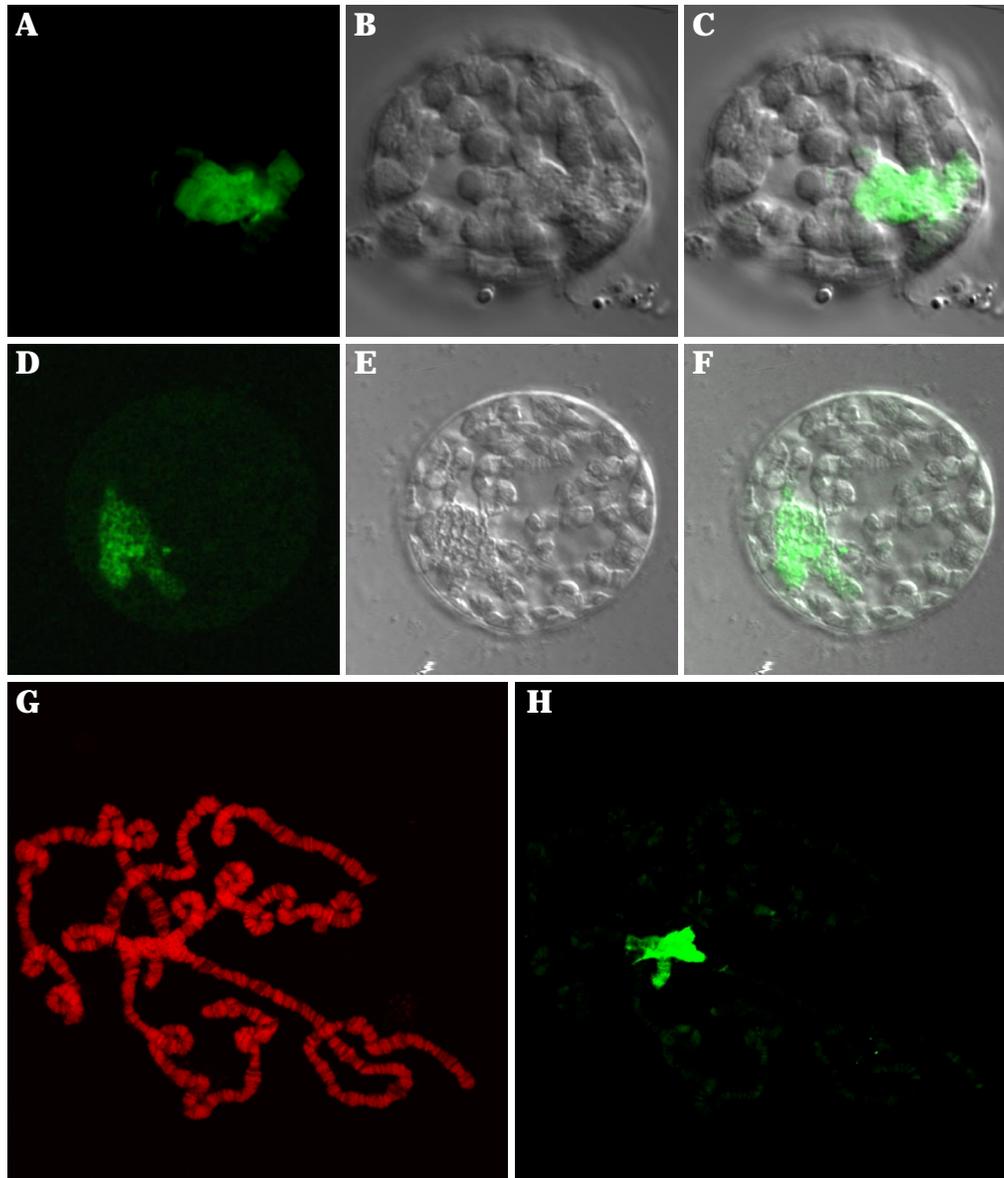


Abbildung 3.4: Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP an polytänisierten Speicheldrüsenschromosomen von *Drosophila melanogaster*. (A-C) Kern einer P{c3-9}-Linie nach Hitzeschock. (D-E) Kern einer P{g3-9}-Linie. (A,D) EGFP-Fluoreszenz, (B,E) Differenz-Interferenz-Kontrast, (C,F) Überlagerung. (G-H) Gespreitetes Speicheldrüsenschromosom einer P{c3-9}-Linie nach Hitzeschock. (G) DNA-Färbung mit Propidiumiodid, (H) Immunmarkierung mit polyklonalem GFP-Antikörper.

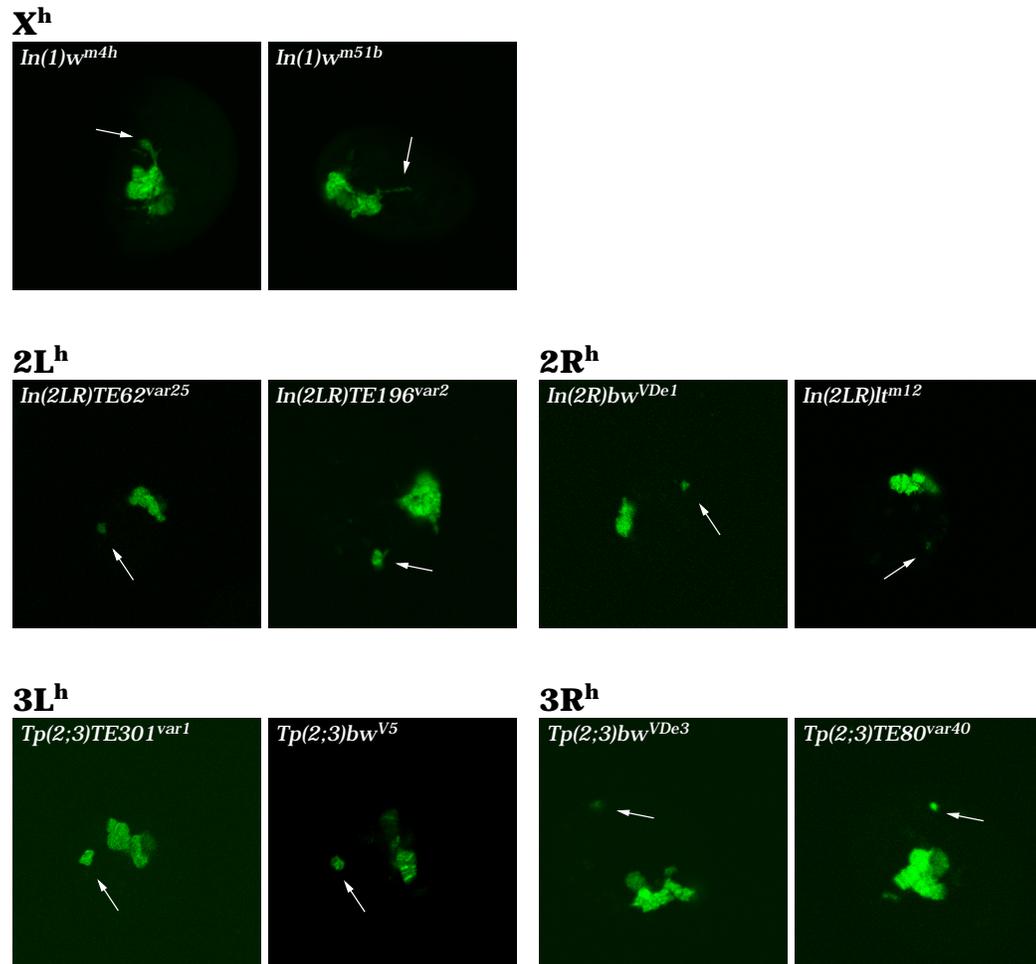


Abbildung 3.5: Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP in verschiedenen Rearrangements, die Bruchpunkte im zentromerischen Heterochromatin haben. SU(VAR)3-9-EGFP ist mit den außerhalb des Chromozentrums liegenden heterochromatischen Blöcken assoziiert (weiße Pfeile).

heit der Nährzellkerne besteht in der ungewöhnlichen Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP, denn gegenüber der fokussierten Verteilung im zentromerischen Heterochromatin diploider und polyploider Kerne ist in diesen Kernen eine starke Zersplitterung der Fluoreszenz sichtbar (Abb. 3.6F).

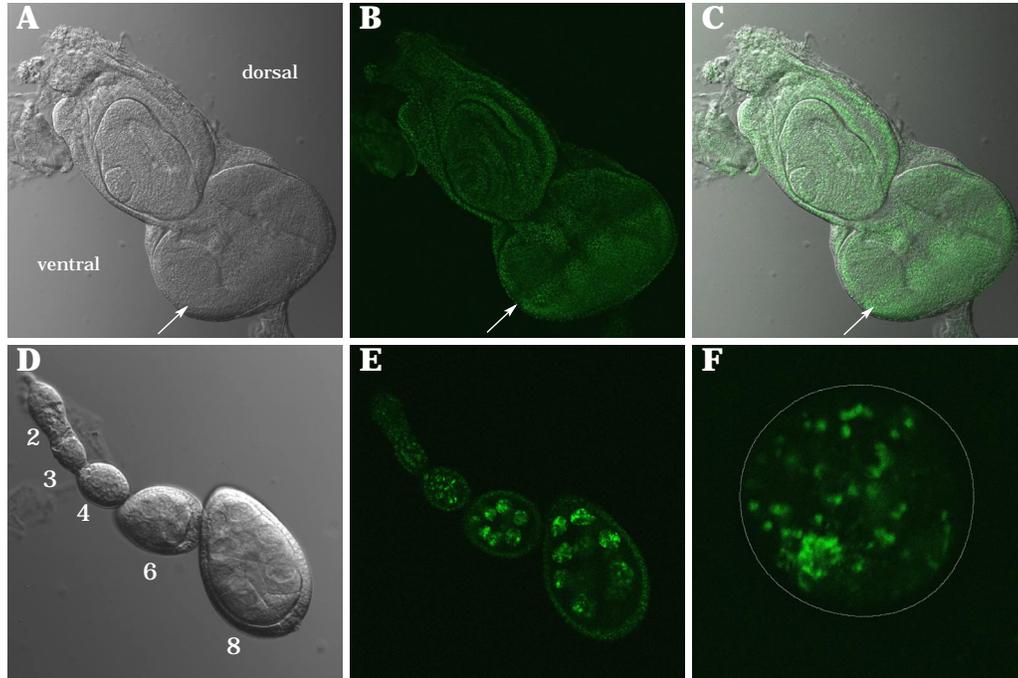


Abbildung 3.6: Expression der P{g3-9}-Linie CII in Imaginalscheiben und Ovarien. (A-C) SU(VAR)3-9-EGFP in einer Antenne-Augen-Imaginalscheibe eines dritten Larvalstadiums. Der weiße Pfeil markiert die morphogenetische Furche. (A) DIC-Aufnahme, (B) EGFP-Fluoreszenz, (C) Überlagerung. (D-E) Expression von SU(VAR)3-9-EGFP in verschiedenen Oogenesestadien (Zahlen bezeichnen das entsprechende Stadium), (D) DIC-Aufnahme, (E) EGFP-Fluoreszenz. (F) SU(VAR)3-9-EGFP-Verteilung in einem Nährzellkern aus Oogenesestadium 10.

3.3 *Su(var)3-9* modifiziert PEV in verschiedenen Rearrangements und interagiert genetisch mit anderen Heterochromatinproteinen

Su(var)3-9 ist ein Suppressor für Positionseffekt-Variegation (PEV) mit Triplo-abhängigem Enhancereffekt auf das *In(1)w^{m4}*-Rearrangement (Tschiersch et al.,

1994) und andere PEV-Rearrangements wie *bw^{VDe2}* und *Byron* (Sass und Henikoff, 1998), sowie die meisten der hier untersuchten heterochromatischen *w⁺*-Rearrangements (Reuter, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *Su(var)3-9* auf die *lacZ*-Variegation der zwei Rearrangements *In(3L)BL1* und *Tp(3;Y)BL2* (Lu et al., 1996) untersucht. Diese Rearrangements wurden durch Röntgenbestrahlung eines Transgens erhalten, das ein *lacZ*-Gen und ein mini-*white*-Gen, jeweils unter Kontrolle des *hsp70*-Promoters und umschlossen von SCS, SCS' Sequenzen, enthält (Lu et al., 1996). Nach einer Kreuzung von *In(3L)BL1* bzw. *Tp(3;Y)BL2* mit dem Null-Allel *Su(var)3-9¹⁷* wurde in Transheterozygoten und Kontrolltieren die *lacZ*-Variegation untersucht. Dabei zeigte sich, daß *Su(var)3-9* auch auf diese Rearrangements einen starken dominanten Suppressoreffekt ausübt (Abb. 3.7).

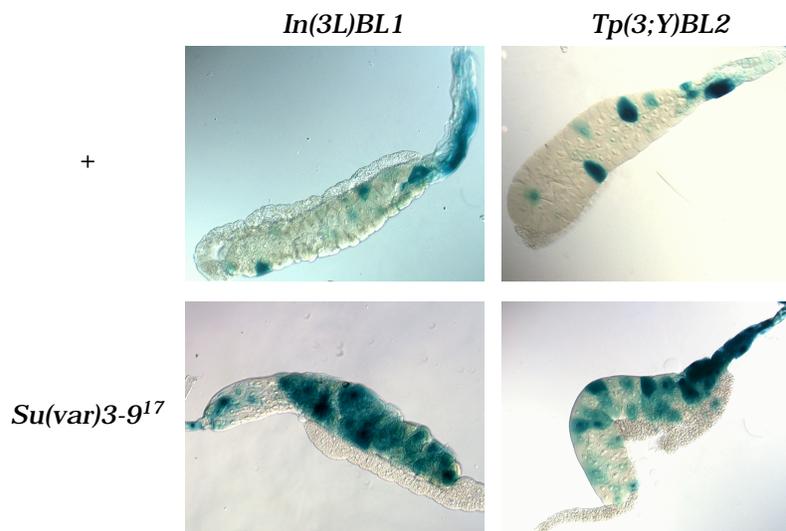


Abbildung 3.7: *Su(var)3-9* modifiziert PEV in Speicheldrüsen. Die *lacZ*-Variegation in Speicheldrüsen von *Df(1)w, yw; In(3L)BL1/TM3, Ser* und *Tp(3;Y)BL2/Df(1)w, yw* (obere Reihe) wurde mit der Variegation in transheterozygoten Tieren aus Kreuzungen von *Su(var)3-9¹⁷/Su(var)3-9¹⁷* mit *Df(1)w, yw; In(3L)BL1/TM3, Ser* bzw. *Tp(3;Y)BL2/Df(1)w, yw* verglichen (untere Reihe).

Neben *Su(var)3-9* zeigen auch *Su(var)3-7* und *Su(var)2-5* Haplo-Suppressor / Triplo-Enhancereffekte auf PEV und kodieren heterochromatinassoziierte Proteine (James und Elgin, 1986; Cleard et al., 1997). Um die genetischen Wechselwirkungen näher zu charakterisieren, wurden Null-Allele dieser Gene mit genomischen Zusatzkopien gekreuzt und die Nachkommenschaft bezüglich ihres Effekts auf *In(1)w^{m4}* ausgewertet (Abb. 3.8). Dabei zeigte sich, daß die *Su(var)3-*

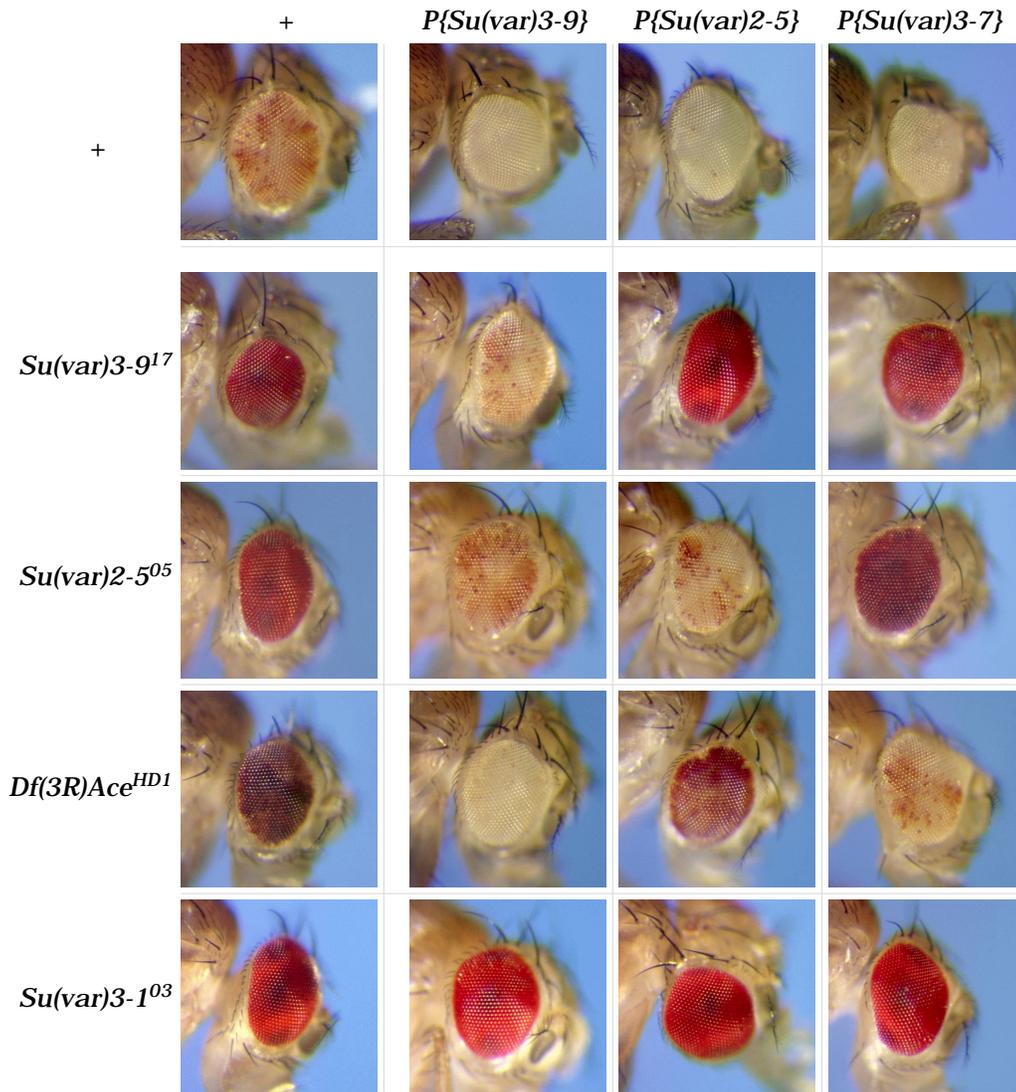


Abbildung 3.8: Genetische Interaktionen zwischen *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* bezüglich *In(1)w^{m4}*-Variegation. Die Null-Allele *Su(var)3-9¹⁷*, *Su(var)2-5⁰⁵*, *Df(3R)Ace^{HD1}* (*Su(var)3-7* Defizienz) und *Su(var)3-1⁰³* wurden mit transgenen Linien, die genomische Zusatzkopien von *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* enthalten, gekreuzt. Abgebildet ist die *white*-Variegation in Augen von Männchen der Haplo-Suppressor- (1. Spalte) und Triplo-Enhancer-Genotypen (1. Reihe) sowie der transheterozygoten Kombinationen.

9^{17} -Mutante epistatisch über den Enhancereffekt von Zusatzkopien der Gene *Su(var)3-7* und *Su(var)2-5* ist. Andererseits ist der Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)3-9* zwar epistatisch über die *Su(var)3-7*-Mutante, aber kooperativ mit *Su(var)2-5*. Die Interaktion von *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* ist wechselseitig epistatisch, denn Null-Allele von *Su(var)2-5* sind epistatisch über eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-7* und ebenso ist die *Su(var)3-7* umfassende *Df(3R)Ace^{HD1}* epistatisch über eine zusätzliche *Su(var)2-5* Kopie.

Besonders interessant sind Mutanten des *Su(var)3-1* Gens, denn diese dominieren sowohl über *Su(var)3-9* als auch *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7*. Dieses Gen stellt damit einen übergeordneten Regulator für die Etablierung heterochromatischen Gen-Silencings dar (Abb. 3.8).

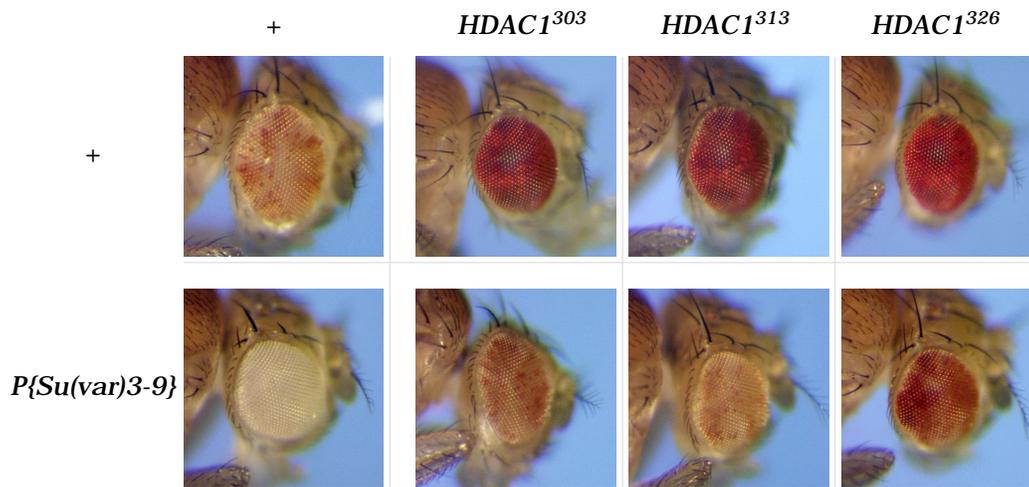


Abbildung 3.9: Genetische Interaktion von *Su(var)3-9* mit verschiedenen *HDAC1*-Allelen. Mutanten in *HDAC1* (obere Reihe) wurden mit der genomischen Zusatzkopie von *Su(var)3-9*, *P{Su(var)3-9}*, gekreuzt. Abgebildet ist die *white*-Variegation in Augen der transheterozygoten Männchen.

Die Histon-Deacetylase HDAC1 ist in SU(VAR)3-9-Komplexe inkorporiert und deacetyliert Histon H3, um eine nachfolgende Methylierung von SU(VAR)3-9 zu ermöglichen (Czermin et al., 2001). Für HDAC1 existieren 4 Punktmutanten, die zu Aminosäureaustauschen führen, sowie insertionelle Mutanten im Promotorbereich, bei denen in Augen-Imaginalscheiben kein Transkript nachweisbar ist (Rubertis et al., 1996; Mottus et al., 2000). Die Punktmutanten sind starke Suppressoren, die insertionellen Mutanten jedoch Enhancer für PEV. Drei der Punktmutanten wurden mit einer zusätzlichen Kopie von *Su(var)3-9* (*P{Su(var)3-9}*) ge-

kreuzt und der Effekt auf die *white*-Variegation in Augen der F₁-Männchen analysiert (Abb. 3.9). Von allen drei *HDAC1*-Mutanten wird der Triplo-Enhancereffekt von P{*Su(var)3-9*} abgeschwächt, die Mutante *HDAC1*³²⁶ ist sogar epistatisch (Abb. 3.9).

3.4 SU(VAR)3-9 interagiert mit HP1

Neben der genetischen Interaktion von *Su(var)3-9*, *Su(var)3-7* und *Su(var)2-5* wurden auch mögliche Interaktionen auf Proteinebene unter Nutzung des Hefe-Dihybridensystems festgestellt (Fischer, 1997), welche *in vivo* bestätigt werden sollten.

