

***Su(var)*-Gene regulieren die Balance zwischen
Euchromatin und Heterochromatin in *Drosophila
melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Frau Anja Ebert
geb. am: 24.12.1975 in: Plauen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Reuter
2. Prof. Dr. Thomas Jenuwein

Halle (Saale), 02.11.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009789

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009789>]

Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	Charge Coupled Device
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
E(var)	Enhancer of Variegation
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
H3-K9	Lysin 9 von Histon H3
H3-K27	Lysin 27 von Histon H3
H4-K20	Lysin 20 von Histon H4
HMTase	Histonmethyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	β -Galactosidase
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MBD	methyl-CpG-binding domain
NP40	Nonident P40
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline + 0.2% Tween 20
PcG	Polycomb-Gruppenproteine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEV	Positionseffekt-Variegation
PMEF	Primary Mouse Embryo Fibroblasts
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
preSET	cysteinreiche Domäne vor der SET-Domäne
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase

postSET	cysteinreiche Domäne nach der SET-Domäne
PVDF	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuclease
SET	<u>Su</u> (var)3-9 / <u>E</u> nhancer of zeste / <u>T</u> rithorax
SDS	Natriumdodecylsulfat
Su(var)	Suppressor of Variegation
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TOTO-3	DNA-Farbstoff (Molecular Probes)
TR	Texas Red
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactosid
X _i	inaktives X-Chromosom

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	10
2.1	Genetische Methoden	10
2.1.1	Anzucht der Fliegen	10
2.1.2	Verwendete Stämme und Stabilisierungschromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	10
2.1.3	<i>In vivo</i> -Interaktion von SU(VAR)3-9 und HP1	11
2.1.4	Generierung von <i>Su(var)2-5</i> , <i>E(z)</i> und <i>Su(var)3-9</i> Null-Larven	11
2.1.5	Analyse der Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9 und HP1	11
2.1.6	Genetische Klassifizierung der <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten	11
2.1.7	Analyse der <i>Su(var)3-9^{ptn}</i> -Mutante	12
2.1.8	Einfluß von <i>Suv4-20^{BG00814}</i> auf PEV	12
2.1.9	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen <i>Su(var)3-9</i> und <i>Suv4-20</i>	12
2.1.10	Blockierung der Heterochromatisierung durch <i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> in der Translokation <i>w^{m258-21}</i>	13
2.1.11	Untersuchung des Effektes von <i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> auf <i>Su(var)3-9</i> -induziertes Gensilencing	13
2.1.12	Herstellung transgener <i>Drosophila</i> -Linien	14
2.2	Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1	Verwendete Plasmide und Bakterienstämme	14
2.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	14
2.2.3	DNA-Isolation aus einzelnen Fliegen	15
2.2.4	Inverse PCR	15
2.3	Proteinbiochemische Methoden	15
2.3.1	Herstellung von Kernextrakten aus <i>Drosophila</i> -Embryonen	15
2.3.2	Herstellung von Kernextrakten aus <i>Drosophila</i> -Larven	16
2.3.3	Saure Extraktion von Proteinen aus isolierten Kernen	16
2.3.4	Gelelektrophorese von Proteinen	16
2.3.5	Nachweis von Proteinen im Westernblot	17
2.4	Immunzytologische Methoden	17
2.4.1	<i>In vivo</i> -Detektion von EGFP	17
2.4.2	Enzymatischer Assay für <i>lacZ</i> -Expression	19
2.4.3	Immunmarkierung von Polytänchromosomen	20
2.4.4	Immunmarkierung von Embryonen	20
2.4.5	Immunmarkierung von Ovarien	21

3 Ergebnisse	22
3.1 Die Funktion von <i>Su(var)3-9</i> im heterochromatischen Gensilencing erfolgt Dosis-abhängig	22
3.2 SU(VAR)3-9 ist wichtig für eine korrekte Chromosomensegregation während der frühen Embryonalentwicklung	22
3.2.1 SU(VAR)3-9 ist ein maternales Protein	22
3.2.2 Verlust von SU(VAR)3-9 führt zu Segregationsdefekten in frühen Embryonen	24
3.2.3 Maternal bereitgestelltes SU(VAR)3-9 ist erforderlich für eine korrekte Embryonalentwicklung	26
3.2.4 Der Verlust von SU(VAR)3-9 führt zu Defekten in Ovarien	31
3.3 SU(VAR)3-9 ist mit heterochromatischen Bereichen assoziiert	34
3.3.1 SU(VAR)3-9 und HP1 sind Interaktionspartner	36
3.3.2 SU(VAR)3-9 und HP1 binden mit unterschiedlicher Affinität an das Chromatin	36
3.4 Kontrolle der H3-K9 bzw. H3-K27 Methylierungsstadien in <i>Drosophila melanogaster</i>	39
3.4.1 H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung in Polytänchromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	41
3.4.2 H3-K27 mono-, di- und tri-Methylierung in Polytänchromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	44
3.4.3 Massenspektrometrische Analyse von Histonen	44
3.4.4 Anreicherung der H3-K9 bzw. H3-K27 tri-Methylierung betrifft zentromernahe Bereiche	48
3.4.5 Einfluß von <i>Su(var)3-9</i> auf andere Histon-Modifizierungen in polytänen Speicheldrüsenchromosomen	49
3.5 Das <i>Silencing</i> -Potential von <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten korreliert mit der zugehörigen Histon-Methyltransferase-Aktivität	52
3.5.1 Klassifizierung der <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten anhand genetischer Analysen	53
3.5.2 Kategorisierung der <i>Su(var)3-9</i> -Mutanten anhand der H3-K9-Methylierung <i>in vivo</i>	54
3.6 H4-K20 tri-Methylierung als neue Markierung repressiver Chromatinzustände	61
3.6.1 H4-K20-Methylierung im Chromozentrum ist SU(VAR)3-9-abhängig	61
3.6.2 <i>SUV4-20</i> vermittelt H4-K20 tri-Methylierung	63
3.6.3 <i>Sw4-20</i> ist ein dominanter Suppressor für Positioneffekt-Variegation	65
3.6.4 Letale Wechselwirkung zwischen <i>Su(var)3-9</i> und <i>Sw4-20</i>	66
3.7 Charakterisierung von neuen <i>JIL-1</i> -Mutanten als bedeutende Regulatoren von PEV	68
3.7.1 <i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> -Mutanten zeigen normale H3-S10-Phosphorylierungsmuster	69
3.7.2 Veränderte Chromosomenmorphologie in <i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> -Mutanten	69

Inhaltsverzeichnis

3.7.3	Repressive oder aktivierende Histon-Modifikationen sind in <i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> -Mutanten nicht verändert	72
3.7.4	<i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> blockiert die Ausbreitung heterochromatischer Chromatinstrukturen	78
3.7.5	<i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> -Mutanten hemmen generell die Ausbreitung <i>Su(var)3-9</i> -vermittelter Heterochromatisierung	80
3.7.6	Die massive Heterochromatisierung in <i>Su(var)3-9^{ptn}</i> wird durch <i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> verhindert	84
4	Diskussion	86
4.1	Kontrolle der repressiven H3-K9 und H3-K27 Methylierungsstadien .	86
4.2	Kontrolle der Organisation heterochromatischer Chromatinzustände durch <i>Su(var)3-9</i> -abhängige H3-K9-Methylierung	90
4.3	Kombinatorisches Muster der H3-K9- und H4-K20-Methylierung für konstitutives Heterochromatin	93
4.4	<i>JIL-1^{Su(var)3-1}</i> reguliert die Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin in <i>Drosophila melanogaster</i>	96
5	Zusammenfassung	100
A	Literaturverzeichnis	102

1 Einleitung

Die Komplexität eines Organismus wird durch die Kontrolle der räumlich und zeitlich präzisen Ausprägung seiner Gene bestimmt. Eukaryotische Organismen bestehen weitestgehend aus genetisch identischen Zellen, die sich dennoch in Form und Funktion voneinander unterscheiden. Dieser Kontrast entsteht durch die spezifischen Expressionsmuster der Gene, die während der Zelldifferenzierung etabliert und durch epigenetische Prozesse aufrechterhalten werden. Die genetischen Expressionsmuster können selbst während der DNA-Replikation, Chromatinassemblierung und Zellteilung bestehenbleiben. Diese Art der Aufrechterhaltung der Zellidentität wird als "cellular memory" bezeichnet (Turner, 2002). Der Mechanismus, der die flexible Verpackung der ca. 2m DNA im Kern einer humanen Zelle gewährleistet, bleibt jedoch nach wie vor rätselhaft.

Die Chromatinstruktur, ein komplexes Arrangement aus DNA, Proteinen und RNAs, spielt eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der Genexpression. Die grundlegende, sich wiederholende Verpackungseinheit des Chromatins ist das Nucleosom, in welchem 147 Basenpaare der DNA um ein Oktamer von Histonen, bestehend aus je zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4, oder in einigen Fällen speziellen Varianten dieser Proteinfamilien (Malik und Henikoff, 2003), gewunden sind (Luger et al., 1997). Der Umfang der erzielten Verpackung ist bescheiden, nichtsdestotrotz spielt die Organisation der DNA in Nucleosomen eine kritische Rolle in der Etablierung höhergeordneter Chromatinstrukturen.

Man unterscheidet generell zwei Arten von Chromatin, Euchromatin und Heterochromatin, die zytologisch differenzierbar sind (Heitz, 1928). Euchromatische Domänen bilden offene, transkriptionsaktive Strukturen aus und enthalten die Mehrheit der Gene. Konstitutives Heterochromatin verbleibt kondensiert während des Zellzyklusses, wird spät in der Interphase repliziert (Lima di Faria und Jaworska, 1968), enthält nur wenige Transkriptionseinheiten (Gatti und Pimpinelli, 1992), besteht größtenteils aus hoch- und mittelrepetitiven Sequenzen (Lohe et al., 1993; Pimpinelli et al., 1995; Laurent et al., 1997) und ist im Allgemeinen auf Zentromer- bzw. Telomerregionen konzentriert (Blackburn, 1994; Pardue, 1994). Desweiteren zeigen Analysen unter Verwendung von Mikrokokken-Nuclease, daß Heterochromatin eine weitaus regelmäßigeren Nucleosomen-

struktur aufweist als Euchromatin (Wallrath und Elgin, 1995; Sun et al., 2001). Die Zugänglichkeit für *Dnase I* und Endonucleasen ist reduziert, jedoch der Umstand, daß die Linker-Region zwischen den Nucleosomen noch immer für die kleinere Mikrokokken-Nuclease zugänglich ist, zeigt, daß die höhergeordnete Struktur des Heterochromatins keineswegs die DNA komplett einhüllt. Entgegen früherer Annahmen [diskutiert in Pardue und Hennig (1990)] ist das Heterochromatin in verschiedene wesentliche Kernfunktionen involviert, einschließlich Kern-Organisation (Cremer et al., 2004), Chromosomensegregation und Crossing-over während Mitose und Meiose (Wines und Henikoff, 1992; Hawley et al., 1992; Westphal und Reuter, 2002), Genom-Variabilität (Dimitri und Junakovic, 1999; Birchler et al., 2000) bzw. die Wahrung des Genoms gegenüber mobilen Elementen (Henikoff und Matzke, 1997) sowie Gensilencing (Wallrath, 1998; Wakimoto, 1998).

In den letzten Jahren ist deutlich geworden, daß die Beschaffenheit des Nucleosoms, neben der Verpackung der DNA, eine weitere bedeutende und konservierte Funktion bei der Regulation der Gen-Expression ausübt. Die N-terminalen Enden der hoch konservierten basischen Histone ragen aus der Oberfläche des Nucleosoms heraus (Luger et al., 1997) und sind vielfältigen posttranslationalen Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitinierung (Strahl und Allis, 2000) unterworfen. Obwohl die Art dieser Modifizierungen seit langem bekannt ist (van Holde, 1988), wurde deren biologische Relevanz erst seit wenigen Jahren in vollem Umfang erkannt. Histon-Modifikationen sind mit hochdynamischen Veränderungen der Organisation der Chromatinstruktur verbunden (Luger, 2003) und bieten auf diese Weise eine molekulare Grundlage epigenetischer Informationen (Turner, 2000). Es wird angenommen, daß spezifische Histon-Modifizierungen, oder Kombinationen dieser, einen Informationscode bilden, der den entsprechenden Chromatinstatus definiert (Jenuwein und Allis, 2001; Richards und Elgin, 2002). Dieser Histon-Code, von spezifischen Histon-modifizierenden Enzymen determiniert, generiert neue Bindungsstellen im Nucleosom, die von Nicht-Histon-Proteinen, welche für nachgeschaltete zelluläre Prozesse von Bedeutung sind, erkannt werden können. Die Epigenetik definiert vererbte Veränderungen der Gen-Expression ohne Veränderungen innerhalb der DNA-Sequenz (Wolffe und Matzke, 1999). Epigenetische Prozesse können demnach, durch Aktivierung oder Inaktivierung funktioneller Gene, als ein ausgeklügeltes System zur selektiven Nutzung genetischer Informationen angesehen werden. Auf der molekularen Ebene beinhaltet die Etablierung, Aufrechterhaltung und Vererbung spezifischer Chromatinstrukturen ein Zusammenspiel unterschiedlichster Proteine, wie Histon-modifizierende Enzyme,

DNA-Methyltransferasen, Chromatin-Remodelling-Faktoren, Transkriptionsfaktoren sowie Komponenten der RNAi-Maschinerie (Volpe et al., 2002). Wohldefinierte Prozesse während der Entwicklung, wie beispielsweise die Inaktivierung eines der beiden weiblichen X-Chromosomen (Barr-Körperchen) in Säugern, genomisches Imprinting oder die Differenzierung von Zellen und Geweben bieten gute Ansätze für die Untersuchung der molekularen Grundlagen epigenetischer Markierungen der Gen-Expression.

Ein weiterer biologischer Prozess, der ausgezeichnet dafür geeignet ist, neue interessante Einblicke in epigenetische Regulationsmechanismen höhergeordneter heterochromatischer Chromatinzustände zu gewinnen, ist das Phänomen der Positionseffekt-Variegation (PEV). Euchromatische, normalerweise aktive Gene, durch chromosomale Rearrangements in die Nähe oder innerhalb heterochromatischer Bereiche platziert, werden stillgelegt, was sich meist in einem variierten Phänotyp äußert (Weiler und Wakimoto, 1995). PEV wurde zuerst in *Drosophila* beschrieben (Muller, 1930), als das *white*-Gen, erforderlich für die rote Augenpigmentierung, infolge einer Inversion in die Nähe des zentromerischen Heterochromatins gebracht wurde (Schultz, 1936). Die Inaktivierung des *white*-Gens führt durch unkontrollierte Ausbreitung des Heterochromatins in einem Teil der Zellpopulation zu einer rot-weißen mosaikartigen Augenpigmentierung (white-mottled-Phänotyp) (Muller, 1930; Tartof et al., 1984). Gensilencing aufgrund von Positionseffekten ist ebenfalls für euchromatische Gene, die nahe oder innerhalb des Paarungstyp-Locus bzw. Telomerbereichen von *Saccharomyces cerevisiae* (Grunstein, 1997) oder von *Schizosaccharomyces pombe* (Allshire et al., 1994; Grewal und Klar, 1997), sowie Maus-Zentromeren (Festenstein et al., 1996; Lundgren, 2000) positioniert wurden, nachweisbar. Die Ausbreitung des Heterochromatins auf normalerweise euchromatische Bereiche kann in einigen geeigneten PEV-Rearrangements überdies zytologisch nachgewiesen werden, wobei diese Regionen dabei Merkmale des Heterochromatins, wie verstärkte Kompaktierung, späte Replikation und Unterreplikation (Reuter et al., 1982; Zhimulev, 1998) aufweisen.

Da Heterochromatin-induziertes Gensilencing infolge von Positionseffekten in *Drosophila melanogaster* ein überaus gut charakterisiertes genetisches Modellsystem darstellt, ist es besonders geeignet, um mit Hilfe genetischer Screens Modifikatoren zu isolieren, die epigenetische Prozesse in eukaryotischen Organismen steuern (Reuter und Wolff, 1981; Sinclair et al., 1983; Wustmann et al., 1989; Dorn et al., 1993b). Die auf diese Weise identifizierten Mutationen supprimieren (Suppressor of Variegation [*Su(var)s*]) oder verstärken (Enhancer of Variegation [*E(var)s*]) PEV (Wustmann et al., 1989). Da die Suppression eines PEV-

Phänotyps eine reduzierte Befähigung des Heterochromatins, das Marker-Gen zu inaktivieren, erkennen läßt, wurde postuliert, daß *Su(var)s* für Gene kodieren, die direkt oder indirekt an der Etablierung heterochromatischer Chromatinstrukturen beteiligt sind (Locke et al., 1988). Im Gegensatz dazu sollten *E(var)s* Gene darstellen, die dem Silencingpotential des Heterochromatins entgegenwirken bzw. die Ausildung euchromatischer Chromatinstrukturen begünstigen. Einige Modifikatoren zeigen bei Erhöhung der Gen-Dosis einen umgekehrten Einfluß auf PEV [Triplo-Enhancer- bzw. Triplo-Suppressoreffekte; Wustmann et al. (1989)] und sind von außergewöhnlichem Interesse, da ihre Genprodukte vermutlich in multimeren Proteinkomplexe involviert sind, die direkt am Aufbau höhergeordneter Chromatinstrukturen beteiligt sind (Locke et al., 1988).

Mehr als 100 Dosis-abhängige Modifikatoren für PEV konnten bisher unter Verwendung des *In(1)w^{m4}*-Rearrangements identifiziert werden (Reuter und Spierer, 1992). Interessanterweise hat ein Großteil dieser Mutationen keinen Einfluß auf Positioneffekt-Variation in Telomerregionen in *Drosophila melanogaster* (Weiler und Wakimoto, 1995; Cryderman et al., 1999). Ein Großteil der bisher identifizierten *E(var)s* kodiert für Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren oder Chromatin-Remodelling-Faktoren, wie *mod(mdg4)* (Dorn et al., 1993a; Büchner et al., 2000), *E2f* (Seum et al., 1996), *zeste* (Judd, 1995), *Trithorax-like*, [GAGA-Faktor; Farkas et al. (1994)], *brahma* (Tamkun et al., 1992; Büchner et al., 2000) und *Asx* (Sinclair et al., 1998). Die Gene *D-Ubp-64E*, welches für eine putative Ubiquitin-spezifische Protease (Henchoz et al., 1996) kodiert bzw. *hel*, eine putative ATP-abhängige RNA-Helicase (Eberl et al., 1997), gehören zu der Gruppe der Haplo-Enhancer, die bei Erhöhung der Gen-Dosis einen entgegengesetzten Effekt auf PEV zeigen (Triplo-Suppressor). Molekular charakterisierte Suppressoren für PEV kodieren Chromatin-assoziierte Proteine, die über verschiedene hochkonservierte Protein-Domänen verfügen und vielfältige Funktionen ausüben. *Su(var)2-10*, ein Mitglied der Familie der PIAS-Proteine, welche in Prozesse der Sumoylierung involviert sind (Sachdev et al., 2001), kontrolliert vielfältige Aspekte der Chromosomenstruktur und -Funktion (Hari et al., 2001). Mutanten des Satellitenbindenden Proteins D1, welches 10 AT-Hook-Motive enthält, supprimieren PEV, währenddessen die Überexpression dieses Proteins PEV verstärkt (Aulner et al., 2002). Suppressorgene kodieren auch für Proteine, die in Chromatin-Remodelling und -Assemblierung involviert sind, wie *domino* (Ruhf et al., 2001) und *acfl* (Fyodorov et al., 2004), RNA/DNA-bindende Proteine, wie *modulo* (Perrin et al., 1998), oder Faktoren der DNA-Replikation, wie *mus209* [PCNA; Henderson et al. (1994)], *DmORC2* (Pak et al., 1997) und *cav* [HOAP; Badugu et al. (2003)]. Suppressoren kodieren desweiteren für Histon-modifizierende Enzyme, wie die Histon-

Deacetylasen *HDAC1* (Rubertis et al., 1996; Mottus et al., 2000) und *dSir2* (Newman et al., 2002), die Histon-Acetyltransferase *chameau* (Grienenberger et al., 2002) oder *Su(var)3-6* [Protein-Phosphatase PP1; Baksa et al. (1993)]. Mutationen in einigen Polycomb-Gruppengenen (PcG), negative Regulatoren homöotischer Gene, wie beispielsweise *Enhancer of Polycomb* (Sinclair et al., 1998), *Su(z)12* (Birve et al., 2001) und, in abgeschwächter Form, *Enhancer of zeste*, (Laible et al., 1997) supprimieren ebenfalls PEV. Aufgrund ihres Haplo-Suppressor-/Triplo-Enhancereffektes sind drei weitere Gene von besonderem Interesse: *Su(var)2-5*, welches das Heterochromatinprotein 1 (HP1) kodiert (Eissenberg et al., 1990), *Su(var)3-7* (Reuter et al., 1990) und *Su(var)3-9* (Tschiersch et al., 1994). Die Dosis-abhängigen Effekte auf Heterochromatin-induziertes Gensilencing implizieren, daß selbst feine Unterschiede in der Konzentration der SU(VAR)-Proteine das Ausmaß der Ausbreitung des Heterochromatins beeinflussen können.

Su(var)3-7 wurde als erstes Suppressorgen für PEV kloniert (Reuter et al., 1990). Mutanten, die über homologe Rekombination generiert wurden (Seum et al., 2002), zeigen wie eine den *Su(var)3-7*-Locus einschließende Defizienz einen signifikanten Suppressoreffekt, während durch Erhöhung der genomischen Kopien Heterochromatin-induziertes Gensilencing deutlich verstärkt wird (Reuter et al., 1990; Cleard et al., 1997). Das SU(VAR)3-7-Protein verfügt über sieben Zinkfinger-Motive, wobei jedes Paar der Zinkfinger sowie das Intervall dazwischen eine DNA-Bindedomäne darstellt, welche *in vitro* eine hohe Affinität gegenüber bestimmten Satelliten-Sequenzen aufweist (Cleard und Spierer, 2001). Anhand von Co-Immunpräzipitation bzw. mittels Hefe-Dihybrid-Analysen konnte eine Interaktion von SU(VAR)3-7 mit HP1 (Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000) und SU(VAR)3-9 (Schotta et al., 2002) nachgewiesen werden. Im C-terminalen Teil des SU(VAR)3-7-Proteins befindet sich weiterhin ein BESS-Motiv (Altschul et al., 1997), welches für die Dimerisierung des Proteins von Bedeutung ist. Der C-terminale Bereich nach den Zinkfinger-Motiven ist, aufgrund der hier stattfindenden Interaktion mit Proteinen, für eine spezifische Erkennung und Bindung des Proteins an das perizentrische Heterochromatin erforderlich (Jaquet et al., 2002).

Su(var)2-5 kodiert HP1, welches als erstes Heterochromatin-assoziiertes Protein anhand biochemischer Methoden aus *Drosophila melanogaster* isoliert werden konnte (James und Elgin, 1986). Orthologe Proteine konnten in zahlreichen Organismen, inclusive *Schizosaccharomyces pombe* (Swi6p), Mensch (M31/HP1 β) und selbst in Pflanzen identifiziert werden (Singh et al., 1991). Die drei Vertreter der HP1-Familie [HP1a, HP1b und HP1c in *Drosophila*; Smothers und Henikoff (2001)] sind aus einer N-terminalen Chromo-Domäne, einer C-terminalen

Chromo-Shadow-Domäne und einer variablen Hinge-Region, welche beide Domänen verbindet, zusammengesetzt (Eissenberg und Elgin, 2000). Die Chromo-Domäne bindet mit hoher Affinität di- und tri-methyliertes H3-K9 (Lachner et al., 2001; Bannister et al., 2001). Die Chromo-Shadow-Domäne ist eine Homodimerisierungsdomäne und erkennt eine Konsensus-Pentapeptidsequenz, PxVxL (Thiru et al., 2004), welche in einer wachsenden Anzahl von Kernproteinen nachweisbar ist, die HP1 an spezifische Gene bzw. bestimmte Kernbereiche lokalisiert (Lechner et al., 2005).

Su(var)3-9 stellt einen der stärksten bisher identifizierten Suppressoren für PEV dar und spielt somit offensichtlich eine bedeutende Rolle bei der Steuerung epigenetischer Silencingprozesse (Tschiersch et al., 1994). Im Unterschied zu anderen Organismen, wie beispielsweise Hefe und Mensch, liegt das Gen in *Drosophila melanogaster* in Form einer bicistronischen Transkriptionseinheit mit dem eukaryotischen Translationsfaktor eIF-2 γ vor. Durch alternatives Spleißen werden zwei unabhängige Transkripte generiert, wobei SU(VAR)3-9 die ersten beiden Exonen von eIF-2 γ erhält, die 80 Aminosäuren kodieren (Krauss und Reuter, 2000). SU(VAR)3-9 ist evolutionär von *Schizosaccharomyces pombe* [Clr4p; Ivanova et al. (1998)] bis zum Menschen, wo zwei Orthologe, SUV39H1 (Aagaard et al., 1999) und SUV39H2 (O'Carroll et al., 2000), existieren, konserviert. SU(VAR)3-9 kombiniert zwei Proteindomänen, die Chromo- und die SET-Domäne [SU(VAR)3-9, E(Z), TRITHORAX, (Tschiersch et al., 1994; Jenuwein et al., 1998)] miteinander. Die SET-Domäne wird in SU(VAR)3-9 von der cysteinreichen preSET- und postSET-Domäne eingeschlossen. Neben der strukturellen ist ebenfalls eine funktionelle Konservierung von SU(VAR)3-9 nachweisbar, da sowohl Clr4p in *Schizosaccharomyces pombe*, als auch die menschlichen Homologen von SU(VAR)3-9 in epigenetische Prozesse des Gensilencings involviert sind (Ivanova et al., 1998; Peters et al., 2002). Darüberhinaus ist das menschliche SUV39H1 in der Lage, in *Drosophila* die Funktion von SU(VAR)3-9 zu übernehmen (Schotta et al., 2002).

Die Identifizierung von SUV39H1 als Histon-Lysin-Methyltransferase (HMTase) eröffnete einen molekularen Mechanismus, in welchem diese spezifische Methylierung von Lysin 9 im Histon H3 (H3-K9) eine Bindungsstelle für Heterochromatin-assoziierte Proteine generiert (Rea et al., 2000). Die SET-Domäne trägt die enzymatische Aktivität und beschreibt somit eine neue Klasse von Protein-Methyltransferasen. Einträge in Proteindatenbanken (Schultz et al., 1998) offenbaren eine hohe Zahl an SET-Domänen-Proteinen, 50 allein in der murinen Datenbank. Demgegenüber verfügt *Schizosaccharomyces pombe* über 10 und *Drosophila melanogaster* über 20 SET-Domänen-Proteine. Diese Vielzahl von SET-

Domänen-Genen spiegelt die Anzahl möglicher Modifikationen wider (Kouzarides, 2002). Es ist bekannt, daß Lysin-Methylierung innerhalb der Histone H3 (K4, K9, K27, K36, K79) und H4 (K20) auftritt. Insbesondere die H3-K9-Methylierung bietet offenbar eine Markierung für die Etablierung und Aufrechterhaltung heterochromatischer Domänen. Die murinen Suv39h-Proteine sind für H3-K9-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin verantwortlich (Peters et al., 2001). SUV39H1 sowie SU(VAR)3-9 interagieren mit HP1 (Aagaard et al., 1999; Schotta et al., 2002), das mittels seiner Chromo-Domäne spezifisch H3-K9-Methylierung bindet und somit eine Grundlage für den Aufbau heterochromatischer Chromatinstrukturen darstellt (Nakayama et al., 2001). *Suv39h*-defiziente Mäuse weisen chromosomale Instabilitäten und, daraus folgend, ein erhöhtes Tumor-Risiko auf (Peters et al., 2001). Sie verknüpfen somit die gestörte Etablierung heterochromatischer Strukturen mit einer beeinträchtigten Chromosomenstabilität. Dieser funktionelle Zusammenhang konnte ebenfalls in Mutanten anderer Heterochromatin-assoziiierter Proteine beobachtet werden (Kellum und Alberts, 1995; Ekwall et al., 1996). Desweiteren ist in *Suv39h*-defizienten Mäusen eine beeinträchtigte DNA-Methylierung der Haupt-Satellitensequenzen zu beobachten (Lehnertz et al., 2003). Gleichermäßen kontrolliert DIM-5, das SU(VAR)3-9-homologe Protein in *Neurospora crassa*, DNA-Methylierung (Tamaru und Selker, 2001). SUV39H1/HP1-Komplexe sind nicht ausschließlich auf das perizentrische Heterochromatin beschränkt. Dies belegen Daten, die zeigen, daß das Tumor-Suppressor-Protein Retinoblastoma (Rb) SUV39H1/HP1 an den Cyclin E-Promotor rekrutiert, wo infolge der SUV39H1-abhängigen H3-K9-Methylierung eine Inaktivierung der Genexpression erfolgt (Nielsen et al., 2001).

Zusätzlich zu SUV39H1/SU(VAR)3-9 konnten fünf weitere SET-Domänen-Proteine, die alle mit Ausnahme von E(Z) eine preSET-Domäne enthalten, als H3-K9-spezifische HMTasen identifiziert werden: SUV39H2 (O'Carroll et al., 2000), G9A (Tachibana et al., 2001) und EuHMTase1 (Ogawa et al., 2002), ESET (Yang et al., 2002) sowie E(Z) (Czermin et al., 2002).

Die Proteine G9A und EuHMTase1 verfügen über Ankyrin-Repeats, welche eine Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen bieten (Sedgwick und Smerdon, 1999). G9A weist eine HMTase-Aktivität sowohl für H3-K9 als auch H3-K27 auf (Tachibana et al., 2001). *G9a*-defiziente Mäuse zeigen frühe embryonale Letalität sowie eine drastische Reduktion der H3-K9 di-Methylierung, jedoch ausschließlich innerhalb euchromatischer Bereiche (Tachibana et al., 2002). Bemerkenswert sind Analysen betreffend das Prader-Willi Syndrom Imprinting-Center. Diese besagen, daß die reduzierte H3-K9-Methylierung in *G9a*-defizienten embryonalen Stammzellen die Aufrechterhaltung der Eltern-spezifischen CpG-Methylierung

beeinträchtigt, sichtbar am Verlust des Imprinting untersuchter Gene (Xin et al., 2003).

Die Proteine ESET und CLLL8 enthalten eine MBD-Domäne (*methyl-CpG-binding-domain*), ein Motiv, welches potentiell in der Lage ist, methylierte DNA zu binden (Bird und Wolffe, 1999). SETDB1, das humane Homologe von ESET, interagiert mit KAP-1, einem Corepressor der KRAB-ZFP-Familie von transkriptionellen Repressoren und kolokalisiert mit HP1 α sowie HP1 γ im Euchromatin, wo die Proteine an spezifische Reporter rekrutiert werden und die Genexpression reprimieren (Schultz et al., 2002). Jüngste Analysen zeigen, daß MBD1, ein methyl-CpG-bindendes Protein, stabile Komplexe mit SETDB1 bildet und die HMTase während der S-Phase an den Chromatin-Assemblierungsfaktor CAF1 rekrutiert, um eine Methylierung der K9-Position von neu bereitgestellten Histonen H3 zu erreichen (Sarraf und Stancheva, 2004). Diese Daten postulieren einen Mechanismus, bei dem SETDB1-abhängige H3-K9-Methylierung eine stabile Vererbung reprimierter Chromatinzustände, basierend auf DNA-Methylierung, garantiert. Beachtenswert sind Analysen, die beweisen, daß das mAM-Protein die Umsetzung von di-methyl zu tri-methyl H3-K9 durch ESET stimuliert, was das Vermögen von ESET bezüglich transkriptioneller Reprimierung verstärkt (Wang et al., 2003). *Eset*-defiziente Mäuse zeigen embryonale Lethalität, wobei jedoch weder die globale H3-K9 tri-Methylierung noch DNA-Methylierung signifikanten Veränderungen unterliegt (Dodge et al., 2004).

Die aufgeführten Daten zeigen, daß die H3-K9-Methylierung eine wesentliche epigenetische Markierung im Zuge der Etablierung und Aufrechterhaltung reprimierender Chromatinzustände darstellt. Insbesondere die Verbindung der Misregulation epigenetischer Information durch gestörte Histon-Modifikation bzw. DNA-Methylierung mit dem Auftreten multifunktionaler Störungen, wie chromosomaler Instabilitäten und erhöhtem Krebsrisiko, verdeutlichen die kritische Rolle epigenetischer Modifizierungen in der Gen-Aktivierung bzw. Gen-Reprimierung während der Entwicklung und Differenzierung eines Organismus. Grundprinzipien des Aufbaus heterochromatischer Strukturen konnten bereits entschlüsselt werden, nichtsdestotrotz impliziert beispielsweise die hohe Anzahl identifizierter PEV-Modifikatoren in *Drosophila* einen weitaus komplexeren Mechanismus zur Etablierung und Aufrechterhaltung des Heterochromatins höherer Organismen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß verschiedener PEV-Suppressorgene auf den Aufbau höhergeordneter Chromatinstrukturen analysiert. Dabei konnte belegt werden, daß SU(VAR)3-9, aufgrund seiner HMTase-Funktion, eine zentrale Komponente im Prozeß des heterochromatischen Gensilencings darstellt. Eine wesentliche Rolle konnte SU(VAR)3-9 ebenfalls während

der syncytialen Kernteilungen in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* zugewiesen werden. Die *in vivo*-Charakterisierung von Punktmutanten in *Su(var)3-9*, die unterschiedliche HMTase-Aktivitäten aufweisen, demonstrieren, daß das Silencing-Potential von SU(VAR)3-9 vorwiegend von der Kinetik der HMTase-Reaktion abhängt. Dieser Befund konnte durch Analysen des hypermorphen Allels *Su(var)3-9^{ptn}* gestützt werden, da diese Punktmutante extensive H3-K9 di- und tri-Methylierung innerhalb und außerhalb des perizentrischen Heterochromatins sowie ein überaus starkes Silencing-Potential aufweist.

Auf welche Weise jedoch euchromatische und heterochromatische Domänen voneinander abgegrenzt werden, um beispielsweise Misregulationen in der Genexpression vorzubeugen, ist ungeklärt. In diesem Hinblick betrifft ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit die funktionelle Analyse des Suppressors *Su(var)3-1* (Wustmann et al., 1989), der als ein Gegenspieler von *Su(var)3-9* identifiziert werden konnte (Ebert et al., 2004). *Su(var)3-1* repräsentiert den bisher stärksten beobachteten Suppressoreffekt auf PEV und ist epistatisch über *Su(var)3-9*. *Su(var)3-1*-Mutanten stellen neue, antimorphe Allele der euchromatischen H3-S10-Kinase JIL-1 dar. Die H3-S10 Phosphorylierung unterliegt in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten keiner Veränderung, was andeutet, daß die Kinase-Aktivität von *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten intakt ist. Gleichwohl ist die Expansion heterochromatischer Bereiche in sieben verschiedenen PEV-Rearrangements massiv blockiert, was demonstriert, daß *JIL-1^{Su(var)3-1}* eine globale Funktion in der Kontrolle und Ausbreitung heterochromatischer Domänen innehat. Die aufgeführten Daten weisen auf eine dynamische Balance zwischen Heterochromatin und Euchromatin und präsentieren *Su(var)3-1* als eine neue Klasse von Suppressorgenen für PEV, in der antimorphe Mutationen eines weitestgehend euchromatisch lokalisierten Proteins die Ausbreitung höhergeordneter Chromatinstrukturen beeinträchtigen.

2 Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Anzucht der Fliegen

Die 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 wurde dem Medium 0.1% Nipagin sowie 100 mM Ampicillin zugesetzt. Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18 °C. Kreuzungen wurden im allgemeinen bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Kreuzungen, die zur Bestimmung von PEV-Effekten dienen, wurden hingegen bei 18 °C ausgeführt.

2.1.2 Verwendete Stämme und Stabilisierungschromosomen von *Drosophila melanogaster*

Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Mutationen und Stabilisierungschromosomen ist in Lindsley und Zimm (1992) bzw. FLYBASE (2002) aufgeführt. Die Bezeichnungen der genutzten transgenen Linien sind in Tab. 2.1 verzeichnet.

P-Element-Vektor	Bezeichnung	Referenz
$P\{GS.v^+hs(cDNASu(var)3-9)EGFP3'\}$	$P\{c3-9^{ptn}-EGFP\}$	vorl. Arbeit
$P\{GS.ry^+hs(cDNASu(var)3-9)EGFP3'\}$	$P\{c3-9-EGFP\}$	Schotta et al. (2002)
$P\{GS.ry^+hs(cDNAHP1)EGFP3'\}$	$P\{cHP1-EGFP\}$	Schotta et al. (2002)
$P\{ry^+. (11.5kbSu(var)3-9)\}$	$P\{Su(var)3-9\}$	Tschiersch et al. (1994)

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

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

HP1 und Proteine, die mit HP1 interagieren, werden durch ein chimäres HP1-Protein, welches die Chromo-Domäne von POLYCOMB enthält (HP1-PC), an euchromatische Bindungsstellen lokalisiert (Platero et al., 1995, 1996). Eine HP1-PC exprimierende Linie (HP1-PC/CyO GFP) wurde mit $P\{c3-9-EGFP\}$ gekreuzt. F_1 -Larven, die nicht den GFP-Balancer [CyO GFP; Rudolph et al. (1999)] trugen, wurden 30 min hitzegeschockt und nach Inkubation für 2 h bei 18 °C deren Speicheldrüsen präpariert.

2.1.4 Generierung von *Su(var)2-5*, *E(z)* und *Su(var)3-9* Null-Larven

Su(var)2-5 Null-Larven überleben bis zum 3. Larvenstadium und wurden als GFP-negative Larven in den Nachkommen von *CyO GFP/Df(2L)TE128X11* x *CyO GFP/Su(var)2-5⁰⁴* identifiziert. *Df(2L)TE128X11* beinhaltet den *Su(var)2-5*-Locus (Wustmann et al., 1989).

E(z) Null-Larven (LaJeunesse und Shearn, 1996) sind bis zum 3. Larvenstadium lebensfähig und wurden durch die Kreuzung von $y; mwh E(z)^5 red e/TM3, y^+ Sb Ser x E(z)^{15} red/TM3, Sb Ser$ generiert. Transheterozygote $mwh E(z)^5 red e/E(z)^{15} red$ Larven wurden anhand ihres *red*-Phänotyps in den malphigischen Gefäßen identifiziert.

Für Analysen von *Su(var)3-9* Null-Larven wurden die Stämme $w; Su(var)3-9^{17}/Su(var)3-9^{17}$ oder $w^{m4h}; Su(var)3-9^{06} e ro /Su(var)3-9^{06} e ro$ verwendet.

2.1.5 Analyse der Heterochromatinverteilung von SU(VAR)3-9 und HP1

Su(var)3-9 Null-Larven, die HP1-EGFP exprimieren, wiesen den Genotyp *CyO/P{cHP1-EGFP}; Su(var)3-9⁰⁶ e ro/Su(var)3-9⁰⁶ e ro* auf.

Su(var)2-5 Null-Larven, die SU(VAR)3-9-EGFP exprimieren, hatten den Genotyp *Df(2L)TE128X11/Su(var)2-5⁰⁴; P{c3-9-EGFP}/TM3*.

2.1.6 Genetische Klassifizierung der *Su(var)3-9*-Mutanten

Zur Einordnung der *Su(var)3-9*-Mutanten in amorphe und hypomorphe Allele wurde der Dosisseffekt von *Su(var)3-9* genutzt. In Kreuzungen von $w^{m4h}; Su(var)3-9^x/TM3 x w^{m4h}; P\{ry^+(11.5kbSu(var)3-9)\}100E/TM3$ wurde der Einfluß der *Su(var)3-9*-Allele auf die Reprimierung des *white*-Gens in der Inversion w^{m4h} mit einer zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopie beurteilt. Von jeder Kreuzung wurden jeweils

ca. 50 Tiere der F₁-Generation anhand ihres white-mottled-Phänotyps quantifiziert und in 5 Klassen eingeteilt (1- volle Expression des *white*-Gens; 5- keine Expression des *white*-Gens).

2.1.7 Analyse der *Su(var)3-9^{ptn}*-Mutante

Das hypermorphe *Su(var)3-9^{ptn}*-Allel wird durch die Kreuzung von *w^{m4h}/w^{m4h}; Sco/T(2;3)ap^{Xa} + In(2)Cy, Cy Su(var)3-9^s/+* x *w^{m4h}/Y; Sco/T(2;3)ap^{Xa} + In(2)Cy, Cy Su(var)3-9^s/Su(var)3-9^{ptn}* aufrechterhalten (Kuhfittig et al., 2001). Die aus einer Kreuzung von *w/w; TM3 GFP[w⁺] x w^{m4h}/Y; Sco/T(2;3)ap^{Xa} + In(2)Cy, Cy Su(var)3-9^s/Su(var)3-9^{ptn}* erhaltenen *TM3 GFP/Su(var)3-9^{ptn}*-Männchen wurden für weitere Analysen entweder mit Wildtyp-, *Su(var)3-9¹⁷/Su(var)3-9¹⁷*-, *Su(var)3-1⁰²/Su(var)3-1⁰²*- oder *Su(var)2-5⁰⁴/CyO GFP*-Weibchen gekreuzt und das *Su(var)3-9^{ptn}*-Allel anhand GFP-negativer Larven identifiziert.

2.1.8 Einfluß von *Suv4-20^{BG00814}* auf PEV

Das *P*-Element *P{GT1}BG00814* ist im dritten Exon von *Suv4-20* (CG13363) inseriert und repräsentiert ein stark hypomorphes *Suv4-20*-Allel (*Suv4-20^{BG00814}*).

Für die Analyse eines potentiellen Modifikatoreffektes von *Suv4-20* wurde das PEV-Rearrangement *T(2;3)Sb^v* genutzt (Sinclair et al., 1983). Durch diese Translokation wird die dominante Mutation *Sb^l*, die in kurze, dicke Borsten resultiert, in die Nähe des Heterochromatins des Chromosoms 2R gebracht. *Suv4-20^{BG00814}/Suv4-20^{BG00814}* sowie Wildtyp-Weibchen, welche als Kontrolle dienten, wurden mit *T(2;3)Sb^v, In(3R)Mo, Sb^l sr^l/TM3 Ser* gekreuzt. 14 definierte Borsten wurden pro Tier ausgewertet und die Anzahl der *Stubble*-Borsten in Männchen und Weibchen der F₁-Generation ermittelt.

2.1.9 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen *Su(var)3-9* und *Suv4-20*

Eine Kombination des amorphen Allels *Su(var)3-9¹⁷* mit der *Suv4-20^{BG00814}*-Mutante erfolgte durch die Kreuzung von *Suv4-20^{BG00814}/Suv4-20^{BG00814}; +/TM2 x w/Y; Su(var)3-9¹⁷/Su(var)3-9¹⁷*. Durch weitere Kreuzungsschritte konnten stabile Stämme folgender Genotypen erhalten werden: *Suv4-20^{BG00814}; Su(var)3-9¹⁷/TM2* oder */TM3C Sb* bzw. */TM3 GFP*. In keinem dieser Stämme konnten adulte Tiere erhalten werden, die die *Su(var)3-9¹⁷*-Mutation homozygot tragen.

2.1.10 Blockierung der Heterochromatisierung durch *JIL-1^{Su(var)3-1}* in der Translokation *w^{m258-21}*

Der Einfluß von *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten auf die Ausbreitung heterochromatischer Strukturen wurde mit Hilfe zytologischer Analysen in polytänen Speicheldrüsenchromosomen von *T(1;4)w^{m258-21}/T(1;4)w^{70l26.5}*-Larven (Reuter et al., 1982) untersucht. Resultierend aus der Kreuzung von *T(1;4)w^{m258-21}/FM1, y^{31d} w^a dm B; Su(var)3-1⁰² e ro/TM6C Sb x T(1;4)w^{70l26.5}/Y; P{ry⁺.(11.5kbSu(var)3-9)}96A + P{ry⁺.(11.5kbSu(var)3-9)}100E* wurden polytäne Speicheldrüsen der Genotypen *T(1;4)w^{m258-21} /T(1;4)w^{70l26.5}; Su(var)3-1⁰² e ro/P{ry⁺.(11.5kbSu(var)3-9)}96A + P{ry⁺.(11.5kbSu (var)3-9)}100E* bzw. *T(1;4)w^{m258-21} /T(1;4)w^{70l26.5}; TM6C Sb/P{ry⁺.(11.5kbSu(var)3-9)}96A + P{ry⁺.(11.5kbSu(var)3-9)}100E* vergleichend analysiert. *T(1;4)w^{m258-21}/T(1;4)w^{70l26.5}-* und *T(1;4)w^{70l26.5}/FM1, y^{31d} w^a dm B*-Larven wurden anhand gelber gegenüber weißer malphigischer Gefäße unterschieden.

