

**SU(VAR)2-1, ein Regulator genomweiter Histon-
Deacetylierung, ist essentiell für die Bildung von
Heterochromatin in *Drosophila***

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg**

vorgelegt

von Matthias Walther

geb. am 25.09.1976 in Schwerin

Gutachter:

Prof. Dr. K. Humbeck

Prof. Dr. T. Jenuwein

Prof. Dr. G. Reuter

Verteidigung: 20.02.2018

Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA-Kopie der mRNA
CAS9	Endonuklease Cas9
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin-11-dUTP
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FISH	<i>fluorescent in situ hybridisation</i>
gRNA	<i>guide</i> RNA
GST	Glutathion-S-Transferase
H3K9	Lysin 9 von Histon H3
H3K36	Lysin 36 von Histon H3
H4K16	Lysin 16 von Histon H4
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMTase	Histonmethyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HYPB	<i>huntingtin interacting protein B</i>
kDa	kiloDalton
NP40	Nonidet P40 (4-Nonylphenyl poly(ethylene glycol))
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEV	Positionseffekt-Variation
PMSF	Phenylmethansufonylfluorid
preSET	cysteinreiche Domäne vor der SET-Domäne
postSET	cysteinreiche Domäne nach der SET-Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
SAM-C ¹⁴	S-adenosyl-[methyl-C ¹⁴]-l-methionin
SET	<i>Su(var)3-9 / Enhancer of zeste / Trithorax</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
w ^{m4h}	<i>ln(1)w^{m4h}</i> Inversion, eine <i>white</i> -Gen-Translokation auf dem X-Chromosomen mit einer Positionseffekt-Variation (PEV)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-D-galactosid

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Genetische Methoden	11
2.1.1	Haltung und Anzucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	11
2.1.2	<i>Drosophila</i> -Stämme und Balancerchromosomen	11
2.1.3	Etablierung transgener <i>Drosophila</i> -Linien	12
2.1.4	Kartierung von <i>Su(var)2-1</i>	14
2.2	Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1	Verwendete Bakterienstämme	14
2.2.2	Vektoren und Plasmide	14
2.2.3	Transformation in <i>E.coli</i>	15
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA	15
2.2.5	Standard - PCR	15
2.2.6	DNA-Sequenzierung	15
2.2.7	RNA- und DNA-Isolation aus <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2.2.8	RACE-PCR an 5' - und 3' - Enden an Gesamt-RNA	16
2.2.9	RT-PCR-Analyse	16
2.2.10	Herstellung von Konstrukten für das CRISPR/Cas9-System	16
2.3	Biochemische Methoden	17
2.3.1	Isolierung und Charakterisierung von GST-Fusionsproteinen	17
2.3.2	Histon-Methyltransferase-Assay	18
2.3.3	Isolierung und Charakterisierung von 6xHis-Fusionsproteinen	18
2.3.4	Westernblot zum Nachweis von Proteinen	19
2.3.5	Proteinkonzentrationsbestimmungen	19
2.3.6	Kernisolation aus <i>Drosophila</i> für Proteinextrakte	19
2.3.7	Herstellung von nativen <i>Drosophila</i> -Proteinextrakten	20
2.3.8	Co-Immunoprecipitation von <i>Drosophila</i> -Proteinen	20
2.4	Immunzytologische Methoden	21
2.4.1	Anzucht von Embryonen	21
2.4.2	Immunfärbung in embryonalen Stadien	21
2.4.3	Immunmarkierung von polytären Speicheldrüsenchromosomen	22
2.4.4	Gal4-UAS-kontrollierte Transgenexpression von SU(VAR)2-1 EGFP	22
2.4.5	Immunmarkierungen in <i>Drosophila</i> -Ovarien	23
2.4.6	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	23
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Das <i>Su(var)2-1</i>-Gen	25
3.1.1	<i>Su(var)2-1</i> , ein Suppressor für PEV im <i>In(1)w^{mdh}</i> -Rearrangement	25
3.1.2	Kartierung von <i>Su(var)2-1</i>	25
3.1.3	Erstellung der Deletion <i>Df(2L)ED721</i> zur Feinkartierung	27
3.1.4	Molekulare Analyse einzelner <i>Su(var)2-1</i> -Mutanten	30
3.1.5	Erstellung definierter <i>Su(var)2-1</i> -Mutanten mit CRISPR/Cas9	32
3.1.6	Evolutionäre Konservierung von SU(VAR)2-1	34
3.1.7	Mutantenrettung des <i>Su(var)2-1</i> -Suppressoreffekts	36
3.1.8	<i>Su(var)2-1</i> -Expression in <i>Drosophila melanogaster</i>	45
3.1.9	SU(VAR)2-1 ist ein kernlokalisiertes Protein	47
3.1.10	Generierung eines polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörpers	48

3.2	Zytologische Verteilung und Effekte von SU(VAR)2-1	50
3.2.1	Verteilung von SU(VAR)2-1 in der frühen Embryogenese	50
3.2.2	Verteilung von SU(VAR)2-1-Fusionsproteinen in der frühen Embryogenese	53
3.2.3	SU(VAR)2-1 ist an polytären Chromosomen mit Banden assoziiert	55
3.2.4	SU(VAR)2-1-Mutanten zeigen Hyperacetylierung am Histon H4	55
3.2.5	MOF und MSL-1 sind in SU(VAR)2-1- Mutanten nicht verändert.....	59
3.2.6	Beeinflussung der H3-Acetylierungen in <i>Su(var)2-1^{null}</i> -Mutanten	61
3.2.7	H3K9me2 und HP1 an polytären Chromosomen von <i>Su(var)2-1^{null}</i>	64
3.2.8	Eine Verlust von SU(VAR)2-1 führt zu Defekten in der Oogenese	65
3.2.9	Lokalisierung von SU(VAR)2-1-Fusionsproteinen in der Oogenese	67
3.2.10	Rettung des „held out wing“-Phänotyps in <i>Su(var)2-1</i> -Männchen	69
3.3	Analyse von SU(VAR)2-1-Proteinkomplexen	70
3.3.1	Expression und Reinigung von rekombinantem SU(VAR)2-1	70
3.3.2	Etablierung SU(VAR)2-1 exprimierender S2-Zelllinien	71
3.3.3	SU(VAR)2-1 interagiert mit RPD3.....	73
3.3.4	Isolation von SU(VAR)2-1 in Proteinkomplexen in der frühen Embryogenese	74
3.3.5	Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 aus Extrakten des Wildtyps	75
3.3.6	Reinigung von SU(VAR)2-1-Proteinkomplexen mit Ionenaustausch-Chromatografie	77
3.3.7	Präzipitation von SU(VAR)2-1 aus Fraktionen nach Ionenaustausch-chromatografie.....	80
3.3.8	Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1-V5-FLAG aus transgenen Fliegenlinien	81
3.4	dMES-4/NSD als Interaktionspartner von SU(VAR)2-1	82
3.4.1	dMES-4 ist ein evolutionär konserviertes Protein.....	82
3.4.2	Erzeugung definierter <i>dMes-4</i> -Mutanten mit CRISPR/Cas9	83
3.4.3	Charakterisierung von erzeugten <i>dMes-4</i> -Mutanten	84
3.5	Analyse der enzymatischen Aktivität von dMES-4/NSD	85
3.5.1	dMES-4 ist eine H3K36-Methyltransferase	85
3.5.2	dMES-4 kontrolliert die früh-embryonale H3-K36-Methylierung.....	86
3.5.3	HYPB als H3K36me3-HMTase wird durch dMES-4 nicht beeinflusst.....	90
3.6	Lokalisation und Verteilung von dMES-4	91
3.6.1	dMES-4 ist im frühen Embryo mit Furchungskernen kolokalisiert	91
3.6.2	dMES-4-Bindung mit dem 4. Chromosom	92
3.6.3	Verteilung von FLAG-V5-dMES-4 in Ovarien und Embryonen.....	93
3.6.4	POF (<i>Painting Of Fourth</i>) in <i>Su(var)2-1</i> - und <i>dMes-4</i> -Mutanten.....	96
4	DISKUSSION	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	108
6	LITERATUR	109
7	ANHANG	116
8	PUBLIKATIONSLISTE	121
9	DANKSAGUNG	122
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	123

1 Einleitung

Die exakte Weitergabe der gesamten genetischen Information an eine Tochterzelle und die Aufrechterhaltung der Genomstabilität sind komplexe Herausforderungen an einen mehrzelligen Organismus. Dabei spielen epigenetische Prozesse eine große Rolle.

Während einzelner Entwicklungsphasen im eukaryotischen Organismus wie Meiose, Mitose, Fertilisation und Zellmorphogenese sind die DNA-Sequenzen als zentraler Informationsträger der genetischen Information von besonderer Bedeutung. Trotz einer identischen genomischen DNA-Sequenz im Zellkern müssen die verschiedenen Expressionsprofile einzelner Gene und DNA-Abschnitte den entsprechenden Entwicklungsstadien der Zelle angepasst werden. Die räumliche und zeitliche Regulation der Genexpression eines Genoms führt zu einer Vielzahl von spezialisierten Zellen und ist zentral für eine erfolgreiche Zelldifferenzierung. Unterschiedliche Expressionsmuster werden zunächst durch transiente Signale etabliert. Langfristig sind es aber epigenetische Änderungen, die zum Erhalt dieser Expressionsmuster in der gesamten Zelllinie führen. Epigenetische Veränderungen werden durch epigenetische Prozesse gesteuert und an die Tochterzellen weitergegeben, ohne dabei die ursprüngliche genomische DNA-Sequenz zu verändern.

Die genomische DNA liegt im eukaryotischen Zellkern mit Proteinen assoziiert vor und ist besonders eng mit dem Nukleosom als ein grundlegendes Strukturelement verbunden. Das Nukleosom bildet als stetig wiederkehrendes Element die Basis für das Chromatin und die Chromosomen (Kornberg, 1974). Nukleosomen bestehen aus einem Histon-Oktamer, aufgebaut aus zwei heterodimeren Histonen H2A-H2B und einem Tetramer aus den *core*-Histonen (H3-H4)₂, sowie der darum gewundenen 147bp langen genomischen DNA (Luger et al., 1997; Richmond and Davey, 2003). Über eine Bindung des Linker-Histons H1 und der Interaktion mit weiteren Nicht-Histonproteinen können die Nukleosomen zu einer 30nm Chromatinfaser kondensiert werden (Robinson et al., 2006; Woodcock et al., 2006). Die verschiedenen Arten von Chromatin, wie das konstitutive und fakultative Heterochromatin sowie das Euchromatin, sind in strukturell verschiedenen Regionen des Genoms lokalisiert.

Heterochromatin ist räumlich dicht gepackt und für Transkriptionsfaktoren unzugänglich, so dass es transkriptionell inaktiv ist (Richards and Elgin, 2002).

Euchromatin ist im Gegensatz dazu weniger stark kondensiert, zugänglich für Transkriptionsfaktoren und transkriptionell aktiv.

Das transkriptionsinaktive Heterochromatin, mit seiner Vielzahl an repetitiven Sequenzen (z.B. Satelliten-DNA), hat für die strukturelle und funktionelle Integrität von spezifischen chromosomalen Regionen, wie den Zentromeren und den Telomeren, eine besondere Bedeutung. Repressive posttranslationale Modifikationen der Histone sind wesentliche Merkmale von transkriptionsinaktivem Heterochromatin (Jenuwein and Allis, 2001). Die posttranslationalen Modifikationen an N-terminalen Enden der Histone, welche aus dem Nukleosom herausragen, dienen in Abhängigkeit ihrer jeweiligen epigenetischen Indizierung als Plattformen für Transkriptionsaktivatoren und Transkriptionsrepressoren (Levine, 2010).

Kovalente Modifikationen an Histonen sind Merkmale einer epigenetischen Veränderung, die zu einer reversiblen Regulation von Genabschnitten führen. Durch Histonmodifikationen sind funktionelle und zeitlich gesteuerte Regulationen nuklearer Prozesse möglich, ohne die DNA-Sequenz zu verändern.

Eine der ersten bekannten epigenetischen Modifikationen, welche im Besonderen mit transkriptionell aktiven Genen verbunden ist, stellt die Acetylierung von Histonen dar (Allfrey et al., 1964). Studien an verschiedenen Histonmodifikationen zeigen, dass die einzelnen Modifikationen unabhängig zur DNA-Sequenz eine Unterscheidung in Eu- und Heterochromatin möglich machen. Genomweite Analysen von Histonmodifikationen durch Chromatinimmunopräzipitationen (ChIP), gekoppelt mit genomweiten DNA Sequenzierungen, zeigen für Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Acetylierungen, Methylierung, Sumolierung und ADP-Ribosylierung epigenetische Profile an Gen-Promotoren und regulatorischen Elementen innerhalb des Genoms (Wang et al., 2008; Celniker et al., 2009; Roudier et al., 2011; Tessarz and Kouzarides, 2014; Allis and Jenuwein, 2016). Es zeigt sich, dass die meisten epigenetischen Modifikationen des Chromatins reversibel sind und von einer Vielzahl epigenetischer Kontrollfaktoren gesteuert werden. Mit verschiedenen genetischen Testsystemen in *Drosophila*, *Saccharomyces* und *Arabidopsis* konnten konservierte Schlüsselfaktoren wie z.B. das Heterochromatinprotein 1 (HP1), *SU(VAR)3-9*, *E(Z)*, *GCN5*, *CLR4* und *DDMI* für eine chromatinabhängige Genregulation identifiziert werden (Elgin and Reuter, 2013; Grunstein and Gasser, 2013; Grossniklaus and Paro, 2014; Kingston and Tamkun, 2014; Pikaard and Mittelsten Scheid, 2014). Die Identifizierung des ersten

Vertreter einer SET-Domäne enthaltenden Histonmethyltransferasen (KMTasen) gelang in *Drosophila melanogaster* (Tschiersch et al., 1994). Der als dominanter Suppressor für PEV isolierte Faktor weist eine konservierte SET-Domäne auf, welche im humanen Homologen SUV39H1 eine Methyltransferaseaktivität am Lysin 9 des Histons H3 hat (Jenuwein et al., 1998; Rea et al., 2000). Es können neben SUV39H1 im Säuger genom eine Vielzahl weiterer SET-Domänen enthaltenden Gene identifiziert und charakterisiert werden (Dillon et al., 2005).

Das in *Drosophila melanogaster* besonders erfolgreich eingesetzte Testsystem zur Identifizierung konservierter Heterochromatinfaktoren basiert auf Grundlage der Positionseffekt-Variegation (PEV) (Muller, 1930).

Bei einer Positionseffekt-Variegation werden euchromatische Genabschnitte durch eine Neupositionierung in die unmittelbare Nähe zum perizentrischen Heterochromatin gebracht und durch dessen Ausbreitung heterochromatisiert. Im PEV-Rearrangement $In(1)w^{m4}$ wird das euchromatische *white*-Gen partiell durch eine Heterochromatisierung inaktiviert und zeigt einen variierten Augenphänotyp (Elgin and Reuter, 2013). Der Bruchpunkt der Inversion $In(1)w^{m4}$ im X-Chromosomen, welcher das *white*-Gen hin zum perizentrischen Heterochromatin verlagert, befindet sich distal zum Nukleolus Organisator innerhalb einer R1-Transposon Repeatsequenz (Muller, 1930; Cooper, 1959; Ebert, 1999). Durch die Nähe des *white*-Gens zum heterochromatischen Bruchpunkt und einer Ausbreitung des Heterochromatins, wird das euchromatische *white*-Gen durch eine Heterochromatisierung partiell transkriptionell inaktiviert.

Drosophila melanogaster mit dem $In(1)w^{m4}$ -Rearrangement wurde erfolgreich zur Isolation einer sehr großen Anzahl von Suppressor- und Enhancer-Mutationen für eine Positions-Effekt-Variegation (PEV) verwendet (Reuter and Wolff, 1981). Der Funktionsverlust eines Suppressor-Genes [*Suppressor of variegation*", *Su(var)*] in $In(1)w^{m4}$ führt zu einer Verminderung von „silencing“, während Enhancer-Gen-Mutationen [*Enhancer of variegation*“, *E(var)*] zu einer verstärkten Zunahme von „silencing“ führen. Umfangreiche Untersuchungen zeigen, dass diese Genprodukte an einer strukturellen Regulierung von heterochromatischen und euchromatischen Chromatinzuständen beteiligt sind. Ein Genverlust führt in den Mutanten zu einem veränderten „silencing“ durch heterochromatische Strukturen.

Durch epigenetische Veränderungen kann eine Zugänglichkeit von Protein-komplexen für die Transkription, Replikation und Rekombination gesteuert werden.

Genetische Analysen schätzen die Anzahl von *Su(var)*- und *E(var)*-Genen im *Drosophila*-Genom auf über 150 (Sinclair et al., 1983; Schotta et al., 2003; Elgin and Reuter, 2013). Die meisten dieser Gene sind noch nicht molekular charakterisiert.

Die mit dem PEV-System identifizierten Heterochromatinfaktoren haben eine hohe evolutionäre Konservierung und sind zentrale epigenetische Faktoren in verschiedenen Organismen (Fodor et al., 2010; Elgin and Reuter, 2013). So kann für das in *Drosophila melanogaster* identifizierte *Su(var)3-9*-Gen gezeigt werden, dass es für ein Heterochromatinprotein kodiert. Dieses im Heterochromatin lokalisierte Protein besitzt, wie sein humanes Homolog SUV39H1, eine H3K9 spezifische Methyltransferasaktivität (Schotta et al., 2002). Durch die dynamischen und reversiblen epigenetischen Zustände eines Chromatinbereiches wird eine transkriptionelle Flexibilität ermöglicht. Fehlregulation oder der Funktionsverlust human homologer SU(VAR)- und E(VAR)-Proteine können pathologische Formen verschiedener Krankheiten wie Akute-Myeloische-Leukämien (AML) auslösen. Dies verdeutlicht die fundamentale Bedeutung einer epigenetischen Balance in eukaryotischen Genomen (Santos-Rosa and Caldas, 2005; Zhang and Dent, 2005; Fodor et al., 2010). Beispiele für hochkonservierte *Su(var)*-Gene sind z.B. *Su(var)3-1* (JIL1), *Su(var)3-3* (LSD1), *Su(var)3-9* (SU(VAR)3-9) und *Su(var)2-5* (HP1) (Elgin and Reuter, 2013).

Die gekannten Suppressorgene kodieren für Proteine verschiedener enzymatischer Funktion. Das *Su(var)3-1*-Gen ist identisch mit Jil-1 in *Drosophila* und wirkt mit seiner enzymatischen Aktivität einer Ausbreitung von Heterochromatin entgegen. JIL-1 ist eine H3S10 spezifische Kinase (H3S10p), die in *Drosophila* an polytären Chromosomen in euchromatischen Interbandenbereichen und dem männlichen X-Chromosom lokalisiert ist (Jin et al., 1999). Eine Reduktion von H3S10p in JIL-1 Mutanten führt zur ektopischen Ausbreitung von H3K9me2 und HP1 auf den Chromosomenarmen mit einer besonders starken Anreicherung auf den X-Chromosomen. Darüber hinaus zeigen genetische Untersuchungen, dass die JIL-1 Aktivität antagonistisch zur Funktion von SU(VAR)3-9 ist. Die JIL-1-Kinase ist aber auch an einer epigenetischen Regulation von Heterochromatin durch die Etablierung von H3S10phK9me2 mit der SU(VAR)3-9-Methyltransferase im Chromocenter und dem vierten Chromosom von Bedeutung (Wang et al., 2014).

Die Gene *Su(var)3-9* und *Su(var)2-5* (HP1) sind Suppressorgene, die eine zentrale Rolle bei der Etablierung von Heterochromatin haben. *Su(var)3-9* kodiert für

eine Histon-Methyltransferase (KMTase), die spezifisch Histon H3 am Lysin 9 (H3K9) methyliert. *Su(var)3-9* Null-Mutanten zeigen eine reduzierte H3K9-Di-Methylierung im Heterochromatin der Chromozentren von Speicheldrüsenchromosomen. SU(VAR)3-9 ist die wichtigste heterochromatinspezifische KMTase für H3K9me2 in *Drosophila melanogaster*. SU(VAR)3-9 interagiert direkt mit HP1 und wird dadurch im perizentrischen Heterochromatin gehalten. Ein Verlust von HP1, welches ebenfalls ein Suppressor für PEV ist, führt zu einer ektopischen Ausbreitung von H3K9me2 und SU(VAR)3-9 (Schotta et al., 2002).

In den Experimenten zur Isolation von Suppressor-Mutationen im PEV konnten mit *In(1)w^{m4}* die Gene *Su(var)3-3* und *Su(var)2-1* als starke Suppressorgene, die eine *n*-Butyrat-Sensitivität aufweisen, identifiziert werden (Reuter et al., 1982a; Reuter et al., 1986). *Su(var)3-3* wurde bereits kloniert und die molekulare Funktion ist bestimmt (Rudolph et al., 2007). SU(VAR)3-3 ist eine von dreizehn putativen Histon-Demethylasen in *Drosophila melanogaster*, die der Flavin-Monoaminoxidase-Familie angehört. Sie ist die bisher einzig bekannte Aminoxydase-Demethylase in *Drosophila* (Shi et al., 2004; Di Stefano et al., 2007). Das SU(VAR)3-3-Protein enthält als konservierte Bereiche die SWIRM-Domäne und eine NAD-Bindedomäne (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) (Shi et al., 2004; Holowatyj et al., 2015). Die SWIRM Domäne, welche sich in den Proteinen SWI3, RSC8 und MOIRA wiederfindet, ist an Protein-Protein- und DNA-Protein-Wechselwirkungen im Euchromatin beteiligt (Aravind and Iyer, 2002). SU(VAR)3-3 entfernt durch seine Demethylaseaktivität die Mono- und Di-Methylgruppen an H3K4 im Chromatin. In einem Proteinkomplex mit der Histondeactylase RPD3 und SU(VAR)3-9 hat SU(VAR)3-3 eine protektive Wirkung gegen die Etablierung einer H4K9-Metylierung im Heterochomatin (Rudolph et al., 2007).

Das Gen *Su(var)2-1* ist wie *Su(var)3-3* einer der stärksten bekannten dominanten Suppressoren für PEV und von zentraler Bedeutung im Prozess des heterochromatischen Gen-Stilllegung (Reuter et al., 1982a). Mutanten von *Su(var)2-1* sind homozygot lebensfähig und zeigen aber eine rezessiv weibliche Sterilität (Szabad et al., 1988a). Polzell-Transplantationsexperimente zeigen, dass rezessiv weibliche Sterilität in *Su(var)2-1* wahrscheinlich von somatischen Follikelzellen abhängig ist. *Su(var)2-1*-Mutanten weisen mit zusätzlichem Y-Heterochromatin und *n*-Butyrat eine

letale Wechselwirkung auf und unterstreicht die essentielle Chromatinfunktionen von *SU(VAR)2-1* (Szabad et al., 1988a).

Die untersuchten *Su(var)2-1*-Mutanten zeigen neben dem dominanten Suppressoreffekt auf das *In(1)w^{m4}* starke Effekte in anderen PEV-Variegations-Rearrangements. *Su(var)2-1* ist an einer PEV-abhängigen Heterochromatisierung der euchromatischen *white*-Notch-Region in der Translokation *T(1;4)w^{m258-21}* beteiligt. In weiteren PEV-Rearrangementsystemen, welche die Gene *white*-, *brown*-, *Stubble*-, *scute*- und *bobbed* betreffen, ist *Su(var)2-1* ein wichtiger Faktor für Gensilencing (Reuter et al., 1982b; Hayashi et al., 1990). Der starke Suppressoreffekt der *Su(var)2-1* Mutanten in allen PEV-Systemen weist darauf hin, dass das *Su(var)2-1*-Genprodukt eine zentrale Funktion beim Aufbau von Heterochromatin besitzt.

Alle *Su(var)2-1* stellen *n*-Butyrat sensitive dominante Suppressormutationen dar. Nach Zugabe von *n*-Butyrat wurde eine verminderte Überlebensrate von homozygoten *Su(var)2-1*-Mutantentieren nachgewiesen (Reuter et al., 1982a). Butyrat ist ein Inhibitor für Histon-Deacetylasen (HDAC), über dessen genaue regulatorischen Wirkungen wenig bekannt ist (Candido et al., 1978). Die Butyrat-Sensitivität zeigt sich in verschiedenen Analysen und geht in homozygoten *Su(var)2-1*- Mutantenmännchen mit einem additiven Effekt der letalen Wirkung des heterochromatischen Y-Chromosoms einher. Es zeigt sich, dass die Ab- bzw. Anwesenheit von zusätzlichem Y-Chromatin in beiden Geschlechtern einen starken Einfluss auf die Letalität der homozygoten *Su(var)2-1*-Mutanten hat.

Neben der letalen Wechselwirkung mit heterochromatischem Y-Chromatin und der *n*-Butyrat-Sensitivität zeigen die semiletalen *Su(var)2-1*-Mutanten eine rezessiv weibliche Sterilität ohne die Ablage reifer Eier (Sinclair et al., 1983). Die rezessive Sterilität der *Su(var)2-1*-Weibchen geht von den Eikammer-umschließenden somatischen Follikelzellen aus (Szabad et al., 1988b).

Su(var)2-1-Mutanten zeigen am Histon H3 und H4 eine Hyperacetylierung (Dorn et al., 1986). Durch die Anreicherung von hyperacetyliertem Histon H4, in heterozygoten und homozygoten *Su(var)2-1*-Mutanten-Larven konnte gezeigt werden, dass der Anteil von nicht acetyliertem Histon H4 im Vergleich zum Wildtyp von ursprünglich 50 % auf ca. 27 % absinkt. In *Su(var)2-1*-Mutanten wird beobachtet, dass jedoch der Anteil an hyperacetyliertem Histon H4 in gleichem Maße wie der Anteil des nicht acetylierten Histons H4 verändert wird (Dorn et al., 1986). Die Letalität von

Su(var)2-1-Mutanten durch *n*-Butyrat und die nachgewiesene Hyperacetylierungen der Histone in den *Su(var)2-1*-Mutanten zeigen, dass SU(VAR)2-1 und eine Histon-Deacetylierung für eine Gen-Stillegung wichtig sind. Eine vergleichbare letale Wechselwirkung wie von *n*-Butyrat auf *Su(var)2-1* zeigt Carnitin, ein natürlicher Inhibitor für Deacetylasen (Candido et al., 1978; Vidali et al., 1978a; Vidali et al., 1978b; Fanti et al., 1994).

Genetische Wechselwirkungen von SU(VAR)2-1 mit anderen *E(var)*- und *Su(var)*-Genen werden durch epistatische Effekte beobachtet. So reduzieren bereits drei genomische Kopien des Suppressorgenes *Su(var)3-7* den Suppressor-Effekt der *Su(var)2-1⁰¹*-Mutation deutlich. In Kombination mit fünf *Su(var)3-7*-Kopien zeigt sich ein Enhancer-Phänotyp mit fast vollständig weißen Facetten (Reuter et al., 1990). Interaktionen der *Su(var)2-1*-Mutante mit dem Enhancer *E(var)3-93D^{neo}* zeigen, dass der dominante Suppressor-Effekt von *Su(var)2-1* auch durch *E(var)3-93D^{neo}* ebenfalls kompensiert wird und beide Genprodukte in Wechselwirkung treten (Dorn et al., 1993).

Allele der *Su(var)2-1*-Mutanten zeigen homozygot eine braune Augenschattierung, welche einem Augen-Phänotyp von *light*-Gen-Mutanten ähnelt (Sinclair et al., 1992). Das *light*-Gen ist, ebenso wie *rolled* und *concertina* ein im Heterochromatin lokalisiertes Gen. *Su(var)2-1*-Mutanten führen zu einer Modifikation der heterochromatischen Umgebung von *light*, die in einer veränderten Expression des *light*-Genes resultiert (Clegg et al., 1998; Sinclair et al., 2000). Transgene *white*-Insertionen im überwiegend heterochromatischen vierten Chromosom zeigten ebenfalls einen deutlich von *Su(var)2-1* abhängigen Suppressor-Effekt (Wallrath and Elgin, 1995; Sun et al., 2000). Ebenso wird der Effekt von *E(z)^{Trm}*, welches phänotypisch eine *loss-of-function* Mutation von *E(z)* ist, durch *Su(var)2-1* supprimiert. Die Wechselwirkung von *E(z)^{Trm}* mit *Su(var)2-1* und die gemeinsame Sensibilität gegenüber Butyrat sind Hinweise für eine Interaktion der Proteine, da der konservierte ESC-E(Z)-Komplex eine Histondeacetylase-Aktivität in *Drosophila melanogaster* besitzt (Bajusz et al., 2001).

Die in *Su(var)2-1*-Mutationen ausgelösten Effekte auf das Gensilencing haben eine direkte Wirkung auf ein Crossing over innerhalb der perizentromeren Chromosomenregionen in *Drosophila melanogaster*. Die untersuchten *Su(var)2-1*-Mutationen haben so einen signifikanten Einfluss auf den Anstieg der Crossing over Frequenz in der *ri-p^p*-Region, was darauf hindeutet, dass die Crossing over Frequenz vom Heterochromatin und *Su(var)2-1* abhängig ist (Westphal and Reuter, 2002).

Zytogenetische- und genetische Analysen lokalisieren das *Su(var)2-1*-Gen in der Region 31B1 im zweiten Chromosom (2L) von *Drosophila melanogaster*. Für den chromosomalen Bereich von *Su(var)2-1* in 31B-32A sind mittels Defizienz-Kartierung und Mutanten-Analysen ca. 193 rezessiv letale Mutationen isoliert (Sinclair et al., 1983; Wustmann et al., 1989; Sinclair et al., 1992; Clegg et al., 1993). Durch dieser Untersuchungen konnte der genaue Mutationsort für *Su(var)2-1* nicht bestimmt werden, so dass genetische bzw. biochemische *Su(var)2-1*-Effekte beschrieben sind, ohne das *Su(var)2-1* molekular kloniert wurde. Als eines der ersten Proteine konnte dMES-4/NSD als Interaktor von SU(VAR)2-1 in einem Hefe-Dihybrid-Screen nachgewiesen werden. Da MES-4/NSD auch ein *Su(var)*-Gen ist, deutet es darauf hin, dass zwei Suppressoren für PEV miteinander in Wechselwirkung treten können (Walther, 2003).

Mes-Gene werden in *C.elegans* als funktionell „maternal effect sterile“-Gene beschrieben. Mutationen der *Mes*-Gene zeigen, neben einer Sterilität zusätzlich „grandchildless“-Effekte (Capowski et al., 1991). Die MES-Proteine werden bei *C.elegans* maternal an die Nachkommen weitergegeben und haben dort einen unmittelbaren Einfluss auf die Keimbahn. Obwohl alle vier Gene der *Mes*-Gen-Familie (*Mes-2*; *Mes-3*; *Mes-4* und *Mes-6*) in *C. elegans* gleiche Mutanten-Phänotypen aufweisen, werden die *mes*-Gene in zwei verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet (Xu et al., 2001; Bender et al., 2004). Die MES-Proteine MES-2-, MES-3- und MES-6- bilden zusammen einen Komplex, welcher dem PRC2-Komplex (*Polycomb Repressiv Complex*) in *Drosophila* bzw. dem in Vertebraten ähnelt. MES-2 und MES-6 sind in *C.elegans* Orthologe von E(Z) (*enhancer of zeste*) und ESC (*extra sex combs*) zwei charakterisierte PRC2-Untereinheiten in *Drosophila* und katalysieren eine repressive Di- und Tri-Methylierung am Histon H3K27. Eine enzymatische Aktivität des MES-2/3/6-Komplexes findet in der *C.elegans*-Keimbahn statt und bewirkt direkt eine Stilllegung des X-Chromosoms durch eine Anreicherung von H3K27me3 (Fong et al., 2002). Durch die Akkumulation von H3K27me3 ist eine effektive Bindung von MES-4 an diesen chromosomalen Regionen reprimiert.

Durch eine Aktivität des MES-2/3/6-Komplexes am X-Chromosomen wird das MES-4-Protein in *C.elegans* vorwiegend an den fünf Autosomen lokalisiert und ist am X-Chromosom nicht nachzuweisen (Fong et al., 2002).

Wie auch in MES-2 vorhanden, enthält MES-4 neben drei PHD- und zwei PWWP-Domänen eine konservierte SET-Domäne im C-terminalen Bereich des

Proteins. Die SET-Domäne in MES-4 ist für die H3K36me2 Methylierung an den Autosomen in der Keimbahn und im Embryo verantwortlich. Dabei ist die H3K36-Methylierung durch MES-4 nicht mit einer Transkriptionaktivität verbunden, sondern scheint eine differenzierte epigenetische Rolle in der Keimbahn zu besitzen (Bender et al., 2004; Bender et al., 2006). Durch MES-4 in *C. elegans* wird durch die H3K36me1/me2-Methylierung eine Bindung von Silencing-Repressoren an den Autosomen verhindert. Durch die erschwerte Bindung findet eine Akkumulation von Silencing-Repressoren am X-Chromosom statt, welche zusätzlich durch die Wirkung des MES-2/3/6-Komplexes begünstigt wird. Ein Verlust von MES-4 Proteinen führt zu einer Umverteilung der Repressoren vom X-Chromosomen zu den Autosomen, mit einem sofortigen De-Silencing des X-Chromosoms in der *C.elegans*-Keimbahn. Die maternalen Mutanteneffekte in der *C.elegans*-Keimbahn zeigen sich nicht unmittelbar in der ersten Generation der homozygoten Mutanten, sondern werden als Sterilität in der zweiten Generation der homozygoten *Mes/Mes*-Nachkommen beobachtet.

In *Drosophila melanogaster* zeigt das Gen CG4976 eine Homologie zum *MES-4* in *C.elegans*. Auf Grundlage seiner Homologie mit dem *C.elegans*-SET-Domänen-Protein MES-4 und den NSD-Proteinen (*Nuclear-receptor-binding-SET-Domain-containing protein*) in *Mus musculus* wird es in *Drosophila melanogaster* als dMES-4 bzw. NSD bezeichnet. Über die molekulare Funktion von dMES-4 in *Drosophila* ist wenig bekannt. Der gezielte Einsatz eines dMES-4-RNAi-Knockdowns führt in den Schneider-S2-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der H3K36me2-Methylierung. Eine Beeinflussung der H3K36me3-Methylierung sowie eine Einfluss auf den Dosis-Kompensations-Komplexes können nicht beobachtet werden (Yokoyama et al., 2007). *In-vivo*-Analysen in *Drosophila melanogaster* zeigen, dass die H3K36-Methylierung ein stark regulierter komplexer Prozess ist, an dem mindestens zwei verschiedene H3K36-Histon-Methyltransferasen beteiligt sind. Eine H3K36-Di-Methylierung in Promotorregion aktiv transkribierter Gene ist hauptsächlich durch dMES-4 katalysiert. Die am 3'-Ende akkumulierte H3K36me3-Methylierung ist dMES-4-unabhängig und wird durch die Histon-Methyltransferase HYPB katalysiert (Bell et al., 2007; Mikkelsen et al., 2007). Es zeigt sich *in vivo*, dass eine H3K36-Methylierung eine antagonistische Wirkung auf die K16-Acetylierung am Histon H4 hat, welche eine besondere Rolle bei der Transkriptions-Elongation und der Dosiskompensation in *Drosophila* spielt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die beiden PEV-Suppressorgene *Su(var)2-1* und *dMes-4/NSD* identifiziert, charakterisiert und eine umfassende molekulare und funktionelle Analyse der Proteine SU(VAR)2-1 und dMES-4 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen die zentrale Bedeutung von SU(VAR)2-1 beim Gen-Silencing. Die direkte Interaktion von SU(VAR)2-1 mit der Histondeacetylase RPD3 und der evolutionär konservierten Methyltransferase dMES-4 zeigt, dass Suppressoren in verschiedenen Stadien der Entwicklung Komplexe bilden können. Die Interaktion von RPD3 mit SU(VAR)2-1 und die beobachteten *Su(var)2-1* Mutanteneffekte von SU(VAR)2-1 weisen auf eine besondere Bedeutung bei der Kontrolle von Acetylgruppen an den Histonen hin. In den frühen Embryonalstadien spielt dMES-4/NSD, neben der direkten Interaktion mit SU(VAR)2-1, bei der Etablierung der frühen embryonalen H3K36-Methylierung eine wichtige Rolle.

2 Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Haltung und Anzucht von *Drosophila melanogaster*

Die Anzucht, Kreuzung und Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgten auf einem *Drosophila*-Standard-Futtermedium (1% Agar; 2,5% Sirup; 3,5% Rosinen; 3% Grieß; 5% Hefe; 0,1% Nipagin, 100mM Ampicillin/50mM Tetracyclin) bei einer Temperatur von 25 °C im Inkubator.

2.1.2 *Drosophila*-Stämme und Balancerchromosomen

Die in der Arbeit verwendeten *Drosophila*-Stämme und *Drosophila*-Linien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und im Anhang beschrieben. Die genutzten *Drosophila*-Stämme und Stabilisierungschromosomen sind bei Lindsley und Zimm detailliert beschrieben (Lindsley and Zimm, 1992). In Tabelle 1 sind die genutzten *Drosophila*-Stämme mit ihren genetischen Merkmalen aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete *Drosophila*-Stämme mit ihren dominanten und rezessiven genetischen Markern (Lindsley and Zimm, 1992).

Stammbezeichnung	Genotyp	FlyBase-ID/Ref.
w ¹¹¹⁸	w ¹¹¹⁸ _{iso} ; 2 _{iso} ; 3 _{iso}	FBst0005905
w ^{m4h}	In(1)w ^{m4h} ; +; +	Prof. Reuter
Wildtyp/Canton-S	+; +; +	FBst0064349
Cre-Rekombinase	y1 w67c23 P[Crey]1b; D*/TM3, Sb1	FBst0000851
Balancer 2.Chr.	w ¹¹¹⁸ ; SM6a/Sco	Lindsey und Zimm
Balancer 2./3.Chr.	w ¹¹¹⁸ ; SM6a/Sco; TM2, Ubx/TM6c, Sb	Lindsey und Zimm
Balancer 3.Chr.	w ¹¹¹⁸ ; TM3, Ser/Dr	Lindsey und Zimm
Balancer 3.Chr.	w ¹¹¹⁸ ; TM2, Ubx/TM6c, Sb	Lindsey und Zimm
GFP-Balancer 2./3.Chr	w[1]; T(2;3)CyO-TM3, P[w[+mC]=GAL4 Hsp70.PB] TR1, P[w[+mC]=UAS-GFP.Y]TR1; P[GAL4-Hsp70.PB]TR2, P[UAS-GFP.Y]TR2, y[+] Ser[1]/sna[Sco]; Sb[1]	FBst0005703
ZH-51D	y1 M[vas-int.Dm]ZH-2A w*; M[3xP3-RFP.attP]ZH-51D	FBst0024483
ZH-86F	y1 M[vas-int.Dm]ZH-2A w*; M[3xP3-RFP.attP]ZH-86F	FBst0024749
CB-6516-3	w ¹¹¹⁸ ; P[RS3]Npe1a ^{CB-6516-3}	FBst0326667
5-SZ-4008	w ¹¹¹⁸ ; P[RS5]CG5381 ^{5-SZ-4008}	FBst0328282
FLP für 2.Chrom.	y ¹ w ¹¹¹⁸ P[ry ^{+7.2} =FLP]3F _{iso} /Dp(1;Y)y ⁺ Y _{iso} ;sna ^{Sco} /SM6a;3 _{iso}	FBst0006416
CAS-0001	y2 cho2 v1; attP40[nos-Cas9]/CyO	NIG-FLY#CAS-0001
CAS-0003	y2 cho2 v1; P[nos-Cas9, y+, v+]3A/TM6C, Sb Tb	NIG-FLY#CAS-0003
CAS-0004	y2 cho2 v1; Sp/CyO, P[nos-Cas9, y+, v+]2A	NIG-FLY#CAS-0004

Die für eine Kartierung von *Su(var)2-1* verwendeten chromosomalen Deletionen, P-Elemente sowie die einzelnen *Su(var)2-1*-Allele sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die zur Analyse von *dMes-4* genutzten Deletionen *Df(3R)13* und *Df(3R)77* sind molekular bereits charakterisiert (Schäfer, 2004).

Tabelle 2: Verwendete chromosomale Deletion, P-Elemente und *Su(var)2-1*-Allele

Bezeichnung	Charakteristika	Lokalisation
5-HA-1257	P-Element	2L:10,230,357 ... 10,230,552 [+]
CB-6516-3	P-Element	2L:10,220,877 ... 10,220,877 [-]
Df(2L)ED721	chromosomale Deletion	2L:10,220,877 ... 10,230,357
Df(2L)ED729	chromosomale Deletion	2L:10,220,877 ... 10,321,777
Df(2L)BSC143	chromosomale Deletion	2L:10,209,408 ... 10,333,704
Df(2L)BSC144	chromosomale Deletion	2L:10,227,504 ... 10,457,595
Df(2L)BSC206	chromosomale Deletion	2L:10,240,295 ... 10,333,704

<i>Su(var)2-1</i> Allel	Ursprung /Mutagen	Stammbezeichnung
<i>Su(var)2-1</i> ⁰¹	spontan	Sub-1
<i>Su(var)2-1</i> ⁰²	EMS	Sub-36
<i>Su(var)2-1</i> ⁰³	Röntgenstrahlen	Sub-49
<i>Su(var)2-1</i> ⁰⁴	EMS	Sub-45 & Sub-56
<i>Su(var)2-1</i> ⁰⁵	Röntgenstrahlen	Sub-51 & Sub-64
<i>Su(var)2-1</i> ⁰⁶	Röntgenstrahlen	Sub-40
<i>Su(var)2-1</i> ¹⁵	EMS	<i>Su(var)2-9</i>
<i>Su(var)2-1</i> ²¹⁴	EMS	-
<i>Su(var)2-1</i> ²¹⁵	EMS	-
<i>Su(var)2-1</i> ^{ds}	diese Arbeit	<i>Su(var)2-1</i> ^{ds}
<i>Su(var)2-1</i> ^{null}	diese Arbeit	<i>Su(var)2-1</i> ^{null}
<i>Su(var)2-1</i> ^{AV1}	diese Arbeit	<i>Su(var)2-1</i> ^{AV1}
<i>Su(var)2-1</i> ^{MW2}	diese Arbeit	<i>Su(var)2-1</i> ^{MW2}
<i>Su(var)2-1</i> ^{MW3}	diese Arbeit	<i>Su(var)2-1</i> ^{MW3}

2.1.3 Etablierung transgener *Drosophila*-Linien

Zur Etablierung transgener *Drosophila*-Linien wurden Methoden, die auf P-Element- und *phiC31*-Integrase-Systemen basieren, für eine Keimbahntransformation genutzt (Rubin and Spradling, 1982; Bischof et al., 2007).

Durch eine Keimbahntransformation wird extrachromosomale DNA über ein Zwischenkonstrukt (Tabelle 3) eingebracht und stabil im Genom der Nachkommen integriert.

Für die P-Element vermittelte Keimbahntransformationen wurde die DNA eines Transformationskonstruktes (300 ng/μl) mit einem Δ2-3-Helfer-Plasmid (Transposase-Quelle, 250 ng/μl) gemischt und im Injektionspuffer (0,1mM Na-Phosphat, 5mM KCl, pH 6,8~7,8) aufgenommen. Für eine *phiC31*-basierte Integration wurde das DNA-Konstrukt mit einer Endkonzentration von 350ng/μl mit Injektionspuffer gemischt. Vor jeder Injektion wurde der Puffer-DNA-Mix bei 4°C für 25 Minuten und 13000 Upm zentrifugiert.

Embryonen des Injektionsstammes wurden in einem Zeitintervall von dreißig Minuten abgesammelt und mit Hypochlorid (12%) für zwei Minuten dechorionisiert. Nach einem Mehrmaligen Waschen mit 1xPBS wurden die Embryonen auf einem Agarblock aufgereiht und zum Trocknen auf einen beschichteten Objektträger transferiert. Nach einer folgenden Trocknung (6 Minuten) der Embryonen bei 28°C wurden diese mit 10S-Voltalev-Öl (Elf-Atochem, Düsseldorf) überschichtet. Mittels einer stationären Mikroinjektionsapparatur konnte die DNA-Injektionslösung in die räumliche Nähe der Polzellen injiziert werden. Nach der Injektion inkubierten die Embryonen unter Voltalev-Öl-S10 bei 25 °C für 24 Stunden in einer Feuchtekammer. Die geschlüpften Larven wurden anschließend auf ein Fliegenstandardmedium überführt. Nach erfolgter Auskreuzung und einer Auswertung der Nachkommen anhand von Selektionssmarkern (z.B. *wihte*, *dsRED*), wurden die transgenen Fliegenlinien mit entsprechenden Balancer-Chromosomen stabilisiert (Tabelle 1).