Ein chimäres HP1-PC-Protein, bei dem die Chromo-Domäne von HP1 gegen die von POLYCOMB ausgetauscht ist, zeigt wie HP1 selbst eine heterochromatische Verteilung, ist aber zusätzlich an Bindungsstellen von POLYCOMB im Euchromatin lokalisiert (Platero et al., 1995). Bei Vorhandensein des HP1-PC-Proteins sind HP1-interagierende oder in HP1-Komplexe involvierte Proteine ebenfalls an diesen zusätzlichen Stellen zu finden (Platero et al., 1996). Mit Hilfe dieses Systems kann SU(VAR)3-9 auf eine *in vivo*-Interaktion mit HP1 getestet werden, indem eine P{c3-9}-Linie mit einer Linie, die das ebenfalls unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors stehende HP1-PC-Protein exprimiert, gekreuzt wird. In den Larven der transheterozygoten Tiere konnte schließlich SU(VAR)3-9-EGFP ebenfalls an den euchromatischen Bindungsstellen des HP1-PC-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3.10 A, B).

Eine *in vivo*-Interaktion konnte zudem durch Koimmunpräzipitation beider Proteine aus embryonalen Kernextrakten gezeigt werden. Dazu wurden von Wildtyp-Embryonen (0-12h) bzw. hitzegeschockten P{c3-9}-Embryonen Kerne isoliert und mit Ammoniumsulfat aufgeschlossen. Die Extrakte wurden mit einem polyklonalen HP1-Antikörper (Wildtyp-Embryonen) bzw. GFP-Antikörper (P{c3-9}-Embryonen) inkubiert, welche wiederum an Protein-G Sepharose gebunden wurden. Extrakte, Überstände und Präzipitate wurden einer Westernanalyse mit polyklonalem SU(VAR)3-9-, GFP- bzw. HP1-Antikörper unterzogen. Dabei konnten sowohl im GFP- als auch im HP1-Präzipitat beide Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3.10 C, D).

3.5 Evolutionäre Konservierung von SU(VAR)3-9

SU(VAR)3-9 ist ein evolutionär konserviertes Protein. Bisher konnten orthologe Proteine in *Schizosaccharomyces pombe* (Ivanova et al., 1998), *Caenorhab-*

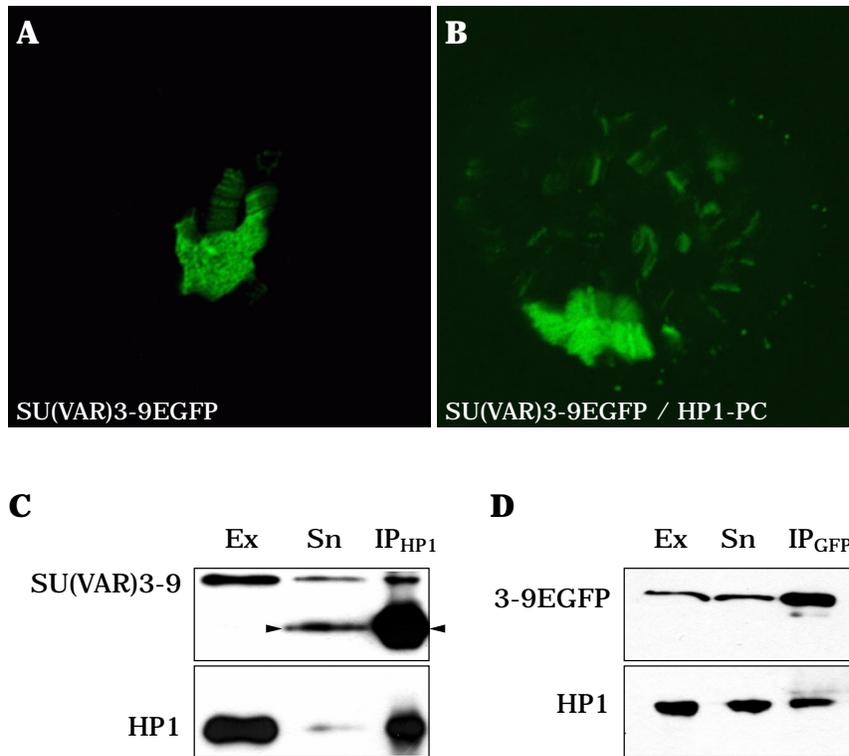


Abbildung 3.10: *In vivo*-Interaktion von SU(VAR)3-9-EGFP und HP1. (A, B) SU(VAR)3-9-EGFP wird durch Expression der HP1-PC Chimäre an euchromatische Stellen umlokalisiert. (A) Kontrolle, (B) Umlokalisierung durch HP1-PC. (C, D) Koimmunpräzipitation von SU(VAR)3-9 mit einem HP1-Antikörper aus Wildtyp-Embryoextrakt (C) und einem GFP-Antikörper aus Kernextrakt von P{c3-9}-Embryonen (D). Westernblots mit Extrakten (E), Überständen (Sn) und Präzipitaten (IP_{HP1}, IP_{GFP}) wurden mit einem SU(VAR)3-9 spezifischen Antikörper (C, obere Reihe), GFP-Antikörper (D, obere Reihe) und HP1-Antikörper (C und D, untere Reihe) getestet. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Bande des benutzten Antikörpers.

ditis elegans (Tamaru und Selker, 2001), Mensch und Maus (Aagaard et al., 1999; O'Carroll et al., 2000), sowie mehreren Insektenpezies (Krauss und Reuter, 2000) identifiziert werden. Die cDNA des menschlichen Orthologs (*SUV39H1*) wurde in pP{GS.ry⁺hsEGFP3} kloniert (P{SUV39H1}) und transgene Linien etabliert. Die Verteilung des Fusionsproteins in Speicheldrüsenkernen entspricht der des *Drosophila*-Proteins (Abb. 3.11A). Durch Nutzung des HP1-PC-Chimärenproteins konnte auch die *in vivo*-Interaktion mit HP1 nachgewiesen werden (Abb. 3.11B). Die transgenen Linien zeigen nur geringe PEV-Effekte auf *In(1)w^{m4}*. Nach einer Remobilisierung konnte jedoch eine Linie erhalten werden, die eine partielle Rettung des Suppressoreffekts von *Su(var)3-9*-Mutanten zeigt (Abb. 3.11 C,D). Somit scheint SU(VAR)3-9 nicht nur strukturell, sondern auch funktionell konserviert zu sein.

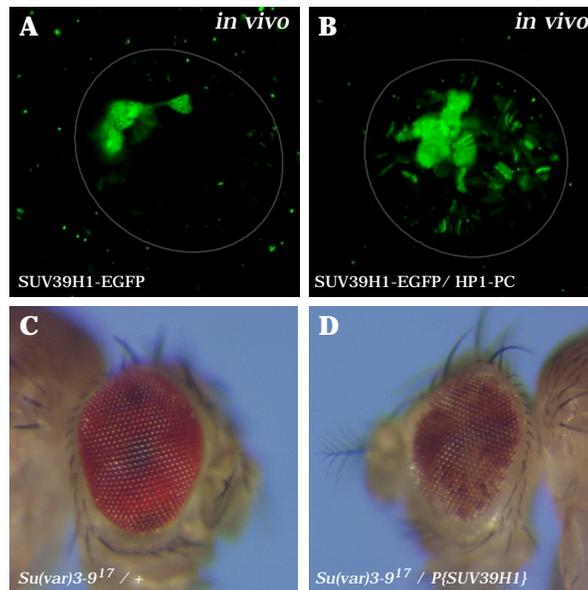


Abbildung 3.11: Das humane Ortholog SUV39H1 ist funktionell in *Drosophila*. (A) SUV39H1-EGFP-Fluoreszenz im Speicheldrüsenkern einer transgenen P{SUV39H1}-Linie nach leichtem Hitzeschock. (B) Umlagerung des Fusionsproteins durch Koexpression mit dem HP1-PC-Chimärenprotein. (C, D) Suppressoreffekt von *Su(var)3-9¹⁷* (C) und partielle Rettung des Mutanteneffekts durch Expression von SUV39H1-EGFP in einer remobilisierten P{SUV39H1}-Linie (D).

3.6 Struktur-Funktionsanalyse von SU(VAR)3-9

3.6.1 Kontrolle der Heterochromatinbindung von SU(VAR)3-9

SU(VAR)3-9 interagiert mit den Heterochromatin-Proteinen HP1 und SU(VAR)3-7. Im Hefedibridsystem konnte festgestellt werden, daß diese Interaktion über den N-Terminus von SU(VAR)3-9 stattfindet (Fischer, 1997), der somit eine wichtige Bedeutung für die Heterochromatin-Assoziierung von SU(VAR)3-9 haben sollte. Ein EGFP-Fusionsprotein des N-Terminus (NTerm-EGFP) zeigt in Speicheldrüsenkernen die gleiche Verteilung wie SU(VAR)3-9-EGFP (Kontrolle), allerdings ist das Chromozentrum etwas schwächer gefärbt (Abb. 3.12). Ein N-terminal deletiertes Protein (myc Δ NTerm) zeigt ebenfalls eine Heterochromatinassoziiierung (Ebert, persönliche Mitteilung), was darauf hinweist, daß der N-Terminus zwar in der Lage, aber noch ein anderer Teil des Proteins nötig ist, um die korrekte Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9 zu ermöglichen.

Die Chromo-Domäne kommt neben SU(VAR)3-9 in vielen anderen Chromatinproteinen vor und wird als Chromatin-Bindungsmodul diskutiert (Platero et al., 1995). Um den Einfluß dieser Domäne auf die Heterochromatinbindung von SU(VAR)3-9 zu beurteilen, wurde ein EGFP-Fusionskonstrukt mit deletierter Chromo-Domäne hergestellt (Δ chromo-EGFP) und die Verteilung in Speicheldrüsenkernen untersucht. Ebenso wie NTerm-EGFP zeigt diese Proteinvariante eine Heterochromatin-Assoziierung mit schwächerer Chromozentrumfärbung (Abb. 3.12), was verdeutlicht, daß auch die Chromo-Domäne zur Heterochromatin-Assoziierung von SU(VAR)3-9 beiträgt.

Da der N-Terminus von SU(VAR)3-9 im Hefedibridsystem mit HP1 und auch SU(VAR)3-7 interagieren kann, wurde untersucht, ob diese Interaktionen auch *in vivo* für die Heterochromatin-Lokalisierung des Proteins verantwortlich sind. Im SU(VAR)3-9 Bait-Klon (AS 1-188) wurden Mutanten des N-Terminus isoliert, die im Hefedibridsystem keine Interaktion mit HP1 und SU(VAR)3-7 aufweisen (Fischer, persönliche Mitteilung). Eine dieser Mutanten (P177T) wurde ebenfalls als EGFP-Fusionskonstrukt in *Drosophila* transformiert (NTermPT-EGFP). Die Verteilung dieses Proteins entspricht der von NTerm-EGFP, bzw. Δ chromo-EGFP (Abb. 3.12). Das bedeutet, daß entweder die Heterochromatinbindung des N-Terminus unabhängig von HP1 oder SU(VAR)3-7 vermittelt ist, oder der mutierte N-Terminus (*in vivo*) doch noch in der Lage ist, mit diesen Proteinen zu interagieren. *In vivo*-Interaktionstests von HP1-PC mit NTerm-EGFP, NTermPT-EGFP und Δ chromo-EGFP zeigen, daß alle drei Proteinvarianten in der Lage sind, mit HP1 zu interagieren (Abb. 3.12). Auffällig ist dabei, daß die Chromozentren bei

NTermPT-EGFP und Δ chromo-EGFP wesentlich schwächer angefärbt sind, als bei NTerm-EGFP. Bei diesen Experimenten wurden alle Linien der gleichen Hitzeschockprozedur (5 min bei 37°C) unterzogen und unter gleichen Bedingungen am konfokalen Laserscanningmikroskop ausgewertet. Für alle Konstrukte wurden verschiedene transgene Linien untersucht, um Unterschiede in der Expressionsstärke auszumitteln.

3.6.2 Mutanten der SET-Domäne verursachen eine veränderte Verteilung von SU(VAR)3-9 im Chromozentrum

Neben der Chromo-Domäne ist auch die SET-Domäne in vielen Chromatinproteinen konserviert (Jenuwein et al., 1998). Um den Einfluß der SET-Domäne auf die Verteilung von SU(VAR)3-9 zu untersuchen, wurden EGFP-Fusionskonstrukte angefertigt, bei denen die SET-Domäne deletiert (Δ SET-EGFP), bzw. ein Domänentausch gegen die SET-Domäne von TRITHORAX durchgeführt wurde (c3-9/TRX-EGFP). Weiterhin wurden von zwei *Su(var)3-9*-Allelen, die als Suppressoren für PEV identifiziert wurden (Tschiersch et al., 1994) und bei denen der Mutationsort innerhalb der SET-Domäne festgestellt werden konnte (*Su(var)3-9^{I3}*, P571S; *Su(var)3-9^{I5}*, Δ_{549} AANY₅₅₂) EGFP-Fusionskonstrukte (SET13-EGFP, SET15-EGFP) generiert.

Im Gegensatz zu SU(VAR)3-9-EGFP, welches eine weitgehend homogene Anfärbung des Heterochromatins zeigt, unterscheiden sich diese Proteinvarianten durch stärkere Akkumulation an einem oder mehreren Spots innerhalb des Heterochromatins (Abb. 3.12, SET13, SET15, Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Zahl dieser Spots und der zentralen Position kann man vermuten, daß es sich hier um zentromerisches Heterochromatin handelt. Die SET-Domäne ist damit an einer homogenen Verteilung von SU(VAR)3-9 innerhalb des Chromozentrums beteiligt. Die Interaktion mit HP1 ist durch Mutationen in der SET-Domäne nicht betroffen, da bei allen Proteinen der *in vivo*-Test auf HP1-Interaktion positiv ist (Abb. 3.12).

3.6.3 Die Verteilung der SU(VAR)3-9-Proteinvarianten wird vom endogenen SU(VAR)3-9-Protein beeinflusst

Um zu testen, ob die Verteilung der SU(VAR)3-9-Proteinvarianten von endogenem SU(VAR)3-9 abhängig ist, wurden Stämme etabliert, bei denen das entsprechende Transgen in der homozygoten Null-Mutante *Su(var)3-9⁰⁶* vorliegt. SU(VAR)3-9-EGFP zeigt dabei die gleiche Verteilung wie im Wildtyp-Hintergrund (Abb. 3.12).

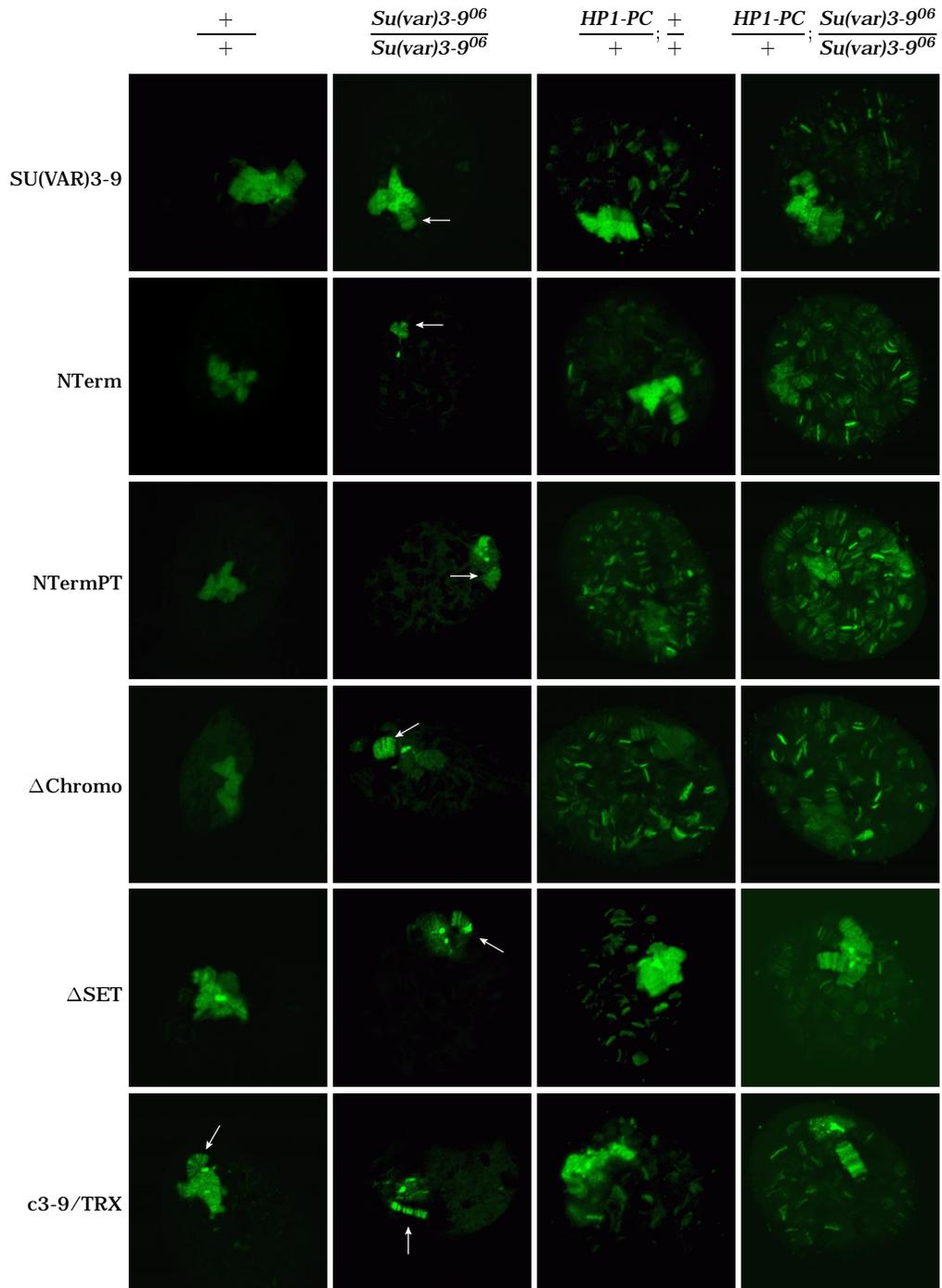


Abbildung 3.12: Kontrolle der Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9. Transgene Linien der EGFP-markierten Proteinvarianten wurden im Wildtyp- bzw. *Su(var)3-9⁰⁶*-Hintergrund bezüglich ihrer Verteilung in Speicheldrüsenkernen und *in vivo*-Interaktion mit HP1 untersucht. Konfokale Schnitte durch *in vivo*-Kerne, Pfeile weisen auf das vierte Chromosom.

Die anderen Proteinvarianten sind auf wenige zentrale Punkte nur sehr schwach mit dem Chromozentrum assoziiert, zeigen jedoch noch eine starke Assoziation mit dem vierten Chromosom (Abb. 3.12). Das Vorliegen des endogenen bzw. eines vollständig funktionsfähigen SU(VAR)3-9 ist somit für eine Ausbreitung des Proteins über das gesamte Chromozentrum, nicht jedoch für die Verteilung über das vierte Chromosom, notwendig.

3.6.4 Wechselseitige Beeinflussung der Heterochromatinbindung von SU(VAR)3-9 und HP1

Die reduzierte Chromozentrumfärbung der SU(VAR)3-9-Proteinvarianten zeigt, daß die volle Funktionalität des Proteins nötig ist, um korrekt innerhalb des Heterochromatins verteilt zu werden. Die Restfärbung an den zentromerischen Dots und am 4. Chromosom weist jedoch darauf hin, daß verschiedene Mechanismen an der Verteilung von SU(VAR)3-9 beteiligt sind. Um die Einflüsse von anderen PEV-Modifikatoren auf die Kontrolle der Verteilung von SU(VAR)3-9 zu untersuchen, wurden mit Hilfe von GFP-Balancern (Rudolph et al., 1999) transheterozygote Tiere für Mutanten von *Su(var)2-1*, *Su(var)2-5*, *Su(var)3-1* und *Su(var)3-3* selektiert, die zusätzlich eine Kopie des P{c3-9}-Transgens enthielten. In diesen Tieren wurde nach kurzem Hitzeschock die Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP in Speicheldrüsen untersucht. Dabei wurde in Mutanten von *Su(var)2-1*, *Su(var)3-1* und *Su(var)3-3* keine veränderte Verteilung gefunden (Daten nicht gezeigt). Drastische Veränderungen zeigten sich jedoch in transheterozygoten *Su(var)2-5*-Mutanten. Hier ist SU(VAR)3-9-EGFP über die gesamten euchromatischen Bereiche ausgebreitet; die Verteilung im Heterochromatin scheint dabei nicht beeinflußt zu sein (Abb. 3.13).

HP1 ist in Speicheldrüsenchromosomen wie SU(VAR)3-9 vorwiegend im Chromozentrum und am vierten Chromosom lokalisiert (James et al., 1989), was für ein EGFP-markiertes HP1-Protein bestätigt werden konnte (Abb. 3.13). In homozygoten *Su(var)3-9*-Mutanten hingegen zeigt HP1-EGFP eine stark reduzierte Assoziation mit chromozentrischem Heterochromatin (Abb. 3.13). Wie für die SU(VAR)3-9 Proteinvarianten ist auch für die vollständige Verteilung von HP1 im Chromozentrum endogenes SU(VAR)3-9 essentiell.

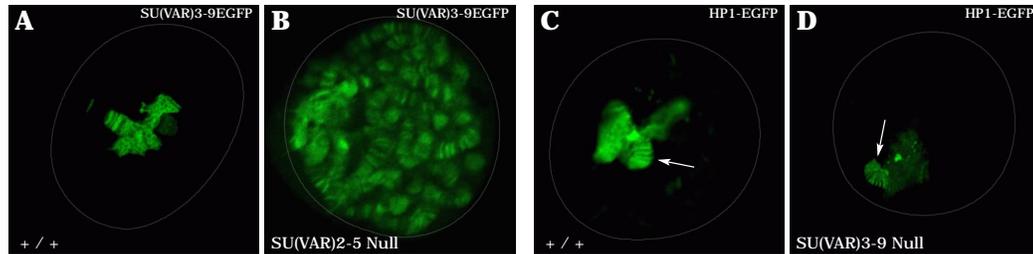


Abbildung 3.13: Wechselseitige Kontrolle der Verteilung von SU(VAR)3-9 und HP1. (A-B) Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP einer P{c3-9}-Linie in Wildtyp- (A) und *Su(var)2-5⁰⁴/Df(2L)TE128X11*-Larven (B). (C-D) Verteilung von HP1-EGFP einer P{cHP1}-Linie in Wildtyp- (C) und *Su(var)3-9⁰⁶/Su(var)3-9⁰⁶*-Larven (D). Konfokale Schnitte durch *in vivo*-Kerne, Pfeile weisen auf das vierte Chromosom.

3.7 SU(VAR)3-9 ist eine Methyltransferase für Histon H3

SUV39H1 realisiert über die SET-Domäne eine Aktivität als Methyltransferase, die spezifisch für Lysin 9 von Histon H3 (H3-K9) ist (Rea et al., 2000). Durch die Untersuchung eines myc-SU(VAR)3-9-Fusionsproteins konnte gezeigt werden, daß *Drosophila* SU(VAR)3-9 ebenso wie SUV39H1 eine Methyltransferase mit einer Substratspezifität für H3-K9 ist (Czermin et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Untersuchungen auf die in der Struktur-Funktionsanalyse verwendeten Proteinvarianten ausgedehnt, um die Bedeutung der Methyltransferasefunktion für die Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9 zu analysieren.