2.1.11 Untersuchung des Effektes von *JIL-1^{Su(var)3-1}* auf *Su(var)3-9*-induziertes Gensilencing

Der Suppressoreffekt von *Su(var)3-1⁰²* bzw. die Auswirkung einer zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopie (*P{ry⁺.(11.5kbSu(var)3-9)}46F3*) wurden in den PEV-Rearrangements *Dp(1;f)γ²³⁸* (Le et al., 1995), welches eine variierte Ausprägung des *yellow*-Gens aufweist, *T(2;3)V21^ePlacW(92E)* (Dorer und Henikoff, 1994), welches 4 *PlacW*-Elemente in Tandemanordnung enthält, resultierend in einer variablen Reprimierung des *mini-white*-Markergens, *T(2;3)BL1* bzw. *Tp(3;Y)BL2* (Lu et al., 1998), die *P[w⁺, HS-lacZ]* Transgensilencing zeigen, sowie *T(2;3)Sb^v* (Sinclair et al., 1983), was eine variable Inaktivierung des *Sb¹*-Allels aufweist, analysiert. *Su(var)3-1⁰²*-abhängige Unterdrückung verstärkter Heterochromatisierung infolge der Gegenwart von zwei Extra-Kopien *Su(var)3-9* (*P{ry⁺.(11.5kbSu(var)3-9)}46F3*) wurde in den PEV-Rearrangements *In(1)w^{m4}, T(1;4)w^{m258-21}, Dp(1;f)γ²³⁸, T(2;3)BL1* bzw. *Tp(3;Y)BL2* untersucht. Die Identifizierung der Anwesenheit der *Su(var)3-9*-Transgene erfolgte per PCR an einzelnen adulten Fliegen bzw. Larven mit den Primern 5'gen Suv7-4 (5'-gct ttt ccg aat cac tct cc-3') und 5'P rev-1 (5'-ttt act cca gtc aca gct ttg-3'). Die Expressionslevel der Markergene wurden anhand ihres Phänotyps in 5 Kategorien eingeteilt (1- keine Expression, 5- volle Expression des jeweiligen Markergens).

2.1.12 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 ($p\pi 25.1$ -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 in der Nachkommenschaft auf transgene Tiere selektiert werden, die den Selektionsmarker ausprägen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Zur Plasmidvermehrung wurde der *E.coli*-Bakterienstamm *DH5 α* (F^- , *end A1*, *hsd R17* (r_k^- , m_k^+), *sup E44*, *thi-1*, I^- , *rec A1*, *gyr A96*, *rel A1*, $\phi 80d$, *lacZ* $\Delta M15$) (Gibco/BRL 1987) verwendet.

Für Klonierungen wurden die Vektoren pBluescript II KS(-) (Stratagene) und pGEM-T (Promega) verwendet. Als Transformationsvektor für *Drosophila melanogaster* wurde der Vektor $pP\{GS.v^+hs EGFP 3'\}$ (Schotta und Reuter, 2000) eingesetzt.

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doley, 1979), Großpräparationen wurden mittels eines Plasmid-Midipräparationskits (Macherey-Nagel) entsprechend Herstellerangaben 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.

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit dem Staden-Package, Version 2001.0 bzw. GCG-Package, Version 10.2.

2.2.3 DNA-Isolation aus einzelnen Fliegen

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

2.2.4 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 (5'-acc cac ttt aat gat teg cag-3') und 5'P rev-1 (5'-ttt act cca gtc aca gct ttg-3') für das 5'-Ende des *P*-Elements bzw. 3'P forw-1 (5'-ata cta ttc ctt tca ctc gca c-3') und 3'P rev-1 (5'-tgt cgt att gag tct gag tga g-3') für das 3'-Ende des *P*-Elements vorgenommen. Bei zu geringer Produktausbeute wurden geschachtelte PCRs mit entsprechenden Primerpaaren für den 5'-Bereich [5'P forw-2 (5'-acc agt ggg agt aca caa aca g-3') und 5'P rev-2 (5'-cac aca acc ttt cct ctc aac-3')] bzw. den 3'-Bereich [3'P forw-2 (5'-gca tac gtt aag tgg atg tct c-3') und 3'P rev-2 (5'-tga tta acc ctt agc atg tcc g-3')] durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit Primern sequenziert, die vom 5' *P*-Repeat [Sp1 (5'-aca caa cct ttc ctc tca aca a-3')] bzw. 3' *P*-Repeat [Pry2mod (5'-atg tct ctt gcc gac ggg acc acc tta tg-3')] in Richtung der angrenzenden genomischen DNA orientiert sind. Durch Datenbankvergleich der an das *P*-Element angrenzenden Sequenz mit der Gesamtsequenz von *Drosophila melanogaster* konnten die entsprechenden Insertionsstellen identifiziert werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Kernextrakten aus *Drosophila*-Embryonen

Für die Herstellung von embryonalen Kernextrakten für anschließende Westernblotanalysen wurde zunächst die Chorionmembran von Embryonen mit Natri-

umhypochloritlösung (Roth) entfernt. Die dechorionisierten Embryonen wurden nach dieser Behandlung entweder sofort weiterverarbeitet oder nach Gefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert. Die Präparation der Kerne erfolgte auf Eis. Ca. 500 mg Embryonen wurden in IP-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM NaVO₃, 1mM PMSF) suspendiert, in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und durch einen Saccharosegradienten (350 mM Saccharose) für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in einem entsprechenden Volumen PBS resuspendiert.

2.3.2 Herstellung von Kernextrakten aus *Drosophila*-Larven

Für die Herstellung von larvalen Kernextrakten für anschließende massenspektrometrische Analysen wurden ca. 100 3. Larven des Wildtyps, *Su(var)3-9* null [*Su(var)3-9¹⁷/Su(var)3-9¹⁷*], *Su(var)2-5* null [*Df(2L)TE128X11 /Su(var)2-5⁰⁴*], *E(z)* null [*E(z)⁵/E(z)¹⁵*] und *Su(var)3-9^{ptn}* [*Su(var)3-9^{ptn}/+* und *Su(var)3-9^{ptn}/Su(var)3-9¹⁷*] gesammelt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C verwahrt. Die Präparation der Kerne erfolgte auf Eis. Die Larven wurden in IP-Puffer [20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM NaVO₃, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 10 mM β -Glycerophosphat, Protease-Inhibitoren (Roche)] suspendiert, in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und durch einen Saccharosegradienten (350 mM Saccharose, 2 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 10 mM β -Glycerophosphat) für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in einem entsprechenden Volumen PBS resuspendiert.

2.3.3 Saure Extraktion von Proteinen aus isolierten Kernen

Um für massenspektrometrische Analysen eine hohe Anreicherung von Histonen zu erreichen, wurde eine saure Extraktion der isolierten Kerne (siehe 2.3.1 bzw. 2.3.2) vorgenommen. Dazu wurden das aus der Kernextraktion gewonnene Pellet nicht in PBS sondern in 0.6 N HCl resuspendiert und bei 4 °C für 2 h auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 10 Vol kaltem Aceton versetzt und für 2 h bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in einem entsprechenden Volumen H₂O dest. resuspendiert.

2.3.4 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) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandards wurden Proteinleitern von Invitrogen bzw. MBI Fermentas eingesetzt.

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 minütiges Kochen der Gele in Aqua bidest.

2.3.5 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 eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) bzw. 3% BSA 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 3 x 20 min Waschen in PBST (PBS, 0.2% Tween 20) wurden die entsprechenden sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Tab. 2.3) in 5% Trockenmilchpulver zugegeben und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Membran wurde wiederum 3 x 20 min in PBST gewaschen. Danach erfolgte die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Antikörper mit dem ECL- bzw. ECL Plus System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers.

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 einen Objektträger überführt. Nach Auflegen eines Deckgläschens konnte mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes (LSM 510, Zeiss) die EGFP-Fluoreszenz in Kernen analysiert werden.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung Westernblot	Verdünnung Zytologie
monoclonal GFP	Babco	1:1000	1:30
polyclonal GFP	Molecular Probes	1:1500	1:75
monoclonal α -Tubulin	Sigma	1:20000	
monoclonal Lamin (T47)	Amersham		1:50 - 1:500
monoclonal β -Gal	Sigma		1:50
polyclonal HP1-AK (chromo Peptid)	J. Eissenberg	1:7500	
polyclonal HP1-AK (Gesamtprotein)	J. Eissenberg	1:2000	1:75
polyclonal SU(VAR)3-9 (As285-465)	A. Kegel; preink. mit <i>Su(var)3-9¹⁷</i>	1:1000	1:50
polyclonal H3-K4 di-methyl	Upstate Biotech	1:1000	1:75
polyclonal H3-K9 acetyl	Upstate Biotech	1:1000	1:75
polyclonal H3-K9 mono-methyl	T. Jenuwein	1:1000	1:50
polyclonal H3-K9 di-methyl	T. Jenuwein	1:1000	1:50
polyclonal H3-K9 tri-methyl	T. Jenuwein	1:500	1:50
polyclonal H3-S10 phospho	Upstate Biotech	1:1000	1:50
polyclonal H3-K14 acetyl	Upstate Biotech	1:1000	1:75
polyclonal H3-S10 phospho -K14 acetyl	Upstate Biotech	1:1000	1:50
polyclonal H3-K27 mono-methyl	T. Jenuwein		1:50
polyclonal H3-K27 di-methyl	T. Jenuwein		1:50
polyclonal H3-K27 tri-methyl	T. Jenuwein		1:50
polyclonal H4-K20 mono-methyl	Upstate Biotech		1:50
polyclonal H4-K20 di-methyl	Upstate Biotech		1:50
polyclonal H4-K20 tri-methyl	Abcam		1:50
polyclonal H4A/H4-S1 phospho	Upstate Biotech		1:50
polyclonal H2Av	R. L. Glaser		1:50
polyclonal CID	S. Henikoff		1:25
polyclonal MOF	A. Akhtar		1:50
polyclonal JIL-1	K. Johansen		1:50

Tabelle 2.2: Verwendete primäre Antikörper für biochemische und immunzytologische Analysen

2 Material und Methoden

Antikörper	Hersteller	Verdünnung Westernblot	Verdünnung Zytologie
Goat Anti-mouse-Peroxidase	Jackson ImmunoRes	1:2000	
Goat Anti-rabbit-Peroxidase	Jackson ImmunoRes	1:5000	
Goat Anti-mouse-Alexa 488	Molecular Probes		1:50 - 1:200
Goat Anti-rabbit-Alexa 488	Molecular Probes		1:50 - 1:200
Goat Anti-mouse-FITC	Jackson ImmunoRes		1:50 - 1:200
Goat Anti-rabbit-FITC	Jackson ImmunoRes		1:50 - 1:200
Goat Anti-mouse-TR	Jackson ImmunoRes		1:50 - 1:200
Goat Anti-rabbit-TR	Jackson ImmunoRes		1:50 - 1:200

Tabelle 2.3: Verwendete sekundäre Antikörper für biochemische und immunzytologische Analysen

Für die Konfokalmikroskopie wurde ein invertiertes Carl-Zeiss LSM 510 Mikroskop mit einem Plan Apo 63 x N.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.

2.4.2 Enzymatischer Assay für *lacZ*-Expression

Zur Untersuchung der *lacZ*-Expression des Konstrukts $P[w^+ HS-lacZ]$ in den beiden PEV-Rearrangements *In(3L)BL1* und *Tp(3;Y)BL2* in Speicheldrüsen dritter Larven (Lu et al., 1996) wurden Larven für 30 min bei 37 °C hitzegeschockt 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 über Nacht 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 die Speicheldrüsen in 90% Glycerin/PBS eingebettet und mit einer CCD-Kamera an einem Zeiss Axioskop im Differenzial-Interferenzkontrast-Modus dokumentiert.

2.4.3 Immunmarkierung von Polytänychromosomen

Für Präparation von polytären Speicheldrüsenchromosomen wurde die Methode von Silver und Elgin (1978) wie folgt modifiziert. Speicheldrüsen aus Larven im dritten Stadium wurden in einer 0.7% NaCl-Lösung präpariert und in Fixierlösung (45% Essigsäure, 2% Formaldehyd) 10 min inkubiert. Nach dem Spreiten der Chromosomen wurde der Objektträger bis zur Antikörperfärbung in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

Für Immunmarkierungen mit anti-Histon-Antikörpern bzw. SU(VAR)3-9-Antikörper erfolgte die Präparation von polytären Speicheldrüsenchromosomen nach Alfageme et al. (1980) mit folgenden Modifikationen. Larven im dritten Stadium wurden in 0.7% NaCl, 0.5% NP-40 präpariert, für 2 min in 2% Formaldehyd, 1% Triton X-100 fixiert und nach einer Inkubation für 3 min in 45% Essigsäure, 2% Formaldehyd gespreitet. Die verwendeten Lösungen wurden ca. alle 3 h neu hergestellt und während des Gebrauchs auf Eis gelagert.

Die Antikörpermarkierung erfolgte mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (Tab. 2.3). Die primären Antikörper (Tab. 2.2) wurden mit dem entsprechenden Präparat in PBST (PBS, 0.2% Tween 20), 5 % Trockenmilchpulver (Biorad) bzw. 3% BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten in PBST für jeweils 5 min wurden die Präparate mit den sekundären Antikörpern in PBST, 5 % Trockenmilchpulver, 10 % Ziegen Serum (Sigma) für 2 h bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in PBST für jeweils 5 min erfolgte die Färbung der DNA entweder mit DAPI, Propidiumiodid oder TOTO-3 (Molecular Probes). Nach Waschen in PBST für 5 min wurden die Präparate getrocknet, anschließend in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingebettet und mit Nagellack verschlossen. Die Auswertung der Immunmarkierung wurde mit einem Konfokalmikroskop (LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der Standardfiltersätze für DAPI, Alexa 488, FITC, TR, Propidiumiodid und TOTO-3 durchgeführt.

2.4.4 Immunmarkierung von Embryonen

Für die Immunmarkierung 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 auf einem Drehrad 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Methanol eingefroren oder der Antikörperfärbung unterzogen. Zunächst wurde das Methanol durch 3 Waschschrte in PBST (PBS, 0.2% Tween 20) entfernt und die Embryonen durch Inkubation mit 10% Ziegen serum (Sigma) in PBST für mindestens 2 h rehydriert. Der primäre Antikörper (Tab. 2.2) wurde über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 10% Ziegen serum in PBST mit den Embryonen auf einem Drehrad inkubiert. Nach 3 Waschschrten in PBST wurde der sekundäre Antikörper (Tab. 2.3) gleichzeitig mit einer RNaseA-Behandlung ($40\mu\text{g/ml}$; nur im Fall einer DNA-Färbung mit Propidiumiodid notwendig) bei Raumtemperatur in 10% Ziegen serum in PBST für 2 h inkubiert. Nach wiederum 3 Waschschrten in PBST erfolgte eine DNA-Färbung mit Propidiumiodid ($5\mu\text{g/ml}$) oder DAPI ($0.5\mu\text{g/ml}$) und nach erneutem Waschen in PBST wurden die Embryonen in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingebettet. Die Immunmarkierungen wurden am konfokalen Mikroskop (LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der entsprechenden Filterkombinationen ausgewertet.

2.4.5 Immunmarkierung von Ovarien

Die Präparation und Fixierung von Ovarien erfolgte in Anlehnung an Theurkauf und Hawley (1992) und wurde wie folgt modifiziert. Ovarien 4 Tage alter Weibchen wurden in 0.7% NaCl präpariert und in 5% Formaldehyd auf einem Drehrad fixiert. Nach Waschen in PBST wurden die Ovarien für ca. 30 sek in Methanol geschwenkt, mehrmals kurz in PBST gewaschen und anschließend für 2 h in PBST auf einem Drehrad rehydriert. Der primäre Antikörper (Tab. 2.2) wurde über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 10% Ziegen serum in PBST mit den Ovarien auf einem Drehrad inkubiert. Nach 3 Waschschrten in PBST wurde der sekundäre Antikörper (Tab. 2.3) bei Raumtemperatur in 10% Ziegen serum in PBST für 2 h inkubiert. Nach wiederum 3 Waschschrten in PBST erfolgte eine DNA-Färbung mit Propidiumiodid ($5\mu\text{g/ml}$) oder DAPI ($0.5\mu\text{g/ml}$) und nach erneutem Waschen in PBST wurden die Ovariolen vorsichtig unter Zuhilfenahme von Präpariernadeln auf einem Objektträger vereinzelt und in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingebettet. Die Auswertung der Immunmarkierung erfolgte am konfokalen Mikroskop (LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der entsprechenden Filterkombinationen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Funktion von *Su(var)3-9* im heterochromatischen Gensilencing erfolgt Dosis-abhängig

Das *Su(var)3-9*-Gen stellt einen der stärksten dominanten Suppressoren des PEV-Modellsystems *In(1)w^{m4h}* dar. Der Ausfall einer Kopie von *Su(var)3-9* bewirkt den Verlust der Reprimierung des *white*-Gens [Tschiersch et al. (1994); Abb. 3.1]. Eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-9* verursacht hingegen verstärktes Gensilencing, den sogenannten Triplo-Enhancereffekt, sichtbar an der nahezu kompletten Inaktivierung des *white*-Gens [Tschiersch et al. (1994); Abb. 3.1]. Erhöht man durch weitere genomische Kopien die Dosis von *Su(var)3-9*, führt das zu einer weiteren Ausbreitung (Spreading) des Heterochromatins auf normalerweise euchromatische Regionen, erkennbar an der teilweisen bzw. vollständigen Inaktivierung des ca. 180 kb distal lokalisierten *roughest*-Gens (Abb. 3.1). Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß SU(VAR)3-9 eine zentrale Komponente bei der Etablierung höhergeordneter Chromatinstrukturen darstellt.

3.2 SU(VAR)3-9 ist wichtig für eine korrekte Chromosomensegregation während der frühen Embryonalentwicklung

3.2.1 SU(VAR)3-9 ist ein maternales Protein

SU(VAR)3-9 ist ein Kernprotein. Transgene Linien, die den *Su(var)3-9*-Locus inklusive des endogenen Promotors, fusioniert mit EGFP, exprimieren, zeigen in Speicheldrüsenkernen eine EGFP-Fluoreszenz innerhalb des perizentrischen Heterochromatins (Schotta und Reuter, 2000). Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers, der das SU(VAR)3-9-Protein detektiert (Kegel, 1999), ist es möglich, die Verteilung von SU(VAR)3-9 während der *Drosophila*-Entwicklung zu dokumentieren. Das SU(VAR)3-9-Antikörperserum weist jedoch Kreuzreaktivitäten mit

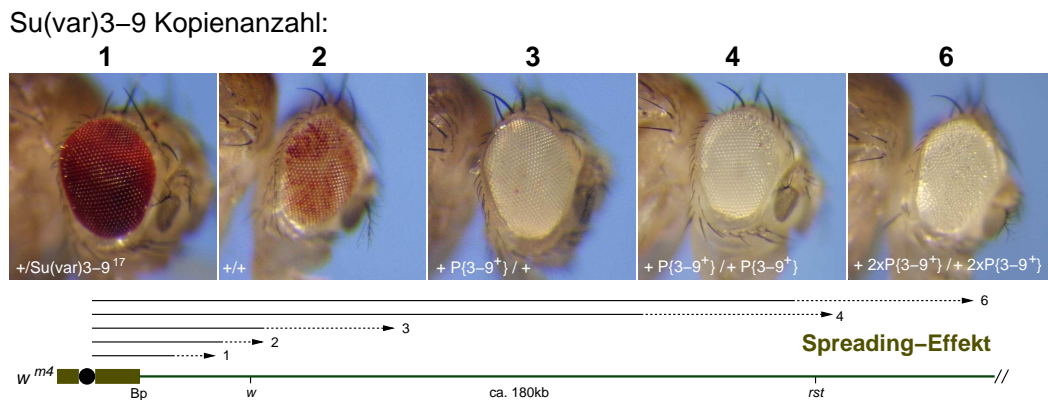


Abbildung 3.1: Dosis-Abhängigkeit von *Su(var)3-9*. Verlust einer funktionellen Kopie von *Su(var)3-9* im Null-Allel *Su(var)3-9¹⁷* führt zu einem dominanten Suppressoreffekt auf die Inversion *w^{m4h}*. Zusätzliche genomische Kopien [*P{Su(var)3-9}*] zeigen verstärktes Gensilencing, sichtbar an der individuellen Inaktivierung der Markergene *white (w)* bzw. *roughest (rst)*. Das Ausmaß der Heterochromatisierung wird durch Pfeile verdeutlicht. Das Schema zeigt das *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement. Balken- Heterochromatin; Strich- Euchromatin; Bp- proximaler Bruchpunkt (nicht maßstabsgetreu).

anderen Proteinen auf (Kegel, 1999). Da jedoch *Su(var)3-9* Null-Mutanten homozygot lebensfähig sind, besteht die Möglichkeit, den Antikörper an *Su(var)3-9* Null-Embryonen zu reinigen. Unspezifische Proteinassoziationen werden auf diese Weise gebunden. Nach dieser Reinigung detektiert der SU(VAR)3-9-Antikörper im Westernblot von embryonalen Kernextrakten ausschließlich das SU(VAR)3-9-Protein (Abb. 3.2). Demgegenüber sind im Westernblot von embryonalen Kernextrakten der *Su(var)3-9* Null-Mutanten keine Antikörpersignale nachweisbar, was die Spezifität des SU(VAR)3-9-Antikörpers bestätigt (Abb. 3.2).

Nach der Befruchtung erfolgt die frühe Embryonalentwicklung in *Drosophila melanogaster* in 13 schnellen und synchronen Kernteilungen in einem Syncytium (Foe und Alberts, 1983). Während des Syncytiums ist SU(VAR)3-9 bereits im 4 Zell-Stadium (Zyklus 2) prominent im Interphasekern nachweisbar (Abb. 3.3A). Hohe Proteinkonzentrationen von SU(VAR)3-9 sind in Interphasekernen während der gesamten syncytialen Kernteilungen (Zyklen 1-13) zu verzeichnen (Abb. 3.3A; stellvertretend ist Zyklus 8 dargestellt). Demgegenüber ist SU(VAR)3-9 im Zuge der Kernteilung ausschließlich zerstreut um die segregierenden mitotischen Chromosomen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Diese Besonderheit bezüglich der Chromosomenassoziation in Embryonen wurde bereits für die mit SU(VAR)3-9 interagierenden Proteine HP1 (Kellum et al., 1995) und SU(VAR)3-7 (Cleard

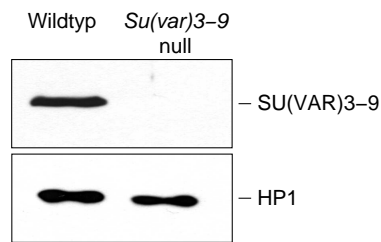


Abbildung 3.2: Westernblot aus Kernextrakten von Wildtyp- bzw. *Su(var)3-9* Null-Embryonen. Gleiche Mengen Kernextrakt von 0-12 h alten Wildtyp- bzw. homozygoten *Su(var)3-9* Null-Embryonen wurden auf zwei Westernblots aufgetragen und mit SU(VAR)3-9-Antikörper (obere Reihe) und HP1-Antikörper (untere Reihe; Ladekontrolle) markiert.

et al., 1997) beschrieben. Da die früheste zygotische Expression in Embryonen nicht vor Zyklus 10 erfolgt (Edgar und Schubiger, 1986), kann man davon ausgehen, daß es sich bei SU(VAR)3-9 um ein maternal bereitgestelltes Genprodukt handelt. SU(VAR)3-9 ist darüberhinaus prominent in den Keimbahnzellen (Polzellen) nachweisbar (Abb. 3.3A, Pfeile). Erreicht der Embryo nach Zyklus 14 das zelluläre Blastoderm, ist innerhalb der Kerne eine deutliche Akkumulation von SU(VAR)3-9 in bestimmten Regionen zu erkennen, die mit Arealen dichter DNA-Färbung kolokalisieren (Abb. 3.3A). Es konnte gezeigt werden, daß diese Regionen perizentrischem Heterochromatin entsprechen (Foe und Alberts, 1983; Hiraoka et al., 1990). Während der Gastrulation bzw. in späteren embryonalen Stadien ist SU(VAR)3-9 ebenfalls mit heterochromatischen Regionen assoziiert, wenngleich die detektierten Proteinlevel geringer sind (Abb. 3.3A). In *Su(var)3-9* Null-Embryonen aller Stadien sind wiederum mittels SU(VAR)3-9-Antikörper keine Antikörpersignale detektierbar (Abb. 3.3B).

3.2.2 Verlust von SU(VAR)3-9 führt zu Segregationsdefekten in frühen Embryonen

Su(var)3-9 ist kein essentielles Gen, da amorphe *Su(var)3-9*-Mutanten homozygot bzw. transheterozygot lebensfähig sind (Tschiersch et al., 1994). Nichtsdestotrotz deutet die hohe Konzentration des SU(VAR)3-9-Proteins während der syncytialen Kernteilungen eine bedeutende Funktion in der frühen Embryonalentwicklung an. Um Einblicke in eine solche mögliche Funktion von SU(VAR)3-9 zu erhalten, wurde die Embryonalentwicklung in *Su(var)3-9* Null-Mutanten analysiert. Dabei wurden zunächst transheterozygote Embryonen der *Su(var)3-9* Null-Allele

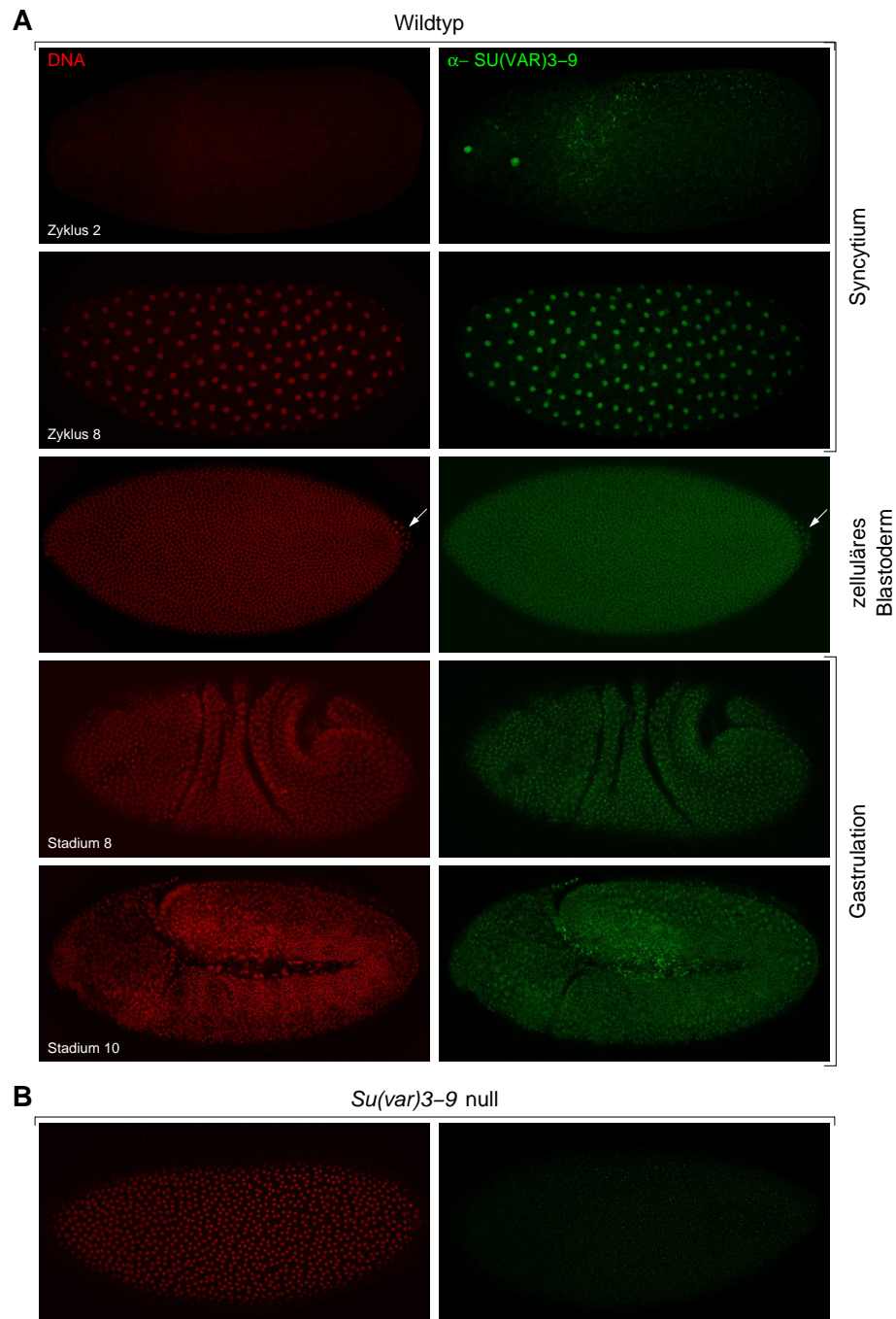


Abbildung 3.3: Verteilung von SU(VAR)3-9 während der frühen Embryonalentwicklung. **(A)** Nachweis des SU(VAR)3-9-Proteins mittels eines SU(VAR)3-9-spezifischen Antikörpers während Syncytium, zellulärem Blastoderm (Pfeile deuten auf Polzellen) und Gastrulation in Wildtypembryonen. **(B)** Immunmarkierung von *Su(var)3-9* Null-Embryonen mit dem SU(VAR)3-9-Antikörper. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

Su(var)3-9⁰⁶ und *Su(var)3-9¹⁷* (Tschiersch et al., 1994) analysiert, um den Einfluß eventueller Zweit-Mutationen (second-site mutations) auszuschließen. Weibchen, die auf diese Weise kein funktionelles SU(VAR)3-9-Protein zur Verfügung haben, produzieren Embryonen, die zu einem großen Anteil während der Embryonalentwicklung sterben. Färbt man *Su(var)3-9* Null-Embryonen mit Propidiumiodid, um die DNA sichtbar zu machen und vergleicht diese mit Wildtypembryonen gleicher Entwicklungsstadien, werden massive Defekte während der frühen syncytialen Kernteilungen erkennbar (Abb. 3.4). *Su(var)3-9* Null-Embryonen zeigen eine ungleichmäßige Verteilung der Kerne an der Oberfläche der Embryonen und Verlust der Synchronität während der Kernteilung. Die beobachteten Segregationsdefekte führen zu Kernfragmentierung und teilweiser Auflösung der Chromatinstruktur (Abb. 3.4). Die Chromosomendefekte treten dabei zu verschiedenen Zeitpunkten während des Syncytiums auf. Diese Daten legen nahe, daß SU(VAR)3-9 eine wesentliche Funktion während der frühen Embryonalentwicklung ausübt und der Verlust des SU(VAR)3-9-Proteins zum Zerfall der Kern- bzw. Chromatinstruktur führt.

3.2.3 Maternal bereitgestelltes SU(VAR)3-9 ist erforderlich für eine korrekte Embryonalentwicklung

Um zu dokumentieren, welches Ausmaß der Verlust des SU(VAR)3-9-Proteins auf die Embryonalentwicklung hat, wurden Eiablagen verschiedener Kreuzungen, in denen *Su(var)3-9* Null-Mutanten entweder maternaler oder paternaler Herkunft sind, analysiert und die Frequenz embryonaler Letalität ermittelt (Abb. 3.5). Bei Wildtypembryonen beträgt die Schlupfrate der Larven ca. 92% (Abb. 3.5). Bei Embryonen, die aus einer Kreuzung heterozygoter *Su(var)3-9* Null-Allele resultieren, schlüpfen ca. 83% der analysierten Larven, demnach nicht wesentlich weniger als im Fall der Wildtypkreuzung (Abb. 3.5). Aus Embryonen einer Kreuzung transheterozygoter *Su(var)3-9* Null-Mutanten-Weibchen schlüpfen lediglich in ca. 41% der Fälle Larven. Diese signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit kann durch eine paternale *Su(var)3-9*-Wildtypkopie nicht ausgeglichen werden (Abb. 3.5). Untersucht man den umgekehrten Fall in einer Kreuzung von Wildtypweibchen mit Männchen, die transheterozygot *Su(var)3-9* Null-Mutanten tragen, schlüpfen aus ca. 85% der untersuchten Embryonen Larven (Abb. 3.5). Diese Ergebnisse belegen, daß allein der Verlust des maternal zugefügten SU(VAR)3-9-Proteins die Segregationsdefekte in den frühen syncytialen Kernteilungen und somit die stark reduzierte Lebensfähigkeit der Embryonen verursacht. Kreuzt man *Su(var)3-9* Null-Mutanten-Weibchen, die zusätzlich heterozygot eine trans-

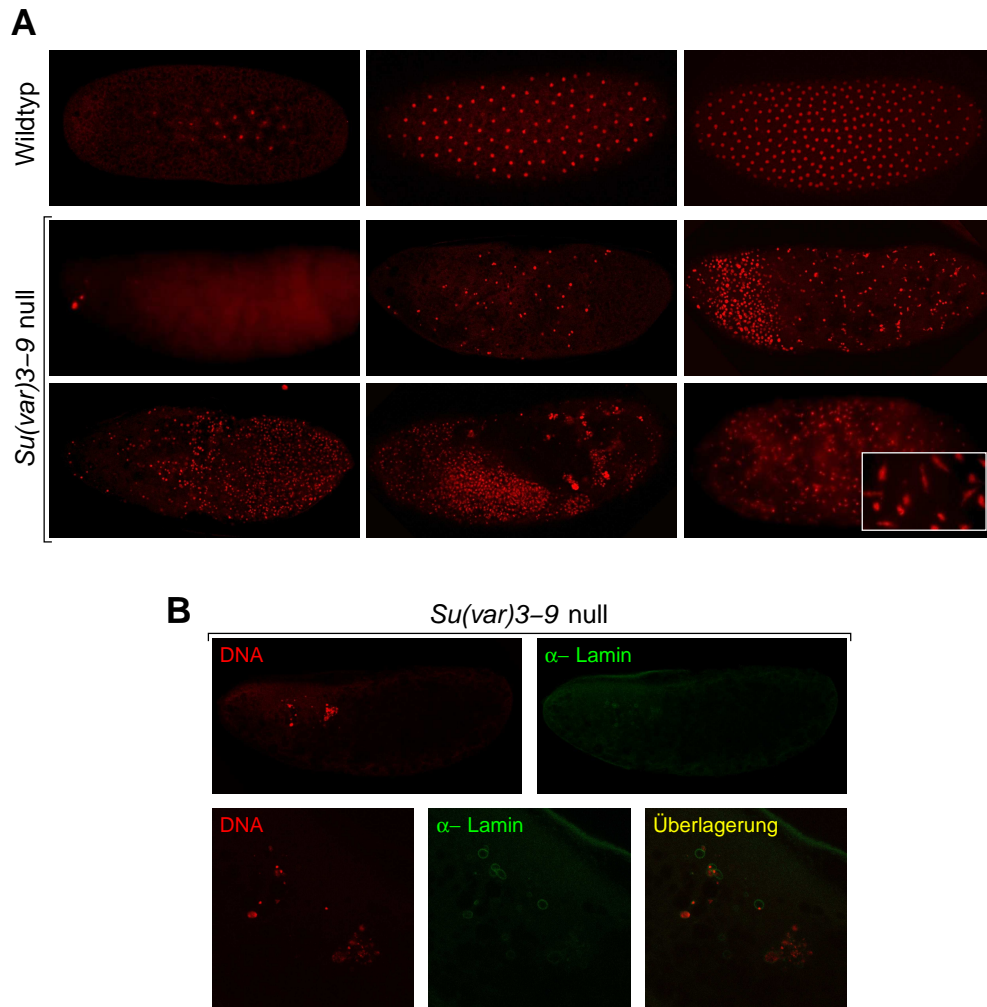


Abbildung 3.4: Segregationsdefekte während der syncytialen Kernteilungen in *Su(var)3-9* Null-Mutanten. **(A)** Wildtypembryonen und transheterozygote *Su(var)3-9* Null-Embryonen [*Su(var)3-9⁰⁶/Su(var)3-9¹⁷*] wurden mit Propidiumiodid gefärbt, um die DNA sichtbar zu machen. Während in Wildtypembryonen eine regelmäßige Verteilung der Kerne zu verzeichnen ist (obere Reihe), weisen viele *Su(var)3-9* Null-Embryonen ein dramatisch ungleichmäßiges Verteilungsmuster der Kerne auf (untere beiden Reihen). Durch Defekte während der Chromosomensegregation sind verschiedene Variationen der Fragmentierung von Kernen zu beobachten. Das Insert zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des dargestellten Embryos. **(B)** Transheterozygote *Su(var)3-9* Null-Embryonen [*Su(var)3-9⁰⁶/Su(var)3-9¹⁷*]. Die obere Reihe zeigt den gesamten Embryo, die untere Reihe eine Vergrößerung der Kerne. Die Markierung der DNA erfolgte mit Propidiumiodid (rot), Immunmarkierung mit einem Lamin-Antikörper zeigt die Kernlamina (grün). Die Chromatinstruktur ist nahezu aufgelöst, Chromatinreste erscheinen durch die DNA-Färbung als vereinzelte helle Punkte, die in einigen Fällen noch von einer Kernlamina umgeben sind (Überlagerung).

gene *Su(var)3-9*-Wildtypkopie tragen [$P\{Su(var)3-9\} / Su(var)3-9^{06}$], mit Wildtyp-Männchen, erhöht sich die Schlupfrate der Larven in geringem Maße um ca. 18%, von 42% auf 58% (Abb. 3.5). Da in diesem Konstrukt *Su(var)3-9* mit EGFP fusioniert ist, ist es möglich, *in vivo* die EGFP-Fluoreszenz in Embryonen zu detektieren. Tatsächlich ist während der syncytialen Kernteilungen vor dem Zyklus 10 in Embryonen dieses Genotypes das maternale Genprodukt anhand der EGFP-Fluoreszenz schwach nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Daß die Mutantenrettung durch die transgene *Su(var)3-9*-Kopie nur partiell erfolgt, ist dadurch zu erklären, daß die Bereitstellung des maternalen Genproduktes im Embryo aus dem heterozygoten $P\{Su(var)3-9\}$ -Allel aufgrund von euchromatischen Positionseffekten nicht im vollem Maße erfolgt. Grundlage dieser Annahme ist die Tatsache, daß die verwendete $P\{Su(var)3-9\}$ -Linie nur partiell den Suppressoreffekt einer *Su(var)3-9*-Mutante ausgleichen kann (Daten nicht gezeigt).

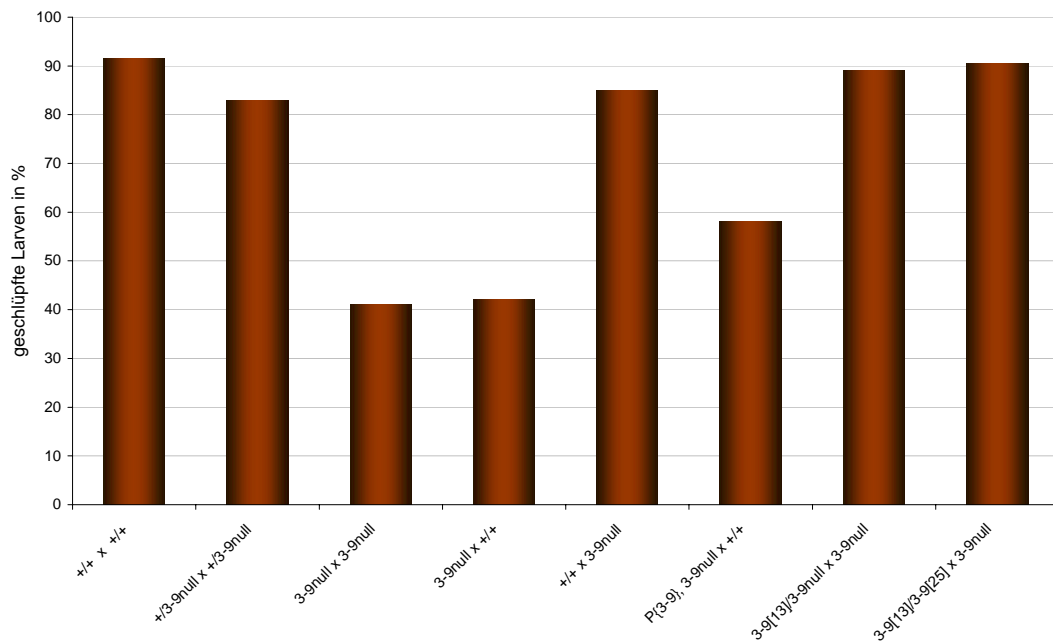


Abbildung 3.5: Maternal zugeführtes SU(VAR)3-9 ist erforderlich für eine korrekte Embryonalentwicklung. Es wurde die Prozentzahl geschlüpfter Larven bei maternal bzw. paternal eingekreuzten *Su(var)3-9* Mutanten ermittelt. Embryonen, denen die maternale SU(VAR)3-9-Komponente fehlt, weisen eine signifikante embryonale Letalität auf, die von einer paternalen *Su(var)3-9*-Wildtypkopie nicht ausgeglichen werden kann. Maternale Genprodukte hypomorpher *Su(var)3-9*-Mutanten [$Su(var)3-9^{13}$ und $Su(var)3-9^{25}$] sind ausreichend, um eine dem Wildtyp vergleichbare Embryonalentwicklung zu garantieren.

Für den *Su(var)3-9*-Locus konnten insgesamt 33 Allele identifiziert und molekular charakterisiert werden (Tschiersch et al., 1994; Schotta, 2002; Ebert et al., 2004). Basierend auf das Vermögen von *Su(var)3-9*, die Expression des *white*-Gens in dem PEV-Rearrangement *In(1)w^{m4h}* zu unterdrücken, ist es möglich, die *Su(var)3-9*-Mutanten, die als dominante Suppressoren auf PEV selektiert wurden, in Abhängigkeit von der Stärke des *Su(var)*-Effektes in amorphe bzw. hypomorphe Allele einzuordnen (auf die Charakterisierung der Allele wird in den Kapiteln 3.5.1 und 3.5.2 näher eingegangen). Auf diese Weise konnten die Allele *Su(var)3-9^{l3}* und *Su(var)3-9²⁵* als hypomorphe *Su(var)3-9*-Mutanten eingestuft werden.

Um sicher nachweisen zu können, daß die beobachteten Segregationsdefekte während der frühen Embryonalentwicklung tatsächlich ausschließlich aus dem Verlust des maternalen SU(VAR)3-9-Proteins resultieren, wurden Tiere, die transheterozygot *Su(var)3-9* Null-Mutationen aus unterschiedlichen genetischen Hintergründen tragen (Schotta, 2002), miteinander gekreuzt. In den analysierten Eiblaggen schlüpfen aus 18% bzw. 7% der Embryonen Larven (Daten nicht gezeigt). Eine dramatische Erhöhung der Lebensfähigkeit der Embryonen ist dagegen zu verzeichnen, wenn Weibchen analysiert werden, die heterozygot oder transheterozygot hypomorphe *Su(var)3-9*-Allele tragen (Abb. 3.5). Die reduzierte Aktivität dieser hypomorphen *Su(var)3-9*-Mutanten ist offenbar ausreichend, um die Funktion von SU(VAR)3-9 während der syncytialen Kernteilungen abzusichern. Da der Effekt des maternalen Phänotyps nicht 100% penetrant ist, das heißt, nicht alle Embryonen sterben, die kein maternal zugeführtes SU(VAR)3-9-Protein aufweisen, muß es andere maternale Genprodukte geben, die redundante Funktionen ausüben und aufgrunddessen die syncytialen Kernteilungen in einigen Embryonen korrekt erfolgen können.

Die SET-Domäne von SU(VAR)3-9 weist eine Methyltransferaseaktivität, spezifisch für die Position Lysin 9 im Histon H3 (H3-K9), auf (Czermin et al., 2001; Schotta et al., 2002). Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß diese spezifische Histon-Modifizierung eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielt. Tatsächlich konnte in Westernblotanalysen von 0-4 h alten Wildtypembryonen mit Hilfe eines H3-K9-dimethyl-Antikörpers eine signifikante H3-K9 di-Methylierung nachgewiesen werden, die in *Su(var)3-9* Null-Embryonen gleichen Alters massiv reduziert ist (Abb. 3.6A). Ebendiese reduzierte H3-K9 di-Methylierung läßt die Vermutung zu, daß mindestens eine weitere Histonmethyltransferase mit enzymatischer Aktivität für H3-K9 als maternales Genprodukt im Embryo vorliegt. Diese "Rest"-Methylierung der H3-K9-Position könnte demzufolge die korrekte Segregation der Chromosomen einiger Embryonen während der frühen Embryonalentwicklung gewährleisten.