Tabelle 3: Konstrukte zur Etablierung transgener *Drosophila*-Linien

Vektor (Ref.)	Bezeichnung	P-Element-Konstrukt
<i>pP[RS5]</i> (K.Golic)	pR[g2-1-V5]	<i>pP[RS5 gen. Su(var)2-1-V5]</i>
	pR[g2-1-V5-FLAG]	<i>pP[RS5 gen. Su(var)2-1-V5-3xFLAG]</i>
	pR[gdMes4-V5]	<i>pP[RS5 gen. dMes-4-V5]</i>
	pR[gdMes4-V5-FLAG]	<i>pP[RS5 gen. dMes-4-V5-3xFLAG]</i>
	pR[gH3.3B-V5]	<i>pP[RS5 gen. H3.3B-V5-6xHis]</i>
<i>pP[UAST]</i> (Perrimon, 1993)	pU[c2-1-EGFP]	<i>pP[UAST cDNA-Su(var)2-1-EGFP]</i>
	pU[g3.3A-V5-His]	<i>pP[UAST gen. H3.3A-V5-6xHis]</i>
<i>pP[UASTattB]</i> (Bischof et al. 2007)	pB[g2-1-V5-FLAG]	<i>pP[UAST,attB gen. Su(var)2-1-V5-3xFLAG]</i>
	pB[gS2-1-V5-FLAG]	<i>pP[UAST,attB gen. Strep-Su(var)2-1-V5-FLAG]</i>

2.1.4 Kartierung von *Su(var)2-1*

Für die Kartierung von *Su(var)2-1* wurde der dominante Suppressoreffekt auf $In(I)w^{m4h}$ in Kombination mit chromosomalen Deletion genutzt. *Df(2L)BSC*-Deletionen der genomischen Region 31B1 wurden mit dem chromosomalen w^{m4h} -Rearrangement kombiniert. Nach der Kreuzung von Weibchen des Genotyps w^{1118}/w^{1118} ; *Df(2L)BSC/CyRoi* (Tabelle 2) mit Männchen des Genotyps $In(I)w^{m4h}/Y$;+ ;+ wurden die weiblichen F1-Nachkommen analysiert. Zeigten diese in der F1-Generation einen Suppressoreffekt auf $In(I)w^{m4h}$, bei gleichzeitiger Anwesenheit der chromosomalen Deletion, so befindet sich ein *Su(var)*-Gen im Bereich der untersuchten Deletion. In einer daran anschließend durchgeführten Komplementations-analyse wurden einzelne *Su(var)2-1*-Allele (Tabelle 2) mit den *Df(2L)BSC*-Deletionen komplementiert. Für diese Komplementation wurden w^{m4h} ; *Su(var)2-1^{Allele}/CyRoi*-Tiere mit w^{m4h}/w^{m4h} ; *Df(2L)BSC/CyRoi* gekreuzt und die transheterozygoten Nachkommen auf männliche und weibliche Fertilität getestet.

Weitere Defizienzen für den *Su(var)2-1*-Locus wurden mithilfe von DrosDel-Delitionen identifiziert [*Df(2L)ED729*] bzw. durch eine FLP/FRT-basierte Rekombination hergestellt [*Df(2L)ED721*] (Ryder et al., 2004). Die auf dem DrosDel-System beruhenden w^+ -Deletionen wurden, wie zuvor beschrieben, ebenfalls in einer Komplementationsanalyse auf männliche und weibliche Fertilität untersucht.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Verwendete Bakterienstämme

DH5 α , <i>Escherichia coli</i>	F-, <i>end A1</i> , <i>hsd R17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>Sup E44</i> , <i>thi- 1</i> , <i>I</i> , <i>rec A1</i> , <i>gyr A96</i> , <i>rel A1</i> , $\Phi 80d$, <i>lac</i> Δ <i>ZM15</i> (Life Technologies; Invitrogen)
BL21 (DE3) pLysE	F- <i>ompT hsdSB</i> (<i>rB-mB-</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysE (CamR) ; (Life Technologies; Thermo Scientific)
BL21 (DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdSB</i> (<i>rB-mB-</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR) ; (Life Technologies; Thermo Scientific)

2.2.2 Vektoren und Plasmide

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden in *E.coli* die Vektoren pGEM-T[®] (Promega) und ZERO-Blunt[®] (Life Technologies/Thermo) verwendet. Für Gateway-System-basierte Konstrukte wurde das Gateway[®] pDONR[™] System (Life Technologies) genutzt. Als Transformationsvektoren für *Drosophila melanogaster* dienten die Vektoren pP[UAST], pP[RS5] und pP[UASTattB], siehe Tabelle 3.

2.2.3 Transformation in *E.coli*

Plasmide und ihre Derivate wurden in *E.coli*-Bakterien des Stammes *DH5 α* (Invitrogen) durch Hitzeschock transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf einem LB-Agar-Selektionsmedium (Ampicillin; Chloramphenicol; Tetracyclin) über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmiden zur Sequenzierung aus *E.coli* erfolgte mit dem Plasmid-Isolations-Kit der Firma Marligen bzw. Macherey & Nagel nach Angaben des Herstellers. Für einfache Kontrollrestriktionen und PCR-Analysen wurden die Plasmide nach der Methode von Birnboim und Doly isoliert (Birnboim and Doly, 1979).

2.2.5 Standard-PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei wurden verschiedene DNA-Polymerasen wie *Taq* (Life Technologies), *Pfu* (Promega Corporation, Madison, WI), *Phusion* (Thermo Scientific) sowie *KOD* (Novagen) eingesetzt und gemäß den Herstellervorgaben verwendet.

Die in dieser Arbeit genutzten Primer für die spezifischen PCR-Reaktionen und ihre entsprechenden Sequenzen sind im Anhang detailliert aufgeführt.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

DNA-PCR-Fragmente und Vektoren wurden mittels Big-Dye *termination-cycle sequencing* Kit (Applied Biosystems) sequenziert (Sanger et al., 1977a; Sanger et al., 1977b). Ein Sequenz-Standard-Reaktionsgemisch von 10 μ l enthielt jeweils 1 μ l Big Dye Puffer, 1.3 μ l Big Dye Mix, 1 μ l Oligonucleotid (4 pmol), DNA (~125 ng Plasmid-DNA bzw. ~15 ng PCR-Produkt) und H₂O. Nach Beendigung der Sequenzreaktion wurde diese nach Zugabe von 3 μ l 3M NaAc pH5 bzw. 60 μ l Ethanol (99%) bei 12000Upm gefällt und getrocknet. Die Analyse erfolgte am Sequenzer (Applied Biosystems).

2.2.7 RNA- und DNA-Isolation aus *Drosophila melanogaster*

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus Embryonen, Larven und adulten *Drosophila melanogaster* wurde die TRIzol®-Methode (Life Technologies) nach den Angaben des Herstellers angewendet. Die Gesamt-RNA wurde nach dem Trocknen in 50 μ l DEPC

behandeltem Wasser gelöst und vor ihrer Verwendung spektrofotometrisch vermessen. Eine Lagerung der RNA über längere Zeiträume erfolgte bei -20 °C.

Die Isolation genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster* erfolgte aus jeweils fünfzehn bis dreißig adulten Fliegen nach Vorgabe des „Quick-Fly-Genomic-DNA-Prep“-Protokolls von E. Jay Rehm (Berkeley, Drosophila Genome Project).

2.2.8 RACE-PCR an 5'- und 3'- Enden an Gesamt-RNA

Für die Untersuchung der 3'- und 5'-Bereiche wurden 7 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Unter Verwendung des GeneRacer™-Kits (Life Technologies) erfolgte eine RNA-Ligase-vermittelte Amplifizierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden. Die amplifizierten und klonierten 3'- und 5'-Enden wurden sequenziert und analysiert.

2.2.9 RT-PCR-Analyse

Die Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde entsprechend der Herstellerangaben (GoScript, Promega; Life Technologies) durchgeführt. Zur Herstellung von cDNA wurde 1µg einer isolierten Gesamt-RNA verwendet. Die RNA (1µg/µl) wurde mit 2µl Random Primern (50ng/µl, Promega) und 13µl Nuklease-freiem Wasser versetzt und nachfolgend für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach einer Abkühlung auf Eis erfolgte eine Inkubation bei 37°C nach Zugabe von 5 x M-MLV Reaktionspuffer, M-MLV Reverse Transkriptase (5U/µl), RNase Inhibitor RNasin (Promega) und dNTPs entsprechend den Herstellerangaben. Die in den RT-PCR Reaktionen für die Expressionsanalysen von *Su(var)2-1* (CG5694) verwendeten Primer, sind im Anhang aufgelistet.

2.2.10 Herstellung von Konstrukten für das CRISPR/Cas9-System

Zur Erzeugung von *Knock out*-Konstrukten wurden ca. 1-kb-lange genomische homologe Bereiche, die die gRNA-Schnittstellen flankierten, mittels Oligonukleotiden amplifiziert und über entsprechende Restriktionsschnittstellen in den pHD-dsRed-Donor-Vektor kloniert (Gratz et al., 2014). Die Injektionen der Konstrukte in Cas-9-exprimierende Embryonen wurden bei 18°C durchgeführt (Kondo and Ueda, 2013). Die pU6-gRNA-Targeting-Konstrukte wurden in einer Konzentration von jeweils 125ng/µl (Gratz et al., 2013) zusammen mit pHD-dsRed basierten Donor-Konstrukten in einer Konzentration von 350ng/µl injiziert. Alle Injektionsmischungen wurden mit dem Injektionspuffer hergestellt (0,1mM Na-Phosphat, 5mM KCl, pH 6,8~7,8). Die

injizierten Embryonen wurden nach dem Schlupf mit entsprechenden Stabilisierungschromosomen gekreuzt und die Nachkommen der F1-Generation durch Analyse der Markergene und PCR selektiert. DsRed-positive Fliegen wurden für den Aufbau stabiler Fliegenstämme weiterverwendet.

Zur Erzeugung eines endogen *in vivo* Expremierten *Su(var)2-1* C-Terminal markierten AVI-Fuionsproteins, wurde ein Donor-Konstrukt durch die Klonierung von drei DNA-Fragmenten erstellt. Das erhaltene Konstrukt wurde, wie zuvor für die *knock out* Konstrukte beschrieben, injiziert. Erfolgreiche Transformanten wurden selektiert und stabilisiert. Die für die Konstrukte verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Isolierung und Charakterisierung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde eine proteinkodierende Sequenz des Gens in den Vektor pGEX6P-1 (Amersham Bioscience) kloniert. Durch eine anschließende Expressionsinduktion der erstellten Konstrukte in *E.coli* (BL21pLys) wurde ein Fusionsprotein bestehend aus der klonierten Zielsequenz und einer N-terminalen GST-Fusion (Glutathion-S-Transferase) gebildet.

Die endogene Expression des GST-Fusionsproteins in *E.coli* steht unter Kontrolle des *lac*-Promotors, welcher durch ein Laktose-Analogon (IPTG) induziert wird. Durch Zugabe von IPTG in das Kulturmedium kann nachfolgend die Expression des Fusionsproteins angeschaltet werden. 100 ml LB-Medium (100 µg/µl Ampicillin) wurden frisch mit *E.coli* BL21pLys/pGEX6P-1-Konstrukten inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Übernacht-Kultur wurde 1:100 in 300 ml LB-Amp-Medium verdünnt und bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte von 0.6 inkubiert. Die Expressionsinduktion der GST-Fusionskonstrukte erfolgte mit 0,15 mM IPTG. Nach einer Induktion über drei Stunden wurde die Bakterienkultur durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000upm (Sigma) pelletiert.

Das *E.coli*-Zellelett wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, in 1/15 Vol. 1xPBS (137mM NaCl; 10mM Na₂HPO₄; 2,7mM KCl; 1,8mM KH₂PO₄) mit Proteaseinhibitoren (Roche, Basel) resuspendiert und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach einer anschließenden Ultraschallbehandlung (3 x 12 Pulse, 70 % Power) auf Eis wurde der lösliche Zellextrakt von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (zwanzig

Minuten, 15300upm bei 4 °C) abgetrennt. Zur Isolation der GST-Fusionsproteine aus dem Gesamtzellextrakt wurde eine GST-Affinitätschromatografie durchgeführt. Das erhaltene lösliche Extrakt des Überstandes wurde dazu mit 1xPBS equilibrierter Glutathion-B4-Sepharose versetzt und über Nacht im Kühlraum (4°C) auf dem Drehrad inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurden die ungebundenen löslichen Proteine durch mehrmaliges Waschen mit 20 ml 1 x PBS entfernt. Die nach den Waschschritten an der Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine wurden mit einem Elutionspuffer (20mM reduziertes Glutathion) eluiert bzw. als direkt an der Sepharose gebundenes Protein für proteinbiochemische Experimente eingesetzt.

2.3.2 Histon-Methyltransferase-Assay

Für einen Nachweis der Histon-Methyltransferaseaktivität von dMES-4 wurden die Proteine in *E.coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert und aus dem Gesamtextrakt über GST-Sepharose gereinigt. Die mit 4 x 5ml MAB-Puffer (0,25M Saccharose; 0,05M TrisCl pH 8,5; 0,02M KCl; 0,01mM β -Mercaptoethanol) gewaschenen GST-Fusionsproteine wurden anschließend in einem Histon-Methyltransferase Assay eingesetzt. Für die Reaktionen wurden an die GST-Sepharose gebundene Fusionsproteine, S-Adenosyl-L-[methyl- 14 C] (Amersham Bioscience) und 2 μ g rekombinantes Histon bzw. synthetisches Peptid gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde für 1h bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von ROTI-Load Puffer (Carl Roth) sowie einer fünf minütigen Erhitzung bei 95 °C beendet. Das Proteingemisch wurde zentrifugiert und der Überstand auf einem 15% igem SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach der Trocknung des SDS-Gels wurden die C^{14} -markierten Histone und Peptide am Phosphoimager (FUJIFILM, Japan) radiografisch detektiert. Nichtradioaktive HMTase-Assays wurden im Westernblot analysiert.

2.3.3 Isolierung und Charakterisierung von 6xHis-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von 6xHis-Tag-Fusionsproteinen wurde eine frische Expressionskultur des entsprechenden Fusionskonstruktes in LB-Medium angeimpft. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6 wurde die Kultur mit 1mM IPTG induziert und für die Dauer von zwölf Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde aus der Expressionskultur durch Zentrifugation ein Gesamtpellet hergestellt. Je nach denaturierter oder nativer Proteinaufreinigung wurde nach Angaben des Herstellers die Ni-NTA-Agarose (Qiagen, The Expressionist), vorbereitet und

verwendet. Die gebundenen 6xHis-Fusionsproteine wurden in einem Elutionspuffer (250mM Imidazol) eluiert bzw. direkt in einem ROTI-Load Puffer (Carl Roth) für 5 Minuten gekocht. Die Analyse erfolgte mittels Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE.

2.3.4 Westernblot zum Nachweis von Proteinen

Proteine wurden nach einer SDS-PAGE aus der Acrylamid-Gelmatrix auf eine PVDF- (Thermo) bzw. Nitrocellulose-Membran durch einen Elektro-Blot-Transfer (Blotpuffer: 192mM Glycin, 25mM Tris, 20% Methanol) bei $0,5\text{mA}/\text{cm}^2$ für 60 Minuten transferiert. Die Membran mit den gebunden Proteinen wurde nach dem Blot eine Stunde im Blocking-Puffer (3% Trockenmilchpulver [Carl-Roth] in 1 x PBST) geblockt und anschließend mit einem im Blocking-Puffer verdünnten primären Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 x 20 minütigem Waschen in PBST (1x PBS, 0,2% Tween 20) wurde der sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt auf die Membran gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut 3 x 20 Minuten gewaschen und der Westernblot mit einem ECL-Prime-System (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmungen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der Bio-Rad Protein-Assay-Kit der Firma Bio-Rad verwendet. Nach Erstellung der Eichgeraden mit entsprechenden Eichproteinen (GE Healthcare) wurden die zu untersuchenden Proben nach Vorgaben des Herstellers aufgearbeitet, fotometrisch im Ultrospec (Amersham Bioscience) vermessen und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.3.6 Kernisolation aus *Drosophila* für Proteinextrakte

Für die Kernisolation wurden zunächst die Embryonen des ausgewählten Genotyps von den Agar-Ablegeplatten abgesammelt und durch eine zweiminütige Behandlung mit Hypochlorid (6%) dechorionisiert. Die anschließend intensiv mit Wasser gewaschenen Embryonen wurden sofort für eine Kernisolation verwendet bzw. in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Kernisolation erfolgte bei 4°C nach der Methode von Elgin und Hood (Elgin and Hood, 1973) und wurde wie folgt modifiziert. 1g dechorionisiert Embryonen wurden mit 5ml TMMP-Puffer (50mM Tris-Maleat pH 7,4; 5mM MgCl_2 ; 10mM β -Mercaptoethanol; 0,1mM PMSF) versetzt und in einem Dounce-Homogenisator

(Weaton) homogenisiert. Nach Filtration des Homogenats durch eine Miracloth-membran (Calbiochem) wurde dieses auf 5ml Suc-TMMP Puffer (0,25 M Saccharose gelöst in TMMP-Puffer) überschichtet und für 10 Minuten bei 2000upm in der Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Kern-Pellet zweimal in 2ml TMMP-II-Puffer (0,1% Triton X-100 in TMMP-Puffer) und einmal in TMMP-Puffer gewaschen. Die isolierten Kerne wurden in Stickstoff eingefroren bzw. zur Herstellung der Kernextraktes weiterverarbeitet.

2.3.7 Herstellung von nativen *Drosophila*-Proteinextrakten

Für Co-Immunopräzipitationen wurden native Kernextrakte verwendet (Dignam et al., 1983). Die aus der Kernisolation gewonnenen Kerne des Kern-Pellets wurden in 1ml Puffer C (25mM HEPES pH 7,6; 500mM NaCl; 1,5mM MgCl₂; 25% Glycerol; 0,2mM EDTA; 0,5mM PMSF; 0,5mM DTT) aufgenommen und bei 4°C auf einem Drehrad für 45 Minuten inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4°C mit 16000upm für 30 Minuten wurde der Überstand über Nacht gegen 1000 ml Puffer D (25mM HEPES pH 7,6; 150 mM KCl; 12,5mM MgCl₂; 20% Glycerol; 0,2mM EDTA; 0,2mM PMSF; 0,5mM DTT; Roche-Protease-Inhibitor-Mix) dialysiert. Das Dialysat wurde erneut bei 4°C mit 12000upm für 5 Minuten zentrifugiert und jeweils in Aliquotes à 250 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu einer Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

2.3.8 Co-Immunopräzipitation von *Drosophila*-Proteinen

Native Kernextrakte wurden mit an Protein-A-Sepharose (Amersham) gekoppelten SU(VAR)2-1-Antikörpern bzw. α-FLAG-tag-Antikörpern für 3h bei 4°C inkubiert. Die kovalente Bindung des SU(VAR)2-1-Antikörpers an die Protein-A-Sepharose erfolgte zuvor durch eine Reaktion mit DMP (Dimethylpimelimidat). Nach der Inkubation wurden die Sepharose-Beads sechsmal mit Puffer A (50mM Tris-HCl, pH 7.5; 125mM NaCl; 0,1% NP-40) und fünfmal mit Puffer A plus 250mM KCl gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch Zugabe eines 0,1M-Glycinpuffers (pH 2.5) eluiert und sofort mit 1:10 Volumen 1M Tris-HCl (pH 8.0) neutralisiert. Die Eluate wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der durch den Antikörper präzipitierten Proteine erfolgte im Westernblot mit den entsprechend aufgeführten Antikörpern.

2.4 Immunzytologische Methoden

2.4.1 Anzucht von Embryonen

Zur Gewinnung von Embryonen für die verschiedenen immunzytologischen Untersuchungen wurden spezielle Ablegeröhrchen mit auswechselbaren Ablegeplatten verwendet. Die Ablageplatten (2% Agar; 10% Zucker; 2,25% Nipagin; Aktivkohle zum Anfärben des Mediums) wurden mit Frisch-Hefe bestrichen, um die Eiablage der adulten *Drosophila*-Weibchen zu stimulieren. Die Ablage erfolgte im Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 25 °C für die jeweiligen Untersuchungsintervalle von 0,5 - 12 Stunden. Embryonen wurden mittels eines Pinsels und entsprechender Siebe abgesammelt und entsprechend weiterverwendet.

2.4.2 Immunfärbung in embryonalen Stadien

Für die Immunmarkierung von *Drosophila*-Embryonen wurde die Methode nach Mitchison und Sedat (Mitchison and Sedat, 1983), wie in *Drosophila*-Protocols beschrieben, angewendet und modifiziert (W. Sullivan, 2000). Die von den Ablegeplatten abgesammelten Embryonen wurden in einer 6%igen Natriumhypochloridlösung (Carl Roth GmbH) dechorionisiert, intensiv mit Wasser gewaschen und anschließend entweder einer Hitze- oder Formaldehydfixierung (Rothwell and Sullivan, 2007) unterzogen. Die nachfolgende Devitellinisierung der fixierten Embryonen erfolgte durch Zugabe eines Gemisches aus *n*-Heptan und Methanol mit anschließendem kräftigem Schütteln. Die devitelinisierten und fixierten Embryonen wurden in Methanol bei 4°C gelagert. Zu Beginn einer Färbung wurden die Embryonen ca. 30 Minuten auf dem Drehrad in PBTA (1xPBS, 1% BSA, 0,05% Titon X-100) rehydriert. Die Immunmarkierung mittels primären Antikörpers (verdünnt in PBTA) fand bei 4°C über Nacht statt. Am nächsten Tag wurden die Embryonen zunächst dreimal in 1xPBTA gewaschen und für eine Stunde in PBTA inkubiert. Die Färbung mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (GAR/GAM Alexa 488) erfolgte für 2 Stunden in PBTA bei 37°C. Anschließend wurden die Embryonen erneut mit 1x PBTA gewaschen und inkubiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit jeweils 40µl DAPI-Mix [1:1-Gemisch Glycerol / 1xPBS, 1:1000 DAPI (Stammlösung 2 mg/10 ml)]. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern wurde jedes Präparat mit handelsüblichem Nagellack verschlossen. Die Auswertung der Immunmarkierung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510/780; Zeiss).

2.4.3 Immunmarkierung von polytären Speicheldrüsenchromosomen

Für die immunzytologische Untersuchung von polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster* wurde die Methode nach Silver und Elgin (Silver et al., 1978) verwendet. Larven des zu untersuchenden Genotyps wurden unter Zugabe von frischer Hefe bei 18°C gehalten, bis sie das dritte Larvenstadium erreicht hatten. Aus diesen beweglichen Larven wurden die paarigen Speicheldrüsen in 0,7%-iger NaCl-Lösung unter dem Binokular herauspräpariert. Die freipräparierten Speicheldrüsen wurden in Fixierlösung (45% Essigsäure, 3,7% Formaldehyd) für 5 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Spreizung und Quetschung der Chromosomen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren, das Deckglas abgesprengt und die Objekte in 1xPBS bis zur Färbung mit spezifischen Antikörpern gelagert.

Die verwendeten primären Antikörper (Tabelle 4) wurden in 1xPBS, 5% Trockenmilchpulver bzw. 3% BSA gelöst und über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurden die Präparate 3x 15 Minuten mit PBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in 1xPBST, 5% Trockenmilchpulver bzw. 3% BSA über Nacht bei 4°C in einer Feuchteammer inkubiert.

Nach einem erneuten Waschen mit PBST erfolgte die DNA-Färbung für 10 Minuten mit PBS-DAPI. Die Präparate wurden anschließend gewaschen und in CITIFLOUR-Mounting eingebettet. Die Versiegelung der Präparate erfolgte mit handelsüblichem Nagellack. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Mikroskop (LSM 510/780; Zeiss) mit entsprechenden Filtersätzen.

2.4.4 Gal4-UAS-kontrollierte Transgenexpression von SU(VAR)2-1 EGFP

Die Transgenexpression von SU(VAR)2-1-EGFP-Fusionsproteinen erfolgte mit dem Gal4-UAS-System. Durch den Einsatz der gewebespezifischen Gal4-UAS-Treiberlinien (Tabelle 4) können gewebs- oder entwicklungsabhängige Promotoren genutzt werden, um SU(VAR)2-1EGFP kontrolliert zu exprimieren.

Tabelle 4 Verwendete Gal4-Treiberlinien

Bezeichnung	Genotyp	FlyBase-Ref.
mat-Gal4-62	w[*]; P[w[+mC]=matalpha4-GAL-VP16]V2H	FBst0007062
mat-Gal4-63	w[*]; P[w[+mC]=matalpha4-GAL-VP16]V37	FBst0007063
tj-Gal4	y* w*; P[GawB]NP1624 / CyO, P[UAS-lacZ.UW14]UW14	FBst0302922
act-Gal4	y1 w*; P[Act5C-GAL4]25FO1/CyO, y+	FBst0004414
tub-Gal4	P[hsFLP]1, P[tubP-GAL80]LL1 w* P[neoFRT]19A; PinYt/CyO	FBst0005133
elv-Gal4	P[GawB]}elavC155	FBst0000458

2.4.5 Immunmarkierungen in *Drosophila*-Ovarien

Die Ovarien angefügterter *Drosophila*-Weibchen wurden in 1xPBS unter einem Stereomikroskop aus dem Abdomen herauspräpariert und die Ovariolen freigelegt.

Die vorbereiteten Ovarien wurden in 250µl einer Lösung, bestehend aus 5%-igem Paraformaldehyd gelöst in 1xPBS, für dreißig Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Dehydrierung in 200µl Methanol mit anschließender dreimaliger Rehydrierung in 250µl PBTA (1xPBS; 1% BSA; 0,05% Triton-X100) wurden die fixierten Ovarien für eine weitere Stunde nochmals in PBTA aufgenommen und inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der in PBTA verdünnten primären Antikörper und einer Inkubation bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBTA wurde der in PBTA verdünnte primäre Antikörper für zwei Stunden bei 37°C zugegeben. Danach erfolgte ein erneutes waschen mit PBTA. Die Ovariolen-Präparate wurden auf Objektträger überführt, gespreitet und in ein DAPI enthaltendes CITIFLOUR-Mounting-Medium eingebettet. Die Deckgläschen wurden mit handelsüblichem Nagellack versiegelt und die Objekte zur Auswertung der Immunmarkierungen an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510/780; Zeiss) untersucht.

2.4.6 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

Fixierte und gespreitete polytäre Speicheldrüsenchromsomen wurden in 2xSSC für 45 Minuten im Wasserbad bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Präparate für neunzig Sekunden in Denaturierungspuffer (2xSSC; 70 mM NaOH) getaucht und sofort danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%) für jeweils 5min bei -20°C inkubiert. Die per GoTaq-PCR (Promega) hergestellte und mit DIG markierte Sonde (aufgenommen in Hybridisierungspuffer [10% Lachsspermien-DNA; 2xSSC; 50% Formamid; 10% Dextransulfat; 1mMEDTA, 50mM Na-Phosphat-Puffer pH7]) wurde nach einer 5 minütigen Inkubation bei 95°C direkt zur Hybridisierung auf die Präparate gegeben und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen in 2x SSC bei 42°C wurden die hybridisierten Präparate für 60 min in einer feuchten Kammer bei 37°C mit Blocking-Lösung (4x SSC; 0,15% NP40; 0,15% Tween 20, 3% BSA; 5% Milchpulver) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit der Antikörperlösung (1:25 anti-DIG) über Nacht bei 4°C gefärbt. Nach dreimaligem Waschen in 2x SSC + 0,15% TritonX-100 bei Raumtemperatur wurden die Präparate mit einem *Goat*-Anti-Maus Alexa 488

Antikörper (GAM488) bei 37°C für 2 Stunden gefärbt. Nach dreimaligem Waschen in 2xSSC + 0,15% Triton X-100 bei Raumtemperatur wurden die Präparate in einer *Mounting*-Lösung (1xPBS, 50% Glycerol, DAPI) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Laser Scanning Mikroskop (LSM 780, Carl Zeiss).

Tabelle 5: Verwendete Antikörper im Westernblot und der Immunzytologie

Antikörper	Hersteller	Kat. Nr.	Western Blot	Verdünnung für Zytologie
Primäre Antikörper				
polyklonal H3	Sant Cruz	ab1791	1:1000	-
polyklonal H3K9me1	Abcam	ab89906	1:1000	1:100
polyklonal H3K9me2	Abcam	ab1220	1:800	1:100
polyklonal H3K9ac	Abcam	ab10812	1:1000	1:100
polyklonal H3K18ac	Abcam	ab1191	1:1000	1:100
polyklonal H3K23ac	Abcam	Ab47813	1:1000	1:100
polyklonal H3K27ac	Abcam	ab4729	1:1000	1:100
polyklonal H3K36me1	Abcam	ab9048	1:750	1:100
monoklonal H3K36me2	O. Bell et al. 2008	-	1:40	1:20
polyklonal H3K36me3	Abcam	ab9049	1:750	1:100
polyklonal H4	Abcam	ab10158	1:1000	1:100
polyklonal H4K5ac	Millipore	206839	1:1000	1:100
polyklonal H4K8ac	Millipore	205840	1:1000	1:100
polyklonal H4K12ac	Millipore	205842	1:1000	1:100
polyklonal H4K16ac	Millipore	205841	1:1000	1:100
monoklonal α -E(Z)	A. Imhof	-	1:300	-
monoklonal α -FLAG	Sigma-Aldrich	F1804	1:1500	1:100
monoklonal α -HP1a	DSHB, Iowa USA	C1A9	1:300	1:250
monoklonal α -HP1c	A. Imhof	-	1:800	-
monoklonal α -HYPB	O. Bell et al. 2008	-	1:500	1:100
polyklonal α -LSD1	Rudolph et al. 2007	-	1:2000	1:100
monoklonal α -dMES-4	O. Bell et al. 2008	-	1:40	1:15
polyklonal α -dMES-4	Walther/Rudolph	-	1:850	1:100
polyklonal α -MOF	P. Becker	-	-	1:200
polyklonal α -MSL-1	P. Becker	-	-	1:250
monoklonal α -PCNA	Millipore	05-347	1:250	-
polyklonal α -RPD3	Rudolph	-	1:2500	1:150
polyklonal α -SU(VAR)2-1	Walther	-	1:750	1:100
monoklonal α -Tubulin	Sigma-Aldrich	T6199	1:10000	-
monoklonal α -V5	Life Technologies	R96025	1:2000	1:100
polyklonal α -GFP	TP Biolabs	TP401	1:1000	1:100
Sekundäre Antikörper				
Goat anti-Mouse HRP	Life Technologies	G-21040	1:1000	-
Goat anti-Rabbit HRP	Life Technologies	G-21234	1:1000	-
Goat anti-Mouse 488	Life Technologies	A110001	-	1:100 - 1:250
Goat anti-Rabbit 488	Life Technologies	A110008	-	1:100 - 1:250
Goat anti-Mouse 555	Life Technologies	A21422	-	1:100 - 1:250

3 Ergebnisse

3.1 Das *Su(var)2-1*-Gen

3.1.1 *Su(var)2-1*, ein Suppressor für PEV im *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement

Das in dieser Arbeit analysierte *Su(var)2-1*-Gen ist neben den bereits sehr gut untersuchten Genen *Su(var)3-9* und *Su(var)3-3* einer der stärksten dominanten Suppressoren für das *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement. Der Verlust des *Su(var)2-1*-Gens führt im *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement zur Suppression des heterochromatischen *white*-Gen-Silencings. Aufgrund des Suppressoreffektes der *Su(var)2-1*-Mutante wird das in räumlicher Nähe zum Heterochromatin liegende *white*-Gen vollständig exprimiert, sodass in *Su(var)2-1*-Mutaten alle Facetten im Fliegenauge intensiv rot gefärbt sind. Durch den Suppressoreffekt in *In(1)w^{m4h}*-Tieren wird deutlich, dass das *SU(VAR)2-1*-Protein ein wichtiger Faktor bei der Etablierung von Heterochromatin ist.

3.1.2 Kartierung von *Su(var)2-1*

Die untersuchten *Su(var)2-1*-Mutanten wurden anhand ihres starken dominanten Suppressoreffektes auf *w^{m4h}* in den frühen 80er-Jahren isoliert (Reuter et al., 1982a). Die erste Kartierung des *Su(var)2-1*-Gens erfolgte zunächst durch eine P-Element vermittelte Rekombination im *Drosophila*-Männchen in die Region 31B1 im linken Arm des zweiten Chromosoms (Westphal & Suckau, persönliche Mitteilung). Um den Genlocus genauer zu kartieren, wurden verschiedene Deletionen der Region 31B1 eingesetzt. Die vom *Drosophila*-Stammzentrum in Bloomington bereitgestellten *white*-minus-Deletionen *Df(2L)BSC143*, *Df(2L)BSC144* und *Df(2L)BSC206* für den chromosomalen Bereich 31B1 konnten zunächst in das *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement eingekreuzt werden. Die Nachkommen dieser Kreuzung wurden auf einen dominanten Suppressoreffekt untersucht (Abb. 1A). In der F1-Generation der Kreuzung *w¹¹¹⁸/w¹¹¹⁸*; *Df(2L)BSC/CyO*-Weibchen mit *w^{m4h}/Y; Sco/CyRoi*-Männchen zeigten *Df(2L)BSC143* und *Df(2L)BSC144*, aber nicht die Deletion *Df(2L)BSC206* einen dominanten Suppressoreffekt auf das *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement (Abb. 1B). In balancierten *w^{m4h}*-Stämmen prägen Weibchen und Männchen mit den Deletionen *Df(2L)BSC143* und *Df(2L)BSC144*, nicht aber Tiere mit der Deletion *Df(2L)BSC206* einen dominanten Suppressoreffekt auf *In(1)w^{m4h}* aus.

Komplementationsanalysen der Deletionen *Df(2L)BSC143*, *Df(2L)BSC144* und *Df(2L)BSC206* mit einzelnen *Su(var)2-1* Allelen zeigen, dass die transheterozygoten Weibchen der Genotypen *Df(2L)BSC143/Su(var)2-1* und *Df(2L)BSC144/Su(var)2-1* steril sind. Transheterozygote Weibchen des Genotyps *Df(2L)BSC206/Su(var)2-1* sind dagegen jedoch fertil (Abb. 1D). *Su(var)2-1* befindet sich innerhalb der Region, die von den Deletionen *Df(2L)BSC143* und *Df(2L)BSC144* gemeinsam abgedeckt werden (Abb. 1C). Durch die Analyse der überlappenden Region konnte das *Su(var)2-1*-Gen auf die Gene *CG5694*, *eEF1delta* und *CG31720* eingegrenzt werden (Abb. 1C).

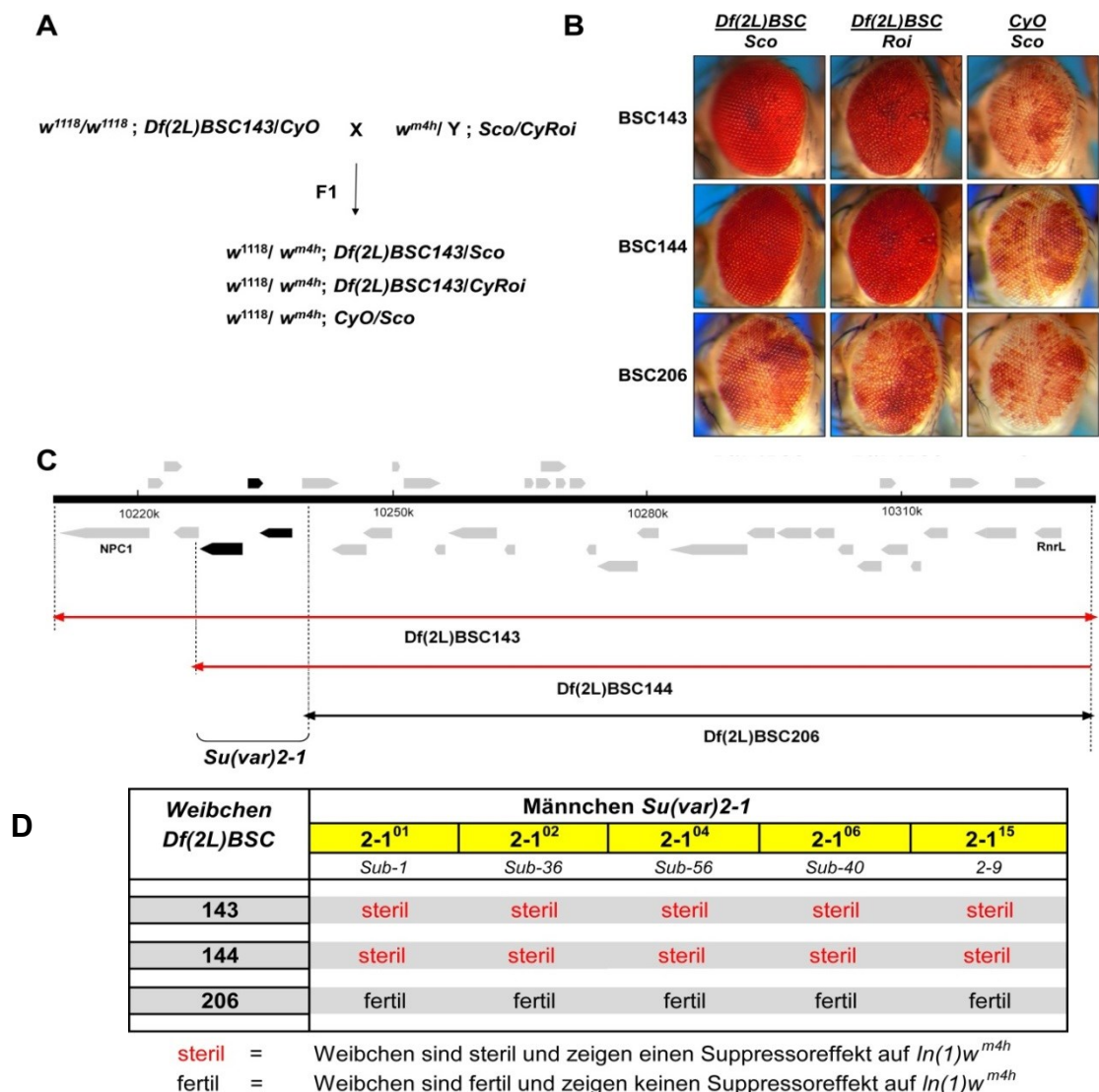


Abbildung 1: Genetische Analyse der *Su(var)2-1*-Region 31B1 durch Deletionskartierung und Komplementation. (A) Kreuzungsschema der *BSC*-Deletionen mit $In(1)w^{m4h}$. Stellvertretend für die Kreuzung wurde *Df(2L)BSC143* dargestellt. (B) Augenphänotypen der heterozygoten $In(1)w^{m4h}/w^{1118}$ F1-Weibchen (C) Deletionskartierung mit *Df(2L)BSC143*, *Df(2L)BSC144* und *Df(2L)BSC206*. In Rot unterlegt sind Deletionen, die einen Suppressoreffekt aufweisen und steril mit *Su(var)2-1*-Allelen sind. In Schwarz ist die Deletion dargestellt, welche keinen Suppressoreffekt auf $In(1)w^{m4h}$ zeigt und fertil mit *Su(var)2-1* ist. Die Lage der Gene und die Größe der einzelnen Deletionen wurden FLYBASE (FB2012_04) entnommen (McQuilton et al., 2012). (D) Komplementation der *BSC*-Deletionen mit verschiedenen *Su(var)2-1*-Allelen.

3.1.3 Erstellung der Deletion *Df(2L)ED721* zur Feinkartierung

Mit dem DrosDel-System ist es möglich, eine Deletion zwischen molekular genau definierten P-Elementen zu generieren und so gezielt Gene innerhalb der Region auszuschalten. Zur weiteren molekularen Bestimmung von *Su(var)2-1* wurden mit Hilfe der DrosDel P-Element-Kollektion kleine chromosomale Deletionen in der Region 31B1 erzeugt (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007). Zur Erstellung der DrosDel-Deletion *Df(2L)ED721* wurde zwischen den FRT-Sequenzen der *Remnant*-P-Elemente *CB-6516-3* und *5-HA-1257* eine FLP-katalysierte Rekombination durchgeführt (Abb. 2). Die so hergestellte DrosDel-Deletion *Df(2L)ED721* umfasst einen 9.764 bp großen chromosomalen Bereich in der Region 31B1. Durch die Deletion *Df(2L)ED721* werden die vier Gene *CG5694*, *CG4904*, *CG4908* und *CG5708* deletiert. In der ebenfalls verwendeten DrosDel-Deletion *Df(2L)ED729*, welche aber ca. 100 kb umfasst, werden im Gegensatz zur Deletion *Df(2L)ED721* bereits vierunddreißig Gene deletiert.

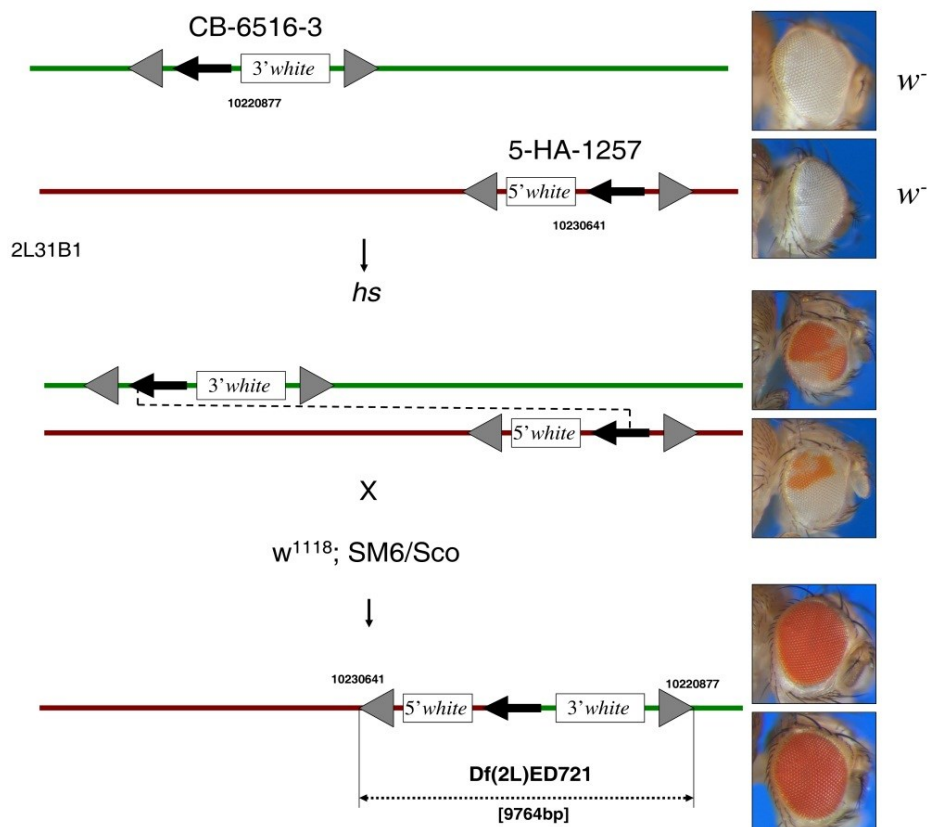
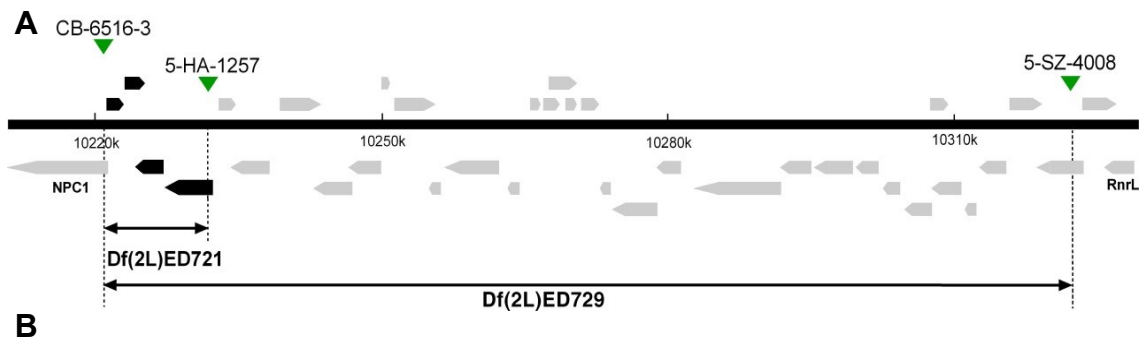


Abbildung 2: Schema zur Herstellung der DrosDel-Deletion *Df(2L)ED721*.

Die *P[rRS, w-]*-Elemente (*remnant*) *CB-6516-3* und *5-HA-1257* werden durch eine Kreuzung trans-heterozygot kombiniert. Durch einen Hitzeschock induzierte FLP-Rekombinase-Reaktion findet an den in *trans* liegenden FRT-Sequenzen der beiden P-Elemente eine homologe Rekombination statt. Die generierten Deletionen werden balanciert und beinhalten ein vollständiges *white*-Gen (w^{hs}) mit seinen 3'- und 5'-Bereichen. Die erzeugte *white*-Deletion *Df(2L)ED721* in der Region 31B1 umfasst einen Bereich von 9.764 bp.