Für SU(VAR)3-9-EGFP, Δ Chromo-EGFP, Δ SET-EGFP und c3-9/TRX-EGFP wurden Stämme etabliert, die homozygot das Null-Allel *Su(var)3-9⁰⁶* enthalten. Von hitzegeschockten Embryonen dieser Linien wurden Kernextrakte angefertigt und mit einem GFP-Antikörper die entsprechende SU(VAR)3-9-Variante an Protein-G-Sepharose-Beads gebunden. Ein Teil der Beads wurde mit ³H-markiertem SAM (S-adenosyl-[methyl-³H]-l-methionin) und einem N-terminalen H3-Peptid (AS 1-20) inkubiert und die in das Peptid eingebaute Radioaktivität als Maß für die Methyltransferaseaktivität im Scintillationszähler bestimmt. Als Kontrolle wurden die Extrakte ohne Antikörper mit den Protein-G-Beads inkubiert und ansonsten gleich behandelt (Mock).

In diesem Test zeigen SU(VAR)3-9-EGFP, Δ Chromo-EGFP und das endogene SU(VAR)3-9-Protein eine signifikante Methyltransferaseaktivität. Da die SET-Domäne für die Methyltransferaseaktivität verantwortlich ist, zeigt Δ SET-EGFP

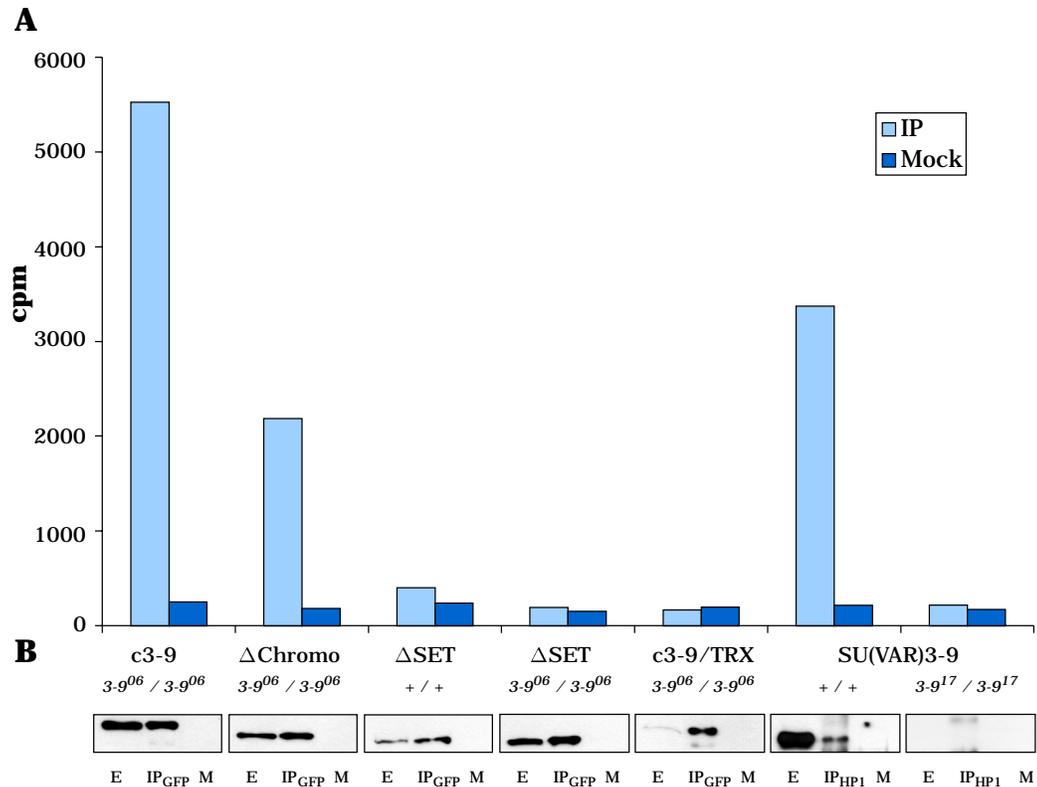


Abbildung 3.14: Methyltransferaseassay von EGFP-markierten SU(VAR)3-9 Proteinvarianten und endogenem SU(VAR)3-9. **(A)** Kernextrakte von Embryonen transgener Linien in SU(VAR)3-9 Null-Mutanten (c3-9 (=SU(VAR)3-9-EGFP), Δ Chromo, Δ SET, c3-9/TRX) und Wildtyp (Δ SET, SU(VAR)3-9) wurden analysiert. Der Methyltransferaseassay wurde an Präzipitaten mit GFP- oder HP1-Antikörper (IP) und ohne Antikörper (Mock) durchgeführt. **(B)** Westernblots mit je 10 μ g der verwendeten Kernextrakte (E), 10 μ l der Immunpräzipitate mit GFP- oder HP1-Antikörper (IP) und 10 μ l der Präzipitate ohne Antikörper (M) wurden mit GFP-Antikörper (Spalte 1-5) bzw. SU(VAR)3-9-spezifischem Antikörper (Spalte 6-7) markiert.

erwartungsgemäß keine Aktivität. Die SET-Domäne von TRITHORAX kann offenbar keine Methylierung des H3-Peptids durchführen, da c3-9/TRX-EGFP ebenfalls inaktiv ist. Endogenes SU(VAR)3-9 wird nicht in den an die Beads gekoppelten Komplexen gefunden, denn Δ SET im Wildtyphintergrund zeigt ebenfalls keine Methyltransferaseaktivität. (Abb. 3.14A). Die HMTase-Aktivität von Δ Chromo-EGFP ist nicht signifikant geringer, als die von SU(VAR)3-9-EGFP, da die Menge des an die Beads gebundenen Δ Chromo-EGFP geringer ist, als die von SU(VAR)3-9-EGFP (Abb. 3.14B). Die Bestimmung der HMTase-Aktivitäten wurde mehrmals an unabhängigen Extrakten wiederholt und lieferte immer gleiche Relationen.

Um die Aktivität des endogenen Proteins nachzuweisen, wurden Kernextrakte von Wildtyp- und homozygoten *Su(var)3-9^{l7}*-Embryonen hergestellt. Weil der SU(VAR)3-9-spezifische Antikörper für Immunpräzipitationen nicht geeignet ist, wurde SU(VAR)3-9 über einen HP1-Antikörper an die Protein-G-Beads gebunden. Aus Wildtyp-Embryonen konnte eine starke, aus der *Su(var)3-9^{l7}* Null-Mutante keine Aktivität präzipitiert werden (Abb. 3.14A). Im Westernblot konnte das gebundene SU(VAR)3-9 nachgewiesen werden (Abb. 3.14B).

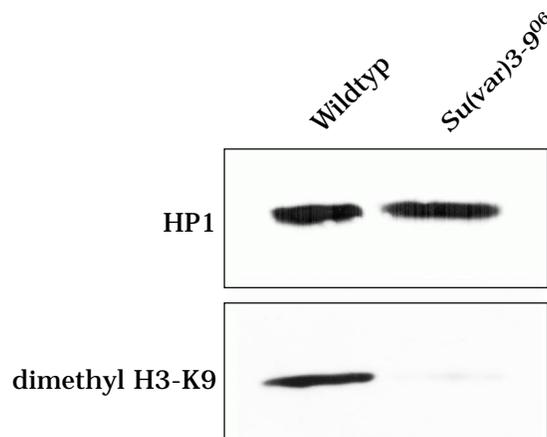


Abbildung 3.15: H3-K9-Methylierung in *Drosophila melanogaster*. Gleiche Mengen Kernextrakt von 0-12h alten Wildtyp- und homozygoten *Su(var)3-9⁰⁶*-Embryonen wurden auf zwei separate Westernblots aufgetragen und mit α -HP1-Antikörper (obere Reihe) zur Quantifizierungskontrolle und α -dimethyl H3-K9-Antikörper (untere Reihe) markiert.

Die *in vivo*-Relevanz der H3-K9-Methyltransferaseaktivität wurde in *Su(var)3-9* Null-Mutanten untersucht. Gleiche Mengen des Kernextraktes von Wildtyp-Embryonen und homozygoten *Su(var)3-9⁰⁶*-Embryonen wurden auf einem Wes-

tern-Blot mit einem α -dimethyl H3-K9-Antikörper markiert. In *Su(var)3-9*-Mutanten ist die Menge des dimethylierten H3-K9 stark reduziert (Abb. 3.15). SU(VAR)3-9 ist damit nicht die einzige, aber die wesentliche H3-K9 Methyltransferase in Embryonen von *Drosophila melanogaster*.

3.8 Isolation und molekulare Analyse von *Su(var)3-9*-Mutanten

3.8.1 Isolation von *Su(var)3-9*-Mutanten im endogenen Locus und im P{c3-9}r-Transgen

Die durch Transformation erhaltenen P{c3-9}-Linien zeigen aufgrund der schwachen konstitutiven Expression des Hitzeschockpromotors keine Rettung des Suppressoreffekts von *Su(var)3-9*. Durch Remobilisierung der P{c3-9}-Linie P{c3-9} E wurde die Linie P{c3-9}r isoliert, die den für *Su(var)3-9* typischen Triplo-Enhancereffekt aufweist. Außerdem konnte für diese Linie eine spezifische Rettung des *Su(var)3-9*-Suppressoreffekts im ventralen Bereich des Auges beobachtet werden (Abb. 3.16).

Männchen

Su(var)3-9¹⁷ / +



Su(var)3-9¹⁷ / P{c3-9}r



Weibchen

Su(var)3-9¹⁷ / +



Su(var)3-9¹⁷ / P{c3-9}r



Abbildung 3.16: Mutantenrettung durch die remobilisierte P{c3-9}-Linie P{c3-9}r. Der Suppressoreffekt von *Su(var)3-9¹⁷ / +* wird in transheterozygoten *Su(var)3-9¹⁷ / P{c3-9}r* Männchen und Weibchen in der ventralen Hälfte des Auges (weißer Pfeil) gerettet.

Unter Nutzung dieses sehr spezifischen Effekts auf *Su(var)3-9* wurden von Prof. Dr. G. Reuter und Stefan Löttsch zwei unabhängige Mutationsexperimente durchgeführt. Im ersten Experiment (EMS-I) wurde die Linie P{c3-9}r mit EMS behandelt und, nach Kreuzung mit *Su(var)2-1⁰¹*, Mutanten isoliert, die nicht mehr den Triplo-Enhancereffekt von P{c3-9}r aufwiesen (Abb. 3.17). Durch wei-

tere Kreuzungsschritte wurden die Mutationen dem Transgen, dem endogenen Locus oder einem Modifikator auf dem zweiten oder dritten Chromosom zugeordnet (Abb. 3.17). Unter 4134 gesichteten F1-Tieren wurden 97 Suppressor-Ausnahmen identifiziert. Von diesen konnten 28 dem Transgen, 6 dem endogenen *Su(var)3-9*-Locus, 2 *Su(var)3-1*, 8 Suppressoren auf dem dritten Chromosom und 16 Suppressoren auf dem zweiten Chromosom zugeordnet werden.

In einem zweiten Experiment (EMS-II) wurden spezifisch Mutanten im endogenen *Su(var)3-9*-Locus isoliert, indem *In(1)w^{m4}*-Männchen mit EMS behandelt und mit P{c3-9}r-Fliegen gekreuzt wurden. In der Nachkommenschaft wurden die Tiere selektiert, die im ventralen Teil des Auges einen Suppressorphänotyp aufwiesen. In diesem Experiment wurden 6 Ausnahmetiere identifiziert.

Die molekulare Auswertung der Transgen-Mutanten erforderte zunächst die Identifizierung des Insertionsorts von P{c3-9}r. Mit *in situ*-Hybridisierung unter Nutzung einer P-Element-Sonde (Hoffmann, 2000) konnten zwei Insertionen des Transgens in Region 77 bzw 88 festgestellt werden (Abb. 3.18). Beide Inserts wurden durch Rekombination voneinander getrennt und nach Kreuzung der Rekombinanten mit *Su(var)3-9^{I7}*-Mutanten zeigte sich, daß nur das Insert in Region 77 für die spezifische Rettung des Suppressoreffekts in der ventralen Augenhälfte verantwortlich ist.

Mittels inverser PCR wurden die genauen Insertionsstellen der Inserts identifiziert. Das in Region 77 gelegene Insert ist in den 5'-Bereich von *fringe* inseriert (Abb. 3.19A). Da *fringe* cytologisch in Region 78A1-2 liegt, wird dieses Insert weiterhin mit P{c3-9}78A bezeichnet. Für das in Region 88 gelegene Insert konnte hingegen die Integrationsstelle im dritten Exon von *Men* nachgewiesen werden (Abb. 3.19B). Aufgrund der Lokalisierung von *Men* in Region 87C wird dieses Insert im folgenden als P{c3-9}87C bezeichnet.

Das P{c3-9}78A-Insert führt sowohl zu einem Triplo-Enhancereffekt, als auch zur spezifischen Mutantenrettung in der ventralen Augenhälfte. Die Expression von SU(VAR)3-9-EGFP wurde in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* (Embryonen, Larven, Adulte) untersucht, um eine Korrelation mit dem beobachteten Phänotyp zu finden. In der Linie P{c3-9}78A wird SU(VAR)3-9-EGFP erst in späteren Embryonalstadien (ab Stadium 10) in einem spezifischen Expressionsmuster gefunden (Abb. 3.20A-F). In Larven kommt das Protein in allen Imaginalscheiben vor (Abb. 3.20G-I), bei adulten Tieren wird es nur in den "nurse-like cells" der Hoden (Abb. 3.20K-L) und frühen Oogenesestadien (Abb. 3.20M-N) exprimiert.

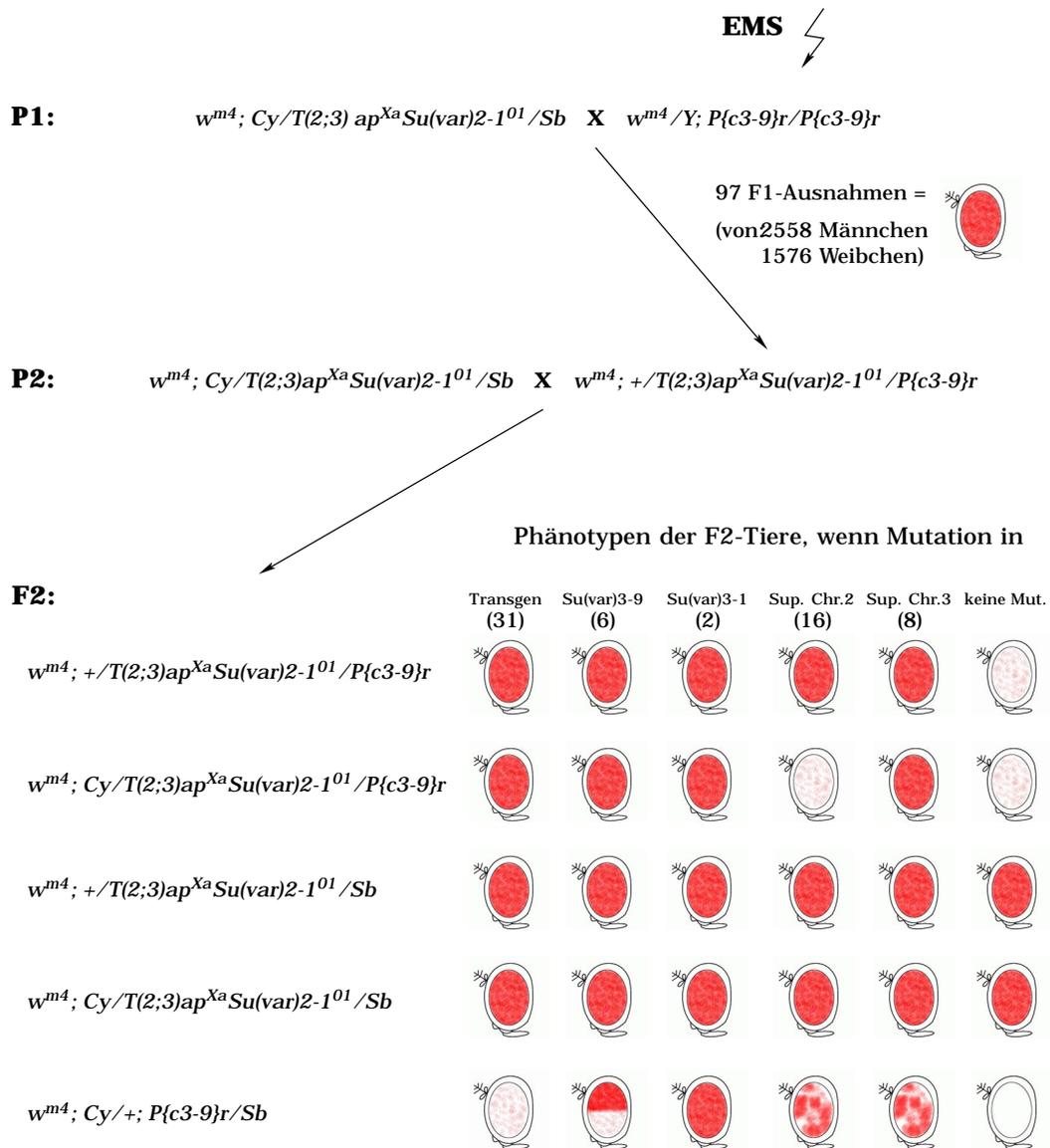


Abbildung 3.17: Kreuzungsschema zur Selektion von Mutanten im P{c3-9}r-Transgen (EMS-I). Nach Kreuzung der EMS-behandelten Männchen mit $Su(var)2-1^{01}$ -Mutanten wurde auf Verlust des Enhancereffekts selektiert. Die Ausnahmetiere konnten durch erneute Kreuzung mit $Su(var)2-1^{01}$ kategorisiert werden (Anzahl der Ausnahmen in Klammern).

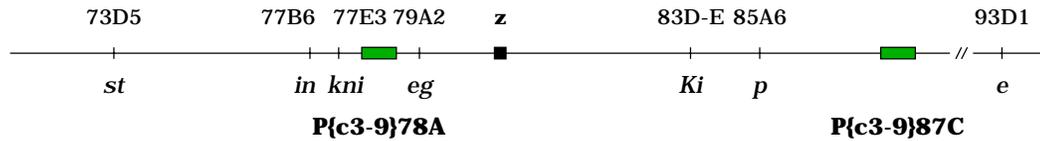


Abbildung 3.18: Lokalisierung der beiden Inserts in der remobilisierten P{c3-9}r-Linie bezüglich verschiedener Markergene auf dem dritten Chromosom. Die zytologisch bestimmten Insertionsstellen sind als grüne Kästen angegeben. *z* - Zentromer, *st* - *starlet*, *in* - *inturned*, *kni* - *knirps*, *eg* - *eagle*, *Ki* - *Kinked*, *p* - *pink*, *e* - *ebony*

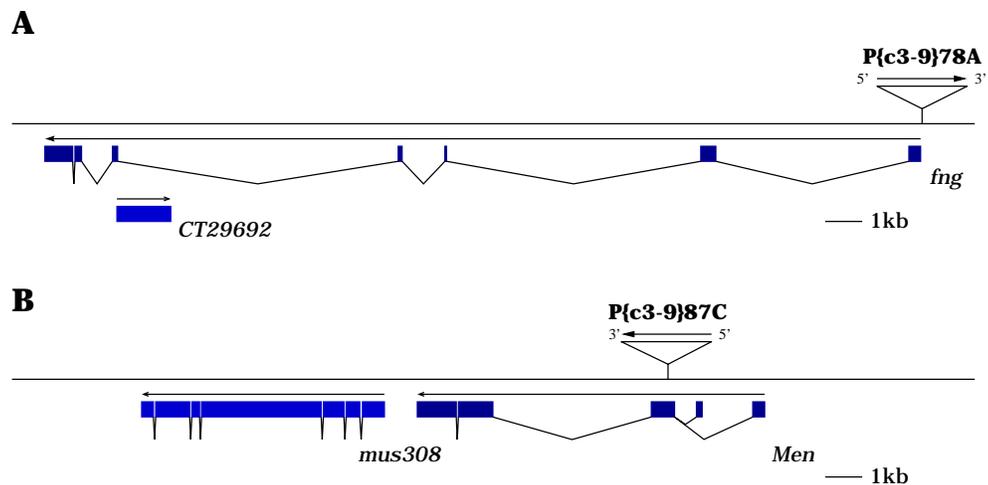


Abbildung 3.19: Molekulare Karte der Insertionsstellen von P{c3-9}78A und P{c3-9}87C. Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der entsprechenden Gene bzw. die Orientierung der P-Elemente (5'→3') an. *Su(var)3-9* ist in den P-Elementen ebenfalls 5'→3' orientiert. Die Größe der P-Elemente ist nicht maßstabsgerecht. (*Men* - Malatdehydrogenase, *fng* - fringe, *mus308* - mutagen-sensitive 308, *CT29692* - EST aus Genomprojekt).

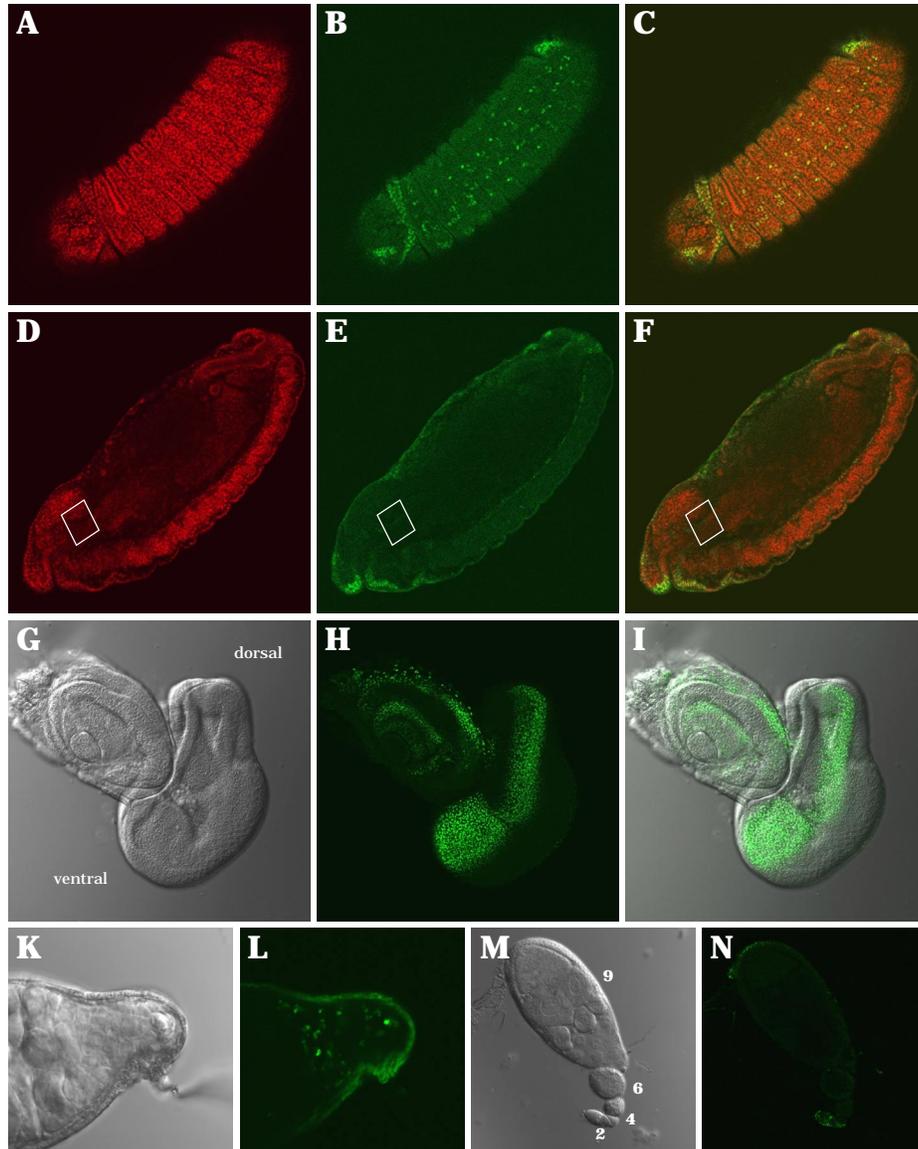


Abbildung 3.20: Expression von SU(VAR)3-9-EGFP in der P{c3-9}78A-Linie. (A-F) Antikörperfärbung eines Stadium-13-Embryos. Zwei Konfokale Sektionen. Die Position der Vorläuferzellen der Augen-Antenne-Imaginalscheibe ist als weißer Kasten markiert. (A,D) DNA-Färbung mit Propidiumiodid. (B,E) GFP-Antikörperfärbung (FITC). (C,F) Überlagerung. (G-I) Augen-Antenne-Imaginalscheibe. (G) DIC-Aufnahme, (H) EGFP-Fluoreszenz, (I) Überlagerung. (K-L) "nurse-like cells" in einem männlichen Hoden (K) DIC-Aufnahme, (L) EGFP-Fluoreszenz. (M-N) Oogenesestadien (Zahlen) von P{c3-9}78A-Weibchen, (M) DIC-Aufnahme, (N) EGFP-Fluoreszenz.