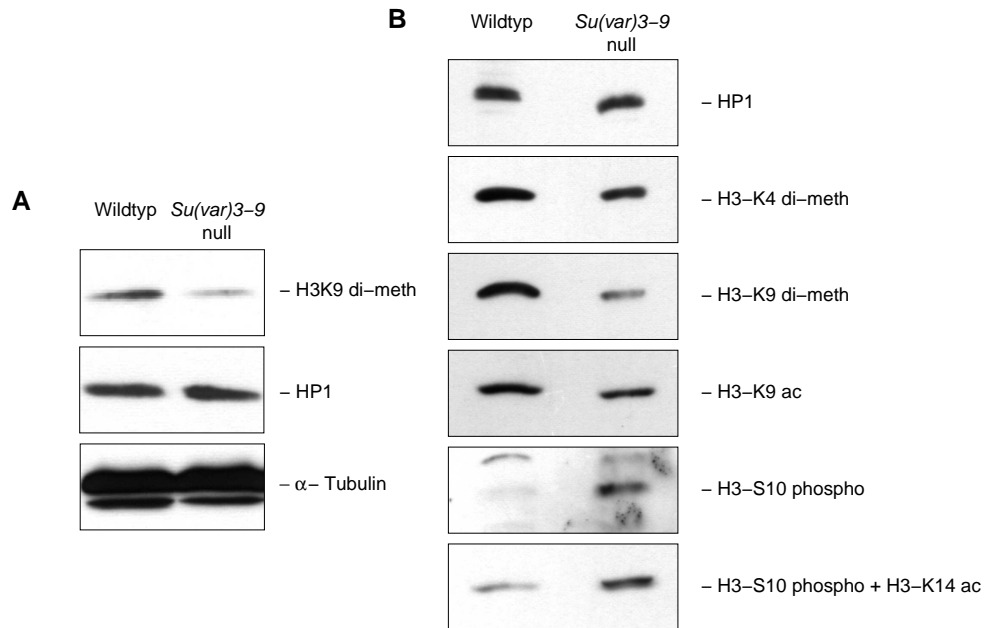


Abbildung 3.6: *Su(var)3-9*-abhängige Änderung kovalenter Histon-Modifikationen. **(A)** Gleiche Mengen Kernextrakt von 0-4 h alten Wildtyp- bzw. homozygoten *Su(var)3-9* Null-Embryonen wurden für zwei Westernblots verwendet und (von oben nach unten) mit H3-K9 dimethyl-Antikörper, HP1-Antikörper bzw. α -Tubulin-Antikörper (zur Quantifizierung) markiert. **(B)** Gleiche Mengen Kernextrakt von 0-4 h alten Wildtyp- bzw. homozygoten *Su(var)3-9* Null-Embryonen wurden für Westernblots benutzt und (von oben nach unten) mit HP1-, H3-K4 di-methyl-, H3-K9 di-methyl-, H3K9 acetyl-, H3-S10 phospho- und H3-S10 phospho + H3-K14 acetyl- Antikörper markiert.

Es ist bekannt, daß H3-K9-Methylierung andere Modifikationen benachbarter Aminosäuren des N-Terminus von Histon H3, wie beispielsweise Acetylierung und Phosphorylierung, beeinflussen kann (Peters et al., 2001). Die *Set9*-vermittelte Methylierung von H3-K4 beispielsweise, verhindert die Bindung des NuRD-Komplexes und unterstützt damit die Aktivierung der Transkription (Norma et al., 2001; Nishioka et al., 2002a). Darüberhinaus beeinträchtigt diese Modifizierung *Suw39h1*-abhängige, aber nicht *G9a*-abhängige H3-K9-Methylierung (Nishioka et al., 2002a). Die Methylierung von H3-K4 sowie die Acetylierung von H3-K9 ist in *G9a*-defizienten Mäusen, aufgrund der reduzierten H3-K9 di-Methylierung, stark erhöht (Tachibana et al., 2002). Methyliertes H3-K9 kann *in vitro* die Phosphorylierung von H3-S10 durch die Ipl1/aurora-Kinase (Rea et al., 2000) beeinflussen. H3-S10 Phosphorylierung wiederum erleichtert die Acetylierung von H3-K14 durch die Acetyltransferase GCN5 (Cheung et al., 2000). Aufgrund dieser Fakten bezüglich der Abhängigkeiten und gegenseitigen Beeinflussung der aufgeführten Histon-Modifikationen sowie deren Auswirkung auf den Chromatinstatus, wurden der Methylierungsstatus von H3-K4, die Acetylierungslevel von H3-K9 und H3-K14 und der Phosphorylierungsstatus von H3-S10 in *Su(var)3-9* Null-Embryonen (0-4h) mittels Westernblotanalysen untersucht. Die Level der H3-K4 di-Methylierung und H3-K9 Acetylierung zeigen sich in *Su(var)3-9* Null-Embryonen unbeeinflusst (Abb. 3.6B). Demgegenüber ist eine massive Erhöhung der H3-S10 Phosphorylierung erkennbar (Abb. 3.6B). Darüberhinaus ist unter Verwendung eines Antikörpers, der neben der H3-S10 Phosphorylierung auch die H3-K14 Acetylierung erkennt, im Westernblot ein verstärktes Signal nachweisbar, was für eine hochgradige Erhöhung beider Modifikationen in *Su(var)3-9* Null-Embryonen spricht (Abb. 3.6B). Diese Analysen bezüglich weiterer Histon-Modifikationen im Histon H3 dokumentieren eine tiefgreifende Änderung des Chromatinzustandes in *Su(var)3-9* Null-Embryonen.

3.2.4 Der Verlust von SU(VAR)3-9 führt zu Defekten in Ovarien

Die syncytialen Kernteilungen der frühen Embryonalentwicklung sind gänzlich abhängig von mRNA-Transkripten und Proteinen, die während der Oogenese in die Oocyte gegeben werden (Edgar und Schubiger, 1986). Da *Su(var)3-9* Null-Mutanten einen starken maternalen Effekt aufweisen und SU(VAR)3-9 in Nährzellen und Follikelzellen aller Oogenesestadien nachweisbar ist (Schotta, 2002), liegt die Vermutung nahe, daß *Su(var)3-9* ebenfalls eine Funktion während der Oogenese ausübt. Aus diesem Grund wurden Ovarien transheterozygoter *Su(var)3-9* Null-Mutanten präpariert und im Vergleich mit Ovarien von Wildtypweibchen

analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, daß in Ovarien aller untersuchten Mutantenweibchen, nicht jedoch der Wildtypweibchen, einzelne Eikammern nachweisbar sind, die degeneriert vorliegen (Abb. 3.7; Pfeile). Die Eikammern zeigen eine starke Degeneration der Nährzellen. Aus diesen Daten kann man folgern, daß SU(VAR)3-9 bereits während der Oogenese eine Rolle spielt. Ob es sich bei den beobachteten Defekten um apoptotische Prozesse handelt, bleibt zu untersuchen.

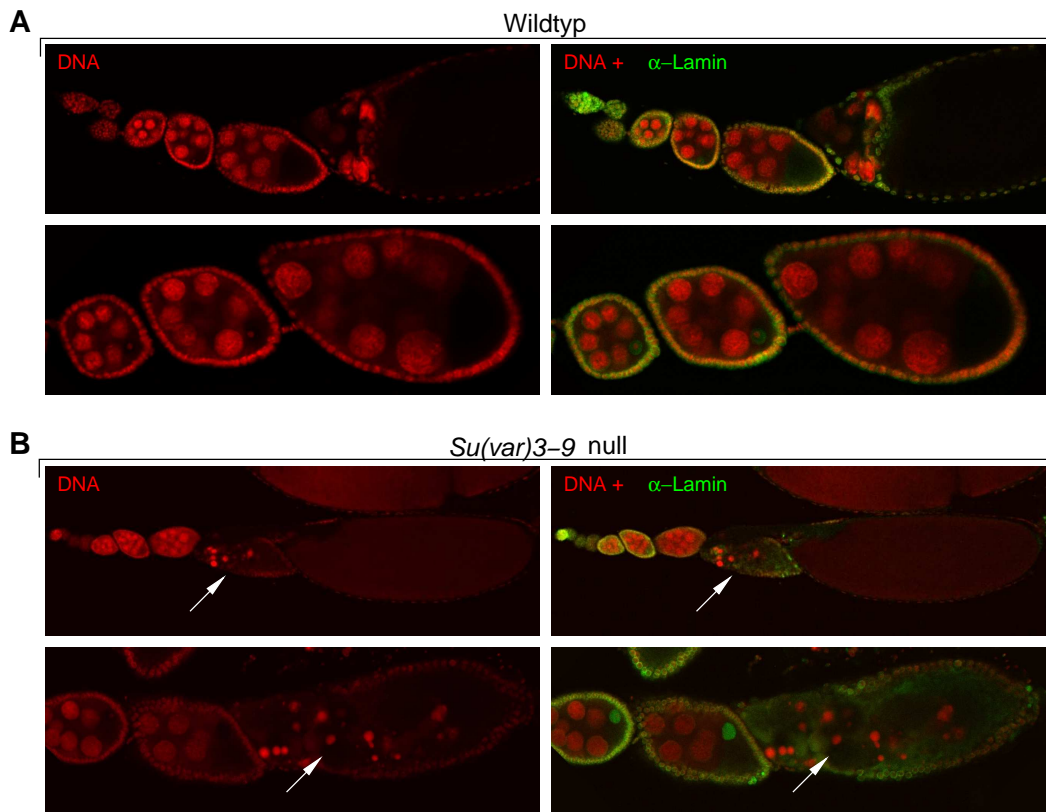


Abbildung 3.7: Defekte während der Oogenese in *Su(var)3-9* Null-Mutanten. Ovarien von Wildtypweibchen zeigen eine normale Oogenese (**A**), während einige Eikammern transheterozygoter *Su(var)3-9* Null-Mutanten-Weibchen degeneriert sind (Pfeile) (**B**). DNA-Färbung mit Propidiumiodid (rot). Immunmarkierung mit einem Lamin-Antikörper zeigt die Kernlamina von Nährzellen, Follikelzellen und Oocyten-Zellkern (grün).

Um festzustellen, ob die teilweise gestörte Ovarienentwicklung in *Su(var)3-9* Null-Mutanten mit einer reduzierten H3-K9-Methylierung einhergeht, wurden Ovarien von Wildtyp- bzw. *Su(var)3-9* Null-Mutanten präpariert und mittels H3-

K9 di-methyl-Antikörper vergleichend analysiert. In Wildtyp-Ovarien ist die H3-K9 di-Methylierung prominent im Oocyten-Zellkern und in den Follikelzellen, hier in einem einzelnen, DAPI-intensiven Bereich, nachweisbar (Abb. 3.8). Außerdem ist eine Markierung der polyploiden Nährzellen sichtbar. Gleichwohl ist in Ovarien von *Su(var)3-9* Null-Mutanten keine signifikante Reduzierung der H3-K9 di-Methylierung, weder im Oocytenzellkern noch in den Nährzellen zu verzeichnen (Abb. 3.8). Allein eine schwache Reduktion der H3-K9 di-Methylierung in den, zum somatischen Gewebe gehörenden, Follikelzellen ist nachweisbar (Abb. 3.8).

Dieses überraschende Ergebnis deutet an, daß es während der Oogenese andere, H3-K9-spezifische HMTasen geben muß, die den Großteil der H3-K9-Methylierung ausführen. Aufgrund der Präsenz des SU(VAR)3-9-Proteins während der Oogenese sowie dem Auftreten von Defekten in Ovarien von *Su(var)3-9* Null-Mutanten, scheint SU(VAR)3-9 in diesem speziellen Entwicklungsstadium eine andere, momentan unbekannte Funktion auszuüben.

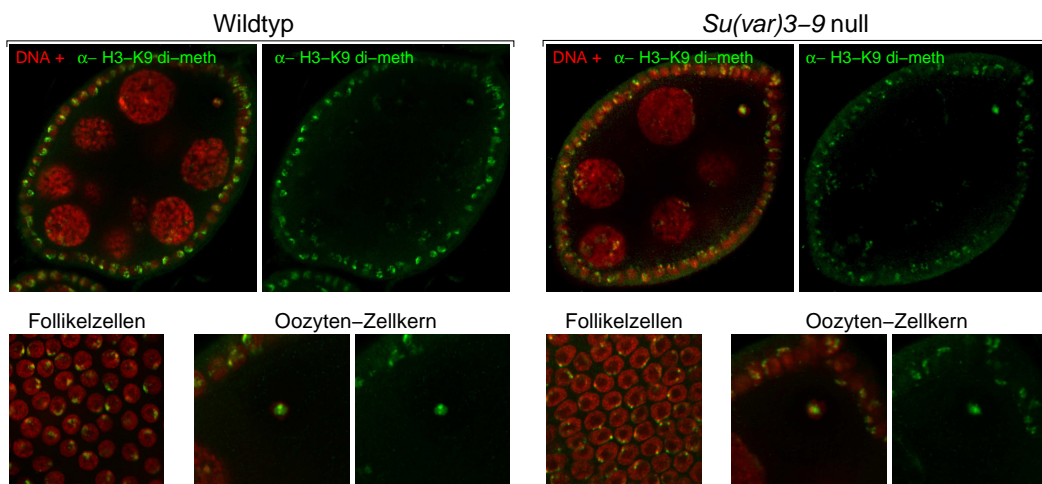


Abbildung 3.8: Immunmarkierung von Wildtyp- und *Su(var)3-9* Null-Mutanten-Weibchen mit einem H3-K9 di-methyl-Antikörper. Die obere Reihe zeigt ganze Eikammern, die untere Reihe Ausschnittsvergrößerungen von Follikelzellen (Überlagerung der DNA- und Antikörpermarkierung) und Oocytenzellkern (links: Überlagerung der DNA- und Antikörpermarkierung; rechts: Antikörpermarkierung). DNA-Färbung mit DAPI (rot), H3-K9 di-methyl-Antikörper ist grün dargestellt.

3.3 SU(VAR)3-9 ist mit heterochromatischen Bereichen assoziiert

Das *Su(var)3-9*-Gen ist eines der stärksten dominanten Suppressoren für PEV. Aus diesem Grund stellt die Untersuchung der molekularen Funktion dieses Gens einen wichtigen Schritt in der Aufklärung der Regulation der Chromatinstruktur dar.

Bei *Drosophila melanogaster* sind die Chromosomen der Speicheldrüsen mehr als 1000fach polytänisiert. Die euchromatischen Arme der Chromosomen fusionieren in ein Chromozentrum, welches aufgrund seiner Größe mikroskopisch gut analysierbar ist. Da polytäne Speicheldrüsenchromosomen eine sehr gute Möglichkeit bieten, bestimmte Chromatinstrukturen in einer sehr hohen Auflösung zu untersuchen, wurde die Verteilung des endogenen SU(VAR)3-9-Proteins in Speicheldrüsen dritter Larven analysiert. Dabei konnte nach indirekter Immunfluoreszenz mit Hilfe des SU(VAR)3-9-Antikörpers eine starke Markierung des heterochromatischen Chromozentrums und des größtenteils heterochromatischen 4. Chromosoms (Abb. 3.9A) beobachtet werden. Interessanterweise konnte im zentralen Bereich des Chromozentrums eine lokale Anreicherung von SU(VAR)3-9 nachgewiesen werden (Abb. 3.9A, Pfeil). Darüberhinaus sind in abgeschwächter Form einige euchromatische Banden und Telomere, die ebenfalls heterochromatischen Charakter aufweisen, markiert (Abb. 3.9A). In Polytänchromosomen homozygoter *Su(var)3-9* Null-Larven konnten unter Einsatz des SU(VAR)3-9-Antikörpers keine Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was die hohe Spezifität dieses Antikörpers unterstreicht.

In früheren Arbeiten konnte mit Hilfe transgener Linien, welche SU(VAR)3-9-EGFP unter Kontrolle des endogenen Promotors oder des Hitzeschock-Promotors exprimieren [$P\{c3-9-EGFP\}$], *in vivo* ebenfalls eine Assoziation mit dem Chromozentrum und dem 4. Chromosom nachgewiesen werden (Schotta et al., 2002). Immunmarkierung einer $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linie mit monoklonalem GFP- und polyklonalem SU(VAR)3-9-Antikörper zeigen eine komplette Kolo-kalisierung beider Signale (Abb. 3.9B). Es kann also davon ausgegangen werden, daß der SU(VAR)3-9-Antikörper das endogene Protein spezifisch erkennt, darüberhinaus die transgenen $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linien funktionell sind und somit eine gute Basis für weitere Analysen bieten. Daß $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linien nach erfolgter Remobilisierung in der Lage sind, die Funktion eines mutierten *Su(var)3-9*-Allels zu übernehmen (Schotta et al., 2002), untermauert diese Annahme.

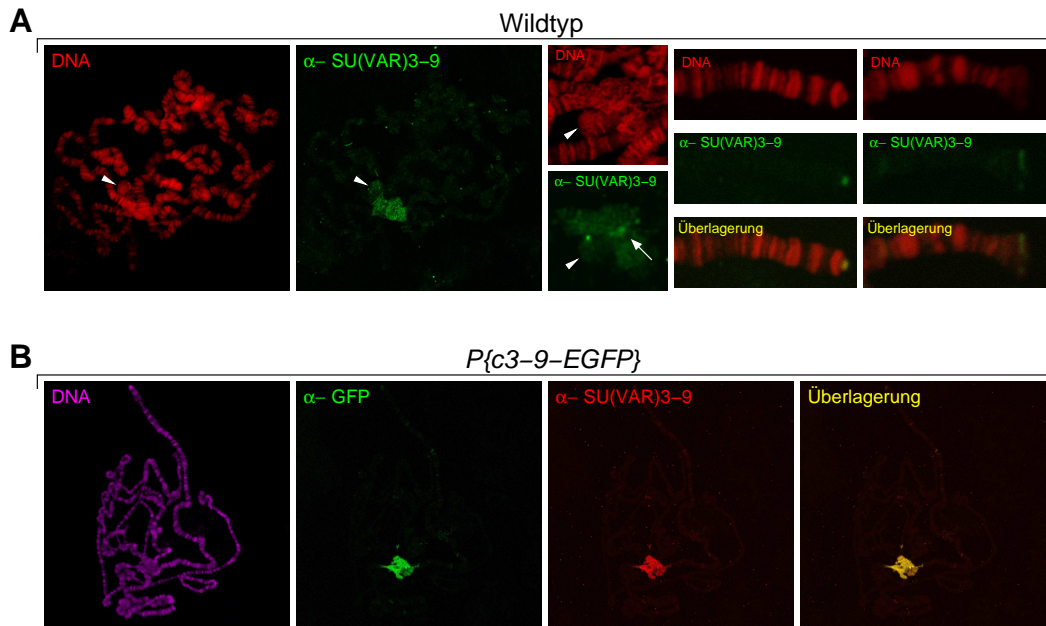


Abbildung 3.9: Nachweis von SU(VAR)3-9 in Polytänchromosomen mit Hilfe des SU(VAR)3-9-Antikörpers. **(A)** Links: SU(VAR)3-9 ist in Wildtypchromosomen mit dem Chromozentrum und dem 4. Chromosom (Pfeilkopf) assoziiert. Mitte: Vergrößerung des Chromozentrums mit der lokalen Anreicherung des Antikörpersignals im Kern des Chromozentrums (Pfeil). Der Pfeilkopf deutet auf das 4. Chromosom. Rechts: Nachweis von SU(VAR)3-9 an Telomeren. DNA-Färbung mit Propidiumiodid. **(B)** Immunmarkierung einer $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linie mit einem GFP-Antikörper, der das SU(VAR)3-9-EGFP Fusionsprotein erkennt und dem SU(VAR)3-9-Antikörper. Eine Kolokalisierung beider Markierungen wird durch die Überlagerung der Signale deutlich. DNA-Färbung mit TOTO-3.

3.3.1 SU(VAR)3-9 und HP1 sind Interaktionspartner

Mit Hilfe des Hefe-Dihybridsystems bzw. Co-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß HP1 ein Interaktionspartner von SU(VAR)3-9 ist (Schotta et al., 2002). Um nachzuweisen, daß SU(VAR)3-9 und HP1 kolokalisiert sind, sollte deren Proteinverteilung näher untersucht werden. Nach Immunmarkierung von $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linien mit einem monoklonalen GFP-Antikörper, der das transgene SU(VAR)3-9-EGFP erkennt und einem polyklonalen HP1-Antikörper, konnte eine Kolokalisierung beider Signale beobachtet werden (Abb. 3.10A).

Ein chimäres, mit β -Galactosidase fusioniertes, HP1-PC-Protein, in welchem die Chromo-Domäne von HP1 durch die von POLYCOMB ersetzt wurde, zeigt wie HP1 eine Verteilung innerhalb des Chromozentrums, ist jedoch darüberhinaus an Bindungsstellen von POLYCOMB im Euchromatin lokalisiert (Platero et al., 1995). HP1-interagierende Proteine sind in diesem Fall ebenfalls an POLYCOMB-Bindungsstellen im Euchromatin detektierbar (Platero et al., 1996). Mit Hilfe dieses speziellen Systems kann eine unmittelbare Interaktion von SU(VAR)3-9 mit HP1 *in vivo* nachgewiesen werden. Kombiniert man eine $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linie mit der HP1-PC-Linie, wird nach einem Hitzeschock sowohl die Expression von SU(VAR)3-9-EGFP als auch die des HP1-PC-Proteins induziert. Daraufhin konnte SU(VAR)3-9-EGFP ebenfalls an zusätzlichen euchromatischen Bindungsstellen identifiziert werden, die mit denen des HP1-PC-Proteins überlappen (Abb. 3.10B). Das HP1-PC-Chimärenprotein ist ebenfalls in der Lage, das endogene SU(VAR)3-9-Protein zu rekrutieren (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe dieser Experimente konnte bewiesen werden, daß SU(VAR)3-9 und HP1 *in vivo* interagieren.

3.3.2 SU(VAR)3-9 und HP1 binden mit unterschiedlicher Affinität an das Chromatin

Die Chromatinproteine SU(VAR)3-9 und HP1 sind in polytären Speicheldrüsenchromosomen kolokalisiert. Es ist bekannt, daß HP1 mittels seiner Chromo-Domäne di- und tri-methyliertes H3-K9 binden kann (Lachner et al., 2001). Über welchen Mechanismus SU(VAR)3-9 an das Chromatin bindet, ist unbekannt, mit Hilfe transgener Fusionsproteine konnte jedoch der N-Terminus von SU(VAR)3-9 als Chromatin-bindendes Modul identifiziert werden (Schotta et al., 2002).

Um zu untersuchen, welchen Einfluß eine starke Überexpression beider Proteine auf deren Chromatin-Assoziation ausübt, wurden transgene Linien, die entweder die cDNA von SU(VAR)3-9 ($P\{c3-9-EGFP\}$) oder HP1 ($P\{cHP1-EGFP\}$) tragen, analysiert. Diese transgenen Linien exprimieren die jeweilige cDNA, fu-

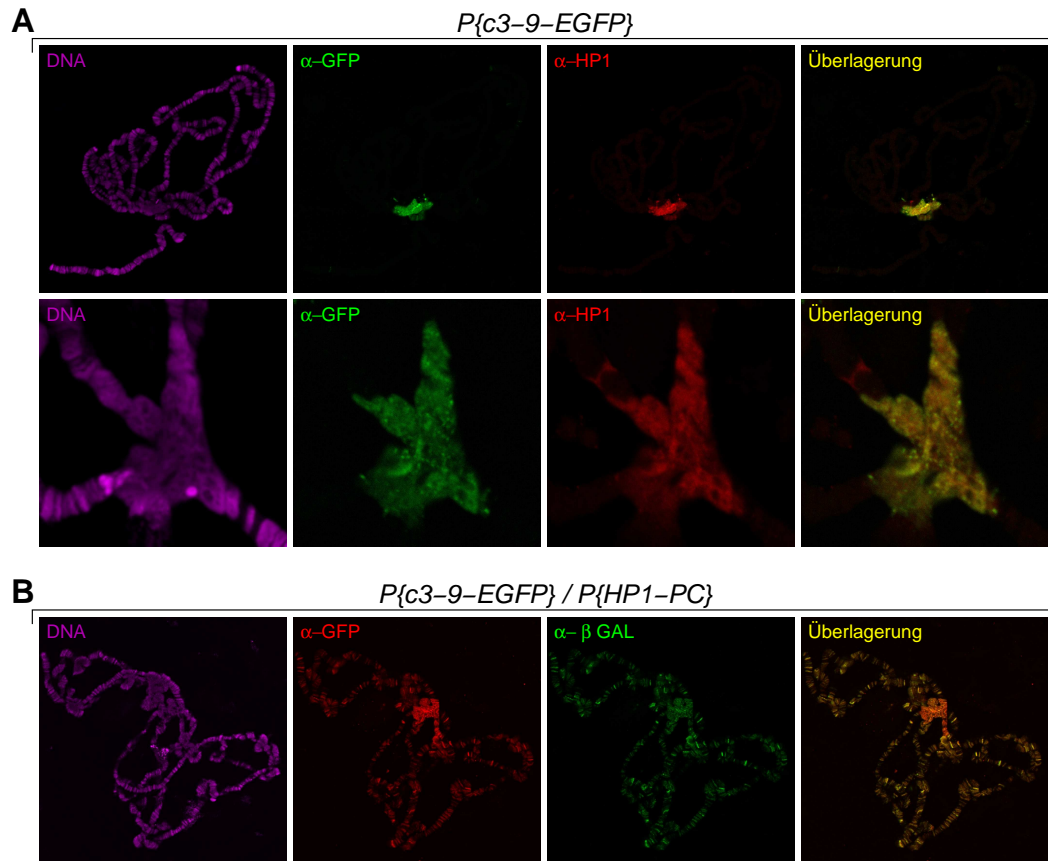


Abbildung 3.10: SU(VAR)3-9 und HP1 interagieren *in vivo*. **(A)** Kolokalisierung von SU(VAR)3-9-EGFP und endogenem HP1. Nachweis der Proteine mit Hilfe eines GFP-Antikörpers, der das SU(VAR)3-9-EGFP-Fusionsprotein erkennt und eines HP1-Antikörpers. Die untere Reihe zeigt die Vergrößerung eines Chromozentrums. **(B)** Chimäres HP1-PC-Protein ist in der Lage, SU(VAR)3-9-EGFP an zusätzliche euchromatische Bindungsstellen zu rekrutieren. Nachweis der Proteine mit Hilfe eines GFP-Antikörpers, der das SU(VAR)3-9-EGFP-Fusionsprotein erkennt und eines β -Gal-Antikörpers, der das HP1-PC-Chimärenprotein detektiert. DNA-Färbung mit TOTO-3.

sioniert mit EGFP, unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors *hsp70* (Schotta et al., 2002). In unfixierten Speicheldrüsenchromosomen konnte anhand der EGFP-Fluoreszenz eine Bindung beider Proteine im Chromozentrum nachgewiesen werden (Schotta et al., 2002). Eine immunzytologische Analyse der SU(VAR)3-9-EGFP- bzw. HP1-EGFP-Fusionsproteine mit Hilfe eines GFP-Antikörpers erlaubt hingegen eine genauere Lokalisierung der Proteinbindung innerhalb des Chromatins. Nach einem schwachen Hitzeschock von 1 min ist das SU(VAR)3-9-EGFP-Protein hauptsächlich im Chromozentrum und am 4. Chromosom nachweisbar (Abb. 3.11; Pfeilkopf) bzw. überaus schwach an wenigen euchromatischen Banden und Telomeren. Die Analyse des HP1-EGFP-Fusionsproteins nach einem gleichartigen Hitzeschock zeigt ebenfalls größtenteils eine Markierung des Chromozentrums und des 4. Chromosoms (Abb. 3.11). Erhöht man jedoch die Expressionslevel beider Fusionsproteine durch einen weitaus stärkeren Hitzeschock von beispielsweise 10 oder 20 min, wird eine deutlich voneinander abweichende Chromatinbindung offensichtlich. Nach einem Hitzeschock von 10 min ist das SU(VAR)3-9-EGFP-Protein in den $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linien neben der starken Markierung des Chromozentrums und des 4. Chromosoms sowohl deutlich an ca. 30 euchromatischen Banden als auch an allen Telomeren nachweisbar (Abb. 3.11). Erhöht man weiterhin die Expression des SU(VAR)3-9-EGFP-Fusionsproteins, ist größtenteils eine Veränderung des Bindungsmusters innerhalb des X-Chromosoms zu verzeichnen (Abb. 3.11; X). Am X-Chromosom weiblicher und männlicher Larven sind deutlich mehr Bindungsstellen von SU(VAR)3-9 nachweisbar (Abb. 3.11; dargestellt ist das Chromosom einer weiblichen Larve). Eine weitere Erhöhung des Hitzeschocks (bis zu 2 h) hat keinen weiteren nennenswerten Einfluß auf das Verteilungsmuster von SU(VAR)3-9 (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Analysen kann man ableiten, daß die Verteilung des SU(VAR)3-9-EGFP-Proteins nach einem Hitzeschock von 5-10 min in etwa der Verteilung des endogenen Proteins entspricht (vergleiche mit Abb. 3.9). Erhöht man hingegen die Expressionslevel der $P\{cHP1-EGFP\}$ -Linien durch einen Hitzeschock von beispielsweise 10 oder 20 min, zeigt sich, daß das HP1-EGFP-Fusionsprotein neben dem Chromozentrum mit nahezu jeder euchromatischen Bande assoziiert ist (Abb. 3.11). Immunzytologische Analysen des endogenen HP1-Proteins mit unabhängig generierten HP1-Antikörpern zeigen jedoch neben der Markierung des Chromozentrums und des 4. Chromosoms nur eine Assoziation mit einigen euchromatischen Banden [Abb. 3.10; James et al. (1989); Fanti et al. (1998)]. Es ist denkbar, daß die massive Überexpression des HP1-EGFP-Proteins eine unspezifische Chromatinassoziation dieses Fusionsproteins bewirkt, da *in vitro* nachgewiesen werden konnte, daß HP1 in der Lage ist, an Nucleosomen und DNA zu

binden (Zhao et al., 2000). Es kann also argumentiert werden, daß, obwohl in gleiche Proteinkomplexe inkorporiert, SU(VAR)3-9 und HP1 offensichtlich über unterschiedliche Mechanismen zur Chromatinbindung verfügen.

Untersucht man die Verteilung von SU(VAR)3-9 und HP1 innerhalb des Chromatins im *Su(var)2-5* bzw. *Su(var)3-9* Null-Hintergrund, wird eine wechselseitige Beeinflussung der Proteinverteilung beider Chromatinproteine deutlich. In *Su(var)2-5* Null-Larven ist das SU(VAR)3-9-EGFP-Fusionsprotein im Gegensatz zum Wildtyp an nahezu allen Banden entlang der euchromatischen Chromosomenarme verteilt (Abb. 3.11 B; vergleiche mit 3.11 A: mittlere Reihe). In der Assoziation des SU(VAR)3-9-Proteins mit dem Chromozentrum ist jedoch kein Unterschied zu verzeichnen (Abb. 3.11 B). Somit scheint endogenes HP1 wichtig für die begrenzte Bindung von SU(VAR)3-9 im perizentrischen Heterochromatin zu sein. Im Gegensatz dazu ist die Assoziation des HP1-EGFP-Fusionsproteins mit dem Chromozentrum von *Su(var)3-9* Null-Larven drastisch reduziert, im 4. Chromosom jedoch unbeeinflusst (Abb. 3.11 B; vergleiche mit 3.11 A: mittlere Reihe). Aus diesen Analysen kann man schließen, daß für die korrekte heterochromatische Verteilung von HP1 endogenes SU(VAR)3-9 erforderlich ist.

3.4 Kontrolle der H3-K9 bzw. H3-K27

Methylierungsstadien in *Drosophila melanogaster*

Frühe biochemische Analysen weisen darauf hin, daß Lysine in den Histonen H3 und H4 in mono-, di- oder tri-methyliertem Zustand vorliegen können (Paik und Kim, 1971; DeLange et al., 1973). Die *in vivo*-Verteilung und die biologische Relevanz der drei verschiedenen Lysin-Methylierungsstadien ist jedoch weitgehend ungeklärt. Gleichwohl konnte in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden, daß die Präsenz der H3-K4 tri-Methylierung, katalysiert durch das Set1-Protein, aktive Genexpression determiniert (Santos-Rosa et al., 2002). Desweiteren existieren Daten, die konstatieren, daß in *Neurospora crassa* ausschließlich H3-K9 tri-Methylierung, vermittelt durch das SU(VAR)3-9-homologe Protein DIM-5, eine Voraussetzung für DNA-Methylierung darstellt (Tamaru et al., 2003). Methylierung von H3-K9 und H3-K27 stellt eine Markierung repressiven Chromatins dar (Fischle et al., 2003; Rougeulle et al., 2004). Unter Benutzung hochspezifischer Antikörper, die die Möglichkeit bieten, zwischen mono-, di- und tri-methyliertem Zustand von H3-K9 bzw. H3-K27 zu unterscheiden, konnte sowohl in Interphaschromatin als auch in mitotischen Chromosomen von murinen Zellen eine spezifische Verteilung dieser Markierungen beobachtet werden (Peters et al., 2003).

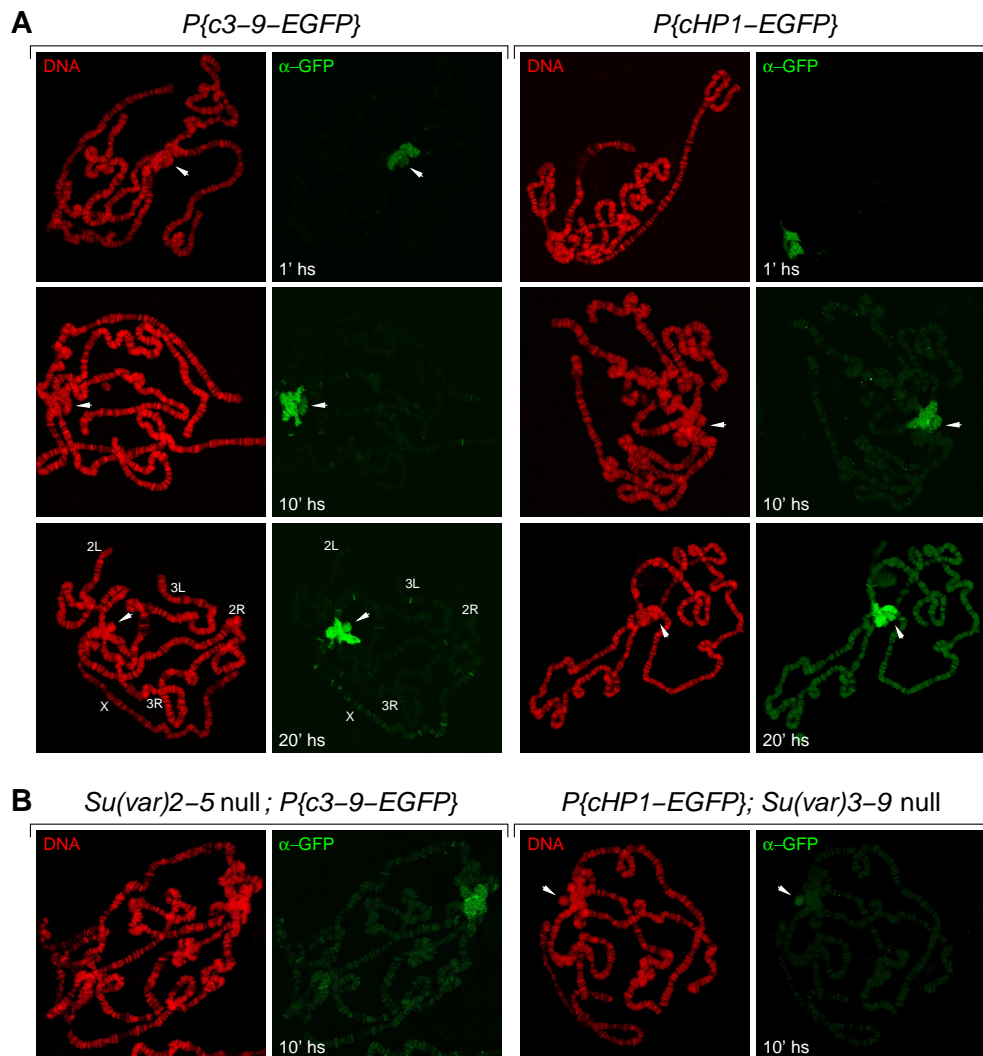


Abbildung 3.11: Verteilung transgener *P{c3-9-EGFP}*- bzw. *P{cHP1-EGFP}*-Fusionsproteine in Polytänchromosomen. **(A)** Proteinverteilung der *P{c3-9-EGFP}*- bzw. *P{cHP1-EGFP}*-Fusionsproteine nach variabler Induktion der Expression. Immunmarkierung mit Hilfe eines GFP-Antikörpers, der das jeweilige Fusionsprotein erkennt. Starke Überexpression von SU(VAR)3-9-EGFP zeigt eine begrenzte Zahl von SU(VAR)3-9-Bindungsstellen, während nach gleichartiger Überexpression HP1-EGFP an nahezu allen euchromatischen Banden nachweisbar ist. DNA-Färbung mit Propidiumiodid. Pfeilköpfe deuten auf das 4. Chromosom. Das X markiert das X-Chromosom; 2L, 2R, 3L und 3R die übrigen Chromosomen. Von oben nach unten: 1 min, 10 min, 20 min Hitzeschock. **(B)** Wechselseitige Kontrolle der Verteilung von SU(VAR)3-9 und HP1. Verteilung der *P{c3-9-EGFP}*- bzw. *P{cHP1-EGFP}*-Fusionsproteine im *Su(var)2-5* bzw. *Su(var)3-9* Null-Hintergrund. Immunmarkierung mittels GFP-Antikörper nach 10-minütiger Induktion der Expression.

Dabei ist perizentrisches Heterochromatin in Säugern durch eine starke Anreicherung der H3-K9 tri-Methylierung und H3-K27 mono-Methylierung charakterisiert (Peters et al., 2003). Die Antikörper dieser Kollektion wurden sorgfältig charakterisiert und zeigen in den durchgeführten Analysen keinerlei Kreuzreaktivitäten mit anderen Histon-Methylierungsstellen (Perez-Burgos et al., 2004). Unter Zuhilfenahme dieser spezifischen Antikörper sollte die Verteilung der H3-K9 und H3-K27-Methylierungsstadien im nativen Chromatin von *Drosophila melanogaster* untersucht werden.

3.4.1 H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung in Polytänychromosomen von *Drosophila melanogaster*

Zur Analyse der Verteilung der H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung wurden polytäre Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp und *Su(var)3-9* Null-Allelen vergleichend analysiert (Abb. 3.12 und 3.13). Im Chromozentrum und im 4. Chromosom des Wildtyps ist H3-K9 di-Methylierung die prominente Markierung (Abb. 3.13). Darüberhinaus ist H3-K9 di-Methylierung zusätzlich mit einigen euchromatischen Banden und Telomeren assoziiert (Abb. 3.12). H3-K9 mono-Methylierung konnte ebenfalls im Chromozentrum und überdies an vielen euchromatischen Banden nachgewiesen werden (Abb. 3.12 und 3.13). H3-K9 tri-Methylierung zeigt demgegenüber eine sehr spezielle Verteilung innerhalb des Heterochromatins mit einer starken Anreicherung im inneren Bereich des Chromozentrums (Abb. 3.13; Pfeilkopf).

In *Su(var)3-9* Null-Mutanten ist die H3-K9 mono-Methylierung nicht signifikant verändert (Abb. 3.12 und 3.13). Im Gegensatz dazu ist die H3-K9 di-Methylierung im Chromozentrum stark reduziert bzw. die H3-K9 tri-Methylierung nahezu vollständig verloren. Demgegenüber ist die H3-K9 di- und tri-Methylierung im 4. Chromosom von *Su(var)3-9*-Larven unbeeinflusst (Abb. 3.13; Pfeile). Interessanterweise ist der Kern des Chromozentrums, der in Wildtypchromosomen mit H3-K9 tri-Methylierung angereichert ist, in *Su(var)3-9*-Mutanten prominent H3-K9 di-methyliert (Abb. 3.13; Pfeilkopf).

HP1 ist notwendig, um SU(VAR)3-9 im Chromozentrum zu halten (Abb. 3.11B). Um zu analysieren, ob HP1 ebenfalls einen Einfluß auf die durch SU(VAR)3-9 vermittelte H3-K9-Methylierung hat, wurden die H3-K9 Methylierungsstadien in *Su(var)2-5* Null-Mutanten analysiert. Dabei zeigte sich, daß die H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung im Chromozentrum unbeeinflusst erscheint (Abb. 3.13), währenddessen eine dramatische Erhöhung der H3-K9 mono- und di-Methylierung an zahlreichen euchromatischen Banden zu verzeichnen ist (Abb. 3.12).