Keuzung	F1-CyRoi Weibchen	F1-CyRoi Männchen	ED721/Su gesamt	ED721/Su Weibchen	steril/ fertil	ED721/Su Männchen
<i>Df(2L)ED721/CyRoi</i> x <i>Su(var)2-1⁰¹/CyRoi</i>	42	54	17	15	steril	2
<i>Df(2L)ED721/CyRoi</i> x <i>Su(var)2-1⁰²/CyRoi</i>	63	38	20	18	steril	2
<i>Df(2L)ED721/CyRoi</i> x <i>Su(var)2-1⁰⁴/CyRoi</i>	48	40	24	19	steril	5
<i>Df(2L)ED721/CyRoi</i> x <i>Su(var)2-1⁰⁶/CyRoi</i>	47	80	6	6	steril	0
<i>Df(2L)ED721/CyRoi</i> x <i>Su(var)2-1¹⁵/CyRoi</i>	76	93	41	25	steril	16

Abbildung 3: Komplementationsanalyse von *Su(var)2-1* Allelen mit der Deletion *Df(2L)ED721* und genomische Lage der DrosDel-Deletionen *Df(2L)ED721* und *Df(2L)ED729*.

(A) In Grau ist die Lage der Gene in der genomischen Region eingezeichnet (McQuilton et al., 2012). Die verwendeten P-Elemente *CB-6516-3* und *5-HA-1257* sind grün eingefärbt. Schwarz sind die durch *Df(2L)ED721* und *Df(2L)ED729* deletierten Gene hervorgehoben. In der Deletion *Df(2L)ED729* werden vierunddreißig Gene und in der Deletion *Df(2L)ED721* jeweils vier Gene deletiert.

(B) Komplementationskreuzung der Deletion *Df(2L)ED721* mit *Su(var)2-1* Allelen. Die transheterozygoten Weibchen (*Df(2L)ED721/Su(var)2-1*) sind steril. Die F1-Männchen sind fertil.

Die hergestellte Deletion *Df(2L)ED721* und die durch das DrosDel-Konsortium bereitgestellte Deletion *Df(2L)ED729* (Abb. 3A) wurden mit verschiedenen *Su(var)2-1* Allelen gekreuzt und die transheterozygoten Nachkommen der Kreuzung w^{m4h}/w^{m4h} ; *Df(2L)ED721/CyRoi* x w^{m4h}/Y ; *Su(var)2-1^{Allel}/CyRoi* auf weibliche und männliche Fertilität getestet (Abb. 3A).

Die verwendeten Allele *Su(var)2-1⁰¹*, *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁴*, *Su(var)2-1⁰⁶* und *Su(var)2-1¹⁵* zeigten in transheterozygoter Kombination mit der Deletion *Df(2L)ED721* und der Deletion *Df(2L)ED729* sterile weibliche Nachkommen (Abb. 3B). Die *Su(var)2-1* Allele *Su(var)2-1⁰³* und *Su(var)2-1²¹⁵* zeigten über die getesteten Deletionen eine weibliche Semisterilität und sind besondere Allele von *Su(var)2-1*. Die generierten Defizienzen *Df(2L)ED721* und *Df(2L)ED729* wurden nicht für einen Test im PEV-Rearrangement $In(1)w^{m4h}$ verwendet, da durch die Etablierung der Deletionen ein vollständiges *white*-Gen (w^{hs}) entsteht und ein w^+ -Phänotyp ausgeprägt wird. Der w^+ -Augenphänotyp überlagert vollständig einen Suppressoreffekt bei einer Testung der DrosDel-Deletionen im PEV-Rearrangement $In(1)w^{m4h}$.

Komplementationsanalysen mit der P-Element-Insertionslinie *5-HA-1257* und der Defizienz *Df(2L)ED729* ergaben ebenfalls sterile weibliche Nachkommen. Das *5-HA-1257*-P-Element, welches sich im ersten Intron des Gens *CG5694* befindet, wurde mit den genutzten *Su(var)2-1*-Allelen komplementiert. Die transheterozygoten weiblichen Nachkommen *Su(var)2-1^{Allel}/5-HA-1257* sind durch eine weibliche Sterilität gekennzeichnet. Aus den durchgeführten Komplementations- und Deletionsanalysen mit *5-HA-1257*, *Df(2L)BSC143*, *Df(2L)BSC144* und *Df(2L)ED721* lässt sich ableiten, dass das unbekannte Gen *CG5694* mit dem Gen *Su(var)2-1* identisch ist.

RT-PCR-Untersuchungen an transheterozygoten *5-HA-1257/Df(2L)ED729* zeigen, dass kein normales *Su(var)2-1* Transkript gebildet wird (Abb. 4B). Es wird ein alternatives chimäres Transkript, bestehend aus dem ersten Exon des Genes *Su(var)2-1* und dem im P-Element codierten *white*-Gen, gebildet (Daten nicht gezeigt). Da dieses chimäre mRNA-Transkript nur das erste untranslatierte Exon von *Su(var)2-1* enthält kann es für *Su(var)2-1* nicht mehr funktionell sein. Die *5-HA-1257*-Insertion im ersten Exon des *CG5694*-Genes ist somit auch ein „*loss of function*“ *Su(var)2-1*-Allel, welches eine nicht korrekt prozessierte mRNA bildet (Abb. 4B). *Su(var)2-1* kann auch transkriptionell eindeutig mit dem Gen *CG5694* in Verbindung gebracht werden (Abb. 4A-B).

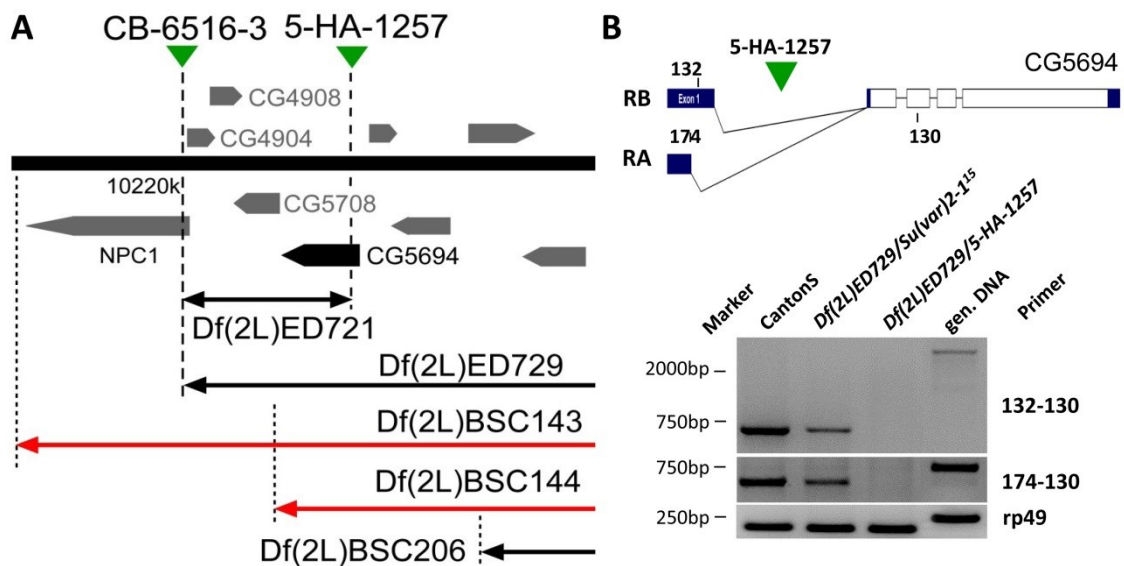


Abbildung 4: Zusammenfassung der *Su(var)2-1*-Kartierung mit eingezeichneten P-Elementen sowie den überlappenden Deletionen und RT-PCR-Untersuchung am P-Element *5-HA-1257*.

(A) In der Deletion *Df(2L)ED721*, welche mit den P-Elementen *CB-6516-3* und *5-HA-1257* hergestellt wurde, sind die kodierenden Bereiche von *Su(var)2-1/CG5694* vollständig deletiert. *Df(2L)ED721* umfasst neben *Su(var)2-1* (schwarz unterlegt) die Gene *CG4904*, *CG4908* und *CG5708*. In den Deletionen *Df(2L)ED729*, *Df(2L)BSC143* und *Df(2L)BSC144* ist *Su(var)2-1* vollständig deletiert. Die Positionen der Deletionen und die Genstruktur wurden FLYBASE entnommen. (B) RT-PCR an transheterozygoten Fliegen mit den eingezeichneten Primern. Zur RT-PCR Kontrolle wurde *rp49* verwendet.

3.1.4 Molekulare Analyse einzelner *Su(var)2-1*-Mutanten

Zur Sequenzierung einzelner *Su(var)2-1*-Allele wurden diese mit der chromosomalen Deletion *Df(2L)ED729* gekreuzt und die transheterozygoten Nachkommen molekular analysiert. Aus den transheterozygoten Tieren *Df(2L)ED729/Su(var)2-1^{Allel}* wurde für die nachfolgende Sequenzierung genomische DNA isoliert. Der gesamte Exon-Intron-Bereich des Genes *CG5694* konnte mehrmals unabhängig voneinander durch eine PCR-Reaktion amplifiziert, kloniert und anschließend sequenziert werden. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Flybase-Datenbank ausgewertet (BDGB; www.flybase.org/). Die Ergebnisse der *Su(var)2-1*-Sequenzierung sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Ergebnisse der Sequenzierung einzelner *Su(var)2-1*-Allele. In der Tabelle werden die analysierten *Su(var)2-1*-Allele, das Mutagen und die molekular bestimmten Mutationsorte aufgeführt.

Allel	Mutagen	Veränderung (bp) Wildtyp > Allel	Veränderung (AA) Wildtyp > Allel	Position (genomisch; Flybase January 2015)
<i>Su(var)2-1⁰¹</i>	spontan	1bp Insertion	T₃₄₉ Frameshift > stop	10228687
<i>Su(var)2-1⁰²</i>	EMS	75 bp Deletion	S₂₆₅ Frameshift > stop	10228939
<i>Su(var)2-1⁰³</i>	Röntgenstrahlen	14bp Deletion + 5bp Insertion	E₃₂₄₋₃₂₈ > C₃₂₄N₃₂₅	10228763
<i>Su(var)2-1⁰⁴</i>	EMS	GTA > ATA	S₁₄₉ Splicedefekt > stop	10229413
<i>Su(var)2-1⁰⁵</i>	Röntgenstrahlen	1bp Insertion	T₃₄₉ Frameshift > stop	10228687
<i>Su(var)2-1⁰⁶</i>	Röntgenstrahlen	4 bp Deletion	Q₁₅₃ Frameshift > stop	10229303
<i>Su(var)2-1¹¹</i>	EMS	1bp Insertion	T₃₄₉ Frameshift > stop	10228687
<i>Su(var)2-1¹⁵</i>	EMS	TTA > TAA	L₄₇ > stop	10229811
<i>Su(var)2-1⁹⁷</i>	EMS	1bp Insertion	T₃₄₉ Frameshift > stop	10228687
<i>Su(var)2-1¹⁴</i>	EMS	TTA > TAA	L₂₇₉ > stop	10228897
<i>Su(var)2-1¹⁵</i>	EMS	CAG > TAG	Q₃₄ > stop	10229851
<i>5-HA-1257</i>	P-Element	Im 1. Intron	Spleißdefekt	10230453

Die untersuchten *Su(var)2-1*-Allele zeigen eine Vielzahl verschiedener Sequenzveränderungen. In den durch EMS induzierten *Su(var)2-1*-Mutationen werden überwiegend Basenpaaraustausche gefunden, wohingegen Röntgenstrahl induzierte Mutationen oft genomische Umbauten und Deletionen aufweisen.

Insgesamt konnten zwei Spleißdefekt-, fünf Insertions-, zwei Deletions- und drei Punktmutationen gefunden werden. Mit Ausnahme von *Su(var)2-1⁰³* führen alle Mutationen zum Abbruch der Translation des *Su(var)2-1/CG5694*-Genes (Tab. 1). Im *Su(var)2-1⁰³*-Allel ergibt eine 14-bp-Deletion mit einer zusätzlichen 5-bp-Insertion am Mutationsort ein um drei Aminosäuren verkürztes SU(VAR)2-1-Protein.

Im Allel *Su(var)2-1⁰⁶* führte die Mutagenese zu einem Verlust von vier Basenpaaren im vierten Exon und einem nachfolgenden Abbruch der Translation von SU(VAR)2-1⁰⁶. Im *Su(var)2-1⁰⁴*-Allel befindet sich eine *Splice-Donor-Site* Mutation im dritten Exon von *Su(var)2-1*. Dadurch wird in dieser Mutante das Intron nicht aus mRNA entfernt und es entsteht nach einem „*frame-shift*“ ein vorzeitiger Translationsstopp.

Mit Ausnahme der *Su(var)2-1⁰³*-Mutante führen alle untersuchten *Su(var)2-1*-Mutationen zu einem vorzeitigen Stopp der Translation (Tab. 6). Durch den vorzeitigen Translationsstopp werden verkürzte SU(VAR)2-1-Proteine von 34 [*Su(var)2-1²¹⁵*] bis hin zu maximal 349 Aminosäuren [*Su(var)2-1⁰¹*] gebildet. Sie sind als verkürzte Proteine nicht funktionsfähig und führen zum Suppressoreffekt im Rearrangement *In(1)w^{m4h}*. Es konnten insgesamt 12 der 22 *Su(var)2-1*-Allele erfolgreich sequenziert und die Veränderung auf molekularer Ebene dem *Su(var)2-1*-Gen zugeordnet werden (Abb. 5A). Die Allele *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁴* und *Su(var)2-1⁰⁶* können auf Grund ihrer veränderten genomischen Sequenz als SU(VAR)2-1^{null}-Mutanten klassifiziert werden. Für die funktionelle Analyse von *Su(var)2-1* sind sie als „*loss of function*“-Allele durch den Verlust des SU(VAR)2-1-Proteins besonders gut geeignet.

Im ersten Intron von *Su(var)2-1* ist das *5-HA-1257* inseriert. Diese P-Insertion führt dazu, dass *CG5694* nicht korrekt transkribiert werden kann und stellt selbst ein neues *Su(var)2-1*-Allel dar. Für die genetischen, biochemischen und zytologischen Analysen wurden *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁴*, *Su(var)2-1⁰⁶* und *Su(var)2-1¹⁵* genutzt (Abb. 5B-C).

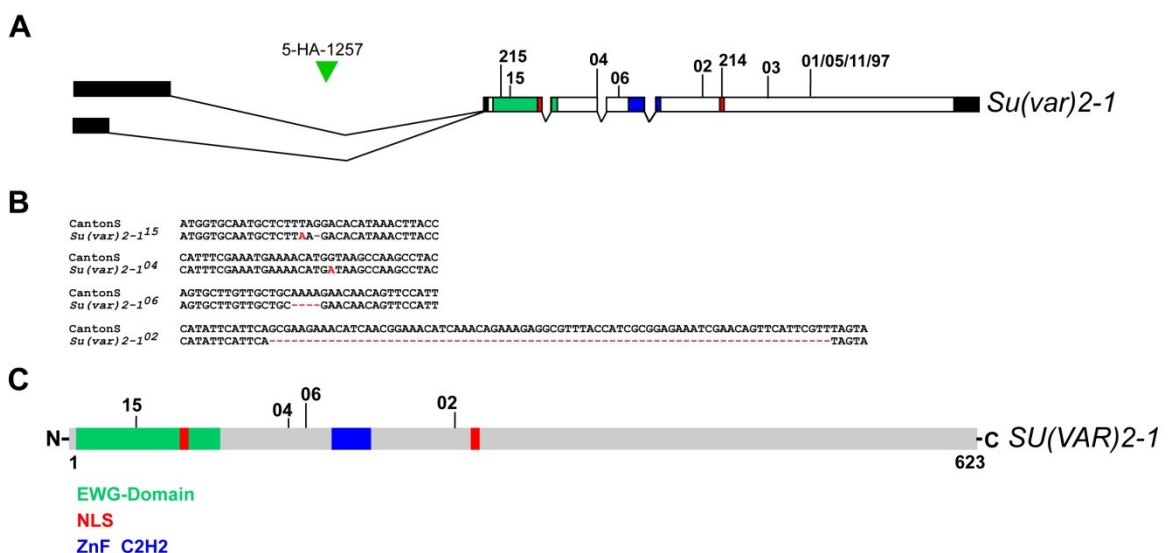


Abbildung 5: Zusammenfassung zur genomischen Lage molekular analysierter *Su(var)2-1*-Allele. (A) Genomische Lage einzelner Mutanten innerhalb der Exon-Intron-Struktur von *Su(var)2-1* (B) Die Veränderungen der genomische Sequenz von *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁴*, *Su(var)2-1⁰⁶* und *Su(var)2-1¹⁵* im Vergleich zum Flybase-Referenzstamm Canton-S. (C) Schematische Darstellung und Lage der im SU(VAR)2-1-Protein konservierten Proteinmotive EWG, NLS und Znf C2H2.

3.1.5 Erstellung definierter *Su(var)2-1*-Mutanten mit CRISPR/Cas9

Durch das CRISPR/Cas9-System ist es möglich, Genome zielgerichtet durch veränderte DNA-Bereiche zu mutieren. Optimierte Anwendungen des CRISPR/Cas9-Systems in *Drosophila* zeigten, dass nach einer gRNA-gesteuerten Cas9-Aktivität ein homologes DNA-Template (dsDNA) präzise durch *homology-directed-repair* (HDR) an vorbestimmten genomischen DNA-Sequenzen eingebaut wird (Gratz et al. 2014). Mit Hilfe von DsRED und *white* sind diese transgenen Integrationen gut nachzuweisen.

Für die Generierung einer *Su(var)2-1^{ds}*-Mutante, die keine codierenden Exone mehr enthält, wurde ein pHD-*dsRed* basiertes Donor-2-1^{ds}-Konstrukt kloniert. Dieses Konstrukt enthält neben dem Markergen *dsRed*, ca. 1kb große homologe Regionen (HR) von *Su(var)2-1*, die die gRNA1 bzw. gRNA2 flankieren (Abb. 6A). Die gRNA-Zielsequenzen wurden in den Vektor pU6-gRNA kloniert und zusammen mit dem Donor Konstrukt coinjiziert (Gratz et al. 2013). Nach der Injektion in Cas9 enthaltenen Fliegenlinien (Kondo and Ueda, 2013) konnten mit einer Rate von 9% der geschlüpften G₀-Tiere vier *Su(var)2-1^{ds}*-Transgene Fliegenlinien etabliert werden.

Für die Insertion eines C-Terminales AVI-Tag's in den endogenen *Su(var)2-1*-Locus wurde das Donor-konstrukt Donor-2-1^{AVI} und die gRNA2/gRNA3 coinjiziert (Abb. 6A) und anschließend drei *Su(var)2-1^{AVI}* Linien aufgebaut.

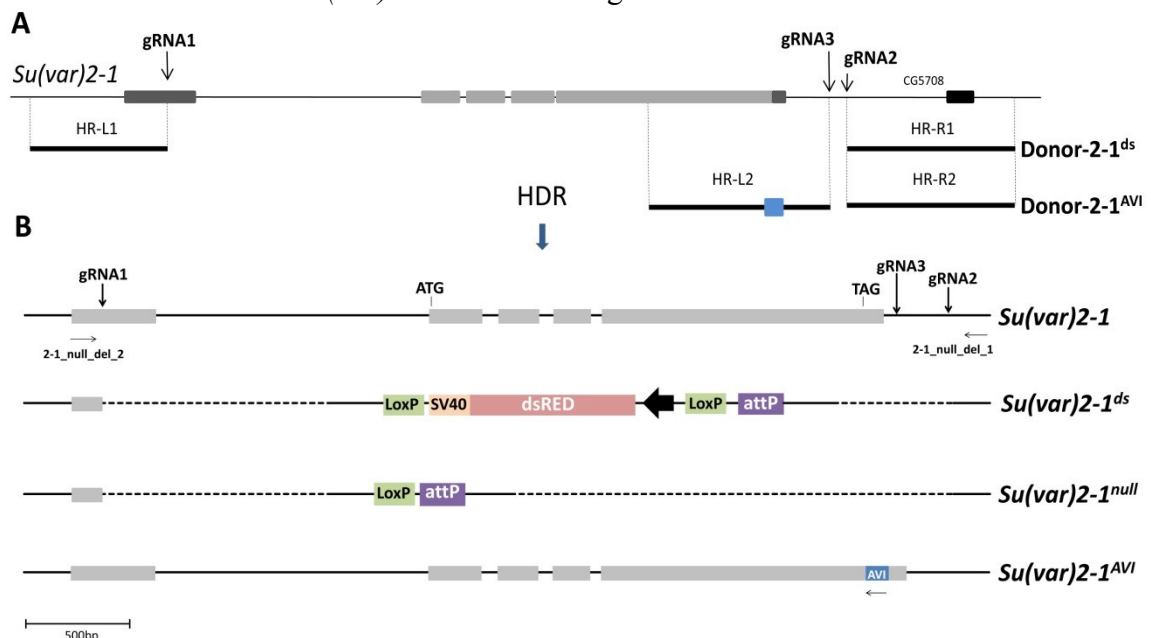


Abbildung 6: Erzeugung von *Su(var)2-1*-Mutantenmaterial mit dem CRISPR/Cas9-System. (A) Zur Erzeugung einer *Su(var)2-1*-Deletion wurden homologe Regionen (HR-L1 und HR-R1) in einen Donor-2-1^{ds}-Vektor kloniert. Für die *Su(var)2-1^{AVI}*-Insertionsmutante wurden die homologen Regionen HR-L2 und HR-R2 im Donor-2-1^{AVI}-Vektor kloniert. (B) Durch eine gRNA geleitete CAS9-Aktivität mit nachfolgender HDR entsteht eine *Su(var)2-1^{ds}*-Mutante. Sie enthält statt der codierenden Exone nur *dsRed* LoxP und attP. Nach Cre-LoxP-Rekombination ist in *Su(var)2-1^{null}* nur noch Lox-P und attP vorhanden. In *Su(var)2-1^{AVI}* ist der AVI-tag vor dem Stoppcodon/UTR des endogenen *Su(var)2-1* inseriert.

Zur Charakterisierung der *Su(var)2-1^{ds}*-Mutanten wurden *DsRed* positive Fliegenlinien mittels FISH-Analyse untersucht. Für die FISH-Probe wurde eine DIG-markierte *DsRed*-DNA-Sonde amplifiziert und hybridisiert. In der FISH konnte ein DIG-Fluoreszenzsignal an polytären Speicheldrüsenchromosomen detektiert werden (Abb.7A). Die zytogenetische Analyse zeigt eine Einzelintegration des Transgens in die Region 31B1 mit einer relativen Nähe zur chromosomalen Bande 31A1. Das deckt sich mit der Lage des *Su(var)2-1*-Locus in 31B1.

Zur molekularen Charakterisierung von *Su(var)2-1^{ds}* bzw. der *Su(var)2-1^{AVI}* wurden RT-PCR und PCR-Reaktionen durchgeführt. Mit spezifischen Primern (Abb. 7B) konnten die Mutationen *Su(var)2-1^{ds}* und *Su(var)2-1^{AVI}* bestätigt werden (Abb. 7C). In homozygoten *Su(var)2-1^{ds}*-Mutanten ist kein *Su(var)2-1*-Transkript nachweisbar (Abb.7 D). Die mRNA-Transkripte von eEF1delta werden normal gebildet was bedeutet, dass in *Su(var)2-1^{ds}* der Promotor von eEF1delta nicht mutiert ist. Die charakterisierten Mutanten *Su(var)2-1^{ds}* und *Su(var)2-1^{AVI}* wurden in das *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement eingekreuzt und die Nachkommen in der F1-Generation auf PEV analysiert.

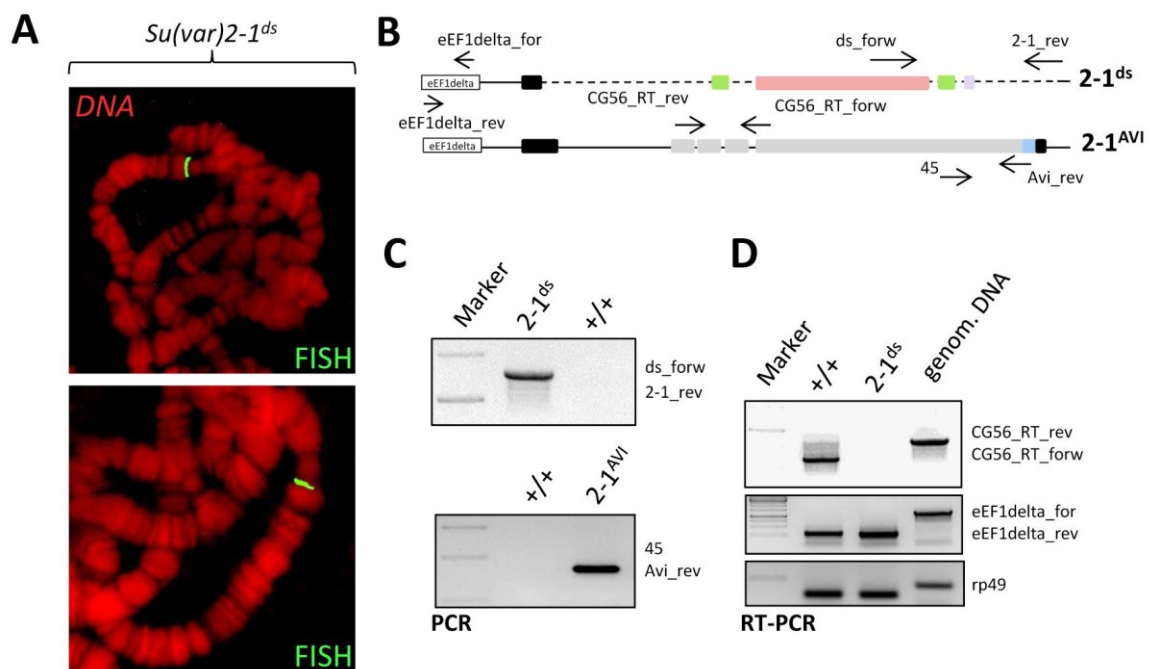


Abbildung 7: Charakterisierung von *Su(var)2-1^{ds}*- und *Su(var)2-1^{AVI}*-Mutanten. (A) Nachweis einer transgenen Einzelintegration durch FISH am *Su(var)2-1*-Locus. Die Detektion eines erfolgreichen Austausches der *Su(var)2-1*-Exone durch *DsRed* in der *Su(var)2-1^{ds}*-Mutante erfolgte mittels einer DIG-markierten *DsRed*-FISH-Sonde. (B-C) PCR-Nachweis von *DsRed* nach einem erfolgreichen Einbau in *Su(var)2-1* mit den angegebenen Primern. In heterozygoten *Su(var)2-1^{ds}* konnte *DsRed* mit den Primern ds_for und 2-1_rev nachgewiesen werden. In homozygoten *Su(var)2-1^{AVI}* wurde der AVI-tag mit den Primern 45 und Avi_rev detektiert. (D) RT-PCR an homozygoten *Su(var)2-1^{ds}*-Mutanten zeigt einen kompletten Verlust der *Su(var)2-1*-Transkripte. Die Transkription von eEF1delta ist nicht beeinflusst

Die mit dem CRISPR/Cas9-System hergestellte *Su(var)2-1^{ds}*-Mutante zeigt einen deutlichen Suppressoreffekt auf das Rearrangement *In(1)w^{m4h}* in *Drosophila melanogaster* (Abb. 8). Der starke Suppressoreffekt weist darauf hin, dass der Verlust der kodierenden Exone von *Su(var)2-1* in *Su(var)2-1^{ds}* zum beobachteten Suppressoreffekt in der PEV führt. Ein solch starker Suppressoreffekt kann auch bei den durch Röntgenstrahlen bzw. EMS induzierten *Su(var)2-1*-Mutanten beobachtet werden. Eine Komplementationsanalyse von *Su(var)2-1^{ds}* mit den Allelen *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁶* und *Su(var)2-1¹⁵* zeigt Allelie. In der Komplementationskreuzung zeigen die transheterozygoten Weibchen der F1-Generation Sterilität und bilden einen deutlichen Suppressoreffekt im *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement aus. In der *Su(var)2-1^{AVI}*-Linie wird kein Suppressoreffekt auf das *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement beobachtet. Dieses bedeutet, dass der in den endogenen Locus von *Su(var)2-1* eingebrachte AVI-tag die molekulare Funktion von *SU(VAR)2-1^{AVI}* nicht beeinflusst und somit auch als *SU(VAR)2-1^{AVI}*-Protein die endogene Funktion von *SU(VAR)2-1* beibehält.

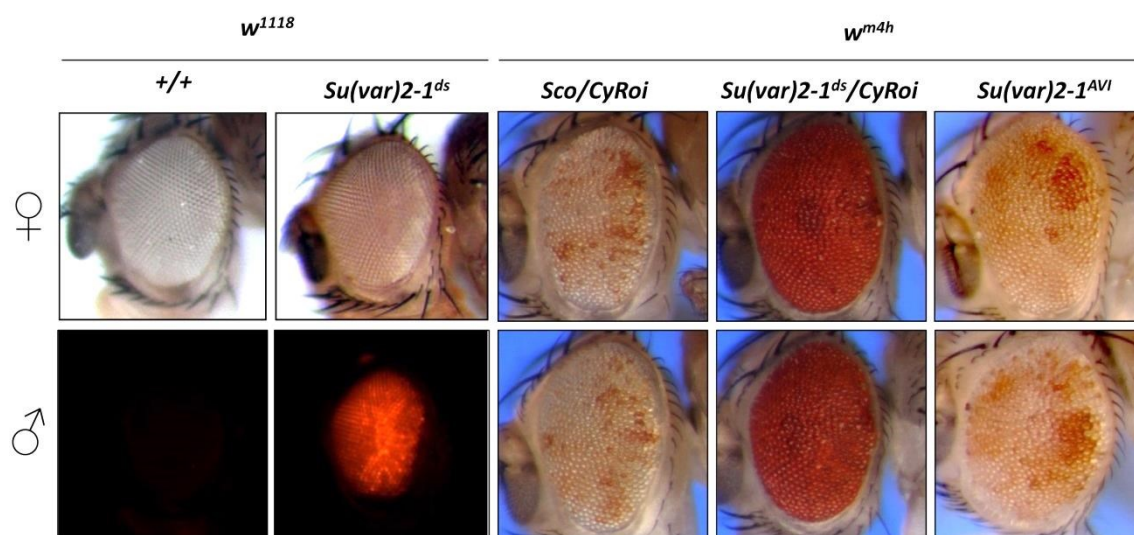


Abbildung 8: Analyse des Suppressoreffektes von *Su(var)2-1^{ds}* und *Su(var)2-1^{AVI}* auf *In(1)w^{m4h}*. Nach dem Austausch der *Su(var)2-1*-Exone gegen *DsRed*, zeigen die *Su(var)2-1^{ds}*-Mutanten ein deutliches DsRED-Signal in den Augenfacetten. Im genetischen Hintergrund des *In(1)w^{m4h}*-Rearrangements zeigt die *Su(var)2-1^{ds}*-Mutante einen ausgeprägten Suppressoreffekt auf PEV. Die Augenfacetten sind dabei Uniform rot gefärbt. *Su(var)2-1^{AVI}* zeigt keinen Suppressoreffekt in *In(1)w^{m4h}*.

3.1.6 Evolutionäre Konservierung von *SU(VAR)2-1*

Das *SU(VAR)2-1*-Protein in *Drosophila melanogaster* besteht aus 623 Aminosäuren. Im N-Terminus des Proteins zwischen der 9. und der 100. Aminosäure befindet sich eine teilweise konservierte Nrf_DNA-Binde-Dimerisierungsdomäne (Abb. 9A-B). Diese wird in EWG/NRF-Proteinen von Säugern gefunden und wird dort für eine DNA-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich gemacht (Scarpulla, 2006, 2008).

Durch Datenbankanalysen mit SU(VAR)2-1 konnten insgesamt einunddreißig orthologe Proteine gefunden werden (Veiko Krauß, persönliche Mitteilung), wobei das SU(VAR)2-1-Protein wahrscheinlich nur bei Insekten konserviert vorkommt (Abb. 10).

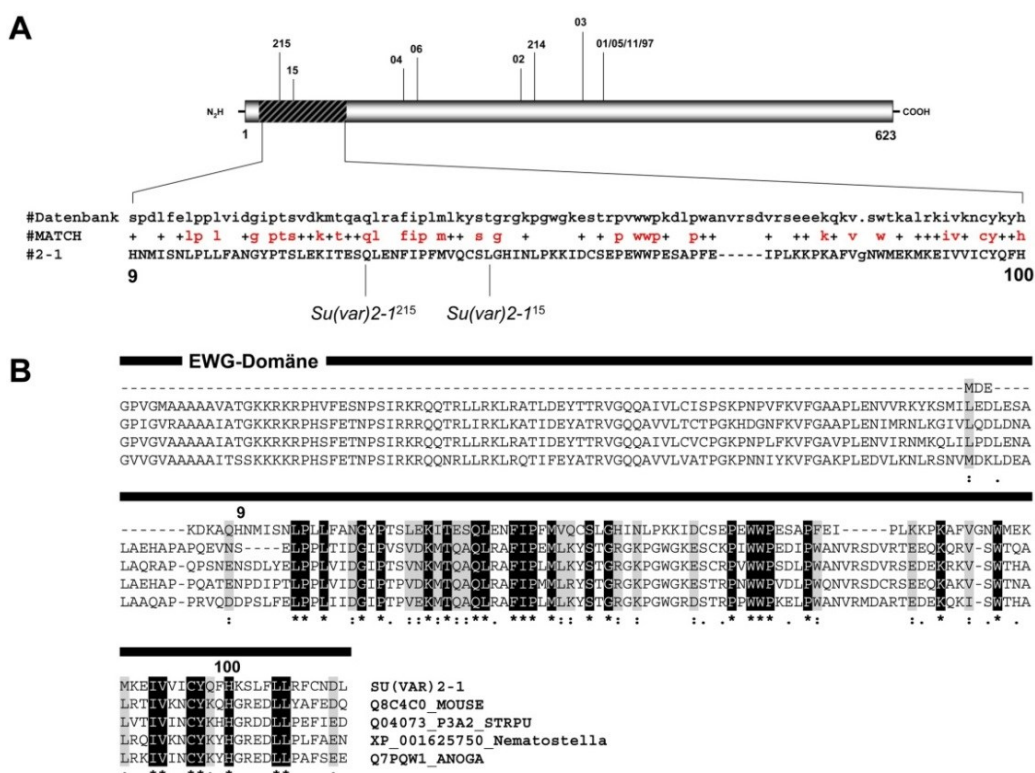


Abbildung 9: Proteinalignment des EWG-Motives (Nrf-DNA-Bine-Dimerisierungs-Motiv) in SU(VAR)2-1. (A) Proteinsequenzvergleich der EWG-Domäne in *erect wing* und *Su(var)2-1*. Die konservierte EWG-Domäne ist grau schraffiert. Die Mutationen *Su(var)2-1²¹⁵* und *Su(var)2-1¹⁵* befinden sich in der EWG-Domäne (B) Alignment verschiedener EWG-Domänen enthaltender Proteine aus Maus (Nrf1), *Strongylocentrotus purpuratus* (DNA-binding-protein P3A2), *Nematostella* (XP_001625750) und *Anopheles gambiae* (Q7PQW1). Die konservierten Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet.

Der Transkriptionsfaktor EWG (*erect wing*) ist das einzige in *Drosophila melanogaster* gefundene Protein welches konservierte Aminosäuren mit SU(VAR)2-1 aufweist (Abb. 9A). Beide Proteine haben einen Teilbereich der EWG-Domäne gemeinsam, wobei SU(VAR)2-1 zusätzlich eine weitere konservierte Proteinsequenz besitzt (Abb. 10). Dieses Motiv eine Struktur von Zinkfinger-Domänen des Typs ZnF_C2H2 (SMART, 2012) auf, ist mit ihnen aber nicht identisch. Der ZnF-Typ scheint nur in SU(VAR)2-1 vorzukommen und zeigt eine β -Faltblatt- und α -Helix-Struktur (Pei and Grishin, 2007).

<i>Drosophila melanogaster</i>	P P F D I Y L C D N C D A E L Y S K E A I L E H E N I C C
<i>Bombyx mori</i>	R A A D I Y L C D N C D S H F D N L N N L Q V H E R L C H
<i>Apis mellifera</i>	S T E D I Y L C D N C D A E F I G L E K M K E H E R V C Y
<i>Daphnia pulex</i>	P I N D I Y L C D Y C G A D F S S L S A I K A H E A K C M
consensus of 31 species	P X X D I Y L C D N C D A E L X S X E A X X E H E X X C X
Strukturvorhersage	sheet helix helix

Abbildung 10: Zinkfingerähnliches Motiv in SU(VAR)2-1. Proteinalignment aus *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Apis mellifera*, *Daphnia pulex* und der Konsensussequenz aus 31 Arten. Eine Strukturvorhersage der Motive zeigt ein β -Faltblatt bzw. eine α -Helix-Struktur (Pei and Grishin, 2007).

3.1.7 Mutantenrettung des *Su(var)2-1*-Suppressoreffekts

3.1.7.1 Rettung des *Su(var)2-1*-Phänotyps mit Rescue-Konstrukten

Neben dem Nachweis von endogenem SU(VAR)2-1-Protein mit spezifischen polyklonalen Antikörpern erfolgten Untersuchung zur Verteilung von SU(VAR)2-1 sowie eine Mutantenrettung mit genomischen Fusionskonstrukten.

Durch genomische Konstrukte, welche über Vektorsysteme in das *Drosophila*-Genom eingebracht werden, ist es möglich, die Effekte, die durch Mutationen hervorgerufen werden, teilweise bzw. vollständig zu kompensieren. Die genomische Region, welche den gesamten *Su(var)2-1*-Locus umfasst, wurde in verschiedene *Drosophila*-Transformationsvektoren kloniert. Um die endogenen Expressionsverhältnisse zu erhalten wurden verschiedene genomische *Rescue*-Konstrukte hergestellt (Abb. 11).

In den Konstrukten pP[RS5-*Su(var)2-1*-V5-3xFLAG] und pP[RS5-*Su(var)2-1*-V5] wurden der genomische *Su(var)2-1*-Bereich in pP[RS5]-P-Element-Vektoren mit verschiedenen Fusionsanteilen (V5 und 3xFLAG) kloniert und transgene Fliegenlinien hergestellt (Abb. 11). Neben den pP[RS5]-basierten Konstrukten, die nur eine zufällige Integration ins *Drosophila*-Genom ermöglichen, wurde alternativ das pP[UAST.attB]-*phiC31*-Integrase-System (Gendatenbanknummer: EF362409) für ortsspezifische Genomintegration genutzt (Bischof et al., 2007). Das p[UASTattB- Δ eEF1-Strep-*Su(var)2-1*-V5-3xFLAG]-Konstrukt enthält zusätzlich das *eEF1Delta*-Gen, in welches nachträglich durch Mutagenese ein Stopcodon eingeführt wurde (Abb. 11B). So kann sichergestellt werden, dass das Konstrukt den vollständigen unbekanntem Promotorbereich von *Su(var)2-1* enthält und *eEF1Delta* durch die Mutation „*loss of function*“ ist.

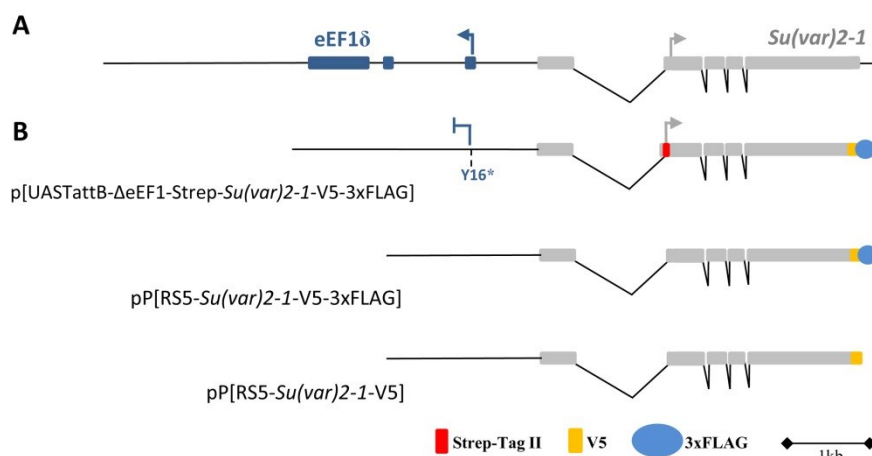


Abbildung 11: Konstrukte zur Mutantenrettung von *Su(var)2-1*. (A) Genomische Region, an der die *Rescue*-Konstrukte amplifiziert wurden. (B) Das Konstrukt p[UAST, attB-eEF1-Strep-*Su(var)2-1*-V5-FLAG] enthält *eEF1delta*, dieses wurde mutagenisiert, so dass eine Translation vorzeitig abbricht (Y16-Stop). Die pP[RS5]-Konstrukte sind verkürzt und haben kein vollständiges *eEF1delta*. Die modifizierten 5'- bzw. 3'-Bereiche sind durch die Proteintags wie V5, 3xFLAG und Strep-Tag II gekennzeichnet.

Die Expression von *Su(var)2-1* in den genomischen Konstrukten steht unter Kontrolle des endogenen Promotors. Dadurch werden die endogenen Expressionsverhältnisse von *Su(var)2-1* im *Su(var)2-1*-Transgen erhalten und eine Verteilung von SU(VAR)2-1-Fusionsproteinen ist unter endogener Kontrolle analysierbar.

Für die *Su(var)2-1*-Mutantenrettung wurden homozygote bzw. heterozygote transgene Weibchen w^{m4h}/w^{m4h} ; +/+; *Transgen-Konstrukt/TM3* mit den *Su(var)2-1*-Mutantenmännchen w^{m4h}/Y ; *Su(var)2-1^{Allel}/CyRoi* gekreuzt. Die genomischen Rettungs-Konstrukte, welche zusätzlich zum genomischen Bereich verschiedene Fusionsanteile wie V5- bzw. 3xFLAG-Tag enthalten (Abb. 11), konnten den *Su(var)2-1* Suppressoreffekt in verschiedenen *Su(var)2-1*-Mutantenlinien retten. Die beobachtete vollständige oder partielle Rettung erfolgte sowohl mit den auf *pP[RS5]* basierten Konstrukten (Abb. 12A) als auch mit den *pP[UAST]*-basierten Konstrukten (Abb. 12B).