3.8.2 Molekulare Analyse der *Su(var)3-9*-Mutanten

Die Referenz für die Analyse der *Su(var)3-9*-Mutanten ist die Sequenz des 11.5 kb *SaII*-Fragmentes (Genbank: AJ290956), welches aus einer genomischen Bibliothek des Karsnäs-Stammes von *Drosophila melanogaster* stammt (Tschiersch et al., 1994). Entsprechend der unterschiedlichen Isolationsstämme der *Su(var)3-9*-Mutanten wurden gegenüber dieser Referenzsequenz Polymorphismen im dritten Exon gefunden (Tab. 3.2). Vier Variationen führen zum Austausch von Aminosäuren, wobei I176M und I381V keine wesentlichen Veränderungen der Proteinstruktur zur Folge haben sollten. Weiterhin sind die Positionen T275 und R493 offenbar nicht konserviert, denn hier wurden in verschiedenen Wildtyp-Stämmen von *Drosophila melanogaster* die Austausche T275I (leicht saure As → neutrale As) und R493Q (stark basische As → neutrale As) identifiziert.

Variation	molekulare Veränderung		
	Basen	Triplett	Aminosäure
1	5116-5118	ATA→ATG	I 176 M
2	5152-5154	CGG→CGA	R 188 R
3	5413-5415	ACA→ATA	T 275 I
4	5443-5445	GAA→GAG	E 285 E
5	5731-5733	ATT→GTT	I 381 V
6	5905-5907	GAG→GAA	E 439 E
7	6067-6069	CGA→CAA	R 493 Q
8	6070-6072	GCC→GCA	A 494 A
9	6304-6306	TGT→TGC	C 572 C
10	6415-6417	GAT→GAC	D 609 D
11	6430-6432	AAC→AAT	N 614 N

Tabelle 3.2: Variationen (Polymorphismen) im kodierenden Bereich des dritten Exons von *Su(var)3-9*. Die Angabe der Basenpaare bezieht sich auf die Position im genomischen 11.5 kb *Su(var)3-9*-Fragment (Genbank Acc-nr.: AJ290956); Nucleotid- bzw. Aminosäureaustausche sind fett gedruckt.

Die Identifizierung des Insertionsortes in der Mutante *Su(var)3-9⁰⁶* (Krauss, 1995) erlaubte die molekulare Analyse von *Su(var)3-9*-Mutanten, die aufgrund von "second site"-Letalmutationen nicht homozygot lebensfähig sind. Von transheterozygoten *Su(var)3-9⁰⁶/Su(var)3-9^x* Tieren konnte mit spezifischen Primerpaaren selektiv das *Su(var)3-9^x*-Allel sequenziert werden (siehe auch Material und Methoden, Abb. 2.3). Damit wurden zunächst Allele untersucht, die aus Mutationsexperimenten stammen, bei denen Suppressoren für *E(var)2-1⁰¹* bzw. *E(var)3-*

l^{01} isoliert wurden und durch Komplementationsanalyse als *Su(var)3-9*-Allele identifiziert werden konnten (Reuter et al., 1986; Wustmann, 1988; Tschiersch et al., 1994). Ein weiteres Allel (*Su(var)3-9³³*) wurde als spontane Suppressor-mutation in einem TM2-Balancerchromosom gefunden und aufgrund der spezifischen Mutantenrettung mit P{c3-9}r als *Su(var)3-9*-Allel klassifiziert.

In den meisten der untersuchten Allele wurden Basenpaaraustausche identifiziert, die in Aminosäureaustauschen resultieren (Tab. 3.3). Bei dem spontanen Allel *Su(var)3-9³³* ist eine Base am Beginn des *Su(var)3-9* spezifischen Exons deletiert, die zu einem sehr frühen Frameshift führt. Das resultierende Protein sollte praktisch nur die mit *eIF2 γ* gemeinsamen Aminosäuren enthalten und damit eine *Su(var)3-9* Null-Mutante darstellen. Für das Allel *Su(var)3-9¹¹* wurde aufgrund von Restriktionslängenpolymorphismen gegenüber *Su(var)3-9⁰⁵* und *Su(var)3-9¹⁵* eine Deletion im dritten Exon vermutet (Tschiersch, 1993). Dies konnte durch die Sequenzanalyse nicht bestätigt werden. Da *Su(var)3-9¹¹* aus einem anderen Wildtypstamm isoliert wurde, als die Vergleichsstämme (vgl. Polymorphismen Tab. 3.3), sind hier Restriktionslängenpolymorphismen nur begrenzt aussagefähig.

Des Weiteren erfolgte die Auswertung der Mutanten im P{c3-9}r-Transgen und endogenen Locus aus den Experimenten EMS-I und EMS-II. Die Mutanten im endogenen Locus wurden entweder als homozygote *Su(var)3-9^x/Su(var)3-9^x* oder transheterozygote *Su(var)3-9⁰⁶/Su(var)3-9^x* Tiere analysiert. In allen Mutanten, für die aufgrund der spezifischen Mutantenrettung durch P{c3-9}r eine Mutation im endogenen Locus vermutet wurde, konnten tatsächlich Basenpaaraustausche gefunden werden, die Aminosäureaustausche oder Nonsense-Mutationen ergeben (Tab. 3.4). Da die Experimente EMS-I und EMS-II einmal mit Chromosomen eines *ry⁵⁰⁶/ry⁵⁰⁶* Stammes (EMS-I) und eines Oregon R-Wildtypstammes (EMS-II) durchgeführt wurden, gibt es zwei Klassen von Polymorphismen im dritten Exon. Die Polymorphismen des Transgens stimmen hier mit denen des Oregon R-Stammes überein, der offenbar als Isolationsstamm für die cDNA diente.

Die putativen Transgen-Mutanten aus dem EMS-I Experiment wurden vor der Sequenzierung näher genetisch charakterisiert. Da diese Allele auf den Verlust des Triplo-Enhancereffekts isoliert wurden, können auch vom Transgen unabhängige Mutationsorte als Ursache in Betracht gezogen werden. Deshalb erfolgte zunächst eine Kreuzung mit *Su(var)3-9⁰⁶*-Mutanten, bei denen ein intaktes Transgen die spezifische Mutantenrettung zeigen sollte. Von den 31 putativen Allelen zeigten 11 keine, 9 eine partielle und 11 eine vollständige Mutantenrettung im ventralen Bereich des Auges. Die Kenntnis des Integrationsortes von P{c3-9}78A ermöglichte die spezifische Amplifizierung und Sequenzierung dieses

Allel	Mutagen	Selektion	Variationen	Bereich Basen	Triplet	molekulare Aminosäure(n)	Veränderung
01	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	n. getestet	5027-5028	GG → GGG	Frameshift R146	RAKHQSDLTESKQ*
02	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2, 7, 8	5869-5871	TGT → TAT	C 427	Y
03	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2	5995-5997	CGT → TGT	R 469	C
04	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2	6115-6117	GGA → GAA	G 509	E
05	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2	6115-6117	GGA → GAA	G 509	E
06	X-Ray	E(var)3-1 ⁰¹	n. getestet	5094-5103		Insertionsverdopplung; Insert ca. 6kb	
07	X-Ray	E(var)3-1 ⁰¹	2, 7, 8	5869-5871	TGT → TAT	C 427	Y
08	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2	6409-6411	AAC → TAC	N 607	Y
09	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2	6103-6105	TGC → TAC	C 505	Y
10	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2	6391-6393	GAC → AAC	D 601	N
11	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2, 5, 9, 10, 11	5446-5449	AAG → TAG	K 286	STOP
12	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	2, 5, 9, 10, 11	6064-6066	GTG → GAG	V 492	G
13	EMS	E(var)3-1 ⁰¹	n. getestet	6300-6303	TCT → TTT	S 571	P
14	P-Element	E(var)3-1 ⁰¹	n. getestet	6357-6366		Insertionsverdopplung P-Element	
15	X-Ray	E(var)2-1 ⁰¹	n. getestet	6235-6246	Deletion	Δ549	AANY 552
16	X-Ray	E(var)2-1 ⁰¹	n. getestet	5085-5097	Deletion	Frameshift V 165	VNMMWTKYPVSTDSPN*
17	X-Ray	E(var)2-1 ⁰¹	n. getestet	4868-4875	Deletion	Frameshift T 93	TAATAV*
18	X-Ray	E(var)2-1 ⁰¹	n. getestet			Stamm verloren	
19	X-Ray	E(var)2-1 ⁰¹	n. getestet	5169-5170	GG → T	identisch wie Su(var)3-9[15]	
20	X-Ray	E(var)2-1 ⁰¹	n. getestet	4843-4845	GAA → GA	Frameshift V 193	VAPQLPTPSGRKITWE*
33	spontan		2			Frameshift E 85	EKKSIF*

Tabelle 3.3: Mutanten im endogenen Su(var)3-9-Locus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Allele 2-5, 7-12 und 33 molekular analysiert. Die Isolation der Allele ist in den folgenden Referenzen beschrieben: 1-13 Reuter et al. (1986), 14 Wustmann (1988), 15-20 Tschiersch (1993). Angabe der Basenpaare bezüglich des 11.5 kb Sall-Fragmentes (Genbank: AJ290956).

Inserts. Von den 11 Mutanten, die keine Mutantenrettung zeigten, war in 9 Fällen das Insert nicht amplifizierbar, was entweder durch Ausbau oder Umbau des P-Elements erklärbar ist. Die Sequenzanalyse wurde deshalb auf die restlichen 2 Mutanten mit fehlender, und die 9 Mutanten mit partieller Mutantenrettung konzentriert. In 6 dieser Allele konnten wiederum Basenpaaraustausche gefunden werden, die ausschließlich in Aminosäureaustauschen resultieren (Tab. 3.4).

Allel	Experiment	Variationen	Bereich Basen	molekulare Triplet	Veränderung Aminosäure
<i>Su(var)3-9²¹</i>	EMS-I	2, 3	5953-5955	GAG → GTG	E 455 V
<i>Su(var)3-9²²</i>	EMS-I	2, 3	6490-6493	CTC → TTC	L 634 F
<i>Su(var)3-9²³</i>	EMS-I	2, 3	6064-6066	GTG → GAG	V 492 G
<i>Su(var)3-9²⁴</i>	EMS-I	2, 3	6307-6309	TGG → TGA	W 573 STOP
<i>Su(var)3-9²⁵</i>	EMS-I	2, 3	6421-6423	CCC → CTC	P 611 L
<i>Su(var)3-9²⁶</i>	EMS-I	2, 3	6016-6018	CAG → TAG	Q 476 STOP
<i>Su(var)3-9²⁷</i>	EMS-II	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	6061-6063	GGG → AGG	G 491 R
<i>Su(var)3-9²⁸</i>	EMS-II	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	6307-6309	TGG → TAG	W 573 STOP
<i>Su(var)3-9²⁹</i>	EMS-II	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	5503-5505	TAT → TAA	Y 305 STOP
<i>Su(var)3-9³⁰</i>	EMS-II	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	5899-5901	GCC → ACC	A 437 T
<i>Su(var)3-9³¹</i>	EMS-II	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	5953-5955	GAG → AAG	E 455 K
<i>Su(var)3-9³²</i>	EMS-II	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	6274-6276	TCT → TTT	S 562 F
<i>P{c3-9}78A¹</i>	EMS-I	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	5593-5595	GGA → GAA	G 335 E
<i>P{c3-9}78A⁹</i>	EMS-I	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	5968-5970	TGC → TAC	C 460 Y
<i>P{c3-9}78A²⁴</i>	EMS-I	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	6358-6360	CGT → TGT	R 590 Q
<i>P{c3-9}78A²⁸</i>	EMS-I	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	6013-6015	CGC → TGC	R 475 C
<i>P{c3-9}78A⁴⁸</i>	EMS-I	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	6055-6057	GGA → GAA	G 489 E
<i>P{c3-9}78A⁵⁵</i>	EMS-I	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10	5986-5988	TGC → TAC	C 466 Y

Tabelle 3.4: Allele von *Su(var)3-9*, die innerhalb der Mutationsexperimente EMS-I und EMS-II isoliert und sequenziert wurden. *Su(var)3-9²¹⁻³²* sind Mutanten im endogenen Locus, *P{c3-9}78A¹⁻⁵⁵* sind Mutanten im *P{c3-9}78A*-Transgen.

Die innerhalb der EMS-Experimente entstandenen Basenpaaraustausche sind zum größten Teil Transitionen (G→A: 12 Allele, C→T: 8 Allele). Transversionen wurden ausschließlich von A→T (3 Allele) bzw. T→A (3 Allele) gefunden. Die EMS-Mutagenese sollte durch Alkylierung von Guanin zum größten Teil zu G→A, etwas weniger durch Alkylierung von Thymin zu A→G Austauschen führen. Der letztgenannte Austausch wurde in keiner Mutante beobachtet. Im Unterschied zu EMS, welches ausschließlich zu Basenpaaraustauschen führt, wurden durch die Röntgenstrahl-Mutagenese vorwiegend kleinere Deletionen erzeugt. Eine Ausnahme ist *Su(var)3-9⁰⁶*, bei der eine große, bisher nicht näher spezifizierte Insertion entstand.

Ein Alignment von SU(VAR)3-9 mit den orthologen Proteinen SUV39H1, Clr4p und DIM5 zeigt, daß die meisten Punktmutanten, die Aminosäureaustausche be-

wirken, in hochkonservierten Bereichen der SET-Domäne oder der preSET- bzw. postSET-Domäne liegen (Abb. 3.21). Die Konservierung des “GWGV” -Motivs (As 489-492) scheint besonders essentiell für die Funktion der SET-Domäne zu sein, da hier insgesamt 4 unabhängige Mutanten gefunden wurden ($Su(var)3-9^{27}$, $Su(var)3-9^{12}$, $Su(var)3-9^{23}$ und $P\{c3-9\}78A^{48}$). Weitere Mutanten liegen in konservierten Cysteinpositionen der preSET-Domäne ($P\{c3-9\}78A^9$ und $P\{c3-9\}78A^{55}$) und dem für die Methyltransferaseaktivität wichtigen “NHSC”-Motiv (As 560-563) der SET-Domäne ($Su(var)3-9^{32}$). Mehrere Mutanten weisen Aminosäureaustausche auch in wenig konservierten Bereichen, wie der Linker-Region zwischen SET- und postSET-Domäne ($Su(var)3-9^{08}$, $Su(var)3-9^{25}$) auf.

Zur funktionellen Analyse wurden alle Mutanten mit einer Linie gekreuzt, die das 11.5 kb *Sall*-Fragment des endogenen Locus von $Su(var)3-9$ enthält. Transheterozygote $Su(var)3-9^x/P\{Su(var)3-9\}$ Tiere wurden bezüglich der Rettung des Suppressoreffekts untersucht. Alle Mutanten konnten durch das 11.5 kb *Sall*-Fragment gerettet werden, es wurden nur leichte Unterschiede in der Stärke der Mutantenrettung gefunden. Kein Allel zeigt einen typisch antimorphen Charakter.

Zur weiteren Charakterisierung von bestätigten Transgen-Mutanten wurden $P\{c3-9\}78A^{24}$, $P\{c3-9\}78A^{28}$ und $P\{c3-9\}78A^{48}$ durch Rekombination von $P\{c3-9\}87C$ getrennt. Eine Kreuzung der Rekombinanten mit $Su(var)3-9^{06}$ zeigte, daß bei $P\{c3-9\}78A^{24}$ noch in 14% aller transheterozygoten Weibchen und 25% der Männchen eine wenigstens partielle Rettung des Suppressoreffekts im ventralen Bereich des Auges auftritt (Tab. 3.5). Hingegen zeigten $P\{c3-9\}78A^{28}$ und $P\{c3-9\}78A^{48}$ praktisch keine Rettung des Suppressors (Tab. 3.5).

Da die zentrale Funktion von SU(VAR)3-9 die H3-K9-Methylierung ist, wurden die Transgenmutanten auf ihre Methyltransferaseaktivität getestet. Alle Mutanten zeigen gegenüber der Kontrolle (SU(VAR)3-9-EGFP) eine Reduktion der Aktivität (Abb. 3.22A). $P\{c3-9\}78A^{48}$ ist sogar völlig inaktiv. Bei $P\{c3-9\}78A^{24}$ wurde noch eine Restaktivität registriert, die möglicherweise ausreichend für die Etablierung der partiellen Mutantenrettung ist. Dieses Experiment wurde mehrfach mit unabhängigen Extrakten durchgeführt, wobei immer das gleiche Verhältnis der HMTase-Aktivitäten der Mutantenproteine gefunden wurde.

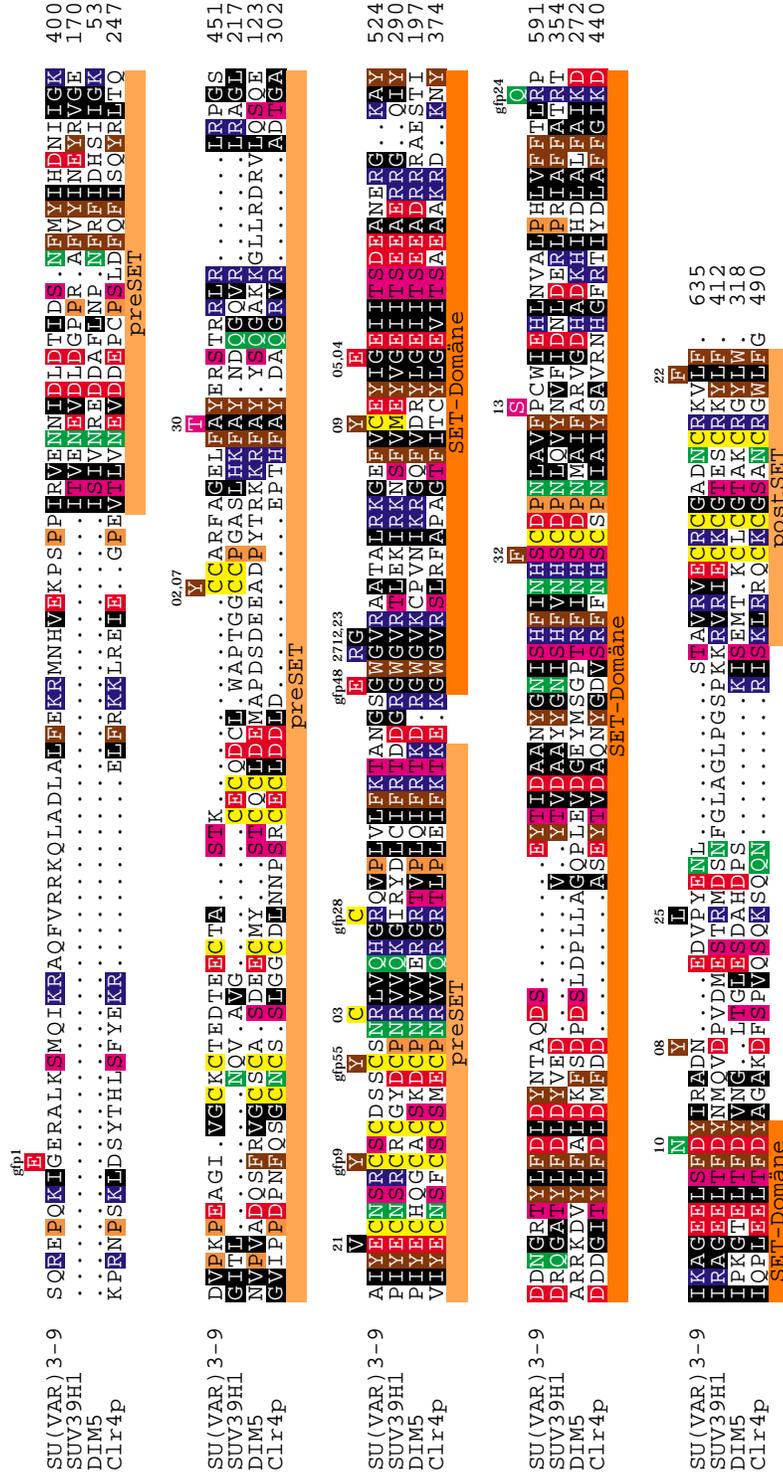


Abbildung 3.21: Alignment von SU(VAR)3-9 mit seinen Homologen Clr4p, SUV39H1 und DIM5. Die infolge von Punktmutationen in Su(var)3-9 resultierenden Aminosäureaustausche sind in der oberen Zeile eingezeichnet. Mutanten im endogenen Locus sind als Zahl, Mutanten im P{c3-9}-Transgen mit vorgestelltem "gfp" gekennzeichnet. Die Aminosäuren sind nach chemischen Eigenschaften farbkodiert: ■ sauer, ■ aliphatisch, ■ Amid, ■ aromatisch, ■ basisch, ■ hydroxyl, ■ Imino, ■ Schwefel.