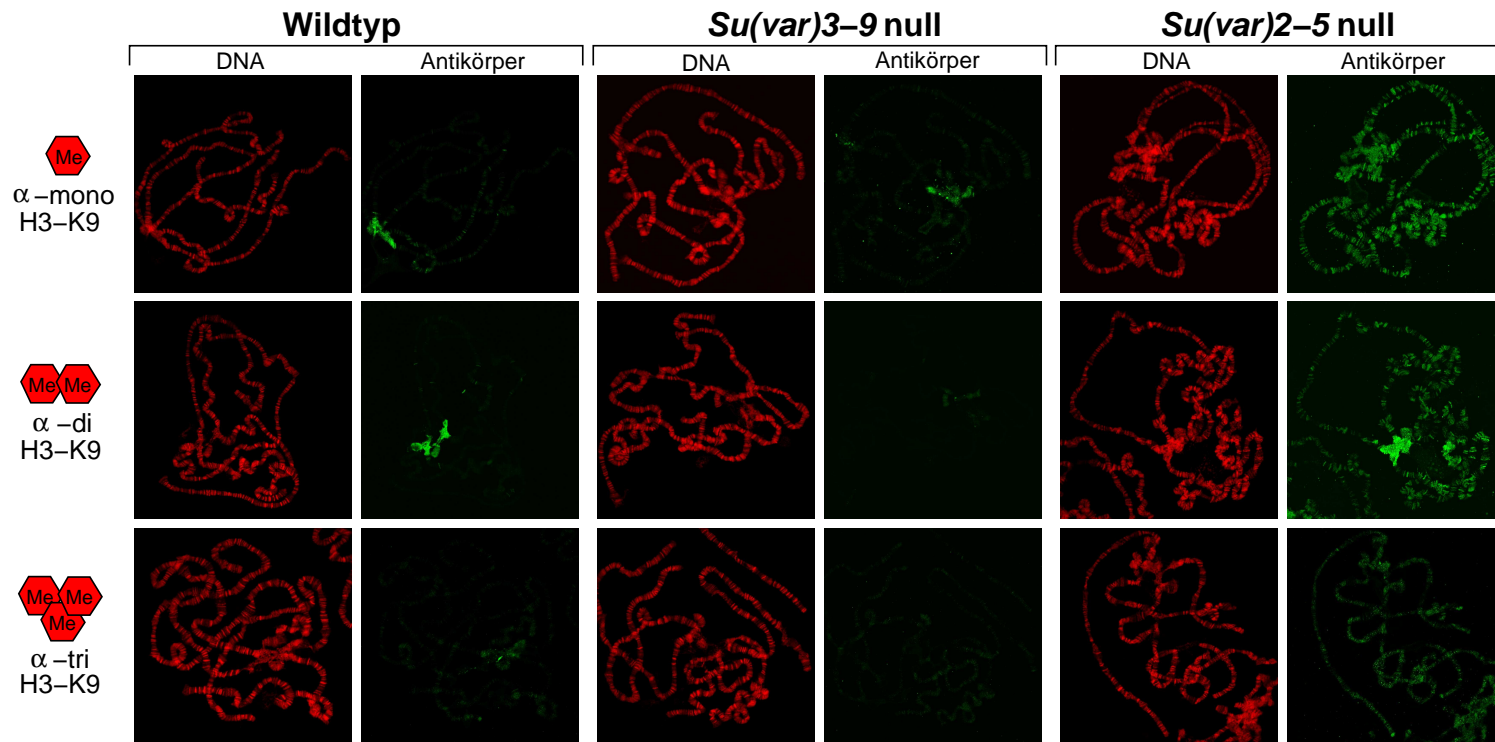


Abbildung 3.12: Kontrolle der H3-K9 Methylierungsstadien in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Verteilung der H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung in Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp-, *Su(var)3-9* Null- sowie *Su(var)2-5* Null-Larven. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

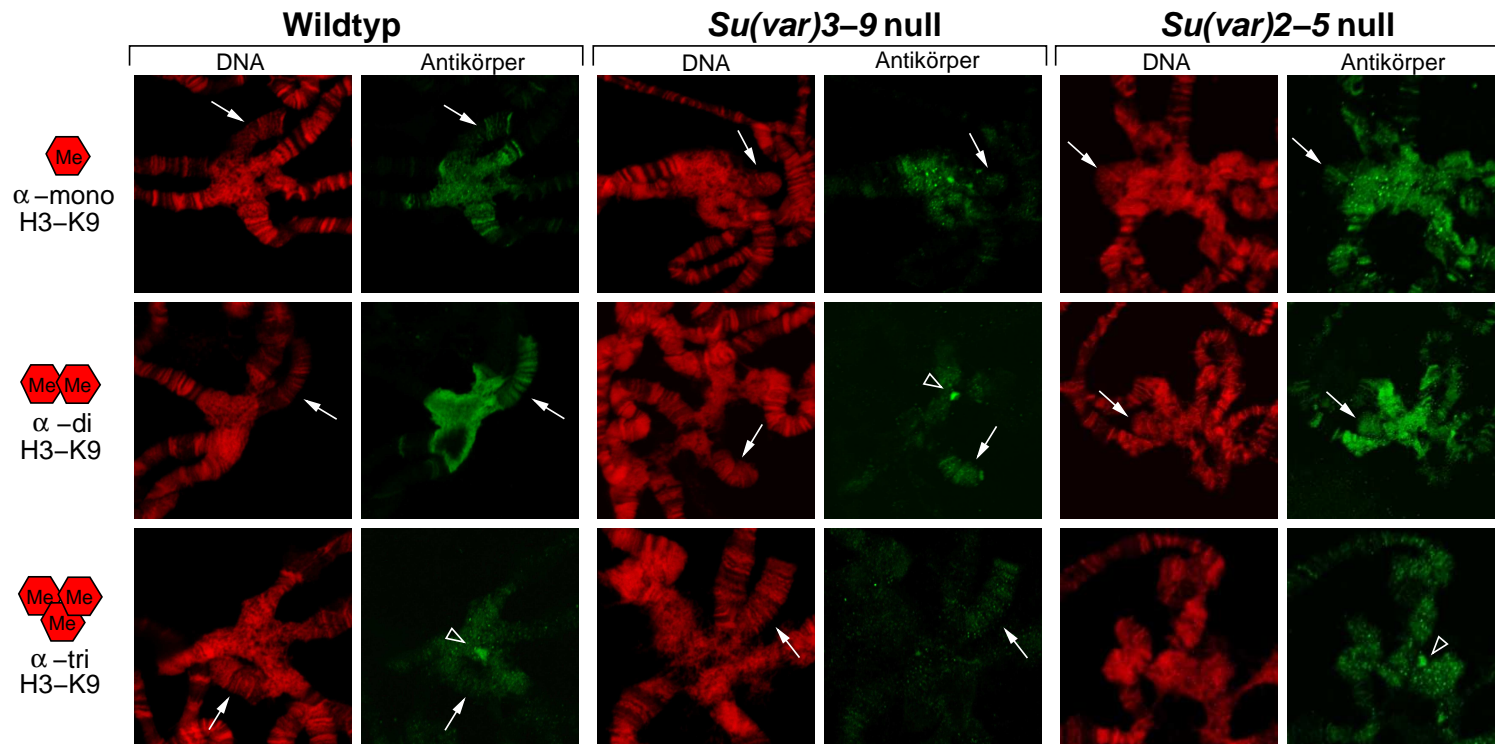


Abbildung 3.13: Kontrolle der H3-K9 Methylierungsstadien in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Verteilung der H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung im Chromozentrum von Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp-, *Su(var)3-9* Null- sowie *Su(var)2-5* Null-Larven. Pfeile deuten auf das 4. Chromosom, Pfeilkopf auf die lokale Anreicherung der Markierung innerhalb des Chromozentrums. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

3.4.2 H3-K27 mono-, di- und tri-Methylierung in Polytänchromosomen von *Drosophila melanogaster*

Die SET-Domäne von Enhancer of Zeste [E(Z)], einem PcG-Protein, welches im ESC-E(Z)-Komplex inkorporiert ist, weist eine Histon-Methyltransferaseaktivität für die H3-K27- und H3-K9-Position auf (Czermin et al., 2002; Müller et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002), wobei die Aktivität für H3-K9 in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Müller et al., 2002). In Wildtypchromosomen sind H3-K27 mono- und di-Methylierung im Chromozentrum und darüberhinaus auch an nahezu allen euchromatischen Banden zu finden (Abb. 3.14 und 3.15). H3-K27 tri-Methylierung ist ähnlich wie H3-K9 tri-Methylierung in einem zentralen Bereich des Chromozentrums angereichert (Abb. 3.15; Pfeilkopf) und weist darüberhinaus ca. 100 deutlich reproduzierbare euchromatische Banden auf (Abb. 3.14). Der Großteil dieser Banden entsprechen Bindungsstellen von POLYCOMB (Fischle et al., 2003). An anderer Stelle konnte durch Kartierung euchromatischer Banden von POLYCOMB, H3-K9 tri-Methylierung (hier wurde jedoch ein anderer H3-K9 tri-methyl-spezifischer Antikörper eingesetzt) und H3-K27 tri-Methylierung beobachtet werden, daß POLYCOMB sowohl umfangreiche Kolo-kalisierung mit H3-K27 tri-Methylierung, als auch mit H3-K9 tri-Methylierung aufweist (Ringrose et al., 2004). In Polytänchromosomen von *Su(var)3-9* Null-Mutanten ist keine signifikante Änderung der H3-K27-Methylierungsstadien zu beobachten (Abb. 3.14 und 3.15), wobei angefügt werden muß, daß in diesen Analysen nicht alle euchromatischen Banden beider Genotypen vergleichend bestimmt wurden. Somit können lokale geringfügige Änderungen der H3-K27-Methylierungsmuster in *Su(var)3-9* Null-Mutanten nicht ausgeschlossen werden. Erstaunlicherweise konnte demgegenüber in *E(z)* Null-Larven keinerlei H3-K27-Methylierung detektiert werden (Abb. 3.14).

3.4.3 Massenspektrometrische Analyse von Histonen

Um die mit Hilfe der H3-K9- und H3-K27-Methyl-Antikörper gewonnenen Resultate zu bestätigen, sollten diese mittels einer weiteren, Antikörper-unabhängigen, Methode verifiziert werden. Aus diesem Grund wurden in Zusammenarbeit mit Stefan Kubicek (Arbeitsgruppe T. Jenuwein, IMP Wien) Kernextrakte von Wildtyp- und Mutanten-Larven massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnten die mittels Immunfluoreszenz erhaltenen Daten bestätigt werden (Abb. 3.16). Zusammenfassend konnte demonstriert werden, daß in *Su(var)3-9*-Null-Mutanten die H3-K9 mono-Methylierung unbeeinflusst, die H3-K9 di-Methylierung nahezu auf

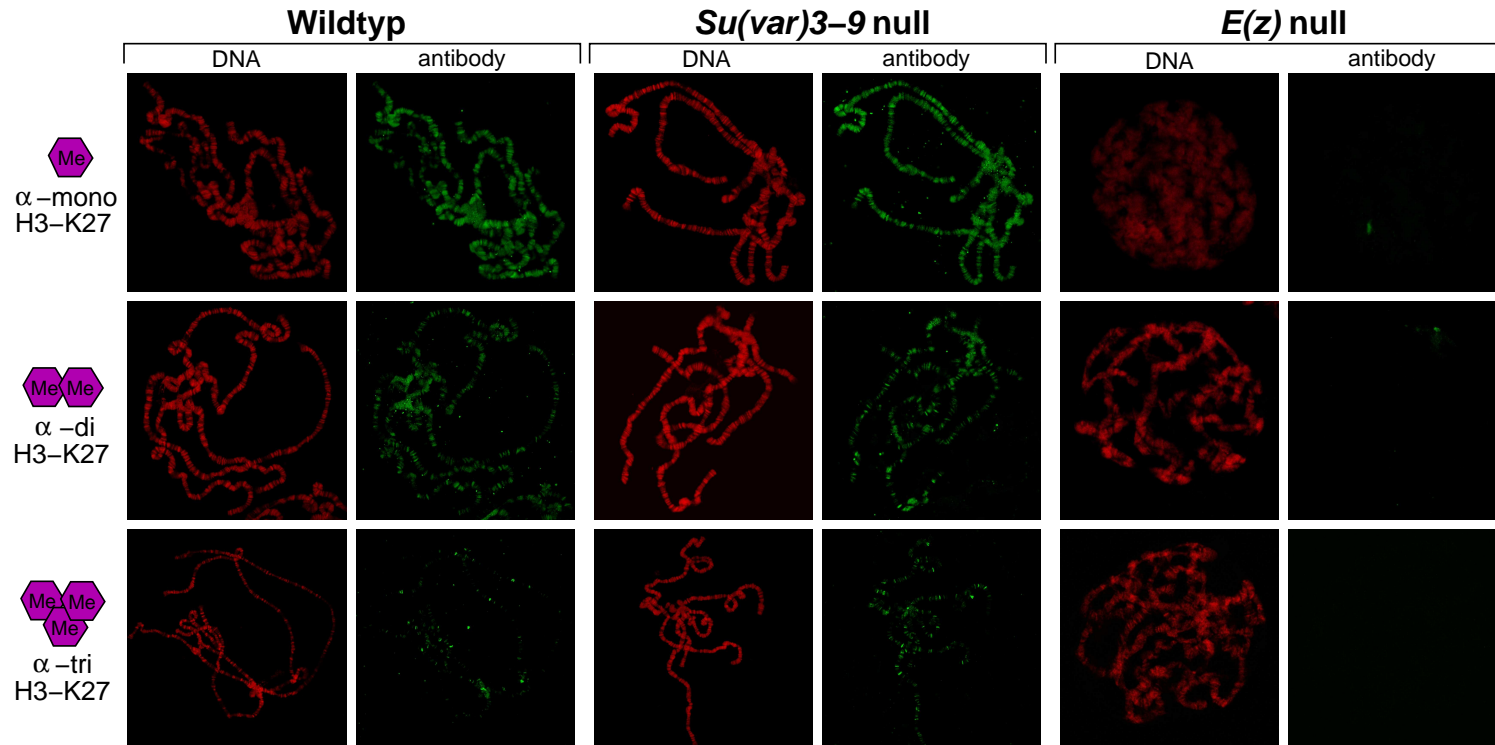


Abbildung 3.14: Kontrolle der H3-K27 Methylierungsstadien in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Verteilung der H3-K27 mono-, di- und tri-Methylierung in Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp-, *Su(var)3-9* Null- sowie *E(z)* Null-Larven. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

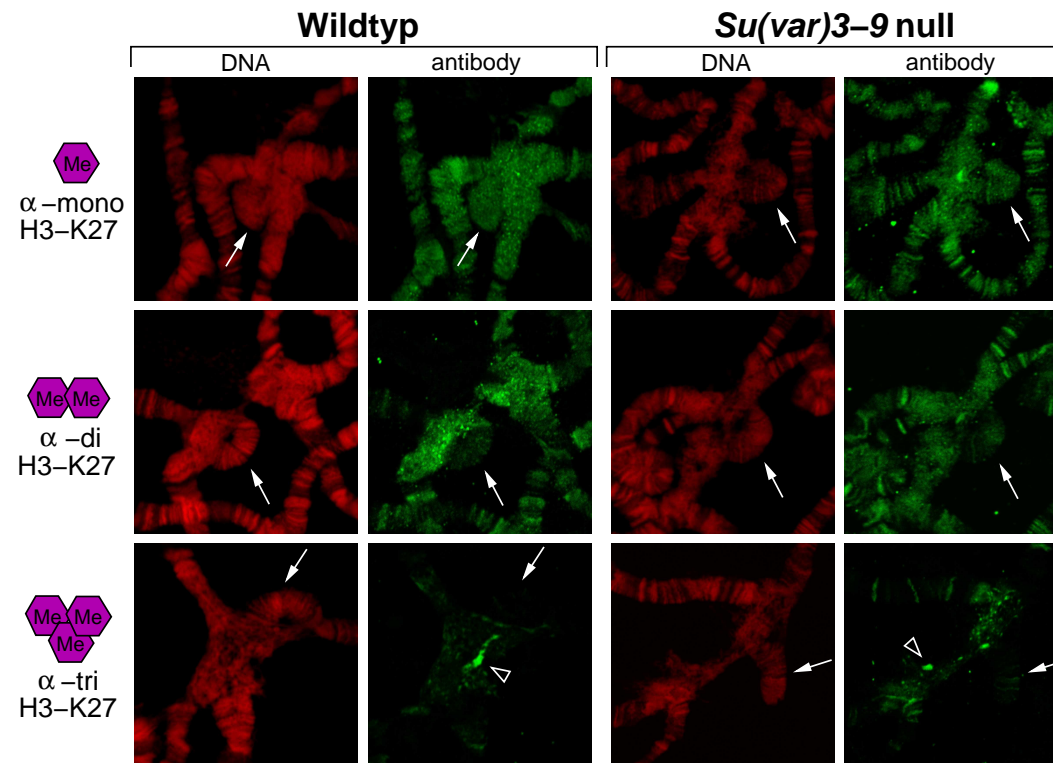


Abbildung 3.15: Kontrolle der H3-K27 Methylierungsstadien in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Verteilung der H3-K27 mono-, di- und tri-Methylierung im Chromozentrum von Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp- und *Su(var)3-9* Null-Larven. Pfeile deuten auf das 4. Chromosom, Pfeilkopf auf die lokale Anreicherung der Markierung innerhalb des Chromozentrums. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

ein Drittel und die H3-K9 tri-Methylierung auf die Hälfte reduziert ist (Abb. 3.12 und 3.16A). Übereinstimmend mit immunzytologischen Ergebnissen, die zeigten, daß in *Su(var)2-5* Null-Larven SU(VAR)3-9 ektopisch an zahlreichen euchromatischen Banden verteilt ist, sind in *Su(var)2-5* Null-Larven die H3-K9 mono- und di-Methylierungslevel bedeutend erhöht (Abb. 3.12 und 3.16A). E(Z) ist für alle drei H3-K27-Methylierungsstadien verantwortlich (Abb. 3.14 und 3.16B), nichtsdestotrotz hat der Verlust von E(Z) keinen signifikanten Einfluß auf die H3-K9-Methylierungsstadien (Abb. 3.16A). Erwartungsgemäß zeigen *Su(var)3-9*- bzw. *Su(var)2-5* Null-Mutanten keine Veränderung der H3-K27-Methylierungsstadien (Abb. 3.14 und 3.16B). Diese Daten legen nahe, daß es sich bei der Etablierung der H3-K9- und H3-K27-Methylierung, zumindest im Chromozentrum, um unabhängige Systeme handelt. Konträr zu den Resultaten in murinen ES-Zellen, die nachweisen, daß im perizentrischen Heterochromatin von *Sw39h* Doppel-Knockout-Zellen eine Konvertierung der H3-K27 mono- zu tri-Methylierung erfolgt (Peters et al., 2003), konnte in *Drosophila melanogaster* keine gegenseitige Beeinflussung dieser Markierungen beobachtet werden.

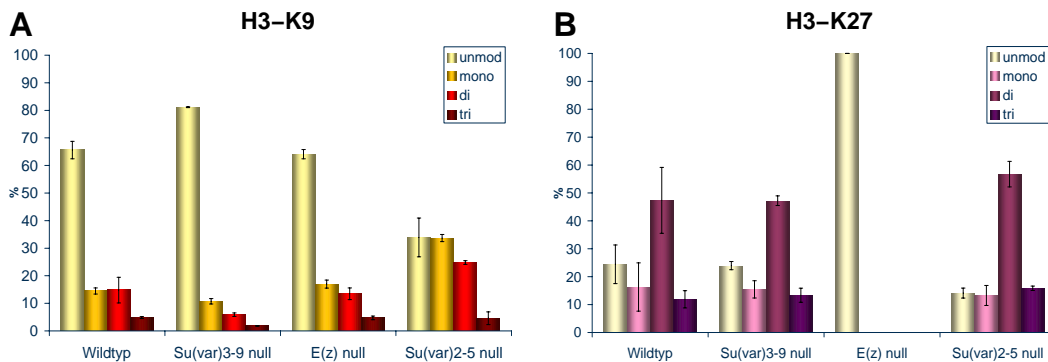


Abbildung 3.16: Vergleichende massenspektrometrische Analysen der **(A)** H3-K9- und **(B)** H3-K27 mono-, di-, tri-Methylierungsstadien. Fragmente von Histon H3-Peptiden (AS 9-17 bzw. AS 27-40) wurden aus Kernextrakten von Wildtyp-, *Su(var)3-9* Null-, *E(z)* Null- sowie *Su(var)2-5* Null-Larven isoliert. Für jeden Genotyp wurden jeweils drei verschiedene Extrakte analysiert (Vertrauensbalken zeigen die Standardabweichung). Die relative Höhe einer einzelnen H3-K9 bzw. H3-K27-Methylierungsstufe ist in Abhängigkeit zu der Summe aller H3-K9 bzw. H3-K27-Modifikationen in den Histon H3-Peptidpopulationen (AS 9-17 bzw. AS 27-40) angegeben.

3.4.4 Anreicherung der H3-K9 bzw. H3-K27 tri-Methylierung betrifft zentromerische Bereiche

Nucleosomen der zentromerischen Satelliten-DNA der Maus bzw. des Menschen ("minor" satellites) sind hauptsächlich mit H3-K9 tri-Methylierung angereichert (Peters et al., 2003; Martens et al., 2005). Um zu untersuchen, ob es sich in *Drosophila* bei der zentralen Anreicherung der H3-K9 bzw. H3-K27 tri-Methylierung innerhalb des Chromozentrums (Abb. 3.13 und 3.15) um zentromerisches Heterochromatin handelt, wurden immunzytologische Analysen mit Hilfe eines CID-Antikörpers durchgeführt. CID (*centromere identifier*), eine Histon H3-Variante, ist vorwiegend mit Zentromeren assoziiert (Henikoff et al., 2000). Mit Hilfe eines spezifischen CID-Antikörpers ist es möglich, die Verteilung des CID-Proteins innerhalb des Chromozentrums von Polytänchromosomen zu detektieren. In Wildtypchromosomen ist in einem zentralen Bereich des Chromozentrums eine signifikante Anreicherung des CID-Proteins zu erkennen (Abb. 3.17). Darüberhinaus ist eine Markierung zahlreicher euchromatischer Interbanden zu verzeichnen, interessanterweise besonders prominent im 4. Chromosom (Abb. 3.17A). Eine Doppelmarkierung von Wildtypchromosomen mit H3-K9 tri-methyl- bzw. CID-Antikörper ist nicht möglich, da beide Antikörper in dem gleichen Organismus (Kaninchen) generiert wurden. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Analysen ein transgenes SU(VAR)3-9-Fusionsprotein ($P\{c3-9\Delta SET-EGFP\}$), in dem die SET-Domäne deletiert wurde, eingesetzt (Schotta et al., 2002). Dieses Fusionsprotein befindet sich im *Su(var)3-9* Null-Hintergrund und ist aufgrund des Fehlens der enzymatischen Aktivität nicht mehr in der Lage, eine H3-K9 di-Methylierung im Chromozentrum auszuführen. Die Verteilung des Fusionsproteins reflektiert die der H3-K9 di-Methylierung in *Su(var)3-9*-Null-Mutanten mit der zentralen Akkumulation im Chromozentrum (Abb. 3.17B und Daten nicht gezeigt). Immunmarkierung der $P\{c3-9\Delta SET-EGFP\}$ -Linie mit einem GFP- und einem CID-Antikörper zeigt eine Kollokalisierung beider Signale in diesem zentralen Bereich, wobei das CID-Protein darüberhinaus eine starke Akkumulation innerhalb dieses Bereiches aufweist (Abb. 3.17B). Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß die prominente Anreicherung der H3-K9 bzw. H3-K27 tri-Methylierung im zentralen Areal des Chromozentrums zentromerische Bereiche einschließt. Für genauere Analysen sind polytäne Speicheldrüsenchromosomen nicht geeignet, da zentromerisches Heterochromatin hier unterrepräsentiert vorliegt.

Unter Zuhilfenahme von Metaphasechromosomen bzw. verlängerten Chromatin-Fasern aus Interphase-Zellen (Blower et al., 2002) konnte unlängst jedoch keine direkte Überlappung der H3-K9 tri-Methylierung mit zentromerischem He-

terochromatin (definiert durch CID) nachgewiesen werden (Sullivan und Karpen, 2004). Diese Diskrepanz der Daten kann dadurch erklärt werden, daß es sich bei polytänen Speicheldrüsenchromosomen um spezielle polyploide Interphasechromosomen handelt und aufgrund der massiven Unterreplizierung des zentromerischen Heterochromatins die Auflösung der Antikörpersignale beschränkt ist.

3.4.5 Einfluß von *Su(var)3-9* auf andere Histon-Modifizierungen in polytänen Speicheldrüsenchromosomen

Die dramatische Reduktion der H3-K9 di- und tri-Methylierung in *Su(var)3-9* Null-Embryonen resultiert, wie bereits beschrieben, in eine Hochregulierung der H3-S10 Phosphorylierung bei unveränderter H3-K4 di-Methylierung (siehe Abb. 3.6). In polytänen Speicheldrüsenchromosomen ist es nun möglich, die Verteilung dieser Histon-Modifizierungen zu analysieren, die durch H3-K9 Methylierung reguliert sein könnten.

H3-K4 di-Methylierung ist in Polytäanchromosomen vornehmlich in zahlreichen Interbanden lokalisiert (Abb. 3.18). Interessanterweise zeigt sich im Chromozentrum demgegenüber eine überaus selektive, punktierte Markierung bestimmter Regionen, die nicht mit der blasenartigen Struktur des Chromozentrums überlappt (Abb. 3.18A, untere Reihe). Dieses spezifische Methylierungsmuster im Chromozentrum könnte offene, gelockerte Chromatinbereiche innerhalb des perizentrischen Heterochromatins definieren. In Polytäanchromosomen von *ash1*-Mutanten, einem Trithorax-Gruppengen, ist H3-K4 di-Methylierung nahezu nicht detektierbar (Byrd und Shearn, 2003). Demgegenüber ist in *Su(var)3-9* Null-Mutanten, im Einklang mit der unveränderten globalen H3-K4 di-Methylierung in Embryonen, keine Änderung dieses spezifischen Methylierungsmusters zu erkennen (Abb. 3.18A).

H3-S10 Phosphorylierung, die in Polytäanchromosomen von der JIL-Kinase vermittelt wird (Wang et al., 2001), ist vor allem in Interbanden, jedoch nur schwach im Heterochromatin nachweisbar (Abb. 3.18B). Demgegenüber ist in *Su(var)3-9* Null-Mutanten eine verstärkte Anreicherung dieser Markierung im Chromozentrum zu verzeichnen (Abb. 3.18B, Pfeilkopf). Ebenso ist im Chromozentrum von *Su(var)3-9* Null-Mutanten eine deutlich gesteigerte H3-S10 Phosphorylierung gekoppelt mit H3-K14 Acetylierung zu beobachten (Abb. 3.18C, Pfeilkopf). Auch im Fall dieser spezifischen Histon-Modifizierung ist ein, bereits für H3-K4 di-Methylierung beschriebenes, punktiertes Markierungsmuster im Chromozentrum nachweisbar (Abb. 3.18C).

Histon H4 kann an den Lysinen K5, K8, K12 und K16 acetyliert vorliegen.

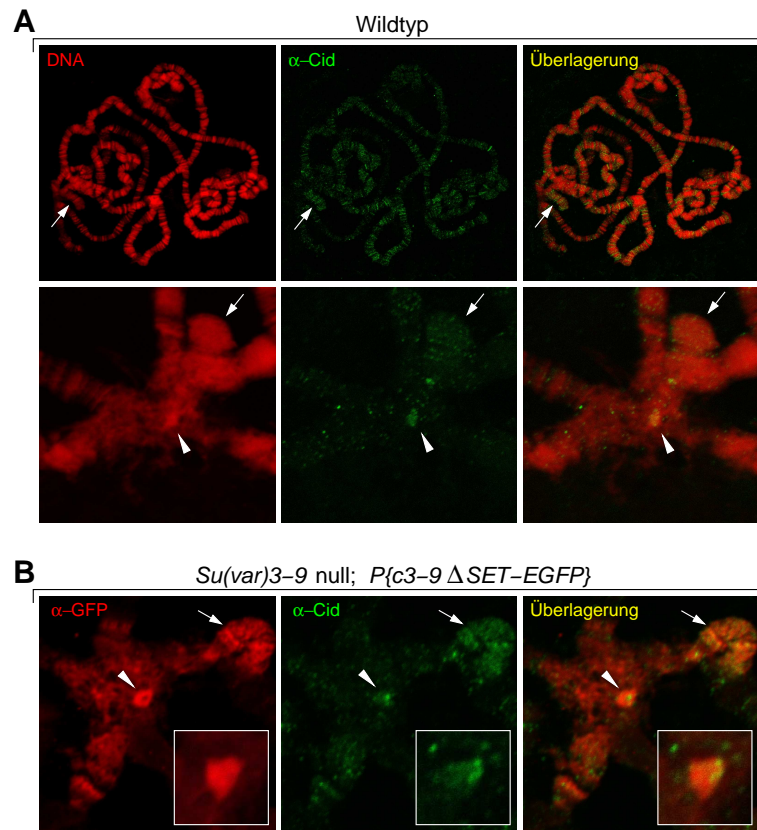


Abbildung 3.17: SU(VAR)3-9-Fusionsproteine ohne HMTase-Aktivität sind in Polytänchromosomen mit zentromernahen Bereichen assoziiert. **(A)** Nachweis von CID im zentralen Areal des Chromozentrums (Pfeilkopf), in Interbanden des 4. Chromosoms (Pfeile) bzw. schwächer in weiteren Interbandenregionen. **(B)** Immunmarkierung einer *P{c3-9 Δ SET-EGFP}*-Linie mit einem GFP-Antikörper, der das Fusionsprotein erkennt sowie einem CID-Antikörper. Kolokalisierung beider Signale im zentralen Bereich des Chromozentrums deutet eine Assoziation des Fusionsproteins mit zentromernahen Regionen an. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt eine Vergrößerung des Zentromerbereiches eines anderen Chromozentrums. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

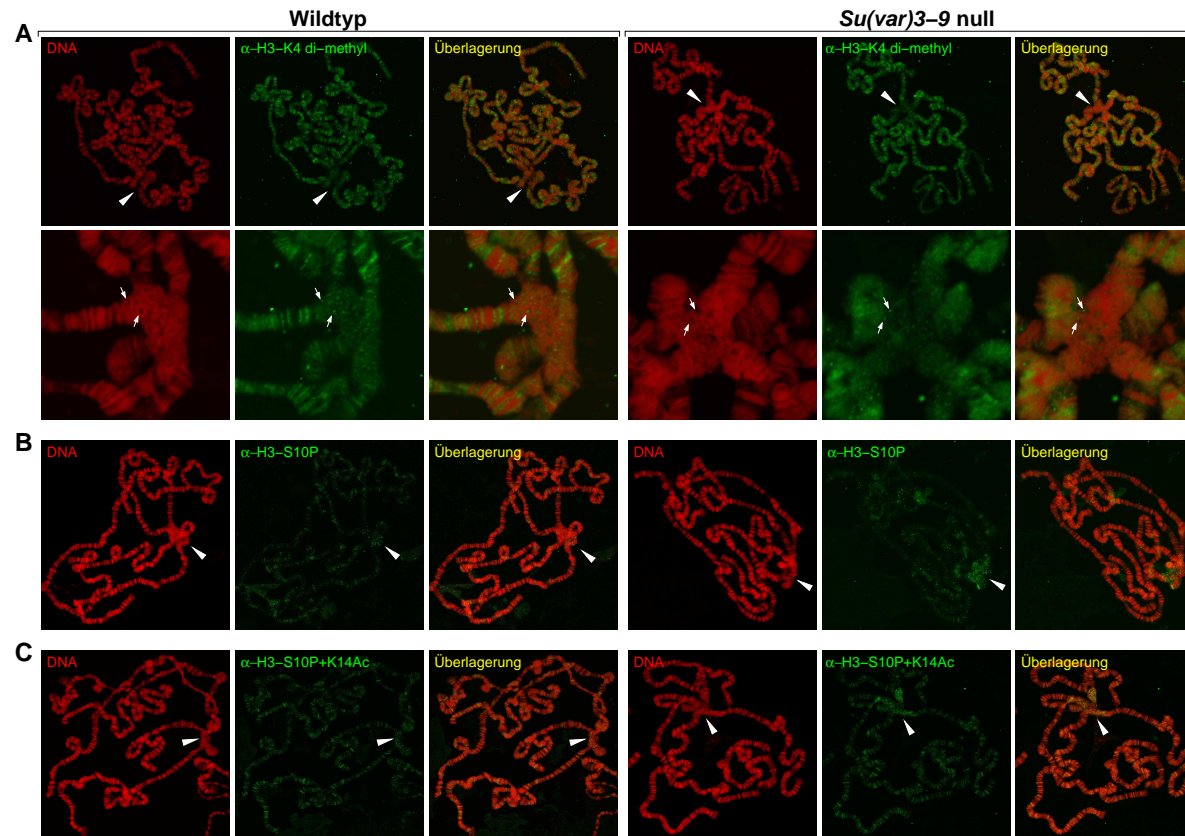


Abbildung 3.18: Einfluß des Verlustes der *Su(var)3-9*-abhängigen H3-K9 Methylierung auf die Verteilung weiterer Histonmodifizierungen. Während H3-K4 di-Methylierung in *Su(var)3-9* Null-Mutanten unbeeinflusst ist **(A)** (die untere Reihe zeigt vergrößerte Chromozentren), ist im Chromozentrum von *Su(var)3-9* Null-Mutanten eine verstärkte H3-S10 Phosphorylierung **(B)** bzw. H3-S10 Phosphorylierung gekoppelt mit H3-K14 Acetylierung **(C)** zu beobachten. Pfeilköpfe deuten auf das Chromozentrum, Pfeile auf das selektive, punktuerte Modifizierungsmuster innerhalb des Chromozentrums. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

Die ausschließlich am männlichen X-Chromosom lokalisierte H4-K16 Acetylierung (Turner et al., 1992) wird durch MOF vermittelt (Akhtar und Becker, 2000). H4-K12 Acetylierung hingegen weist, im Gegensatz zu den anderen H4 Acetylierungen, eine deutliche Anreicherung im Chromozentrum auf (Turner et al., 1992). H4-K5, H4-K8 und H4-K12 Acetylierung ist demgegenüber in euchromatischen Regionen weitestgehend mit transkriptionsaktiven Bereichen assoziiert (Turner, 1998). Die allgemeinen Verteilungsmuster der H4-K5, H4-K8, H4-K12 und H4-K16 Acetylierung unterliegen in *Su(var)3-9* Null-Mutanten jedoch keiner signifikanten Beeinflussung (Daten nicht gezeigt).

Die Analysen der aufgeführten Histon-Modifikationen zeigen eine Abhängigkeit der Chromatinorganisation im perizentrischen Heterochromatin von der SU(VAR)3-9-vermittelten H3-K9-Methylierung. Der Nachweis einer ebenfalls erhöhten H3-S10 Phosphorylierung in *Su(var)3-9* Null-Embryonen suggeriert darüberhinaus einen Einfluß von SU(VAR)3-9 auf die Etablierung bzw. Aufrechterhaltung heterochromatischer Chromatinstrukturen während der gesamten *Drosophila*-Entwicklung.

3.5 Das *Silencing*-Potential von *Su(var)3-9*-Mutanten korreliert mit der zugehörigen Histon-Methyltransferase-Aktivität

SU(VAR)3-9 spielt eine wesentliche Rolle bei der Etablierung heterochromatischer Gensilencings. Mit Hilfe von EMS bzw. Röntgenstrahlen wurden mehrere unabhängige Mutantenanalysen durchgeführt (Tschiersch, 1993; Reuter et al., 1986; Wustmann, 1988; Ebert et al., 2004), in denen dominante Suppressoren für das PEV-Rearrangement *In(1)w^{m4h}* selektiert werden konnten. Die Sequenzierung der durch Komplementationsanalysen identifizierten *Su(var)3-9*-Mutanten ergab insgesamt 33 *Su(var)3-9*-Allele (Krauss, 1995; Schotta, 2002). In den meisten Allelen wurden Basenpaaraustausche, die zu Aminosäureaustauschen führen oder Deletionen bzw. Insertionen, die in Frameshift-Mutationen resultieren, identifiziert. Interessanterweise betreffen alle Mutantenallele, die aus Aminosäureaustauschen resultieren, die SET-, bzw. pre-SET und post-SET-Domäne (Schotta, 2002). Im Verlauf dieser Analysen konnte ebenfalls *pitkin^D* (Kuhfittig et al., 2001) als *Su(var)3-9*-Allel identifiziert werden (Ebert et al., 2004). Diese Mutante resultiert aus einer Punktmutation (R529S) innerhalb der SET-Domäne. *Su(var)3-9^{ptn}* ist ein außergewöhnlich starker dominanter Enhancer für PEV und führt zu

dominanter weiblicher Sterilität (Kuhfittig et al., 2001).

Um zu bestätigen, daß dieser Basenaustausch tatsächlich *pitkin^D* repräsentiert, wurden transgene Linien etabliert, die die cDNA von *Su(var)3-9* einschließlich der Punktmutation R529S enthalten. In diesem Transgen liegt dieses spezielle *Su(var)3-9-Allel* fusioniert mit EGFP und unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors *hsp70* vor ($P\{c3-9^{ptn}-EGFP\}$). Nach kurzem Hitzeschock ist es möglich, polytäre Speicheldrüsenchromosomen der $P\{c3-9^{ptn}-EGFP\}$ -Linien vergleichend mit den, den Wildtyp repräsentierenden, $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linien *in vivo* anhand ihrer EGFP-Fluoreszenz zu analysieren. Das Wildtyp-SU(VAR)3-9-Fusionsprotein ist nahezu ausschließlich mit dem Chromozentrum assoziiert (Abb. 3.19), währenddessen das SU(VAR)3-9^{ptn}-Fusionsprotein in ausgewählten transgenen $P\{c3-9^{ptn}-EGFP\}$ -Linien darüberhinaus zahlreiche euchromatische Banden markiert (Abb. 3.19). Diese Analysen stehen mit der Beobachtung in Einklang, daß *pitkin^D* in Speicheldrüsenchromosomen eine ektopische Verteilung des SU(VAR)3-9-Fusionsproteins verursacht (Kuhfittig et al., 2001). Nach Remobilisierung einer $P\{c3-9^{ptn}-EGFP\}$ -Linie konnten vier unabhängige Linien etabliert werden, die einen überaus starken Enhancer-Effekt auf die Inversion *w^{m4h}* aufweisen (Reuter, pers. Mitteilung). Weiterhin ist in diesen Linien zusätzlich zu der vollständigen Reprimierung des *white*-Gens eine starke Reprimierung des ca. 180 kb distal lokalisierten *roughest*-Gens zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt ist vergleichbar mit dem Einfluß von drei bis vier zusätzlichen genomischen *Su(var)3-9*-Kopien.

Somit konnte deutlich nachgewiesen werden, daß der identifizierte Basenaustausch innerhalb der SET-Domäne von *Su(var)3-9* tatsächlich den *pitkin^D*-Phänotyp verursacht und daß es sich bei dieser speziellen Mutation um ein hypermorphes *Su(var)3-9*-Allel handelt.

3.5.1 Klassifizierung der *Su(var)3-9*-Mutanten anhand genetischer Analysen

Um die Funktion der SU(VAR)3-9-vermittelten H3-K9-Methylierung in der Etablierung heterochromatischer Chromatinstrukturen besser zu verstehen, sollten die *Su(var)3-9*-Allele bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität charakterisiert werden. Basierend auf dem Vermögen von *Su(var)3-9*, die Expression des *white*-Gens in *In(1)w^{m4h}* zu unterdrücken, ist es möglich, die *Su(var)3-9*-Mutanten, die als dominante Suppressoren auf PEV selektiert wurden, in amorphe bzw. hypomorphe Allele einzuordnen.

Eine Wildtyp-Kopie von *Su(var)3-9* ist nicht in der Lage, eine Reprimierung

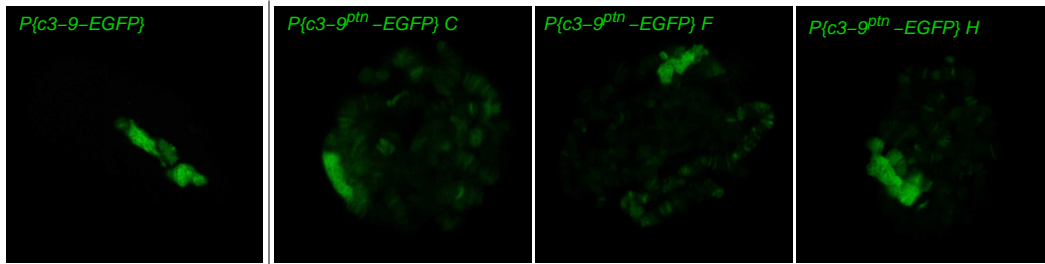


Abbildung 3.19: SU(VAR)3-9^{ptn}-EGFP ist *in vivo* mit zahlreichen euchromatischen Banden assoziiert. EGFP-Fluoreszenz im Speicheldrüsenkern einer transgenen $P\{c3-9-EGFP\}$ -Linie nach leichtem Hitzeschock (links) im Vergleich zur EGFP-Fluoreszenz in Speicheldrüsenkernen unabhängiger, transgener $P\{c3-9^{ptn}-EGFP\}$ -Linien nach gleichartigem Hitzeschock.

des *white*-Gens zu induzieren (heterozygote Mutante; Abb. 3.20), währenddessen zwei Kopien eine partielle Inaktivierung des *white*-Gens herbeiführen (Wildtyp-Situation), resultierend in dem charakteristischen white-mottled-Phänotyp. Kombiniert man zwei Kopien von *Su(var)3-9*, wobei eine Kopie durch ein genomisches Transgen repräsentiert wird, mit den zu untersuchenden *Su(var)3-9*-Mutanten, ist es möglich, die Fähigkeit dieser Allele, das *white*-Gen zu inaktivieren, zu verfolgen (Abb. 3.20). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die *Su(var)3-9*-Mutanten 21, 22, 13 und 25 in der Lage sind, die Reprimierung des *white*-Gens zu verstärken (Abb. 3.20) und werden deshalb als hypomorphe Allele klassifiziert. Die Mutante *Su(var)3-9²⁵* verursacht in dieser genetischen Analyse die stärkste Reprimierung des *white*-Gens, gefolgt von *Su(var)3-9¹³*. Die übrigen *Su(var)3-9*-Mutanten hatten nicht das Vermögen, den *In(1)w^{m4h}*-Phänotyp zu verändern (Abb. 3.20) und werden demzufolge als amorphe Allele bezeichnet.

3.5.2 Kategorisierung der *Su(var)3-9*-Mutanten anhand der H3-K9-Methylierung *in vivo*

Nun stellte sich die Frage, ob das in hypomorphen *Su(var)3-9*-Mutanten beobachtete Silencing-Potential mit der Fähigkeit des Mutantenproteins, H3-K9-Methylierung zu induzieren, korreliert. Aus diesem Grund wurde die H3-K9 di- und tri-Methylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen der *Su(var)3-9*-Allele analysiert. Obwohl es sich bei *Su(var)3-9* nicht um ein essentielles Gen handelt, zeigen eine Vielzahl der Allele aufgrund von Zweit-Mutationen (second-site mutations) rezessive Letalität, was deren Analyse erschwert. Um alle *Su(var)3-*

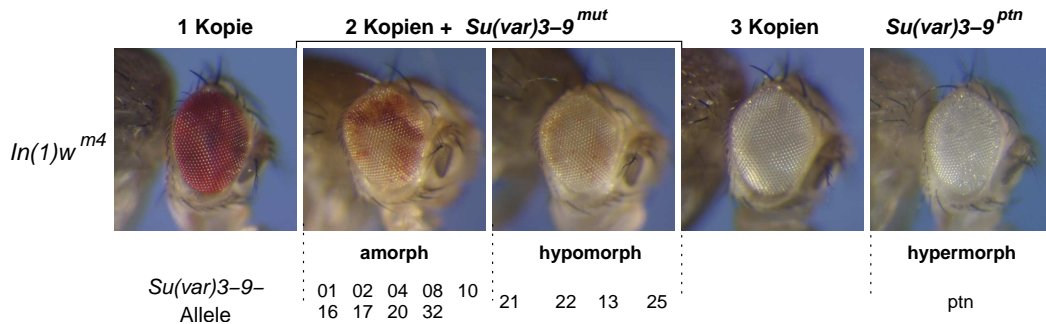


Abbildung 3.20: Genetische Klassifizierung der *Su(var)3-9*-Mutanten. *Su(var)3-9^{mut}*-Allele wurden mit zwei genomischen *Su(var)3-9*-Kopien gekreuzt und der Effekt auf die Inversion *w^{m4h}* dokumentiert. Amorphe Allele zeigen den charakteristischen white-mottled-Phänotyp, während hypomorphe Allele die Reprimierung des *white*-Gens verstärken. *Su(var)3-9^{ptn}* repräsentiert eine hypermorphe Mutante, resultierend in der kompletten Inaktivierung des *white*-Gens bzw. partiellen Reprimierung des *roughest*-Gens.

9-Mutanten vergleichend analysieren zu können, wurden die *Su(var)3-9*-Allele mit dem Null-Allel *Su(var)3-9¹⁷* kombiniert und die erhaltenen transheterozygoten Larven immunzytologisch bezüglich der H3-K9 di- und tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin untersucht. Die Abbildung 3.21 zeigt eine repräsentative Auswahl dieser immunzytologischen Analysen. In homozygoten *Su(var)3-9¹⁷* Null-Mutanten ist die H3-K9 di-Methylierung im Chromozentrum stark reduziert und zeigt die charakteristische Anreicherung dieser Markierung im Kern des Chromozentrums, währenddessen die H3-K9 tri-Methylierung nahezu vollständig fehlt (Abb. 3.21, vergleiche mit Abb. 3.13). Alle Mutanten, die genetisch als amorphe Allele klassifiziert wurden, zeigen eine gleichartig reduzierte Verteilung der H3-K9 di- und tri-Methylierung (Abb. 3.21, durch *Su(var)3-9¹⁰* repräsentiert). Im Gegensatz dazu zeigen alle als hypomorphe Allele klassifizierten Mutanten signifikant erhöhte H3-K9 di- und tri-Methylierungslevel (Abb. 3.21, durch *Su(var)3-9²²*, *Su(var)3-9¹³* bzw. *Su(var)3-9²⁵* repräsentiert). Dabei ist klar erkennbar, daß *Su(var)3-9²⁵*, gefolgt von *Su(var)3-9¹³*, im Chromozentrum höhere H3-K9 di- und tri-Methylierungslevel im Vergleich zu den übrigen hypomorphen Allelen aufweist (Abb. 3.21 und Daten nicht gezeigt). Da *Su(var)3-9²⁵*, ebenfalls gefolgt von *Su(var)3-9¹³*, in unserem genetischen Test die stärkste Reprimierung des *white*-Gens verursacht (Abb. 3.20), kann man schlußfolgern, daß das Vermögen der Mutanten, *in vivo* H3-K9 di- bzw. tri-Methylierung zu erzeugen, direkt mit deren Silencing-Potential korreliert.