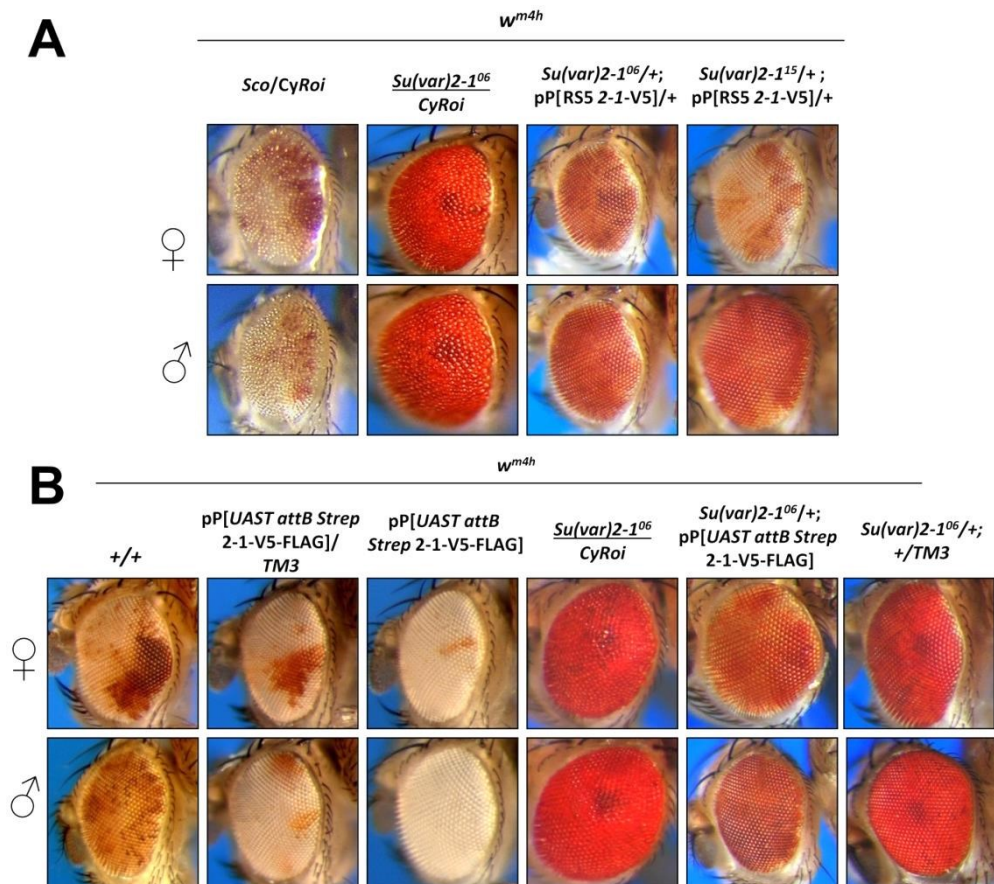


Abbildung 12: Rettung des *Su(var)2-1*-Suppressoreffektes mit genomischen *Su(var)2-1*-Konstrukten. (A) *Su(var)2-1⁰⁶* zeigt einen starken Suppressoreffekt in *In(1)w^{m4h}*. Der Suppressoreffekt der Allele *Su(var)2-1⁰⁶* und *Su(var)2-1¹⁵* können mit dem *pP[RS5 Su(var)2-1-V5]*-Konstrukt gerettet werden. Die Augenfacetten sind nicht Suppressor. Dargestellt sind der w^{m4h} -Phänotyp, der *Su(var)2-1*-Suppressor-Phänotyp und die F1-Nachkommen der Rettungskreuzung. (B) Mutantenrettung des Suppressoreffektes in der *Su(var)2-1⁰⁶*-Mutante mit dem *pP[UAST attB Strep-Su(var)2-1-V5-FLAG]*-Konstrukt. Gezeigt sind die Augenphänotypen von w^{m4h} -Weibchen und -Männchen sowie die heterozygote und homozygote Integrationslinie *Strep-Su(var)2-1-V5-FLAG*. Der Suppressoreffekt von *Su(var)2-1⁰⁶* kann durch *pP[UAST attB Strep-Su(var)2-1-V5-FLAG]* gerettet werden. Der TM3-Balancer hat keinen Effekt.

3.1.7.2 Fosmid-Klone einer pFlyFos-Bibliothek können für eine Mutantanalyse genetisch und molekular angepasst werden

Zur weiteren vollständigen Rettung der *Su(var)2-1*-Mutanteneffekte, wurden mit Hilfe von Fosmiden (pFlyFos) alternative genomische Konstrukte generiert (Ejsmont et al., 2009). Neben *Su(var)2-1* und *dMes-4* konnten zusätzlich siebzehn modifizierte Fosmid-Konstrukte für wichtige Heterochromatinfaktoren hergestellt werden. Die Konstrukte enthalten am 5'- bzw. am 3'-Ende definierte synthetische Sequenzmodifikationen, aber insgesamt alle regulatorischen Elemente der endogenen Genstruktur. Diese genomischen pFlyFos-Konstrukte konnten mit dem bereits genutzten *phiC31*-Intergase-System ortsspezifisch in das *Drosophila*-Genom integriert werden. In Tabelle 7 sind alle neunzehn hergestellten pFlyFos-Fusionskonstrukte und die daraus bereits zum Teil etablierten transgenen *Drosophila*-Linien dargestellt.

Tabelle 7: Zusammenstellung etablierter stabiler transgener pFlyFos-Fliegenlinien (FF) nach spezifischer Modifikation an selektierten pFlyFos-Klonen.

Dargestellt sind die Genbezeichnung, die CG-Nummer der einzelnen Gene, die Nummer der pFlyFos-Klone für die entsprechende Zielgene, die Art und Position des eingefügten Fusions-Tag-Motives (siehe Material und Methoden) sowie die hergestellten Konstrukte und die balancierten Stammlinien.

<i>Su(var)</i>	Gen	FlyFos-Vektor (Fosmidgröße)	Region nach http://flybase.org/ (R5.27)	Fusions- Tag	<i>attp</i> -Stelle	etablierte Stämme
<i>Su(var)2-8</i>	CG2807	FlyFos028731 (33613bp)	2L:547714..581327	V5-C	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
<i>Suv4-20</i>	CG13363	FlyFos023442 (32866bp)	X:541037..573903	V5-C	<i>attp2</i>	-
<i>Suv4-20</i>	CG13363	FlyFos023442 (32866bp)	X:541037..573903	GFP-C	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
<i>Su(var)2-1</i>	CG5496	FlyFos026029 (39806bp)	2L: 10201601..10241406	V5-C	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
<i>Su(var)2-1</i>	CG5496	FlyFos026029 (39806bp)	2L: 10201601..10241406	V5-N	<i>attp2</i>	-
<i>Su(var)2-1Δ</i>	CG5496	FlyFos026029 (39806bp)	2L: 10201601..10241406	Stop	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
HP1	CG8409	FlyFos030711 (35230bp)	2L:8199309..8234539	V5-C	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
CG5381	CG5381	FlyFos018655 (37756bp)	2L: 10279485..10317240	V5-C	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
RpD3	CG7471	FlyFos023080 (38895bp)	3L:4607067..4645962	V5-C	VK00001	-
<i>Su(var)3-9</i>	CG6476	FlyFos026659 (37406bp)	3R:11061825..11099231	V5-C	<i>attp40</i>	-
Gen5	CG4107	FlyFos028109 (38422bp)	3L:12493527..12531949	V5-C	VK00001	<i>In(1)w^{4h}</i> ; CyRoi/ <i>Flyfos</i>
<i>Su(var)3-6</i>	CG5650	FlyFos019660 (31303bp)	3R:8233814..8265117	V5-C	VK00001	-
<i>Su(var)3-7</i>	CG8599	FlyFos024374 (34599bp)	3R:9081640..9116239	V5-C	VK00001	-
SuUR	CG7869	FlyFos026479 (34136bp)	3L:11039439..11073575	V5-C	<i>attp40</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; CyRoi/ <i>Flyfos</i>
<i>mod(mdg4)</i>	CG32491	FlyFos031052 (30914bp)	2L:2875662..2906575	V5-C	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
E(z)	CG6502	FlyFos031509 (25632bp)	3L:10611197..10636829	V5-N	VK00001	-
<i>dMes-4</i>	CG4976	FlyFos024854 (31114bp)	3R:23754595..23785709	V5-N	<i>attp40</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; CyRoi/ <i>Flyfos</i>
egg	CG12196	FlyFos016198 (29361bp)	2R:20649790..20679151	V5-N	<i>attp2</i>	<i>In(1)w^{4h}</i> ; TM3/ <i>Flyfos</i>
<i>Jil-1</i>	CG6297	FlyFos030223 (32360bp)	3L:11063710..11096070	V5-C	<i>attp40</i>	-

Zur Überprüfung der genomischen pFlyFos-Konstrukte und zum Test auf eine generelle zytologische und biochemische Nutzbarkeit der pFlyFos-Klone, wurde ein Klon für das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) in einem Vorversuch genauer charakterisiert. In dem isolierten pFlyFos-Plasmid für den *Hpl1*-Genlocus wurde der C-Terminus des *Hpl1*-

Genes so modifiziert, dass ein HP1-V5-FLAG-Fusionsprotein exprimiert wird. Das HP1-Fusionsprotein steht dabei im pFlyFos-Konstrukt unter Kontrolle des endogenen *Hpl*-Promotors.

In immunzytologischen Untersuchungen an polytären Speicheldrüsenchromosomen der transgenen FF-HP1-V5-FLAG-*Drosophila*-Fliegenlinie konnte eine Färbung des Chromozentrums mit den zwei unabhängigen Fusions-Tag-spezifischen Antikörpern (V5 und FLAG) gezeigt werden (Abb. 13A). Die Bindung von HP1-V5-FLAG-Fusionsprotein am Chromozentrum ist gleich dem Verteilungsmuster des endogenen Wildtyp-HP1-Proteins (Fanti et al., 1998). Das Verteilungsmuster des HP1-Fusionsproteins und das des endogenen HP1-Proteins sind deckungsgleich und zeigen, dass der V5-FLAG-Fusionsanteil die Bindung nicht beeinflusst. Die Verteilung von HP1-V5-FLAG entspricht auch in Ovarien der Verteilung des Wildtyp HP1-Proteins (Abb. 13B).

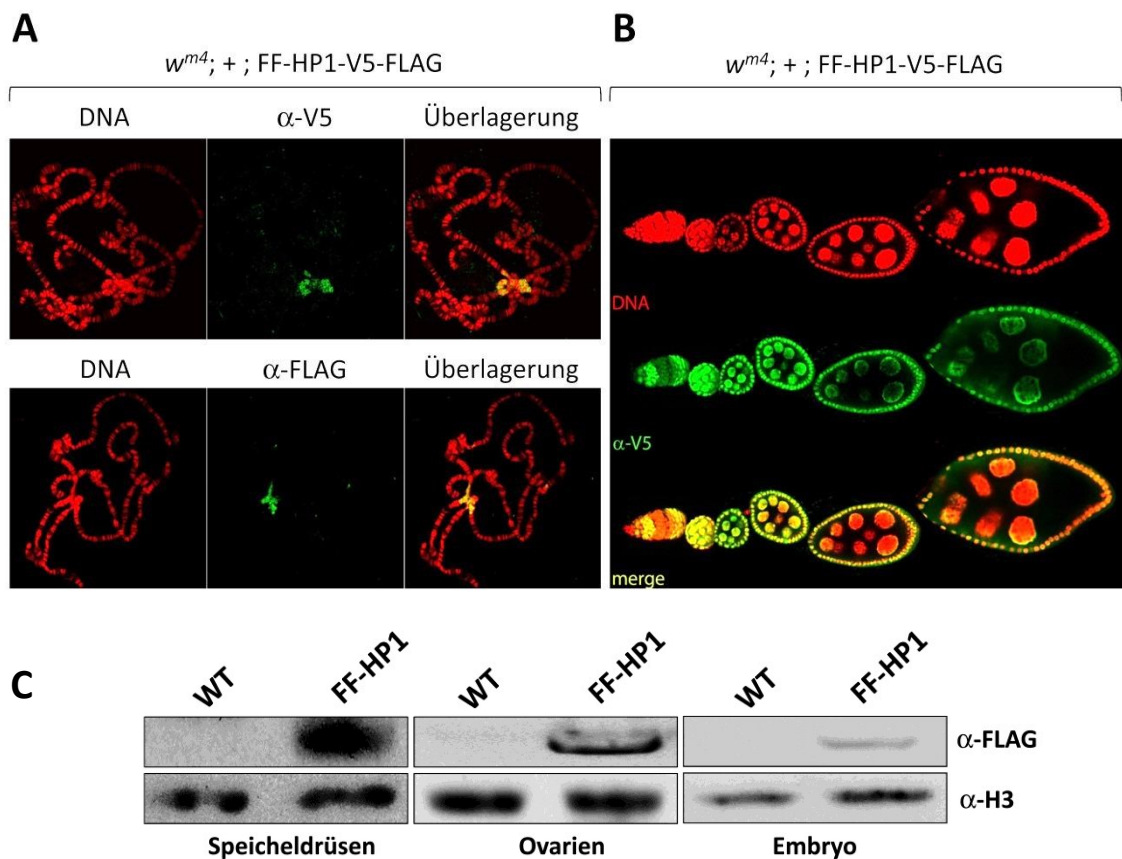


Abbildung 13: Untersuchung und Charakterisierung von pFlyFos-kodierten HP1-V5-FLAG mit immunzytologischen Methoden und Western-Blot.

(A) Lokalisation von HP1-V5-FLAG an polytären Speicheldrüsenchromosomen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit monoklonalen anti-V5- und anti-FLAG-Antikörpern, welche den V5- bzw. FLAG-Fusionsanteil des Proteins erkennen. (B) Verteilung von HP1-V5-FLAG während der Oogenese in den Ovariolen transgener HP1-pFlyFos-Linien. Die Färbung der DNA in allen dargestellten zytologischen Präparaten erfolgte mit DAPI. (C) Nachweis der HP1-Fusionsproteine im Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern an Extrakten aus Speicheldrüsen, Ovarien und Embryonen. Als Ladekontrolle wurde der anti-H3-Antikörper verwendet.

In den untersuchten Ovarien der transgenen HP1-pFlyFos-Linien ist das HP1-V5-FLAG-Protein in allen Stadien der Ovarienentwicklung zu finden. Das HP1-V5-FLAG-Protein ist ubiquitär in den somatischen Zellen, aber auch in Keimbahnzellen, nachweisbar (Abb. 13B). Die Ovarienentwicklung und die Oogenese werden durch das zusätzlich exprimierte HP1-V5-FLAG-Protein nicht beeinflusst. Der Nachweis des HP1-V5-FLAG-Proteins erfolgte neben dem zytologischen Nachweis auch erfolgreich an Proteinextrakten im Western-Blot mit monoklonalen anti-V5- bzw. anti-FLAG-Antikörpern (Abb. 13C). In Speicheldrüsen und ovarialen Extrakten wurde rekombinantes HP1-V5-FLAG-Protein sehr gut und in etwas schwächerer Konzentration auch an embryonalen Extrakten (0–12 h) nachgewiesen (Abb. 13C).

3.1.7.3 Rettung des *Su(var)2-1*-Phänotyps mit modifizierten Fosmiden

Nach den Voruntersuchungen am HP1-V5-FLAG-Protein konnte, als alternative Methode zur P-Element vermittelten Mutantenrettung, die ca. 30-40 kb umfassenden pFlyFos-Konstrukte für eine Rettung von *Su(var)2-1* genutzt werden.

Aus einer bestehenden *FlyFos*-Bibliothek (MPI-CBG, AG Pavel Tomancak) wurde ein *Su(var)2-1* enthaltender *pFlyFos*-Klon identifiziert und isoliert (Tab. 7). Der pFlyFos-Klon mit der Datenbanknummer 026029 enthält einen 39805bp großen genomischen Bereich [2L:10201601..10241406] in der *Su(var)2-1*-Region 31B1. Der in diesen pFlyFos inserierte genomische Bereich enthält die vollständigen *Su(var)2-1* Locussequenzen mit all seinen noch unbekanntem regulatorischen Kontrollelementen.

Um neben der *Su(var)2-1*-Mutantenrettung weitere Charakterisierung von SU(VAR)2-1 durchzuführen zu können, wurden verschiedene Konstrukte durch Modifikationen am *Su(var)2-1* Locus innerhalb des pFlyFos-Klons 026029 hergestellt. Das pFlyFos-Konstrukt FF-(2-1)-V5 enthält den vollständigen *Su(var)2-1*-Locus mit einer in am 3'-Bereich eingefügten Fusionskassette (Abb. 14). Für Kontrollexperimente wurde das Mutantenkonstrukt FF-(Δ2-1)-V5 erzeugt, welches durch eine Insertion der Fusionskassette in *Su(var)2-1* eine „*loss of function*“-Mutante für *Su(var)2-1* innerhalb der pFlyFos-Klons 026029 erzeugt (Abb. 14). Die verwendete Fusionskassette für die Modifikationen des *Su(var)2-1*-Gens enthält ein Set von Protein-Fusionstags wie BLRK-V5-3xFLAG-Stop. Damit ist es möglich, V5- und FLAG-Fusionsproteine unter Kontrolle des endogenen Promotors zu exprimieren. Durch die endogene Kontrolle der SU(VAR)2-1-Fusionsproteine werden sie in den transgenen Fliegenstämmen gewebe- und entwicklungspezifisch gebildet.

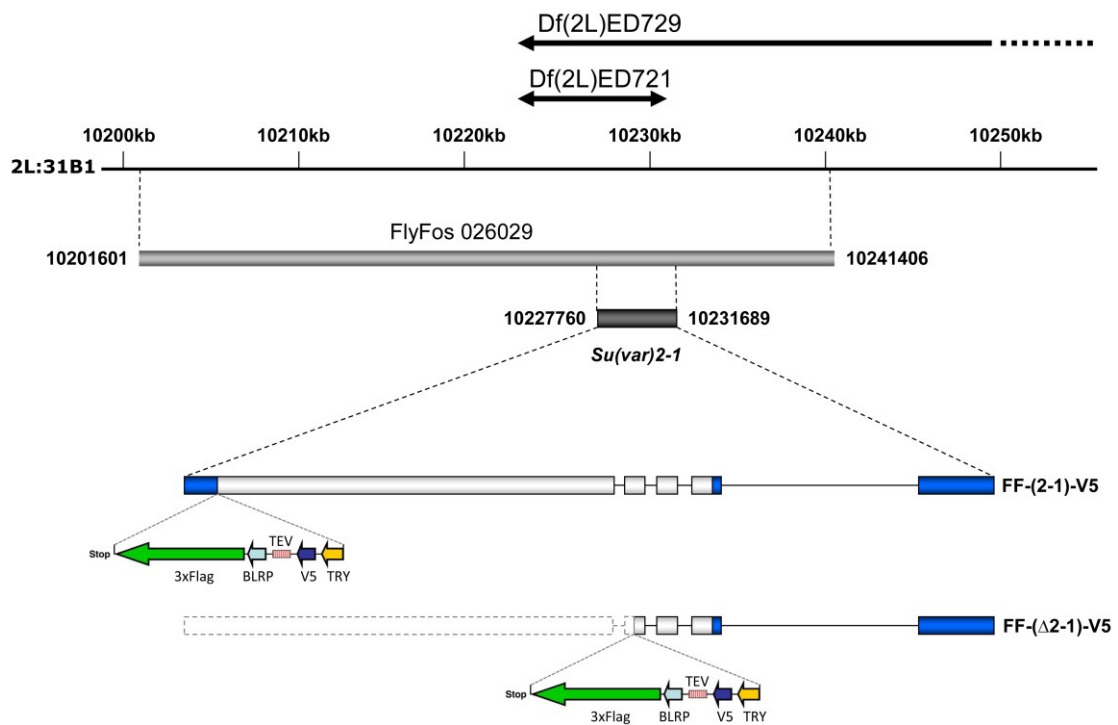


Abbildung 14: Genomische Region des isolierten pFlyFos-Klons 026029 und hergestellte pFlyFos-*Su(var)2-1*-Konstrukte. Der isolierte pFlyFos-Klon (hellgrau) enthält den vollständigen genomischen *Su(var)2-1*-Locus (dunkelgrau) mit seinen endogenen regulatorischen Sequenzen. Der pFlyFos-Klon wurde genutzt, um zwei unabhängige Konstrukte für die Etablierung von transgenen *Drosophila*-Linien zu erstellen. Das Konstrukt FF-(2-1)-V5 enthält das vollständige *Su(var)2-1*-Gen mit einem C-terminalen V5-FLAG-Fusionsteil. Im Mutantenkonstrukt FF-(Δ 2-1)-V5 wurde durch die Insertion der V5-FLAG-Fusionskassette in das *Su(var)2-1*-Gen eine *loss of function*-Mutante erzeugt. Dieses Mutanten-Konstrukt entspricht dem des sequenzierten *Su(var)2-1*⁰⁶-Allels. Durch die Insertion der Fusionskassette entsteht ein *frame shift* und das verkürzte SU(VAR)2-1⁰⁶-Mutanten Protein.

Für die Erzeugung „*loss of funktion*“-Mutante pFlyFos FF-(Δ 2-1)-V5 erfolgte zunächst eine Auswertung der einzelnen Sequenzen der bereits analysierten *Su(var)2-1*-Allele. Die erfolgte Insertion einer Proteinfusionskassette im Mutantenkonstrukt entspricht dem Integrationsort der analysierten *Su(var)2-1*⁰⁶-Mutante, die ein verkürztes SU(VAR)2-1⁰⁶-Fusionsprotein von 153 Aminosäuren bildet (Abb. 14) Durch die erzeugte „*loss of funktion*“-Mutation im *Su(var)2-1*-Locus des pFlyFos-Klon-Konstruktes FF-(Δ 2-1)-V5 sollte eine Mutantenrettung im Gegensatz zum Wildtyp-Konstrukt pFlyFos FF-(2-1)-V5 nicht möglich sein (Abb. 14).

Die pFlyFos-Konstrukte wurden nach ihrer Fertigstellung und Sequenzierung unabhängig voneinander in ausgewählte *Drosophila*-Stämme injiziert (Ejsmont et al., 2009) und gemäß ihrer Lokalisation mit Balancer-Chromosomen stabilisiert. Für alle *Su(var)2-1*-pFlyFos-Konstrukte wurden transgene Fliegenlinien etabliert (Tabelle 7). Nach der Kreuzung der pFlyFos-Transgene FF-(Δ 2-1)-V5 und FF-(2-1)-V5 mit dem *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement zeigte sich ein charakteristischer *white*-mottled-Augen-

Phänotyp (Abb. 15A, Spalte 2 und 4). Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine zusätzliche Kopie von *Su(var)2-1* zu weiterer Inaktivierung des *white*-Gens führt und ein Triplo-Enhancereffekt von *Su(var)2-1* nicht bzw. nur sehr schwach ausgeprägt ist. Liegt das Konstrukt FF-(2-1)-V5 homozygot vor, so ist durch zwei zusätzliche Kopien von *Su(var)2-1* ein leichter Enhancereffekt auf PEV im Männchen zu beobachten (Abb. 15A, Spalte 3). Eine Expression von *Su(var)2-1* durch vier genomische Kopien von *Su(var)2-1* führt im Männchen zum Aufbau von Heterochromatin in *In(1)w^{m4h}*. In der Kreuzung $w^{m4h}/w^{m4h}; +/+; \text{FF-(2-1)-V5/FF-(2-1)-V5} \times w^{m4h}/Y; \text{Su(var)2-1}^{06}/\text{CyRoi}$ und der reziproken Kreuzung konnte eine Rettung des *Su(var)2-1*⁰⁶-Suppressoreffektes durch das *pFlyFos*-Konstrukt FF-(2-1)-V5 gezeigt werden (Abb. 15B). Das Mutantenkonstrukt FF-(Δ2-1)-V5 war nicht in der Lage, den Suppressoreffekt der Mutante *Su(var)2-1*⁰⁶ zu retten (Abb. 15B).

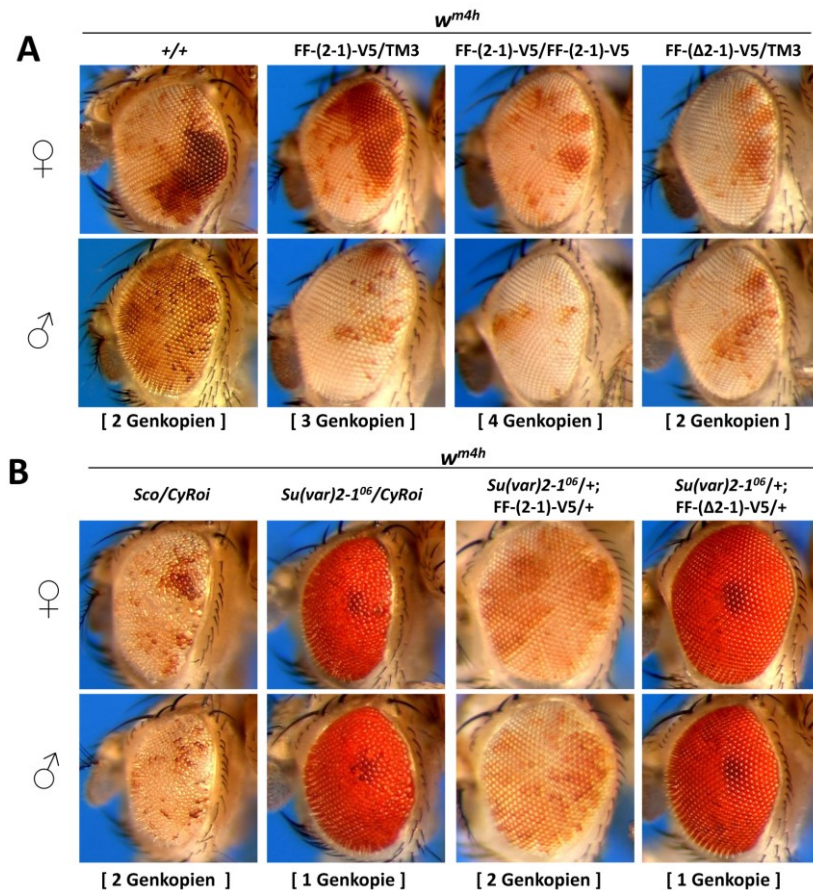


Abbildung 15: Rettung des *Su(var)2-1*-Suppressoreffektes mit *pFlyFos*-Konstrukten. (A) Die *pFlyFos*-Konstrukte wurden in das *In(1)w^{m4h}*-Testsystem gekreuzt. Getestet wurden das Wildtyp-Konstrukt FF-(2-1)-V5 in heterozygot und homozygot. Das Mutantenkonstrukt FF-(Δ2-1)-V5 zeigt heterozygot keinen Suppressoreffekt in *In(1)w^{m4h}*. Unter den Abbildungen ist die Anzahl funktioneller *Su(var)2-1*-Genkopien dargestellt. (B) Mutantenrettung der *Su(var)2-1*⁰⁶ Mutante durch das Konstrukt FF-(2-1)-V5. Das Mutantenkonstrukt FF-(Δ2-1)-V5 kann den Suppressoreffekt der Mutante *Su(var)2-1*⁰⁶ nicht retten, da die Augen noch einen deutlichen Suppressoreffekt aufweisen.

Die erfolgreiche Mutantenrettung zeigt, dass eine Expression von *Su(var)2-1* im Wildtyp-Konstrukt FF-(2-1)-V5 den Verlust der Mutante kompensieren kann (Abb. 15B, Spalte 3). Weiterhin kann ausgeschlossen werden, dass andere Gene, die ebenfalls im *pFlyFos*-Klon codiert sind, für die Reversion des Suppressoreffektes verantwortlich sind, da eine Rettung des Suppressoreffektes mit dem Mutantenkonstrukt FF-(Δ2-1)-V5 nicht mehr möglich ist (Abb. 15B, Spalte 4). In weiteren *Rescue*-Kreuzungen konnte auch für die Allele *Su(var)2-1⁰¹*, *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁴*, *Su(var)2-1⁰⁶*, *Su(var)2-1¹⁵* und *Su(var)2-1²¹⁵* mit dem Wildtyp-Konstrukt FF-(2-1)-V5 eine Rettung des Suppressoreffektes nachgewiesen werden (Abb. 16, F1). Die erfolgreiche Rettung der Allele zeigt auch, dass die Fusionskassette, welche am C-terminus von *Su(var)2-1* eingefügt wurde, keinen Effekt auf die Funktion des SU(VAR)2-1-Proteins hat.

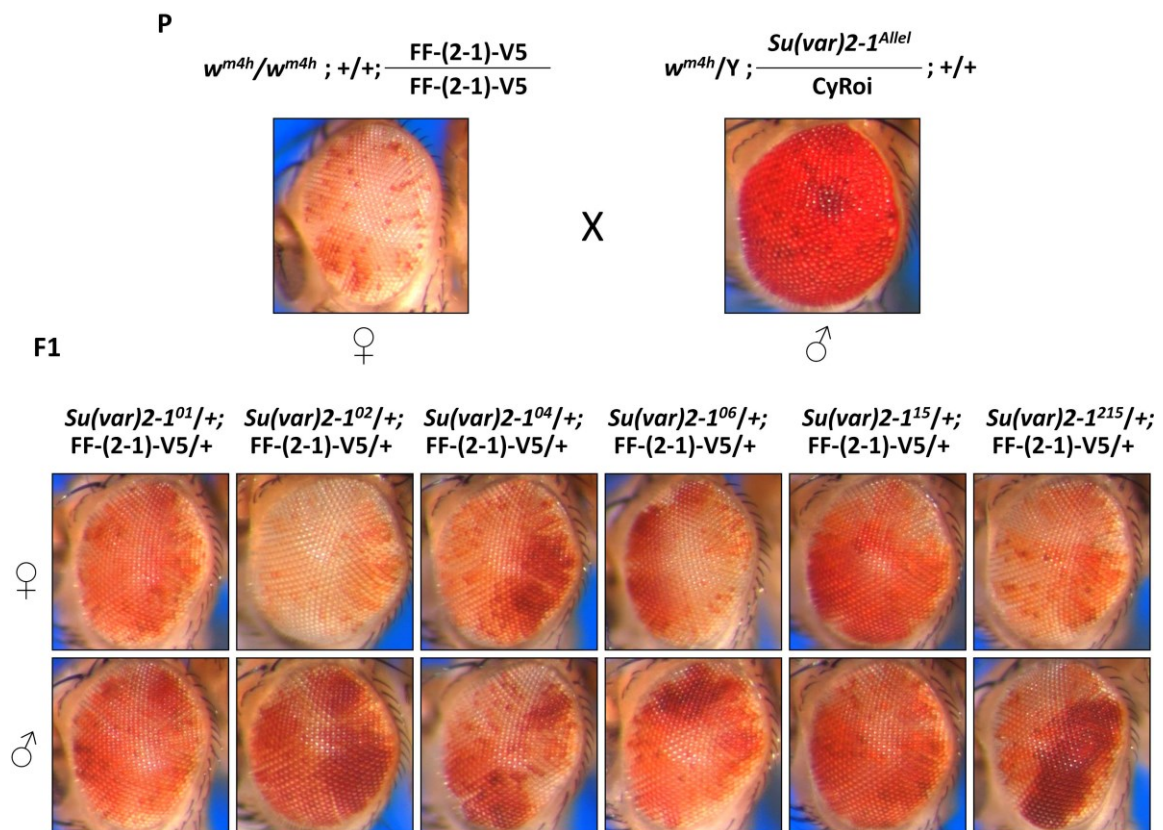


Abbildung 16: Rettung des Suppressoreffektes verschiedener *Su(var)2-1*-Allele durch das genomische Wildtyp-pFlyFos-Konstrukt FF-(2-1)-V5.

Die Nachkommen der Kreuzung $w^{m4h}/w^{m4h}; FF-(2-1)-V5/FF-(2-1)-V5$ mit verschiedenen *Su(var)2-1* - Mutanten zeigen, dass der Suppressoreffekt der *Su(var)2*-Allele *Su(var)2-1⁰¹*, *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁴*, *Su(var)2-1⁰⁶*, *Su(var)2-1¹⁵* und *Su(var)2-1²¹⁵* vollständig durch das Wildtypkonstrukt gerettet werden kann.

Das *Su(var)2-1* „loss of function“-Mutantenkonstrukt FF-(Δ2-1)-V5 ist nicht in der Lage, den Suppressoreffekt der untersuchten Allele *Su(var)2-1⁰¹*, *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁴*, *Su(var)2-1⁰⁶*, *Su(var)2-1¹⁵* und *Su(var)2-1²¹⁵* im *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement zu retten (Abb. 17, F1). Der Suppressoreffekt ist somit unmittelbar mit *Su(var)2-1* verbunden.

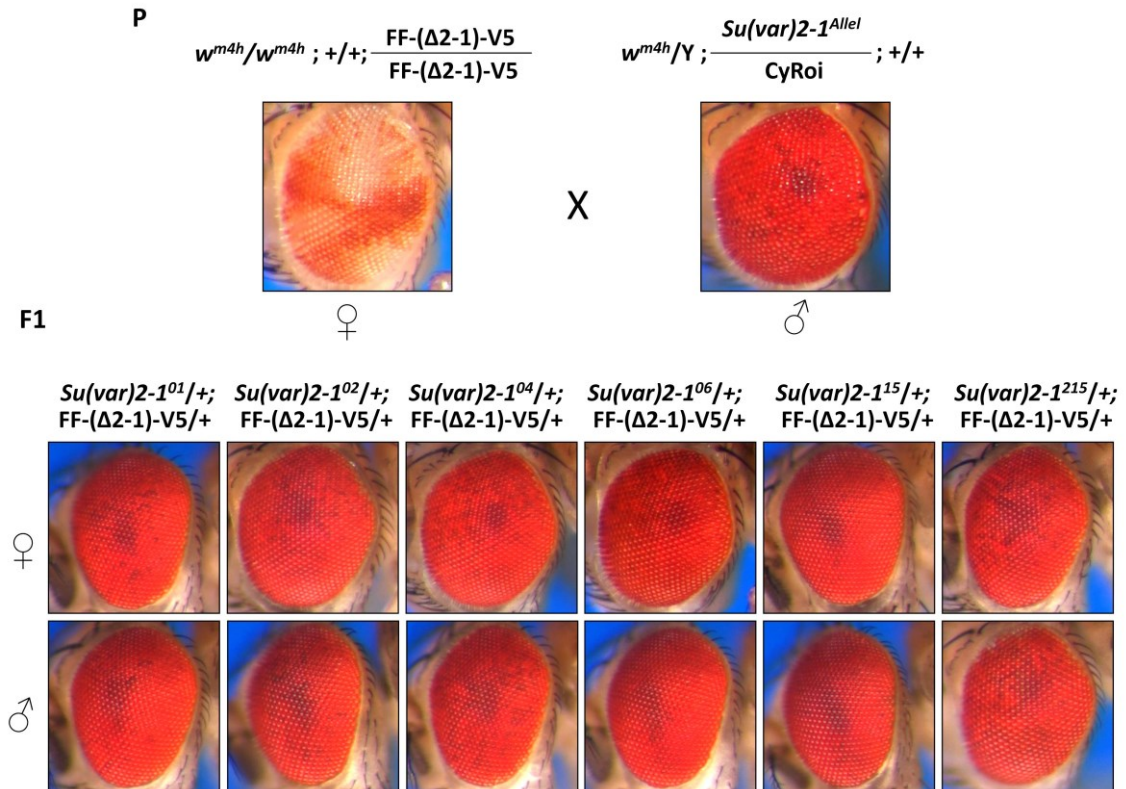


Abbildung 17: Kreuzung von *Su(var)2*-Allelen mit dem Mutantenkonstrukt FF-(Δ2-1)-V5.
 Die Nachkommen der Kreuzung von $w^{m4h}/w^{m4h}; FF-(\Delta 2-1)-V5/ FF-(\Delta 2-1)-V5$ -Weibchen mit *Su(var)2-1*-Mutanten-Männchen zeigen, dass der Suppressoreffekt der verwendeten *Su(var)2-1*-Allele nicht in der Tochtergeneration gerettet werden kann. Alle F1-Nachkommen mit dem Genotyp $w^{m4h}; Su(var)2-1^{Allel}/ FF-(\Delta 2-1)-V5$ zeigen einen Suppressorphänotyp.

3.1.8 *Su(var)2-1*-Expression in *Drosophila melanogaster*

Für eine funktionelle Analyse von *Su(var)2-1* wurde die Expression des *Su(var)2-1*-Gens in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Das *Su(var)2-1*-Gen, welches aus fünf Exonen besteht, bildet zwei mRNA-Varianten, die sich im untranslatierten 5'-Bereich voneinander unterscheiden (Abb. 18A) Das erste Exon der mRNA-Variante *Su(var)2-1*-RA ist gegenüber der mRNA von *Su(var)2-1*-RB um 256 bp verkürzt, sonst jedoch mit diesen identisch (Abb. 18A). Beide mRNA-Varianten von *Su(var)2-1* konnten unabhängig voneinander in den untersuchten Entwicklungsstadien mit RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 17B). Eine semi-quantitative RT-PCR zeigte keine Expressionsunterschiede zwischen den beiden getesteten *Su(var)2-1*-mRNA-Varianten.

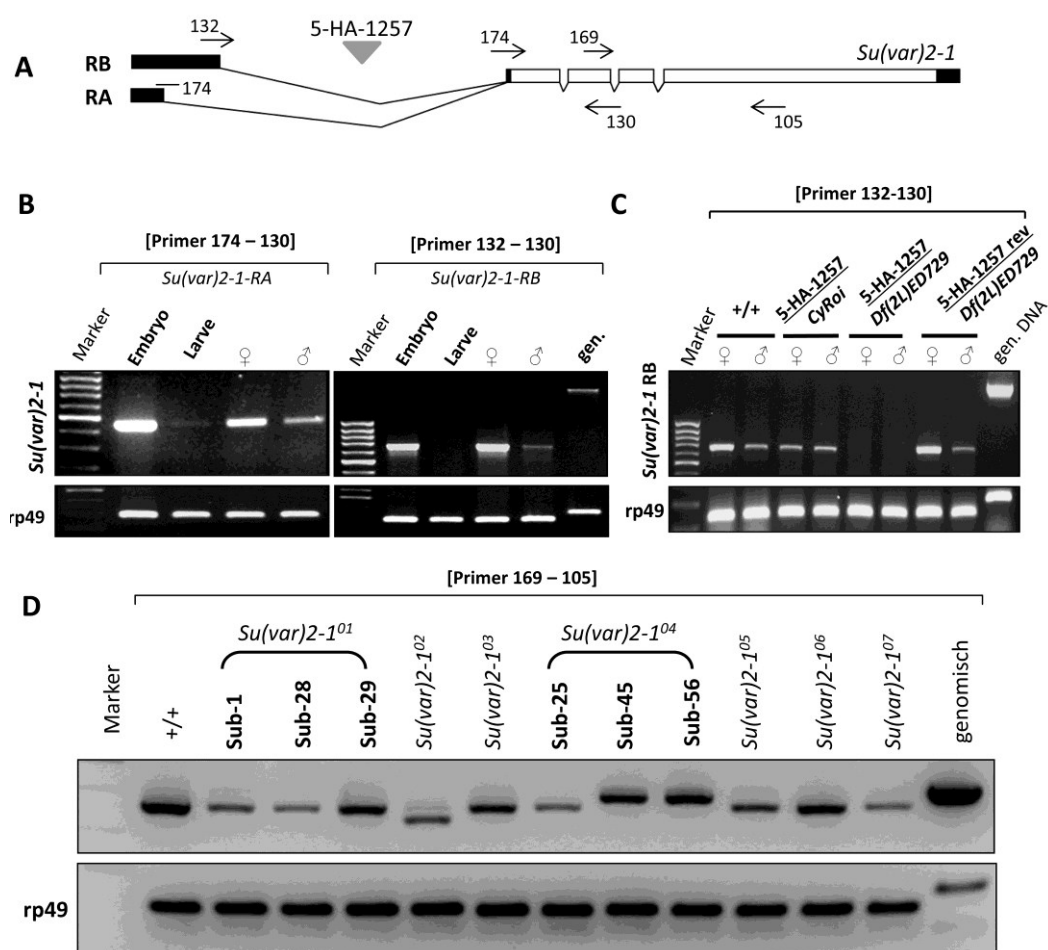


Abbildung 18: Expressionsanalysen des *Su(var)2-1*-Gens in *Drosophila melanogaster*. (A) Exon-Intron-Struktur des *Su(var)2-1*-Gens und Lage der verwendeten Primer mit dem 5-HA-1257 P-Element. (B) Zum Nachweis der beiden mRNA-Varianten *Su(var)2-1*-RA und *Su(var)2-1*-RB wurden die Primerkombinationen 174-130 (RA) bzw. 132-130 (RB) verwendet. Die entwicklungsstadienspezifische Expression von *Su(var)2-1* in Embryonen, Larven und adulten Stadien detektiert beide *Su(var)2-1* mRNA-Varianten. Als Kontrolle wurde rp49 verwendet. (C) Eine Expression der *Su(var)2-1* mRNA in transheterozygoten *P[RS]5-HA-1257/Df(2L)ED729* konnte nicht nachgewiesen werden. (D) Die RT-PCR Charakterisierung von verschiedenen *Su(var)2-1*-Allelen (Tab. 6) zeigen für die Allele *Su(var)2-1⁰²* und *Su(var)2-1⁰⁴* (Sub-Allele 45 und 56) veränderte *Su(var)2-1*-Transkriptgrößen. *Su(var)2-1⁰²* besitzt eine 75pb-Deletion im getesteten Bereich und *Su(var)2-1⁰⁴* ist eine Spleißdefektmutante.

Expressionsdaten aus der modENCODE-Datenbank (Graveley et al., 2011) und aus FlyAtlas (Chintapalli et al., 2007) deuten darauf hin, dass *Su(var)2-1* besonders stark im Embryo und den Ovarien exprimiert ist. In larvalen Stadien und adulten Männchen ist die *Su(var)2-1* schwach exprimiert. Diese Expressionsdaten wurden mit RT-PCR bestätigt, da auch hier eine *Su(var)2-1*-mRNA besonders stark in Embryonen und adulten Weibchen nachgewiesen werden konnte. In Larven ist ein *Su(var)2-1*-Transkript in nur sehr geringen Mengen nachzuweisen (Abb. 18B). Die Analysen zeigten auch, dass in transheterozygoten *P[RS]5-HA-1257/Df(2L)ED729* ein funktionelles *Su(var)2-1*-Transkript fehlt (Abb. 18C). In ihnen wird stattdessen ein chimäres Transkript gefunden, bestehend aus dem ersten *Su(var)2-1*-Exon und dem zweiten Exon des im *P*-Element befindlichen *white*-Gens (Daten nicht gezeigt). In heterozygoten *P[RS]5-HA-1257/CyRoi*-Tieren wird eine Reduktion der *Su(var)2-1*-Transkripte gefunden.

Nach einer FRT-Rekombinase-Reaktionen (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007) können die *white*-Exone aus dem *w+* *P[RS]5-HA-1257*-P-Element entfernt werden und es entsteht ein *white* minus *P[RS]5-HA-1257*-P-Element (*remnant*). Nach Verlust der *white*-Exone in *P[rRS]5-HA-1257* zeigen die transheterozygoten *P[rRS]5-HA-1257/Df(2L)ED729* Weibchen normale Fertilität und bilden wieder *Su(var)2-1*-Transkripte (Abb. 18C). Durch den Verlust der *white*-Exone in *P[rRS]5-HA-1257* fehlen die zuvor genutzten *Splice*-Sequenzen im *white*-Gen und *Su(var)2-1* wird normal transkribiert (Abb.18C). Mit einer RT-PCR an *Su(var)2-1*-Mutanten konnten veränderten RNA-Transkripte der *Splice*-Mutante *Su(var)2-1⁰⁴* und der 75pb-Deletionsmutante *Su(var)2-1⁰²* betätigt werden (Abb. 18D).

Zur Bestimmung von 3'- und 5'-Enden der *Su(var)2-1*-Transkripte wurde ein 3'- bzw. 5'-RACE durchgeführt. Es konnten die ersten Exone der beiden mRNA-Varianten spezifisch amplifiziert werden (Abb.19). Die Sequenzierung der 5'UTR-Bereiche ergab im Vergleich zu den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen keine Abweichungen.

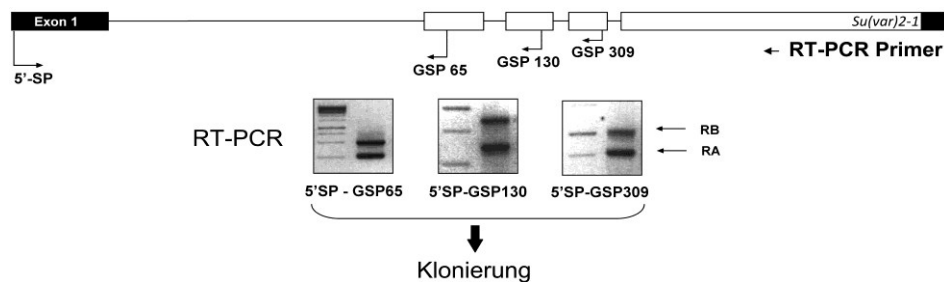


Abbildung 19: 5'-Race an Gesamt-mRNA aus *Drosophila melanogaster*. Die Amplifikate des 5'-spezifischen Primers (5'SP) und der Gen-Spezifischen Primern (GSP65; GSP130; GSP309) wurden an Wildtyp *cDNA* generiert und in einem Agarosegel aufgetrennt, kloniert und sequenziert. Der 5'-Bereich der *Su(var)2-1*-RA und -RB mRNA-Varianten konnte unabhängig amplifiziert werden.