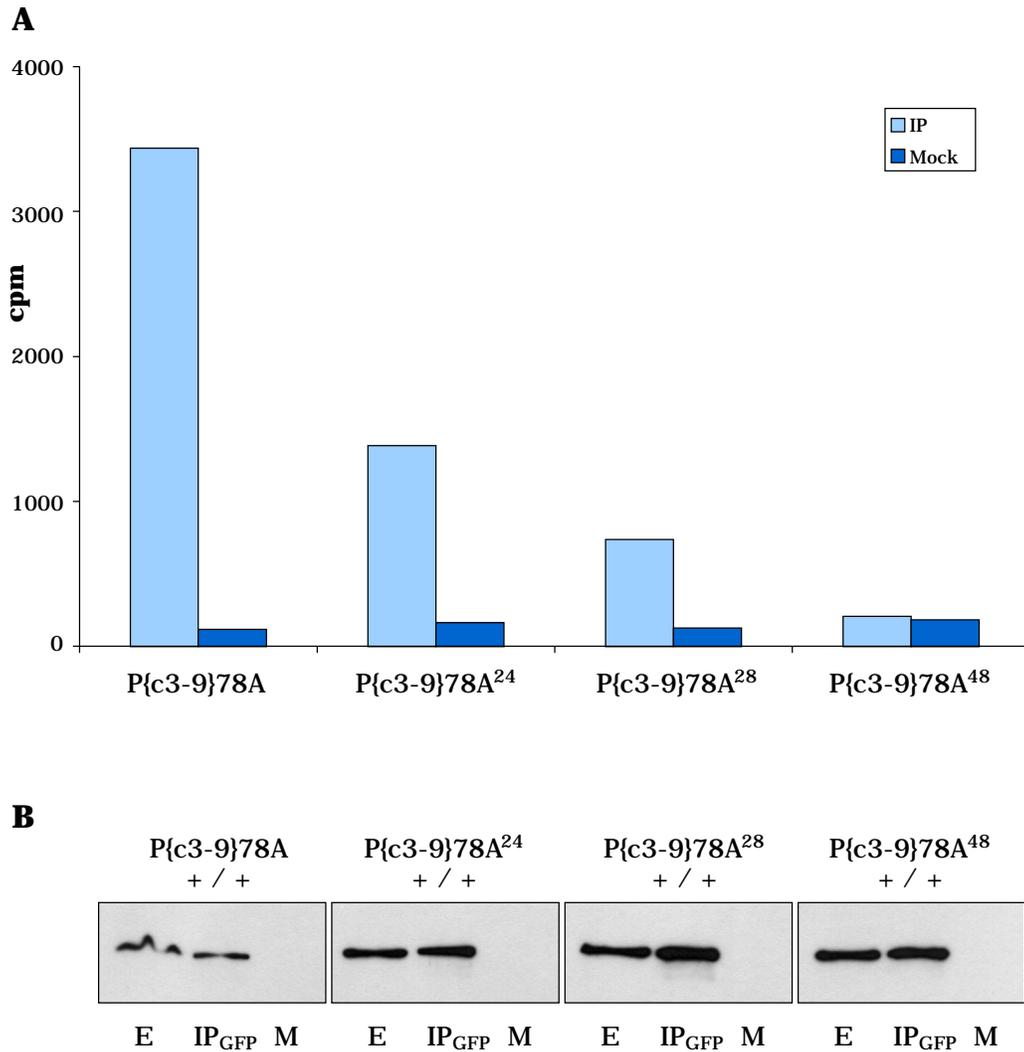


Abbildung 3.22: Methyltransferaseassay von EGFP-markierten SU(VAR)3-9-Mutantenproteinen. **(A)** Kernextrakte von Embryonen der Linien *P{c3-9}78A*, *P{c3-9}78A²⁴*, *P{c3-9}78A²⁸* und *P{c3-9}78A⁴⁸* wurden analysiert. Der Methyltransferaseassay wurde an Präzipitaten mit GFP-Antikörper (IP) und ohne Antikörper (Mock) durchgeführt. **(B)** Westernblots mit jeweils 10 µg der verwendeten Kernextrakte (E), 10 µl der Immunpräzipitate (IP) und 10 µl der Präzipitate ohne Antikörper (M) wurden mit GFP-Antikörper markiert.

Mutante	Mutantenrettung in transheterozygoten					
	Weibchen			Männchen		
	komplett	partiell	keine	komplett	partiell	keine
P{c3-9}78A	34% (44)	63% (80)	3% (4)	64% (113)	36% (64)	0% (0)
P{c3-9}78A ²⁴	3% (8)	11% (25)	86% (203)	7% (18)	18% (49)	75% (201)
P{c3-9}78A ²⁸	0 % (0)	0% (0)	100% (192)	0% (0)	3% (4)	97% (154)
P{c3-9}78A ⁴⁸	0% (0)	1% (1)	99% (123)	0% (0)	5% (7)	95% (131)

Tabelle 3.5: Mutantenrettung durch Transgen-Mutanten. Die transheterozygoten Nachkommen einer Kreuzung von $Su(var)3-9^{I7}/Su(var)3-9^{I7} \times P\{c3-9\}78A^x/TM3$ wurden bezüglich der Rettung des Suppressoreffekts von $Su(var)3-9$ in der ventralen Augenhälfte analysiert. Die Tiere zeigten entweder eine komplette, partielle oder keine Rettung des Suppressoreffekts (prozentuale Angaben, die Zahl der ausgewerteten Augen steht in Klammern).

4 Diskussion

Gen-Silencing durch Heterochromatisierung ist ein entscheidender Kontrollprozeß für Genaktivitäten in der Entwicklung eukaryotischer Organismen. In *Drosophila melanogaster* wurde mit der Positionseffekt-Variegation des *white*-Gens ein Modellsystem etabliert, welches die Identifizierung von Komponenten erlaubt, die am Aufbau oder dem Erhalt heterochromatischer Strukturen beteiligt sind. Im Verlauf der letzten 20 Jahre wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, die Funktionen im heterochromatischen Gen-Silencing ausüben (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1983; Reuter und Szidonya, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde einer der stärksten Suppressoren für PEV, das *Su(var)3-9*-Gen, bezüglich seiner Funktion am Aufbau heterochromatischer Strukturen und seiner genetischen und molekularen Interaktionen näher untersucht.

4.1 Heterochromatisches Gen-Silencing bei PEV wird durch *Su(var)3-9*-abhängige H3-K9-Methylierung kontrolliert

Die N-Termini der Histone sind einer Vielzahl von Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung und ADP-Ribosylierung unterworfen (Berger, 2002). Die Acetylierung ist dabei am besten erforscht und wird als eine epigenetische Markierung für den Status der transkriptionellen Aktivität gesehen (Turner, 1998). Die Möglichkeit durch Kombination verschiedener Modifikationsstufen der N-Termini Markierungen für "Feinabstimmungen" der transkriptionellen Aktivität bzw. des Chromatinzustandes verfügbar zu haben, führte zur "Histon-Code"-Hypothese (Strahl und Allis, 2000). Mit der Entdeckung der H3-K9-Methyltransferaseaktivität von SUV39H1 (Rea et al., 2000) wurde diese Hypothese auch mit der Kontrolle heterochromatischer Regionen in Verbindung gebracht (Jenuwein und Allis, 2001).

Die Lysin-Methylierung kann mehrere Positionen des N-Terminus von Histon H3 (K4, K9, K27, K36) bzw. Histon H4 (K20) betreffen. Nicht alle dieser Modifikationen markieren jedoch, wie H3-K9, heterochromatische oder transkriptionell inaktive Chromatinbereiche. Die K4-Methylierung hat duale Funktionen, die wahrscheinlich abhängig von der Kombination mit anderen Modifikationen sind. SET9, eine H3-K4-Methyltransferase, führt zur transkriptionellen Aktivierung durch Verhindern der H3-K9-Deacetylierung und damit Ausschließen der H3-K9-Methylierung durch SUV39H1 (Nishioka et al., 2002). Andererseits ist SET1 ebenfalls eine H3-K4-Methyltransferase, die für Telomer-Silencing in *Saccharomyces cerevisiae* essentiell ist (Briggs et al., 2001). Weiterhin ist die H3-K36-Modifikation durch SET2 in *Saccharomyces cerevisiae* an Gen-Repressionsprozessen beteiligt (Strahl et al., 2002). Neben SUV39H1 (Rea et al., 2000) wurden Suv39h2 (O'Carroll et al., 2000) in der Maus, Clr4p (Nakayama et al., 2001) in *Schizosaccharomyces pombe* und DIM5 (Tamaru und Selker, 2001) in *Neurospora crassa* als weitere H3-K9-Methyltransferasen identifiziert, die alle in Gen-Silencingprozesse involviert sind. Mit transkriptioneller Aktivierung ist die dagegen die Methylierung verschiedener Arginin-Reste von H3 (R2, R17, R26) und H4 (R3) verknüpft, die durch PRMT1 (Strahl et al., 2001; Wang et al., 2001) und PRMT4/CARM1 (Chen et al., 1999) erfolgen kann.

Durch den Nachweis der *in vitro*-Methyltransferaseaktivität von SU(VAR)3-9-EGFP und rekombinantem SU(VAR)3-9-GST (Schotta et al., 2002) und der starken Reduktion von dimethyl-H3-K9 in *Su(var)3-9* Null-Mutanten konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß SU(VAR)3-9 die wesentliche H3-K9-Methyltransferase in *Drosophila melanogaster* ist. In polytänsierten Speicheldrüsenchromosomen ist SU(VAR)3-9 vorwiegend im perizentrischen Heterochromatin und im stark heterochromatischen vierten Chromosom lokalisiert. Die Verteilung von methyliertem H3-K9 in Speicheldrüsenchromosomen stimmt hier mit der SU(VAR)3-9 Verteilung überein, in *Su(var)3-9* Null-Mutanten ist die H3-K9-Methylierung des Heterochromatins stark reduziert. Ausgenommen ist die H3-K9-Methylierung des vierten Chromosoms und einiger zentraler Bereiche des Chromozentrums, die nicht beeinflusst sind (Schotta et al., 2002). Die Korrelation einer Reduktion von methyliertem H3-K9 und dem Suppressoreffekt auf PEV zeigt, daß die H3-K9-Methyltransferaseaktivität von SU(VAR)3-9 für den Aufbau heterochromatischen Gen-Silencings verantwortlich ist.

Die *Su(var)3-9*-unabhängige H3-K9-Methylierung des vierten Chromosoms beweist die Existenz weiterer H3-K9-Methyltransferasen in *Drosophila melanogaster*, die insbesondere die Heterochromatinstruktur dieses Chromosoms bestimmen sollten. Proteine wie POF (Birve et al., 2001), die ausschließlich im vier-

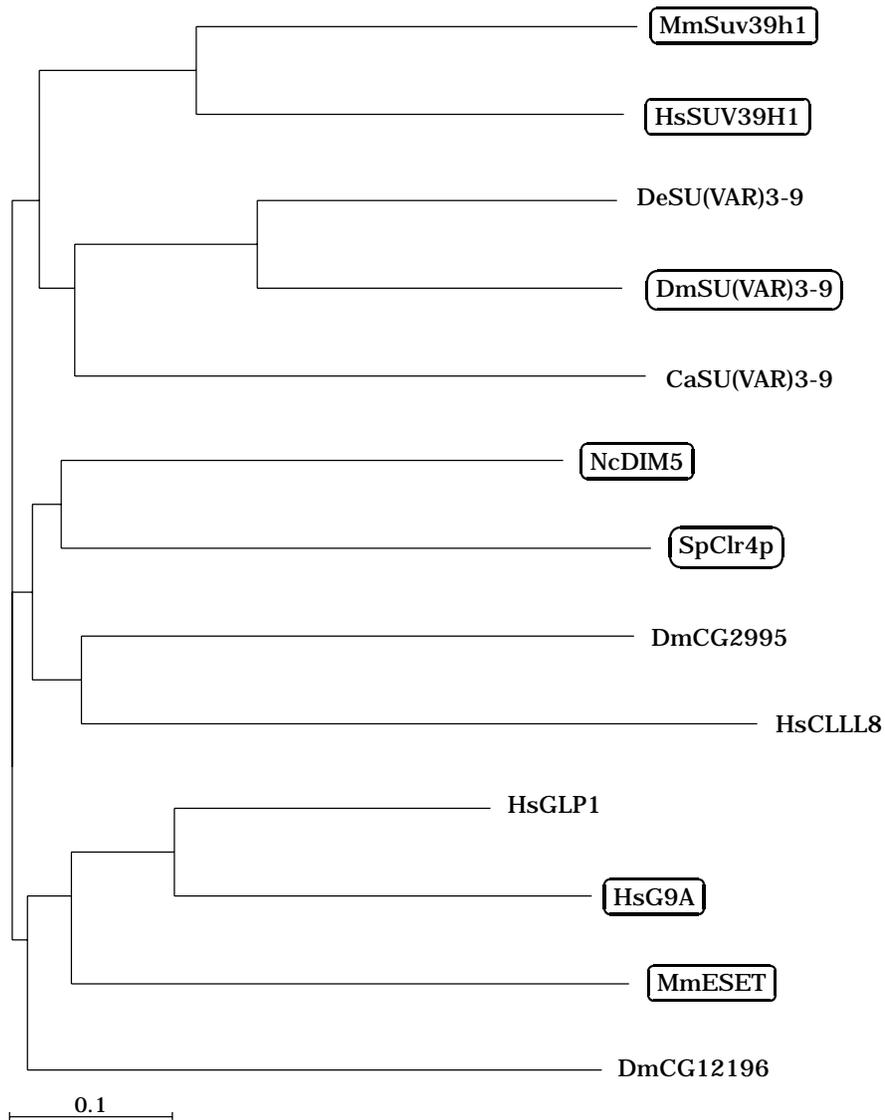


Abbildung 4.1: Dendrogramm bezüglich der preSET- und SET-Domäne verschiedener H3-K9-HMTasen und homologer Proteine aus verschiedenen Organismengruppen. Proteine, bei denen eine HMTase-Aktivität gezeigt werden konnte, sind eingerahmt. Für MmESET und HsG9A wurde eine duale Aktivität für H3-K4 und H3-K9 bzw. H3-K9 und H3-K27 gezeigt. CG2995 und CG12196 sind neben SU(VAR)3-9 die einzigen Proteine in *Drosophila melanogaster*, die sich in diese Gruppe der H3-K9-HMTasen einordnen lassen. Hs - *Homo sapiens*, Mm - *Mus musculus*, Dm - *Drosophila melanogaster*, De - *Drosophila erecta*, Ca - *Clytus arietis*, Nc - *Neurospora crassa*, Sp - *Schizosaccharomyces pombe*.

ten Chromosom binden, zeigen, daß hier eine spezielle Chromatinstruktur bestehen sollte. Tatsächlich konnte die Existenz weiterer Methyltransferasen in *Drosophila melanogaster* durch die Isolation mehrerer Proteinkomplexe, die nicht SU(VAR)3-9 enthalten, aber H3-K9-Methyltransferaseaktivität aufweisen (A. Imhof, pers. Mitteilung), bestätigt werden. Vergleiche mit der Genomsequenz von *Drosophila melanogaster* zeigen zwei putative Proteine, die eine ähnliche SET-Domäne, wie andere H3-K9-HMTasen aufweisen (Abb. 4.1). Auch in der Maus sind Suv39h1/Suv39h2 nicht die einzigen H3-K9-Methyltransferasen, denn in Doppel-Null-Mutanten wird eine Suv39h-unabhängige H3-K9-Methylierung des inaktiven X-Chromosoms (Peters et al., 2002) und von Teilen mitotischer Chromosomen gefunden (Peters et al., 2001). Neben Suv39h1/Suv39h2 existieren in der Maus mit ESET (Yang et al., 2002) und G9a (Tachibana et al., 2001) wenigstens zwei weitere SET-Domänen Proteine mit H3-K9-Methyltransferaseaktivität.

Die Suv39h-abhängige H3-K9-Methylierung ist in der Maus für die korrekte Entwicklung und Gewebedifferenzierung notwendig, denn Doppel-Null-Mutanten für Suv39h1/Suv39h2 zeigen Segregationsdefekte bei der Zellteilung, verminderte Lebensfähigkeit und die Ausbildung von B-Zell-Lymphomas (Peters et al., 2001). In *Drosophila melanogaster* sind Mutanten für *Su(var)3-9* homozygot lebensfähig, zeigen aber ebenfalls eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte embryonale Letalität, die mit einer veränderten Kernmorphologie verknüpft ist (Ebert, persönliche Mitteilung). Weitere Untersuchungen dieses Phänotyps bezüglich Kondensations- oder Segregationsdefekten und die Untersuchung weiterer H3-K9-Methyltransferasen, die eventuell redundante Funktionen ausüben können, werden tiefere Einblicke in die Funktion der H3-K9-Methylierung beim Erhalt der Genomstabilität liefern.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Methylierung von H3-K9 ist die Deacetylierung von H3-K9, denn auf Peptide, die an dieser Position eine Acetylgruppe tragen, kann keine Methylierung durch SUV39H1 erfolgen (Rea et al., 2000). Tatsächlich konnte mit HDAC1 in SU(VAR)3-9-Komplexen eine Histondeacetylase nachgewiesen werden (Czermin et al., 2001). Punktmutanten in HDAC1 zeigen einen starken Suppressoreffekt auf *In(1)w^{m4}*, der im Fall von *HDAC³²⁶* epistatisch über den Triplo-Enhancereffekt einer zusätzlichen *Su(var)3-9* Kopie ist. Die Aminosäureaustausche dieser Mutanten liegen in den Bereichen, die die "Tasche" für die Substratbindung bilden (Finnin et al., 1999) und verändern die Proteinstruktur von HDAC1 möglicherweise nur wenig. Der Einbau in SU(VAR)3-9-Komplexe sollte mit einem dominant negativen Effekt durch fehlerhafte oder ausbleibende Deacetylierung und damit Hemmung der Methylierung durch SU(VAR)3-9 verknüpft sein. Da die Suppression des Triplo-Enhancereffekts durch die beiden

Allele *HDAC*³⁰³ und *HDAC*³¹³ schwächer ist, als durch *HDAC*³²⁶, kann vermutet werden, daß diese Mutanten eine größere Restaktivität aufweisen. Die Beteiligung von Deacetylasen ist auch wesentlich für die Silencing-Funktion von Clr4p, denn *clr3*-Mutanten supprimieren das Clr4p-abhängige Silencing in *Schizosaccharomyces pombe* (Nakayama et al., 2001). Eine generelle Notwendigkeit der Deacetylierung für die Integrität perizentrischen Heterochromatins wurde des weiteren durch TSA-Behandlung von Maus-Zellen gezeigt, die zu einer Delokalisierung von HP1 und Mitosedefekten führt (Taddei et al., 2001).

Interessant ist eine insertionelle *HDAC1*-Mutante (Rubertis et al., 1996), die keine Expression in Augen-Imaginalscheiben zeigt, einen starken Enhancereffekt auf *In(1)w^{m4}* aufweist und damit ein verstärktes Silencing ermöglicht. Dieser Effekt könnte damit erklärt werden, daß bei Fehlen von HDAC1 eine andere Deacetylase in den SU(VAR)3-9 Komplex eingebaut wird. Diese könnte entweder eine höhere Effizienz bei der Deacetylierung aufweisen oder unempfindlich für eine negative Regulierung durch vorhandene Komponenten im Komplex sein und zu einer effizienteren Deacetylierung und nachfolgenden Methylierung durch SU(VAR)3-9 führen. Die gezeigte Interaktion des N-Terminus von Suv39H1 mit einem Deacetylase-Kernkomplex in Maus-Zellen, der neben HDAC1 auch HDAC2 enthält (Vaute et al., 2002) legt die Möglichkeit nahe, daß auch in *Drosophila melanogaster* neben HDAC1 andere Deacetylasen mit SU(VAR)3-9 interagieren können bzw. im SU(VAR)3-9 Silencing-Komplex eingebaut sind.

Um den Einfluß der Deacetylierung auf die Etablierung von Gen-Silencing weitergehend abzuschätzen, wäre es wichtig, die Substratspezifität von HDAC1 und den eventuell noch beteiligten Deacetylasen zu untersuchen. Bei *Schizosaccharomyces pombe* wurden die Klasse-I Deacetylasen Clr6p und Hda1, sowie die Klasse-II Deacetylase Clr3p identifiziert, die im Clr4p-abhängigen Gen-Silencing involviert sind (Nakayama et al., 2001). Clr3p zeigt eine spezifische Aktivität für K14, während die anderen beiden Proteine eine eher breite *in vivo*-Aktivität aufweisen (Bjerling et al., 2002). In *Drosophila* könnte demnach ebenfalls die K9-Deacetylierung von der Klasse-I Deacetylase HDAC1 und die K14-Deacetylierung durch eine andere Deacetylase erfolgen.

4.2 *SU(VAR)3-9* ist eine limitierende Komponente für Gen-Silencing bei Positioneffekt-Variegation

HP1 ist ein zentrales Linker-Modul für heterochromatische Proteinkomplexe (Eisenberg und Elgin, 2000). Es wurde eine Vielzahl von Interaktionspartnern

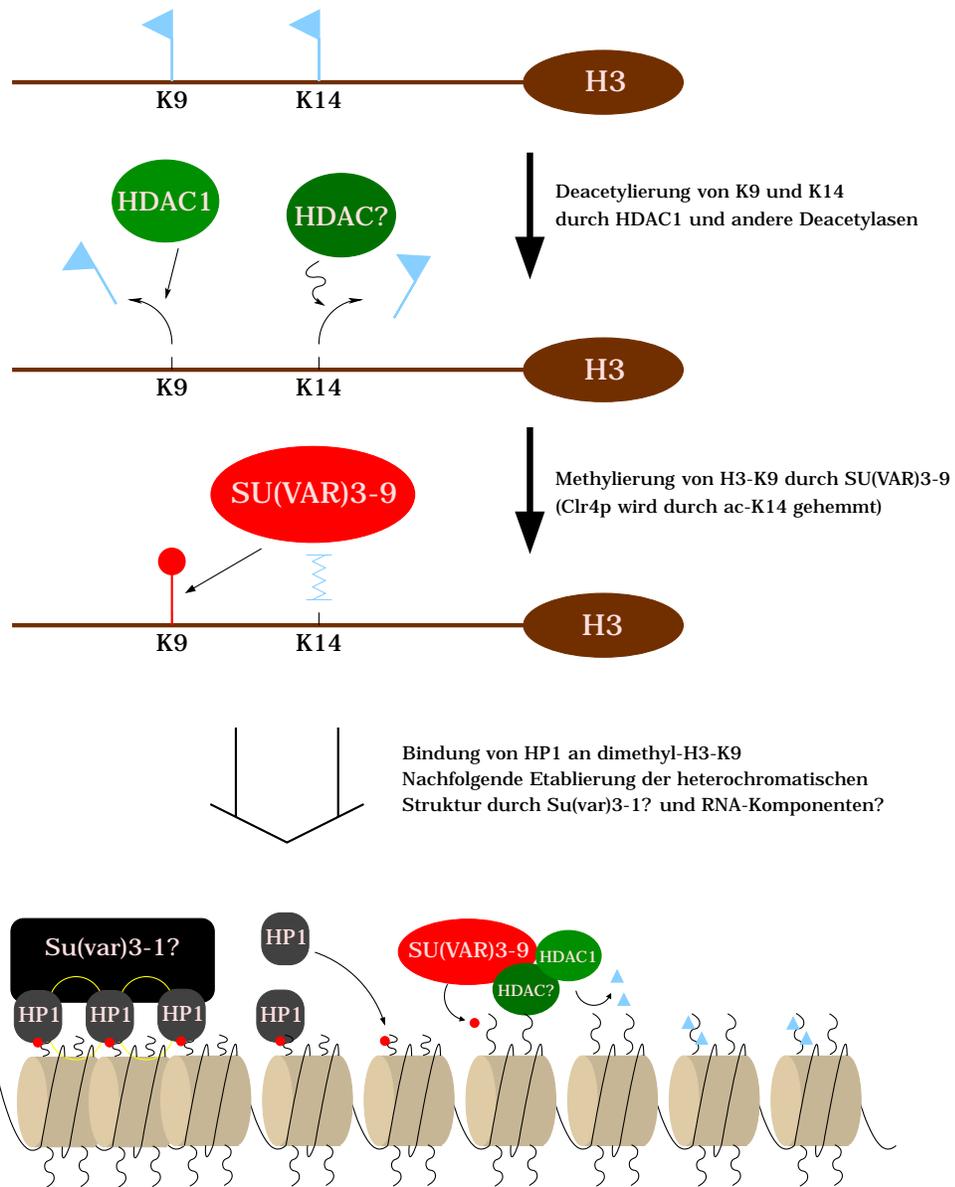


Abbildung 4.2: Modell für die Funktion von SU(VAR)3-9. SU(VAR)3-9 kann Lysin 9 von Histon H3 methylieren, wenn vorher eine Deacetylierung dieser Position erfolgt ist. HP1 bindet über seine Chromo-Domäne an methyliertes H3-K9 und durch bisher unbekannte Faktoren (möglicherweise RNA-Komponenten und / oder *Su(var)3-1*) wird eine heterochromatische Chromatinstruktur etabliert.

identifiziert, die Funktionen im Heterochromatinaufbau, aber auch bei der Kontrolle von Gen-Silencing übernehmen. Die meisten Interaktionen erfordern die Chromo-Shadow-Domäne von HP1, die in der Regel dimerisiert vorliegt (Brascher et al., 2000). Eine mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems identifizierte Interaktion von SU(VAR)3-9 mit HP1 (Fischer, 1997) konnte in der vorliegenden Arbeit durch *in vivo*-Analysen untermauert werden. Es wurde gezeigt, daß HP1 und SU(VAR)3-9 kopräzipitieren, kolokalisiert sind und SU(VAR)3-9 mit der HP1-POLYCOMB-Chimäre umlokalisiert wird. Die Interaktionsdomäne bei HP1 ist die Chromo-Shadow-Domäne, bei SU(VAR)3-9 ist der N-Terminus (AS 81-188) an der Interaktion beteiligt (Fischer, 1997). Der für Interaktionen mit der Chromo-Shadow-Domäne identifizierte Konsensus (Smothers und Henikoff, 2000) liegt bei SU(VAR)3-9 nicht vor, jedoch existieren auch andere Interaktionspartner von HP1, die diesen Konsensus nicht aufweisen.