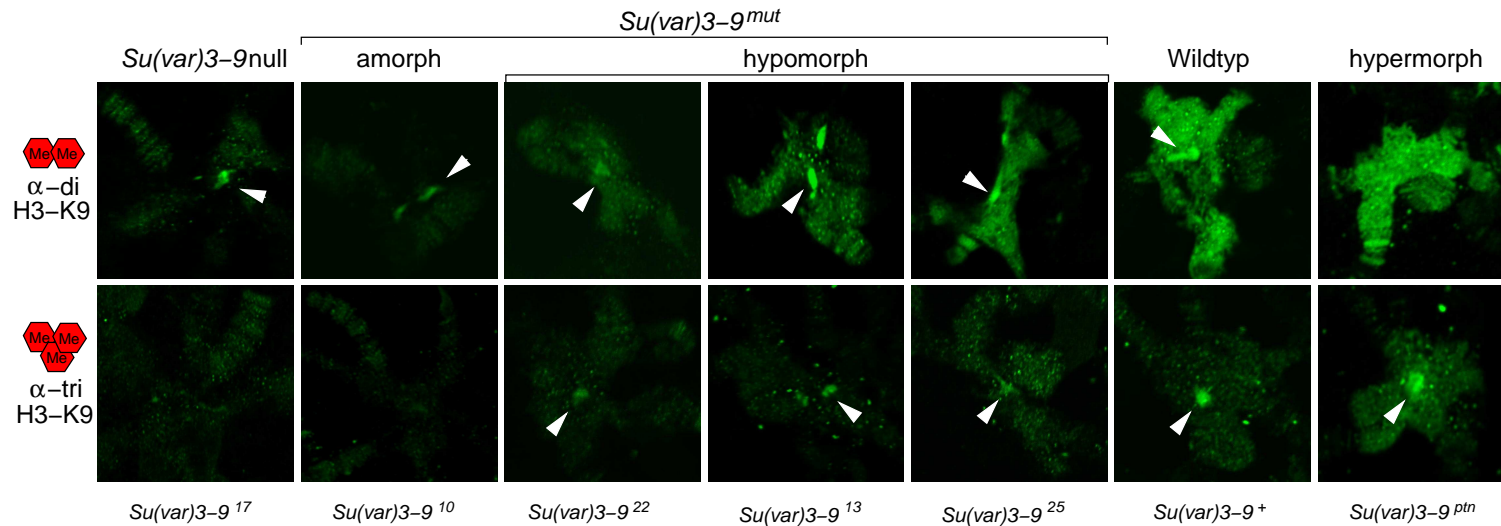


Abbildung 3.21: Klassifizierung der *Su(var)3-9*-Mutanten anhand der H3-K9 di- und tri-Methylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen. Immunmarkierung der Chromozentren transheterozygoter *Su(var)3-9¹⁷/Su(var)3-9^{mut}*-Allele mit H3-K9 di- und tri-methyl-Antikörpern. Amorphe Allele (exemplarisch gezeigt ist *Su(var)3-9¹⁰*) weisen die gleiche massiv reduzierte Verteilung der H3-K9 di- und tri-Methylierung wie die *Su(var)3-9¹⁷/Su(var)3-9¹⁷* Null-Mutante auf. Im Vergleich dazu sind H3-K9-Methylierungslevel in hypomorphen Allelen erhöht (dargestellt sind *Su(var)3-9²²*, *Su(var)3-9¹³* und *Su(var)3-9²⁵* in aufsteigender Reihenfolge bezüglich ihres Vermögens, H3-K9 di- und tri-Methylierung zu induzieren). Außergewöhnlich erhöhte H3-K9 di- und tri-Methylierung ist in der hypermorphen *Su(var)3-9^{ptn}*-Mutante zu verzeichnen. Pfeilköpfe deuten auf die verstärkten Antikörpersignale im Kern des Chromozentrums.

Die hypermorphe Mutante *Su(var)3-9^{ptn}* induziert eine starke H3-K9 di- und tri-Methylierung im Chromozentrum (Abb. 3.21) und darüberhinaus eine prominente Markierung euchromatischer Banden (Abb. 3.22A). Massenspektrometrische Analysen (in Zusammenarbeit mit Stefan Kubicek) der larvalen Kernextrakte von *Su(var)3-9^{ptn}* zeigen einen außergewöhnlich starken Anstieg der H3-K9 di- und tri-Methylierungslevel, wobei die H3-K9 di-Methylierung verdoppelt bzw. die H3-K9 tri-Methylierung nahezu verdreifacht ist (Abb. 3.22B). Die H3-K9 mono-Methylierung wird hingegen durch *Su(var)3-9^{ptn}* nicht beeinflusst (Abb. 3.22B). Interessanterweise zeigt die Null-Mutante *Su(var)3-9¹⁷* in transheterozygotem Zustand mit *Su(var)3-9^{ptn}* keinerlei reduzierenden Einfluß auf die H3-K9-Methylierungslevel, was die Stärke des *Su(var)3-9^{ptn}*-Allels unterstreicht (Abb. 3.22B).

Die Fähigkeit der hypermorphen *Su(var)3-9^{ptn}*-Mutante, eine prominente H3-K9 di-Methylierung zahlreicher euchromatischer Banden in Polytänychromosomen zu induzieren, stellt ein auffallendes Merkmal dieses Allels dar. Um einen weiteren Beweis zu erhalten, daß der beschriebene Basenaustausch innerhalb der SET-Domäne von *Su(var)3-9* in der Tat den Phänotyp der *Su(var)3-9^{ptn}*-Mutation auslöst, wurde die H3-K9 di-Methylierung in polytären Chromosomen remobilisierter *P{c3-9^{ptn}-EGFP}*-Linien analysiert. Immunmarkierungen mittels eines GFP-Antikörpers, der das transgene SU(VAR)3-9^{ptn}-EGFP-Protein detektiert und des H3-K9 di-methyl-Antikörpers zeigen sowohl eine Assoziation des Fusionsproteins mit vielen euchromatischen Banden, als auch eine starke Induktion der H3-K9 di-Methylierung im Euchromatin (Abb. 3.23). Die Signale beider Antikörper überlappen über große Bereiche (Abb. 3.23). Daß der GFP-Antikörper insgesamt weniger Banden detektiert, könnte darin begründet sein, daß in einigen Bereichen die Detektionsgrenze unterschritten ist. In immunzytologischen Analysen an *P{c3-9-EGFP}*-Linien, die eine Wildtypkopie der cDNA von *Su(var)3-9* tragen, konnte keine vergleichbare euchromatische Verteilung des Fusionsproteins bzw. der H3-K9 di-Methylierung beobachtet werden (Vergleiche mit Abb. 3.9 und Daten nicht gezeigt).

In vitro Histon-Methyltransferase-Assays von 16 verschiedenen Punktmutanten von *Su(var)3-9* (Lein, 2003; Ebert et al., 2004) untermauern die Ergebnisse, die mit Hilfe genetischer bzw. *in vivo*-Methoden erhalten wurden. Nahezu alle als amorph eingeordneten Allele sind katalytisch inaktiv, Ausnahmen sind *Su(var)3-9⁰⁸* und *Su(var)3-9¹⁰*, die *in vitro* eine schwache HMTase-Aktivität aufweisen (Lein, 2003), jedoch in genetischen bzw. *in vivo*-Analysen als inaktiv eingestuft wurden (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Die Mutantenproteine SU(VAR)3-9⁰⁸ und SU(VAR)3-9¹⁰ sind deutlich im Chromozentrum nachweisbar, was die Möglichkeit

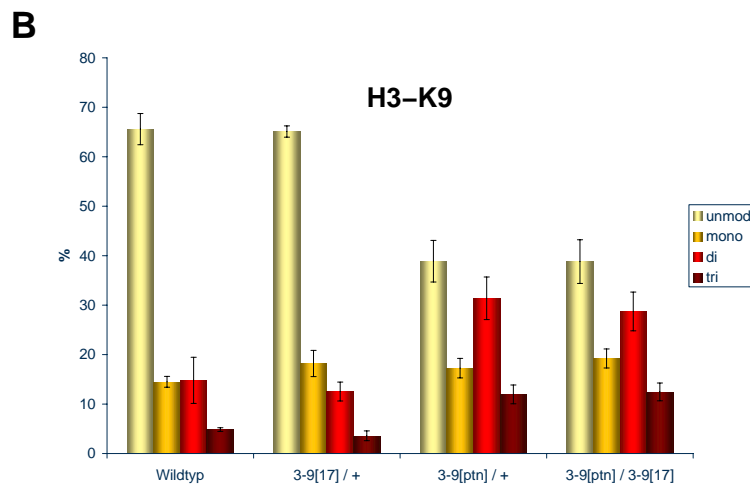
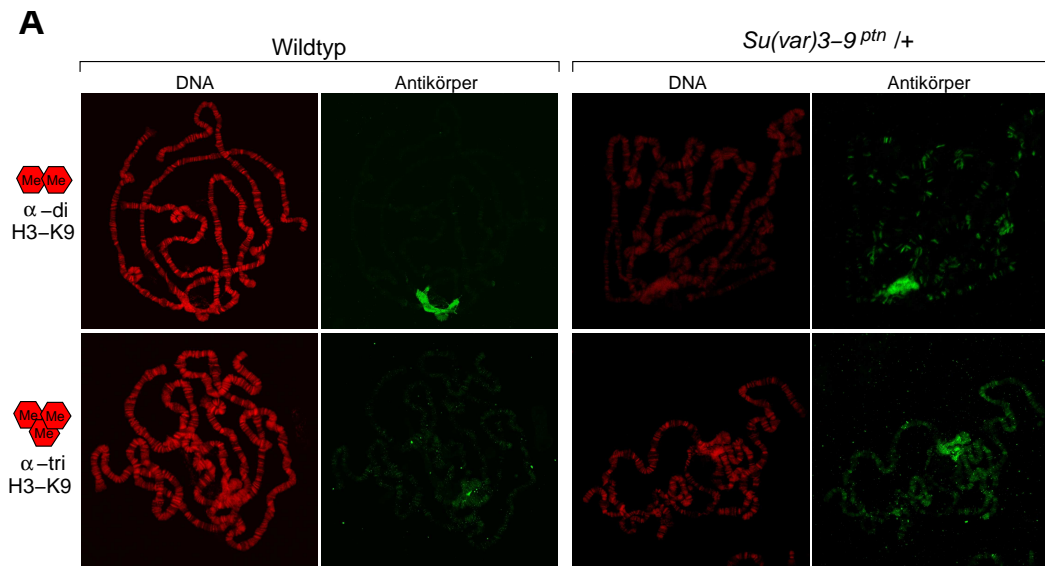


Abbildung 3.22: *Su(var)3-9^{ptn}* erzeugt verstärkte H3-K9 di- bzw. tri-Methylierung. **(A)** Immunmarkierung polytärer Speicheldrüsenchromosomen des heterozygoten *Su(var)3-9^{ptn}*-Allels mittels H3-K9 di- und tri-methyl-Antikörper. Im Vergleich zum Wildtyp (links) sind in *Su(var)3-9^{ptn}* (rechts) sowohl im Chromozentrum als auch an zahlreichen euchromatischen Banden drastisch erhöhte Level der H3-K9 di- bzw. tri-Methylierung nachweisbar. **(B)** Massenspektrometrische Analysen der H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung isolierter Histon H3-Peptidfragmente (AS 9-17), isoliert aus Kernextrakten von Wildtyp-, heterozygoten *Su(var)3-9¹⁷*-, *Su(var)3-9¹⁷ / Su(var)3-9^{ptn}*- sowie heterozygoten *Su(var)3-9^{ptn}*-Larven.

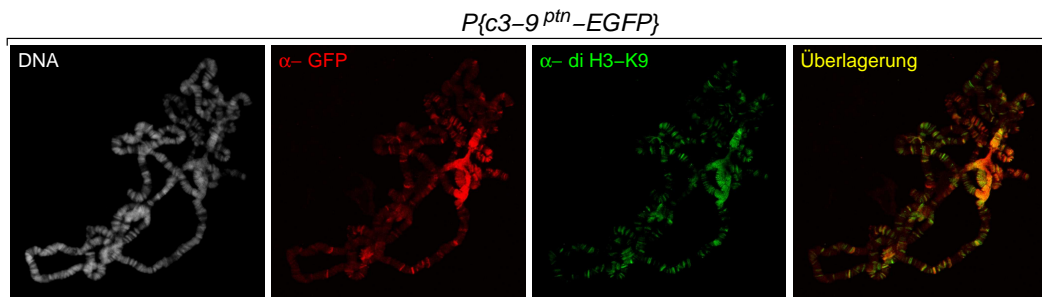


Abbildung 3.23: Transgene $P\{c3-9^{p^{tn}}-EGFP\}$ -Linien induzieren eine verstärkte H3-K9 di-Methylierung im Euchromatin polytärer Speicheldrüsenchromosomen. Kolokalisierung des SU(VAR)3-9^{p^{tn}}-EGFP-Fusionsproteins, welches mittels eines GFP-Antikörpers nachgewiesen wurde, mit H3-K9 di-Methylierung an zahlreichen euchromatischen Banden. DNA-Färbung mit DAPI.

ausschließt, daß diese aufgrund einer gestörten oder fehlenden Interaktion ihre Chromatinbindung verlieren (Abb. 3.24; exemplarische Darstellung der SU(VAR)3-9¹⁰-Verteilung). In den hypomorphen Allelen $Su(var)3-9^{13}$, $Su(var)3-9^{22}$ und $Su(var)3-9^{25}$ ist ebenfalls *in vitro* eine HMTase-Aktivität nachweisbar, die jedoch nie Wildtypniveau erreicht (Lein, 2003; Ebert et al., 2004). Die Mutantenproteine der hypomorphen Allele zeigen eine dem Wildtyp gleichartige Verteilung (Abb. 3.24; exemplarische Darstellung der SU(VAR)3-9²²-Verteilung). *In vitro* Histon-Methyltransferase-Assays der hypermorphen $Su(var)3-9^{p^{tn}}$ -Mutante ergaben eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte HMTase-Aktivität (Ebert et al., 2004). Analysen der Reaktionskinetik der Wildtyp-HMTase gegenüber dem hypermorphen Mutantenprotein zeigten, daß die SU(VAR)3-9^{p^{tn}}-HMTase am Beginn der Reaktion ca. doppelt so viel H3-Peptid (AS 1-20) umsetzen kann als das Wildtyp-Protein (Ebert et al., 2004). Immunzytologische Analysen des SU(VAR)3-9^{p^{tn}}-Mutantenproteins mit Hilfe des SU(VAR)3-9-Antikörpers zeigen im Chromozentrum eine dem Wildtyp vergleichbare Verteilung, eine Erhöhung der Gesamt-Proteinmenge ist in Polytänchromosomen der $Su(var)3-9^{p^{tn}}$ -Mutante nicht zu beobachten (Abb. 3.24). Anhand dieser Analysen und der Daten der HMTase-Assays kann man ausschließen, daß eine erhöhte Enzymmenge für den hypermorphen Phänotyp des $Su(var)3-9^{p^{tn}}$ -Allels verantwortlich ist.

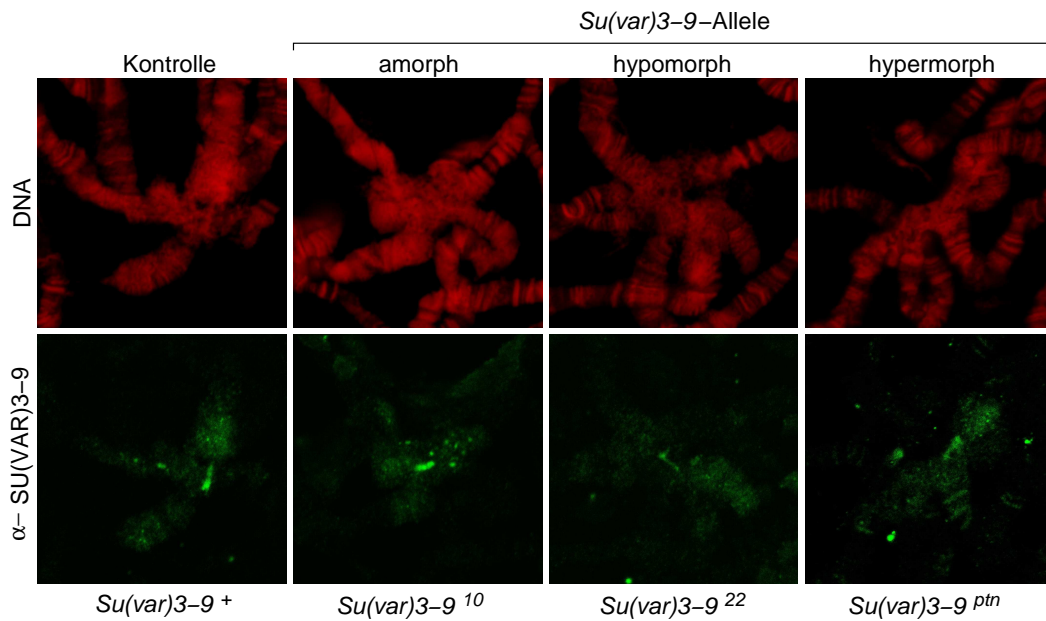


Abbildung 3.24: Verteilung der SU(VAR)3-9^{mut}-Proteine in polytänen Speicheldrüsenchromosomen. Immunmarkierung der Chromozentren transheterozygoter *Su(var)3-9*¹⁷/*Su(var)3-9*^{mut}-Larven mit dem SU(VAR)3-9-Antikörper. Alle untersuchten Punktmutanten weisen eine dem Wildtypprotein (links dargestellt) vergleichbare Verteilung auf.

3.6 H4-K20 tri-Methylierung als neue Markierung repressiver Chromatinzustände

Die Modifizierung des Chromatins mittels Histon-Lysin-Methylierung spielt eine wesentliche Rolle in der Determinierung bestimmter Chromatinzustände. Im einzelnen konnte gezeigt werden, daß die SU(VAR)3-9-vermittelte Modifizierung der H3-K9-Methylierungsstadien bzw. E(Z)-abhängige H3-K27 mono- und di-Methylierung bedeutende Markierungen des perizentrischen Heterochromatins von *Drosophila melanogaster* darstellen. Jüngste Erkenntnisse deuten an, daß die H4-K20-Methylierung ebenfalls eine Markierung repressiver Chromatinstrukturen repräsentiert (Nishioka et al., 2002b; Fang et al., 2002). Um diesen Hinweisen nachzugehen, wurden mittels spezifischer Antikörper, die zwischen den einzelnen H4-K20-Methylierungsstadien unterscheiden können, polytäre Wildtypchromosomen immunzytologisch analysiert. H4-K20 mono-Methylierung ist hauptsächlich an Banden und Interbanden im Euchromatin bzw. schwach im Chromozentrum nachweisbar (Abb. 3.25A). Die H4-K20 di-Methylierung zeigt eine prominente Markierung zahlreicher Banden entlang der Chromosomen und darüberhinaus eine deutliche Assoziation mit dem Chromozentrum (Abb. 3.25B). Die H4-K20 tri-Methylierung zeigt ebenfalls intensive Signale an vielen euchromatischen Banden, eine starke Markierung des Chromozentrums bzw. ergänzend dazu, eine lokale Akkumulation innerhalb des Chromozentrums (Abb. 3.25C). Diese besondere Anreicherung im zentralen Areal des Chromozentrums konnte bereits in Wildtypchromosomen mit H3-K9 tri- und H3-K27 tri-methyl-Antikörpern detektiert werden und repräsentiert zentromernahe Bereiche (Siehe Abb. 3.13, 3.15 und 3.17).

3.6.1 H4-K20-Methylierung im Chromozentrum ist SU(VAR)3-9-abhängig

In verschiedenen Studien konnten Wechselwirkungen bzw. Abhängigkeiten zwischen verschiedenen Histon-Modifikationen aufgedeckt werden. Beispielsweise ist die Methylierung von Histon H3 an den Positionen H3-K4 bzw. H3-K79 abhängig von der Ubiquitinierung von H2B (Ezhkova und Tansey, 2004). Beachtenswert ist ein weiterer Fall, in dem beobachtet wurde, daß die Reduktion der H3-K9 tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin in *Suw39h* Doppel-Knockout-Zellen zu einer Konvertierung von H3-K27 mono-Methylierung zu H3-K27 tri-Methylierung führt (Peters et al., 2003). Da die H4-K20-Methylierung

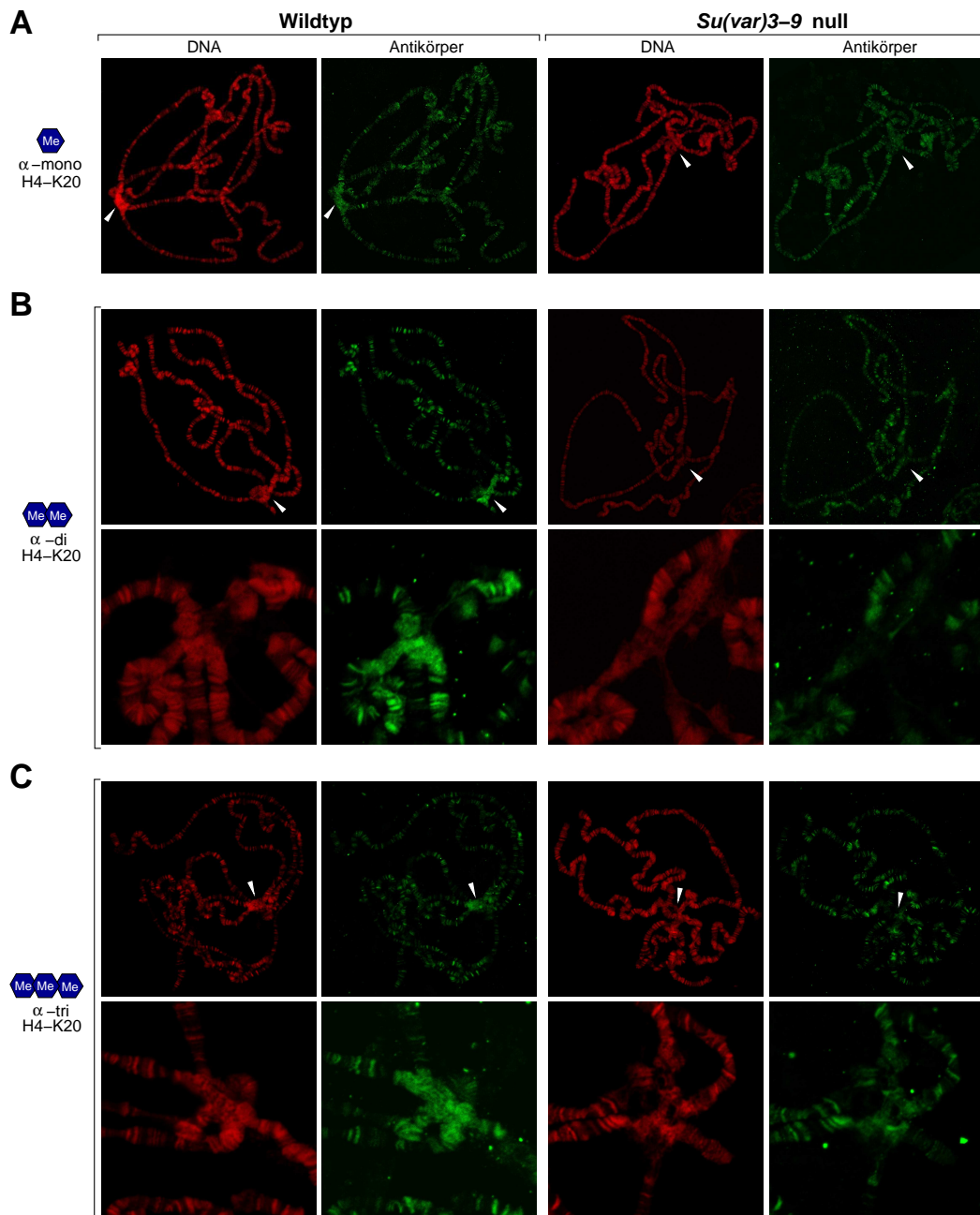


Abbildung 3.25: Nachweis der H4-K20-Methylierungsstadien in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster* und Abhängigkeit von *Su(var)3-9*. Verteilung der H4-K20 **(A)** mono-, **(B)** di- und **(C)** tri- Methylierung in Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp- und *Su(var)3-9* Null-Larven. Die unteren Abbildungen zeigen jeweils vergrößerte Chromozentren. Pfeilköpfe deuten auf das Chromozentrum. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

eine ähnliche heterochromatische Verteilung wie die H3-K9-Methylierung aufweist, wurde untersucht, ob die H4-K20-Methylierungsstadien eine Abhängigkeit von SU(VAR)3-9 zeigen. Obwohl in *Su(var)3-9* Null-Mutanten keine signifikante Reduktion der H4-K20 mono-Methylierung des Chromozentrums zu verzeichnen ist (Abb. 3.25A), konnte eine massive Reduktion der H4-K20 di- und tri-Methylierung innerhalb des Chromozentrums festgestellt werden (Abb. 3.25B, C). Das euchromatische Bandenmuster aller drei H4-K20-Methylierungszustände weist in *Su(var)3-9* Null-Larven gegenüber dem Wildtyp keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 3.25). Diese Daten deuten an, daß H4-K20 di- und tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin SU(VAR)3-9-abhängig erfolgt.

Die murinen SU(VAR)3-9-orthologen *Suv39h*-Proteine zeigen einen gleichartigen Einfluß auf die H4-K20-Methylierung. In *Suv39h* Doppel-Knockout-Zellen ist die H4-K20 tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin nahezu vollständig verloren (Schotta et al., 2004). Aufgrund dieser interessanten Wechselwirkung, die offensichtlich evolutionär konserviert ist, wurden weiterführende Analysen mit der Arbeitsgruppe Jenuwein in enger Zusammenarbeit durchgeführt.

3.6.2 SUV4-20 vermittelt H4-K20 tri-Methylierung

Durch Untersuchungen von GFP-Fusionskonstrukten ausgewählter Kandidatengene konnten in der Maus zwei Gene identifiziert werden, *Suv4-20h1* und *Suv4-20h2*, die für die H4-K20 tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin verantwortlich sind (Schotta et al., 2004). HMTase-Assays determinierten H4-K20 tri-Methylierung als präferentielle Aktivität der *Suv4-20h*-Enzyme und ein RNAi-vermittelter Knockdown beider Enzyme resultiert in reduzierter H4-K20 tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin (Schotta et al., 2004). *Suv4-20h*-homologe Proteine sind unter anderem in *Schizosaccharomyces pombe* und *Drosophila melanogaster* nachweisbar. Das *Drosophila*-Gen trägt die Bezeichnung *CG13363* und wird aufgrund der dokumentierten Homologie weiterführend als *Suv4-20* bezeichnet (FLYBASE, 2002). In *P*-Element-Datenbanken von *Drosophila melanogaster* konnte eine homozygot lebensfähige Insertion eines *P*-Elementes (*P{GT1}BG00814*) identifiziert werden, welche im 3. Exon von *Suv4-20* lokalisiert ist (FLYBASE, 2002). In homozygoten *Suv4-20^{BG00814}*-Mutanten ist die H4-K20 tri-Methylierung sehr stark reduziert, sowohl im Chromozentrum als auch entlang der euchromatischen Chromosomenarme (Abb. 3.26). Diese Daten implizieren, daß es sich bei dieser *P*-Element-Insertion um ein stark hypomorphes *Suv4-20*-Allel handelt.

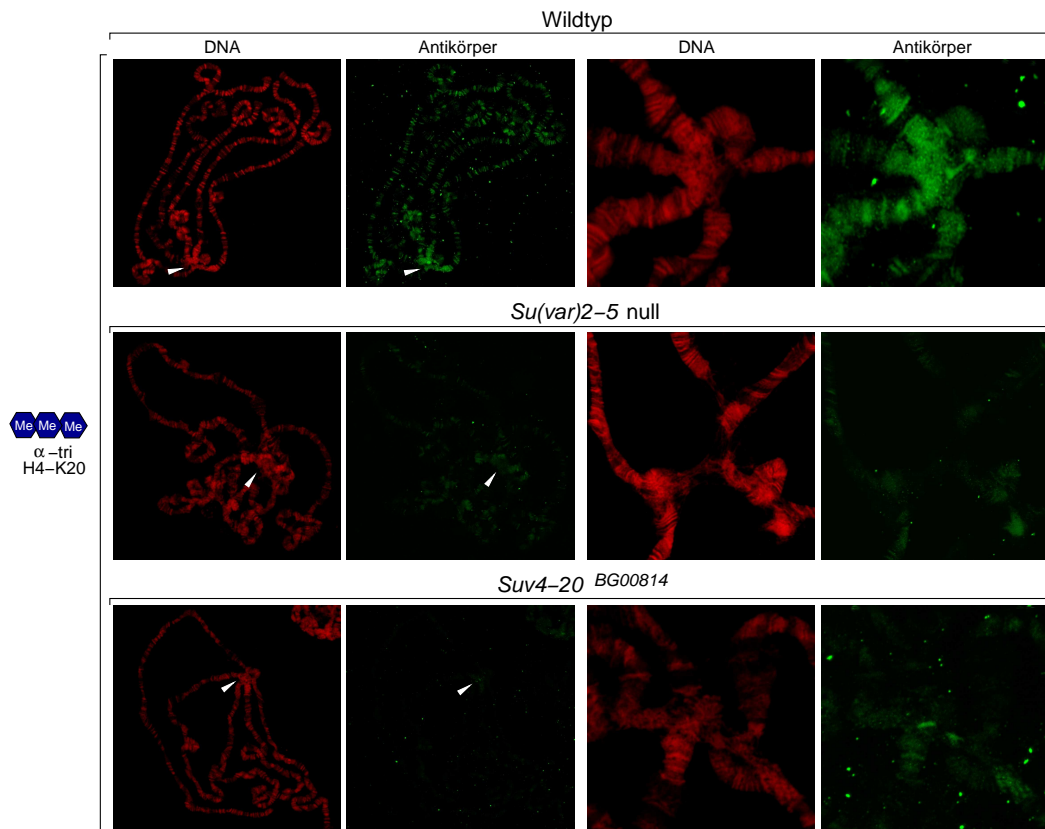


Abbildung 3.26: Kontrolle der H4-K20 tri-Methylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Verteilung der H4-K20 tri-Methylierung in Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp-, *Su(var)2-5* Null- und *Suv4-20*^{BG00814}-Larven. Pfeilköpfe deuten auf das Chromozentrum. Die rechte Reihe zeigt vergrößerte Chromozentren. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

Mit Hilfe biochemischer Analysen konnte eine Interaktion zwischen Suv4-20h2 und HP1-Isoformen nachgewiesen werden (Schotta et al., 2004). Dieser Befund deutet an, daß HP1 eine Lokalisierung der Suv4-20h-Enzyme an das perizentrische Heterochromatin vermittelt, da die Chromatinbindung von HP1 ebenfalls Suv39h-abhängig verläuft (Lachner et al., 2001; Bannister et al., 2001). Tatsächlich ist in polytären Chromosomen von *Su(var)2-5* Null-Larven die H4-K20 tri-Methylierung in Euchromatin und Heterochromatin nahezu vollständig verloren (Abb. 3.26), obwohl die Verteilung aller H3-K9-Methylierungsstadien innerhalb des Chromozentrums unverändert ist (siehe Abb. 3.13). Erwähnenswert ist, daß Chromosomen von *Su(var)2-5* Null-Larven einer Präparation durchaus variable H4-K20 tri-Methylierungslevel aufweisen und daraufhin das Chromosom mit der stärksten nachweisbaren H4-K20 tri-Methylierung in die Abbildung integriert wurde (Abb. 3.26). Demgegenüber ist in *Su(var)2-5* Null-Larven keine signifikante Veränderung der H4-K20 di-Methylierung sichtbar, obgleich der Verlust von SU(VAR)3-9 zu einer deutlichen Reduktion dieser Markierung im Chromozentrum führt (Abb. 3.27). Diese Daten zeigen, daß die Methylierungen der Histon-Lysine im Heterochromatin in einem nacheinandergeschalteten Prozess etabliert werden. Die *Su(var)3-9*-abhängige H3-K9 Methylierung im perizentrischen Heterochromatin geht der *Suv4-20*-vermittelten H4-K20 tri-Methylierung voraus. Die überaus starke Reduktion der H4-K20 tri-Methylierung in Chromosomen von *Su(var)2-5* Null-Larven legt nahe, daß die Chromatinbindung von Suv4-20 tatsächlich durch Interaktion mit HP1 vermittelt wird.

3.6.3 *Suv4-20* ist ein dominanter Suppressor für Positionseffekt-Variegation

Die erhaltenen Ergebnisse implizieren, daß die H4-K20 tri-Methylierung neben H3-K9 di- und tri-Methylierung eine weitere Markierung repressiver Chromatinstrukturen darstellt. Um zu analysieren, ob diese Modifizierung tatsächlich wichtig für die Etablierung von Gensilencing ist, wurde der Einfluß der *Suv4-20*^{BG00814}-Mutante auf PEV untersucht. Da *Suv4-20* auf dem X-Chromosom lokalisiert und darüberhinaus das P-Element *BG00814 white*⁺ markiert ist, konnte die in unserer Arbeitsgruppe sehr gut charakterisierte Inversion *w*^{m4h} nicht zur Einordnung eines potentiellen Modifikatoreffektes von *Suv4-20* genutzt werden. Aus diesem Grund wurde ein anderes PEV-Rearrangement benutzt, *T(2;3)Sb^v*, in welchem die dominante Mutation *Stubble*¹ in die Nähe des perizentrischen Heterochromatins transloziert wird (Sinclair et al., 1983). Das *Sb*¹-Allel führt zur Ausbildung kurzer, dicker Borsten in adulten Fliegen. Eine Reprimierung die-

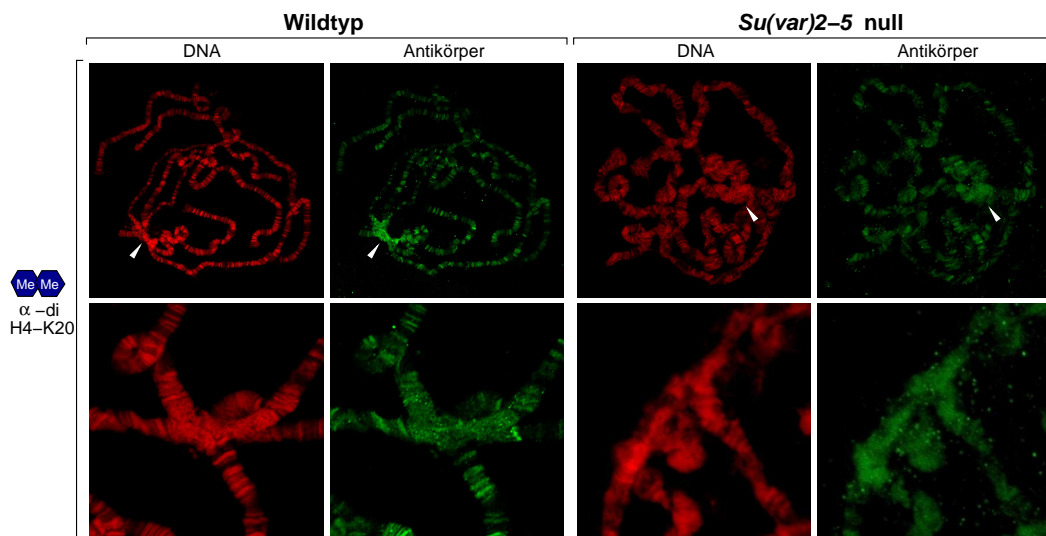
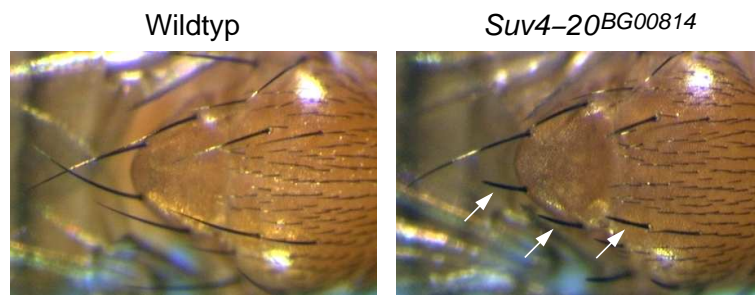


Abbildung 3.27: Kontrolle der H4-K20 di-Methylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Verteilung der H4-K20 di-Methylierung in Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp- und *Su(var)2-5* Null-Larven. Pfeilköpfe deuten auf das Chromozentrum. Die untere Reihe zeigt vergrößerte Chromozentren. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

ser Mutation infolge Heterochromatin-induzierten Gensilencings resultiert in der Bildung von Wildtyp-Borsten (lange, dünne Borsten). Sowohl homozygote *Suv4-20^{BG00814}*- als auch Wildtyp-Weibchen wurden mit der Translokation *T(2;3)Sb^v* gekreuzt. In der *F*₁-Generation wurde die Reaktivierung der *Sb^l*-Mutante durch die Bestimmung des Verhältnisses von kurzen zu langen Borsten ermittelt. In Männchen und Weibchen der Wildtyp-Kontrolle zeigen nur 1-2% der Borsten einen *Sb*-Phänotyp, was eine massive Inaktivierung des *Sb^l*-Allels dokumentiert (Abb. 3.28). Demgegenüber zeigen die Kreuzungsanalysen mit der *Suv4-20^{BG00814}*-Mutante eine Reaktivierung des *Sb^l*-Allels, da ca. 29% der Borsten einen *Sb*-Phänotyp ausprägen (Abb. 3.28). Diese Daten klassifizieren *Suv4-20* als einen dominanten Suppressor für PEV und demonstrieren eine Funktion der H4-K20 tri-Methylierung im heterochromatischen Gensilencing.

3.6.4 Letale Wechselwirkung zwischen *Su(var)3-9* und *Suv4-20*

Ogleich die Fertilität von *Su(var)3-9* Null-Mutanten aufgrund von Segregationsdefekten während der frühen Embryonalentwicklung stark reduziert ist, sind diese Mutanten homozygot lebensfähig. Ebenso ist die hypomorphe *Suv4-20^{BG00814}*-



		Anzahl der Fliegen	Borsten		
			<i>Sb</i>	<i>Sb</i> ⁺	% <i>Sb</i>
Wildtyp	Männchen	43	4	168	2
	Weibchen	45	1	179	1
<i>Suv4-20</i> ^{BG00814}	Männchen	29	34	82	29
	Weibchen	30	35	85	29

Abbildung 3.28: *Suv4-20* ist ein dominanter Suppressor des PEV-Rearrangements *T(2;3)Sb^v*. *Stubble*-Variegation in Wildtyp- (links) und *Suv4-20*^{BG00814}-Fliegen (rechts). Kurze, dicke Borsten (Pfeile) deuten auf Reaktivierung des *Sb*¹-Allels der Translokation *T(2;3)Sb^v* in *Suv4-20*^{BG00814}-Fliegen. Die Tabelle zeigt die Quantifizierung des PEV-Effektes in Wildtyp- und *Suv4-20*^{BG00814}-Fliegen. Wildtyp- und *Suv4-20*^{BG00814}-Weibchen wurden mit *T(2;3)Sb^v*-Männchen gekreuzt. Die Anzahl der *Stubble*-Borsten (in Prozent) wurde in Männchen und Weibchen der *F*₁-Generation ermittelt.

Mutante homozygot lebensfähig. Kombiniert man jedoch ein *Su(var)3-9* Null-Allel mit der *Suw4-20^{BG00814}*-Mutante, resultiert diese Doppelmutation in Letalität. Unter Zuhilfenahme von GFP-Balancerstämmen konnte der Zeitpunkt der Letalität auf das 3. Larvenstadium festgelegt werden. Wie bereits ausführlich beschrieben, ist SU(VAR)3-9 ein maternales Protein, das heißt, das Genprodukt wird vom Weibchen in das Ei eingebracht. Viele Mutationen in Chromatingenen, wie z.B. *Su(var)2-5* oder *E(z)*, führen zu rezessiver Letalität. Gleichwohl sind homozygote Larven häufig bis zum 3. Larvenstadium lebensfähig, da das maternale Genprodukt erst im Laufe dieses Entwicklungsstadiums aufgebraucht ist (Fanti et al., 1998). Aus diesen Überlegungen kann man ableiten, daß die homozygoten Larven, die die Doppelmutation *Suw4-20^{BG00814}; Su(var)3-9* Null tragen, sterben, wenn das maternal eingebrachte SU(VAR)3-9-Protein aufgebraucht ist. Da in *Su(var)3-9* Null-Mutanten ausschließlich die H4-K20 di- und tri-Methylierung im Chromozentrum, nicht aber die Markierung euchromatischer Banden (Abb. 3.25) massiv reduziert ist, ist es möglich, daß der Grund der letalen Wechselwirkung in der gestörten Struktur bzw. Organisation des perizentrischen Heterochromatins begründet ist.

3.7 Charakterisierung von neuen *JIL-1*-Mutanten als bedeutende Regulatoren von PEV

In unabhängigen Mutantanalysen konnten Suppressoren identifiziert werden, die *Su(var)3-9*-abhängiges Gensilencing beeinträchtigen. Die stärksten beobachteten Effekte zeigen in dieser Hinsicht Allele des dominanten Suppressorgens *Su(var)3-1* [Locus beschrieben in Wustmann et al. (1989)]. Es wurde bereits dargestellt, daß eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-9* einen sogenannten Triplo-Enhancereffekt auf PEV aufweist [Abb. 3.1; Tschiersch et al. (1994)], das bedeutet, das Markergen in dem jeweiligen PEV-Rearrangement wird aufgrund der Überexpression des SU(VAR)3-9-Proteins reprimiert. In dem PEV-Rearrangement *In(1)w^{m4h}* beispielsweise, ist in Kombination mit einer zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopie eine komplette Inaktivierung des *white*-Gens zu verzeichnen. In *Su(var)3-1*-Allelen hingegen kann eine Reprimierung des *white*-Gens durch eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-9* nicht mehr erfolgen, das *white*-Gen bleibt vollständig aktiv (Schotta, 2002). Der Suppressoreffekt von *Su(var)3-1* ist demnach epistatisch über den Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)3-9*. Sequenzanalysen von Kandidatengen ergaben in allen sechs *Su(var)3-1*-Allelen Nonsense-Mutationen im *JIL-1*-Gen, C-terminal zu den Kinase-Domänen (Ebert et al., 2004). Aus diesem Grund

wurden diese neuen *JIL-1*-Mutanten, die alle in verkürzte *JIL-1*-Proteine resultieren, als *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Allele bezeichnet (Ebert et al., 2004).

3.7.1 *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten zeigen normale H3-S10-Phosphorylierungsmuster

JIL-1 ist eine Tandem-Kinase, die in Interphase-Chromosomen Serin 10 von Histone H3 (H3-S10) phosphoryliert (Wang et al., 2001). In der homozygoten *JIL-1^{z2}* Null-Mutante ist die H3-S10-Phosphorylierung in Interphase-Kernen stark reduziert, in mitotischen Chromosomen jedoch unbeeinflusst (Wang et al., 2001). Um zu prüfen, ob in einer veränderten H3-S10-Phosphorylierung die Ursache für den außerordentlich starken Suppressoreffekt zu finden ist, wurde die H3-S10-Phosphorylierung in polytänen Speicheldrüsenchromosomen mit Hilfe eines H3-S10-phospho-spezifischen Antikörpers analysiert. In Wildtypchromosomen ist die H3-S10-Phosphorylierung in zahlreichen Interbanden nachweisbar (Abb. 3.29). Dieses Muster ist in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten nicht signifikant geändert, was dafür spricht, daß die Funktion der Kinase-Domänen intakt ist (Abb. 3.29). Untersuchungen mittels eines weiteren Antikörpers, der eine Kombination von phosphoryliertem H3-S10 und acetyliertem H3-K14 erkennt, zeigen ebenfalls keine Veränderung dieser Markierung in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten (Abb. 3.29).

3.7.2 Veränderte Chromosomenmorphologie in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten

Hypomorphe *JIL-1*-Mutanten haben einen massiven Effekt auf die Struktur und Morphologie von polytänen Speicheldrüsenchromosomen in Männchen und Weibchen (Wang et al., 2001). In *JIL-1^{z2}* Null-Mutanten sind die Chromosomen massiv kondensiert und die euchromatischen Interbandenstrukturen weitestgehend aufgelöst, ein Effekt der am deutlichsten im männlichen X-Chromosom auftritt (Wang et al., 2001). Um zu untersuchen, ob die Chromosomenstruktur in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten ebenfalls morphologischen Veränderungen unterliegt, wurden Wildtyp- und Mutantenchromosomen von Männchen und Weibchen vergleichend analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, daß in homozygoten *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Allelen das männliche, jedoch nicht das weibliche, X-Chromosom weitestgehend dekondensiert vorliegt (Abb. 3.30A, Pfeilköpfe deuten auf das X-Chromosom). Insgesamt wirkt das gesamte Euchromatin in der Mutante aufgelockert. Um das männliche X-Chromosom klar zu identifizieren, erfolgte dessen Markierung mit Hilfe eines spezifischen MOF-Antikörpers (Abb. 3.30B), ein Protein,

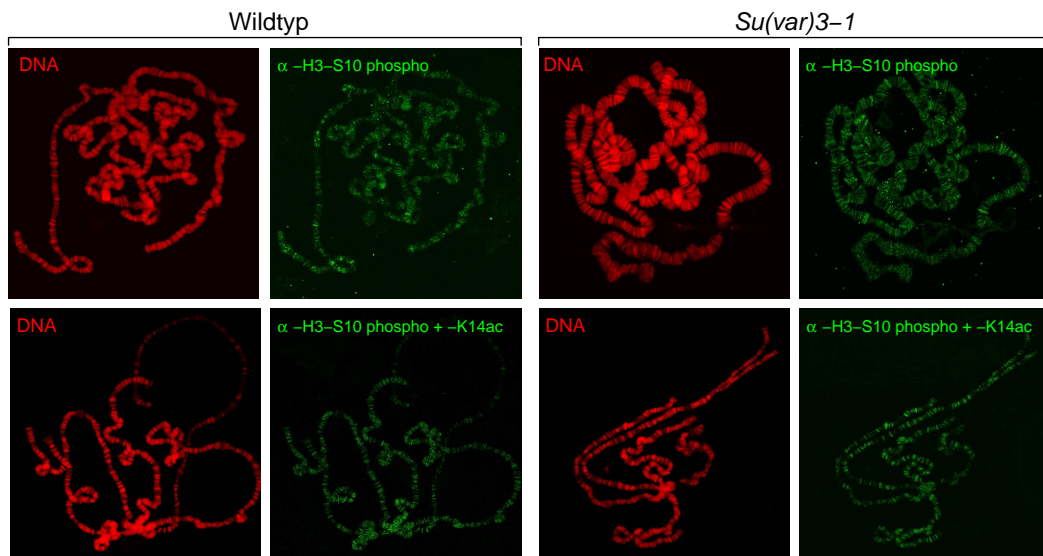


Abbildung 3.29: Nachweis der H3-S10-Phosphorylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten. Immunmarkierung von Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp- (links) und *JIL-1^{Su(var)3-1}* Mutanten-Larven (rechts) mittels eines spezifischen H3-S10 phospho-Antikörpers (obere Reihe) sowie eines Antikörpers, der eine Kombination von phosphoryliertem H3-S10 und acetyliertem H3-K14 erkennt (untere Reihe). DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

welches Bestandteil von Dosis-Kompensations-Komplexen und aufgrunddessen ausschließlich mit dem männlichen X-Chromosom assoziiert ist (Hilfiker et al., 1997). Diese Daten deuten an, daß die *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten dem Wildtypprotein entgegenwirken und somit antimorphe *JIL-1*-Allele darstellen.