3.1.9 SU(VAR)2-1 ist ein kernlokalisiertes Protein

Neben dem Nachweis des endogenen SU(VAR)2-1-Proteins mit polyklonalen Antikörpern wurde die *Su(var)2-1*-cDNA zur Erzeugung eines EGFP-markierten Proteins in den *p[UAST]*-Vektor kloniert und mit EGFP fusioniert (Abb. 20A). Durch die Fusion von SU(VAR)2-1 mit EGFP kann eine Verteilung von SU(VAR)2-1 *in vivo* untersucht werden. Durch das *Gal4-UAS*-System ist eine gewebespezifische Expression von SU(VAR)2-1-EGFP unter Kontrolle von UAS-Promotoren möglich (Abb. 20C-D). Das SU(VAR)2-1-EGFP-Fusionsprotein ist in den Speicheldrüsen im Kern lokalisiert (Abb. 20C). Dieses unterstützt, neben den identifizierten Kernlokalisierungssignalen (RKRR, PLKKPKA, PSRRNRT), die bioinformatisch vorhergesagte Kernlokalisierungswahrscheinlichkeit von über 70 % (PSORT II). Durch Kreuzung und Rekombination wurden UAS-*Su(var)2-1*-EGFP/act-Gal4-Linien aufgebaut (Abb. 20B)

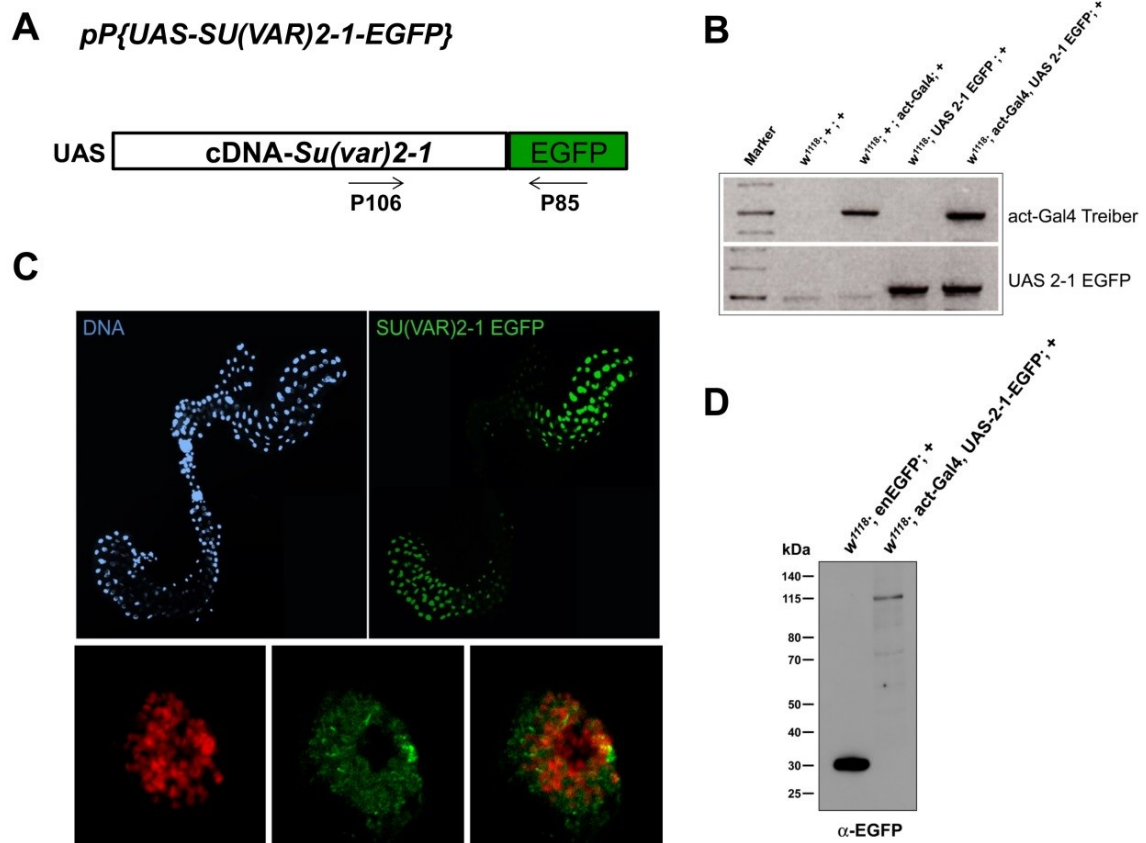


Abbildung 20: Expression von SU(VAR)2-1-EGFP-Fusionsproteinen mit dem Gal4-UAS-System. (A) Das SU(VAR)2-1-EGFP-Konstrukt hat einen durch Gal4 induzierbaren UAS-Promotor. Die Primer P106 und P85 dienen in der PCR-Reaktion zum Nachweis des Transgens. (B) Nachweis des cDNA-EGFP-Transgens und des *act-Gal4*-Treibers mittels PCR. [Marker (Spur 1), *w¹¹¹⁸* Fliegen (Spur 2), *Su(var)2-1*-EGFP und *act-Gal4*-Treiber in den Ausgangslinien (Spur 3 und 4)]. Nachweis des Transgens und des *act-Gal4*-Treibers nach Rekombination in einer stabilen Fliegenlinie des Genotypes *w¹¹¹⁸*; *act-Gal4*, UAS-*Su(var)2-1*-EGFP; + (Spur 5). (C) EGFP-Fluoreszenz nach Induktion durch den *act-Gal4*-Treiber im Kern der Speicheldrüsen (D) Nachweis des SU(VAR)2-1 EGFP-Proteins mittels eines α -EGFP-Antikörpers im Westernblot. Als EGFP-Kontrollprotein diente enEGFP.

3.1.10 Generierung eines polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörpers

Für die Herstellung eines SU(VAR)2-1-spezifischen Antikörpers wurde ein 323 Aminosäuren enthaltendes C-terminales Proteinfragment von SU(VAR)2-1 als Antigen in *E.coli* rekombinant exprimiert. Der *Su(var)2-1-cDNA*-Bereich, welcher für die Aminosäuren 300-623 codiert, wurde dafür in den Expressionsvektor pET28c kloniert und mit 6xHis fusioniert. Die Expression erfolgte bei 37°, da das Antigenprotein auch bei niedrigen Temperaturen unlöslich ist und als „*inclusion-bodies*“ akkumuliert wird. So wurde eine Induktion der Expression bei 37 °C mit 1mM IPTG in *E.coli* BL21(DE3)*Lys* durchgeführt. Nach einer denaturierenden Proteinreinigung an einer Ni-NTA-Agarose und der anschließenden Renaturierung des eluierten Proteins wurde das erhaltene lösliche Protein in einer SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 21A). Zur Bestimmung der erhaltenen Proteinmengen wurde ein BSA-Protein-Standard verwendet (Abb. 21A).

Die Immunisierung des Kaninchens erfolgte mit insgesamt drei Milligramm des gereinigten rekombinanten Fusionsproteins (Pab-productions). Die erhaltenen Immunsereen wurden zytologisch und im Western-Blot an nativen *Drosophila*-Extrakten getestet und zeigten eine gute Spezifität gegen das eingesetzte rekombinante SU(VAR)2-1-Fusionsprotein. Die Serumfraktionen mit dem höchsten spezifischen Antikörpertiter gegen SU(VAR)2-1 wurden für eine Aufreinigung an Protein-A-Sephrose ausgewählt und zur Reduktion unspezifischer Bindungen mit Proteinextrakten aus SU(VAR)2-1-Null-Mutanten präinkubiert. Die an Protein-A-Sephrose gereinigten Antikörper wurden lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

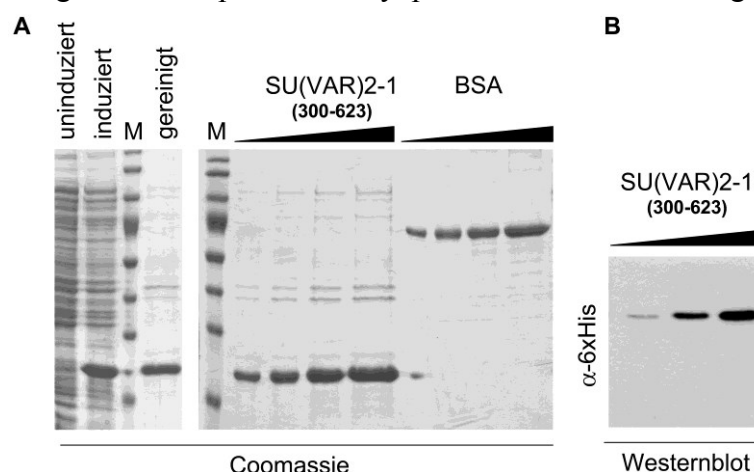


Abbildung 21: SU(VAR)2-1-6xHis-Expression und Reinigung für die Antikörperherstellung.

(A) Die Reinigung von SU(VAR)2-1-6xHis erfolgte unter denaturierenden Bedingungen an Ni-NTA-Agarose. Nach der Renaturierung und Ultrazentrifugation erfolgte die Auftrennung in einer SDS-PAGE. Die Mengenabschätzung erfolgte mit BSA-Proteinstandards (0,2 µg–1,5 µg). (B) Western-Blot zum Nachweis von SU(VAR)2-1-6xHis mit monoklonalen 6xHis-Tag-Antikörpern.

3.1.10.1 Testung des gereinigten polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörpers

Die Spezifität des gereinigten SU(VAR)2-1-Antikörpers wurde im Western-Blot und an fixierten polytänen Speicheldrüsen-Chromosomen getestet.

Der SU(VAR)2-1-Antikörper detektiert in adulten *Drosophila*-Gesamtproteinextrakten, S2-Zell-Extrakten und Embryonalen-Extrakten mit einer guten Spezifität das endogene SU(VAR)2-1-Protein (Abb. 22). Das nachgewiesene Protein entspricht dabei dem des endogenen SU(VAR)2-1 Proteins von ca. 70 kDa. In Gesamt-Protein-Extrakten adulter Fliegen und bei sehr hohen Proteinkonzentrationen in embryonalen Extrakten sind unspezifische Banden zu erkennen (Abb. 22).

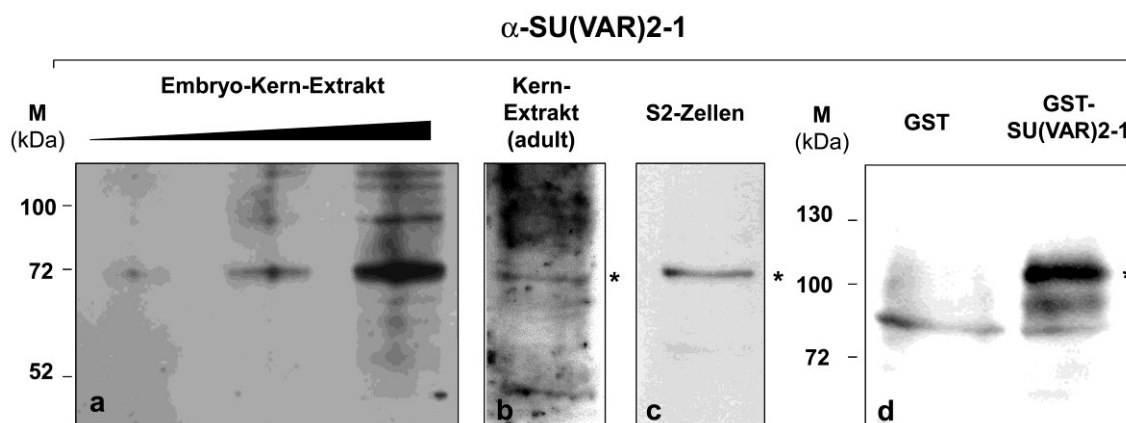


Abbildung 22: Spezifität des polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörpers im Western-Blot.

(a) Western-Blot mit anti-SU(VAR)2-1 an embryonalen Proteinextrakten, (b) SU(VAR)2-1-Detektion an adulten Kernextrakten, (c) SU(VAR)2-1-Nachweis in S2-Schneider-Zellen mit anti-SU(VAR)2-1 im Western-Blot (d) Nachweis eines rekombinanten GST-SU(VAR)2-1-Fusionsproteins (105kDa) an Gesamt-Proteinextrakten einer *E.coli*-Überexpressionskultur, als Kontrolle diente eine GST-Überexpression ohne SU(VAR)2-1-Fusionsanteil.

Zur weiteren Charakterisierung des Antikörpers wurden Speicheldrüsen aus SU(VAR)2-1-Null-Mutanten Larven isoliert. Zum Erhalt dieser SU(VAR)2-1^{Null}-Larven wurde die Kreuzung $+/+; Su(var)2-1^{Allel}/CyO, Ser^{GFP}; +/+$ und $+/Y; Df(2L)ED721/CyO, Ser^{GFP}; +/+$ durchgeführt. F1-Larven des dritten Larvenstadiums konnten mit Hilfe von UV-Licht selektiert werden, da Larven des transheterozygoten Genotypes $+/+; Su(var)2-1^{Allel}/Df(2L)ED721; +/+$ nach Anregung durch UV-Licht keine Fluoreszenz zeigen. Larven, die den GFP-Balancer transheterozygot tragen, zeigten eine GFP-Fluoreszenz und wurden für den Test verworfen (Rudolph et al., 1999). Die polytänen Speicheldrüsenchromosomen der unter UV selektierten *Su(var)2-1^{null}*-Larven, wurden nach einer Fixierung mit dem SU(VAR)2-1-Antikörper inkubiert und mit polytänen Wildtyp-Chromosomen verglichen.

An den polytänen Speicheldrüsenchromosomen des Wildtyps bindet der polyklonale SU(VAR)2-1-Antikörper hauptsächlich in den Banden der Chromosomenarme (Abb. 23). In polytänen Speicheldrüsenchromosomen der homozygoten *Su(var)2-1^{null}*-Larven kann der SU(VAR)2-1-Antikörper im Vergleich zum Wildtyp nicht binden. Die erhaltenen immunzytologischen Daten an polytänen Speicheldrüsenchromosomen weisen auf eine spezifische Bindung des SU(VAR)2-1-Antikörpers hin (Abb. 23).

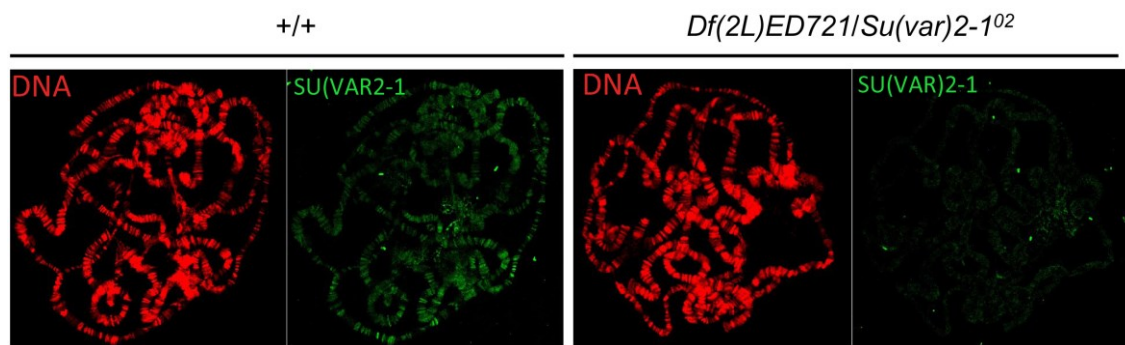


Abbildung 23: Bindung des polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörpers an polytänen Chromosomen. Nachweis des SU(VAR)2-1-Proteins durch einen SU(VAR)2-1-Antikörper an polytänen Speicheldrüsenchromosomen. Der immunzytologische Nachweis von SU(VAR)2-1 erfolgte durch den Vergleich der polytänen Speicheldrüsenchromosomen im Wildtyp- und in SU(VAR)2-1-Null-Mutanten-Larven. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

3.2 Zytologische Verteilung und Effekte von SU(VAR)2-1

3.2.1 Verteilung von SU(VAR)2-1 in der frühen Embryogenese

Für *Su(var)2-1* konnte eine starke Anreicherung von *Su(var)2-1*-Transkripten im Weibchen und im Embryo gezeigt werden (Abb. 18). In den frühen Stadien der Embryogenese von *Drosophila*, in welchen das *Su(var)2-1*-Gen stark exprimiert wird, finden zunächst nur sehr schnelle mitotische Kernteilungen statt. Dieser Zustand, in dem sich der Embryo nach der Ablage für etwa zwei Stunden nach der Befruchtung befindet, wird als Synzytium bezeichnet. Direkt nach einer Befruchtung und der damit einhergehenden Fusion von maternalem und paternalem Kern durchläuft der Embryo eine Vielzahl von synchronen mitotischen Kernteilungszyklen, bestehend aus M- und S-Phasen, ohne die begleitenden Zellteilungsstadien. Die Furchungskerne befinden sich im Zytosol des Embryos und wandern zur Bildung eines synzytialen Blastoderms in die Peripherie des Embryos. Beim Übergang vom synzytialen Blastoderm zum zellulären Blastoderm am Ende des 9-10-Kernteilungszyklus findet neben der beginnenden Abgrenzung der Kerne durch eine Zellmembran eine zunehmende Chromatindifferenzierung in Eu- und Heterochromatin statt.

Die fortschreitende Differenzierung der Kerne innerhalb des zellulären Blastoderms geht mit einer apiko-basalen Polarisierung der DNA einher (Rabl-Konformation). Dabei differenziert sich am apikalen Pol das Heterochromatin und in der basalen Region der Zellkerne das Euchromatin.

Mit dem polyklonalen SU(VAR)2-1 Antikörper konnte das SU(VAR)2-1-Protein vom ersten bis zum vierzehnten Kernteilungszyklus in der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden (Abb. 25). Das SU(VAR)2-1-Protein ist innerhalb des synzytialen Blastoderms abundant an den Furchungskernen gebunden und zeigt nach Beendigung des synzytialen Blastodermstadiums im zellulären Blastoderm eine Bindung am Eu- und Heterochromatin (Abb. 25). Die Verteilung des SU(VAR)2-1 Proteins erfolgt in *Drosophila* entwicklungsabhängig. So ist SU(VAR)2-1 bis zu Beginn des 10. Kernteilungszyklus homogen an den Furchungskernen gebunden (Abb. 24). Je weiter die Furchungskerne differenzieren und dadurch zunehmend heterochromatische Strukturen am apikalen Teil des Furchungskernes ausbilden, desto mehr findet auch eine differenzielle Verteilung des SU(VAR)2-1-Proteines statt.

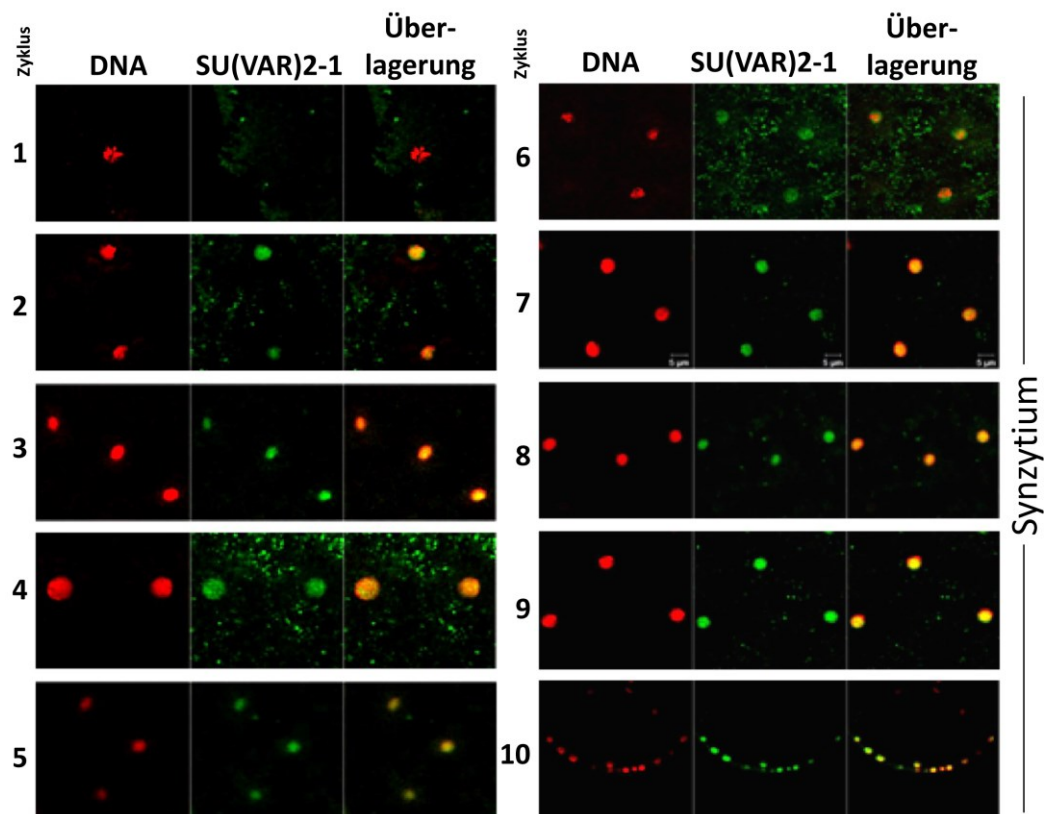


Abbildung 24 : Verteilung von SU(VAR)2-1 während der frühen Embryonalentwicklung.

(A) Nachweis des SU(VAR)2-1-Proteins mittels des polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörpers während des Synzytiums in Wildtypembryonen. Dargestellt sind die synzytialen Stadien 1-10. Die DNA der Kerne wurden mit DAPI angefärbt

Die detaillierte Analyse der Eu- und Heterochromatin-Bindung von SU(VAR)2-1 erfolgte an Kernen im 10. bis 14. Kernteilungszyklus. Diese zellulären Stadien zeigen ein differenziertes, besonders gut herausgebildetes, Eu- und Heterochromatin (Abb. 25). Am Ende des 14. Kernteilungszyklus ist SU(VAR)2-1 hauptsächlich mit Heterochromatin colokalisiert. Trotz der relativ starken Akkumulation von SU(VAR)2-1-Protein im Heterochromatin der differenzierten Zellkerne des 14. Kernteilungszyklus ist aber immer auch noch eine schwache Bindung von SU(VAR)2-1-Protein im basalen Euchromatin zu erkennen (Abb. 25).

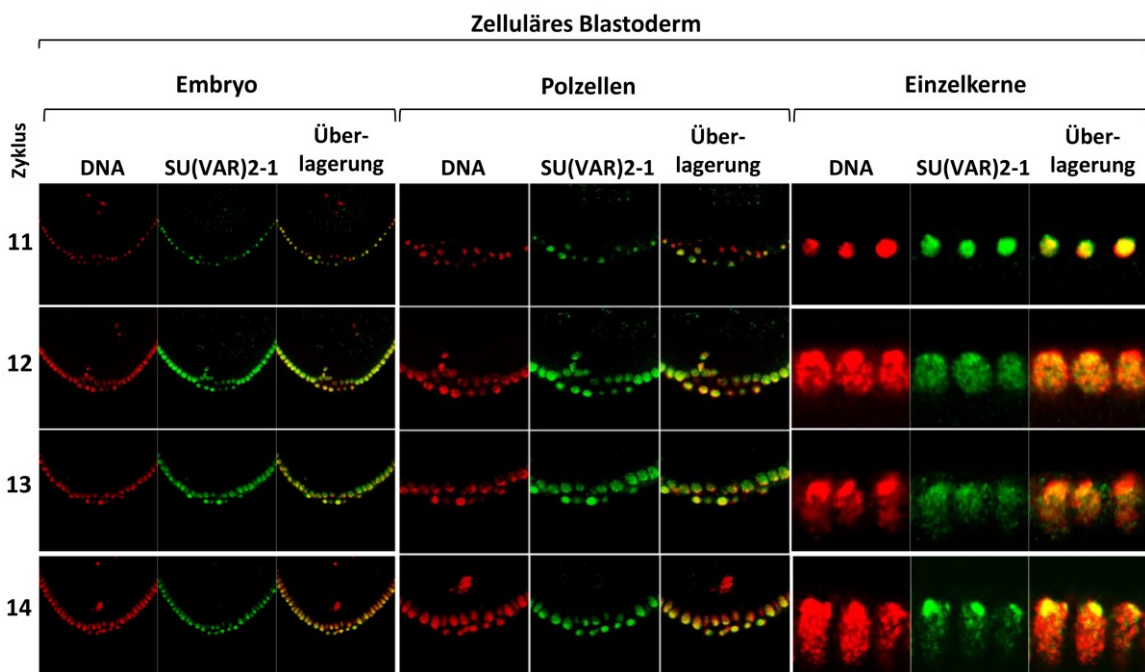


Abbildung 25: Verteilung von SU(VAR)2-1 im zellulären Blastoderm der frühen Embryogenese. Lokalisierung von SU(VAR)2-1-Protein während des zellulären Blastoderms. Einzelne Kerne und die Polzellenregion sind in den Zyklen 11-14 vergrößert dargestellt. Die Polzellen sind separat durch Pfeile markiert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

Das SU(VAR)2-1-Protein befindet sich während der gesamten Zellteilungszyklen (Abb. 24-25) mit dem Chromatin der Furchungskerne assoziiert und ist auch in den Phasen der mitotischen Teilung abundant vorhanden (Abb. 26). Während einer mitotischen Teilung ist das SU(VAR)2-1-Protein bereits in der Prophase an den chromosomalen Strukturen der Furchungskerne gebunden und dort bis zur Metaphase colokalisiert. In der Metaphase sind die kondensierenden Chromosomen homogen mit SU(VAR)2-1-Protein assoziiert. In der darauf folgenden Anaphase ist SU(VAR)2-1 deutlich im Zentromer und an dem perizentrischen Spindelapparat der wandernden Chromosomen

gebunden und bis zum Beginn der Telophase homogen an den sich teilenden Furchungskernen verteilt (Abb. 26).

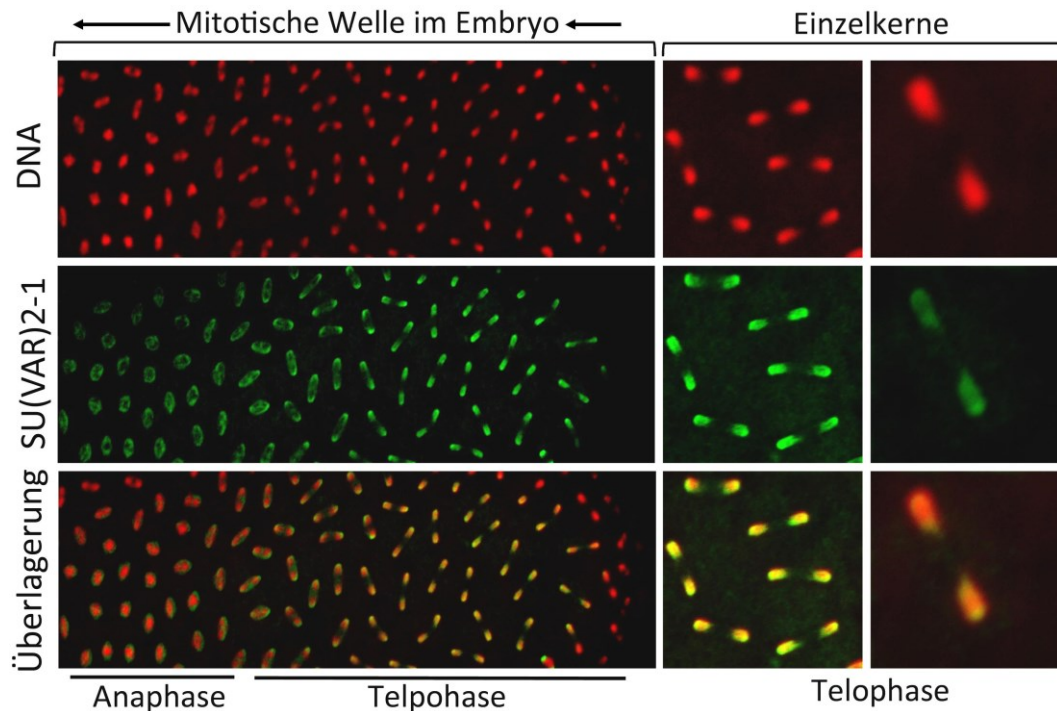


Abbildung 26: Verteilung von SU(VAR)2-1 in Mitosestadien der Furchungskerne.

In der Anaphase umlagert das SU(VAR)2-1-Protein homogen die Metaphasenchromosomen. Mit dem Abschluss der Anaphase und mit Beginn der Telophase ist das SU(VAR)2-1-Protein gleichmäßig mit den Tochterfurchungskernen assoziiert. Dargestellt sind eine Gesamtübersicht und Vergrößerungsausschnitte der Kerne einer mitotischen Welle im Embryo. Die Detektion von SU(VAR)2-1 erfolgte mit einem SU(VAR)2-1-Antikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

3.2.2 Verteilung von SU(VAR)2-1-Fusionsproteinen in der frühen Embryogenese

Das endogene SU(VAR)2-1-Protein weist in allen Stadien der frühen Embryogenese eine abundante Bindung mit dem Chromatin auf. Zur weiteren Untersuchungen von SU(VAR)2-1 Proteinlokalisationen und zur Identifizierung von SU(VAR)2-1 Proteinkomplexen sollten auch die charakterisierten transgenen *Drosophila*-Linien verwendet werden (Abb. 10 und 13). Die in den *Rescue*-Experimenten genutzten transgenen *Drosophila*-Linien enthalten eine genomische *Su(var)2-1*-Region, welche im 5' und 3' Bereich modifiziert ist. Dadurch bilden sie SU(VAR)2-1-Fusionsproteine mit verschiedenen N- bzw. C-terminalen Fusionsanteilen. Aufgrund der sehr starken Anreicherung des endogenen SU(VAR)2-1-Proteins in der frühen Embryogenese wurde auch eine Verteilung der SU(VAR)2-1-Fusionsproteine in der frühen Embryogenese erwartet. Die transgenen Embryonen wurden zum Nachweis der Fusionsproteine mit spezifischen Antikörpern gegen den FLAG- und V5-Fusionsanteil inkubiert (Abb. 27).

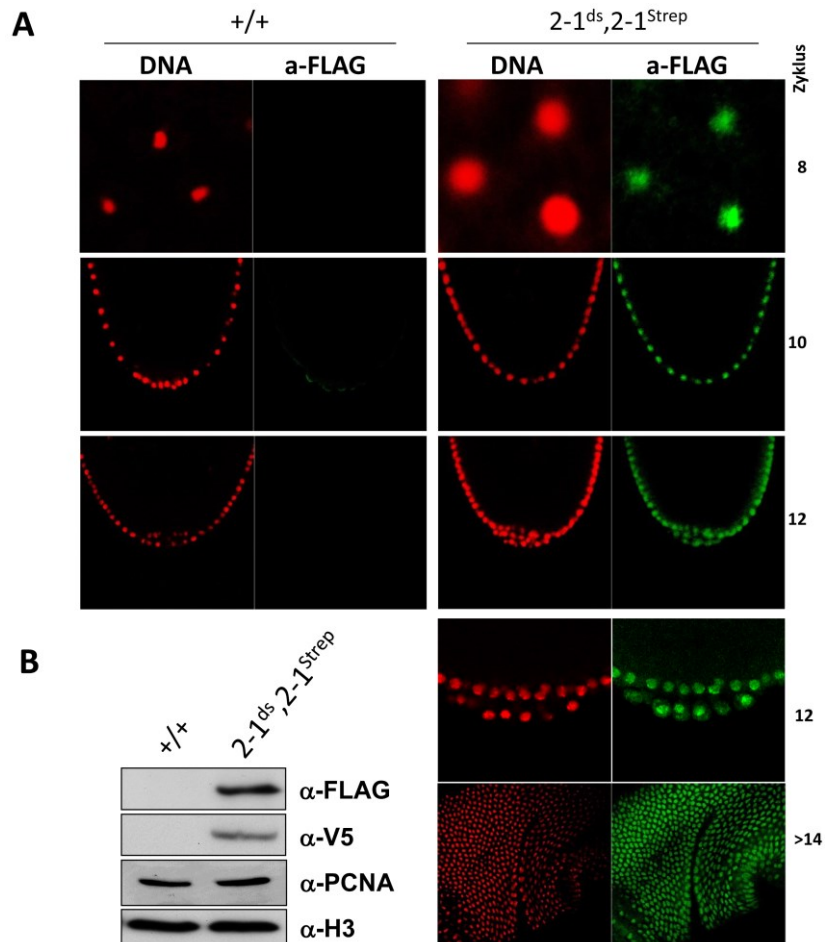


Abbildung 27: Nachweis von STREP-SU(VAR)2-1-V5-3xFLAG im frühen Embryo.

(A) Immunzytologischer Nachweis von STREP-SU(VAR)2-1-V5-FLAG mit FLAG-tag Antikörpern in den Stadien 8, 10 und 12. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Embryonen mit dem gleichen Antikörper inkubiert. Die DNA-Färbung erfolgte mit DAPI. (B) Western-Blot an 0-3 Stunden alten Embryonen der *Su(var)2-1^{ds}*, STREP-SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Fliegenlinie mit V5 und -FLAG-Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde PCNA und H3 genutzt. Lokalisierung von STREP-SU(VAR)2-1-V5-FLAG in der Polzellregion (12) und in der Gastrulation (>14) der Fliegenlinie *Su(var)2-1^{ds}*, STREP-SU(VAR)2-1-V5-FLAG mit FLAG-Antikörpern

Das durch das genomische *Su(var)2-1*-Transgen exprimierte STREP-SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Fusionsprotein ist in den untersuchten Stadien der frühen Embryogenese auch mit dem Chromatin der Furchungskerne colokalisiert (Abb. 27). Das zeigt, dass der im Konstrukt befindliche endogene Promotor entwicklungspezifisch funktioniert und dass STREP-SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Protein in den frühen Stadien exprimiert wird (Abb. 27B). Am Furchungschromatin konnte bereits eine Bindung des endogenen SU(VAR)2-1-Proteins mit einem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper nachgewiesen werden. Das SU(VAR)2-1-Fusionsprotein zeigt wie auch das endogene SU(VAR)2-1-Protein, eine Bindung am Furchungschromatin. In späteren Stadien der Embryogenese (Gastrulation) ist dieses ebenfalls ein mit dem Chromatin assoziiertes Protein (Abb. 27B).

3.2.3 SU(VAR)2-1 ist an polytären Chromosomen mit Banden assoziiert

Drosophila melanogaster besitzt für die Analyse von Heterochromatinfaktoren eine besondere Form von Chromosomen. Diese sind vor allem die polytären Chromosomen, welche in den larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila* zu finden sind.

Immunzytologische Analysen der polytären Speicheldrüsen mit dem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper zeigen, dass das endogene SU(VAR)2-1-Protein in Banden nachweisbar ist und ein in Banden lokalisiertes Protein darstellt. Eine spezifische Färbung im heterochromatischen Chromozentrum und eine Bindung an chromosomalen Interbanden ist mit diesem Antikörper nicht zu erkennen (Abb. 28A). Im Vergleich mit dem Wildtyp ist in den homozygoten SU(VAR)2-1-Null-Mutanten mit dem SU(VAR)2-1-Antikörper kein endogenes SU(VAR)2-1-Protein nachweisbar.

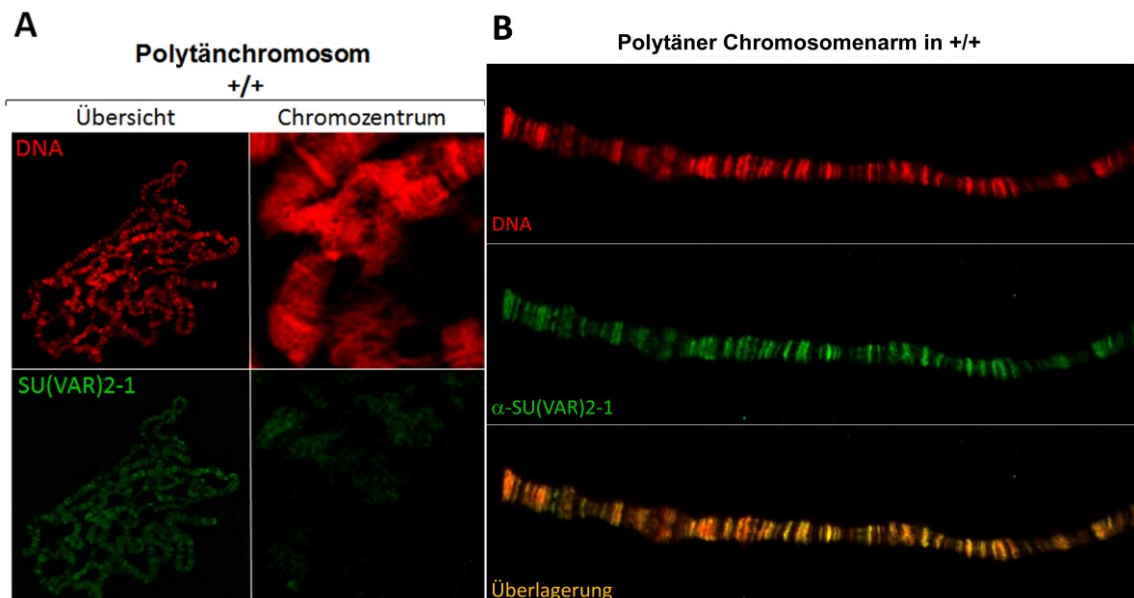


Abbildung 28: Nachweis von SU(VAR)2-1 an Polytären Chromosomen mit einem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper. (A) SU(VAR)2-1 ist am Wildtypchromosom an Banden lokalisiert. Die Vergrößerungen des Chromozentrums zeigt keine heterochromatische Bindung von SU(VAR)2-1 (B) Immunmarkierung eines autosomalen Chromosomenarmes mit dem anti-SU(VAR)2-1 Antikörper. SU(VAR)2-1 ist mit Banden assoziiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI.

3.2.4 SU(VAR)2-1-Mutanten zeigen Hyperacetylierung am Histon H4

Frühe genetische und biochemische Untersuchungen weisen darauf hin, dass in SU(VAR)2-1-Mutanten eine Hyperacetylierung des Histons H4 in den Larven vorliegt (Dorn et al., 1986). Die Art der betroffenen Acetylierung an den polytären Chromosomen von *Su(var)2-1^{null}*-Larven konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Über die chromosomale Verteilung der Acetylierung am Histon H4 und insbesondere über deren biologische Relevanz ist bis auf einige Ausnahmen wenig bekannt.

Die acetylierten Lysine im Histon H4 sind die N-Terminal gelegenen Lysine 5, 8, 12 und 16 (Turner et al., 1992). Für ihre Charakterisierung wurden Antikörper verwendet, die spezifisch für H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac sind. Die H4K5ac-, H4K8ac-, und die H4K16ac-Modifikation zeigen, mit Ausnahme der H4K12-Acetylierung, eine signifikante Veränderung in den untersuchten homozygoten *Su(var)2-1*-Mutanten. In weiblichen Larven des Wildtyps ist H4K5ac an autosomalen Chromosomenarmen zu finden, konzentriert sich im Gegensatz dazu in den *Su(var)2-1*-Mutanten im Chromozentrum (Abb. 29). Im Männchen ist die H4K5ac im Vergleich zum Wildtyp leicht verändert (Abb. 29).

H4K8ac zeigt zytologisch und im Westernblot eine deutliche Erhöhung im Weibchen und Männchen der *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 29).

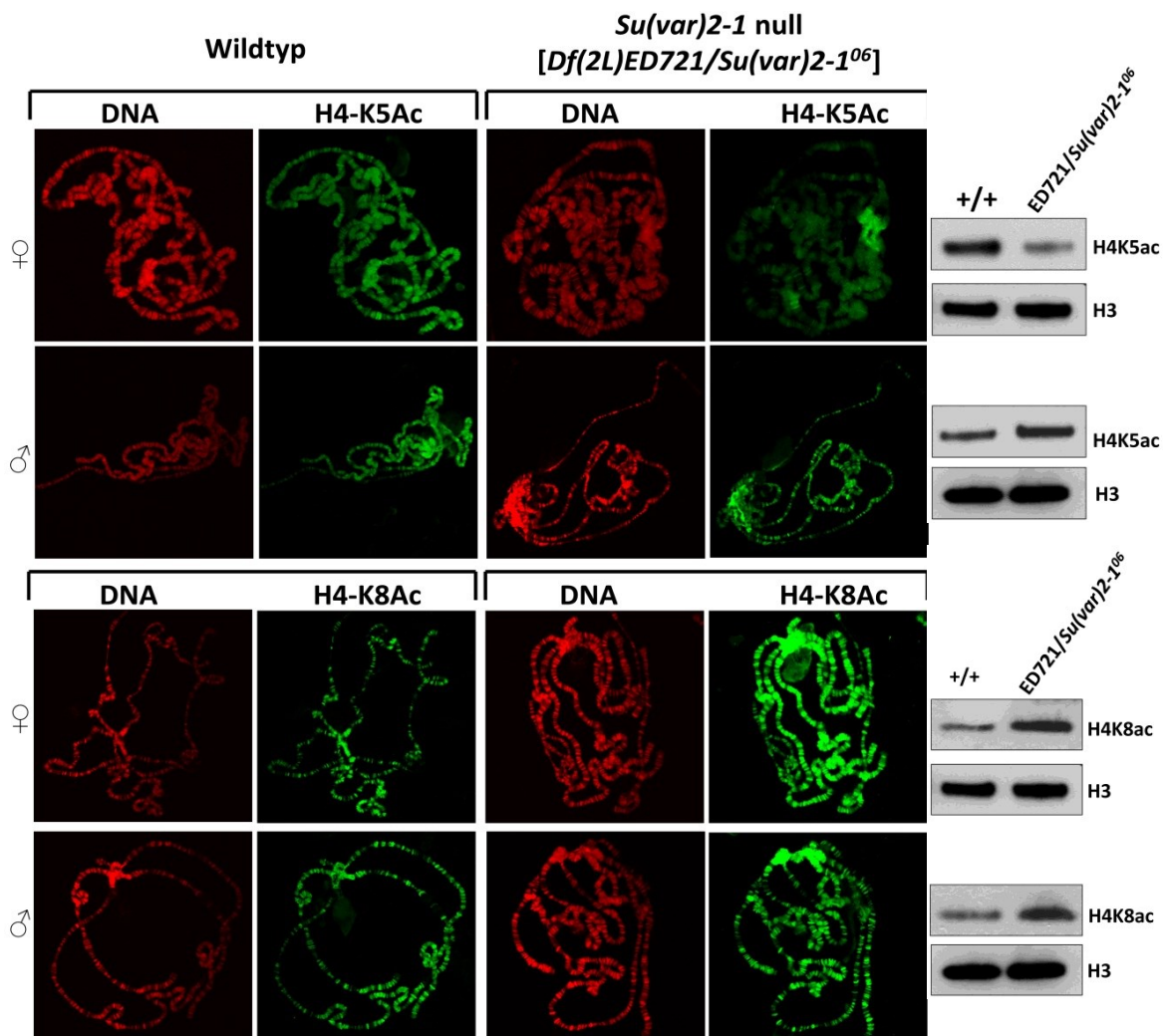


Abbildung 29: H4K5ac- und H4K8ac-Verteilung an Wildtyp- und *Su(var)2-1^{null}*-Speicheldrüsenchromosomen. H4K5ac und H4K8ac in polytären Chromosomen vom Wildtyp- und *Su(var)2-1^{null}*. Anreicherung von H4K5ac innerhalb des Chromozentrums in weiblichen *Su(var)2-1^{null}*-Larven. Erhöhung der H4K8-Acetylierung am gesamten polytären Chromosom von *Su(var)2-1^{null}* im Vergleich zum Wildtyp. Westernblot mit den angegebenen Antikörpern. DNA-Färbung erfolgte mit DAPI.

Die analysierte H4K12-Acetylierung zeigte zytologisch und im Westernblot *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten keine Veränderung im Vergleich zum Wildtypen (Abb. 30).

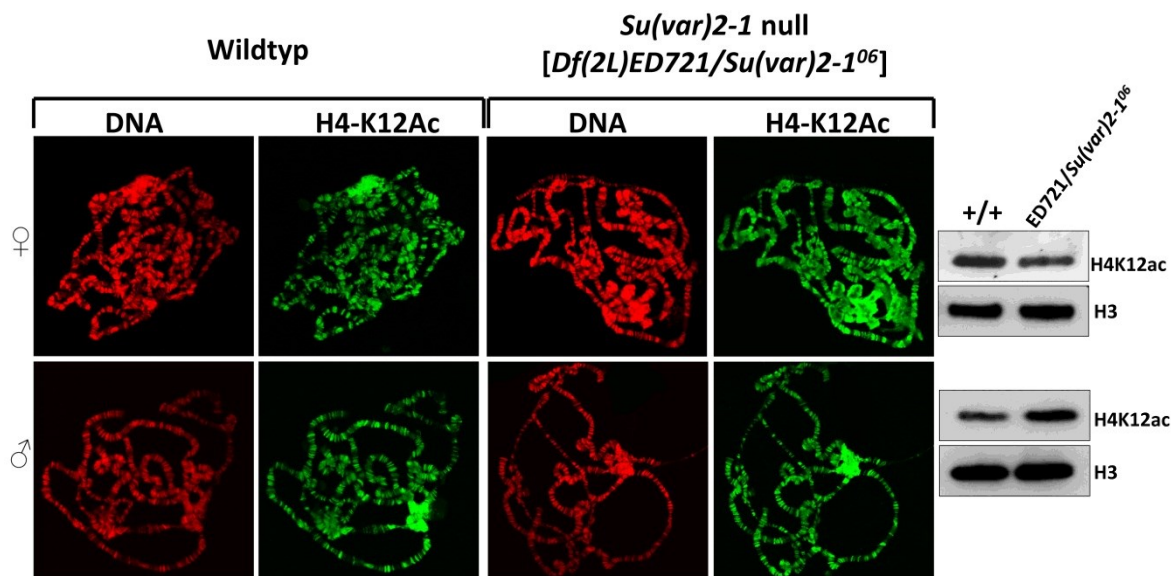


Abbildung 30: Vergleich der H4K12-Acetylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen. Lokalisierung von H4K12ac an polytären Chromosomen des Wildtyps und *Su(var)2-1^{null}*. *SU(VAR)2-1* beeinflusst nicht die Menge und die Verteilung von H4K12ac. Die DNA-Färbung erfolgte mit DAPI.