Auch in der Maus und im Menschen ist die Interaktion des N-Terminus von SUV39H1 (AS 1-44) mit M31 (HP1 β) gezeigt worden (Aagaard et al., 1999; Melcher et al., 2000). Die Analyse von SUV39H1 in *Drosophila melanogaster* zeigte zudem, daß SUV39H1-EGFP sogar mit *Drosophila*-HP1 interagieren kann, so daß diese Interaktionsstelle in SU(VAR)3-9 evolutionär konserviert ist. In *Schizosaccharomyces pombe* wurde bisher keine direkte Interaktion von Clr4p und Swi6p beschrieben und da bei Clr4p der N-terminale Interaktionsbereich fehlt, findet diese wahrscheinlich auch nicht statt.

Eine wesentliche Funktion der Chromo-Domäne von HP1 ist die Bindung an K9-methyliertes Histon H3 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Ein Modell, welches die Ausbreitung des Heterochromatins ("Spreading") erklären könnte (Abb. 4.2), nimmt eine Methylierung von H3-K9 durch SU(VAR)3-9 oder andere Methyltransferasen und nachfolgende Bindung durch HP1 an (Bannister et al. (2001). Eine Fehlen der direkten Interaktion von SU(VAR)3-9 und HP1 wie in *Schizosaccharomyces pombe* ist nach diesem Modell möglich, eine vorhandene Interaktion könnte aber zu einer besseren Effizienz von "Spreading"-Effekten beitragen, die in höheren Organismen aufgrund der ausgebreiteten Regionen perizentrischen Heterochromatins nötig wären. In *Su(var)3-9* Null-Mutanten ist HP1 nur noch mit dem vierten Chromosom, einigen zentralen Dots im Chromozentrum und sehr viel schwächer mit dem restlichen perizentrischen Heterochromatin assoziiert. Diese Lokalisierung stimmt mit der Verteilung von H3-K9 in *Su(var)3-9* Null-Mutanten überein und zeigt, daß die Methylierung von H3-K9 tatsächlich eine Voraussetzung für die Bindung von HP1 ist. Ein weiterer funktioneller Beweis ist, daß der Suppressoreffekt von *Su(var)3-9*-Mutanten epistatisch über den Triplo-Enhancereffekt von HP1 ist, das heißt, *Su(var)3-9* ist die limitie-

rende Komponente bei dieser Art des heterochromatischen Gen-Silencings. Auch in *Schizosaccharomyces pombe* und in der Maus ist die Methylierung von H3-K9 notwendig für die Bindung von HP1 und das anschließende Silencing der betroffenen Regionen. In Clr4p-Mutanten ist Swi6p nicht mehr an *mat2/3* und den zentromerischen Repeats lokalisiert (Nakayama et al., 2001), sondern diffus im Kern verteilt (Bannister et al., 2001) und auch in Suv39h Doppel-Null PMEF-Zellen werden HP1 α und HP1 β nicht mehr an heterochromatischen Bereichen gefunden (Lachner et al., 2001).

HP1 ist jedoch nicht für die Heterochromatin-Lokalisierung von SU(VAR)3-9 notwendig. In allen transheterozygot mit einer *Su(var)2-5*-umfassenden Defizienz getesteten *Su(var)2-5^x*-Mutanten zeigt SU(VAR)3-9 eine heterochromatische Verteilung. Zusätzlich ist das Protein jedoch über die gesamten Chromosomenarme ausgebreitet und führt auch an diesen Stellen zu einer Methylierung von H3-K9 (Schotta et al., 2002). Da im dritten Larvenstadium kein maternales Genprodukt mehr vorliegt (Fanti et al., 1998) kann davon ausgegangen werden, daß der beobachtete Effekt mit einem Verlust des endogenen HP1-Proteins korreliert.

Der Triplo-Enhancereffekt einer zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopie wird durch HP1-Mutanten stark reduziert, was zeigt, daß HP1 für den effizienten Aufbau von heterochromatischem Gen-Silencing notwendig ist. Besonders stark wird dieser Effekt von *Su(var)2-5⁰²*-Mutanten reduziert. Hier handelt es sich um eine Punktmutante in der Chromo-Domäne (V26M), bei der noch endogenes Mutantenprotein im Heterochromatin und Euchromatin nachzuweisen ist. Wahrscheinlich kann das Mutantenprotein mit SU(VAR)3-9 interagieren, aber die mutierte Chromo-Domäne nicht an methyliertes H3-K9 binden (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001), was damit eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung von Silencing ist. In den anderen *Su(var)2-5*-Mutanten, die den Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)3-9* nicht so stark senken, kann diese Funktion offenbar von anderen Proteinen übernommen werden.

Die euchromatische Bindung von SU(VAR)3-9 in HP1-Null-Zellen zeigt, daß HP1 für die Restriktion des Proteins im Heterochromatin notwendig ist. Die Fehlverteilung von SU(VAR)3-9 in *Su(var)2-5*-Mutanten kann möglicherweise durch die Interaktion mit den HP1-Varianten HP1b und HP1c, die vorwiegend euchromatisch lokalisiert sind (Smothers und Henikoff, 2001), hervorgerufen werden. Ob solche Interaktionen erfolgen, könnte im Hefe-Dihybrid-System und durch Untersuchungen auf Kolo-kalisierung von HP1b und HP1c mit SU(VAR)3-9 in *Su(var)2-5* Null-Mutanten getestet werden.

4.3 Kontrolle der Heterochromatin-Bindung von SU(VAR)3-9

Durch die Analyse der chromosomalen Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP und immunzytologische Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper konnte nachgewiesen werden, daß SU(VAR)3-9, ebenso wie die Orthologen Clr4p und SUV39H1 (Aagaard et al., 1999), mit heterochromatischen Bereichen assoziiert ist. Mittels heterochromatischer Rearrangements wurde gezeigt, daß SU(VAR)3-9 mit allen getesteten heterochromatischen Regionen assoziiert ist. In weiterführenden Arbeiten könnte eine Feinlokalisierung der heterochromatischen Verteilung von SU(VAR)3-9 an mitotischen Chromosomen erfolgen, da in diesen auch das stark heterochromatisierte Y-Chromosom sichtbar ist.

Alle untersuchten Proteinvarianten von SU(VAR)3-9 zeigen in Speicheldrüsenchromosomen prinzipiell die gleiche Verteilung wie das Wildtyp-Protein. In Null-Mutanten von *Su(var)3-9* beschränkt sich deren Verteilung jedoch auf wenige Punkte im zentromerischen Heterochromatin und auf das vierte Chromosom. Einzig das Vollängen-Protein SU(VAR)3-9-EGFP weist die gleiche Verteilung wie im Wildtyp-Hintergrund auf. Damit ist die Funktionalität des gesamten Proteins notwendig, um eine vollständige Verteilung im Heterochromatin zu erreichen. Das minimale Modul für eine Heterochromatin-Bindung stellt der N-Terminus dar (Abb. 4.3). Die Interaktion des N-Terminus mit HP1 im Hefe-Dihybrid-System (Fischer, 1997) legt zwar nahe, daß die Bindung von SU(VAR)3-9 im Heterochromatin HP1-vermittelt ist, da aber SU(VAR)3-9 in *Su(var)2-5* Null-Mutanten immer noch heterochromatinassoziiert ist, trägt HP1 nicht ursächlich zur Heterochromatinbindung bei. Auch bei SUV39H1 scheint die HP1-Interaktion des N-Terminus nicht ausschlaggebend für die Lokalisierung zu sein, denn SUV39H1-N44 (ein myc-markiertes N-Terminus-Protein As 1-44) kann zwar mit HP1 interagieren, ist jedoch nicht heterochromatinassoziiert (Melcher et al., 2000). Das minimale Targeting-Modul besteht bei SUV39H1 aus dem N-Terminus und der Chromo-Domäne (Melcher et al., 2000). Im Gegensatz zu SUV39H1 hat der N-Terminus von SU(VAR)3-9 zusätzliche Funktionen bei der Lokalisierung des Proteins.

Die schwache Assoziierung der untersuchten Mutantenproteine mit dem Chromozentrum in *Su(var)3-9* Null-Mutanten ähnelt stark der Verteilung von methyliertem H3-K9 im gleichen genetischen Hintergrund. Daher kann davon ausgegangen werden, daß diese Proteinvarianten nicht in der Lage sind, eine Methylierung von H3-K9 auszuführen, welche somit gleichzeitig eine Voraussetzung

für die Ausbreitung ("Spreading") von SU(VAR)3-9 über das gesamte Heterochromatin darstellt. Die Methyltransferaseaktivität ist jedoch nur bei N-Term-EGFP bzw. NTermPT-EGFP, sowie Δ SET-EGFP und c3-9/TRX-EGFP beeinträchtigt. Das Δ -Chromo-EGFP Protein zeigt eine eindeutige *in vitro* Methyltransferaseaktivität, die ebenso stark wie die des Wildtypproteins ist. Eine Beeinträchtigung der Chromo-Domäne verhindert damit das "Spreading" der SU(VAR)3-9-vermittelten H3-K9-Methylierung (Abb. 4.3). Eine Funktion der Chromo-Domäne könnte bei SU(VAR)3-9 in der Bindung benachbarter Nukleosomen liegen, die ein "Weitergleiten" des Proteins bewirken könnte. Eine andere Erklärungsmöglichkeit liegt darin, daß die SU(VAR)3-9 Chromo-Domäne eventuell auch methyliertes H3-K9 binden kann (Nielsen et al., 2002; Jacobs und Khorasanizadeh, 2002) und erst dann abgelöst wird, wenn HP1 um diese Bindung konkurriert. Die Funktion des N-Terminus könnte andererseits die Erkennung von Initiationsstellen für Heterochromatin, durch Bindung an bestimmte Proteine oder Histonmodifikationen, sein. Das würde erklären, warum alle Proteinvarianten inklusive NTermPT-EGFP, einem Protein mit defizienter HP1-Interaktion, in *Su(var)3-9* Null-Mutanten an die beobachteten zentralen Punkte und das vierte Chromosom binden. Offenbar ist an diesen Stellen eine initiale heterochromatische Struktur aufgebaut worden, die durch den N-Terminus, unabhängig von HP1, erkannt wird.

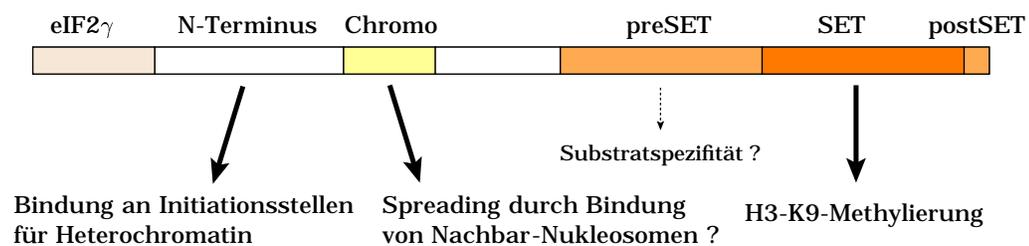


Abbildung 4.3: Funktionen der SU(VAR)3-9-Domänen

Über die Untersuchung von Mutanten, die genetisch mit *Su(var)3-9* interagieren, können Proteine identifiziert werden, die Kontrollfunktionen bei der Heterochromatisierung ausüben. In *Schizosaccharomyces pombe* wurden Mutanten in *rik1* gefunden, die das Silencing an *mat2/3* (Ekwall und Ruusala, 1994) und der Zentromerregion (Allshire et al., 1995) reprimieren. Zudem konnte gezeigt werden, daß Rik1p absolut notwendig für die Methylierung von H3-K9 durch Clr4p (Nakayama et al., 2001) und damit die Assoziierung von Swi6p ist. Aus diesem Grund wurde die Verteilung von SU(VAR)3-9-EGFP auch im Hintergrund

von Mutanten für verschiedene Suppressor-Gene, wie *Su(var)2-1*, *Su(var)3-1* und *Su(var)3-3* analysiert. Diese Mutanten interagieren genetisch mit *Su(var)3-9* und könnten damit Komponenten des *Su(var)3-9*-abhängigen Gen-Silencing darstellen. Besonders interessant sind hier Mutanten von *Su(var)3-1*, da diese epistatisch über den Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)3-9* wirken. In transheterozygoten *Su(var)3-1^x/P{Su(var)3-9}*-Tieren wird kein oder nur geringes Silencing des *white*-Gens der Inversion *In(1)w^{m4}* beobachtet. In keinem der beobachteten Genotypen wurde eine veränderte SU(VAR)3-9-Verteilung gefunden. Zudem konnte gezeigt werden, daß bei *Su(var)3-1*-Mutanten die H3-K9-Methylierung unbeeinflusst ist (Ebert, persönliche Mitteilung). *Su(var)3-1* kodiert damit für eine Komponente, die nach dem Methylierungsereignis von SU(VAR)3-9 wirksam und an der weiteren Etablierung der heterochromatischen Struktur beteiligt ist. Ein negativer Regulator für Gen-Silencing-Prozesse könnte *ptn^D* sein. Diese Mutation weist einen starken PEV-Enhancereffekt auf, der epistatisch über den Suppressoreffekt von *Su(var)3-9*-Mutanten ist (Kuhfittig et al., 2001). Zudem führt diese Mutante zu ektopischem Gen-Silencing infolge Lokalisierung und H3-K9-Methylierung von ektopischen Bindungsstellen im Euchromatin durch den SU(VAR)3-9-HP1-Komplex (Kuhfittig et al., 2001). Durch die Analyse weiterer Suppressor- und Enhancer-Mutanten bezüglich der SU(VAR)3-9-Verteilung und H3-K9-Methylierung können somit weitere Gene bzw. Proteine identifiziert werden, die ähnlich wie *Su(var)3-1*, *ptn^D* oder Rik1p wichtige Funktionen für die Ausbildung heterochromatischer Strukturen ausüben.

4.4 Funktionen der SET-Domäne

Neben einer Struktur-Funktionsanalyse ist die Mutantanalyse besonders geeignet, die Bedeutung bestimmter Domänen oder konservierter Aminosäurepositionen für die Funktion eines Proteins zu charakterisieren. Für *Su(var)3-9* konnten in mehreren unabhängigen Mutationsexperimenten insgesamt 33 Mutationen isoliert werden. Durch Röntgenstrahl-Mutagenese wurden mehrere kleine Deletionen bzw. Insertionen isoliert, die in den meisten Fällen zu Frameshifts führen (Abb. 4.4). In EMS-Experimenten wurden ausschließlich Punktmutanten isoliert, die entweder in Aminosäureaustauschen oder Nonsense-Mutationen resultieren (Abb. 4.4). Auffällig ist, daß alle Punktmutanten in der SET-Domäne oder der preSET- bzw. postSET-Domäne liegen. Da weder Mutanten im N-Terminus noch in der Chromo-Domäne isoliert wurden, wird deutlich, daß die SET-Domäne das zentrale Modul für die dosisabhängige Wirkung von *Su(var)3-*

9 beim Gen-Silencing darstellt. Die Analyse von Δ Chromo-EGFP im Hintergrund von *Su(var)3-9* Null-Mutanten zeigt jedoch eindeutig, daß die Chromo-Domäne für die korrekte Ausbreitung im Chromozentrum wichtig ist. Auch der N-Terminus übt eine essentielle Funktion aus, denn ein myc-markiertes Δ NTerm-Protein ist in *Su(var)3-9* Null-Mutanten nicht mehr chromosomal assoziiert (Ebert, persönliche Mitteilung). Daß keine N-Terminus- oder Chromo-Domäne-Mutanten gefunden wurden, kann somit nur mit einer ungenügenden Sättigung der Mutationsexperimente erklärt werden. Beide Proteinbereiche weisen zudem eine gegenüber der SET-Domäne wesentlich geringere Konservierung auf, weshalb möglicherweise viele Aminosäureaustausche keinen starken Phänotyp zeigen würden.

Insgesamt vier Mutanten wurden in dem bei allen SET-Domänen sehr stark konservierten GWGV-Motiv (As 489-492) identifiziert (*Su(var)3-9¹²*, *Su(var)3-9²³*, *Su(var)3-9²⁷* und *P{c3-9}78A⁴⁸*). Das gleiche Motiv ist in der *trithorax*-Mutante *trx^{z11}* betroffen (₃₆₀₁GRG₃₆₀₃), bei der ein G3601S Austausch (Stassen et al., 1995) zu homöotischen Transformationen und Letalität im Puppenstadium führt (Breen, 1999). Rekombinantes TRITHORAX-Protein besitzt wahrscheinlich keine Aktivität als Histon-Methyltransferase, kann aber über die SET-Domäne den Histon H3 N-Terminus binden (Katsani et al., 2001). Die Ursache für die phänotypischen Effekte von *trx^{z11}* ist eine stark reduzierte Bindung der mutierten SET-Domäne an Histone, wobei die Struktur der Domäne nicht generell gestört ist, da andere Interaktionen nicht unterdrückt werden (Katsani et al., 2001). Die Bedeutung des GWGV-Motiv für die Histon-Bindung erklärt damit für SU(VAR)3-9, weshalb *P{c3-9}78A⁴⁸* praktisch keine *in vitro*-Methyltransferaseaktivität aufweist. Die Aktivitätsbestimmung der anderen drei Mutanten im GWGV-Motiv könnte diesen Befund weiter untermauern.

Ein weiterer Interaktionspartner mit der SET-Domäne von TRX ist ASH1. Mutationen in verschiedenen Bereichen der SET-Domäne unterdrücken eine Interaktion im Hefe-Dihybrid-System (Rozovskaia et al., 1999). Besonders die Austausche 1391-1392 PN→AY, 1414 I→A und 1423-1424 DY→AA verhindern diese Interaktion völlig (Rozovskaia et al., 1999). Für SU(VAR)3-9 sind bisher keine Interaktoren mit der SET-Domäne beschrieben, jedoch wurden in den Mutationsexperimenten auch Aminosäureaustausche gefunden, die ähnliche Stellen wie bei TRITHORAX betreffen. *Su(var)3-9¹⁰* (D601N) betrifft beispielsweise die analoge Position (₁₄₂₃DY₁₄₂₄) wie in TRITHORAX und *P{c3-9}78A²⁴* (R590Q) liegt nur zwei Positionen neben dem auch in *Drosophila melanogaster* konservierten I₁₄₁₄.

In allen Methyltransferasen ist insbesondere das NHSC-Motiv (in SU(VAR)3-9 As 560-563) konserviert (Rea et al., 2000). Da Mutationen in SUV39H1 sowohl zu

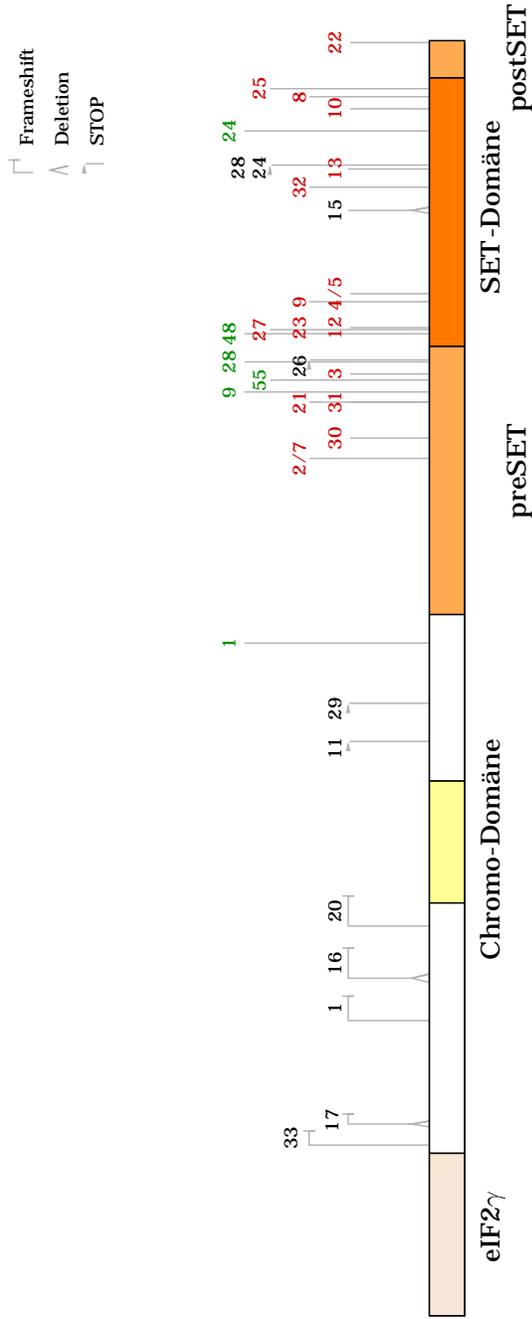


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Mutationsorte in SU(VAR)3-9. Bis auf die zwei insertionalen Mutanten Su(var)3-9⁰⁶ und Su(var)3-9¹⁴ sind alle molekular charakterisierten Mutanten eingezeichnet. Rote Ziffern markieren Allele, die zu Aminosäureaustauschen führen, grüne Ziffern stehen für Mutanten im P(c3-9)78A-Transgen und schwarze Ziffern markieren Mutanten, die zu Frameshift- oder Nonsense-Mutationen führen.

einem Verlust ($\Delta_{320}\text{NHSC}_{324}$, H324L, H324K), als auch einer Erhöhung (H320R) der Methyltransferaseaktivität führen (Rea et al., 2000), könnte dieses Motiv im katalytischen Zentrum liegen. Die Mutante *Su(var)3-9³²* betrifft dieses NHSC-Motiv. Die Erklärung für den Silencing-Defekt der Mutante könnte somit im Verlust der Methyltransferaseaktivität liegen. ASH1, eine weitere Methyltransferase in *Drosophila*, weist ebenfalls das NHSC-Motiv auf. In der Mutante *ash1¹⁰* (N1385I) ist die Funktion dieses Motivs beeinträchtigt, was zu homöotischen Transformationen und Letalität im Puppenstadium führt (Tripoulas et al., 1996). Die preSET-Domäne von ASH1 gehört zwar eher der Enhancer-of-Zeste-Gruppe an, jedoch besteht eine hohe Homologie zu SU(VAR)3-9 vom Beginn der preSET-Domäne bis zu einem konservierten ECN-Motiv (bei SU(VAR)3-9 As 455-457). Dieses Motiv ist in *ash1²¹* (E1284K) betroffen und führt zu ähnlichen Defekten wie *ash1¹⁰* (Tripoulas et al., 1996). Bei *Su(var)3-9²¹* ist die gleiche Aminosäure des ECN-Motivs (E455V) betroffen und da diese Region außerhalb der SET-Domäne liegt, wäre es interessant, festzustellen, inwieweit die Methyltransferaseaktivität des Proteins betroffen ist. In diesem Zusammenhang würde sich auch die Untersuchung der zwei Transgen-Mutanten *P{c3-9}78A⁹* und *P{c3-9}78A⁵⁵* anbieten, denn diese betreffen zwei unmittelbar benachbarte, konservierte Cysteine in der preSET-Domäne. Die Cysteinposition des ECN-Motivs ist auch in einer *Su(var)3-9*-Mutante betroffen (C456S), die bestimmte Telomer-Positionseffekte (TPE) beeinflusst (Donaldson et al., 2002), jedoch liegen keine Daten vor, ob damit eine Veränderung des Musters der Histonmodifikationen einhergeht.