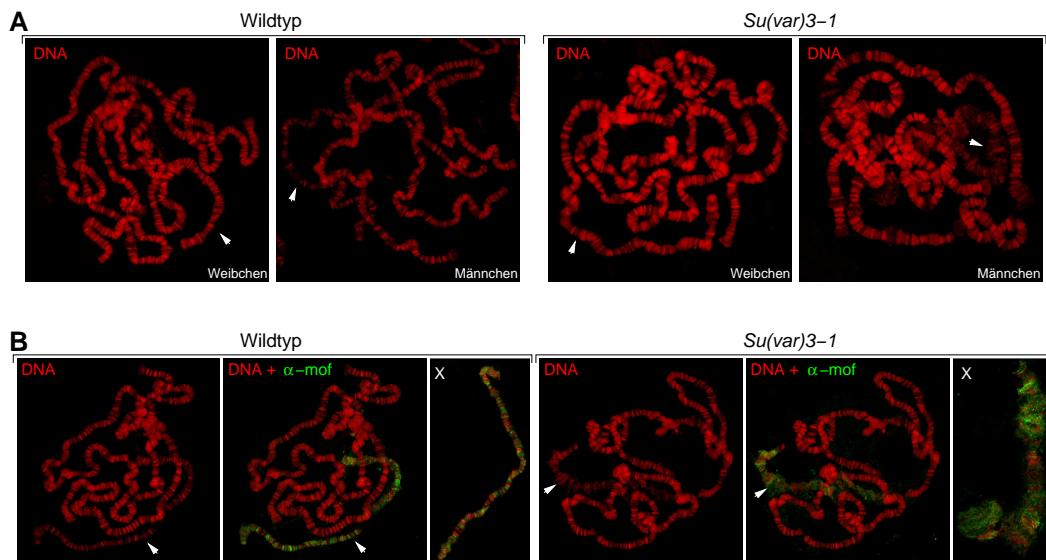


Abbildung 3.30: Dekondensierung des männlichen X-Chromosoms in Polytänchromosomen von *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten. **(A)** Das X-Chromosom (Pfeilkopf) männlicher homozygoter *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten (rechts) liegt in Speicheldrüsenchromosomen größtenteils dekontensiert vor und verliert teilweise die charakteristische Bandenstruktur. **(B)** Die betroffenen Chromosomen zeigen eine Assoziation mit MOF-Antikörpern, einem spezifischen Marker für das männliche X-Chromosom. Das jeweils rechte Bild zeigt ein vergrößertes X-Chromosom. Pfeilköpfe deuten auf das jeweilige X-Chromosom. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

Mit Hilfe eines spezifischen *JIL-1*-Antikörpers ist es möglich, die Verteilung des Proteins zu verfolgen. In Wildtypchromosomen ist das *JIL-1*-Protein in hundert Interbanden und schwach im Chromozentrum nachweisbar [Abb. 3.31; Jin et al. (1999)], wogegen im X-Chromosom männlicher Larven ein ca. zweifach erhöhtes *JIL-1*-Level zu verzeichnen ist [Abb. 3.31, Pfeil; Jin et al. (1999)]. In der homozygoten *JIL-1^{z2}* Null-Mutante ist, wie zu erwarten, kein Signal mittels *JIL-1*-Antikörper identifizierbar (Abb. 3.31). Die Verteilung des verkürzten Proteins der *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten ist in Interbanden nicht signifikant verändert, auffallend ist jedoch eine variable Reduktion der Proteinmenge im männlichen X-Chromosom (Abb. 3.31, gezeigt sind zwei Chromosomen einer Präparation). Wie

bereits erwähnt, entspricht das männliche X-Chromosom der Region, die den auffälligsten Veränderungen der Chromatinstruktur unterliegt (Abb. 3.30). Da *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten interessante genetische Wechselwirkungen mit *Su(var)3-9* aufweisen, wurde ferner die Verteilung des JIL-1-Proteins in *Su(var)3-9* Null-Mutanten analysiert. Dabei waren keine Veränderungen in der Proteinverteilung, betreffend der Markierung der Interbanden und des männlichen X-Chromosoms, nachweisbar (Abb. 3.31). Demgegenüber ist in *Su(var)3-9* Null-Mutanten deutlich und reproduzierbar eine stärkere Assoziation des JIL-1-Proteins mit dem 4. Chromosom zu beobachten (Abb. 3.31, offener Pfeilkopf).

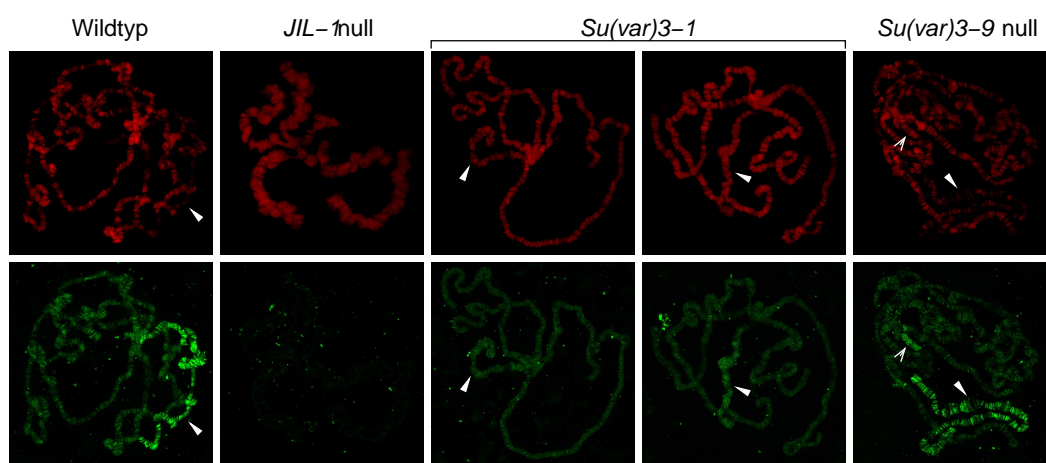


Abbildung 3.31: Verteilung von JIL-1 in polytären Speicheldrüsenchromosomen männlicher Larven des Wildtyps, *JIL-1* Null-Mutante (*JIL-1^{z2}*), *JIL-1^{Su(var)3-1}* und *Su(var)3-9* Null-Mutanten. Pfeilköpfe deuten auf das X-Chromosom. Offene Pfeilköpfe markieren das 4. Chromosom. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

3.7.3 Repressive oder aktivierende Histon-Modifikationen sind in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten nicht verändert

Die faszinierendste Eigenschaft der *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten betrifft die massive Blockierung des durch zusätzliche *Su(var)3-9*-Kopien induzierten Gensilencings. Um die Komplexität des Genoms zu koordinieren, haben sich Mechanismen entwickelt, die aktive Gen-Loci vor repressiven Chromatinstrukturen schützen. Modifizierungen der N-Termini der Histone können durch die Bereitstellung einer neuen Bindungsoberfläche am Chromatin, die von bestimmten Proteinen erkannt werden, den Chromatinstatus regulieren. Die Methylierung von H3-K9, H3-K27 und H4-K20 stellt in diesem Kontext eine Markierung repressiven Chromatins

dar (Fischle et al., 2003; Peters et al., 2003; Schotta et al., 2004), wobei der *Su(var)3-9*-abhängigen H3-K9-Methylierung eine zentrale Rolle im heterochromatischen Gensilencing zukommt (Schotta et al., 2002; Peters et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob der außergewöhnlich starke Suppressoreffekt der *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten, bzw. deren hemmender Einfluß auf *Su(var)3-9*-abhängiges Gensilencing mit einer Veränderung repressiver Histon-Methylierungsmuster einhergeht, wurden immunzytologische Analysen an Polytäanchrosomen des Wildtyps im Vergleich mit homozygoten *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten durchgeführt. In *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten konnte jedoch keine offensichtliche Änderung, weder der H3-K9- und H3-K27-Methylierungsstadien, noch der H4-K20 tri-Methylierung im Heterochromatin bzw. Euchromatin detektiert werden (Abb. 3.32). Die Lokalisierung der Proteine SU(VAR)3-9 und HP1 unterliegt in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten ebenfalls keiner Veränderung (Daten nicht gezeigt).

Da die JIL-1-Kinase hauptsächlich in Interbanden lokalisiert und darüberhinaus in Abwesenheit von JIL-1 die Bandenstruktur weitestgehend aufgelöst ist bzw. die Chromosomen kondensiert vorliegen (Wang et al., 2001), liegt die Vermutung nahe, daß die JIL-1-Kinase eine Funktion in der Etablierung oder Aufrechterhaltung offener Chromatinstrukturen innehat. Aus diesem Grund wurden die *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten auf Veränderungen bezüglich aktivierender Histon-Methylierungsmuster, wie H3-K4-Methylierung und H3-K9- bzw. H3-K14-Acetylierung untersucht. Die H3-K4-Methylierung stellt eine Markierung euchromatischer Interbandenregionen dar (Abb. 3.33, siehe auch Abb. 3.18). In polytären Chromosomen der *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Allele ist jedoch keine Veränderung dieses spezifischen Methylierungsmusters zu beobachten. Eine Acetylierung von H3-K9 und H3-K14 ist hingegen entscheidend für die Rekrutierung des RNA Polymerase II Transkriptionsfaktors TFIID, wobei die H3-S10 Phosphorylierung durch eine bisher nicht näher spezifizierte Kinase kritisch für die Acetylierung der H3-K14-Position, beispielsweise durch GCN5 ist (Agalioti et al., 2002). In Wildtypchromosomen ist die H3-K9- bzw. K14-Acetylierung an zahlreichen euchromatischen Banden und schwach im Chromozentrum nachweisbar (Abb. 3.33). Dieses Markierungsmuster ist in den analysierten *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten nicht signifikant verändert (Abb. 3.33).

Jüngste Erkenntnisse deuten an, daß das Vorkommen von Histonvarianten im Nucleosom wichtig für die Aufrechterhaltung aktivierender bzw. repressiver Chromatinstrukturen ist. Die Inkorporation der H2A-Histonvariante H2A.Z in Nucleosomen beispielsweise, repräsentiert einen neuen Mechanismus, um das Euchromatin vor unkontrollierter Ausbreitung des Heterochromatins zu bewahren (Meneghini et al., 2003). Dabei ist diese Histon-Variante vornehmlich an Promotoren

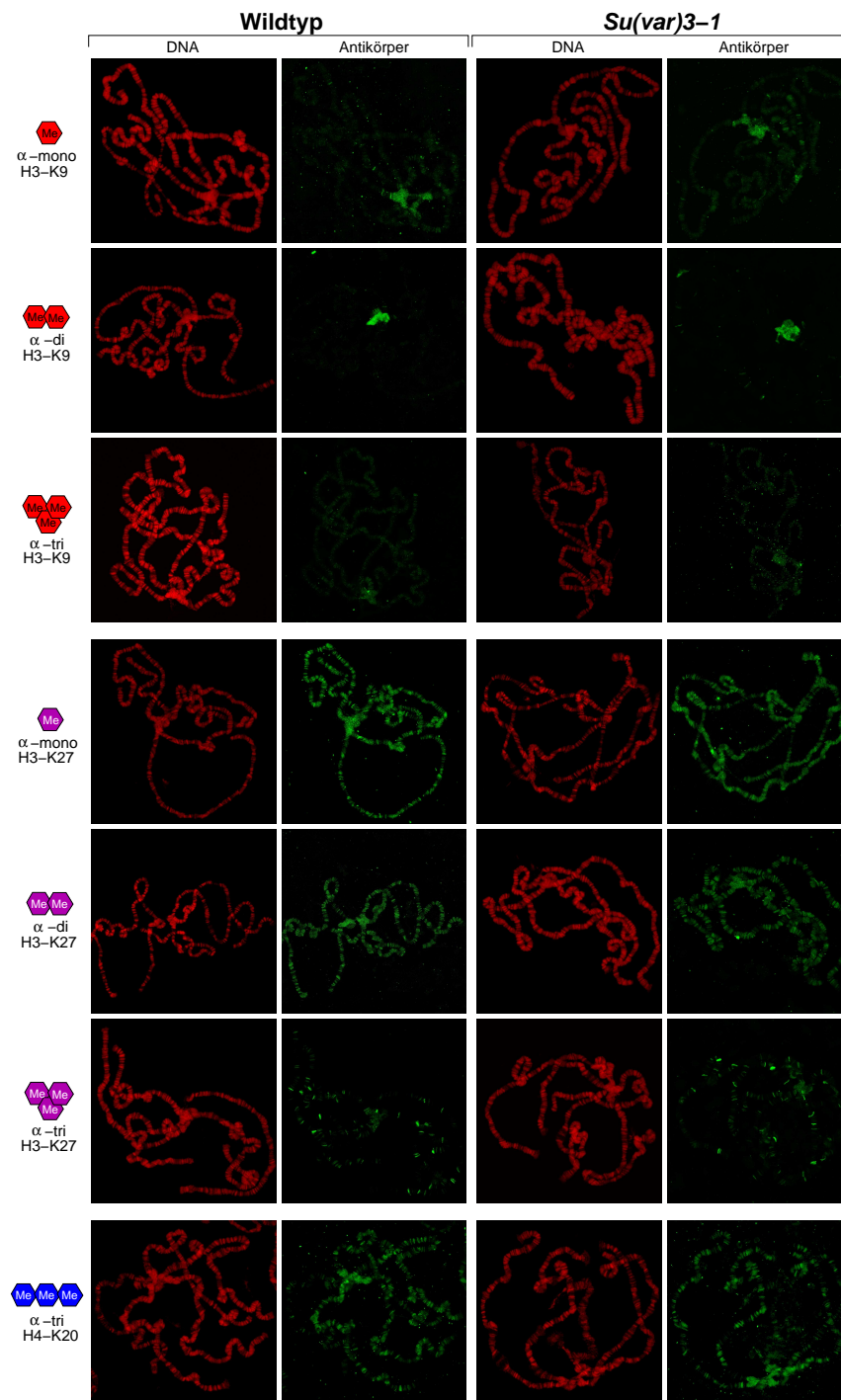


Abbildung 3.32: Verteilung repressiver Histon-Lysin-Methylierungsmuster in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten. Immunmarkierung polytärer Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp- und *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten-Larven mittels Antikörper, die gegen H3-K9 bzw. H3-K27 mono-, di- und tri-Methylierung sowie H4-K20 tri-Methylierung gerichtet sind. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

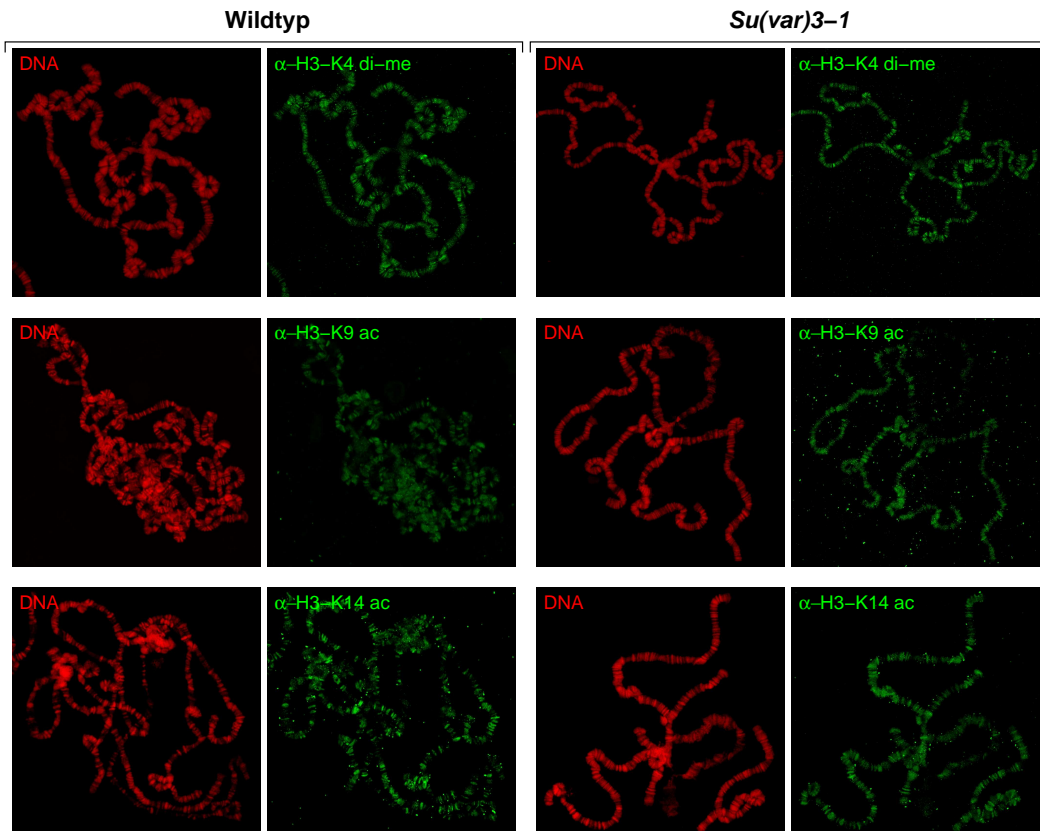


Abbildung 3.33: Verteilung aktivierender Histon-Modifizierungsmuster in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten. Immunmarkierung polytärer Speicheldrüsenchromosomen von Wildtyp- und *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten-Larven mittels Antikörper, die gegen H3-K4 di-Methylierung (obere Reihe) bzw. gegen Acetylierung von H3-K9 (mittlere Reihe) und H3-K14 (untere Reihe) gerichtet sind. DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

und innerhalb der kodierenden Region von aktiven Genen nachweisbar (Meneghini et al., 2003). Es ist demnach denkbar, daß die C-terminal verkürzten *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutantenproteine auf bisher ungeklärte Weise den Einbau von H2A.Z in das Nucleosom beeinflussen und somit die Ausbreitung von Heterochromatin blockieren. Immunzytologische Analysen mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch das *Drosophila*-Homologe von H2A.Z, H2Av, erkennt, zeigen in polytänen Speicheldrüsenchromosomen hauptsächlich eine Verteilung in zahlreichen Interbanden aber auch eine Assoziation mit dem Chromozentrum (Abb. 3.34, linke Reihe). In *JIL-1^{Su(var)3-1}*- bzw. der amorphen *JIL-1^{z2}*-Mutante konnte keine offensichtliche Änderung des H2Av-Verteilungsmusters beobachtet werden (Abb. 3.34, linke Reihe). Ebenfalls in der *Su(var)3-9* Null-Mutante konnte keine signifikante Veränderung der H2Av-Bindung im Chromatin nachgewiesen werden (Abb. 3.34, linke Reihe).

Neueste *in vitro*-Daten implizieren, daß MSK1, das humane Homologe der JIL-1-Kinase, durch die Phosphorylierung von Histon H2A an der Position Serin 1 (S1), eine Transkription an rekonstituiertem Chromatin inhibiert (Zhang et al., 2004). Nun stellte sich die Frage, ob die H2A-S1-Phosphorylierung ebenfalls *in vivo* von MSK1/JIL-1 realisiert wird. Um diesen Punkt zu klären, wurden immunzytologische Analysen mit Hilfe eines Antikörpers durchgeführt, der phosphoryliertes S1 von H2A und H4 detektiert (Barber et al., 2004). In Wildtypchromosomen ist diese spezielle Markierung an zahlreichen euchromatischen Banden und darüberhinaus prominent im Chromozentrum nachweisbar (Abb. 3.34, rechte Spalte). Erstaunlicherweise ist keinerlei Reduktion der Phosphorylierung in *JIL-1^{z2}* Null-Mutanten erkennbar (Abb. 3.34, rechte Spalte). Dieses Ergebnis deutet an, daß die H2A-S1-Phosphorylierung in polytänen Speicheldrüsenchromosomen kein Ziel der JIL-1-Kinase darstellt, wobei in diesen immunzytologischen Untersuchungen der Antikörper eine Schwachstelle darstellt, der neben H2A-S1 ebenfalls H4-S1-Phosphorylierung detektiert (Barber et al., 2004). Dieses Phosphorylierungsmuster unterliegt im Hintergrund von *JIL-1^{Su(var)3-1}*- bzw. *Su(var)3-9* Null-Mutanten gleichermaßen keiner signifikanten Veränderung (Abb. 3.34, rechte Spalte).

Um in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten eine mögliche Veränderung der Histon-Modifizierungsmuster zu detektieren, wurden ergänzend massenspektrometrische Analysen von Kernextrakten diverser embryonaler Stadien (0-4 h bzw. 0-14 h) durchgeführt. Diese Analysen ergaben, bestätigend zu den immunzytologischen Untersuchungen mit Hilfe spezifischer Antikörper, keine signifikanten Änderungen bekannter Histon-Modifizierungen in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Embryonen (S. Kubicek, pers. Mitteilung).

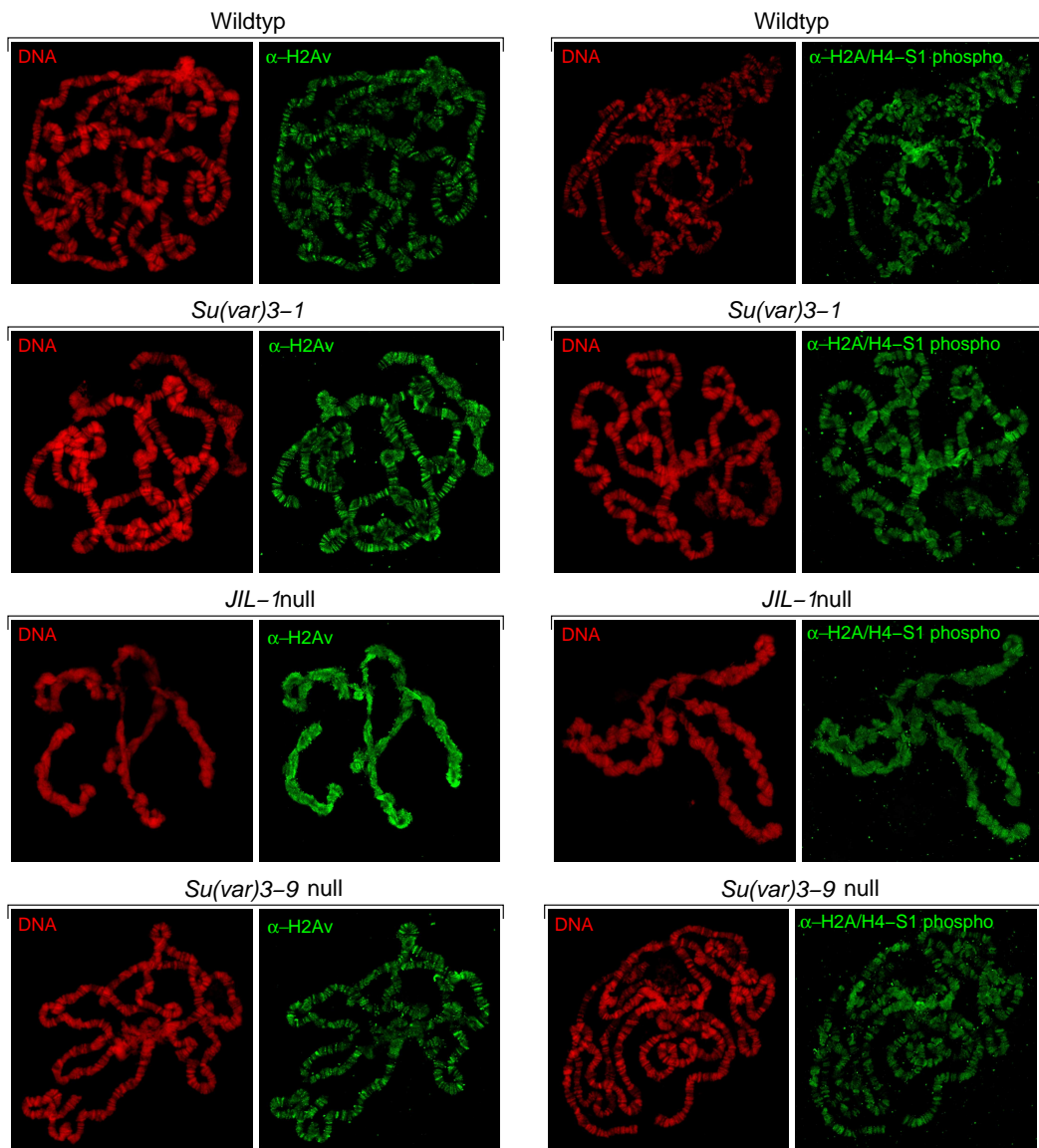


Abbildung 3.34: Verteilung der H2A-Histonvariante H2Av bzw. H2A-S1-Phosphorylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen. Immunmarkierung von Speicheldrüsenchromosomen des Wildtyps, *JIL-1* Null-Mutante (*JIL-1^{z2}*), *JIL-1^{Su(var)3-1}* und *Su(var)3-9* Null-Mutanten mittels Antikörper, die gegen die Histon H2A-Variante H2Av (linke Spalte) und gegen die Phosphorylierung von H2A-S1 sowie H4-S1 gerichtet sind (rechte Spalte). DNA-Färbung mit Propidiumiodid.

3.7.4 *JIL-1^{Su(var)3-1}* blockiert die Ausbreitung heterochromatischer Chromatinstrukturen

Die massive Blockierung der SU(VAR)3-9-vermittelten Reprimierung des *white*-Gens durch *JIL-1^{Su(var)3-1}* legt die Vermutung nahe, daß die Ausbreitung des Heterochromatins in diesen Mutanten schwerwiegend gehemmt ist. Mit Hilfe zytologischer Analysen wurde der Einfluß von *JIL-1^{Su(var)3-1}* auf die Ausbreitung von Heterochromatin in einem geeigneten PEV-Rearrangement, mit der Möglichkeit einer sehr viel höheren Auflösung, untersucht. In der Translokation $T(1,4)w^{m258-21}$ wurde eine, das *white*- und *Notch*-Gen beinhaltende, Region in die unmittelbare Nähe des perizentrischen Heterochromatins transloziert und unterliegt hierbei einer variablen Heterochromatisierung. In polytären Speicheldrüsenchromosomen ist eine variable Kompaktierung der euchromatischen Region 3C-3E, welche ca. 1 Mb DNA entspricht, sichtbar (Hartmann-Goldstein, 1967). In Präparationen ist das heterochromatisierte Material jedoch häufig in das angrenzende perizentrische Heterochromatin inkorporiert, was dessen Analyse erschwert (Reuter et al., 1982). Aus diesem Grund wurde die Heterochromatisierung der Region 3C-3E in heterozygoten $T(1,4)w^{m258-21} / T(1,4)w^{70126.5}$ -Larven verfolgt. In dieser Kombination bildet die Region 3C-3E der Translokation $w^{m258-21}$ mit dem 4. Chromosom eine Paarungsstruktur und wird demzufolge nicht in das Chromozentrum inkorporiert (Reuter et al., 1982). Die Kombination dieser beiden Translokationen erlaubt präzisere Studien der inaktivierten Region (Abb. 3.35). Der variabel heterochromatisierte Bereich umfaßt mehrere Transkriptionseinheiten, von denen die Expression der Gene *Notch* und *white* phänotypisch verfolgt werden kann (Abb. 3.36A).

Die Anwesenheit von zwei zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopien führt zu einer massiven Kompaktierung und markanten H3-K9 di-Methylierung der Region 3C-3E (Abb. 3.36B, linke Spalte). Diese starke Kondensation euchromatischer Bereiche wird von der Reprimierung des *Notch*- und, in abgeschwächter Form, des mehr distal lokalisierten *white*-Gens begleitet (Abb. 3.36B, linke Spalte). Dabei zeigen 51% der ausgewerteten Flügel die für die *Notch*-Inaktivierung typischen eingekerbten Flügel und 41% der untersuchten Fliegenaugen wiesen *white*-mottled-Sektoren unterschiedlichen Ausmaßes auf (Abb. 3.36B, linke Spalte). Weiterhin wurden die zwei zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopien mit *JIL-1^{Su(var)3-1}* kombiniert und deren Effekt auf die Heterochromatisierung in der Translokation $w^{m258-21}$ analysiert. Bemerkenswerterweise verliert die gesamte Region, die durch den Einfluß der SU(VAR)3-9-Überexpression massiv heterochromatisiert wurde, die Kompaktierung und zeigt das typische euchromatische Bandenmuster (Abb. 3.36B, rech-

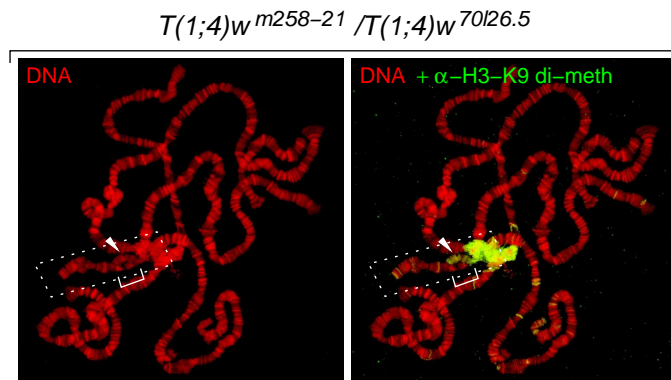


Abbildung 3.35: Polytänes Speicheldrüsenchromosom heterozygoter $T(1,4)w^{m258-21} / T(1,4)w^{70l26.5}$ -Larven. Die variabel heterochromatisierte Region 3C-3E ist markiert (Klammer). Immunmarkierung mit H3-K9 di-methyl-Antikörper kennzeichnet das 4.Chromosom (Pfeilkopf) sowie das Chromozentrum. Das Rechteck markiert den in Abb. 3.36B dargestellten Chromosomenausschnitt.

te Spalte). Die Blockierung der Ausbreitung des Heterochromatins ist mit der Aktivierung der Expression des *Notch*- bzw. *white*-Gens verbunden, da in den analysierten adulten Fliegen kaum noch Zeichen einer Inaktivierung eines der beiden Gene zu beobachten ist (Abb. 3.36, rechte Spalte). Dieser Befund macht deutlich, daß eine verstärkte, SU(VAR)3-9-vermittelte Ausbreitung des Heterochromatins durch *JIL-1^{Su(var)3-1}* massiv blockiert wird, was eine überaus bedeutende Funktion des C-Terminus von JIL-1 in der Regulation von Chromatinstrukturen nahelegt.

Die variable Inaktivierung weiter euchromatischer Bereiche in der Translokation $w^{m258-21}$ ermöglicht weiterhin eine Analyse von Histon-Modifikationen, die mit der Ausbreitung des Heterochromatins einhergehen. Liegt diese Region unkondensiert vor und zeigt das typische euchromatische Bandenmuster, sind keine Signale für H3-K9 di- und tri-Methylierung nachweisbar (Abb. 3.36B, rechte Spalte). Im Gegensatz dazu ist die SU(VAR)3-9-vermittelte Kondensation dieses Bereiches des Chromatins mit einer beträchtlichen H3-K9 di-Methylierung, jedoch nicht mit H3-K9 tri-Methylierung assoziiert (Abb. 3.36B, linke Spalte). Diese Daten implizieren, daß die H3-K9 di-Methylierung, zumindest in *Drosophila melanogaster*, die wesentliche Markierung darstellt, die mit der Ausbreitung reprimierender, heterochromatischer Chromatinstrukturen assoziiert ist. Die H3-K9 tri-Methylierung ist offensichtlich weniger bedeutsam für die Ausbildung von Heterochromatin. Die geringe Verteilung im perizentrischen Heterochromatin bzw. die starke Anreicherung in Zentromernähe zeugen eher für eine Funktion der

H3-K9 tri-Methylierung in der Organisation und Struktur zentromernahen Chromatins.

3.7.5 *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten hemmen generell die Ausbreitung *Su(var)3-9*-vermittelter Heterochromatisierung

Beide PEV-Rearrangements, *T(1,4)w^{m258-21}* bzw. *In(1)w^{m4h}*, in deren Hintergrund bestimmt werden konnte, daß *JIL-1^{Su(var)3-1}* der Triplo-Enhancerfunktion von *Su(var)3-9* entgegenwirkt, betreffen das X-Chromosom. Um sicher ausschließen zu können, daß es sich bei den dokumentierten Effekten nicht um spezifische Wirkungen handelt, die exklusiv mit dem X-Chromosom verbunden sind, wurde der Einfluß von *JIL-1^{Su(var)3-1}* auf fünf weitere PEV-Rearrangements, die sowohl autosomal, als auch X- bzw. Y-chromosomal lokalisiert sind, analysiert. Dabei wurden vergleichend der Einfluß von *JIL-1^{Su(var)3-1}*, zwei zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopien und die Kombination beider untersucht.

Die verwendeten PEV-Rearrangements können in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die erste Klasse ist dadurch charakterisiert, daß durch chromosomale Umbauten ein Gen-Locus in die Nachbarschaft von perizentrischem Heterochromatin gebracht wurde. Im Wildtyp unterliegen diese Gene einer variablen Inaktivierung, sichtbar am gelbfarbenen Abdomen mit wenigen schwarzen Punkten, resultierend aus der Inaktivierung des *yellow*-Gens in der Duplikation *Dp(1;j)γ²³⁸* bzw. lange, dünne Scutellarborsten, hervorgerufen durch die Reprimierung der dominanten *Sb¹*-Mutation, im Fall der Translokation *T(2;3)Sb^v*. *JIL-1^{Su(var)3-1}* zeigt ebenfalls einen starken Suppressoreffekt auf diese PEV-Rearrangements, sichtbar an der deutlichen Schwarzfärbung des Abdomens in der Duplikation *γ²³⁸* bzw. kurzer Borsten in *Sb^v*. Darüberhinaus hemmt *JIL-1^{Su(var)3-1}* massiv die Etablierung des Triplo-Enhancereffektes von *Su(var)3-9* (Abb. 3.37 und Tab. 3.1).

In der zweiten Klasse sind PEV-Rearrangements zusammengefaßt, in denen ein Transgen, welches ein *lacZ*- und *mini-white*-Gen als Marker enthält, in die Nähe des Heterochromatins gebracht wurde (Tab. 3.1). Im Fall der Inversion *In(3L)BL1* und der Transposition *Tp(3;Y)BL2* konnte die Expression der Markergene in verschiedenen Entwicklungsstadien detektiert werden, *lacZ*-Expression in Speicheldrüsen 3. Larven bzw. *white*-Expression in den Augen adulter Fliegen. Die *Su(var)3-9*-Überexpression führt zu verstärkter Reprimierung der beiden Markergene *lacZ* und *white*, währenddessen *JIL-1^{Su(var)3-1}* die Inaktivierung beider Markergene supprimiert (Abb. 3.37 und 3.1). Überdies ist in Gegenwart von zwei Extra-Kopien *Su(var)3-9*, kombiniert mit *JIL-1^{Su(var)3-1}*, eine beträchtliche

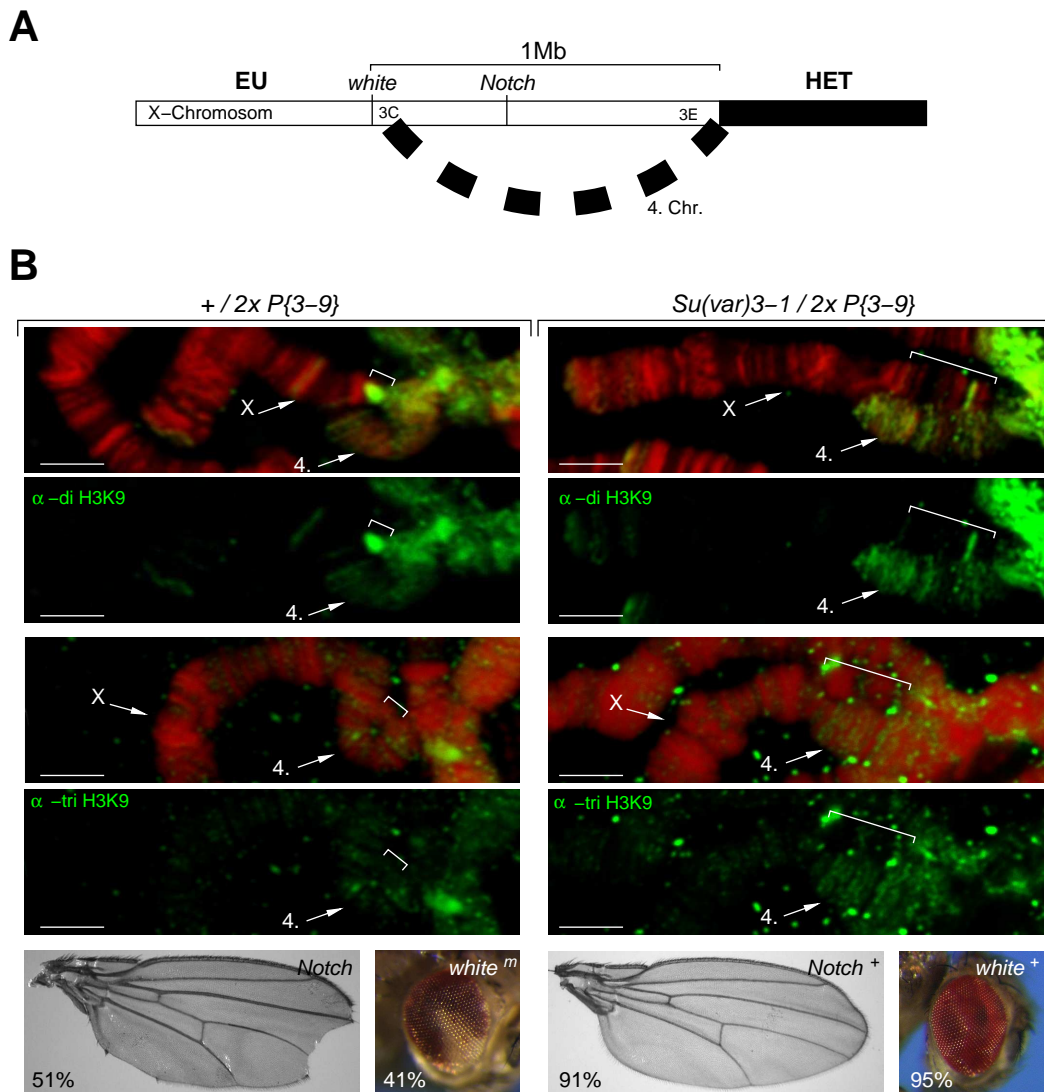


Abbildung 3.36: *JIL-1^{Su(var)3-1}* blockiert die Ausbreitung des Heterochromatins. **(A)** Schematische Darstellung der durch Heterochromatisierung variabel inaktivierten Region 3C-3E in der Translokation $w^{m258-21}$, die aufgrund des Kontaktes zum 4. Chromosom stabilisiert wird. Die phänotypisch analysierbaren Gene *Notch* (inaktiv=eingekerbte Flügel) und *white* (inaktiv=weiße Augen) befinden sich innerhalb dieses variabel inaktivierten Bereiches. **(B)** Immunzytologische Analysen der H3-K9 di- und tri-Methylierung in der Translokation $T(1,4)w^{m258-21}$. In Anwesenheit von zwei Extra-Kopien von *Su(var)3-9* (linke Spalte), wird die Region 3C-3E stark kompaktiert (Klammer) und markiert mit H3-K9 di-Methylierung, nicht jedoch H3-K9 tri-Methylierung. Die Inaktivierung der Transkription wird durch eine hohe Anzahl von eingekerbten Flügeln (51%) bzw. *white*-mottled-Sektoren (41%) verdeutlicht. Die Präsenz von *JIL-1^{Su(var)3-1}* unterdrückt die Ausbreitung des Heterochromatins (Klammer), sichtbar an der Aktivierung der Gene *Notch* (91%) und *white* (95%) sowie den Verlust der H3-K9 di-Methylierung.

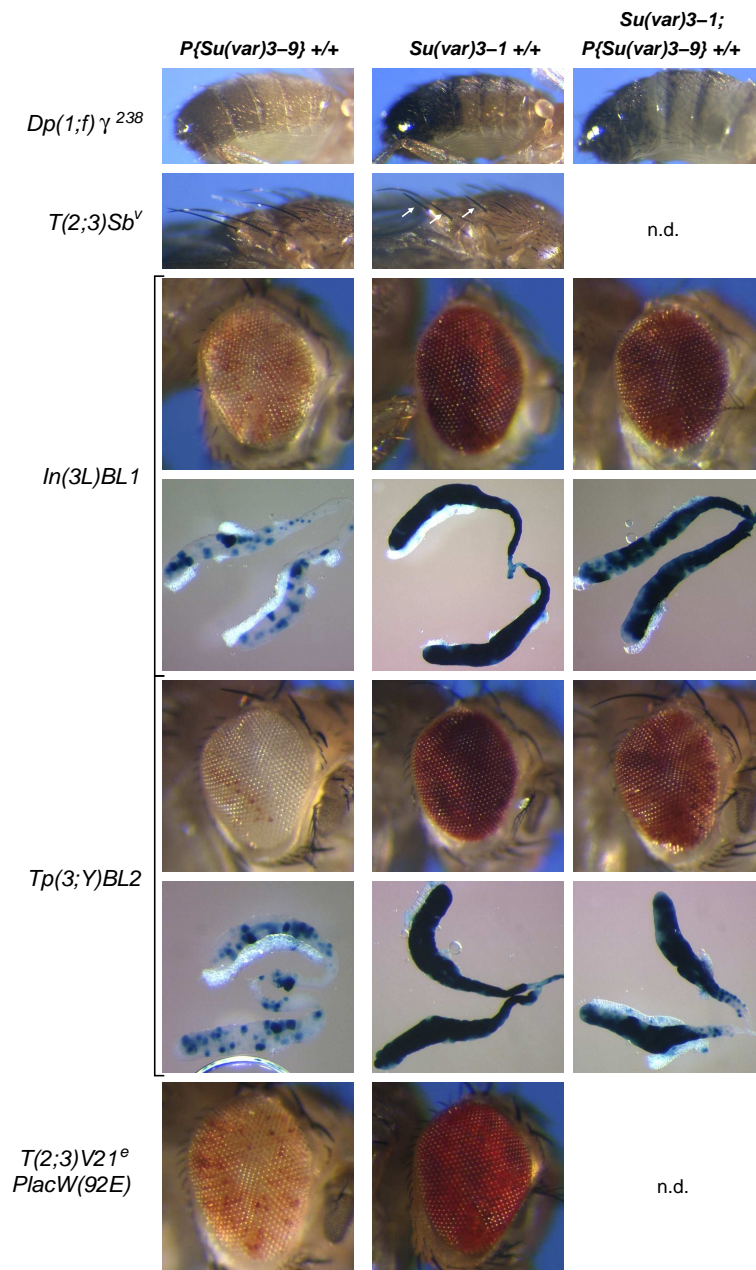


Abbildung 3.37: *JIL-1^{Su(var)3-1}* unterdrückt die Ausbreitung des Heterochromatins in verschiedenen PEV-Rearrangements. Die Expression der Markergene ist in Anwesenheit von zwei zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopien (*P{Su(var)3-9} +/+*), der *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutante (*Su(var)3-1 +/+*) und der Kombination beider Genotypen (*P{Su(var)3-9}; Su(var)3-1 +/+*) dargestellt. Ausgewählt sind repräsentative Phänotypen. Vergleiche mit Tabelle 3.1.