Die untersuchte H4K16-Acetylierung, welche durch die Acetyltransferase MOF (*male absent on the first*) katalysiert wird, hat eine besondere Rolle im Dosis-kompensationsprozess bei *Drosophila* (Conrad et al., 2012). Durch die Aktivität des MOF-Enzymes im MSL-Komplex wird die Acetylierung von Lysin 16 am X-Chromosom der Männchen katalysiert. Im Weibchen ist die H4K16-Acetylierung im Gegensatz zum Männchen unterrepräsentiert (Abb. 31A-B). Zur Analyse der H4K16 Acetylierung wurden polytäre Speicheldrüsenchromosomen der *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten sowie Wildtypplarven mit den entsprechenden H4K16-acetylspezifischen Antikörpern untersucht und verglichen.

Durch die immunzytologischen Analysen konnten deutliche Unterschiede in der H4K16 Acetylierung vom Wildtyp und der *Su(var)2-1*-Mutante gezeigt werden. Im Vergleich der polytären Chromosomen aus Wildtyp-Weibchen mit den Chromosomen aus homozygoten *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen zeigte *Su(var)2-1^{null}* nur eine leichte Anreicherungen von H4K16ac an autosomalen Chromosomenarmen. Besonders zu beobachten ist aber eine starke Akkumulation von H4K16ac im Chromozentrum (Abb. 31C) die so in weiblichen Larven nicht zu finden ist (Abb. 31B).

Polytäre Chromosomen von männlichen *Su(var)2-1^{null}*-Larven zeigen eine deutliche Anreicherung von H4K16ac im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 31A und 31C).

Die H4K16-Acetylierung ist dabei in *Su(var)2-1^{null}* besonders im Chromozentrum stark erhöht und über den basalen Bereich weiter ausgebreitet als in Wildtyp zu beobachten. Im Westernblot ist im Vergleich mit den zytologischen Aufnahmen kein so deutlicher Unterschied zu verzeichnen (Abb. 31E).

Eine unspezifische Bindung des verwendeten H4K16-Acetylantikörpers konnte ausgeschlossen werden, da der Antikörper im Wildtypmännchen eine spezifische charakteristische Färbung des X-Chromosoms zeigte (Abb. 31A).

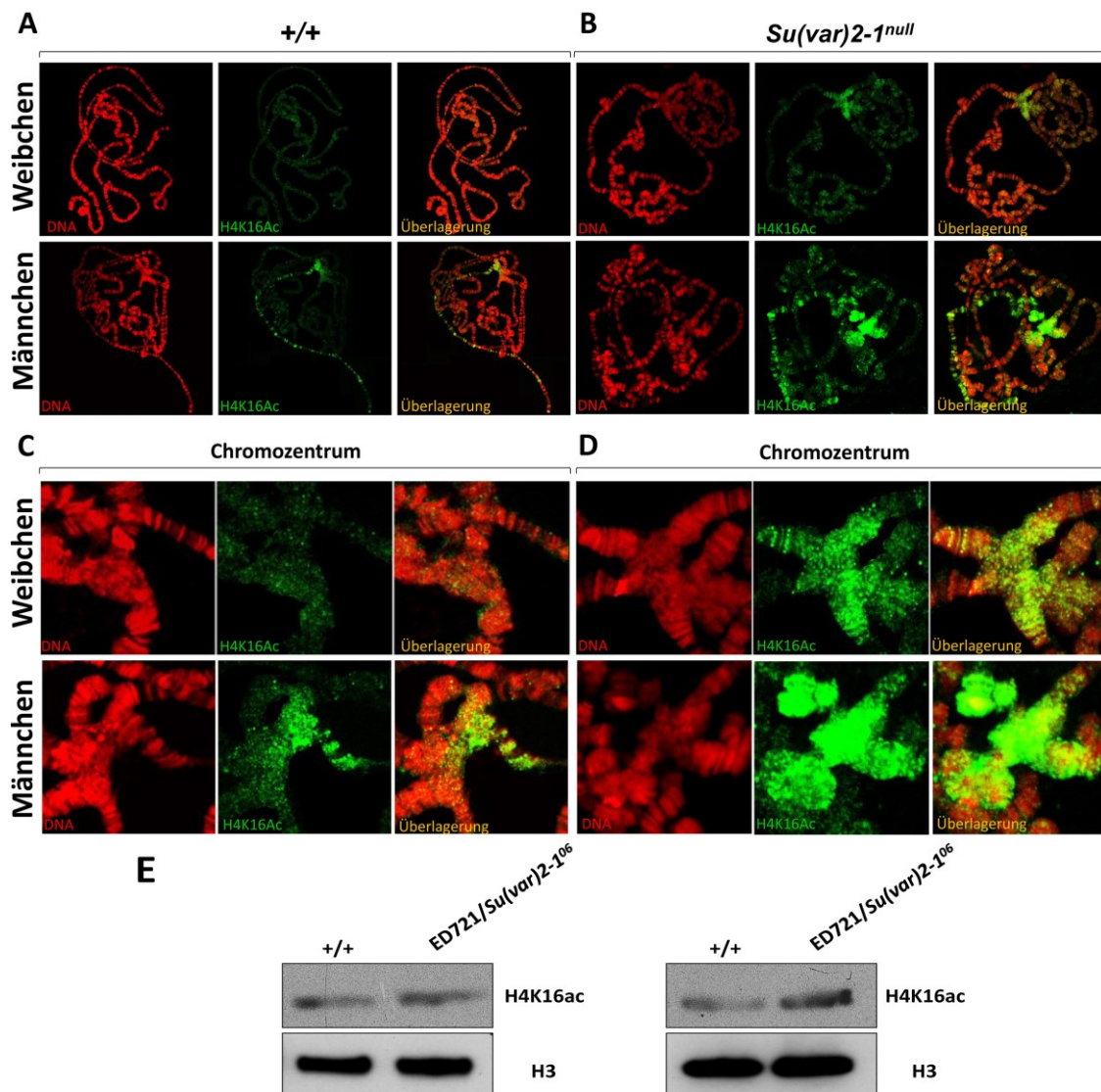


Abbildung 31: In *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten ist die Verteilung der H4K16-Acetylierung in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster* beeinflusst.

(A) Verteilung von H4K16ac an polytären Chromosomen im Weibchen und Männchen des Wildtyps. H4K16ac ist nur wenig im Weibchen vorhanden. Im Männchen ist nur das männliche X-Chromosom mit H4K16ac markiert. (B) H4K16ac-Verteilung an polytären Chromosomen im Weibchen und Männchen in *Su(var)2-1^{null}*. Die H4K16-Acetylierung ist in Weibchen und Männchen der *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten erhöht. (C-D) Das Chromozentrum von *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine starke Anreicherung an H4K16-Acetylierung. Das Chromozentrum in *Su(var)2-1^{null}* Männchen ist im Vergleich zum Wildtyp besonders stark mit der H4K16-Acetylierung angereichert und überdeckt das Chromozentrum. (E) Westernblot mit α -H4K16ac im Weibchen und Männchen.

3.2.5 MOF und MSL-1 sind in SU(VAR)2-1- Mutanten nicht verändert

In *Drosophila* wird der Dosisunterschied der X-Chromosomal-assoziierten Gene in Weibchen (XX) und Männchen (XY) durch den spezifischen DCC-Komplex (*Dosage Compensation Complex*, DCC) kontrolliert. Dabei wird im Männchen die einfache Gendosis des X-Chromosoms gegenüber den beiden X-Chromosomen im Weibchen ausgeglichen (Mendjan and Akhtar, 2007; Straub and Becker, 2007). Der Dosis-Kompensations-Komplex besteht aus fünf Proteinkomponenten, den sogenannten MSL- (*male specific lethal*) Proteinen (MSL-1, MSL-2, MSL-3, MOF und MLE) und den zwei *non-coding*-RNA-Bestandteilen *roX1* und *roX2*. Der DCC ist am männlichen X-Chromosomen lokalisiert und kann durch die Aktivität der H4-K16-spezifischen Lysin-Acetyltransferase MOF (*male absent on the first*) eine lokale Anreicherung der H4-K16-Acetylierung (Bone et al., 1994) bewirken. Durch die Anreicherung von H4K16ac wird eine Zunahme der Transkription im X-Chromosom des Männchens erreicht.

Da gezeigt werden konnte, dass die H4K16-Acetylierung in *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten verändert ist, wurde die Verteilung von MSL-1 und MOF als Bestandteile des Dosiskompensationskomplexes in *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten untersucht.

Das MSL-1-Protein ist in polytären Wildtypchromosomen der Männchen, neben vereinzelten Banden auf den Autosomen, sehr abundant an X-Chromosomen angereichert. Im Gegensatz dazu ist in Weibchen das MSL-1-Protein durch den polyklonalen MSL-1-Antikörper nur sehr schwach nachzuweisen. Vergleichende zytologische Aufnahmen zeigen, dass die Verteilung des MSL-1-Proteins an den polytären Chromosomen des Wildtyps und der *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten im Männchen und Weibchen gleich ist (Abb. 32). Die Bindung von MSL-1 beschränkte sich in den *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten auf das männliche X-Chromosom und ist an den weiblichen Chromosomen nicht nachzuweisen. Eine Bindung von MSL-1-Protein am Heterochromatin konnte nicht nachgewiesen werden. Einen Effekt der *Su(var)2-1^{null}* Mutante auf die Zusammensetzung des Dosiskompensationskomplexes durch den Verlust des SU(VAR)2-1-Proteins konnte anhand der Verteilung des MSL-1-Proteins nicht gezeigt werden.

Die Lokalisierung der H4K16-Acetyltransferase MOF ist an den polytären Chromosomen von *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten im Vergleich zu Chromosomen des Wildtyps nicht verändert (Abb. 32). MOF bindet in *Su(var)2-1^{null}* an allen Chromosomenarmen im Weibchen, im Männchen jedoch ist sie auf das X-Chromosom

beschränkt. Da beide untersuchten Proteine des Dosiskompensationskomplexes in einen Proteinkomplex mit MSL-2 und MSL-3 assoziieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie als Komplexpartner mit MOF sowie MSL-1 an die polytären Chromosomen binden (Abb. 32). *SU(VAR)2-1* beeinflusst nicht den DCC-Komplex da die Bestandteile des Komplexes MSL-1 und MOF in den untersuchten *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten ein Verteilungsmuster aufweisen welches dem des Wildtyps entspricht (Abb. 32). Wie die DCC-Komplexbestandteile MSL-2 und MSL-3 verteilt sind, konnte wegen des Fehlens guter Antikörper gegen MSL-2 und MSL-3 nicht gezeigt werden.

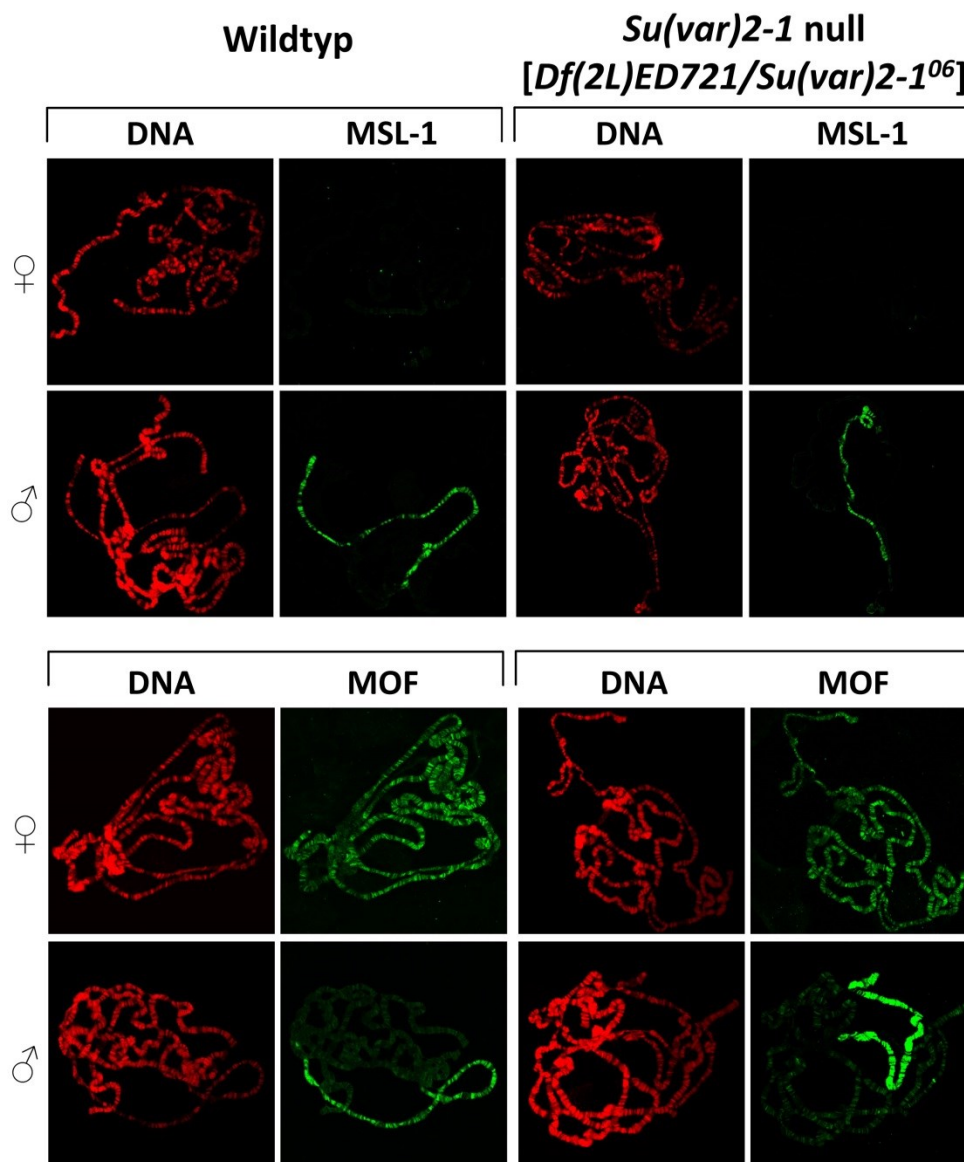


Abbildung 32: Verteilung von MSL-1-Protein an polytären Speicheldrüsenchromosomen der *SU(VAR)2-1*-Null-Mutanten und der Wildtyp-Larven.

Immunzytologischer Nachweis von MSL-1-Protein und MOF-Protein an weiblichen bzw. männlichen polytären Chromosomen in Wildtyp- und *SU(VAR)2-1*-Null-Larven. Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen MSL-1 bzw. MOF an polytären Chromosomen. Die Färbung der DNA wurde mit DAPI durchgeführt.

3.2.6 Beeinflussung der H3-Acetylierungen in *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten

Über die Acetyltransferasen und Deacetylasen, welche die wechselseitige Dynamik von Acetylierung und Deacetylierung der Lysine am Histon H4 bzw. H3 beeinflussen, liegen nur wenige komplexe Untersuchungen vor (Aka et al., 2011). Ein Kandidat für die veränderte Acetylierung der Histone in *Su(var)2-1*-Mutanten ist HDAC1 (RPD3, KDAC). Das RPD3-Protein ist in *S.cerevisiae* als Transkriptionsregulator beschrieben und hat eine *in-vitro*-Histon-Deacetylase-Aktivität (Vidal and Gaber, 1991; Kadosh and Struhl, 1998). Es konnte an *S.cerevisiae* gezeigt werden, dass in *rpd3*-Mutanten durch den Ausfall der Histondeacetylase-Aktivität eine Zunahme der Acetylierung an den Lysin 5 und 12 des Histons H4 stattfindet und in *Drosophila* durch RPD3 H3K9ac und H3K27ac Deacetyliert werden kann (Rundlett et al., 1996; Tie et al., 2009). Für von RPD3 in *Su(var)2-1^{null}* wurde ein α -RPD3-Antikörper (Rudolph et al., 2007) immunozytologisch und im Westernblot verwendet. (Abb. 33). An den polytären Chromosomen und im Westernblot zeigt RPD3 die *Su(var)2-1^{null}* Mutante eine leichte Reduktion im Vergleich zum Wildtyp. Die Chromosomen aber sind in *Su(var)2-1^{null}* nicht vollständig frei von RPD3, da der Antikörper auch in *Su(var)2-1^{null}* immer noch RPD3-Signal an den Chromosomen nachweisen kann (Abb. 33).

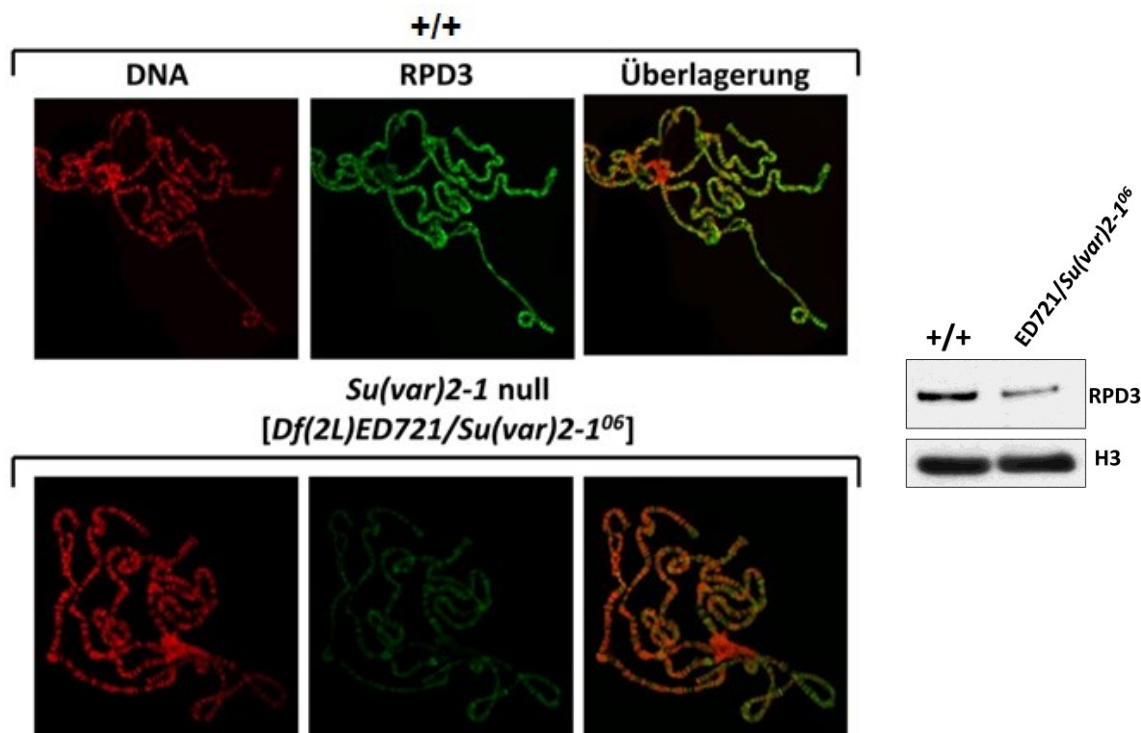


Abbildung 33: RPD3 an polytären Chromosomen von *Su(var)2-1*-Mutanten. Immunmarkierung und Westernblot an polytären Speicheldrüsenchromosomen des Wildtyps und transheterozygoten *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten mittels eines RPD3-Antikörpers. Die DNA-Färbung erfolgte mit DAPI.

Nach den Ergebnissen zur Verteilung von RPD3 in den *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten wurden die H3-Acetylierungen analysiert. Die zytologischen Untersuchungen der Acetylierung K9ac, K14ac, K18ac, K23ac und H3K27ac im Histon H3 zeigten, dass die Acetylierung an K9 und K27 in den *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten leicht erhöht ist. Für H3K9ac ist besonders im Chromozentrum eine zusätzliche Färbung erkennbar (Abb. 34A) die im Wildtyp sehr viel schwächer ist. Auf den Chromosomenarmen wird der Unterschied an H3K9ac im Wildtyp und *Su(var)2-1*-Mutante mit dem verwendeten Antikörper wie auch im Westernblot nicht deutlich (Abb. 34A).

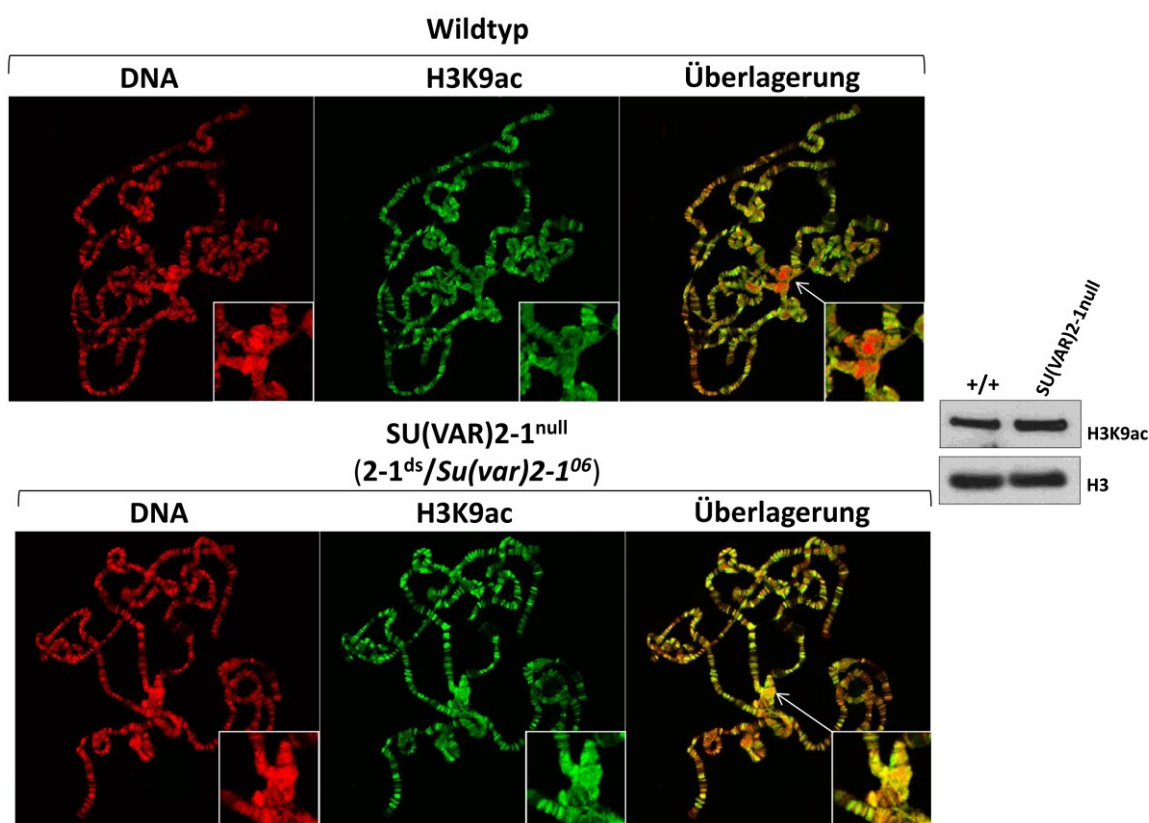


Abbildung 34A: Verteilung von H3K9ac an polytären Chromosomen im Wildtyp und *Su(var)2-1^{null}*
Übersicht zur H3K9-Acetylierung an euchromatischen Chromosomenarmen und dem Chromozentrum in Wildtyp- und *Su(var)2-1*-Mutanten. Das Chromozentrum ist in den Einzelabbildungen Vergrößert dargestellt. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. Der Nachweis der H3K9-Acetylierung erfolgte im Westernblot mit polyklonalen Antikörpern.

Die in den Wildtypchromosomen vorhandene H3K9-Acetylierung ist in einem besonders hohen Maße an den Chromosomenarmen in Banden lokalisiert. Die Zunahme der gesamten H3K9-Acetylierung in *Su(var)2-1*-Nullmutanten konnte im Westernblot nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 34A).

Die Acetylierung an den Lysin 14, 18 und 23 im Histon H3 sind in den *Su(var)2-1*-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

In weibliche und männlichen Larven des Wildtyps ist eine H3K27 Acetylierung bei beiden Geschlechtern vorhanden zeigen aber geschlechtsspezifische Unterschiede.

Die untersuchte H3K27 Acetylierung an polytänen Speicheldrüsenchromosomen weist in einem Vergleich von *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten mit dem Wildtyp eine Zunahme der H3K27 Acetylierung im Weibchen auf. Die nachgewiesene H3K27 Acetylierung ist dabei in den weiblichen *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten besonders stark an den Chromosomenarmen und im heterochromatischen Chromozentrum akkumuliert (Abb. 34B). Im Männchen ist zytologisch nur ein sehr schwacher Unterschied in der H3K27 Acetylierung bei der *Su(var)2-1*-Mutante nachzuweisen. Im Westernblot wird diese leichte Veränderung im Gegensatz zur weiblichen Larven nicht deutlich.

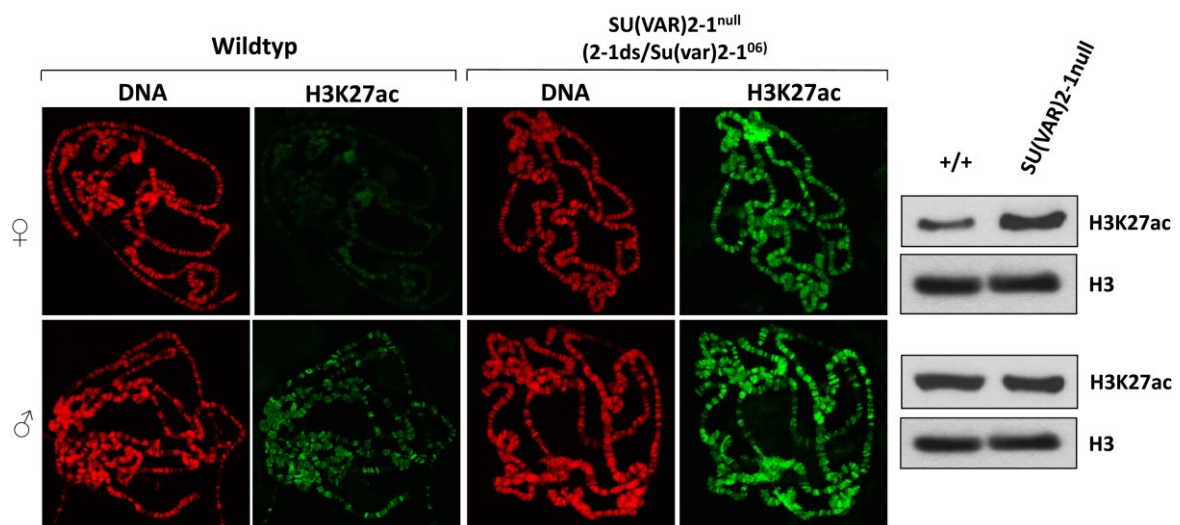


Abbildung 34B: H3K27ac an polytänen Chromosomen im Wildtyp und *Su(var)2-1^{null}*.

Übersicht der H3K27-Acetylierung an weiblichen larvalen polytänen Chromosomen in Wildtyp- und *Su(var)2-1*-Mutanten. Vergleich der H3K27-Acetylierung an männlichen larvalen polytänen Chromosomen in Wildtyp- und *Su(var)2-1*-Mutanten Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. Der Nachweis der H3K27-Acetylierung erfolgte im Westernblot mit polyklonalen Antikörpern.

3.2.7 H3K9me2 und HP1 an polytären Chromosomen von *Su(var)2-1^{null}*

Das Heterochromatinprotein 1 (HP1) und eine H3K9me2-Methylierung sind in polytären Chromosomen kolokalisiert. Es ist bekannt, dass HP1 mittels einer Chromo-Domäne an di- und tri-methyliertem H3K9 bindet und in Verbindung mit einer H4K20-Methylierung höher geordnete heterochromatische Strukturen aufgebaut werden (Bannister et al., 2001; Schotta et al., 2004). Zur Untersuchung, ob das SU(VAR)2-1-Protein einen Einfluss auf den H3K9/HP1/H4K20me3-Reaktionsweg hat, wurden polytäre Chromosomen von *Su(var)2-1^{null}* mit dem Wildtyp verglichen.

In den fixierten Speicheldrüsenchromosomen wurde H3K9me2 und die Bindung von HP1 mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert. H3K9me2 und HP1 sind im Wildtyp hauptsächlich im Chromozentrum und dem vierten Chromosom nachweisbar (Abb. 35). Zusätzlich zur Lokalisation im Chromozentrum ist HP1 auch schwach an einigen euchromatischen Banden und an den Telomeren nachzuweisen (Fanti et al., 1998). In *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten sind H3K9me2 und die HP1 Bindung am Chromozentrum im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 35). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass endogenes SU(VAR)2-1-Protein für die Methylierung von H3K9 durch SU(VAR)3-9 und die Bindung von HP1 im perizentrischen Heterochromatin nicht wichtig ist.

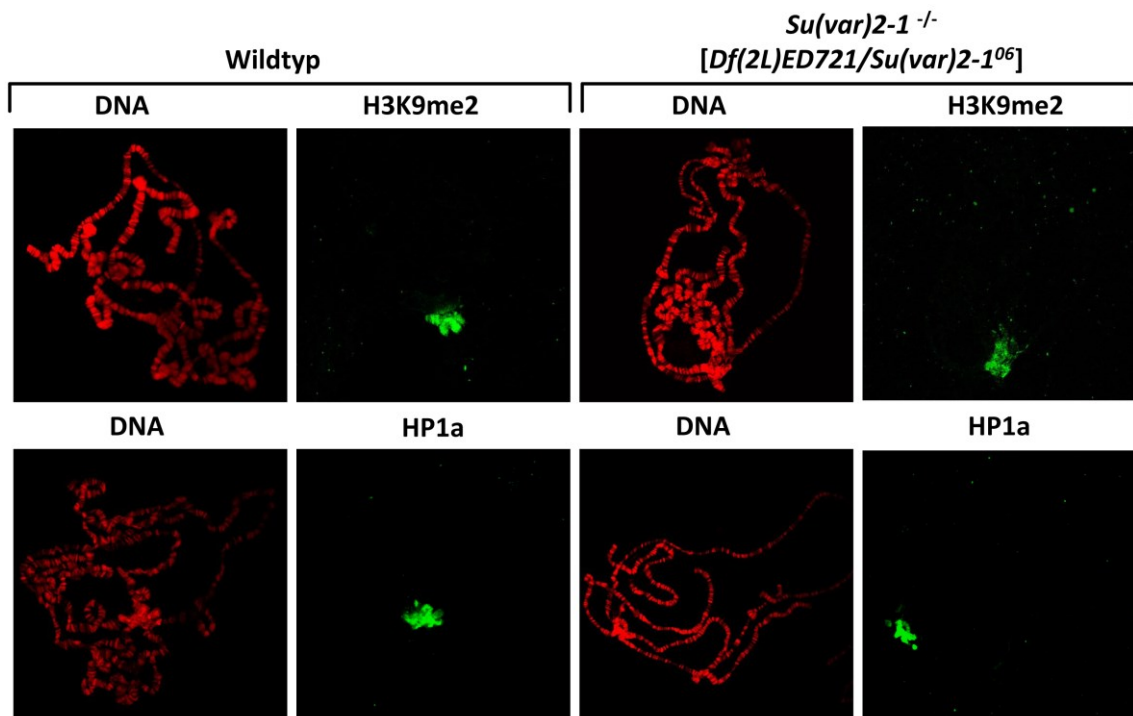


Abbildung 35: SU(VAR)2-1 beeinflusst die H3K9me2-Methylierung nicht und hat *in vivo* ebenfalls keinen Einfluss auf die Bindung von HP1. Lokalisierung und Vergleich von H3K9me2 und endogenem HP1 im Wildtyp- und *Su(var)2-1^{-/-}*. Der Nachweis in den dargestellten zytologischen Färbungen erfolgte mithilfe eines α -H3K9me2 bzw. eines α -HP1-Antikörpers. Die DNA-Färbung wurde mit DAPI durchgeführt.

3.2.8 Eine Verlust von SU(VAR)2-1 führt zu Defekten in der Oogenese

Komplementationskreuzungen einzelner *Su(var)2-1*-Allele untereinander und in Kombination zeigen in transheterozygoten Weibchen eine ausgeprägte weibliche Sterilität. Die Kombinationen der getesteten *Su(var)2-1*-Allele *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁶* und *Su(var)2-1¹⁵* mit den Defizienzen *Df(2L)ED721*, *Df(2L)ED729*, *Df(2L)BSC143* und *Df(2L)BSC144* zeigen alle eine weibliche Sterilität. Diese Sterilität führt dazu, dass die transheterozygoten *Su(var)2-1*-Mutantenweibchen keine Eier mehr ablegen. Zur Analyse der Oogenese wurden Ovarien von transheterozygoten *Su(var)2-1*-Mutantenweibchen präpariert und mit Ovarien des Wildtyps verglichen (Abb. 36A). Zur Untersuchung wurden die Allele *Su(var)2-1⁰²*, *Su(var)2-1⁰⁶*, *Su(var)2-1¹⁵* und die Deletion *Df(2L)ED721* in transheterozygoter Kombination verwendet. Die Ovarien der transheterozygoten Weibchen sind im Vergleich zu den Wildtypovarien stark reduziert und eine Differenzierung in Ovariolen bzw. Eikammern ist nicht mehr erkennbar (Abb. 35A). Eine Eientwicklung ist in keinem Stadium der Oogenese zu erkennen. Die durch CRISPR/CAs9 hergestellte homozygote Mutante *Su(var)2-1^{ds}* ist steril und zeigt ebenfalls starke Defekte in der Oogenese nach dem Verlust des SU(VAR)2-1-Proteins (Abb. 36B-C). Durch das genomische *Rescue*-Konstrukt *Su(var)2-1^{Strep}* kann die Sterilität von *Su(var)2-1^{ds}* gerettet werden (Abb.36C). Im *Rescue*-Stamm *Su(var)2-1^{Strep}* ist SU(VAR)2-1 als funktionsfähiges Fusionsprotein gut nachzuweisen (Abb. 36D).

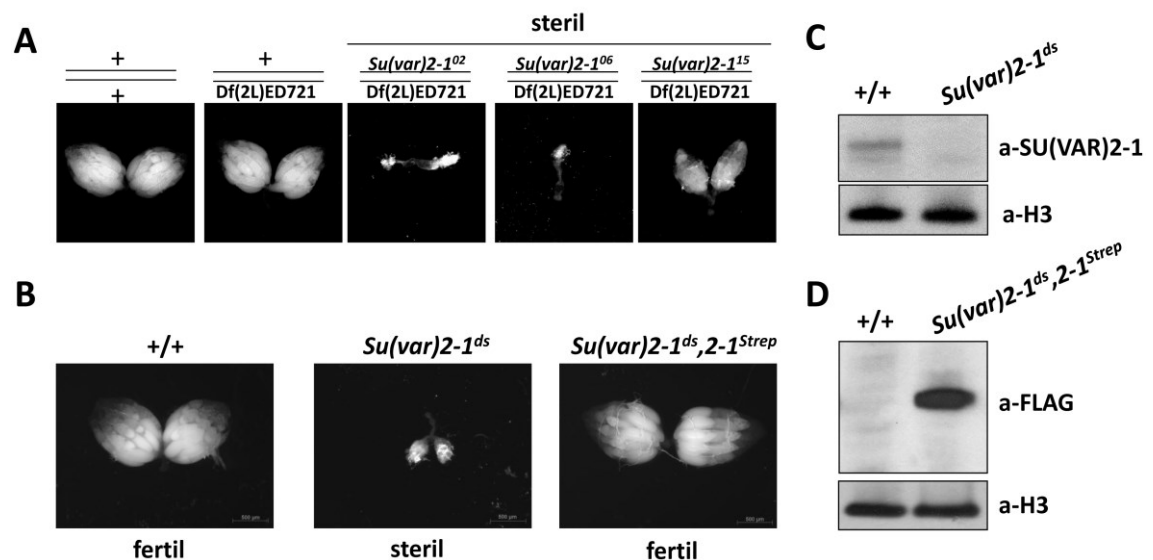


Abbildung 36: Einfluss von SU(VAR)2-1 auf die Oogenese. (A) Die Ovarienphänotypen einzelner *Su(var)2-1*-Allele mit der Deletion *Df(2L)ED721*. Der Verlust von SU(VAR)2-1-Protein führt in transheterozygoten Weibchen [*Su(var)2-1/Df(2L)ED721*] zu reduzierten Ovarien. (B) Homozygote *Su(var)^{ds}*-Weibchen sind steril und zeigen reduzierte Ovarien. *Su(var)2-1^{Strep}* kann die Sterilität und die Oogenese von *Su(var)2-1^{ds}* retten. (C) Homozygote *Su(var)2-1^{ds}*-Weibchen bilden kein SU(VAR)2-1-Protein. Der Nachweis erfolgte im Westernblot mit einem α -SU(VAR)2-1-Antikörper. (D) Nachweis von SU(VAR)2-1^{STREP} im Westernblot mit α -FLAG Antikörper. Als Ladekontrolle wurde α -H3 verwendet.

Zur weiteren Analyse der Oogenese wurden die Ovarien der *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen mit einem anti-VASA-Antikörper untersucht (persönliche Mitteilung, Dr. Sandy Mietzsch). Das mit der Keimbahn assoziierte VASA-Protein wird spezifisch im Zytoplasma der weiblichen Keimbahn exprimiert und dient in den durchgeführten Untersuchungen als immunzytologischer Marker für eine intakte Keimbahn. Die untersuchten *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen zeigten eine gute VASA-Färbung in den transheterozygoten *Su(var)2-1^{null}*-Ovarien. Zum Teil ist in diesen Ovarien ein beginnender Verlust der somatischen Follikelzellen zu erkennen (Abb. 37, Stadium 6) Die Keimbahn und damit auch die Oogenese weisen in *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen strukturelle Defekte in der Expansion der Follikelzellen auf und führen in Folge dessen zu einer Apoptose mit weiblichen Sterilität in *Su(var)2-1^{null}*.

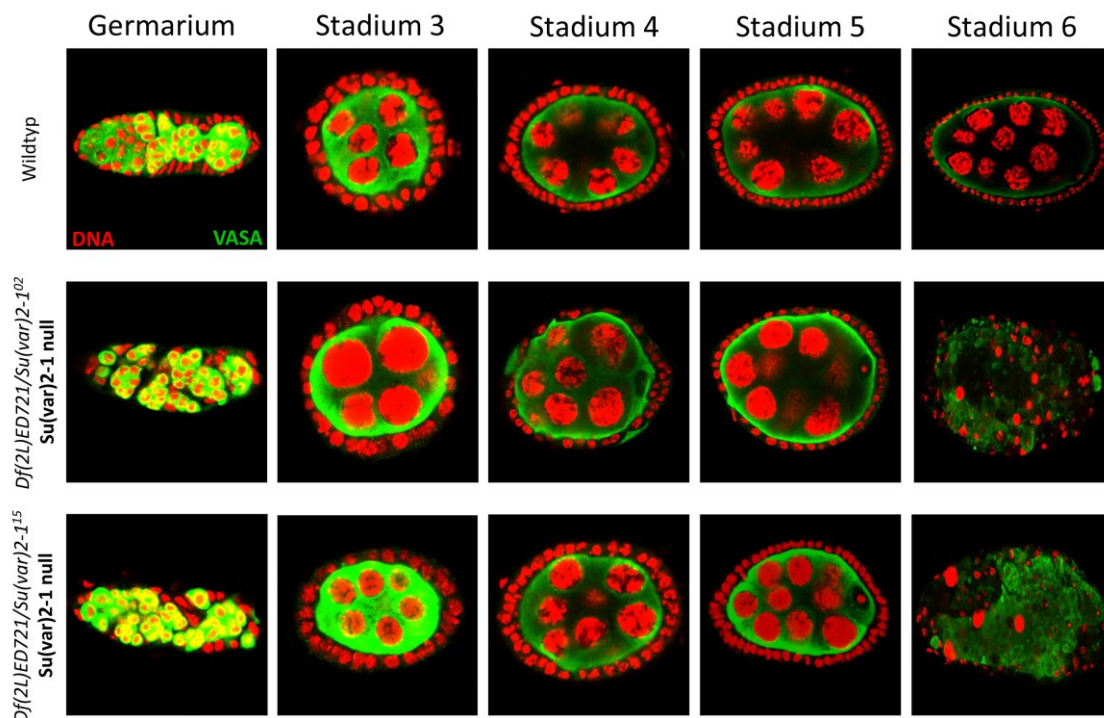


Abbildung 37: Entwicklungsdefekte während der Oogenese in *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten.

Konfokale Aufnahmen von Einzelstadien der Oogenese im Wildtyp und in *Su(var)2-1^{null}*-Mutanten. Der Nachweis von VASA erfolgte mit einem anti-VASA-Antikörper. VASA zeigt in *Su(var)2-1*-Mutanten keine geänderte Verteilung in der Oogenese im Vergleich zum Wildtyp bis zum 5. Oogenesestadium. Ab dem 6. Oogenesestadium zeigten die untersuchten *Su(var)2-1*-Mutanten morphologische Defekte im Vergleich zum Wildtyp. Die Färbung der DNA wurde mit DAPI durchgeführt.

Zur Rettung der Entwicklungsdefekte in den *Su(var)2-1^{null}*-Ovarien wurden neben dem bereits verwendeten Konstrukt *pP[UAST,attB gen.Strep-Su(var)2-1-V5-FLAG]* (Abb.36) auch die *pFlyFos* Konstrukte verwendet. Die Rettung der Entwicklungsdefekte wurde mit den Konstrukten FF-(2-1)-V5 und FF-(Δ2-1)-V5 durchgeführt. Das Konstrukt FF-(2-1)-V5 enthält ein unverändertes *Su(var)2-1*-Gen und das Konstrukt FF-(Δ2-1)-V5 ein „loss of function“ *Su(var)2-1*-Gen, durch die Insertion eines Stoppcodons.

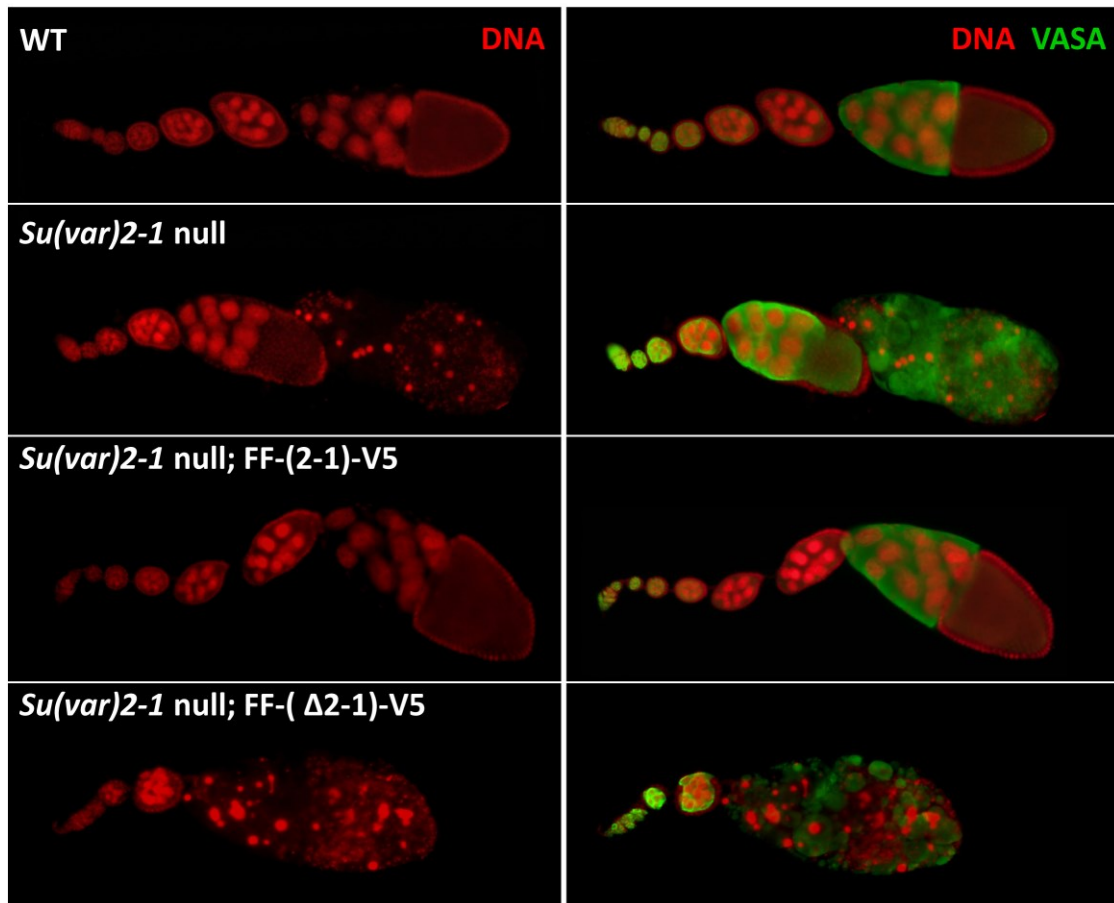


Abbildung 38: Rettung von Oogenesedefekten in *Su(var)2-1*-Mutanten mit *Flyfos*-Konstrukten.