Die weiterführende Analyse der Punktmutanten in *Su(var)3-9*, insbesondere bezüglich ihrer Methyltransferaseaktivität und deren Korrelation mit der Stärke des Suppressoreffekts, sowie die zytologische Lokalisierung der Mutanteneiweiße wird weitere Einsichten in die Funktionen der SET- und besonders der preSET- und postSET-Domäne liefern. Die postSET-Domäne ist bei Methyltransferasen nahezu immer mit der SET-Domäne verbunden, die preSET-Domäne kommt jedoch nur in der SU(VAR)3-9 Familie der Methyltransferasen vor (Kouzarides, 2002). In der SET1- und SET2-Familie wird diese Domäne durch andere Motive ersetzt oder fehlt völlig. Da diese Methyltransferasen jeweils andere Lysin-Positionen der Histone methylieren, könnte die preSET-Domäne der SU(VAR)3-9 Familie an der Substraterkennung beteiligt sein.

4.5 Ist die H3-K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 eine epigenetische Markierung für Gen-Silencing?

Gen-Silencing wird in verschiedenen Bereichen des Genoms beobachtet und dient im perizentrischen Heterochromatin unter anderem der Stilllegung mobiler Elemente (Henikoff, 2000) und im Euchromatin der spezifischen Repression von Entwicklungsgenen (Pirrotta, 1997). Die H3-K9-Methylierung als Histon-Code für Gen-Silencing konnte insbesondere mit der Etablierung fakultativen Heterochromatins in der Inversion *In(1)w^{m4}* oder der Inaktivierung eines X-Chromosoms in weiblichen Säugerzellen (Peters et al., 2002) korreliert werden. Untersuchungen euchromatischer Gene bei *Drosophila melanogaster* zeigen, daß die H3-K9-Methylierung auch an deren Regulation beteiligt ist (Hwang et al., 2001).

Die Entscheidung über eine Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Gene oder chromosomaler Bereiche kann früh in der Entwicklung erfolgen und bis in das adulte Tier aufrecht erhalten werden. Ein Beispiel für diese Art des epigenetischen Gen-Silencing ist die POLYCOMB-abhängige Inaktivierung von Entwicklungsgenen (Pirrotta, 1997). Auch beim *Su(var)3-9*-abhängigen Gen-Silencing scheinen epigenetische Mechanismen beteiligt zu sein. Erzeugt man durch mitotische Rekombination in heterozygoten *Su(var)3-9⁰⁶/+* Tieren Wildtyp-Zellklone, weisen diese nur dann einen Wildtyp-Phänotyp (normale Variegation) auf, wenn sie früh in der Entwicklung erzeugt wurden (Reuter, persönliche Mitteilung und Abb. 4.5). Tatsächlich wird heterochromatisches Gen-Silencing in *Drosophila melanogaster* in frühen Embryonalstadien, zu Beginn der Gastrulation, initiiert (Lu et al., 1998). Unterbleibt in diesen Stadien der Aufbau des *white*-Gen-Silencing aufgrund der *Su(var)3-9*-Mutation, kann es auch in späteren Stadien nicht hergestellt werden (Abb. 4.5).

Einen Hinweis auf den Zeitpunkt für die Etablierung des *Su(var)3-9*-abhängigen Gen-Silencing gibt die P{c3-9}78A-Linie. Der Suppressoreffekt von *Su(var)3-9* kann hier nur in der ventralen Augenhälfte gerettet werden. Diese Linie ist im *fringe*-Gen inseriert und steht offenbar unter Kontrolle der entsprechenden Enhancer-Elemente. *Fringe* kodiert eine Glycosyltransferase, die an der Ausbildung der Dorsal/Ventral-Polarität des Auges (Papayannopoulos et al., 1998; Dominguez und de Celis, 1998) aber auch der Flügel (Rauskolb et al., 1999) beteiligt ist. Charakteristisch ist deshalb die Expression im ventralen Teil der Augen-Imaginialscheibe, die auch für SU(VAR)3-9-EGFP in der Linie P{c3-9}78A gefunden wurde. Bislang ist jedoch ungeklärt, wann dieses Dorsal/Ventral-Muster durch die Expression des *fringe*-Gens festgelegt wird. Die Immunmarkierung von

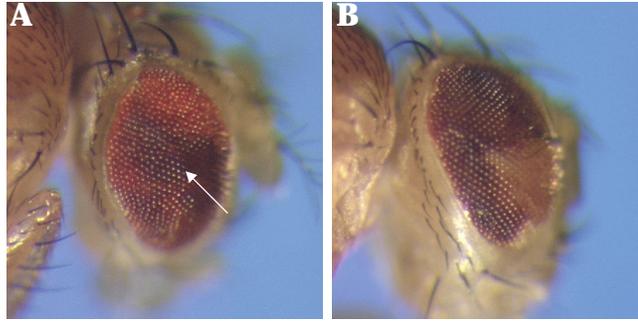


Abbildung 4.5: Der Suppressoreffekt von *Su(var)3-9*-Mutanten kann nur durch eine früh in der Entwicklung erfolgende Expression des Wildtyp-Proteins gerettet werden. (A-B) In *Su(var)3-9⁰⁰/+* Fliegen durch mitotische Rekombination erzeugte Wildtypklone (*red*-Sektoren, weißer Pfeil) (A) zeigen nur dann eine Rettung des Suppressors, wenn die Klone groß und damit früh in der Augenentwicklung erzeugt wurden (B) (Reuter, persönliche Mitteilung).

Embryonen der Linie P{c3-9}78A mit einem GFP-Antikörper zeigt ein sehr spezifisches Expressionsmuster von SU(VAR)3-9-EGFP. Im Bereich der Vorläuferzellen für die Augenimaginalscheibe in Embryonen ist jedoch noch keine signifikante Expression nachweisbar. Das würde dafür sprechen, daß auch in späteren Entwicklungsstadien eine Rettung des Suppressoreffekts durch Expression von SU(VAR)3-9-EGFP stattfinden kann. Da die genaue Lage dieser Vorläuferzellen nur durch eine Doppel-Markierung von SU(VAR)3-9-EGFP und einem Protein, das spezifisch in der Augenentwicklung exprimiert wird, feststellbar ist, muß dieses Ergebnis durch zusätzliche Experimente untermauert werden.

Eine genaue Analyse des Expressionsmusters von P{c3-9}78A insbesondere in Embryonal- und frühen Larvenstadien, wird weitere Hinweise auf den Zeitpunkt geben, an dem durch SU(VAR)3-9 noch Gen-Silencing etabliert werden kann. Da bisherige Ergebnisse auf eine epigenetische Festlegung des transkriptionell aktiven Zustandes hinweisen, wäre es ebenfalls interessant, zu testen, ob auch der inaktive Zustand epigenetisch festgelegt wird. So sollte es beispielsweise nur in frühen Entwicklungsstadien möglich sein, den Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)3-9* zu unterdrücken.

Epigenetische Prozesse spielen eine große Rolle in der Gewebe-Differenzierung und der Ausbildung höhergeordneter Chromatinstrukturen. Ein wesentliches Ereignis für transkriptionelle Inaktivierung ist die H3-K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9 und andere Methyltransferasen. Das weitergehende Verständnis für die epigenetischen Mechanismen zur Steuerung der Gen-Aktivität wird es dem-

zufolge ermöglichen, Entwicklungsvorgänge gezielt zu beeinflussen, Fehlregulationen zu korrigieren und vielleicht, durch Aufheben der epigenetischen Programmierung, Zellen omnipotent zu machen.

5 Zusammenfassung

Drosophila Su(var)3-9 ist ein dominanter Modifikator für Heterochromatin-induziertes Gen-Silencing. Wie die orthologen Proteine aus Mensch, Maus und Hefe kodiert *Su(var)3-9* für eine Histonmethyltransferase (HMTase), die selektiv Lysin 9 von Histon H3 methyliert. SU(VAR)3-9 ist die wesentliche HMTase in *Drosophila melanogaster*, da in *Su(var)3-9* Null-Mutanten nur noch eine sehr schwache Restmethylierung nachweisbar ist. SU(VAR)3-9 ist im Chromozentrum lokalisiert und interagiert dort mit HP1, einem weiteren Heterochromatinprotein und Modifikator für PEV. Diese Interaktion führt zu einer wechselseitigen Abhängigkeit in der Verteilung der beiden Proteine. In SU(VAR)3-9 Null-Mutanten ist HP1 nur noch schwach mit dem Chromozentrum assoziiert. In *Su(var)2-5* Null-Mutanten ist SU(VAR)3-9 nicht mehr auf das Chromozentrum beschränkt, sondern auch stark im Euchromatin ausgebreitet. Das wesentliche Modul für eine Heterochromatinbindung von SU(VAR)3-9 ist der N-Terminus. Dieses Modul erkennt offenbar Initiationsstellen für die Etablierung von Gen-Silencing. Die Chromo-Domäne ist dagegen wichtig für die Ausbreitung ("Spreading-Funktion") der SU(VAR)3-9-Komplexe. Genetische Tests zeigen, daß *Su(var)3-9* eine zentrale Rolle für die Ausbildung von Heterochromatin-induziertem Gen-Silencing ausübt, denn *Su(var)3-9* Null-Mutanten sind epistatisch über die PEV-Modifikatoreffekte von HP1 und *Su(var)3-7*. Da die Deacetylierung von H3-K9 für die nachfolgende Methylierung durch SU(VAR)3-9 notwendig ist, dominieren andererseits *HDAC1*-Mutanten über den Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)3-9*. SU(VAR)3-9 ist evolutionär nicht nur strukturell, sondern auch funktionell konserviert. Die Expression des humanen Orthologs SUV39H1 führt in *Drosophila* zur partiellen Rettung des Suppressorphänotyps von *Su(var)3-9* Null-Mutanten. Ein wesentliches funktionelles Modul von SU(VAR)3-9 ist die SET-Domäne. Alle molekular charakterisierten Punktmutanten liegen innerhalb der preSET-, SET-, bzw. postSET-Domäne. Da in mehreren Mutanten nur eine Reduktion der HMTase-Aktivität beobachtet wurde, ist die volle enzymatische Aktivität wichtig für die Etablierung von Gen-Silencing.

6 Anhang

6.1 Transgene *Su(var)3-9*-Linien

Linie	Chromosom	Linie	Chromosom
P{GS.ry⁺hs(<i>Su(var)3-9</i>)EGFP}		P{GS.ry⁺hs(NTerm PT)EGFP}	
1 I,II,III,IV	3	A I,II	3
2 I	3	B	2
3 I,II,III	3	P{GS.ry⁺hs(NTerm)EGFP}	
4 I,II,III	2	A I,II	3
5 I,II,III,IV	3	B	2
6 I	2	C	2
7 I,II,III	2	D	3
8 I,II,III	2	E	2
10 I,II	3	G	2
P{GS.ry⁺UAS(<i>Su(var)3-9</i>)EGFP}		H	3
A I	2	I	2
A II	3	J	2
B	X	P{GS.ry⁺hs(ΔNTerm)EGFP}	
C	2	A I,II	X
P{GS.ry⁺(10.5kb<i>Su(var)3-9</i>)EGFP}		B	2
A I,II,III,IV	X	C	3
B I	X	E	2
B II	3	F	3
C I	3	G	3
C II	2	H	?
C III,IV	3	I	2
		J	3

Linie	Chromosom	Linie	Chromosom
P{GS.ry⁺hs(ΔSET)EGFP}		P{GS.ry⁺hs(ΔChromo)EGFP}	
A	3	A	3
B	3	B	2
C	2	C I,II	3
D	2		
E	2	P{GS.ry⁺UAS(ΔChromo)EGFP}	
G	2	A I,II	2
I	X	B I	X
J	X	B II	2
K	2		
L	3	P{GS.ry⁺hs(SET13)EGFP}	
M	3	A	X
N	2		
O	3	P{GS.ry⁺hs(SET15)EGFP}	
P	3	A	3
Q	3		
R	2	P{GS.ry⁺hs(c3-9/TRX)EGFP}	
S	3	A	2
T	3	B	2
U	2	C	2
V	2	D	2
X	X	E	X
Z	2	F	3
27	2	G	2
28	3	H	3
29	2	I	3
30	2		
31	3	P{GS.ry⁺hs(3-9/PC)EGFP}	
32	2	A	3
		B	3
		C	3
P{GS.ry⁺UAS(ΔSET)EGFP}		P{GS.ry⁺hs(SUV39H1)EGFP}	
A	3	A I,III	3
B	3		
D	3		
E	3		
G	3		

Linie	Chromosom	Linie	Chromosom
P{GS.ry⁺UAS(SUV39H1)EGFP}		P{GS.ry⁺hs(cDNA HP1)EGFP}	
A	3	A	3
B	3	B	2
C	2	C	2
D	2	D	2
E	3	E	X
F	3	F	2
G	3	H	X
H	3	I	2
P{GS.ry⁺(1.9kbSu(var)2-5)}		P{GS.ry⁺hs(cDNA HP1)EBFP}	
A	3	A	verloren
B	3	B	2
C	2	C	2
D	3	D	2
E	2	E	3
F	2	F	3
G	3	H	2
H	3	I	3
I	2	J	3
J	3	K	3
K	3		

6.2 Verwendete Primer

Primer für das pP{GS}-Vektor-System

EGFP-start	aaa tct aga act agt ccg cgg agc gct ggg ccc ata gcg gcc gca tgg gta aag gag aa
EGFP-end	tta aag ctt cct agg tat gct agc gac gtc gtc gac tat gcc cgg gcc ttg tat agt tc
linker1	ggc cgc ctc gag gca gaa ttc cct gca gga tcg atg gat ccg gcg cgc cg
linker2	tcg acg gcg cgc cgg atc cat cga tcc tgc agg gaa ttc tgc ctc gag gc
casper1	aag ctt ccg aat taa ttc tag ttc cag tga aat cca g
casper2	aag ctt agt taa taa aac cct ttt ttg gag
UAS-start	tct aga tgc atg cct gca ggt cgg
hsp70-start	ata tct aga gaa tcc caa aac aaa ctg g
hsp70-end	aca ggg ccc tat tca gag ttc tct tct tg

Primer zur Herstellung von Konstrukten

3-9gen-I forw	aca tct aga cag cta aaa atc tca gct gtg acc
3-9gen-II forw	aca gtc gac tga atg gac ttg aag tac
3-9gen-II back	aca cct agg att gga atc tgt acc ata cg
c3-9 start	gcg gcc gcg ata tcg aga ttt gat gcc g
c3-9 end	gcg gcc gcc aaa gag gac ctt tct gc
NTerm forw	aca ggg ccc gat atc gag att tga tgc cg
NTerm back	aca gcg gcc gcc gtt att ttt cga ccg ctt gga g
Δchromo forw	aca gcg gcc gcg agc ggc atc agc agc tct ac
ΔSET back	aca gcg gcc gcg agc ggc atc agc agc tct ac
NTerm P177T back	cg tga gac tgg tta ttt tgt cca c
c3-9/trx forw	ctg gtg cag cac gga cgc cag tac aag gat tat gtt gga gtc
c3-9/trx back	aca gcg gcc gcc att taa gta ctt ccg aca cc
SUV39H1 forw	aca gcg gcc gca aca tgg cgg aaa att taa aag gct g
SUV39H1 back	aca gcg gcc gcc gaa gag gta ttt gcg gca gg
HP1gen forw	aca ggg ccc tgt aaa att tag ata gtt ctt agt c
HP1gen back	aca cct agg gaa taa att aac ata tag cca g
HP1cDNA forw	ata gcg gcc gca tgg gca aga aaa tcg aca acc
HP1cDNA back	ata gcg gcc gcc atc ttc att atc aga gta c

Primer zur Sequenzierung

3-9 1forw	gaa gcg aag cgg att ttt aac c
3-9 1back	aag cgg ctc cat aat gac gac g
3-9 2forw	ttt ggg ctc tgg caa gca gat cag
3-9 2back	cgg gcg agc agg aag aat taa c
3-9 3forw	cac caa acc cat cat cca atc c
3-9 3back	gag tgg ctc ata ggc gtc tac ttc
3-9 3.1forw	att gat acg act gat cca gc
3-9 3.2back	tca tac tgc tgt cgc tgc tg
3-9 4forw	aag ttt gtg gag cgg cat cag c
3-9 4back	cgg tct taa aca gca cca acg g
3-9 5forw	gcc atc tat gag tgc aat agc cg
3-9 5back	caa tgc aat gat gtc tca ggt gg
3-9 5.1back	atg cgg taa taa ttt cag cac
pHT4vorn	aca agc gca gct gaa caa gc
pEGFPsback	ctt gtg gcc gtt tac gtc

Primer für inverse PCR

3'P forw-1	ata cta ttc ctt tca ctc gca c
3'P back-1	tgt cgt att gag tct gag tga g
3'P forw-2	gca tac gtt aag tgg atg tct c
3'P back-2	tga tta acc ctt agc atg tcc g
5'P forw-1	acc cac ttt aat gat tcg cag
5'P back-1	ttt act cca gtc aca gct ttg
5'P forw-2	acc agt ggg agt aca caa aca g
5'P back-2	cac aca acc ttt cct ctc aac

6.3 Publikationsliste

- GUNNAR SCHOTTA, ANJA EBERT, VEIKO KRAUSS, ANDREAS FISCHER, JAN HOFFMANN, STEPHEN REA, THOMAS JENUWEIN, RAINER DORN UND GUNTER REUTER. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO Journal*, **21**(5):1121-1131, 2002.
- BIRGIT CZERMIN, GUNNAR SCHOTTA, BASTIAN HÜLSMANN, ALEXANDER BREHM, PETER B. BECKER, GUNTER REUTER UND AXEL IMHOF. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO reports*, **2**(10)915-919, 2001.
- STEFFI KUHFITIG, JÁNOS SZABAD, GUNNAR SCHOTTA, JAN HOFFMANN, ENDRE MÁTHE UND GUNTER REUTER. *pitkin^D*, a Novel Gain-of-Function Enhancer of Position-Effect Variegation, Affects Chromatin Regulation During Oogenesis and Early Embryogenesis in *Drosophila*. *Genetics*, **157**(3):1227-1244, 2001.
- KERSTIN BÜCHNER, PEGGY ROTH, GUNNAR SCHOTTA, VEIKO KRAUSS, HARALD SAUMWEBER, GUNTER REUTER UND RAINER DORN. Genetic and Molecular Complexity of the Position Effect Variegation Modifier *mod(mdg4)* in *Drosophila*. *Genetics*, **155**(1):141-157, 2000.
- GUNNAR SCHOTTA UND GUNTER REUTER. Controlled expression of tagged proteins in *Drosophila* using a new modular P-element vector system. *Mol Gen Genet*, **262**(6):916-920, 2000.
- LOUISE AAGAARD, GÖTZ LAIBLE, PHILLIP SELENKO, MANFRED SCHMID, RAINER DORN, GUNNAR SCHOTTA, STEFFI KUHFITIG, ANDREA WOLF, ANGELIKA LEBERSORGER, PRIM B. SINGH, GUNTER REUTER UND THOMAS JENUWEIN. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *The EMBO Journal*, **18**(7):1923-1938, 1999.

A Literaturverzeichnis

- AAGAARD L, LAIBLE G, SELENKO P, SCHMID M, DORN R, SCHOTTA G, KUHFITIG S, WOLF A, LEBERSORGER A, SINGH PB, REUTER G UND JENUWEIN T. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J*, **18**(7):1923–1938, 1999.
- AASLAND R UND STEWART AF. The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res*, **23**(16):3163–3173, 1995.
- ALLSHIRE RC, NIMMO ER, EKWALL K, JAVERZAT JP UND CRANSTON G. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev*, **9**(2):218–233, 1995.
- BALL LJ, MURZINA NV, BROADHURST RW, RAINE AR, ARCHER SJ, STOTT FJ, MURZIN AG, SINGH PB, DOMAILLE PJ UND LAUE ED. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein1. *EMBO J*, **16**(9):2473–2481, 1997.
- BANNISTER AJ, ZEGERMAN P, PARTRIDGE JF, MISKA EA, THOMAS JO, ALLSHIRE RC UND KOUZARIDES T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**(6824):120–124, 2001.
- BARR ML UND BERTRAM EG. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, **163**:676–677, 1949.
- BERGER SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Gen Dev*, **12**(2):142–148, 2002.
- BIRCHLER JA, BHADRA MP UND BHADRA U. Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr Opin Genet Dev*, **10**(2):211–216, 2000.

- BIRNBOIM HC UND DOLEY J. A rapid alkaline extraction for screening rekombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**:1513–1523, 1979.
- BIRVE A, SENGUPTA AK, BEUCHLE D, LARSSON J, KENNISON JA, RASMUSON-LESTANDER Å UND MÜLLER J. Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development*, **128**(17):3371–3379, 2001.
- BJERLING P, SILVERSTEIN RA, THON G, CAUDY A, GREWAL S UND EKWALL K. Functional Divergence between Histone Deacetylases in Fission Yeast by Distinct Cellular Localization and In Vivo Specificity. *Mol Cell Biol*, **22**(7):2170–2181, 2002.
- BLACKBURN EH. Telomeres: no end in sight. *Cell*, **77**(5):621–623, 1994.
- BRAND AH UND PERRIMON N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**(2):401–415, 1993.
- BRASHER SV, SMITH BO, FOGH RH, NIETLISPACH D, THIRU A, NIELSEN PR, BROADHURST RW, BALL LJ, MURZINA NV UND LAUE ED. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J*, **19**(7):1587–1597, 2000.
- BREEN TR. Mutant alleles of the Drosophila trithorax gene produce common and unusual homeotic and other developmental phenotypes. *Genetics*, **152**(1):319–344, 1999.
- BRIGGS SD, BRYK M, STRAHL BD, CHEUNG WL, DAVIE JK, DENT SY, WINSTON F UND ALLIS CD. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev*, **15**(24):3286–3295, 2001.
- BROWN SW. Heterochromatin. *Science*, **151**(709):418–425, 1966.
- BÜCHNER K, ROTH P, SCHOTTA G, KRAUSS V, SAUMWEBER H, REUTER G UND DORN R. Genetic and molecular complexity of the position effect variegation modifier mod(mdg4) in Drosophila. *Genetics*, **155**(1):141–157, 2000.
- CARMENA M UND GONZALEZ C. Transposable elements map in a conserved pattern of distribution extending from beta-heterochromatin to centromeres in Drosophila melanogaster. *Chromosoma*, **103**(10):676–684, 1995.