PEV Epiallel	Marker-Gen(e)	Chr.	Phänotyp bei voller Expression	% Wildtyp-Expression des Marker-Gens		
				$P\{3-9\} +/+$	$Su(var)3-1; +/+$	$Su(var)3-1; P\{3-9\} +/+$
Klasse I						
$In(1)w^{m4}$	<i>white</i>	X	rote Augen	0%	100%	95%
$Dp(1;j)\gamma^{238}$	<i>yellow</i>	X	schwarze Pigmentierung	6%	70%	45%
$T(2;3)Sb^v$	<i>stubble</i>	3	kurze Borsten	2%	64%	n.d.
$T(1;4)w^{m258-21}$	<i>Notch</i>	X	eingekerbte Flügel	49%	100%	91%
	<i>white</i>		rote Augen	41%	100%	95%
Klasse II						
$In(3L)BL1$	<i>lacZ</i> -Transgene	3	<i>lacZ</i> Expression	26%	73%	60%
	w^+		rote Augen	33%	86%	58%
$Tp(3;Y)BL2$	<i>lacZ</i> -Transgene	Y	<i>lacZ</i> Expression	26%	68%	53%
	w^+		rote Augen	25%	98%	68%
$T(2;3)V21^e$ $PlacW(92E)$	Repeats von w^+ -Transgenen	3	rote Augen	22%	85%	n.d.

Tabelle 3.1: $JIL-1^{Su(var)3-1}$ blockiert generell die Ausbreitung des Heterochromatins. Die Expression der Marker-gene ist in Anwesenheit von zwei zusätzlichen $Su(var)3-9$ -Kopien ($P\{Su(var)3-9\} +/+$), der $JIL-1^{Su(var)3-1}$ -Mutante ($Su(var)3-1 +/+$) und der Kombination beider Genotypen ($P\{Su(var)3-9\}; Su(var)3-1 +/+$) dargestellt. Die Expression der jeweiligen Markergene wurde gemäß Material und Methoden kalkuliert. Repräsentative Phänotypen sind in Abbildung 3.37 aufgeführt.

Reaktivierung des *lacZ*- und *white*-Gens zu verzeichnen (Abb. 3.37 und Tab. 3.1).

Das Transgen *T(2;3)V21^e PlacW(92E)* enthält vier *PlacW*-Elemente in Tandemanordnung, was in einer variablen Inaktivierung des eingeschlossenen mini-*white*-Gens resultiert (Dorer und Henikoff, 1994). Die Gegenwart von zwei zusätzlichen *Su(var)3-9*-Kopien zeigt in diesem Fall nur eine geringe Verstärkung der Inaktivierung des Markergens, demgegenüber induziert die *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutante eine ausnehmend starke Aktivierung der *white*-Expression (Abb. 3.37 und Tab. 3.1).

3.7.6 Die massive Heterochromatisierung in *Su(var)3-9^{ptn}* wird durch *JIL-1^{Su(var)3-1}* verhindert

Die hypermorphe Mutation *Su(var)3-9^{ptn}* stellt den stärksten bisher identifizierten Enhancer für PEV dar. In der Inversion *w^{m4h}* wird durch *Su(var)3-9^{ptn}* nicht nur eine komplette Inaktivierung des *white*-Gens, sondern selbst des ca. 180 kb distal lokalisierten *roughest*-Gens hervorgerufen (Kuhfittig et al., 2001). Diese massive Heterochromatisierung wird offenbar durch stark erhöhte H3-K9 di und tri-Methylierungslevel induziert (Siehe Abb. 3.22). Untersucht man den Einfluß der *Su(var)3-9^{ptn}*-Mutante auf die Inversion *w^{m4h}* in Gegenwart von *JIL-1^{Su(var)3-1}*, ist eine deutliche Blockierung der Ausbreitung des Heterochromatins nachweisbar, sichtbar an der kompletten bzw. teilweisen Reaktivierung des *roughest*- bzw. *white*-Gens (Abb. 3.38A). Die massive Heterochromatisierung durch *Su(var)3-9^{ptn}* ist weiterhin durch eine prominente H3-K9 di-Methylierung euchromatischer Banden in Speicheldrüsenchromosomen gekennzeichnet (Abb. 3.38B). Dieses außergewöhnliche Methylierungsmuster ist in Larven, die sowohl die *Su(var)3-9^{ptn}*- also auch die *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutation tragen, jedoch nicht signifikant verändert (Abb. 3.38B). Das markanteste Merkmal des *Su(var)3-9^{ptn}*-Allels ist das Auftreten dominant weiblicher Sterilität, die durch Überkondensation und Fragmentierung des Chromatins während der frühen Embryonalentwicklung begründet ist (Kuhfittig et al., 2001). Um zu untersuchen, ob die weibliche Sterilität durch Mutanten gerettet werden kann, die durch eine Suppression der Heterochromatinausbreitung gekennzeichnet sind, wurde die Fertilität von Weibchen analysiert, die *Su(var)3-9^{ptn}* in Gegenwart verschiedener Suppressormutanten aufwiesen. Dabei war in den Kombinationen mit einer Null-Mutante von *Su(var)3-9* bzw. *Su(var)2-5* kein Effekt auf die weibliche Sterilität nachweisbar. Ebenso wie der Wildtyp, der als Kontrolle diente, zeigten diese Genotypen eine 100%ige weibliche Sterilität. Bemerkenswerterweise waren jedoch 62% der Weibchen, die neben *Su(var)3-9^{ptn}* die *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutation trugen, fertil. Anhand dieser Ergebnisse kann geschluss-

folgt werden, daß in der verstärkten Ausbreitung des Heterochromatins durch *Su(var)3-9^{ptn}* der Grund für die dominante weibliche Sterilität dieser Mutation zu finden ist und daß diese intensive Heterochromatisierung in *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten massiv eingeschränkt wird.

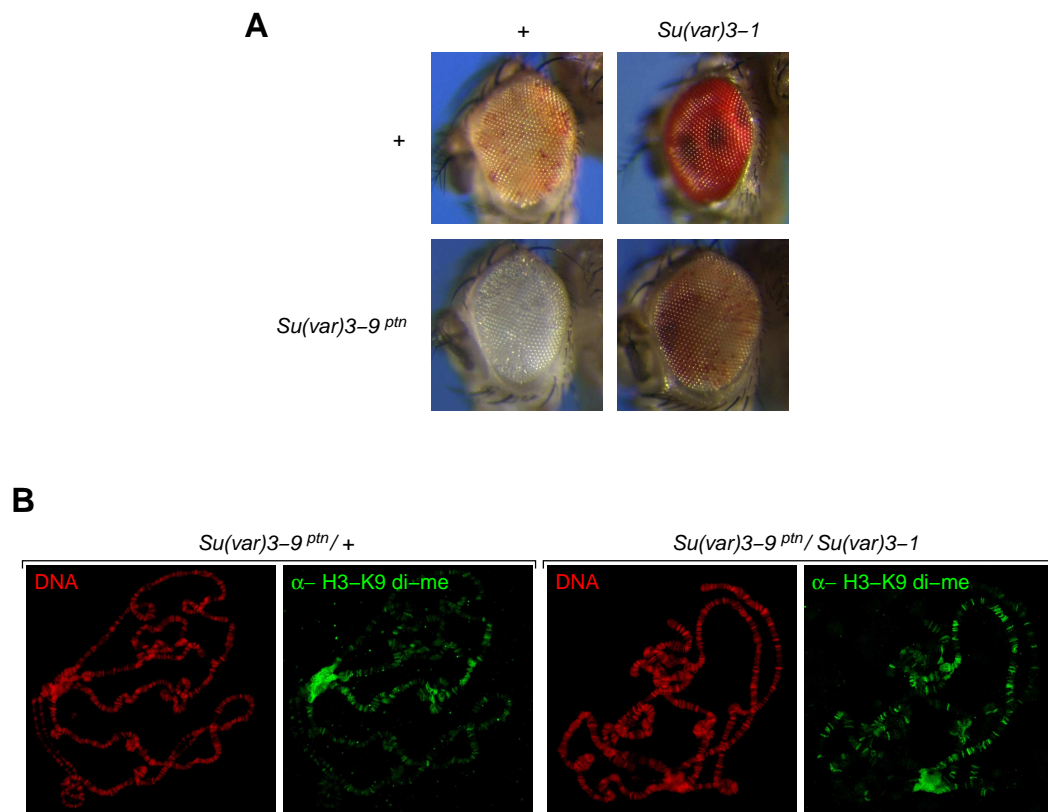


Abbildung 3.38: *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten kompensieren die massive Heterochromatisierung durch *Su(var)3-9^{ptn}*. **(A)** *Su(var)3-9^{ptn}* zeigt eine komplette *white*- und teilweise *roughest*-Inaktivierung, die in Anwesenheit von *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten stark unterdrückt ist. **(B)** Die charakteristische, verstärkte euchromatische Verteilung der H3-K9 di-Methylierung in *Su(var)3-9^{ptn}* unterliegt in Kombination mit *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten keiner signifikanten Veränderung.

4 Diskussion

Die Kontrolle der Genexpression ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung höherer Organismen. In *Drosophila melanogaster* erlaubt das Modellsystem der Positionseffekt-Variation Einblicke in die epigenetische Regulation höhergeordneter Chromatinzustände. Im Verlauf der letzten 15 Jahre war es möglich, eine Vielzahl von Komponenten zu identifizieren, die in die Etablierung heterochromatischer Strukturen involviert sind und somit eine Funktion in der Repression von Genen ausüben (Reuter und Spierer, 1992; Wallrath, 1998; Schotta et al., 2003a). *Su(var)3-9*, *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* beispielsweise, kodieren für Heterochromatin-assoziierte Proteine und haben demnach einen direkten Einfluß auf die Ausbildung bzw. Aufrechterhaltung des Heterochromatins. Genetische Analysen zeigen, daß *Su(var)3-9* ein epistatischer Faktor über *Su(var)2-5* und *Su(var)3-7* ist (Schotta et al., 2002), was für eine wesentliche Funktion der HMTase SU(VAR)3-9 bzw. der von ihr katalysierten H3-K9-Methylierung in der Organisation repressiver chromosomaler Domänen spricht (Schotta et al., 2003b).

4.1 Kontrolle der repressiven H3-K9 und H3-K27 Methylierungsstadien

Die methylierbaren Lysine in den Histonen können mono-, di- oder tri-methyliert vorliegen, wobei eine *in vivo*-Verteilung der verschiedenen Methylierungsstadien innerhalb des Chromatins lange Zeit unklar blieb. Mit der Entwicklung hochspezifischer Antikörper, die zwischen verschiedenen Methylierungsstufen der H3-K9- bzw. H3-K27-Position unterscheiden, wurde das Werkzeug bereitgestellt, mit dem es möglich ist, die *in vivo*-Verteilung dieser Modifizierungen zu analysieren (Perez-Burgos et al., 2004). Unter Verwendung dieser Antikörper konnte in ES-Zellen von Mäusen gezeigt werden, daß die unterschiedlichen H3-K9- und H3-K27-Methylierungsstufen bestimmte chromosomale Bereiche definieren (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003).

In Übereinstimmung mit der *in vitro* HMTase-Aktivität (Lein, 2003; Eskeland

et al., 2004), reguliert SU(VAR)3-9 H3-K9 di- und tri-Methylierung innerhalb des perizentrischen Heterochromatins. In Polytänchromosomen von *Su(var)3-9* Null-Mutanten ist die H3-K9 di- und tri-Methylierung innerhalb des Chromozentrums dramatisch reduziert bzw. vollständig verloren, am größtenteils heterochromatischen 4. Chromosom jedoch unbeeinflusst. Die H3-K9 mono-Methylierung, ebenfalls im perizentrischen Heterochromatin nachweisbar, unterliegt in *Su(var)3-9* Null-Mutanten keiner Veränderung, was die Vermutung zuläßt, daß H3-K9 mono-Methylierung keine ausreichende Markierung für die Etablierung reprimierender Chromatinstrukturen darstellt. Die Daten legen weiterhin nahe, daß mindestens eine weitere H3-K9-spezifische HMTase existiert, die die H3-K9 mono-Methylierung, H3-K9 di- und tri-Methylierung am 4. Chromosom bzw. H3-K9 di-Methylierung im zentromernahen Bereich des Chromozentrums vermittelt. Kandidaten für diese Funktion sind beispielsweise Ash1, ein Trithorax-Gruppenprotein, welches in der Lage ist, die Lysine H3-K4, H3-K9 sowie H4-K20 zu methylieren (Beisel et al., 2002), CG2995, das homologe Protein der HMTase G9a, welche H3-K9 und H3-K27 modifiziert (Tachibana et al., 2001), und CG30426, das Homolog der HMTase ESET, die ebenfalls H3-K9 methyliert (Yang et al., 2002). E(Z) konnte als mögliche, für perizentrische H3-K9 Methylierung verantwortliche HMTase bereits ausgeschlossen werden, da in *E(z)* Null-Mutanten weder mittels massenspektrometrischer, noch anhand immunzytologischer Analysen (Daten nicht gezeigt) eine signifikante Reduktion der H3-K9 mono-, di- oder tri-Methylierung nachweisbar ist. Neueste Analysen lassen hingegen vermuten, daß das G9a-homologe Protein CG2995 speziell für die H3-K9 di-Methylierung des 4. Chromosoms verantwortlich ist (S. Elgin, pers. Mitteilung). Interessanterweise weist demgegenüber die *ash1* Null-Mutante *ash1²²* einen schwachen dominanten Suppressoreffekt auf *In(1)w^{m4h}* auf (Daten nicht gezeigt), was eine neue Funktion von Ash1 für den Aufbau heterochromatischer Strukturen impliziert. Byrd und Shearn (2003) zeigten, daß die charakteristische H3-K4 di-Methylierung in Interbandenregionen von Polytänchromosomen in *ash-1*-Mutanten nahezu verloren, währenddessen die H3-K9 di-Methylierung im Chromozentrum schwach reduziert ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein Einfluß der *ash1*-Mutanten auf H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung im Chromozentrum von Polytänchromosomen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus welchem Grund sich demnach der Suppressoreffekt auf PEV manifestiert, bleibt momentan ungeklärt. Möglicherweise spielt hierbei die H4-K20-spezifische HMTase-Aktivität von Ash1 eine Rolle (Beisel et al., 2002), da die H4-K20-spezifischen HMTasen PR-Set7 und SUV4-20 ebenfalls einen dominanten Suppressoreffekt auf PEV aufweisen (Karachentsev et al., 2005; Schotta et al., 2004).

HP1 fungiert als weiterer wichtiger Kontrollfaktor für H3-K9 Methylierung, da in *Su(var)2-5* Null-Mutanten die H3-K9 mono- und di-Methylierung entlang der euchromatischen Chromosomenarme dramatisch erhöht ist. Dieses veränderte Methylierungsmuster ist mit der ektopischen Assoziation des SU(VAR)3-9-Proteins in *Su(var)2-5*-Mutanten vergleichbar (Schotta et al., 2002), obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß auch andere H3-K9-spezifische HMTasen zu dieser aberranten H3-K9-Methylierung beitragen. Bemerkenswerterweise erscheint die Verteilung der H3-K9 Methylierungsstadien innerhalb des perizentrischen Heterochromatins unverändert, was eine HP1-unabhängige Ausbreitung von SU(VAR)3-9 bzw. der H3-K9-Methylierungsstadien innerhalb des perizentrischen Heterochromatins impliziert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine geringfügige Reduktion der H3-K9 Methylierung, nicht detektierbar mittels Immunmarkierung, den Suppressoreffekt von *Su(var)2-5* hervorruft. Es ist auch denkbar, daß die stark eingeschränkte H4-K20 tri-Methylierung zum Verlust von Gensilencing in *Su(var)2-5*-Mutanten führt.

Analysen der *Su(var)3-9*-Mutanten offenbaren hypomorphe als auch amorphe Allele, unterscheidbar anhand ihres unterschiedlichen Einflusses auf die H3-K9-Methylierungsstadien. Die direkte Korrelation zwischen der HMTase-Aktivität und dem Umfang der Genrepression zeigt, daß die Etablierung heterochromatischer Strukturen größtenteils von den kinetischen Eigenschaften des SU(VAR)3-9-Enzyms determiniert werden. Im Einklang mit dieser Hypothese induziert das hypermorphe Allel *Su(var)3-9^{ptn}* drastisch erhöhte H3-K9 di- und tri-Methylierung bei gleichzeitigem verstärktem Gensilencing. Diese intensive Expansion heterochromatischer Strukturen, sichtbar an der vollständigen Reprimierung des *white*-Gens, bzw. der beträchtlichen Inaktivierung des ca. 180 kb distal lokalisierten *roughest*-Gens in *In(1)w^{m4}* hat schwerwiegende Folgen auf den Organismus. So weist *Su(var)3-9^{ptn}* dominante weibliche Sterilität auf, resultierend aus einer Überkondensierung des Chromatins während der frühen Embryonalentwicklung (Kuhfittig et al., 2001). Das hyperaktive *Su(var)3-9^{ptn}*-Allel führt in polytären Speicheldrüsenchromosomen zu 100-200 zusätzlichen euchromatischen Banden mit verstärkter H3-K9 di-Methylierung. Diese Banden könnten mit endogenen SU(VAR)3-9-Bindungsstellen im Euchromatin korrespondieren (Greil et al., 2003) und demonstrieren, daß SU(VAR)3-9^{ptn} selbst in euchromatischen Bereichen die Ausbreitung repressiver Strukturen vermitteln kann. In der Tat ist dieses hyperaktive Allel in der Lage, die Repression euchromatischer *mini-white*-Insertionen zu realisieren (Kuhfittig et al., 2001), wogegen eine zusätzliche Kopie von SU(VAR)3-9 dazu nicht befähigt ist (Reuter, persönliche Mitteilung).

Nahezu alle bisher identifizierten PEV-Modifikatoren repräsentieren loss-of-

function-Allele. Amorphe *Su(var)*-Mutanten führen aufgrund der Entfernung einer bzw. mehrerer Faktoren innerhalb des Heterochromatins zu reduziertem Gen-silencing. *Su(var)3-9^{ptn}* vertritt demgegenüber den ersten gain-of-function-Enhancer für Positionseffekt-Variegation.

Verschiedene unabhängige Analysen des Polycomb-Gruppenproteins E(Z) in Säugern bzw. *Drosophila melanogaster* zeigten eine HMTase-Aktivität dieses Proteins für Lysin H3-K27 (Müller et al., 2002) bzw. H3-K27 und H3-K9 (Czermin et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002). Polycomb-Gruppenproteine spielen eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Reprimierung der homöotischen Gene während der Entwicklung. Mit Hilfe von ChIP-Analysen war es möglich, E(Z)/Ezh2-abhängige H3-K27-Methylierung in bestimmten Bereichen der homöotischen Gene nachzuweisen (Cao et al., 2002; Kirmizis et al., 2004), was eine Verbindung zwischen H3-K27-Methylierung und PcG-vermittelten Gen-silencing aufzeigt.

Bemerkenswerterweise vermittelt E(Z) alle drei H3-K27-Methylierungsstadien in *Drosophila melanogaster*, da in *E(z)* Null-Mutanten keinerlei H3-K27-Methylierung, weder anhand massenspektrometrischer, noch mittels immunzytologischer Analysen nachweisbar ist. Eine signifikante Änderung der H3-K9-Methylierungsstadien konnte demgegenüber nicht beobachtet werden, was dafür spricht, daß H3-K9 *in vivo* kein Ziel von E(Z) darstellt. *E(z)*-Mutanten weisen einen, wenngleich schwachen, dominanten Suppressoreffekt auf PEV auf, wogegen die Überexpression dieser HMTase einen Triplo-Enhancereffekt zeigt, demnach zu verstärktem Gen-silencing führt (Laible et al., 1997). Diese Analysen implizieren, daß die H3-K27-Methylierung neben der H3-K9 di-Methylierung ebenfalls eine Rolle im Aufbau reprimierender Chromatinstrukturen innerhalb des perizentrischen Heterochromatins spielt. Bisher ist jedoch unklar, welche der drei H3-K27-Methylierungsstadien für die repressive "Markierung" des Heterochromatins in *Drosophila melanogaster* verantwortlich sein könnten. Perizentrisches Heterochromatin in Säugern liegt beispielsweise ausschließlich monomethyliert an der H3-K27-Position vor (Peters et al., 2003). Neueste Untersuchungen in humanen Zellen ergaben demgegenüber, daß das humane homologe Protein von E(Z), Ezh2, in mindestens drei verschiedenen Multiproteinkomplexen (PRC2, 3 und 4) vorhanden ist, die unterschiedliche HMTase-Aktivitäten bezüglich spezifischer Histon-Lysine aufweisen (Kuzmichev et al., 2004, 2005). Abhängig davon, welche der vier Eed-Isoformen in den unterschiedlichen PRC-Komplexen inkorporiert sind, wird die Substratspezifität von Ezh2 moduliert, was zur spezifischen Methylierung von H3-K27 oder H1-K26 führt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, daß SirT1, das humane Homologe von dSir2, spezifisch mit Su(z)12, einer weite-

ren Komponente der PRC-Komplexe, interagiert und *in vivo* H1-K26 deacetyliert (Kuzmichev et al., 2005), was die Voraussetzung für eine Methylierung dieser Stelle darstellt. Interessanterweise weisen sowohl dSir2 als auch Su(z)12 ebenfalls einen Suppressoreffekt auf PEV auf (Rosenberg und Parkhurst, 2002; Birve et al., 2001), wonach gleichermaßen die Ezh2-abhängige H1-K26-Methylierung neben der H3-K27-Methylierung im Aufbau repressiver Strukturen eine wichtige Rolle spielen könnte.

4.2 Kontrolle der Organisation heterochromatischer Chromatinzustände durch *Su(var)3-9*-abhängige H3-K9-Methylierung

Die Integrität des zentromerischen Heterochromatins spielt eine kritische Rolle im Ablauf verschiedener Kernprozesse, beispielsweise in der Genauigkeit der Chromosomensegregation während der Mitose und Meiose (Karpen und Allshire, 1997). Die Segregation der Schwestern-Chromatiden während der Mitose ist von der Assemblierung großer Multi-Protein-Komplexe an den Zentromeren abhängig. Die bipolare Anheftung der Schwestern-Kinetochoren an die Microtubuli der Spindel sichert eine erfolgreiche Chromosomensegregation. Verschiedene Beobachtungen legen eine Funktion des Heterochromatins in der Aufrechterhaltung der Kohäsion zwischen Schwester-Chromatiden nahe (Wines und Henikoff, 1992; Karpen et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte SU(VAR)3-9 als bedeutender Chromatin-Regulator in der *Drosophila*-Entwicklung bestimmt werden. Darüberhinaus legen die erhaltenen Daten nahe, daß die *Su(var)3-9*-abhängige H3-K9-Methylierung des perizentrischen Heterochromatins erforderlich ist, um die Genom-Stabilität während der frühen Embryonalentwicklung zu wahren.

Embryonen von *Su(var)3-9* Null-Mutanten weisen eine massiv reduzierte Lebensfähigkeit auf, die aus Defekten in der Chromosomensegregation während der frühen, syncytialen Kernteilungen resultieren. Diese Defekte während der Kernteilung äußern sich in der Ausbildung von Chromosomenbrücken, "lagging chromosomes" und den Verlust von Chromatin, was als helle Spots mittels DNA-Färbung nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise treten die beobachteten Phänotypen größtenteils während der schnell erfolgenden, syncytialen Kernteilungen auf, was einen wichtigen Bedarf der *Su(var)3-9*-Funktion in der frühen Embryonalentwicklung nahelegt. Untersuchungen von Metaphase-Chromosomen

larvaler Gehirne von *Su(var)3-9* Null-Mutanten zeigten demgegenüber keinerlei Veränderung der Chromosomenmorphologie (Daten nicht gezeigt), im Gegensatz zu *Su(var)2-5*-Mutanten, in welchen Telomerfusionen der Metaphasechromosomen beobachtet wurden (Fanti et al., 1998). Tatsächlich sind in Kernextrakten 0-2 h alter Embryonen die höchsten SU(VAR)3-9-Level nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis des Proteins in allen Zyklen des Syncytiums bekundet SU(VAR)3-9 als ein maternales Protein, da die früheste zygotische Expression in Embryonen nicht vor Zyklus 10 des Syncytiums nachweisbar ist (Edgar und Schubiger, 1986). Die Bereitstellung dieses maternalen Genproduktes ist offenbar von Wichtigkeit für eine korrekte Embryonalentwicklung, da paternal eingebrachte *Su(var)3-9* Null-Mutanten keine reduzierte Lebensfähigkeit der Embryonen aufweisen bzw. die observierte, massiv eingeschränkte Lebensfähigkeit der Embryonen maternal eingebrachter *Su(var)3-9* Null-Mutanten nicht durch eine paternale Wildtypkopie von *Su(var)3-9* gerettet werden kann. Wie bereits unter Verwendung larvaler Gewebe beschrieben (Schotta et al. (2002) und vorliegende Arbeit), stellt SU(VAR)3-9 auch in Embryonen die hauptsächliche, wenn gleich nicht alleinige H3-K9-spezifische HMTase dar. Westernblotanalysen embryonaler Kernextrakte (0-4 h) zeigen eine dramatische Reduktion der H3-K9 di-Methylierung in *Su(var)3-9* Null-Mutanten. H3-K9 tri-Methylierung, die in Embryonen nur sehr schwach nachweisbar ist, unterliegt in *Su(var)3-9* Null-Mutanten ebenfalls einer signifikanten Verminderung, währenddessen H3K9 mono-Methylierung unbeeinflusst erscheint (Daten nicht gezeigt). Daß in der reduzierten H3-K9-Methylierung die Ursache für die observierten Segregationsdefekte zu suchen ist, untermauert die Tatsache, daß hypomorphe *Su(var)3-9*-Mutanten, die in der Lage sind, noch etwas *in vivo* H3-K9 di- und tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin zu vermitteln, keine reduzierte embryonale Lebensfähigkeit aufweisen. Analysen *Suv39h*-defizienter Mäuse ergeben eine gleichermaßen gestörte Chromosomensegregation (Peters et al., 2001), was vermuten läßt, daß die *Su(var)3-9*-abhängige H3-K9 Methylierung eine wichtige, evolutionär konservierte Markierung für die Aufrechterhaltung der höhergeordneten Chromatinstruktur des perizentrischen Heterochromatins darstellt, welche erforderlich ist, um die Genom-Stabilität zu bewahren.

Der Verlust der HMTase-Funktion von SU(VAR)3-9 bewirkt offenbar eine beeinträchtigte Organisation des Heterochromatins, welche Defekte bezüglich der Chromosomensegregation verursacht. *Su(var)3-9* Null-Embryonen und Speicheldrüsen von *Su(var)3-9* Null-Larven zeigen eine erhöhte H3-S10 Phosphorylierung sowie H3-K14 Acetylierung. Veränderte Phosphorylierungs- bzw. Acetylierungsmuster innerhalb des perizentrischen Heterochromatins führen zu Misse-

gregation der Chromsomen in verschiedenen Organismen (Ekwall et al., 1997; Hsu et al., 2000; Taddei et al., 2001). Eine Deletion von mSds3, einer Komponente des mSin3/HDAC Corepressor-Komplexes, weist ebenfalls Hyperacetylierung und Verlust der H3-K9-Methylierung innerhalb des perizentrischen Heterochromatin auf, was gleichermaßen in Segregationsdefekte resultiert (David et al., 2003). Ferner ist in *Su(var)3-9* Null-Mutanten die Assoziation von HP1 im perizentrischen Heterochromatin aufgrund der reduzierten H3-K9-Methylierung größtenteils aufgehoben (Schotta et al., 2002). Interessanterweise ist Swi6, das HP1-Homologe in *Schizosaccharomyces pombe* für die Assoziation von Cohesin mit zentromerischem Heterochromatin erforderlich (Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002). Aufgrunddessen ist es vorstellbar, daß Mutationen in HP1 zu Defekten in der Chromosomensegregation infolge einer gestörten Lokalisierung der Cohesine am Zentromer führen. In der Tat konnten in HP1-Mutanten in *Schizosaccharomyces pombe* (Ekwall et al., 1995; Allshire et al., 1995) bzw. *Drosophila* (Kellum und Alberts, 1995) ebendiese Phänotypen beobachtet werden. Gleichermaßen zeigen Mutationen in den Cohesinen *psc3* und *rad21* in *Schizosaccharomyces pombe* eine fehlerhafte Segregation der Chromosomen (Nonaka et al., 2002). Ob in *Su(var)3-9* Null-Embryonen, aufgrund der beschränkten Rekrutierung Heterochromatin-assoziiierter Proteine wie beispielsweise HP1, auch mögliche Interaktionen mit Cohesin-Komplexen gestört sind, ist noch unklar.

SU(VAR)3-9 ist ebenfalls in Nähr- und Follikelzellen von Ovarien nachweisbar. Zudem sind in *Su(var)3-9* Null-Mutanten Defekte innerhalb einzelner Eikammern zu verzeichnen, was eine Funktion von SU(VAR)3-9 auch während der Oogenese nahelegt. Überraschenderweise ist die H3-K9 di-Methylierung in Nährzellen und im Oozytenzellkern von *Su(var)3-9* Null-Mutanten nicht signifikant verändert. H3-K9 tri-Methylierung konnte in Wildtyp-Ovarien nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt), demgegenüber zeigt sich die H3-K9 mono-Methylierung in diesem Gewebe in *Su(var)3-9* Null-Mutanten ebenfalls unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund weist auf die Existenz anderer wesentlicher H3-K9-spezifischer HMTasen während der Oogenese hin. Interessanterweise zeigt der Oozytenzellkern nicht ausschließlich eine starke H3-K9 di-Methylierung, sondern weist darüberhinaus eine weitaus intensivere H3-K27 tri-Methylierung auf, währenddessen H3-K27 di- bzw. mono-Methylierung im Oozytenzellkern nicht nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt). Diese Histon-Modifizierungen unterliegen in *Su(var)3-9* Null-Mutanten ebenfalls keiner Veränderung (Daten nicht gezeigt). Jedoch scheint E(Z) eine bedeutende Funktion während der Oogenese auszuüben, die aufgrund der Lethalität nur schwer untersucht werden kann.

4.3 Kombinatorisches Muster der H3-K9- und H4-K20-Methylierung für konstitutives Heterochromatin

Die "Histon-Code" Hypothese besagt, daß Histon-Modifikationen, bzw. spezifische Kombinationen dieser, einen Anteil an der Etablierung bestimmter chromosomaler Strukturen innehaben (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001). In den N-terminalen Enden der Histone werden den methylierbaren Lysinen der H3-K9-, H3-K27- und H4-K20-Positionen reprimierende Auswirkungen auf den Chromosomenstatus zugeschrieben (Rea et al., 2000; Müller et al., 2002; Nishioka et al., 2002b). Dosis-Kompensation in Säugern beispielsweise, ausgeführt durch die transkriptionelle Stilllegung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen, ist ein vielschichtiger Prozeß, der die Auswahl des aktiven X-Chromosoms sowie die Initialisierung bzw. Aufrechterhaltung des inaktiven X-Chromosoms (X_i) innerhalb nachfolgender Zellteilungen gewährleistet (Avner und Heard, 2001). Das X_i ist durch eine Reihe epigenetischer Markierungen charakterisiert, welche H4 Hypoacetylierung, Anreicherung mit der Histon-Variante macroH2A, DNA-Methylierung sowie H3-K9 di-, H3-27 tri- und H4-K20 mono-Methylierung beinhalten (Silva et al., 2003; Plath et al., 2003; Kohlmaier et al., 2004). Der Beitrag der H4-K20 Methylierungsstadien an der Etablierung reprimierender Chromatinzustände war jedoch bislang unklar. Bisherige Analysen ergaben eine PR-Set7-abhängige, erhöhte H4-K20-Methylierung während der Mitose (Rice et al., 2002; Julien und Herr, 2004). Mit Hilfe spezifischer Antikörper, die zwischen H4-K20 mono-, di- und tri-Methylierung diskriminieren können, war es möglich, H4-K20 tri-Methylierung in Säugern und *Drosophila* als weitere repressive Histon-Lysin-Modifizierung im perizentrischen Heterochromatin zu determinieren (Schotta et al., 2004). Anhand dieser Daten ergibt sich folgendes Modell, was eine evolutionär konservierte, nacheinanderschaltete Induktion der H3-K9- und H4-K20-Methylierung im konstitutiven Heterochromatin postuliert (Abb.4.1). Zunächst muß SU(VAR)3-9 an das perizentrische Heterochromatin rekrutiert werden, ein Prozess, in dem sowohl der N-Terminus als auch die Chromo-Domäne von SU(VAR)3-9 involviert sind (Schotta et al., 2002). Möglicherweise sind an der Rekrutierung Komponenten der RNAi-Maschinerie beteiligt, da Mutationen in Komponenten des RNAi-Systems in einer Delokalisierung von HP1 und dramatischer Reduktion der H3-K9 di- und tri-Methylierung resultieren (Leibovitch et al., 2004). Bevor SU(VAR)3-9 die H3-K9-Position methylieren kann, muß diese Stelle deacetyliert vorliegen. In der Tat interagiert

SU(VAR)3-9 mit der Histon-Deacetylase HDAC1 (Czermin et al., 2001). *HDAC1*-Allele, deren Mutationen die katalytische Domäne beeinflussen, weisen einen starken Suppressoreffekt auf PEV auf (Mottus et al., 2000) und zeigen eine drastische Reduktion der H3-K9 di-Methylierung innerhalb des perizentrischen Heterochromatins (Daten nicht gezeigt). HP1 interagiert ebenfalls mit SU(VAR)3-9, bindet an H3-K9 di- und tri-methylierte Nucleosomen (Lachner et al., 2001; Jacobs und Khorasanizadeh, 2002) und rekrutiert SUV4-20, welches daraufhin H4-K20 tri-methylieren kann. Ob die ebenfalls im perizentrischen Heterochromatin nachweisbare, E(Z)-abhängige H3-K27-Methylierung einen zusätzlichen Faktor in der Etablierung der H4-K20 tri-Methylierung darstellt, muß in weiteren Untersuchungen gezeigt werden.

Die *P*-Element-Insertion *Suw4-20*^{BG00814}, welche eine dramatische Reduktion der H4-K20 tri-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin aufweist, erlaubt erste Einblicke in die Funktion dieser Histon-Markierung. Es konnte gezeigt werden, daß *Suw4-20* einen neuen dominanten Suppressor für PEV repräsentiert, was eine Funktion der H4-K20 tri-Methylierung in der Etablierung reprimierender Chromatinstrukturen nahelegt. Interessanterweise zeigt die hypomorphe *Suw4-20*-Mutante ebenfalls eine starke Reduktion der H4-K20 tri-Methylierung an zahlreichen euchromatischen Banden in polytänen Speicheldrüsenchromosomen, obwohl die Markierung dieser chromosomalen Bereiche in *Su(var)3-9* Null-Mutanten keiner signifikanten Veränderung unterliegt. Neue, detaillierte immunzytologische Analysen ergaben, daß HP1 spezifisch an ca. 200 euchromatischen Banden in Polytänchromosomen nachweisbar ist (Fanti et al., 2003). Nicht alle dieser Banden zeigen eine Kolo-kalisierung mit H3-K9-Methylierung (Cowell et al., 2002; Li et al., 2002), was für eine *Su(var)3-9*-unabhängige Assoziation von HP1 in bestimmten Bereichen des Euchromatins spricht. Tatsächlich verschwinden nach RNase-Behandlung die HP1-Immunsignale im Euchromatin von Polytänchromosomen, währenddessen das Protein eine unveränderte Assoziation mit dem Chromozentrum, dem 4. Chromosom und den Telomeren aufweist (Piacentini et al., 2003). Diese Daten legen eine RNA-abhängige Rekrutierung von HP1 im Euchromatin nahe. Demgegenüber konnte keine veränderte Chromatinbindung von SU(VAR)3-9 nach vergleichbarer RNase-Behandlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Rekrutierung von SUV4-20 durch die HP1-Isoformen HP1b und HP1c in bestimmten chromosomalen Domänen wäre auch denkbar, da das homologe Protein in Säugern, zumindest *in vitro* mit allen drei HP1-Isoformen interagieren kann (Schotta et al., 2004).

Die hypomorphe *Suw4-20*-Mutante ist, wie auch die *Su(var)3-9* Null-Mutanten, homozygot lebensfähig. Kombiniert man Mutanten beider Gene, führt das zu

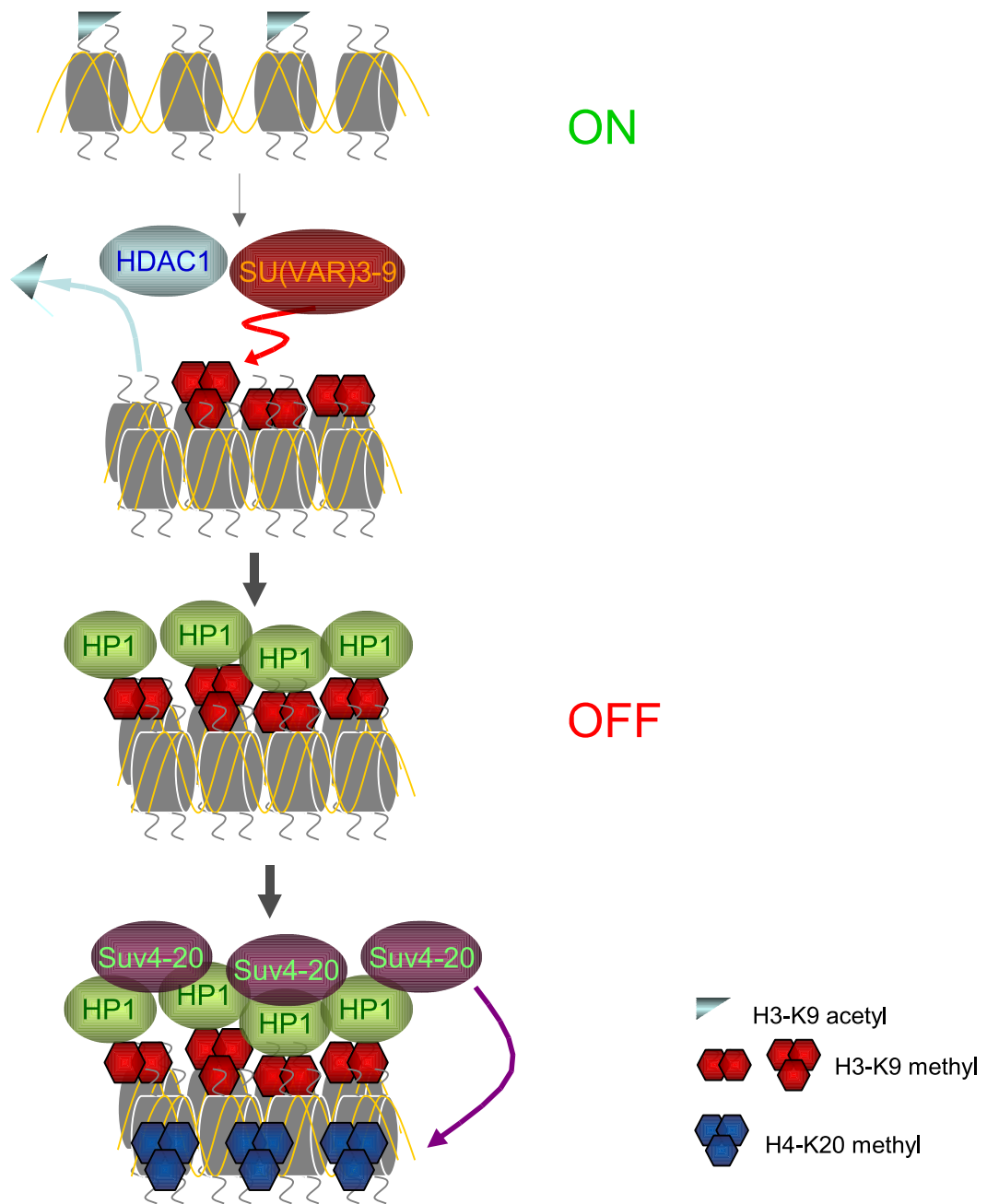


Abbildung 4.1: Modell zur evolutionär konservierten, nacheinandergeschalteten Induktion der H3-K9 und H4-K20 Methylierung im perizentrischen Heterochromatin. Sechsecke verdeutlichen Histon-Methylierung (H3-K9: rot; H4-K20: blau), Dreiecke repräsentieren H3-K9 Acetylierung. Siehe Text für weitere Erläuterungen.

synthetischer Letalität. Dieser wichtige Befund könnte bedeuten, daß die Kombination aus *Su(var)3-9*-abhängiger H3-K9 di- und tri-Methylierung sowie *Suv4-20*-abhängiger H4-K20 tri-Methylierung eine notwendige Markierung zur Aufrechterhaltung der Integrität des perizentrischen Heterochromatins darstellt. Demgegenüber impliziert der Nachweis der H4-K20 tri-Methylierung an zahlreichen euchromatischen Banden polytärer Speicheldrüsenchromosomen eine von *Su(var)3-9* unabhängige Funktion für *Suv4-20* im Euchromatin an. Weiterführende Analysen sind erforderlich, um diese Hypothese zu untermauern.

4.4 *JIL-1^{Su(var)3-1}* reguliert die Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin in *Drosophila melanogaster*

Die Kontrolle der höhergeordneten Chromatinstruktur ist von außergewöhnlicher Wichtigkeit für die epigenetische Genregulation und die funktionelle Differenzierung chromosomaler Domänen während der Entwicklung. Verschiedene unabhängige Mutantenscreens, durchgeführt in unserer Arbeitsgruppe, führten zur molekularen Identifizierung von *Su(var)3-1*. *Su(var)3-1* beschränkt die Ausbreitung heterochromatischer Strukturen und ist epistatisch über den starken Enhancereffekt zusätzlicher *Su(var)3-9*-Kopien in allen getesteten PEV-Modellsystemen. *Su(var)3-1*-Mutanten weisen C-terminale Verkürzungen der H3-S10-Kinase JIL-1 auf. Diese Stopmutationen befinden sich nach den Kinase-Domänen und haben keinen Einfluß auf deren Vermögen, das einzige bisher bekannte Target, H3-S10, zu phosphorylieren.

Bisher charakterisierte Suppressorgene kodieren hauptsächlich für Komponenten, die direkt in den Aufbau heterochromatischer Strukturen involviert sind. Demgegenüber stellt JIL-1 offenbar keine zentrale Komponente des Heterochromatins dar [Wang et al. (2001) und vorliegende Arbeit]. *JIL-1^{Su(var)3-1}* beeinflusst weder die globale Verteilung der bekannten repressiven Histon-Markierungen im perizentrischen Heterochromatin noch die Verteilung prominenter Heterochromatinproteine wie SU(VAR)3-9 und HP1. Gleichwohl weist *JIL-1^{Su(var)3-1}* den stärksten bisher bekannten Suppressoreffekt auf. Aus diesem Grund stellt *JIL-1^{Su(var)3-1}* einen neuen Typ von Suppressor-Mutanten dar. Im Gegensatz zu den "klassischen" *Su(var)s*, die für Faktoren kodieren, welche direkt in die Etablierung des Heterochromatins involviert sind, sollte dieser neue Typ von *Su(var)s* dem Aufbau heterochromatischer Strukturen entgegenwirken, indem er euchromati-

sche Chromatinzustände stabilisiert bzw. die Ausbreitung des Heterochromatins verhindert.

Die aufgezeigten Daten legen eine neue Funktion der JIL-1-Kinase nahe, die unabhängig von deren H3-S10-Kinase-Aktivität verläuft. Das Fehlen der C-terminalen Region könnte entweder die Phosphorylierung oder Interaktion mit einem bisher unbekanntem Protein unterbinden. Auch könnten spezifische Kontrollmechanismen innerhalb des C-Terminus die Phosphorylierung dieses Zielproteins regulieren. Als potentielle Zielproteine sind verschiedenartige Faktoren denkbar, die in die Etablierung heterochromatischer Strukturen verwickelt sind. Die prominente Dekondensierung des männlichen X-Chromosoms in polytären Speicheldrüsenchromosomen in *JIL-1^{Su(var)3-1}* ist ebenfalls in *iswi* und *nurf301*-Mutanten, beide Bestandteile des NURF-Komplexes, nachweisbar (Deuring et al., 2000; Badenhorst et al., 2002). Insbesondere *nurf301*-Mutanten weisen einen dominanten Suppressoreffekt auf, was eine wichtige Funktion von Chromatin-Remodelling-Komplexen für die Regulation höhergeordneter Chromatinstrukturen nahelegt. Desweiteren sind Heterochromatinproteine wie SU(VAR)3-9 und HP1 Phosphoproteine (Aagaard et al., 1999; Eissenberg et al., 1994), weshalb eine *JIL-1^{Su(var)3-1}*-abhängige Phosphorylierung dieser Proteine einen Einfluß auf deren Funktion innerhalb der Etablierung bzw. Ausbreitung heterochromatischer Strukturen ausüben könnte.