Ovarien im Wildtyp mit normaler Oogenese (WT). Die Eikammern der transheterozygoten *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen (*DF(2L)ED721/Su(var)2-1⁰⁶*) zeigen ab dem 5. Oogenesestadium einen starken Entwicklungsdefekt. Das *FlyFos*-Transgen FF-(2-1)-V5 enthält ein Wildtypsequenz von *Su(var)2-1* und kann den Ovarienphänotyp der transheterozygoten *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen retten. Das *FlyFos*-Transgen FF-(Δ 2-1)-V5, welches ein Mutanten-*Su(var)2-1* enthält, kann zeigt keine Rettung. DNA-Färbung mit DAPI (rot). Nachweis von VASA mit einem VASA-Antikörper in der Keimbahn (grün).

Die Sterilität von *Su(var)2-1* konnte durch das Transgen FF-(2-1)-V5 vollständig gerettet werden. Die geretteten Weibchen zeigen mit dem eingebrachten Transgen eine normale Oogenese mit Eiablage. Die Oogenese der transheterozygoten *Su(var)2-1^{null}*-Mutantenweibchen wird somit durch das Wildtypkonstrukt FF-(2-1)-V5 vollständig gerettet. Eine Rettung der Sterilität mit dem Mutantenkonstrukt FF-(Δ 2-1)-V5 ist nicht möglich (Abb. 38).

3.2.9 Lokalisierung von SU(VAR)2-1-Fusionsproteinen in der Oogenese

In den Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass *Su(var)2-1* im Weibchen sehr stark exprimiert ist. Der polyklonale Antikörper, welcher an den Furchungskernen der frühen Embryogenese gut funktionierte, konnte für zytologische Untersuchungen an Ovarien nicht verwendet werden. Zum zytologischen Nachweis von SU(VAR)2-1 in der

Oogenese von *Drosophila melanogaster* wurden endogen exprimierte SU(VAR)2-1-V5-3xFLAG-Fusionsproteine verwendet (Abb. 39A). Durch spezifische Antikörper gegen den FLAG bzw. V5-Fusionsanteil konnte SU(VAR)2-1 zytologisch und im Westernblot in der Oogenese nachgewiesen werden (Abb. 39B). Am Anfang der Oogenese in *Drosophila* entwickelt sich innerhalb des Germariums durch vier Mitosen eine Cyste, welche aus 16 Zellen besteht (King, 1970). Die Zellen innerhalb der gebildeten 16-Zell-Cyste bleiben über cytoplasmatische Brücken (Ringkanäle) miteinander verbunden. Eine von zwei Zellen (Pro-Oozyten), die über vier Ringkanäle verfügt, wird später zur Eizelle und führt eine Meiose durch. Die verbliebene Pro-Oocyte und die übrigen vierzehn Zellen der Cyste entwickeln sich zu transkriptionell aktiven polyploiden Nährzellen. An diesen polyploiden Nährzellen ist das SU(VAR)2-1 Protein deutlich lokalisiert (Abb. 39A) und spielt möglicherweise dort bei einer transkriptionellen Aktivität der Nährzellen eine wichtige Rolle.

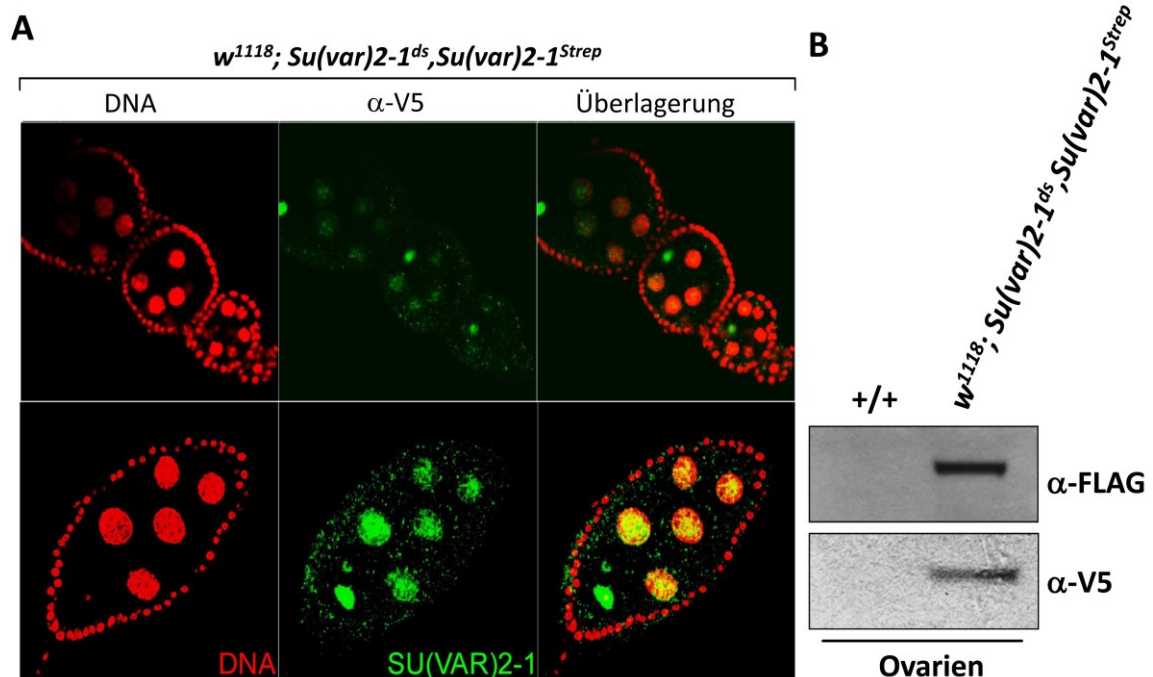


Abbildung 39: Immunzytologischer Nachweis von SU(VAR)2-1 als SU(VAR)2-1-V5-3xFLAG-Fusionsprotein in der Oogenese der transgenen Fliegenlinie $w^{1118}; Su(var)2-1^{ds}, Su(var)2-1^{Strep}$.

(A) Verteilung des SU(VAR)2-1-Fusionsproteins in der Oogenese. Über die ganzen Ovariolen und in den Eikammern ist eine Anreicherung des SU(VAR)2-1-Proteins in den Nährzellen und dem Eizellkern zu erkennen. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. (B) Western-Blot des unter endogener Kontrolle exprimierten SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Proteins in Ovarien mit anti-V5- bzw. anti-FLAG-tag-Antikörpern.

SU(VAR)2-1 ist abundant in den polyploiden Nährzellen gebunden. Die Nährzellen sind durch ihre hohe Transkriptionsaktivität Bildungsorte großer Mengen an maternalen Genprodukten wie z.B. die mRNA-Moleküle *bicoid*, *nanos* und *oskar* (Cha et al., 2001). Es werden zudem auch Ribosomen und Proteine innerhalb der Nährzellen gebildet, die

dann über die Ringkanäle in die Oozyte transportiert und dort deponiert werden. Die posterior gelegene Oozyte mit dem Oozytenkern, welcher sich in der meiotischen Prophase I befindet und durch eine Kondensation der Chromosomen ein Karyosom ausbildet, ist transkriptionell inaktiv (Carpenter, 1975; Morris and Lehmann, 1999). An diesem inaktiven Oozytenkern ist das SU(VAR)2-1-V5-3xFLAG-Fusionsprotein deutlich gebunden. Im einschichtigen Follikelzellenepithel, welches die Keimbahn umschließt, ist das SU(VAR)2-1-Fusionsprotein kaum bzw. schwach nachzuweisen.

3.2.10 Rettung des „held out wing“-Phänotyps in *Su(var)2-1*-Männchen

Neben der Rettung der weiblichen Sterilität und des Suppressoreffektes in *Su(var)2-1*-Mutanten war es möglich, dem im Männchen beobachteten „held out wing“-Phänotyp von *Su(var)2-1* erfolgreich zu retten. *Su(var)2-1* Mutantenmännchen zeigen im „held out wing“-Phänotyp abgespreizte Flügel, im Weibchen ist dieser Phänotyp nicht zu beobachten (Abb. 40A). Dieser im Männchen ausgeprägte *Su(var)2-1*-Phänotyp, kann durch das Transgen-Konstrukt FF-(2-1)-V5 vollständig gerettet werden (Abb. 40B). Das Konstrukt FF-(Δ 2-1)-V5, welches ein mutiertes *Su(var)2-1*-Gen besitzt, kann den „held out wing“-Phänotyp in den *Su(var)2-1* Mutanten nicht retten (Abb. 40B).

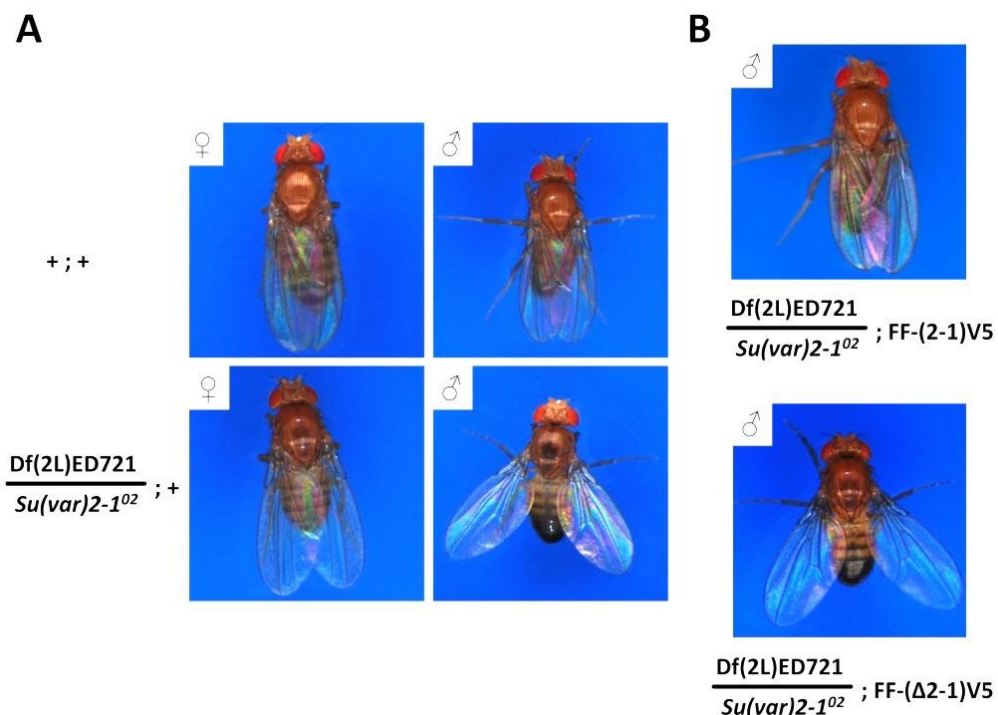


Abbildung 40: Rettung des „held out wing“-Phänotyps in transheterozygoten *Su(var)2-1*-Männchen. (A) Vergleich vom Wildtyp (+/+) mit transheterozygoten *Su(var)2-1*⁰²/*Df(2L)ED721*-Mutanten. *Su(var)2-1*-Mutanten bilden im Männchen einen „held out wing“-Phänotyp aus. (B) Rettung des „held out wing“-Phänotyps im Männchen durch das pFlyFos-Konstrukt FF-(2-1)-V5. Eine Rettung mit dem FF-(Δ 2-1)-V5-Konstrukt ist nicht möglich.

3.3 Analyse von SU(VAR)2-1-Proteinkomplexen

3.3.1 Expression und Reinigung von rekombinantem SU(VAR)2-1

Die Expression eines rekombinanten SU(VAR)2-1-Proteins wurde in *E.coli* und in *Drosophila melanogaster*-Schneider-Zellen (S2-Zellen) durchgeführt. Der Vorteil eines *E.coli* Expressionssystems ist, dass die Proteinausbeuten besser sind als in eukaryotischen Expressionssystemen, wie z. B. den S2-Zellen oder den *Kc* Zellkulturen. Allerdings sind diese eukaryotisch exprimierte Proteine funktionell näher am endogenen Protein als die prokaryotisch exprimierte.

Das vollständige SU(VAR)2-1-Protein ist in *E.coli* sehr schlecht löslich. Durch verschiedene cDNA-Konstrukte und *E.coli*-Stämme wurde die Ausbeute an löslichem Protein gesteigert. Der *E.coli*-Stamm BL21pLysE (Invitrogen) zeigte die besten Expressionseigenschaften für das rekombinante SU(VAR)2-1-Protein. In SU(VAR)2-1-Expressionskonstrukten wurden SU(VAR)2-1 mit N- und C-terminale Fusionen wie 6xHis, GST oder FLAG versehen und überexprimiert. Durch die eingeführte GST-Fusion am N-Terminus konnte die Löslichkeit für das SU(VAR)2-1 Protein deutlich erhöht werden. Der GST-tag und der zusätzlich erzeugte 7xHis-Fusions-Tag am C-Terminus ermöglichte eine erfolgreiche native Reinigung des Proteins durch GST-Affinitätschromatographie und IMAC (*Immobilized-Methal-Affinity-Chromatographie*).

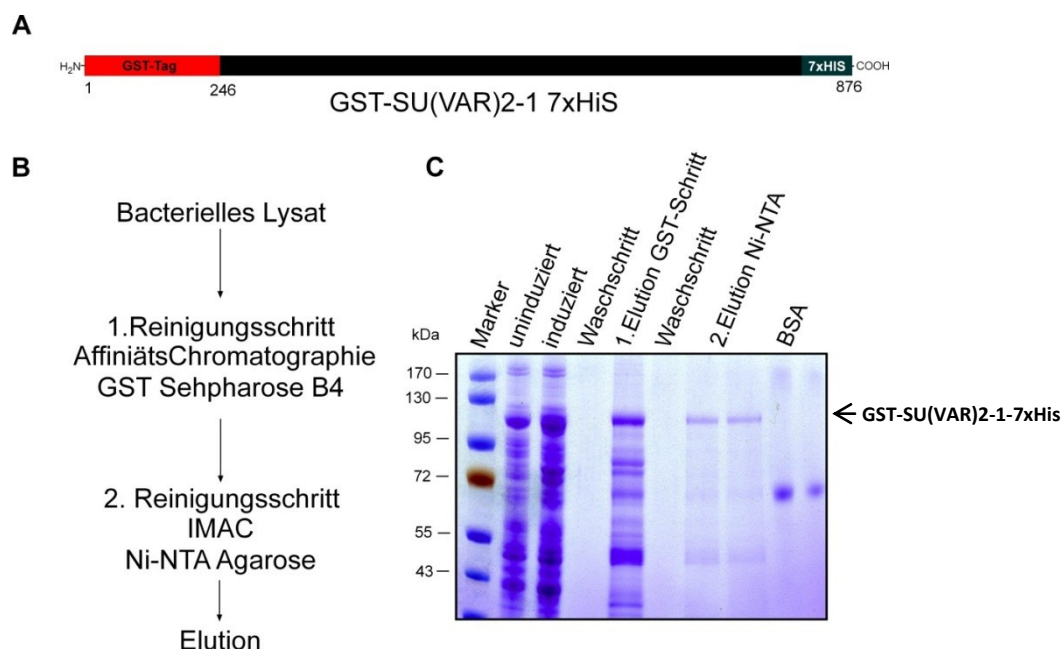


Abbildung 41: Reinigung von rekombinantem GST-SU(VAR)2-1-7xHis-Fusionsprotein.

(A) Exprimiertes GST-SU(VAR)2-1-7xHis-Protein mit einem GST- und 7xHis-Fusionsanteil. (B) Reinigungsschema für das GST-SU(VAR)2-1-7xHis-Fusionsprotein. (C) SDS-Page der durchgeführten Reinigungsschritte des rekombinanten SU(VAR)2-1-Fusionsproteins aus *E.coli*. In der 2. Elution konnte GST-SU(VAR)2-1-7xHis-Protein in zwei Fraktionen von der Ni-NTA-Agarose eluiert werden.

Mit dem GST-SU(VAR)2-1-7xHis-Konstrukt wurden zwei Protein-Tags zusammen an ein SU(VAR)2-1-Fusionsprotein kloniert und exprimiert (Abb. 41A). Das exprimierte GST-SU(VAR)2-1-7xHis-Fusionsprotein konnte über zwei Stufen erfolgreich aus *E.coli*-Proteinextrakten isoliert werden (Abb. 41 B und 41C). Das gewonnene rekombinante SU(VAR)2-1-Volllängenprotein wurde in einem EMSA eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Etablierung SU(VAR)2-1 exprimierender S2-Zelllinien

Das SU(VAR)2-1-Volllängenprotein ist unter Standardbedingungen in *E.coli* schlecht löslich und die Ausbeute an rekombinantem Protein ist sehr gering (Abb. 41C). Aus diesem Grunde wurden neben einem *E.coli*-Expressionssystem alternativ stabil exprimierende SU(VAR)2-1-Schneider-S2-Zellkulturen etabliert.

Die Schneider-S2-Zellkulturen sind eine embryonale männliche Zelllinie von *Drosophila melanogaster*, die besonders gut geeignet ist, um *Drosophila*-Proteine rekombinant zu exprimieren. Die endogenen Faktoren, welche eine Expression und die native Faltung von SU(VAR)2-1 begünstigen, sind in den S2-Zellen vorhanden und steigern die Ausbeuten an löslichem Protein deutlich (Thomas Rudolph, persönliche Mitteilung). Neben der Isolation von löslichem, rekombinantem SU(VAR)2-1-Protein konnte parallel in diesen Zelllinien der polyklonale SU(VAR)2-1-Antikörper charakterisiert werden. Die Extrakte eigneten sich sehr gut zum Test der Immunopräzipitationsfähigkeit von den verwendeten Antikörpern an nativen *Drosophila*-Zellkulturextrakten (Abb. 42).

Der für die Überexpression genutzte S2-Transfektionsvektor pMT-His-V5 (Invitrogen) ermöglicht eine stabile Integration ins Genom der S2-Zellen und führt zu einer kontrollierten Expression eines modifizierten SU(VAR)2-1-V5-6xHis-Fusionsproteines. Für die Untersuchungen an den S2-Zellen und für eine Überexpression von SU(VAR)2-1 konnten zwei Konstrukte hergestellt werden (Abb. 42A). Die Konstrukte ermöglichen nach Transfektion eine Integration in das S2-Zell-Genom und die Expression von FLAG-SU(VAR)2-1-V5-His- bzw. SU(VAR)2-1-EGFP-V5-His-Fusionsproteinen in den etablierten S2-Zelllinien (Abb. 42A).

Die Induktion der stabil in das Genom der S2-Zellen integrierten Konstrukte erfolgte durch einen induzierbaren Methallothionein-Promotor in verschiedenen Zeitintervallen von 12 bis 48 Stunden bei 25 °C (Abb. 42B).

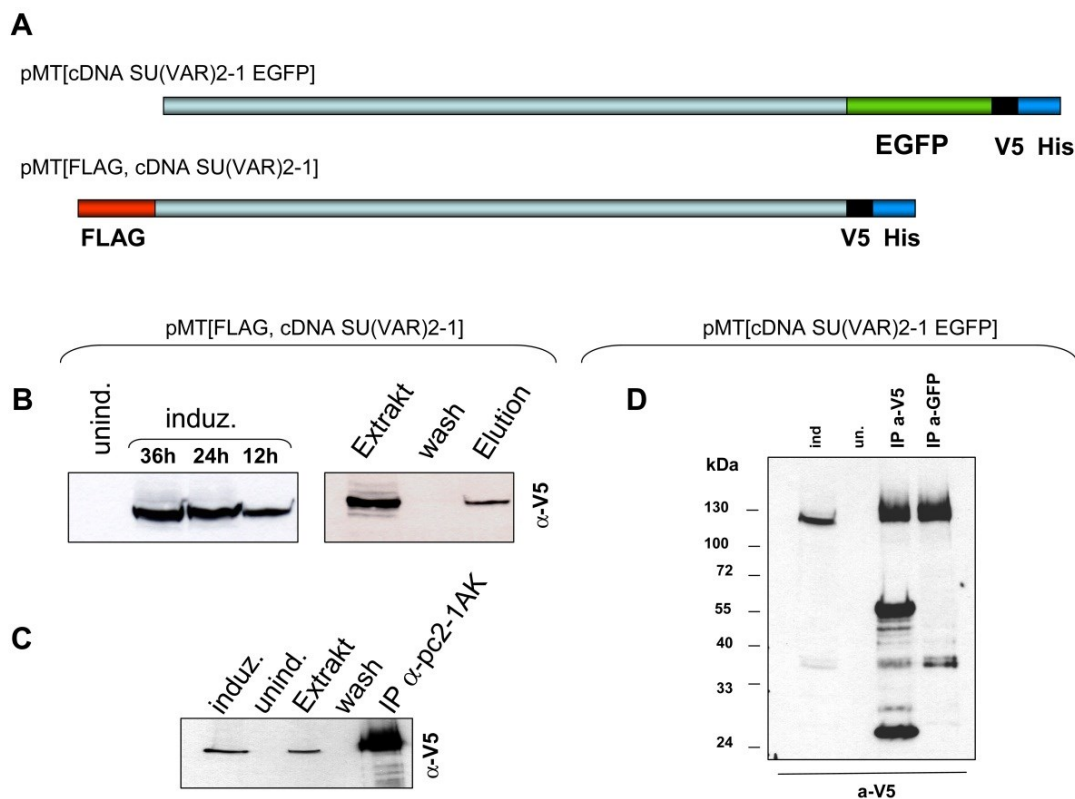


Abbildung 42: Expression von SU(VAR)2-Fusionsproteinen in stabilen S2-Zelllinien.

(A) SU(VAR)2-1-Fusionskonstrukte mit eingezeichneten FLAG-, EGFP- und V5-6xHis-Fusionsanteilen zur Transfizierung von S2-Zell-Linien. (B) Expression von pMT[FLAG, cDNA SU(VAR)2-1-V5-His] in transfizierten S2-Zell-Linien nach unterschiedlichen Induktionsintervallen und Affinitätsreinigung von FLAG-SU(VAR)2-1-V5-His an Ni-NTA-Sepharose. Der Nachweis erfolgte im Western-Blot durch die angegebenen Antikörper. (C) Immunopräzipitation von FLAG-SU(VAR)2-1-V5-His mit einem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper (AK) aus S2-Zellextrakten. (D) Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1-EGFP-V5-His mit α -V5- und α -EGFP-Antikörpern aus pMT[cDNA *Su(var)2-1* EGFP]-S2-Zellextrakten. Der Nachweis erfolgte mit dem angegebenen V5-Antikörper im Western-Blot.

Für die zwei Konstrukte konnten jeweils eine stabile S2-Zelllinien generiert werden, die nach einer Induktion des Methallothionein-Promotors ein entsprechendes Fusionsprotein exprimiert (Abb. 42B-D). Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte im Western-Blot mit monoklonalen α -V5-Antikörpern.

Zur Reinigung der SU(VAR)2-1-Fusionsproteine aus S2-Zellextrakten wurde die FLAG-SU(VAR)2-1-V5-His S2-Zelllinie entsprechend induziert und abgeerntet. Nach einem nativen Zellaufschluss der S2-Zellen konnte das SU(VAR)2-1-Fusionsprotein durch Reinigung mit einer Ni-NTA-Sepharose (Qiagen, Hilden) isoliert und nachgewiesen werden. Die von der Ni-NTA-Affinitätsmatrix eluierten Proteine wurden dazu in verschiedenen Fraktionen aufgefangen und nach einer SDS-PAGE im Westernblot getestet (Abb. 41B). Als Kontrolle wurden uninduzierte S2-Zellen nach der gleichen Vorgehensweise aufgearbeitet. Im Westernblot konnte das SU(VAR)2-1-Fusionsprotein in allen Elutionsfraktionen mittels eines V5-Antikörpers nachgewiesen

werden. Das exprimierte SU(VA)2-1-Fusionsprotein zeigt in den S2 Zellextrakten eine sehr gute Löslichkeit und die verwendeten Affinitätstags sind gut nutzbar. Die Kernextrakte der beiden stabilen Zelllinien wurden aufgrund der guten Löslichkeit des exprimierten SU(VAR)2-1-Fusionsproteins als Ausgangsmaterial für anschließende Immunopräzipitationen (IP) genutzt. Die Immunopräzipitation erfolgte mit einem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper an nativen Extrakten der FLAG-SU(VAR)2-1-V5-His-S2-Zelllinie. Nach einer Bindung des polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörpers an die Zielproteine konnten die Antikörper-Protein-Komplexe an Protein-A-Sepharose (Amersham) gebunden und präzipitiert werden (Abb. 42C). Zur Analyse der Immunopräzipitation, der Extrakte und der einzelnen Waschfraktionen wurden diese im Westernblot mit V5-Antikörpern untersucht (Abb. 42C). Aus den S2-Extrakten konnte mit dem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper erfolgreich das rekombinante FLAG-SU(VAR)2-1-V5-HIS-Fusionprotein isoliert und per Westernblot nachgewiesen werden. Des Weiteren war es möglich, das exprimierte Fusionsprotein SU(VAR)2-1-EGFP-V5-His mit V5 bzw. EGFP-Antikörper erfolgreich zu präzipitieren (Abb. 41D). Die getesteten α -V5- und α -EGFP-Antikörper (Clonotech) sind sehr gut geeignet, um eine Immunopräzipitation von nativem SU(VAR)2-1-EGFP-V5-HIS durchzuführen (Abb. 41D). Für die Untersuchung und die Reinigung von SU(VAR)2-1-Komplexpартnern ist eine Immunopräzipitation mit Antikörpern aus S2-Zellkulturen jedoch nicht geeignet, da die Menge der copräzipitierten Proteine (Silbergel, nicht gezeigt) für eine massenspektrometische Analyse nicht ausreichend waren. Um Interaktionspartner von SU(VAR)2-1 zu identifizieren, wurden basierend auf den Versuchen mit den S2-Zelllinien endogene SU(VAR)2-1-Komplexpартner aus der verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila* isoliert und charakterisiert.

3.3.3 SU(VAR)2-1 interagiert mit RPD3

Su(var)2-1-Mutanten zeigen eine Hyperacetylierung von H3 und H4 mit einer Reduktion von RPD3 an polytären Chromosomen. Die erhöhte Letalität von *Su(var)2-1* Mutanten gegenüber *n*-Butyrat deutet zudem sehr stark auf die Beteiligung von Histondeacetylasen im SU(VAR)2-1-Komplex hin da durch deren Inhibition die Letalität in den *Su(var)2-1*-Mutanten ansteigt. Mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation an nativen Speicheldrüsenextrakten konnte eine Interaktion von SU(VAR)2-1 mit RPD3 nachgewiesen werden.

Für die Untersuchungen wurden durch Rekombination Chromosomen aufgebaut, die sowohl cDNA-*Su(var)2-1-Egfp* unter UAS-Promotorkontrolle als auch *actin-GAL4*-Treiber tragen. Das Chromosom wird heterozygot durch das Blancerchromosom *CyRoI* stabilisiert und an die nachfolgende Generation weitergegeben.

Aus den Speicheldrüsen der SU(VAR)2-1-EGFP-exprimierenden Larven wurden native Extrakte hergestellt und mittels GFP-Trap (Chromotek) eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Als Kontrolle erfolgte eine Co-Immunopräzipitation an nativen Extrakten des Wildtyps. Die Analyse der erhaltenen nativen Extrakte, der Waschfraktionen sowie der Präzipitate erfolgte durch Westernblot mit polyklonalen Antikörpern gegen GFP, RPD3 und HP1a (Abb. 43). Es konnte eine direkte *in vivo* Interaktion durch eine Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 und RPD3 aus larvalen Extrakten mittels GFP-Trap gezeigt werden (Abb. 43). Eine Interaktion von HP1a mit SU(VAR)2-1 wurde in den Speicheldrüsenextrakten nicht nachgewiesen.

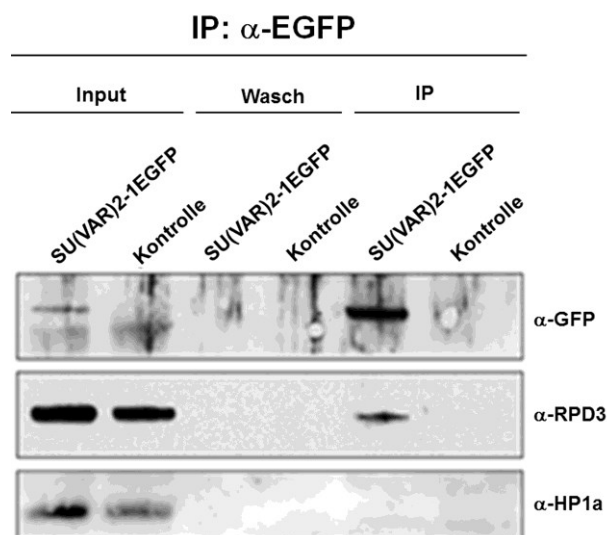


Abbildung 43: In vivo Interaktion von SU(VAR)2-1 und RPD3. Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 und RPD3 mit einem EGFP-Antikörper aus larvalen SU(VAR)2-1-EGFP-Extrakten. Im Westernblot mit Antikörper gegen GFP, RPD3 und HP1a an den Extrakten (Input), den Waschfraktionen (Wasch) und den Präzipitaten (IP) konnte RPD3 spezifisch nachgewiesen werden. In der Kontrolle konnte kein SU(VAR)2-1-EGFP, RPD3 und HP1a detektiert werden.

3.3.4 Isolation von SU(VAR)2-1 in Proteinkomplexen in der frühen

Embryogenese

Für die Isolation von SU(VAR)2-1-enthaltenden Proteinkomplexen aus Embryonen wurden Kernextrakte aus 0–12 Stunden alten Embryonen genutzt. SU(VAR)2-1 ist in den Stadien der frühen Embryogenese stark exprimiert und mit dem Chromatin assoziiert. Zur Charakterisierung von SU(VAR)2-1 wurde eine Isolation von SU(VAR)2-1 in Proteinkomplexen mit Hilfe transgener Fliegenlinien durchgeführt.

3.3.5 Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 aus Extrakten des Wildtyps

In den Experimenten wurde versucht, das SU(VAR)2-1-Protein und seine Komplexpartner aus 0-12 Stunden alten *Drosophila*-Embryonen in großen Mengen zu isolieren. Neben einer Isolation aus dem Wildtyp wurden zusätzlich die transgenen *Drosophila*-Linien P[rRS,w-gen. *Su(var)2-1-V5-FLAG*] und FF-(2-1)-V5 für die Interaktorenanalyse genutzt. In Vorexperimenten konnten die Präzipitatemengen und alternative Pufferbedingungen für die Proteinkomplex-Isolation mithilfe der transgenen P[rRS,w- gen. *Su(var)2-1-V5-FLAG*] Linie optimiert werden. Die Präzipitation von SU(VAR)2-1-V5-FLAG aus den nativen embryonalen Kernextrakten der transgenen Linie P[rRS,w- gen. *Su(var)2-1-V5-FLAG*] erfolgte durch Bindung eines gekoppelten spezifischen Antikörper an Protein-G/A-Agarose (Santa Cruz). Für die Immunopräzipitation konnten auch Antikörper verwendet werden, welche sich gegen den Fusionsanteil V5 und FLAG des SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Fusionproteins richten. In einem Hochsalzextraktionspuffer (Dignam et al., 1983) ist das SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Fusionsprotein sehr gut löslich und konnte mittels Immunopräzipitation erfolgreich aus dem Extrakt mit Antikörpern gebunden werden (Abb. 44A). Dabei zeigte der polyklonale SU(VAR)2-1-Antikörper, wie in den S2-Zell-Extrakten, eine gute Immunopräzipitationsfähigkeit gegen das SU(VAR)2-1-Protein (Abb. 44B). Die α -V5- und α -FLAG-Antikörper zeigten ebenfalls eine gute Präzipitation des Fusionsproteins aus den hergestellten embryonalen Extrakten (Abb. 44B)

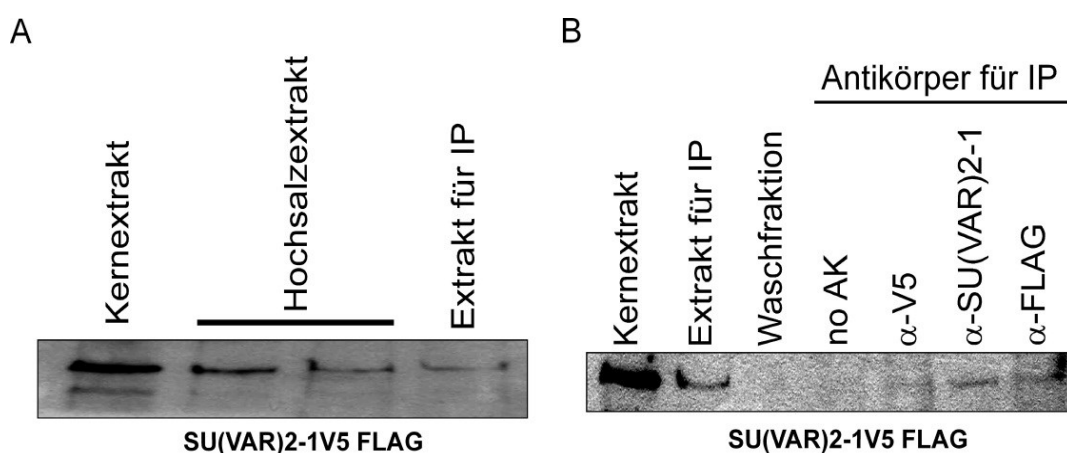


Abbildung 44: Herstellung embryonaler Gesamtproteinextrakten aus der transgenen Linie P[rRS,w-gen. *Su(var)2-1-V5-FLAG*] und Immunopräzipitation des SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Fusionsproteins mit versch. Antikörpern. (A) Kernextrakte aus 0-12 Stunden alten Embryonen der SU(VAR)2-1-V5-FLAG Fliegenlinie. Die isolierten Kerne wurden mit einem Hochsalzpuffer zu einem Hochsalzextrakt aufgeschlossen. Die Hochsalzextrakte wurden vor einer IP gegen einen Niedrigsalzpuffer dialysiert. (B) Immunopräzipitation (IP) von SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Fusionsprotein mit α -V5-, α -FLAG- und α -SU(VAR)2-1-Antikörpern an nativen embryonalen Kernextrakten. Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte nach SDS-PAGE im Westernblot mit einem monoklonalen α -FLAG-Antikörper.

Im Hefe-Dihybrid-Screen wurde der N-Terminale Bereich von dMES-4 als möglicher Interaktionsbereich mit SU(VAR)2-1 identifiziert (Walther, 2003). Zur Bestätigung der *in vivo* Interaktion von SU(VAR)2-1 mit dMES-4 sollten diese mittels Co-Immunopräzipitation bestätigt und eine Analyse weiterer Protein-Komplex-Partner vorgenommen werden.

Zur Immunopräzipitation an nativen Proteinextrakten des *Drosophila*-Wildtyps wurde der polyklonale SU(VAR)2-1-Antikörper kovalent an Protein-A-Agarose gekoppelt und mit Wildtyp-Proteinextrakten aus 0–2 Stunden alten Embryonen inkubiert. Die Elution der Proteinkomplexe erfolgte mit Glycinpuffer (pH 3,5), da eine Elution mit diesem Puffer im Vergleich zur Elution mit 10%igem SDS eine höhere Ausbeute ergab. Die Analyse der embryonalen Präextrakte, der Überstände, der Waschfraktionen sowie der eluierten Präzipitate erfolgte nach SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot (Abb. 45). In der Elution der IP konnte das SU(VAR)2-1-Protein, die H3K36-Methyltransferase dMES-4 und die H3K4me1/me2-spezifische Demethylase SU(VAR)3-3/dLSD1 nachgewiesen werden (Abb. 44). Die Proteine dMES-4 und SU(VAR)3-3 wurden mit SU(VAR)2-1 in 0-2 Stunden alten Extrakten copräzipitiert, was auf eine direkte Interaktion mit SU(VAR)2-1 hindeutet.

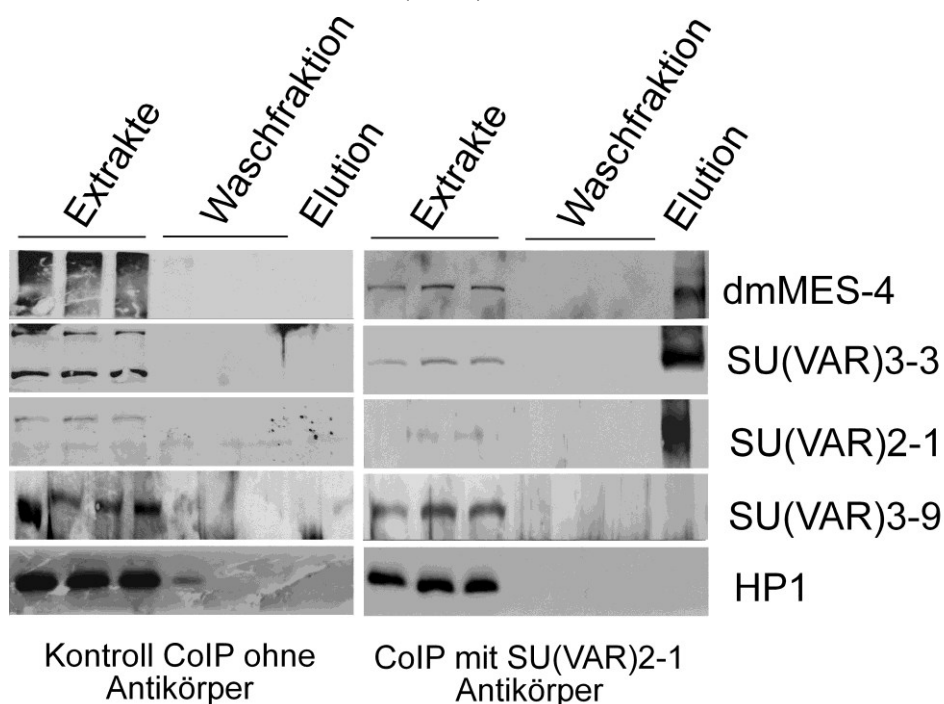


Abbildung 45: Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 an embryonalen Kernextrakten (0-2h) mit einem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper. Die Proteine dMES-4, SU(VAR)3-3, SU(VAR)2-1, SU(VAR)3-9, und HP1a konnten im löslichen Überstand der Extrakte nachgewiesen werden. In der Kontroll-CoIP an Wildtypextrakten, sind in der Elution keine Proteine im Western-Blot nachzuweisen. In der Elution der CoIP ist SU(VAR)2-1 als Präzipitat und dMES-4 bzw. SU(VAR)3-3 als Co-Präzipitate im Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern nachzuweisen.

In der Elution der Präzipitation von SU(VAR)2-1 sind SU(VAR)3-9 und HP1a nicht nachzuweisen und offensichtlich keine direkten Interaktionspartner von SU(VAR)2-1 in der sehr frühen Embryogenese von *Drosophila melanogaster* (Abb. 45).

Als Kontrolle zur Immunpräzipitation (IP) wurde eine IP ohne den spezifischen Antikörper mit Kernextrakt des Wildtyps durchgeführt. Hierbei sollte eine unspezifische Bindung von Proteinen an der Sepharosematrix bzw. unspezifisch gebundene Aggregate an der Protein-A-Agarose identifiziert werden. In den IP-Reaktionen am Wildtypextrakt konnten in der Elutionsfraktion keine unspezifischen Proteine detektiert werden (Abb. 45, Wächter, 2007).

Zur Bestimmung der Spezifität der gezeigten Interaktion von SU(VAR)2-1, dmMES-4 und SU(VAR)3-3 wurden weitere Experimente durchgeführt. In den weiterführenden Analysen wurden vor allem die Transgen-Fliegenlinien genutzt, die SU(VAR)2-1-V5-FLAG und STREP-SU(VAR)2-1-V5-FLAG exprimieren. Die auf pFlyFos- und *p[RS]*-basierenden transgenen Fliegenlinien stehen unter Kontrolle des endogenen Promotors und bilden funktionelle Fusionsproteine, die den Suppressorphänotyp und den Sterilitätsphenotyp von *Su(var)2-1*-Mutanten erfolgreich retten können. Durch den Einsatz der transgenen Linien und Antikörpern gegen SU(VAR)2-1, V5- und FLAG war es möglich, den SU(VAR)2-1/dMES-4-Komplex in einem zweiten Experiment zu bestätigen.

3.3.6 Reinigung von SU(VAR)2-1-Proteinkomplexen mit Ionenaustausch-Chromatografie

Mithilfe einer Affinitätschromatografie sollte eine Auftrennung und Isolation von SU(VAR)2-1-Proteinkomplexen erfolgen, um nachfolgend massenspektrometrisch unbekannte Interaktionspartner zu identifizieren zu können.

Durch die angewendete Ionenaustausch-Chromatografie ist es möglich, eine Trennung von verschiedenen Proteinkomplexen aufgrund ihrer Ladung zu erreichen. Dabei werden die einzelnen Proteine und die aus ihnen gebildeten Proteinkomplexe durch Unterschiede in ihren Ladungseigenschaften voneinander getrennt. Durch unterschiedlich starke ionische Wechselwirkungen zur Chromatografiematrix werden weniger gut gebundene von sehr stark gebundenen Faktoren durch eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Elutionspuffer getrennt und fraktioniert. Die Fraktionierung eines SU(VAR)2-1-Protein enthaltenden Komplexes erfolgte an einer HitrapMonoQ

Säulenmatrix (Amersham). Diese HiTrapMonoQ-Trennmatrix ist ein besonders starker Anionenaustauscher mit den quartären Ammoniumionen-Seitenketten $-O-CH_2N^+(CH_3)_3$ als funktionell negativ geladene Gruppen (Amersham, 2010).

Für eine Beladung der HiTrapMonoQ-Säule wurden dialysierte native embryonale Zellkernextrakte aus 0-12 Stunden alten Embryonen der transgenen Fliegenlinie SU(VAR)2-1-V5-FLAG verwendet. Das Extrakt wurde auf die HiTrapMonoQ-Säule aufgetragen und in vier Elutionsstufen (250 mM, 500 mM, 750 mM und 1.000 mM KCl) durch eine ansteigende Ionenkonzentration fraktioniert. Im Chromatogramm der Elutionsfraktionen ist zu erkennen, dass der wesentliche Teil der an der HiTrapMonoQ-gebundenen Proteine in zwei Peaks bei 750 mM KCl eluieren (Abb. 46). Das Fusionsprotein SU(VAR)2-1-V5-FLAG konnte im Westernblot mit einem α -V5-Antikörper im ersten Proteinelutionspeak nachgewiesen werden (Abb. 46B). Im zweiten Peak ist SU(VAR)2-1-V5-FLAG nicht nachzuweisen.