- CHEN D, MA H, HONG H, KOH SS, HUANG SM, SCHURTER BT, ASWAD DW UND STALLCUP MR. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**(5423):2174–2177, 1999.
- CLEARD F, DELATTRE M UND SPIERER P. SU(VAR)3-7, a *Drosophila* heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation. *EMBO J*, **16**(17):5280–5288, 1997.
- CLEARD F UND SPIERER P. Position-effect variegation in *Drosophila*: the modifier Su(var)3-7 is a modular DNA-binding protein. *EMBO Rep*, **2**(12):1095–1100, 2001.
- CZERMIN B, SCHOTTA G, HULSMANN BB, BREHM A, BECKER PB, REUTER G UND IMHOF A. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep*, **2**(10):915–919, 2001.
- DELATTRE M, SPIERER A, TONKA CH UND SPIERER P. 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 Pt 23**:4253–4261, 2000.
- DOMINGUEZ M UND DE CELIS JF. A dorsal/ventral boundary established by Notch controls growth and polarity in the *Drosophila* eye. *Nature*, **396**(6708):276–278, 1998.
- DONALDSON KM, LUI A UND KARPEN GH. Modifiers of terminal deficiency-associated position effect variegation in *Drosophila*. *Genetics*, **160**(3):995–1009, 2002.
- DORN R, KRAUSS V, REUTER G UND SAUMWEBER H. 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, 1993.
- EBERT A. *Molekulare Charakterisierung des In(1)w^{m4}-Rearrangements und Etablierung eines Modellsystems zur Analyse von heterochromatischen Proteinkomplexen in Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1999.
- EISSENBERG J, JAMES T, FOSTER-HARTNETT D, HARTNETT T, NGAN V UND ELGIN S. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**:9923–9927, 1990.

- EISSENBERG JC UND ELGIN SCR. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Gen Dev*, **10**:204–210, 2000.
- EKWALL K UND RUUSALA T. Mutations in rik1, clr2, clr3 and clr4 genes asymmetrically derepress the silent mating-type loci in fission yeast. *Genetics*, **136**(1):53–64, 1994.
- ELGIN SCR UND HOOD LE. Chromosomal Proteins of Drosophila Embryos. *Biochemistry*, **12**(24):4984–4991, 1973.
- FANTI L, GIOVINAZZO G, BERLOCO M UND PIMPINELLI S. The Heterochromatin Protein 1 Prevents Telomere Fusions in Drosophila. *Mol Cell*, **2**(5):527–538, 1998.
- FARKAS G, GAUSZ J, GALLONI M, REUTER G, GYURKOVICS H UND KARCH F. The Trithorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor. *Nature*, **371**(6500):806–808, 1994.
- FINNIN MS, DONIGIAN JR, COHEN A, RICHON VM, RIFKIND RA, MARKS PA, BRESLOW R UND PAVLETICH NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, **401**(6749):188–193, 1999.
- FISCHER A. *Molekulargenetische Untersuchung heterochromatin-assoziiierter Proteine mit Hilfe des Hefe-Dihybridsystems und des Telomer-Positionseffektes in Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1997.
- FLYBASE. The Drosophila genetic database. <http://flybase.bio.indiana.edu>, 2002.
- FRANKEL S, SIGEL EA, CRAIG C, ELGIN SC, MOOSEKER MS UND ARTAVANIS-TSAKONAS S. An actin-related protein in Drosophila colocalizes with heterochromatin protein 1 in pericentric heterochromatin. *J Cell Sci*, **110**(Pt 1):1999–2012, 1997.
- FRIDELL YWC UND SEARLES L. *Vermilion* as a small selectable marker gene for *Drosophila* transformation. *Nucleic Acids Res*, **19**:5082, 1991.
- GATTI M UND PIMPINELLI S. Functional elements in Drosophila melanogaster heterochromatin. *Annu Rev Genet*, **26**:239–275, 1992.
- HARI KL, COOK KR UND KARPEN G. The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev*, **15**(11):1334–1348, 2001.

- HAWLEY RS, IRICK H, ZITRON AE, HADDOX DA, LOHE A, NEW C, WHITLEY MD, ARBEL T, JANG J UND MCKIM K. There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila* females, one of which requires heterochromatic homology. *Dev Genet*, **13**(6):440–467, 1992.
- HEITZ E. Das Heterochromatin der Moose. *I Jb wiss Bot*, **69**:762–818, 1928.
- HEITZ E. Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. *Ber dtsch Bot Ges*, **47**:274–284, 1929.
- HENIKOFF S. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta*, **1470**(1):1–8, 2000.
- HOFFMANN J. *Entwicklungsspezifische Kontrolle der Verteilung von Heterochromatinproteinen in Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2000.
- HUANG AM, REHM EJ UND RUBIN GM. *Drosophila Protocols*, Kap. Recovery of DNA Sequences Flanking P-element Insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue, Seiten 429–447. Cold Spring Harbor Lab Press, 2000.
- HUANG DW, FANTI L, PAK DT, BOTCHAN MR, PIMPINELLI S UND KELLUM R. Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol*, **142**(2):307–318, 1998.
- HWANG KK, EISSENBERG JC UND WORMAN HJ. Transcriptional repression of euchromatic genes by *Drosophila* heterochromatin protein 1 and histone modifiers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(20):11423–11427, 2001.
- IVANOVA AV, BONADUCE MJ, IVANOV SV UND KLAR AJS. The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature Genet*, **19**(2):192–195, 1998.
- JACOBS SA UND KHORASANIZADEH S. Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-Methylated Histone H3 Tail. *Science*, **295**(5562):2080–2083, 2002.
- JAMES TC, EISSENBERG JC, CRAIG C, DIETRICH V, HOBSON A UND ELGIN SC. Distribution pattern of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol*, **50**(1):170–180, 1989.
- JAMES TC UND ELGIN SCR. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol*, **6**(11):3862–3872, 1986.

- JENUWEIN T UND ALLIS CD. Translating the histone code. *Science*, **293**(5532):1074–1080, 2001.
- JENUWEIN T, LAIBLE G, DORN R UND REUTER G. SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci*, **54**(1):80–93, 1998.
- KATSANI KR, ARREDONDO JJ, KAL AJ UND VERRIJZER CP. A homeotic mutation in the trithorax SET domain impedes histone binding. *Genes Dev*, **15**(17):2197–2202, 2001.
- KOUZARIDES T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*, **12**(2):198–209, 2002.
- KRAUSS V. *Mutantenanalyse, evolutionäre Konservierung und Interaktionen des Su(var)3-9-Gens - ein dosisabhängiges Modifikatorgen für Positioneffekt-Variation bei Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle, 1995.
- KRAUSS V UND REUTER G. Two Genes Become One: The Genes Encoding Heterochromatin Protein SU(VAR)3-9 and Translation Initiation Factor Subunit eIF-2 γ Are Joined to a Dicistronic Unit in Holometabolic Insects. *Genetics*, **156**(3):1157–1167, 2000.
- KUHFITIG S, SZABAD J, SCHOTTA G, HOFFMANN J, MATHE A UND REUTER G. pitkin^D, a novel gain-of-function enhancer of position-effect variegation, affects chromatin regulation during oogenesis and early embryogenesis in Drosophila. *Genetics*, **157**(3):1227–1244, 2001.
- LACHNER M, O'CARROLL D, REA S, MECHTLER K UND JENUWEIN T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**(6824):116–120, 2001.
- LAEMMLI U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680–685, 1970.
- LECHNER MS, BEGG GE, SPEICHER DW UND RAUSCHER FJ. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol*, **20**(17):6449–6465, 2000.

- LEHMING N, SAUX AL, SCHÜLLER J UND PTASHNE M. Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(13):7322–7326, 1998.
- LIMA DI FARIA A UND JAWORSKA H. Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature*, **217**:138–142, 1968.
- LINDSLEY DL UND ZIMM GG. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, 1992.
- LOCKE J, KOTARSKI M UND TARTOF K. Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics*, **120**:181–198, 1988.
- LOHE AR, HILLIKER AJ UND ROBERTS PA. Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **134**(4):1149–1174, 1993.
- LU BY, BISHOP CP UND EISSENBERG JC. Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing. *EMBO J*, **15**(6):1323–1332, 1996.
- LU BY, MA J UND EISSENBERG JC. Developmental regulation of heterochromatin-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development*, **125**(12):2223–2234, 1998.
- MELCHER M, SCHMID M, AAGAARD L, SELENKO P, LAIBLE G UND JENUWEIN T. Structure-Function Analysis of SUV39H1 Reveals a Dominant Role in Heterochromatin Organization, Chromosome Segregation and Mitotic Progression. *Mol Cell Biol*, **20**(10):3728–3841, 2000.
- MITCHISON TJ UND SEDAT JW. Localization of antigenic determinants in whole *Drosophila* embryos. *Dev Biol*, **99**(1):261–264, 1983.
- MOTTUS R, SOBEL RE UND GRIGLIATTI TA. Mutational analysis of a histone deacetylase in *Drosophila melanogaster*: missense mutations suppress gene silencing associated with position effect variegation. *Genetics*, **154**(2):657–668, 2000.
- MULLER H. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics*, **22**:299–334, 1930.
- MURZINA N, VERREAULT A, LAUE E UND STILLMAN B. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell*, **4**(4):529–540, 1999.

- NAKAYAMA J, RICE JC, STRAHL BD, ALLIS CD UND GREWAL SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**(5514):110–113, 2001.
- NIELSEN PR, NIETLISPACH D, MOTT HR, CALLAGHAN J, BANNISTER A, KOUZARIDES T, MURZIN AG, MURZINA NV UND LAUE ED. Structure of the HP1 chromo-domain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, **416**(6876):103–107, 2002.
- NISHIOKA K, CHUIKOV S, SARMA K, ERDJUMENT-BROMAGE H, ALLIS CD, TEMPST P UND REINBERG D. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev*, **16**(4):479–489, 2002.
- NUR U. Heterochromatization and euchromatization of whole genomes in scale insects (Coccoidea: Homoptera). *Dev Suppl*, Seiten 29–34, 1990.
- O'CARROLL D, SCHERTHAN H, PETERS AH, OPRAVIL S, HAYNES AR, LAIBLE G, REA S, SCHMID M, LEBERSORGER A, JERRATSCH M, SATTLER L, MATTEI MG, DENNY P, BROWN SD, SCHWEIZER D UND JENUWEIN T. Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol*, **20**(24):9423–9433, 2000.
- PAK DT, PFLUMM M, CHESNOKOV I, HUANG DW, KELLUM R, MARR J, ROMANOWSKI P UND BOTCHAN MR. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eucaryotes. *Cell*, **91**(3):311–323, 1997.
- PAPAYANNOPOULOS V, TOMLINSON A, PANIN VM, RAUSKOLB C UND IRVINE KD. Dorsal-Ventral Signaling in the Drosophila Eye. *Science*, **281**:2031–2034, 1998.
- PARDUE ML. The ends and the middle: putting chromosomes together. *Curr Opin Genet Dev*, **4**(6):845–850, 1994.
- PARO R UND HOGNESS DS. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(1):263–267, 1991.
- PERRIN L, DEMAKOVA O, FANTI L, KALLENBACH S, SAINGERY S, MAL'CEVA NI, PIMPINELLI S, ZHIMULEV I UND PRADEL J. Dynamics of the sub-nuclear distribution of Modulo and the regulation of position-effect variegation by nucleolus in Drosophila. *J Cell Sci*, **111**(Pt 1):2753–2761, 1998.

- PETERS AH, MERMOUD JE, O'CARROLL D, PAGANI M, SCHWEIZER D, BROCKDORFF N UND JENUWEIN T. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet*, **30**(1):77-80, 2002.
- PETERS AH, O'CARROLL D, SCHERTHAN H, MECHTLER K, SAUER S, SCHÄFER C, WEIPOLTSHAMMER K, PAGANI M, LACHNER M, KOHLMAIER A, OPRAVIL S, DOYLE M, SIBILIA M UND JENUWEIN T. Loss of the *su(v)39h* histone methyltransferases impairs Mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, **107**(3):323-337, 2001.
- PIMPINELLI S, BERLOCO M, FANTI L, DIMITRI P, BONACCORSI S, MARCHETTI E, CAIZZI R, CAGGESE C UND GATTI M. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(9):3804-3808, 1995.
- PIRROTTA V. PcG complexes and chromatin silencing. *Curr Opin Genet Dev*, **7**(2):249-258, 1997.
- PLATERO JS, HARTNETT T UND EISSENBERG JC. Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J*, **14**(16):3977-3986, 1995.
- PLATERO JS, SHARP EJ, ADLER PN UND EISSENBERG JC. In vivo assay for protein-protein interactions using *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma*, **104**(6):393-404, 1996.
- PYRPASOPOULOU A, MEIER J, MAISON C, SIMOS G UND GEORGATOS SD. The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *EMBO J*, **15**(24):7108-7119, 1996.
- RAUSKOLB C, CORREIA T UND IRVINE KD. Fringe-dependent separation of dorsal and ventral cells in the *Drosophila* wing. *Nature*, **401**(6752):476-480, 1999.
- REA S, EISENHABER F, O'CARROLL D, STRAHL BD, SUN ZW, SCHMID M, OPRAVIL S, MECHTLER K, PONTING CP, ALLIS CD UND JENUWEIN T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**(6796):593-599, 2000.
- REUTER G, DORN R, WUSTMANN G, FRIEDE B UND RAUH G. Third chromosome suppressor of position-effect variegation loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, **202**(3):481-487, 1986.

- REUTER G, GUIARRE M, FARAH J, GAUSZ J, SPIERER A UND SPIERER P. Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of a gene encoding an unusual zinc-finger protein. *Nature*, **344**:219-223, 1990.
- REUTER G UND SPIERER P. Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays*, **14**(9):605-612, 1992.
- REUTER G UND SZIDONYA J. Cytogenetic analysis of variegation suppressors and a dominant temperature-sensitive lethal in region 23-26 of chromosome 2L in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **88**(4):277-285, 1983.
- REUTER G UND WOLFF I. Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, **182**(3):516-519, 1981.
- ROZOVSKAIA T, TILLIB S, SMITH S, SEDKOV Y, ROZENBLATT-ROSEN O, PETRUK S, YANO T, NAKAMURA T, BEN-SIMCHON L, GILDEA J, CROCE CM, SHEARN A, CANAANI E UND MAZO A. Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter. *Mol Cell Biol*, **19**(9):6441-6447, 1999.
- RUBERTIS FD, KADOSH D, HENCHOZ S, PAULI D, REUTER G, STRUHL K UND SPIERER P. The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature*, **384**(6609):589-591, 1996.
- RUBIN GM UND SPRADLING AC. Genetic transformation of *Drosophila melanogaster* with transposable element vectors. *Science*, **218**:348-353, 1982.
- RUBIN GM UND SPRADLING AC. Vectors for P-element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucl Acids Res*, **11**:6341-6351, 1983.
- RUDOLPH T, LU B, WESTPHAL T, SZIDONYA J, EISSENBERG JC UND REUTER G. New type of CyO and TM3 green balancers. *DIS*, **82**:99-100, 1999.
- RYAN RF, SCHULTZ DC, AYYANATHAN K, SINGH PB, FRIEDMAN JR, FREDERICKS WJ UND RAUSCHER FJ. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Krüppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, **19**(6):4366-4378, 1999.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF UND MANIATIS T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- SASS GL UND HENIKOFF S. Comparative Analysis of Position-Effect Variegation Mutations in *Drosophila melanogaster* Delineates the Targets of Modifiers. *Genetics*, **148**(2):733–741, 1998.
- SCHOTTA G. *Charakterisierung einer antimorphen Mutation für den Transkriptionsregulator E(var)3-93D bei Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1997.
- SCHOTTA G, EBERT A, KRAUSS V, FISCHER A, HOFFMANN J, REA S, JENUWEIN T, DORN R UND REUTER G. Central Role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J*, **21**(5):1121–1131, 2002.
- SCHOTTA G UND REUTER G. Controlled expression of tagged proteins in *Drosophila* using a new modular P-element vector system. *Mol Gen Genet*, **262**(6):916–920, 2000.
- SCHULTZ J. Variegation in *Drosophila* and the inert heterochromatic regions. *Proc Nat Acad Sci U S A*, **22**:27–33, 1936.
- SEELER JS, MARCHIO A, SITTERLIN D, TRANSY C UND DEJEAN A. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(13):7316–7321, 1998.
- SEIKI. Amplification of genomic DNA. In JJ White und TJ White, Hg., *PCR Protocols. A guide to methods and applications*, Seiten 13–20. Academic Press, 1990.
- SEUM C, SPIERER A, PAULI D, SZIDONYA J, REUTER G UND SPIERER P. Position-effect variegation in *Drosophila* depends on dose of the gene encoding the E2F transcriptional activator and cell cycle regulator. *Development*, **122**(6):1949–1956, 1996.
- SILVER LM UND ELGIN SCR. Production and characterization of antisera against three individual NHC proteins; a case of a generally distributed NHC protein. *Chromosoma*, **68**(2):101–104, 1978.
- SINCLAIR DA, LLOYD VK UND GRIGLIATTI TA. Characterization of mutations that enhance position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, **216**(2-3):328–333, 1989.

- SINCLAIR DAR, MOTTUS RC UND GRIGLIATTI TA. Genes which suppress position effect variegation in *Drosophila melanogaster* are clustered. *Mol Gen Genet*, **191**:326–333, 1983.
- SINGH PB, MILLER JR, PEARCE J, KOTHARY R, BURTON RD, PARO R, JAMES TC UND GAUNT SJ. A sequence motif found in *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res*, **19**(4):789–794, 1991.
- SMOTHERS JF UND HENIKOFF S. The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol*, **10**(1):27–30, 2000.
- SMOTHERS JF UND HENIKOFF S. The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of hp1-like proteins. *Mol Cell Biol*, **21**(7):2555–2569, 2001.
- SPOFFORD JB. *The Genetics and Biology of Drosophila*, Kap. Position-effect variegation in *Drosophila*, Seiten 955–1018. Academic Press, New York, 1976.
- STASSEN MJ, BAILEY D, NELSON S, CHINWALLA V UND HARTE PJ. The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech Dev*, **52**(2-3):41–45, 1995.
- STRAHL BD UND ALLIS CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**(6765):41–45, 2000.
- STRAHL BD, BRIGGS SD, BRAME CJ, CALDWELL JA, KOH SS, MA H, COOK RG, SHABANOWITZ J, HUNT DF, STALLCUP MR UND ALLIS CD. Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr Biol*, **11**(12):996–1000, 2001.
- STRAHL BD, GRANT PA, BRIGGS SD, SUN ZW, BONE JR, CALDWELL JA, MOLLAH S, COOK RG, SHABANOWITZ J, HUNT DF UND ALLIS CD. Set2 Is a Nucleosomal Histone H3-Selective Methyltransferase That Mediates Transcriptional Repression. *Mol Cell Biol*, **22**(5):1298–1306, 2002.
- TACHIBANA M, SUGIMOTO K, FUKUSHIMA T UND SHINKAI Y. 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**(27):25309–25317, 2001.
- TADDEI A, MAISON C, ROCHE D UND ALMOUZNI G. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol*, **3**(2):114–120, 2001.

- TAMARU H UND SELKER EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, **414**(6861):277–283, 2001.
- TRIPOULAS N, LAJEUNESSE D, GILDEA J UND SHEARN A. The *Drosophila ash1* Gene Product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. *Genetics*, **143**(2):913–928, 1996.
- TSCHIRSCH B. *Molekulargenetische Analyse des Su-var(3)9 Gens- ein dosisabhängiges Modifikatorgen für Positioneffekt-Variation bei Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle, 1993.
- TSCHIRSCH B, HOFMANN A, KRAUSS V, DORN R, KORGE G UND REUTER G. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J*, **13**(16):3822–3831, 1994.
- TURNER BM. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci*, **54**(1):21–31, 1998.
- VAUTE O, NICOLAS E, VANDEL L UND TROUCHE D. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, **30**(2):475–481, 2002.
- WANG H, HUANG ZQ, XIA L, FENG Q, ERDJUMENT-BROMAGE H, STRAHL BD, BRIGGS SD, ALLIS CD, WONG J, TEMPST P UND ZHANG Y. Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitates Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. *Science*, **293**(5531):853–857, 2001.
- WEILER KS UND WAKIMOTO BT. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, **29**:577–605, 1995.
- WESTPHAL T UND REUTER G. Recombinogenic effects of suppressors of position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics*, **160**(2):609–21, 2002.
- WINES DR UND HENIKOFF S. Somatic instability of a *Drosophila* chromosome. *Genetics*, **131**(3):683–691, 1992.
- WUSTMANN G. *Cytogenetische Analysen von Modifikatorgenen für Positioneffekt-Variation bei Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle, 1988.
- WUSTMANN G, SZIDONYA J, TAUBERT H UND REUTER G. The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, **217**:520–527, 1989.

- YANG L, XIA L, WU DY, WANG H, CHANSKY HA, SCHUBACH WH, HICKSTEIN DD UND ZHANG Y. Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene*, **21**(1):148–152, 2002.
- YE Q, CALLEBAUT I, PEZHMAN A, COURVALIN JC UND WORMAN HJ. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem*, **272**(23):14983–14989, 1997.
- YE Q UND WORMAN HJ. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1. *J Biol Chem*, **271**(25):14653–14656, 1996.
- ZHANG P UND SPRADLING AC. Insertional mutagenesis of Drosophila heterochromatin with single P elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(9):3539–3543, 1994.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Reuter für die Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft, sowie umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung genetischer Arbeiten. Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. G. Reuter und Stefan Löttsch für die Bereitstellung der *Su(var)3-9*-Mutanten bedanken.

Dr. T. Jenuwein möchte ich für die gute Kooperation und die Möglichkeit danken, am IMP in Wien proteinbiochemische Methoden kennengelernt zu haben.

Bei Dr. Axel Imhof und Birgit Czermin möchte ich mich für die gute Kooperation und insbesondere für die Erlernung der HMTase-Assays bedanken.

Bei Prof. S. Pimpinelli und Laura Fanti möchte ich mich für den Aufenthalt in Rom bedanken, bei dem ich die Gelegenheit bekam, in einem der besten immunzytologischen Labore zu arbeiten.

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

Der gesamten Arbeitsgruppe Drosophilagenetik gilt mein besonderer Dank für das gute Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich Anja Ebert und Jan Hoffmann für zytologische Analysen, Andreas Kegel für die Arbeiten zur Herstellung des SU(VAR)3-9 Antikörpers, weiterhin Veiko Krauß für die Klone der Mutanten *Su(var)3-9^{l3}* und *Su(var)3-9^{l5}* und Andreas Fischer für die Interaktionsklone aus dem Hefe-Dihybrid-System danken.

Ganz besonders möchte ich schließlich meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Halle, den 16. September 2002

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname Schotta, Gunnar
Anschrift Waldheimer Str. 217, 01683 Nossen
Geburtsdatum 21.01.1972
Geburtsort Meißen
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1978 - 1982 Besuch der Grundschule in Rhäsa (bei Nossen)
1982 - 1988 Besuch der Allgemeinbildenden Oberschule in Nossen
1988 - 1991 Berufsausbildung mit Abitur (Gartenbau) in Coswig

wissenschaftlicher Werdegang

1991 - 1992 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1992 - 1993 Zivildienst in Heynitz (bei Nossen)
1993 - 1997 Fortsetzung des Biochemie-Studiums
1997 Diplomarbeit am Institut für Genetik der MLU Halle
Thema: Charakterisierung einer antimorphen Mutation für den Transkriptionsregulator *E(var)3-93D* bei *Drosophila melanogaster*
Betreuer: Dr. R. Dorn
1997-2002 Promotionsstudium am Institut für Genetik der MLU Halle
Betreuer: Prof. Dr. G. Reuter

Halle, den 16. September 2002