Basierend auf den vorliegenden Daten kann ein Modell für eine dynamische Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin vorgeschlagen werden (Abb. 4.2). In PEV-Rearrangements wird der Grenzbereich zwischen euchromatischen und heterochromatischen Domänen durch die antagonistischen Funktionen euchromatischer Regulatoren (beispielsweise JIL-1) und der HMTase SU(VAR)3-9, welche H3-K9 di-Methylierung, die prominenteste Markierung des Heterochromatins in *Drosophila*, vermittelt, determiniert (Abb. 4.2A). Die Grenze zwischen Euchromatin und Heterochromatin verläuft nicht statisch und ist abhängig von der Aktivität oder Menge bestimmter Komponenten des Heterochromatins wie beispielsweise des hyperaktiven SU(VAR)3-9^{ptn} (Abb. 4.2B) oder der Überexpression von *Su(var)3-9* (Abb. 4.2C). Im Einklang mit diesem Befund behindern amorphe Mutationen von *Su(var)3-9* den Aufbau von Heterochromatin und fördern auf diese Weise die Expansion des euchromatischen Zustandes. Demgegenüber zeigen hypomorphe Mutationen von *Su(var)3-9*, die immer noch über eine reduzierte HMTase-Aktivität verfügen, ein dieses enzymatischen Aktivität proportionales Vermögen zur Etablierung von Heterochromatin. In *JIL-1^{Su(var)3-1}*-Mutanten ist die Ausbreitung des Heterochromatins aufgrund momentan unbekannter Proteine, die potentielle Ziele der Kinase JIL-1^{Su(var)3-1} darstellen, selbst nach Überpres-

sion von SU(VAR)3-9, massiv eingeschränkt. Die beobachtete Einschränkung der Expansion des Heterochromatins erfolgt dabei entweder durch eine spezifische Blockierung der Ausbreitung heterochromatischer Strukturen oder aufgrund der gezielten Stabilisierung des euchromatischen Zustandes (Abb. 4.2D). Die Konsequenzen der massiven Blockierung der Heterochromatinisierung werden in der Kombination von *JIL-1^{Su(var)3-1}* mit *Su(var)3-9^{ptn}* deutlich, in welcher die verminderte Ausbreitung reprimierender Strukturen in einer Rettung der dominanten weiblichen Sterilität der *Su(var)3-9^{ptn}*-Mutante resultiert.

Jüngste Erkenntnisse legen einen weiteren Mechanismus zur Kontrolle der Histon-Methylierung nahe. Lange Zeit war es unklar, ob das Ausmaß der Histon-Lysin-Methylierung von Enzymen entgegengesetzter Aktivitäten determiniert werden kann. Die Identifizierung von LSD1, einer im Kern lokalisierten Amin-Oxidase, als Histon-Demethylase spezifisch für H3-K4 mono- und di-Methylierung, eröffnet einen Mechanismus zur dynamischen Regulation der Histon-Lysin-Methylierung durch HMTasen und Demethylasen (Shi et al., 2004). In der Tat weisen Analysen darauf hin, daß ein weiterer Suppressor der Positionseffekt-Variegation, *Su(var)3-3*, das *Drosophila*-Homologe von *LSD1* darstellt (Reuter, pers. Mitteilung), was darauf hinweist, daß *Su(var)3-3/LSD1* aufgrund seiner Demethylase-Aktivität Gensilencing vermittelt. Ebenso ist es theoretisch denkbar, daß die Demethylierung von Histonen durch Hydroxylierung der Methylgruppe erfolgt (Falnes et al., 2002; Trewick et al., 2002). Jumonji-Domänen-Proteine repräsentieren in dieser Hinsicht gute Kandidatenenzyme für eine mögliche Entfernung von Methylgruppen von Histonen durch diesen Hydroxylierungsmechanismus (Trewick et al., 2005). Das als Trithorax-Gruppenprotein identifizierte LID (Gildea et al., 2002), welches eine JmjC- und eine JmjN-Domäne beinhaltet, weist sowohl einen Haplo-Enhancer als auch einen Triplo-Suppressoreffekt auf *In(1)w^{m4}* auf (H. Baisch und G. Reuter, pers. Mitteilung), was darauf hindeutet, daß LID für die Integrität des Heterochromatins erforderlich ist. Tatsächlich ist die H3-K9 di-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin in einer Duplikation, die den *lid*-Locus einschließt, stark reduziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgeführten Mechanismen zur gezielten Entfernung von Histon-Methylgruppen eröffnen somit einen neuen, dynamisch kontrollierten Ansatz für die Etablierung verschiedener chromosomaler Domänen bzw. die komplexe Regulation von Genen.

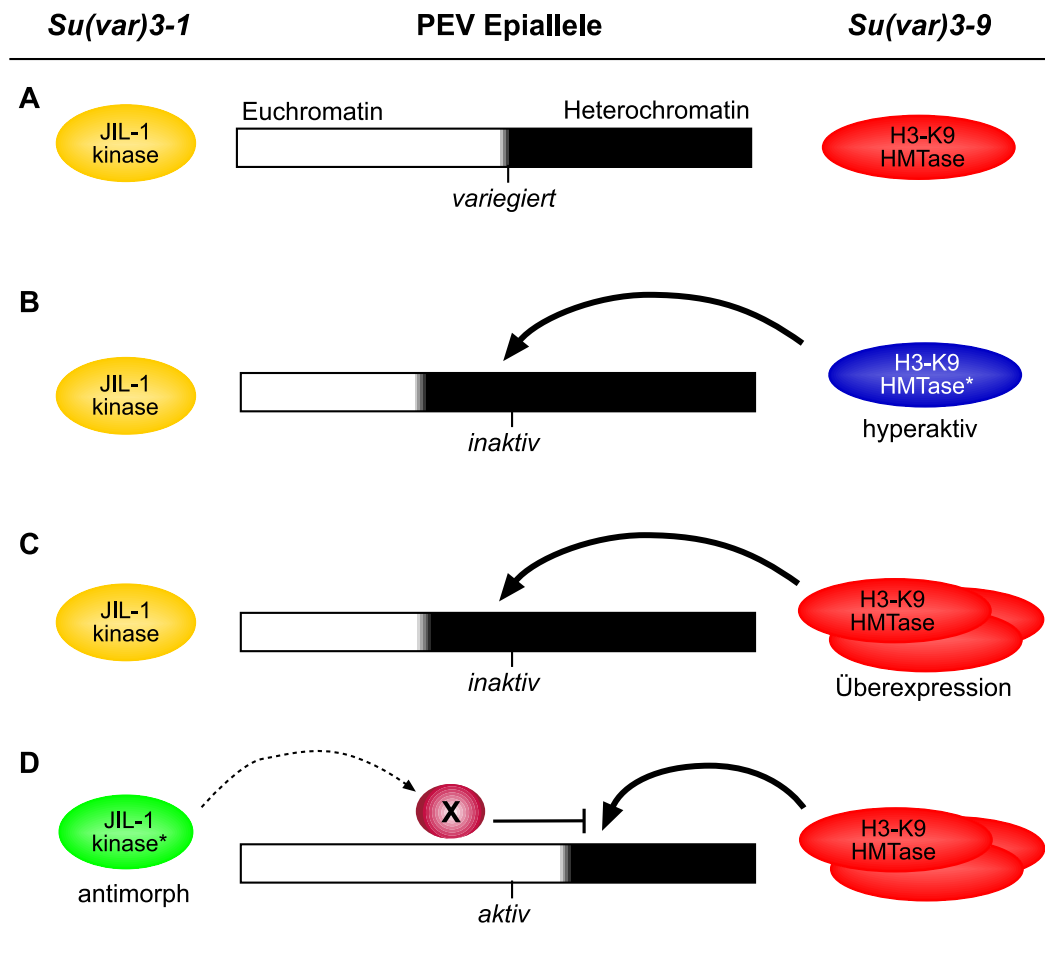


Abbildung 4.2: *Su(var)*-Gene regulieren die Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin. Die antagonistischen Funktionen von *JIL-1^{Su(var)3-1}* und *SU(VAR)3-9* etablieren die Grenze zwischen euchromatischen und heterochromatischen Domänen **(A)**. Die hypermorphe Mutation *SU(VAR)3-9^{ptn}* **(B)** bzw. die Überexpression von *Su(var)3-9* **(C)** führt zur Ausbreitung heterochromatischer Strukturen, währenddessen *JIL-1^{Su(var)3-1}* den euchromatischen Zustand durch Einwirkung auf einen unbekanntem Faktor X stabilisiert **(D)**. Siehe Text für detailliertere Ausführungen.

5 Zusammenfassung

Lysin-Methylierung an N-terminalen Enden von Histonen stellt eine wichtige epigenetische Markierung für die Determinierung bestimmter chromosomaler Domänen und die Regulation der Genexpression dar. In dieser Hinsicht konnte, aufgrund seiner H3-K9 Methyltransferaseaktivität, die Verantwortlichkeit von SU(VAR)3-9 für heterochromatisches Gensilencing demonstriert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das perizentrische Heterochromatin in *Drosophila melanogaster* mit H3-K9 mono-, di- und tri-Methylierung angereichert ist. SU(VAR)3-9 kontrolliert hauptsächlich H3-K9 di- und tri-Methylierung und hat kaum Einfluß auf H3-K9 mono-Methylierung, was andeutet, daß diese Modifizierung keine Markierung für Gensilencing darstellt. Demgegenüber werden alle H3-K27 Methylierungsstadien von E(Z) vermittelt. In *Su(var)2-5* Null-Mutanten ist in Übereinstimmung mit der ektopischen Verteilung von SU(VAR)3-9 die H3-K9 mono- und di-Methylierung im Euchromatin drastisch erhöht. Gleichwohl verbleibt die Verteilung der H3-K9-Methylierungsstadien innerhalb des perizentrischen Heterochromatins unverändert.

Genetische bzw. immunzytologische Analysen von 23 Punktmutanten demonstrieren, daß sich das Silencing-Potential von *Su(var)3-9* proportional zur dazugehörigen HMTase-Aktivität verhält. Die hypermorphe Punktmutante *Su(var)3-9^{ptn}* weist massiv erhöhte H3-K9 di- und tri-Methylierung sowohl im Euchromatin als auch im Heterochromatin bei gleichzeitig verstärktem Gensilencing auf.

Su(var)3-9-Mutanten zeigen schwerwiegende chromosomale Instabilitäten während der schnellen syncytialen Kernteilungen in frühen Embryonen, die mit dem Verlust der HMTase-Aktivität assoziiert sind.

SU(VAR)3-9-abhängige H3-K9-Methylierung ist die Voraussetzung für H4-K20 tri-Methylierung durch SUV4-20. Die Notwendigkeit von HP1 für die Etablierung der H4-K20 tri-Methylierung legt einen nacheinandergeschalteten Mechanismus für den Aufbau der H3-K9 und H4-K20-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin nahe. Der Befund, daß *Suv4-20* einen Suppressor auf PEV darstellt, untermauert die Funktion der H4-K20 tri-Methylierung als repressive Markierung chromosomaler Domänen.

Mutationen in einem neuen *Su(var)*-Gen, *Su(var)3-1*, schränken massiv *Su(var)*

3-9-vermitteltes Gensilencing ein. *Su(var)3-1*-Allele, die als antimorphe Mutationen der H3-S10 Kinase JIL-1 identifiziert werden konnten, behalten die H3-S10 Kinase-Aktivität und weisen keine globalen Veränderungen innerhalb repressiver bzw. aktivierender Histon-Modifizierungen auf. Gleichwohl demonstrieren Analysen mit sieben unterschiedlichen PEV-Rearrangements eine allgemeine Funktion von *JIL-1^{Su(var)3-1}* in der Blockierung der Ausbreitung heterochromatischer Strukturen. Diese Daten legen die Existenz einer dynamischen Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin nahe.

Die erhaltenen *in vivo*-Daten ordnen der perizentrischen H3-K9-Methylierung eine kritische Rolle im Schutz der Genomstabilität sowie der Etablierung und Aufrechterhaltung repressiver, heterochromatischer Chromatinzustände zu und determinieren SU(VAR)3-9 als einen wesentlichen epigenetischen Regulator während der *Drosophila*-Entwicklung.

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.
- AGALIOTI T, CHEN G UND THANOS D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, **111**(3):381–392, 2002.
- AKHTAR A UND BECKER PB. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell*, **5**(2):367–375, 2000.
- ALFAGEME CR, RUDKIN GT UND COHEN LH. Isolation, properties and cellular distribution of D1, a chromosomal protein of *Drosophila*. *Chromosoma*, **78**(1):1–31, 1980.
- ALLSHIRE RC, JAVERZAT JP, REDHEAD NJ UND CRANSTON G. Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell*, **76**(1):157–169, 1994.
- 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.
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, MILLER W UND LIPPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**:3389–3402, 1997.
- AULNER N, MONOD C, MANDICOURT G, JULLIEN D, CUVIER O, SALL A, JANSSEN S, LAEMMLI UK UND KÄS E. The AT-Hook Protein D1 Is Essential for *Drosophila melanogaster* Development and Is Implicated in Position-Effect Variegation. *Mol Cell Biol*, **22**(4):1218–1232, 2002.
- AVNER P UND HEARD E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, **2**(1):59–67, 2001.
- BADENHORST P, VOAS M, REBAY I UND WU C. Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev*, **16**(24):3186–3198, 2002.

- BADUGU R, SHAREEF MM UND KELLUM R. Novel *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations. *J Biol Chem*, **278**(36):34491–34498, 2003.
- BAKSA K, MORAVIETZ H, DOMBRADI V, AXTON M, TAUBERT H, SZABO G, TÖRÖK I, UD-VARDY A, GYURKOVICS H, SZÖÖR B, GLOVER D, REUTER G UND GAUSZ J. Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position-effect variegation and mitosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **135**:117–125, 1993.
- 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.
- BARBER CM, TURNER FB, WANG Y, HAGSTROM K, TAVERNA SD, MOLLAH S, UEBERHEIDE B, MEYER BJ, HUNT DF, CHEUNG P UND ALLIS CD. The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma*, **112**(7):360–371, 2004.
- BEISEL C, IMHOF A, GREENE J, KREMMER E UND SAUER F. Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*, **419**(6909):857–862, 2002.
- BERNARD P, MAURE JF, PARTRIDGE JF, GENIER S, JAVERZAT JP UND ALLSHIRE RC. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**(5551):2539–2542, 2001.
- 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.
- BIRD A UND WOLFFE AP. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**(5):451–454, 1999.
- 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.
- BLACKBURN EH. Telomeres: no end in sight. *Cell*, **77**(5):621–623, 1994.
- BLOWER MD, SULLIVAN BA UND KARPEN GH. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell*, **2**(3):319–330, 2002.
- 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.

- BYRD KN UND SHEARN A. ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc Natl*, **100**(20):11535–11540, 2003.
- CAO R, WANG L, WANG H, XIA L, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, JONES RS UND ZHANG Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, **298**(5595):1039–1043, 2002.
- CHEUNG P, TANNER KG, CHEUNG WL, SASSONE-CORSI P, DENU JM UND ALLIS CD. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, **5**(6):905–915, 2000.
- CLEARF 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.
- CLEARF 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.
- COWELL IG, AUCOTT R, MAHADEVAIAH SK, BURGOPYNE PS, HUSKISSON N, BONGIORNI S, PRANTERA G, FANTI L, PIMPINELLI S, WU R, GILBERT DM, SHI W, FUNDELE R, MORRISON H, JEPPESEN P UND SINGH PB. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma*, **111**(1):22–36, 2002.
- CREMER T, KUPPER K, DIETZEL S UND FAKAN S. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell*, **96**(8):555–567, 2004.
- CRYDERMAN DE, MORRIS EJ, BIESSMANN H, ELGIN SC UND WALLRATH LL. Silencing at Drosophila telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles. *EMBO J*, **18**(13):3724–3735, 1999.
- CZERMIN B, MELFI R, MCCABE D, SEITZ V, IMHOF A UND PIRROTTA V. Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites. *Cell*, **111**(2):185–196, 2002.
- 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.
- DAVID G, TURNER GM, YAO Y, PROTOPOPOV A UND DEPINHO RA. mSin3-associated protein, mSds3, is essential for pericentric heterochromatin formation and chromosome segregation in mammalian cells. *Genes Dev*, **17**(19):2396–2405, 2003.
- DELANGE RJ, HOOPER JA UND SMITH EL. Histone 3. 3. Sequence studies on the cyanogen bromide peptides; complete amino acid sequence of calf thymus histone 3. *J Biol Chem*, **248**(9):3261–3274, 1973.

- 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**:4253–4261, 2000.
- DEURING R, FANTI L, ARMSTRONG JA, SARTE M, PAPOULAS O, PRESTEL M, DAUBRESSE G, VERARDO M, MOSELEY SL, BERLOCO M, TSUKIYAMA T, WU C, PIMPINELLI S UND TAMKUN JW. The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell*, **5**(2):355–365, 2000.
- DIMITRI P UND JUNAKOVIC N. Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet*, **15**(4):123–124, 1999.
- DODGE JE, KANG YK, BEPPU H, LEI H UND LI E. Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Mol Cell Biol*, **24**(6):2478–2486, 2004.
- DORER DR UND HENIKOFF S. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell*, **77**(7):993–1002, 1994.
- 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, 1993a.
- DORN R, SZIDONYA J, KORGE G, SEHNERT M, TAUBERT H, ARCHOUKIEH E, TSCHIERSCH B, MORAWIETZ H, WUSTMANN G, HOFMANN G UND REUTER G. P Transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **133**:279–290, 1993b.
- EBERL DF, LORENZ LJ, MELNICK MB, SOOD V, LASKO P UND PERRIMON N. A new enhancer of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* encodes a putative RNA helicase that binds chromosomes and is regulated by the cell cycle. *Genetics*, **146**(3):951–963, 1997.
- EBERT A, SCHOTTA G, LEIN S, KUBICEK S, KRAUSS V, JENUWEIN T UND REUTER G. Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev*, **18**(23):2973–2983, 2004.
- EDGAR B UND SCHUBIGER G. Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. *Cell*, **44**:871–877, 1986.
- 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.
- EISSENBERG JC, GE YW UND HARTNETT T. Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem*, **269**(33):21315–21321, 1994.
- EKWALL K, JAVERZAT JP, LORENTZ A, SCHMIDT H, CRANSTON G UND ALLSHIRE R. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science*, **269**(5229):1429–1431, 1995.
- EKWALL K, NIMMO ER, JAVERZAT JP, BORGSTRØM B, EGEL R, CRANSTON G UND ALLSHIRE R. Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function. *J Cell Sci*, **109**:2637–2648, 1996.
- EKWALL K, OLSSON T, TURNER BM, CRANSTON G UND ALLSHIRE RC. Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell*, **91**(7):1021–1032, 1997.
- ESKELAND R, CZERMIN B, BOEKE J, BONALDI T, REGULA JT UND IMHOF A. The N-Terminus of *Drosophila* SU(VAR)3-9 Mediates Dimerization and Regulates Its Methyltransferase Activity. *Biochemistry*, **43**(12):3740–3749, 2004.
- EZHKOVA E UND TANSEY WP. Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell*, **13**(3):435–442, 2004.
- FALNES PO, JOHANSEN RF UND SEEBERG E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, **419**(6903):178–182, 2002.
- FANG J, FENG Q, KETEL CS, WANG H, CAO R, XIA L, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, SIMON JA UND ZHANG Y. Purification and Functional Characterization of SET8, a Nucleosomal Histone H4-Lysine 20-Specific Methyltransferase. *Curr Biol*, **12**(13):1086–1099, 2002.
- FANTI L, BERLOCO M, PIACENTINI L UND PIMPINELLI S. Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica*, **117**(2-3):135–147, 2003.
- 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.

- FESTENSTEIN R, TOLAINI M, CORBELLA P, MAMALAKI C, PARRINGTON J, FOX M, MILIOU A, JONES M UND KIOUSSIS D. Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science*, **271**(5252):1123–1125, 1996.
- FISCHLE W, WANG Y, JACOBS SA, KIM Y, ALLIS CD UND KHORASANIZADEH S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*, **17**(15):1870–1881, 2003.
- FLYBASE. The Drosophila genetic database. <http://flybase.bio.indiana.edu>, 2002.
- FOE VE UND ALBERTS BM. Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci*, **61**:31–70, 1983.
- FYODOROV DV, BLOWER MD, KARPEN GH UND KADONAGA JT. Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev*, **18**(2):170–183, 2004.
- GATTI M UND PIMPINELLI S. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu Rev Genet*, **26**:239–275, 1992.
- GILDEA JJ, LOPEZ R UND SHEARN A. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics*, **156**(2):645–663, 2002.
- GLOOR G UND ENGELS W. Single-Fly DNA Preps for PCR. *DIS*, **71**:148–149, 1992.
- GREIL F, VAN DER KRAAN I, DELROW J, SMOTHERS JF, DE WIT E, BUSSEMAKER HJ, VAN DRIEL R, HENIKOFF S UND VAN STEENSEL B. Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes Dev*, **17**(22):2825–2838, 2003.
- GREWAL SI UND KLAR AJ. A recombinationally repressed region between mat2 and mat3 loci shares homology to centromeric repeats and regulates directionality of mating-type switching in fission yeast. *Genetics*, **146**(4):1221–1238, 1997.
- GRIENENBERGER A, MIOTTO B, SAGNIER T, CAVALLI G, SCHRAMKE V, GELI V, MARIOL MC, BERENGER H, GRABA Y UND PRADEL J. The MYST domain acetyltransferase Chameau functions in epigenetic mechanisms of transcriptional repression. *Curr Biol*, **12**(9):762–766, 2002.
- GRUNSTEIN M. Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, **9**(3):383–387, 1997.
- 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.

- HARTMANN-GOLDSTEIN IJ. On the relationship between heterochromatization and variegation in *Drosophila*, with special reference to temperature-sensitive periods. *Genet Res*, **10**(2):143–159, 1967.
- 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. *Jb wiss Bot*, **69**:762–818, 1928.
- HENCHOZ S, RUBERTIS FD, PAULI D UND SPIERER P. The dose of a putative ubiquitin-specific protease affects position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **16**(10):5717–5725, 1996.
- HENDERSON DS, BANGA SS, GRIGLIATTI TA UND BOYD JB. Mutagen sensitivity and suppression of position-effect variegation result from mutations in *mus209*, the *Drosophila* gene encoding PCNA. *EMBO J*, **13**:1450–1459, 1994.
- HENIKOFF S, AHMAD K, PLATERO JS UND VAN STEENSEL B. Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci*, **97**(2):716–721, 2000.
- HENIKOFF S UND MATZKE MA. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet*, **13**:293–295, 1997.
- HILFIKER A, HILFIKER-KLEINER D, PANNUTI A UND LUCCHESI JC. *mof*, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *EMBO J*, **16**(8):2054–2060, 1997.
- HIRAOKA Y, AGARD DA UND SEDAT JW. Temporal and spatial coordination of chromosome movement, spindle formation, and nuclear envelope breakdown during prometaphase in *Drosophila melanogaster* embryos. *J Cell Biol*, **111**:2815–2828, 1990.
- HSU JY, SUN ZW, LI X, REUBEN M, TATCHELL K, BISHOP DK, GRUSHCOW JM, BRAME CJ, CALDWELL JA, HUNT DF, LIN R, SMITH MM UND ALLIS CD. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**(3):279–291, 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.
- IVANOVA AV, BONADUCE MJ, IVANOV SV UND KLAR AJS. The chromo and SET domains of the Clr4 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.
- JAQUET Y, DELATTRE M, SPIERER A UND SPIERER P. Functional dissection of the *Drosophila* modifier of variegation Su(var)3-7. *Development*, **129**(17):3975–3982, 2002.
- 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.
- JIN Y, WANG Y, WALKER DL, DONG H, CONLEY C, JOHANSEN J UND JOHANSEN KM. JIL-1: a novel chromosomal tandem kinase implicated in transcriptional regulation in *Drosophila*. *Mol Cell*, **4**(1):129–135, 1999.
- JUDD BH. Mutations of *zeste* that mediate transvection are recessive enhancers of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **141**:245–253, 1995.
- JULIEN E UND HERR W. A Switch in Mitotic Histone H4 Lysine 20 Methylation Status Is Linked to M Phase Defects upon Loss of HCF-1. *Mol Cell*, **14**:713–725, 2004.
- KARACHENTSEV D, SARMA K, REINBERG D UND STEWARD R. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev*, **19**(4):431–435, 2005.
- KARPEN GH UND ALLSHIRE RC. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet*, **13**(12):489–496, 1997.
- KARPEN GH, LE MH UND LE H. Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmatic disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science*, **273**(5271):118–122, 1996.
- KEGEL A. *Produktion und Analyse polyklonaler Antikörper für das SU(VAR)3-9-Heterochromatinprotein von Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1999.
- KELLUM R UND ALBERTS BM. Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*, **108**:1419–1431, 1995.

- KELLUM R, RAFF JW UND ALBERTS BM. Heterochromatin protein 1 distribution during development and during the cell cycle in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*, **108**:1407–1418, 1995.
- KIRMIZIS A, BARTLEY SM, KUZMICHEV A, MARGUERON R, REINBERG D, GREEN R UND FARNHAM PJ. Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev*, **18**(13):1592–1605, 2004.
- KOHLMAIER A, SAVARESE F, LACHNER M, MARTENS J, JENUWEIN T UND WUTZ A. Kinetics of histone methylation triggered by Xist reveals an epigenetic memory independent of silencing. *PLOS*, 2004.
- 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 Positionseffekt-Variegation 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.
- KUZMICHEV A, JENUWEIN T, TEMPST P UND REINBERG D. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell*, **14**(2):183–193, 2004.
- KUZMICHEV A, MARGUERON R, VAQUERO A, PREISSNER TS, SCHER M, KIRMIZIS A, OUYANG X, BROCKDORFF N, ABATE-SHEN C, FARNHAM P UND REINBERG D. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci*, **102**(6):1859–1864, 2005.
- KUZMICHEV A, NISHIOKA K, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P UND REINBERG D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev*, **16**(22):2893–2905, 2002.
- 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.

- LAIBLE G, WOLF A, DORN R, REUTER G, NISLOW C, LEBERSORGER A, POPKIN D, PILLUS L UND JENUWEIN T. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J*, **16**(11):3219–3232, 1997.
- LAJEUNESSE D UND SHEARN A. E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene. *Development*, **122**(7):2189–2197, 1996.
- LAURENT AM, PUECHBERTY J, PRADES C, GIMENEZ S UND ROIZES G. Site-specific retrotransposition of L1 elements within human alphoid satellite sequences. *Genomics*, **15**:127–132, 1997.
- LE MH, DURICKA D UND KARPEN GH. Islands of complex DNA are widespread in *Drosophila* centric heterochromatin. *Genetics*, **141**(1):282–303, 1995.
- LECHNER MS, SCHULTZ DC, NEGOREV D, MAUL GG UND 3RD FJR. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**(4):929–937, 2005.
- LEHNERTZ B, UEDA Y, DERIJCK AA, BRAUNSCHWEIG U, PEREZ-BURGOS L, KUBICEK S, CHEN T, LI E, JENUWEIN T UND PETERS AH. Suv39h-mediated histone h3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*, **13**(14):1192–1200, 2003.
- LEIBOVITCH MPBBA, GANDHI SG, RAO M, BHADRA U, BIRCHLER JA UND ELGIN SC. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, **303**(5658):669–672, 2004.
- LEIN S. *Molekulare Analyse von Kontrollfaktoren des heterochromatischen Gensilencings bei Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2003.
- LI Y, KIRSCHMANN DA UND WALLRATH LL. Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc Natl Acad Sci*, **99**:16462–16469, 2002.
- 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.
- LUGER K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*, **13**(2):127–135, 2003.
- LUGER K, MÄDER AW, RICHMOND RK, SARGENT DF UND RICHMOND TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**(6648):251–260, 1997.
- LUNDGREN. Transcription factor dosage affects changes in higher order chromatin structure associated with activation of a heterochromatic gene. *Cell*, **103**(5):733–743, 2000.
- MALIK HS UND HENIKOFF S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, **10**(11):882–891, 2003.
- MARTENS JH, O’SULLIVAN RJ, BRAUNSCHWEIG U, OPRAVIL S, RADOLF M, STEINLEIN P UND JENUWEIN T. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J*, **24**(4):800–812, 2005.
- MENEGHINI MD, WU M UND MADHANI HD. Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell*, **112**(5):725–736, 2003.
- 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.
- MÜLLER J, HART CM, FRANCIS NJ, VARGAS ML, SENGUPTA A, WILD B, MILLER EL, O’CONNOR MB, KINGSTON RE UND SIMON JA. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell*, **111**(2):197–208, 2002.
- 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.

- NEWMAN BL, LUNDBLAD JR, CHEN Y UND SMOLIK SM. A *Drosophila* homologue of sir2 modifies position-effect variegation but does not affect life span. *Genetics*, **162**(4):1675–1685, 2002.
- NIELSEN SJ, SCHNEIDER R, BAUER UM, BANNISTER AJ, MORRISON A, O'CARROLL D, FIRESTEIN R, CLEARY M, JENUWEIN T, HERRERA RE UND KOUZARIDES T. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **412**(6846):561–565, 2001.
- 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, 2002a.
- NISHIOKA K, RICE JC, SARMA K, ERDJUMENT-BROMAGE H, WERNER J, WANG Y, CHUIKOV S, VALENZUELA P, TEMPST P, STEWARD R, LIS JT, ALLIS CD UND REINBERG D. PR-Set7 Is a Nucleosome-Specific Methyltransferase that Modifies Lysine 20 of Histone H4 and Is Associated with Silent Chromatin. *Mol Cell*, **9**(6):1201–1213, 2002b.
- NOMA K, ALLIS CD UND GREWAL SI. Transitions in distinct histone h3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*, **293**(5532):1150–1155, 2001.
- NONAKA N, KITAJIMA T, YOKOBAYASHI S, XIAO G, YAMAMOTO M, GREWAL SI UND WATANABE Y. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, **4**(1):89–93, 2002.
- 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.
- OGAWA H, ISHIGURO K, GAUBATZ S, LIVINGSTON DM UND NAKATANI Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, **296**(5570):1132–1136, 2002.
- PAIK WK UND KIM S. Protein methylation. *Science*, **174**(5):114–119, 1971.
- 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.
- PARDUE ML. The ends and the middle: putting chromosomes together. *Curr Opin Genet Dev*, **4**(6):845–850, 1994.
- PARDUE ML UND HENNIG W. Heterochromatin: junk or collectors item? *Chromosoma*, **100**(1):3–7, 1990.

- PÉREZ-BURGOS L, PETERS AH, OPRAVIL S, KAUER M, MECHTLER K UND JENUWEIN T. Generation and characterization of methyl-lysine histone antibodies. *Methods Enzymol*, **376**:234–254, 2004.
- 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**:2753–2761, 1998.
- PETERS AH, KUBICEK S, MECHTLER K, O'SULLIVAN RJ, DERIJCK AA, PÉREZ-BURGOS L, KOHLMAIER A, OPRAVIL S, TACHIBANA M, SHINKAI Y, MARTENS JH UND JENUWEIN T. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*, **12**(6):1577–1589, 2003.
- 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.
- PIACENTINI L, FANTI L, BERLOCO M, PERRINI B UND PIMPINELLI S. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol*, **161**(4):707–714, 2003.
- 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.
- 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.
- PLATH K, FANG J, MLYNARCZYK-EVANS SK, CAO R, WORRINGER KA, WANG H, DE LA CRUZ CC, OTTE AP, PANNING B UND ZHANG Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, **300**(5616):131–135, 2003.
- 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, WERNER W UND HOFFMANN HJ. Mutants affecting position-effect heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **85**(4):539–551, 1982.
- 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.
- RICE JC, BRIGGS SD, UEBERHEIDE B, BARBER CM, SHABANOWITZ J, HUNT DF, SHINKAI Y UND ALLIS CD. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell*, **12**(6):1591–1598, 2003.
- RICE JC, NISHIOKA K, SARMA K, STEWARD R, REINBERG D UND ALLIS CD. Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev*, **16**(17):2225–2230, 2002.
- RICHARDS EJ UND ELGIN SC. Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing. Rounding up the Usual Suspects. *Cell*, **108**(4):489–500, 2002.
- RINGROSE L, EHRET H UND PARO R. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol Cell*, **16**(4):641–653, 2004.
- ROSENBERG MI UND PARKHURST SM. *Drosophila* Sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH repressors in segmentation and sex determination. *Cell*, **109**(4):447–458, 2002.
- ROUGEULLE C, CHAUMEIL J, SARMA K, ALLIS CD, REINBERG D, AVNER P UND HEARD E. Differential histone h3 lys-9 and lys-27 methylation profiles on the x chromosome. *Mol Cell Biol*, **24**(12):5475–5484, 2004.
- 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.

- RUDOLPH T, LU B, WESTPHAL T, SZIDONYA J, EISSENBERG JC UND REUTER G. New type of CyO and TM3 green balancers. *D I S*, **82**:99–100, 1999.
- RUHF ML, BRAUN A, PAPOULAS O, TAMKUN JW, RANDSHOLT N UND MEISTER M. The domino gene of *Drosophila* encodes novel members of the SWI/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. *Development*, **128**:1429–1441, 2001.
- SACHDEV S, BRUHN L, SIEBER H, PICHLER A, MELCHIOR F UND GROSSCHEDL R. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*, **15**(23):3088–3103, 2001.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF UND MANIATIS T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS-ROSA H, SCHNEIDER R, BANNISTER AJ, SHERRIFF J, BERNSTEIN BE, EMRE NC, SCHREIBER SL, MELLOR J UND KOUZARIDES T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**(6905):407–411, 2002.
- SARRAF SA UND STANCHEVA I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell*, **15**:595–605, 2004.
- SCHOTTA G. *Struktur-Funktionsanalyse von SU(VAR)3-9, einem integralen Bestandteil von heterochromatischen Proteinkomplexen*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002.
- SCHOTTA G, EBERT A, DORN R UND REUTER G. Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol*, **14**(1):67–75, 2003a.
- 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, EBERT A UND REUTER G. SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica*, **117**(2-3):149–158, 2003b.
- SCHOTTA G, LACHNER M, SARMA K, EBERT A, SENGUPTA R, REUTER G, REINBERG D UND JENUWEIN T. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, **18**(11):1251–1262, 2004.
- 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 DC, AYYANATHAN K, NEGOREV D, MAUL GG UND RAUSCHER FJ. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*, **16**(8):919–932, 2002.
- SCHULTZ J. Variegation in *Drosophila* and the inert heterochromatic regions. *Proc Nat Acad Sci U S A*, **22**:27–33, 1936.
- SCHULTZ J, MILPETZ F, BORK P UND PONTING CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signalling domains. *Proc Natl Acad Sci*, **95**:5857–5864, 1998.
- SEDGWICK SG UND SMERDON SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, **24**(8):311–316, 1999.
- 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, PAULI D, DELATTRE M, JAQUET Y, SPIERER A UND SPIERER P. Isolation of Su(var)3-7 Mutations by Homologous Recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **161**(3):1125–1136, 2002.
- 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.
- SHI Y, LAN F, MATSON C, MULLIGAN P, WHETSTINE JR, COLE PA, CASERO RA UND SHI Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**(7):941–953, 2004.
- SILVA J, MAK W, ZVETKOVA I, APPANAH R, NESTEROVA TB, WEBSTER Z, PETERS AH, JENUWEIN T, OTTE AP UND BROCKDORFF N. Establishment of histone h3 methylation on the inactive x chromosome requires transient recruitment of eed-enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell*, **4**(4):481–495, 2003.
- 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, CLEGG NJ, ANTONCHUK J, MILNE TA, STANKUNAS K, RUSE C, GRIGLIATTI TA, KASSIS JA UND BROCK HW. Enhancer of Polycomb is a suppressor of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **148**(1):211–220, 1998.
- 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 hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of hp1-like proteins. *Mol Cell Biol*, **21**(7):2555–2569, 2001.
- STRAHL BD UND ALLIS CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**(6765):41–45, 2000.
- SULLIVAN BA UND KARPEN GH. Centromeric Chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*, 2004.
- SUN FL, CUAYCONG MH UND ELGIN SC. Long-Range Nucleosome Ordering Is Associated with Gene Silencing in *Drosophila melanogaster* Pericentric Heterochromatin. *Mol Cell Biol*, **21**(8):2867–2879, 2001.
- 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.
- TACHIBANA M, SUGIMOTO K, NOZAKI M, UEDA J, OHTA T, OHKI M, FUKUDA M, TAKEDA N, NIIDA H, KATO H UND SHINKAI Y. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev*, **16**(14):1779–1791, 2002.
- 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.
- TAMARU H, ZHANG X, McMILLEN D, SINGH PB, NAKAYAMA J, GREWAL SI, ALLIS CD, CHENG X UND SELKER EU. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet*, **34**(1):75–79, 2003.
- TAMKUN JW, DEURING R, SCOTT MP, KISSINGER M, PATTATUCCI AM, KAUFMAN TC UND KENNISON JA. *brhma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*, **68**(3):561–572, 1992.
- TARTOF KD, HOBBS C UND JONES M. A structural basis for variegating position effects. *Cell*, **37**(3):869–878, 1984.

- THEURKAUF WE UND HAWLEY RS. Meiotic spindle assembly in *Drosophila* females: behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein. *J Cell Biol*, **116**(5):1167–1180, 1992.
- THIRU A, NIETLISPACH D, MOTT HR, OKUWAKI M, LYON D, NIELSEN PR, HIRSHBERG M, VERREAULT A, MURZINA NV UND LAUE ED. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J*, **23**(3):489–499, 2004.
- TREWICK S, HENSHAW TF, HAUSINGER RP, LINDAHL T UND SEDGWICK B. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, **419**(6903):174–180, 2002.
- TREWICK SC, MCLAUGHLIN PJ UND ALLSHIRE RC. Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep*, **6**(4):315–320, 2005.
- TSCHIERSCHE B. *Molekulargenetische Analyse des Su-var(3)9 Gens- ein dosisabhängiges Modifikatorgen für Positionseffekt-Variation bei Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle, 1993.
- TSCHIERSCHE 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.
- TURNER BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, **22**(9):836–845, 2000.
- TURNER BM. Cellular memory and the histone code. *Cell*, **111**(3):285–291, 2002.
- TURNER BM, BIRLEY AJ UND LAVENDER J. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell*, **69**(2):375–384, 1992.
- VAN HOLDE KE. *Chromatin*. New York: Springer Verlag, 1988.
- VOLPE TA, KIDNER C, HALL IM, TENG G, GREWAL SI UND MARTIENSSSEN RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**(5588):1833–1837, 2002.
- WAKIMOTO BT. Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell*, **93**(3):321–324, 1998.
- WALLRATH L. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Gen Dev*, **8**(2):147–153, 1998.

- WALLRATH LL UND ELGIN SCR. Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev*, **9**(10):1263–1277, 1995.
- WANG H, AN W, CAO R, XIA L, ERDJUMENT-BROMAGE H, CHATTON B, TEMPST P, ROEDER RG UND ZHANG Y. mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell*, **12**(2):475–487, 2003.
- WANG Y, ZHANG W, JIN Y, JOHANSEN J UND JOHANSEN KM. The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell*, **105**(4):433–443, 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.
- WOLFFE AP UND MATZKE MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science*, **286**:481–486, 1999.
- 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.
- XIN Z, TACHIBANA M, GUGGIARI M, HEARD E, SHINKAI Y UND WAGSTAFF J. Role of Histone Methyltransferase G9a in CpG Methylation of the Prader-Willi Syndrome Imprinting Center. *J Biol Chem*, **278**(17):14996–15000, 2003.
- 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.
- ZHANG Y, GRIFFIN K, MONDAL N UND PARVIN JD. Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. *J Biol Chem*, **279**(21):21866–21872, 2004.
- ZHAO T, HEYDUK T, ALLIS CD UND EISENBERG JC. Heterochromatin Protein 1 Binds to Nucleosomes and DNA in Vitro. *J Biol Chem*, **275**(36):28332–28338, 2000.
- ZHIMULEV IF. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation. *Adv Genet*, **37**:1–566, 1998.

Publikationsliste

EBERT A, SCHOTTA G, LEIN S, KUBICEK S, KRAUSS V, JENUWEIN T UND REUTER G. *Su(var)*-Genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev*, **18**(23):2973-2983, 2004.

SCHOTTA G, LACHNER M, SARMA K, EBERT A, SENGUPTA R, REUTER G, REINBERG D UND JENUWEIN T. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, **18**(11):1251-1262, 2004.

SCHOTTA G, EBERT A UND REUTER G. SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica*, **117**(2-3):149-158, 2003.

SCHOTTA G, EBERT A, DORN R UND REUTER G. Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Sem Cell Dev Biol*, **14**(1):67-75, 2003.

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 histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J*, **21**(5):1121-1131, 2002.

Danksagung

An dieser Stelle sei allen Personen und Gegebenheiten recht herzlich gedankt, die am Entstehen und Fortgang dieser Arbeit Anteil hatten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Reuter für die Vergabe der überaus fesselnden Thematik, die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung genetischer Arbeiten sowie für zahlreiche Ideen und Vorschläge, die an so mancher Stelle weitergeholfen haben. Überaus dankbar bin ich für seine Idee, Positionseffekt-Variegation für ein geeignetes Modellsystem zu halten, was sich schließlich mehr und mehr bewahrheitet.

Dr. T. Jenuwein möchte ich für die fruchtbare Kooperation unserer beider Arbeitsgruppen über viele Jahre danken, die auch zum Entstehen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat. Seiner Idee zugrundeliegend, Antikörper gegen mono-, di- und tri-methylierte Histone zu generieren, ist es möglich, dem Geheimnis der Chromatinregulation auf den Fersen zu bleiben. Für die kritische Auseinandersetzung mit unseren Manuskripten sei ihm ebenfalls herzlich gedankt.

Stefan Kubicek danke ich für zahlreiche massenspektrometrische Analysen.

Allen Shearn, Asifa Akhtar, Kristen M. Johansen, Joel Eissenberg, Robert L. Glaser und Stephen Henikoff danke ich für die Bereitstellung von Fliegenstämmen bzw. Antikörpern.

Bei Prof. J. Szidonya möchte ich mich für die schönen Aufenthalte am Genetischen Institut in Szeged bedanken.

Susanne Opravil danke ich für die Übersendung zahlloser Antikörper-Aliquots.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Drosophilagenetik gilt mein Dank für die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre sowie Tips, Tricks und tröstende Worte.

Insbesondere möchte ich den Su(var)3-9-Leuten Gunnar Schotta und Sandro Lein für die intensive Zusammenarbeit an ebendieser Problematik danken, ohne die viele Fragen unbeantwortet geblieben wären.

Nicht unerwähnt bleiben soll die Renngemeinschaft, bestehend aus Manu, Jette, Sandro und Heiko, die immer eine Quelle der Motivation war.

Ganz besonders möchte ich schließlich meinen Eltern für ihren uneingeschränkten Rückhalt und Beistand - und das nicht nur während meines Studiums - danken. Nicht zu vergessen meinem Bruder Thomas nebst Familie und vor allem Gunnar. Gruß und Dank.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den genutzten Werken wörtlich bzw. inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Halle, den 05. Juni 2005

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Ebert, Anja
Anschrift	Wilhelm-Külz-Str.9, 08547 Plauen
Geburtsdatum	24.12.1975
Geburtsort	Plauen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982 - 1984	Besuch der Grundschule in Plauen
1984 - 1990	Besuch der Allgemeinbildenden Oberschule in Plauen
1990 - 1994	Besuch des Gymnasiums „Adolf Diesterweg“ in Plauen; Abitur 1994

wissenschaftlicher Werdegang

Okt. 1994-Sept. 1999	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1999	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thema: „Molekulare Charakterisierung des <i>In(1)w^{m4}</i> -Rearrangements und Etablierung eines Modellsystems zur Analyse heterochromatischer Proteinkomplexe in <i>Drosophila melanogaster</i> “ Betreuer: Prof. Dr. Gunter Reuter
Okt. 1999-Jan. 2005	Promotionsstudium am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Betreuer: Prof. Dr. Gunter Reuter
seit Feb. 2005	Institut für Molekulare Pathologie (I.M.P.) in Wien, Österreich Arbeitsgruppe Dr. Meinrad Busslinger