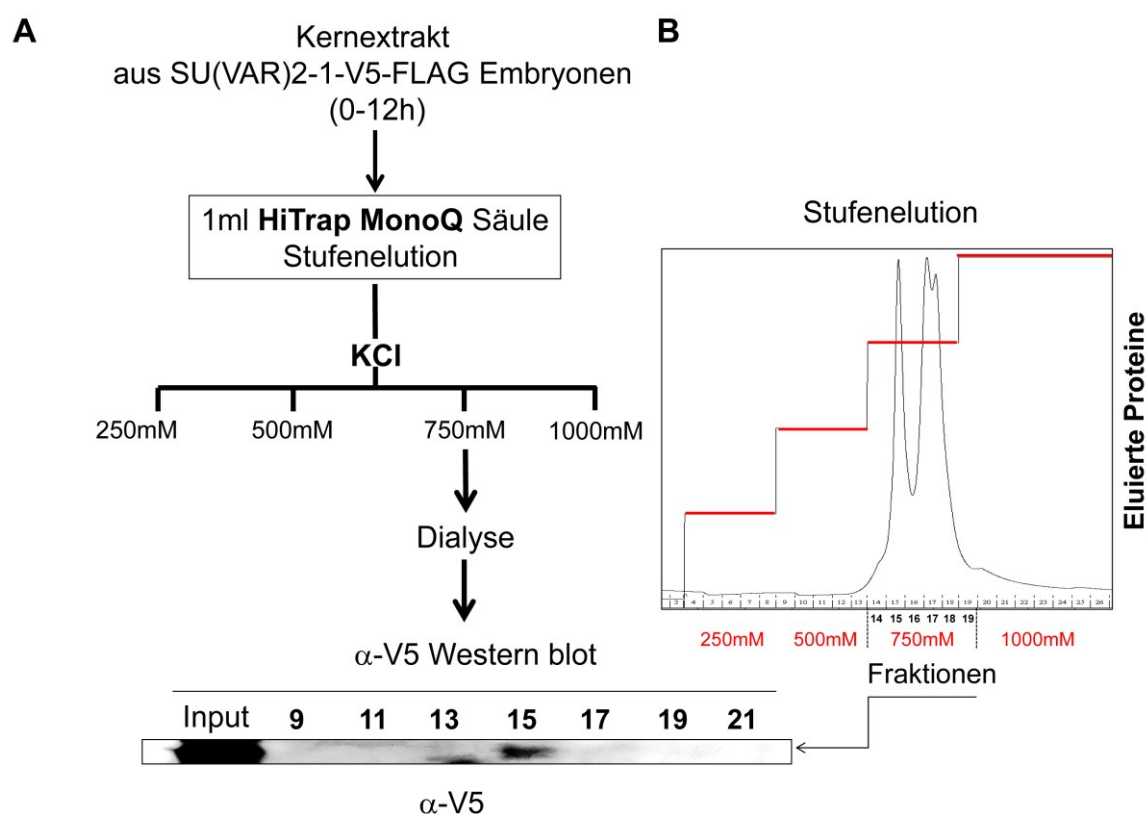


Abbildung 46: Schema zur Auftrennung von SU(VAR)2-1-V5-FLAG aus embryonalen Extrakten an HiTrapMonoQ und Nachweis von SU(VAR)2-1-V5-FLAG Protein in den Elutionsfraktionen.

(A) Das Extrakt aus 0-12 Stunden alten SU(VAR)2-1-V5-FLAG Embryonen wurde auf die MonoQ-Säule aufgetragen und anschließend in vier Stufen von 250mM, 500mM, 750mM und 1000mM KCl fraktioniert. Nach einer Dialyse erfolgte ein Westernblot der Elutionsfraktionen zum Nachweis von SU(VAR)2-1-V5-FLAG mit α -V5-Antikörpern. (B) Das Elutionsprofil der Proteine zeigt zwei deutliche Proteinspeaks in den 750mM KCl Elutionsfraktionen. Jede zweite Elutionsfraktion, beginnend von der 9. bis zur 21., wurde im Western-Blot mit einem α -V5-Antikörper getestet. In der Fraktion 15 erfolgte der Nachweis von SU(VAR)2-1-V5-FLAG durch einen spezifischen α -V5-Antikörper.

Der erste Peak der 750mM Elution umfasst die drei Fraktionen 14, 15 und 16. Der zweite Proteinelutionspeak schließt sich unmittelbar an den ersten Peak an und beinhaltet die Fraktionen 17, 18 und 19 (Abb. 47). Nach einem Test aller Fraktionen des ersten Proteinpeaks konnte das Fusionsprotein SU(VAR)2-1-V5-FLAG spezifisch in den Fraktion 14 und 15, aber nicht in der Fraktion 13 nachgewiesen werden (Abb. 46 und 47). In allen anderen Fraktionen konnte SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Protein im Westernblot nicht detektiert werden. Ein putativer SU(VAR)2-1 einhaltender Proteinkomplex befindet sich somit im ersten Peak der Elution. Zur weiteren Eingrenzung von Interaktionskandidaten wurden cofraktionierten Proteine in den Fraktionen 14, 15 und 16 mit spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 47).

Zum Nachweis einer Co-Fraktionierung mit SU(VAR)2-1 wurden Antikörper gegen dMES-4, SU(VAR)3-3 [dLSD1], E(Z), RPD3, α -V5, HP1c und H3 im Westernblot verwendet (Abb. 47). Dabei zeigte sich, dass SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Protein nur in den Fraktionen 14 und 15 zu finden ist. In der Elutionsfraktion 14 konnten neben dem SU(VAR)2-1-Fusionsprotein auch E(Z) und SU(VAR)3-3 als kofraktionierte Proteine nachgewiesen werden. In der Fraktion 15 konnten gemeinsam mit dem SU(VAR)2-1-V5-FLAG das dMES-4-Protein, SU(VAR)3-3, E(Z), RPD3 und HP1c kofraktioniert werden. In Fraktion 16 ist von den getesteten Proteinen nur dMES-4 sehr schwach mit den endogenen dMES-4-Antikörpern nachzuweisen (Abb. 47). Die Elutionsfraktionen 14,15 und 16 sind in ihrer Zusammensetzung deutlich voneinander verschieden.

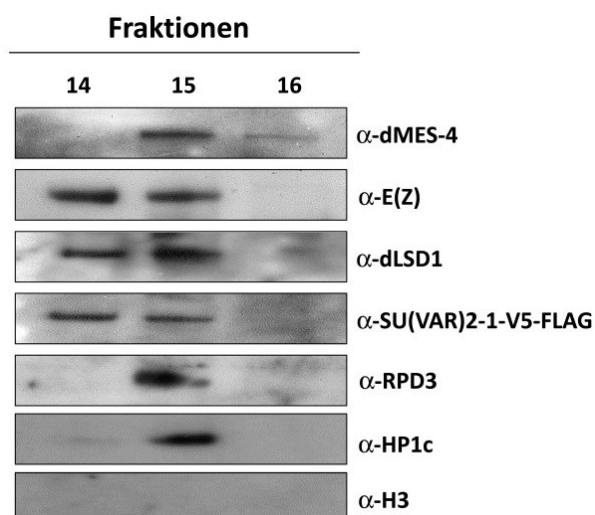


Abbildung 47: Analyse der Fraktionen 14, 15 und 16 mit Antikörpern im Westernblot.

In Fraktion 14 sind die Proteine E(Z); dLSD-1 und SU(VAR)2-1-V5-FLAG im Westernblot nachweisbar. In der Fraktion 15 konnten dMES-4, E(Z), dLSD1, SU(VAR)2-1-V5-FLAG, RPD3 und HP1c als cofraktionierte Proteine nachgewiesen werden. In der Fraktion 16 ist von den getesteten Proteinen nur dMES-4 in einer sehr schwachen Konzentration zu detektieren. Für den Nachweis wurden die angegebenen endogenen bzw. Tag-spezifischen Antikörper im Westernblot verwendet.

3.3.7 Präzipitation von SU(VAR)2-1 aus Fraktionen nach Ionenaustauschchromatografie

Für die Isolation von SU(VAR)2-1-Proteinkomplexen wurden die SU(VAR)2-1-V5-FLAG enthaltenden Elutionsfraktionen 14 und 15 gegen 75 mM KCl dialysiert und als Ausgangsmaterial für eine FLAG-Immunopräzipitation verwendet (Abb. 48A).

Die dialysierten SU(VAR)2-1-V5-FLAG-enthaltenden Fraktionen 14 und 15 wurden vereinigt und mit einer M2- α -FLAG-Agarose (Sigma-Aldrich) versetzt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die an M2- α -FLAG-Agarose gebundenen Präzipitate durch eine Zugabe von FLAG-Peptid eluiert und nach einer SDS-PAGE im Westernblot analysiert (Abb. 48B).

Aus den Elutionsfraktionen 14 und 15 konnte das SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Protein erfolgreich durch die Immunopräzipitation an einer M2- α -FLAG-Agarose isoliert werden (Abb. 47B). Neben dem präzipitierten SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Protein konnte auch das dMES-4-Protein als Copräzipitat in der Elution nachgewiesen werden. Die Proteine E(Z), dLSD1, RPD3 und HP1c konnten in diesem Western-Blot nicht als copräzipitierte Proteine von SU(VAR)2-1-V5-FLAG detektiert werden (Abb. 47B).

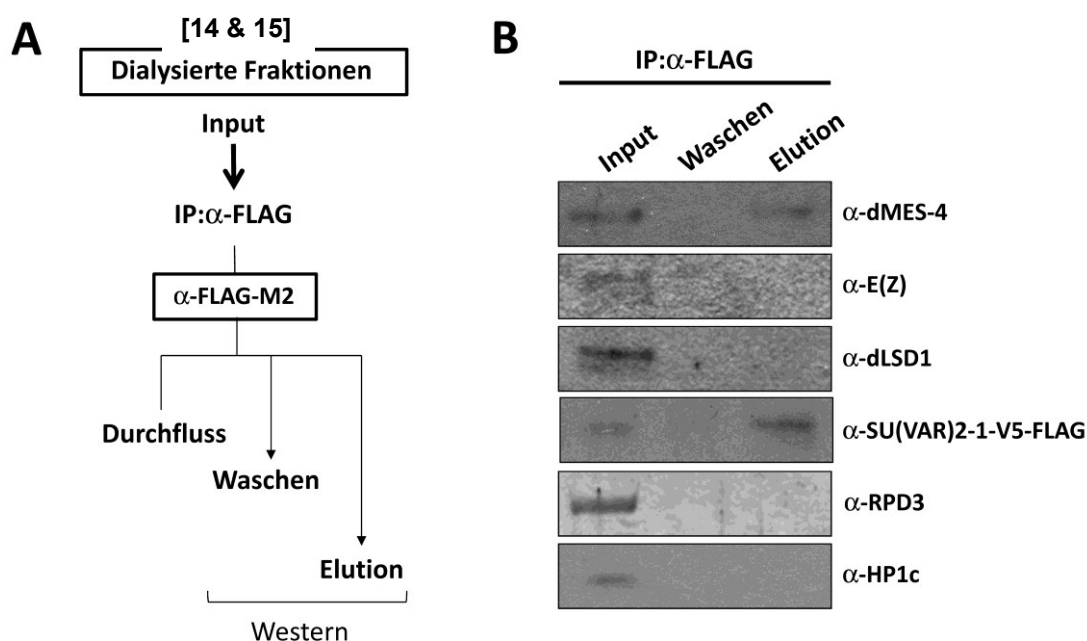


Abbildung 48: Schema zur Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1-V5-FLAG an den Fraktionen 14/15 mittels M2- α -FLAG-Agarose und Analyse der Präzipitate im Westernblot.

(A) Die dialysierten Elutionsfraktionen 14/15 der Anionen-Austausch-Chromatografie wurden mit M2- α -FLAG-Agarose versetzt. Nach einer Bindung der M2- α -FLAG-Agarose an den FLAG-Fusionsanteil des SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Proteins wurden die Präzipitate nach mehreren Waschschritten mit einem FLAG-Peptid eluiert. (B) Der Input, die Waschfraktion und das Eluat wurden im Western-Blot mit α -dMES-4-, α -E(Z)-, α -dLSD1-, α -V5-, α -RPD3- und α -HP1c-Antikörpern analysiert.

3.3.8 Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1-V5-FLAG aus transgenen Fliegenlinien

Für die Charakterisierung der Interaktion von SU(VAR)2-1 mit dMES-4 wurden Co-Immunopräzipitation aus embryonalen Extrakten von Transgenen enthaltenden *Su(var)2-1*- und *dMes-4*-Fliegenlinien durchgeführt. Die Co-IP erfolgte aus embryonalen Extrakten 0–12 h alter Embryonen des Wildtyps, der SU(VAR)2-1-V5-FLAG Linie und der FLAG-V5-dMES4-exprimierenden *FlyFos* Fliegenlinie.

In der transgenen *dMes-4*-pFlyFos-Fliegenlinie wird das FLAG-V5-dMES-4 expremiert und im Kernextrakten (Input) mit einem V5-Antikörper nachgewiesen. Eine Immunopräzipitation des FLAG-V5-dMES-4-Fusionsproteins aus den Extrakten wurde mit einem monoklonalen FLAG-Antikörper durchgeführt (Abb. 49A).

An den Extrakten des Wildtyps und der SU(VAR)2-1-V5-FLAG exprimierenden Fliegenlinie wurden die Proteine jeweils mit DynaBeads (Invitrogen) gekoppelten Antikörpern isoliert und die Präzipitate im Westernblot analysiert.

In der IP wurde mit dem FLAG-Tag-Antikörper, dem V5-Antikörper und dem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper jeweils unabhängig das SU(VAR)2-1-V5-FLAG-Fusionsprotein aus den Zellkernextrakt (Input) isoliert (Abb. 49A). Zusätzlich dazu konnte aus der transgenen Fliegenlinie FLAG-V5-dMES-4 mit dem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper das FLAG-V5-dMES-4-Fusionsprotein als Copräzipitat von nachgewiesen werden. Dieses deutet auf eine direkte Interaktion von SU(VAR)2-1 mit dMES4 hin (Abb. 48B).

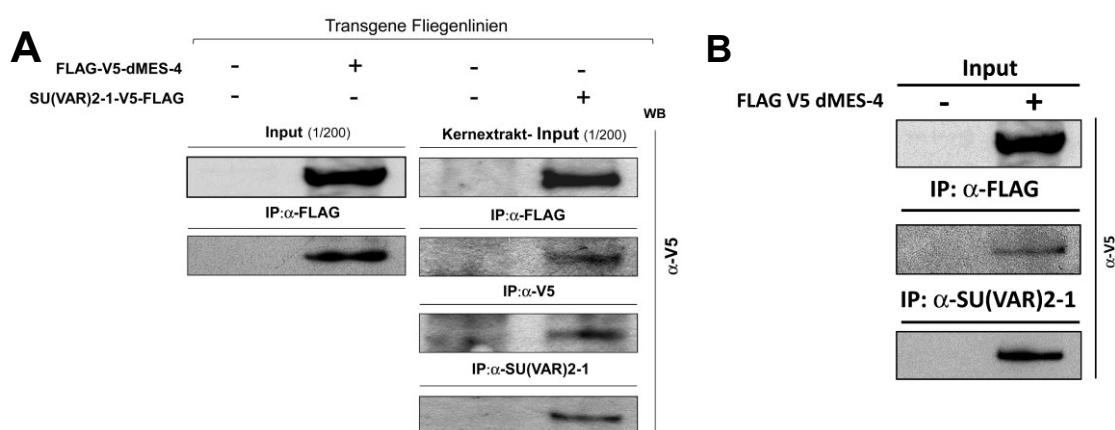


Abbildung 49: Co-Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 und dMES-4 aus transgenen Linien.

(A) Nachweis von FLAG-V5-dMES-4 und SU(VAR)2-1-V5-FLAG im Extrakt der exprimierenden transgenen Fliegenlinien. Immunopräzipitation von FLAG-V5-dMES-4 mittels FLAG-Tag-spezifischen Antikörpern. Immunopräzipitation (IP) von SU(VAR)2-1-V5-FLAG mit α -FLAG-, α -V5- und α -SU(VAR)2-1-AK. Der Nachweis erfolgte jeweils mit einem V5-Tag-spezifischen Antikörper. (B) Co-IP von FLAG-V5-dMES-4 mit dem polyklonalen SU(VAR)2-1-Antikörper an Transgenen FLAG-V5-dMES-4 Extrakten. Die Fusionsproteine wurden mit α -V5-Antikörpern im Westernblot nachgewiesen.

3.4 dMES-4/NSD als Interaktionspartner von SU(VAR)2-1

In *Drosophila* konnte mit Hilfe der chromosomalen Deletion *Df(3R)D13-1* das Gen *dMes-4* (CG4976) als Suppressor für die Positioneffekt-Variegation im Rearrangement *In(1)w^{m4h}* identifiziert werden (Rudolph, 2000).

Das Gen *dMes-4* befindet sich auf dem dritten Chromosom in der Region 98B, besteht aus fünf Exonen und codiert für ein Protein von 1427 Aminosäuren. Im 5'-Bereich des Genes befindet sich in der Fliegenlinie pP[RS3]CB-0044-3 ein P-Element. Dieses pP[RS3]CB-0044-3-Element wurde zur Herstellung von definierten Deletionen verwendet, die nach ihrer Etablierung im PEV-System einen Suppressoreffekt aufweisen (Schäfer, 2004). Untersuchungen von dMES-4 und SU(VAR)2-1 im Hefe-Dihybrid-Screen weisen auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine hin (Walther, 2003). Die Interaktion von dMES-4 mit SU(VAR)2-1 dient als Ausgangspunkt zur detaillierten Analyse der *in vivo* Funktion von dMES-4 in *Drosophila melanogaster*.

3.4.1 dMES-4 ist ein evolutionär konserviertes Protein

Die dMES-4 Proteine besitzen konservierte Proteinmotive, wie zwei PWWP-Domänen, drei PHD-Motive und einer SET-Domäne (Abb.50A). Das dMES-4-Protein zeigt hohe evolutionäre Konservierung zwischen dem human-Orthologen MMSET, dem *Drosophila* dMES-4 und dem *C.elegans* MES-4 (Greer and Shi, 2012). Außerhalb der festgestellten konservierten Domänen ist nur eine geringe Homologie nachweisbar (Schultz et al., 1998).

Die konservierten PHD- und PWWP-Domänen sind verantwortlich für Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen. Proteine mit PWWP-Domänen können mit modifizierten Histonen interagieren, wie z. B. mit H3K36me3 (Dhayalan et al., 2010; Vezzoli et al., 2010). PHD-Domänen enthaltende Proteine wie die Proteine der ING-Familie binden über dieses Motiv an modifizierten Lysinen wie H3K4me3 (Shi et al., 2006). Am C-terminus des dMES-4-Proteins befindet sich eine SET-Domäne mit einem cysteinreichen Post- und Pre-SET-Bereich.

Die katalytischen Funktionen von SET-Domänen ist sehr gut untersucht und sind oft Hauptbestandteile von Histon-Methyltransferasen. Analysen der SET-Domäne des *Drosophila*-Proteins SU(VAR)3-9 und die seines human-orthologen SUV39H1 zeigen eine wichtige enzymatische Funktion bei der Übertragung von Methylgruppen auf das Lysin 9 im Histon H3 (Rea et al., 2000; Schotta et al., 2002).

3.4.2 Erzeugung definierter *dMes-4*-Mutanten mit CRISPR/Cas9

Für molekulare und genetische Untersuchungen konnten definierte Mutantenallele von *dMes-4* mit dem CRISPR/Cas9-System und HDR (*homology direct repair*) hergestellt werden. Zur Etablierung dieser Mutanten wurde ein *dMes-4*-HDR-Konstrukt erstellt, welches ca. 1kb lange homologe Bereiche der 5' (HR-L)- und 3' (HR-R)- Region enthält. Diese homologen Bereiche flankieren gRNA-Zielsequenzen, welche in ein gRNA-Konstrukt kloniert wurden. Nach erfolgter Transformation des *dMes-4*-HDR-Konstruktes in CAS9-exprimierenden Fliegenlinien (Tab.1) konnten sieben *DsRed*-enthaltende Fliegenlinien aufgebaut werden. Der Austausch chromosomaler Bereiche über die gRNA/Cas9-vermittelte homologe direkt Reparatur führt durch den Einbau der Markergen-kassette zu einem Verlust codierter Bereiche des *dMes-4* Genes (Abb.50B). Die so generierten *dMes-4^{ds}*-Mutantenallele enthalten *DsRed* an Stelle der codierten Bereiche und sind „*loss of function*“ Mutanten. Durch die zusätzlich in den *dMes-4^{ds}* inkorporierten LoxP-Sequenzen konnte nachfolgend mit einer *Cre*-Rekombinase das Markergen *DsRed* entfernt werden. Die *Cre*-Rekombinase erkennt die LoxP-Sequenzen und führt eine Rekombination zwischen den zwei enthaltenden Lox-Sequenzen durch. Nach der *Cre*-Rekombinase-Aktivität ist in den *dMes-4^{null}*-Mutanten nur noch eine attP bzw. LoxP-Sequenz enthalten (Abb.50C). Die aufgebauten Fliegenlinien wurden stabilisiert, mit dem *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement gekreuzt und für die weitere molekulare Analyse von *dMes-4* verwendet.

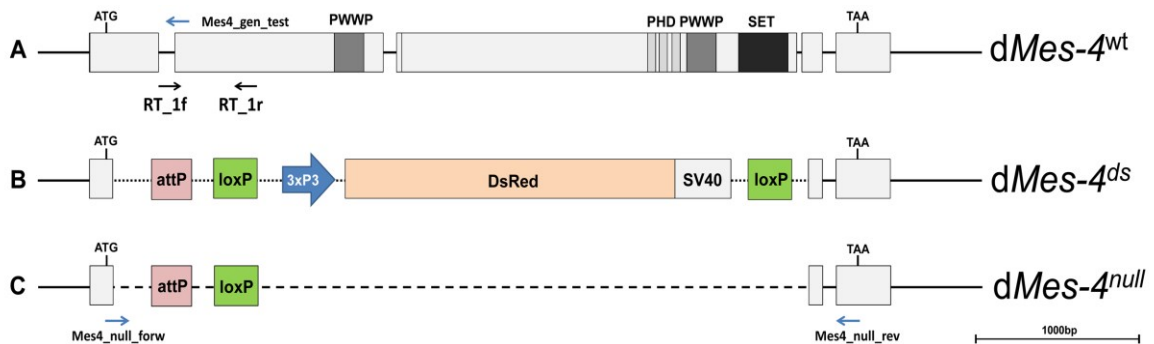


Abbildung 50: Erstellung CRISPR/Cas9-induzierter *dMes-4*-Mutanten.

(A) Schematische genomische Organisation des *dMes-4*-Genes mit den PWWP-, PHD- und SET-Domänen. (B) Durch CRISPR/Cas9 induzierte *dMes-4^{ds}*-Mutanten nach HDR-Modifikation durch den Austausch codierender *dMes-4* Bereiche mit den Sequenzen für 3xP3-, *DsRed*-, LoxP und einer attP-Docking-Stelle. (C) Entfernung des Markergenes *DsRed* durch eine *Cre*-LoxP-Reaktion führt zur Erzeugung von *dMes-4^{null}*-Allelen, welche kein 3xP3 und *DsRed* enthalten. Die eingezeichneten Primer RT_1f und RT_1r dienen zum Nachweis von *dMes-4* Transkripten. Die Primer Mes4_null_forw, Mes4_null_rev und Mes4_gen_test wurden zur molekularen Bestimmung der *dMes-4^{ds}* Mutanten verwendet.

3.4.3 Charakterisierung von erzeugten *dMes-4*-Mutanten

Für die genetische Untersuchung von *dMes-4* im PEV-System wurden die durch CRISPR/Cas9 erzeugten *dMes-4*-Allele mit dem Rearrangement *In(1)w^{m4h}* gekreuzt. *dMes-4^{ds}*-Allele zeigen in heterozygoten Kombinationen (*dMes-4^{ds}/TM3*) nur im Weibchen einen leichten Suppressor-Effekt (Abb. 51). In heterozygoten Männchen ist kein PEV-Effekt zu erkennen. In homozygoten Weibchen (*dMes-4^{ds}/dMes-4^{ds}*) zeigen alle neu erzeugten *dMes-4^{ds}*-Allele einen starken Suppressoreffekt auf das Rearrangement *In(1)w^{m4h}*. In homozygoten Männchen der *dMes-4^{ds}*-Allele ist ein abgeschwächter Suppressoreffekt im Rearrangement *In(1)w^{m4h}* zu erkennen. Dieser Su(var)-Effekt ist sehr variabel und reicht von einer schwachen (*dMes-4^{ds70}*) bis hin zur einem starken Suppression von *In(1)w^{m4h}* in der Mutante *dMes-4^{ds51}*. In allen *dMes-4^{ds}* Allelen ist kein *dMes-4* Transkript mit den Primern RT_1f und RT_1r nachzuweisen.

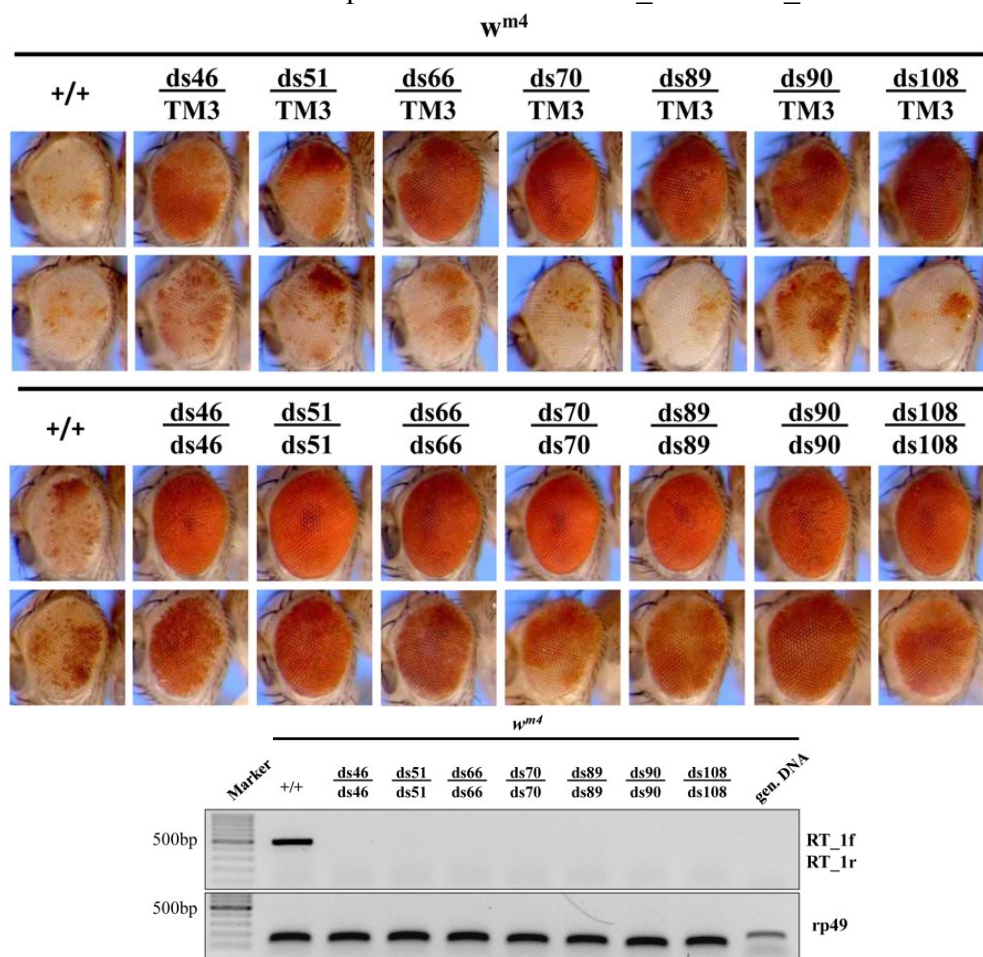


Abbildung 51: *dMes-4* ist ein rezessiver Suppressor für PEV. Im Hintergrund von *In(1)w^{m4h}* zeigen die *dMes-4^{ds}*-Allele in heterozygoten Kombinationen (*dMes-4^{ds}/TM3*) im Weibchen einen leichten Suppressoreffekt. In heterozygoten Männchen ist kein PEV-Effekt zu erkennen. In homozygoten Weibchen (*dMes-4^{ds}/dMes-4^{ds}*) zeigt sich ein starker Suppressoreffekt. In den homozygoten Männchen ist der beobachtete Suppressoreffekt im Rearrangement *In(1)w^{m4h}* sehr ungleichmäßig und reicht von schwacher Suppression bis hin zu einer starken Suppression von PEV. Die erstellten *dMes-4^{ds}*-Mutanten bilden kein *dMes-4*-Transkript. Als RT-PCR-Kontrolle dient rp49 und genomische Wildtyp-DNA.

3.5 Analyse der enzymatischen Aktivität von dMES-4/NSD

3.5.1 dMES-4 ist eine H3K36-Methyltransferase

Methylierung als Modifikation an N-terminalen Enden der Histone können durch Methyltransferasen katalysiert werden. Verschiedene Modifikationsarten sind mit inaktiven (H3K9me2) bzw. aktiven (H3K4me2) Genabschnitten assoziiert. Hauptbestandteil von Methyltransferasen sind SET-Domän-Proteinmotive, welche die Übertragung von Methylgruppen auf Lysinreste der Histone katalysieren.

Das dMES-4-Protein besitzt neben zwei PWWP- und drei PHD-Proteinmotiven eine C-terminale SET-Domäne. Für die Aktivität von dMES-4 konnten bereits enzymatische Aktivitäten in S2- und Kc-Zellkulturen beschrieben werden. Ein Verlust von dMES-4 führt nach einem RNAi-Knock down in der Zellkultur zu einer Reduktion einer H3K36me1- und H3K36me2-Methylierung (Bell et al., 2007). Die H3K36me3 Methylierung ist nicht beeinflusst und wird hauptsächlich durch HYPB katalysiert.

Eine H3K36me1, H3K36me2 und H3K36me3 ist in *Drosophila melanogaster* im Euchromatin in den Interbanden zu finden (Ebert et al., 2006). In *Drosophila-Kc*-Zellen konnte gezeigt werden, dass transkriptionell inaktive heterochromatische Bereiche frei von einer H3K36me2 und H3K36me3 sind, aber stark in transkriptionell aktiven euchromatischen Regionen angereichert werden (Bell et al., 2007).

Um die Abhängigkeit der H3K36-Methylierung von dMES-4 *in vitro* zu zeigen, wurde rekombinantes GST-dMES-4-Fusionsprotein (GST-wt) hergestellt. Mit dem GST-dMES-4-Protein konnte der Bereich der katalytisch aktiven SET-Domäne (AS 1105-1384) exprimiert und gereinigt werden. Neben einem katalytisch aktiven GST-dMES4-Protein wurde durch eine *in vitro* Mutagenese ein katalytisch inaktives GST-dMES4-Protein (SET-mut) für Kontrollversuche hergestellt. In diesem wurde das aktive NHSC-Motiv im Zentrum der SET-Domäne zu einem inaktiven AASC-Motiv mutiert.

Die rekombinanten GST-dMES-4-Proteine wurden mit unmarkierten SAM (S-adenosyl-[methyl-]-methionin), C¹⁴-markierten SAM und rekombinanten Histon H3 bzw. Histon-H3-Peptid (AS 33-40) inkubiert. Zum Nachweis übertragener radioaktiver C¹⁴-Isotope enthaltenden Methylgruppen auf die Lysine der Histone wurden diese nach einer SDS-Page an einen Phosphorimager (Fuji) dokumentiert. Das GST-dMES-4-Fusionsprotein (SET-wt) zeigt eine signifikante *in-vitro*-Methyltransferase-aktivität gegenüber Histon H3, da nach der Methyltransferasereaktion die C¹⁴-Methylgruppen auf das rekombinante Histon H3 übertragen wurden (Abb. 52B).

Zum Nachweis einer H3K36-Methyltransferaseaktivität wurden zusätzlich rekombinantes Histon H3 *in vitro* mit unmarkiertem SAM durch das GST-dMES-4-Fusionsprotein methyliert. Es konnte im Westernblot gezeigt werden, dass die SET-Domäne in dem rekombinant exprimierten dMES-4 eine H3K36-Methyltransferase ist, die *in vitro* H3K36me1 und -me2, aber nicht H3-K36me3 katalysiert (Abb. 52C). GST-dMES4-Protein (SET-mut) besitzt keine H3K36-Methyltransferaseaktivität.

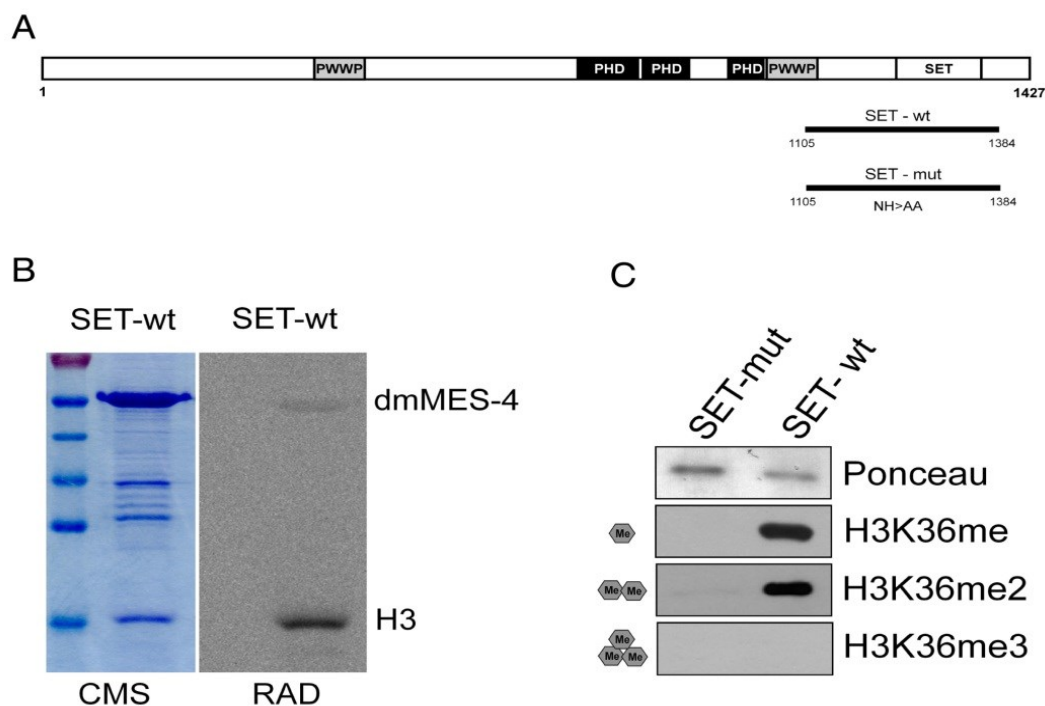


Abbildung 52: H3K36-Methylierung durch die Histonmethyltransferase dMES-4/NSD.

(A) Proteindomänen in dMES-4 und eingesetzte GST-dMES-4-Fusionsproteine. Die GST-dMES-4-Konstrukte enthalten die Aminosäuren 1105-1384 mit der C-terminalen SET-Domäne von dMES-4. Gezeigt ist die relative Lage der GST-dMES-4-Fusionsproteine SET-wt (Wildtype) und SET-mut (SET-Mutante). (B) SDS-PAGE der gereinigten rekombinanten GST-dMES-4-Fusionsproteine (SET-wt) und Radiogramm des Methyltransferase-Assay mit unmethyliertem rekombinanten Histon H3. Die C¹⁴-markierten Histone wurden im Phosphorimager detektiert. (C) Westernblot von *in vitro* methyliertem rekombinanten Histon H3. Der Nachweis erfolgte mit H3K36 Antikörpern. Als Kontrolle wurde die enzymatisch inaktive SET-mut im Assay verwendet.

3.5.2 dMES-4 kontrolliert die früh-embryonale H3-K36-Methylierung

Im frühen Stadium der Embryonalentwicklung sind eine Vielzahl von Enzymen und Proteinen beteiligt, die für eine differenzierte Organisation des nativen Chromatins besonders wichtig sind. Das Ziel von Faktoren, wie z.B. Methyltransferasen, ist das Chromatin der differenzierenden Embryonen. Dieses wird durch katalytische Prozesse in der Embryogenese in euchromatische und heterochromatische Bereiche differenziert. Das Protein dMES-4 ist eine H3K36-Methyltransferase, die in sehr frühen Embryonalstadien von *Drosophila melanogaster* eine enzymatische Funktion aufweist.

In *Drosophila melanogaster* wird in den frühen Entwicklungsstadien eine spezielle Art von Kernteilungen gefunden, die als syncytiale Furchung beschrieben wird. Nach einer Fusion des maternalen und des paternalen Kernes finden mehrere Kernteilungen statt, ohne dass eine Zellmembran ausgebildet wird. Die etablierten Furchungskerne sind genetisch inaktiv, enthalten aber im Furchungschromatin eine Vielzahl von Histonmodifikationen, wie Acetylierung und Methylierung (T. Rudolph, pers. Mitteilung). Im Syncytium, bis zum zehnten Kernteilungszyklus, wird keine Zellmembran ausgebildet. Aus dem Syncytium heraus beginnt die Entwicklung eines zellulären Blastoderms mit einer typischen Rabl-Konformation des Chromatins. Mit Hilfe dieser besonderen Charakteristik kann das Chromatin zytologisch sehr einfach in Eu- und Heterochromatin unterschieden werden.

Das dMES-4-Protein zeigte eine *in vitro* H3K36-Methyltransferase-Aktivität. Voruntersuchungen an Embryonen im Wildtyp sollen Aufschluss über Verteilung der H3K36-Methylierung am Histon H3 in den verschiedenen Stadien der Embryogenese geben (Abb. 53-54).

Bereits vom ersten Kernteilungszyklus an, bis hin zum vierzehnten Kernteilungszyklus der Embryogenese, ist am Furchungschromatin der Furchungskerne *in vivo* eine H3K36me1 und -me2-Methylierung am Chromatin nachzuweisen (Abb. 53A-B). Eine frühe H3K36me1 und -me2 ist auch in den Polzellen des 12.-14. Stadiums zu erkennen.

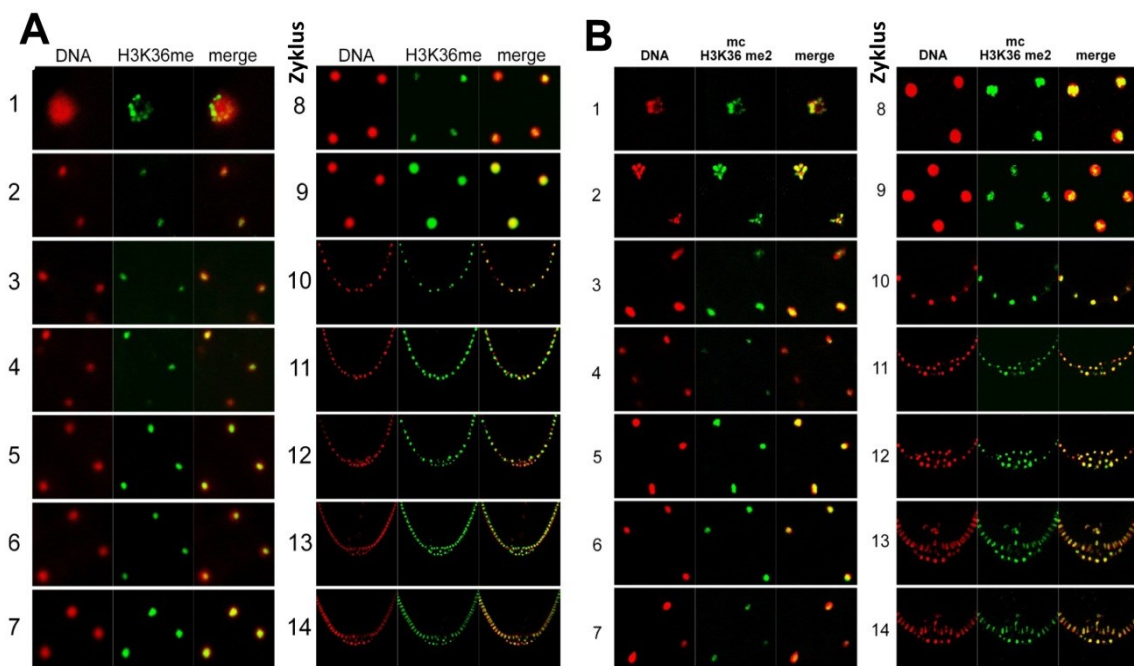


Abbildung 53: Frühembryonale Verteilung von H3K36me1 und H3K36me2 in den Kernteilungszyklen 1 bis 14 in *Drosophila melanogaster*. (A) H3K36me1 ist im frühen Furchungschromatin (1-10) und in späteren Stadien (12-14) mit den Polzellen assoziiert. (B) Nachweis der frühen H3K36me2 Methylierung. Die Verteilung von H3K36me2 entspricht dem der Verteilungsmuster von H3K36me1.

Im Gegensatz zur H3K36me1- und H3K36me2-Methylierung ist eine H3K36me3-Methylierung, außer im ersten Stadium, nur ab dem beginnenden neunten bis zehnten Zellteilungszyklus nachzuweisen. (Abb. 54). Die H3K36me3-Methylierung lokalisiert dabei hauptsächlich distal im Euchromatin der Zellkerne. Das apikal lokalisierte Heterochromatin ist frei von H3K36me3 und ist mit den verwendeten Antikörpern dort nicht nachzuweisen (Abb. 54).

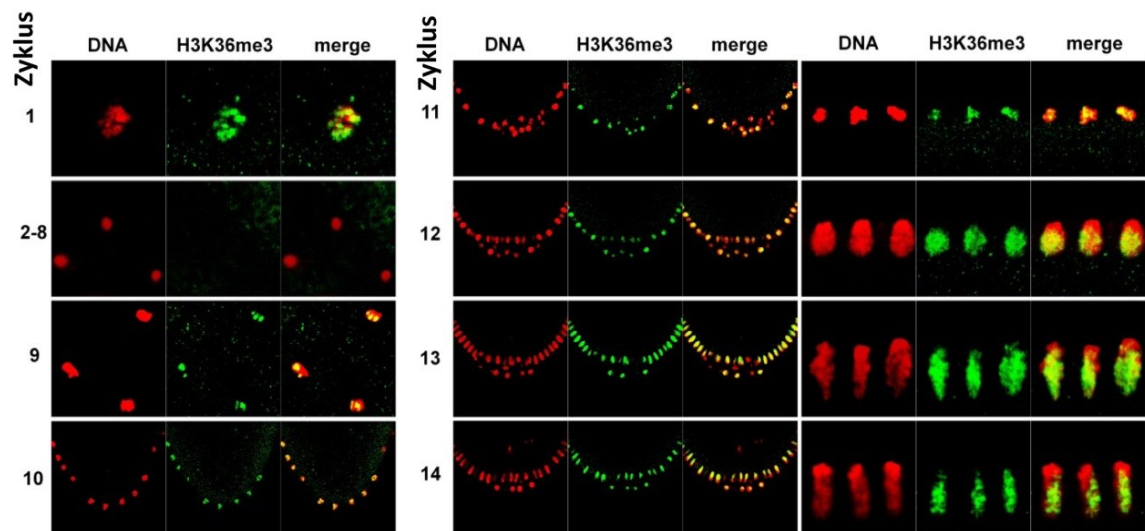


Abbildung 54: Verteilung der früh-embryonalen H3K36me3-Methylierung.

Eine H3K36me2-Methylierung ist in den Kernteilungszyklen 2-8 nicht nachweisbar. Nach Herausbildung des zellulären Blastoderms ist die H3K36me3 mit dem Euchromatin der Zellkerne und den Polzellen assoziiert. Heterochromatin ist frei von H3K36me3.

Da die untersuchten embryonalen Stadien ein hohes Maß an H3K36-methyliertem Histon aufweisen und für die Transkripte der H3K36-Methyltransferase dMES-4 auch eine starke Akkumulation in den frühen Embryonalstadien nachgewiesen werden konnte (FlyBase, 2012), wurden die H3K36-Methylierung an Embryonen homozygoter *dMes-4^{ds}*-Mutantenweibchen mit Embryonen des Wildtypes verglichen.

Für den Nachweis der Abhängigkeit einer H3K36-Methylierung von dMES-4 wurden Histone der frühen Entwicklungsstadien aus der *dMes-4*-Mutante im Westernblot und mit immunzytologischen Methoden untersucht. Die isolierten Histone, aus 0-120 Minuten alten Embryonen, der *dMes-4*-Mutantenlinien bzw. Embryonen des Wildtypes wurden mit methylspezifischen Antikörpern gegen die Modifikationen H3K4me2, K3K9me2, H3K36me2, H3K27me2 und H4K20me2 untersucht und verglichen (Abb. 55A). Die Resultate der Westernblot-Analysen zeigen, dass dMES-4 die früh-embryonale H3K36me1- und H3K36me2-Methylierung am Histon H3 kontrolliert. Bei H3K27me2 ist eine schwache Erhöhung der Modifikation in den *dMes-*

4-Mutanten zu erkennen. Die Modifikationen H3K4me2, K3K9me2 und H4K20me2 sind in *dMes-4*-Mutanten nicht verändert.

In zytologischen Präparaten der homozygoten *dMes-4* Embryonen wird bis zum Zyklus 11 im Vergleich zu Wildtyp keine H3K36me2 Methylierung gefunden (Abb. 55B). Es zeigt ergänzend zu den Westernblots sehr deutlich, dass ein Ausfall von dMES-4 unmittelbar *in vivo* mit einem Verlust der frühen H3K36me1- und H3K36me2-Methylierung einhergeht. In den Entwicklungsstadien nach dem Synzytium wird im zellulären Blastoderm eine H3K36me2-Methylierung in den dMES^{ds}-Mutanten wieder vollständig etabliert (Abb. 55B). Die Wiederherstellung der H3K36me2-Methylierung in den späten Stadien der Embryonalentwicklung ist dMES4 unabhängig und spricht für die Aktivität einer weiteren bis jetzt noch unbekanntenen H3K36me2-Methyltransferase.

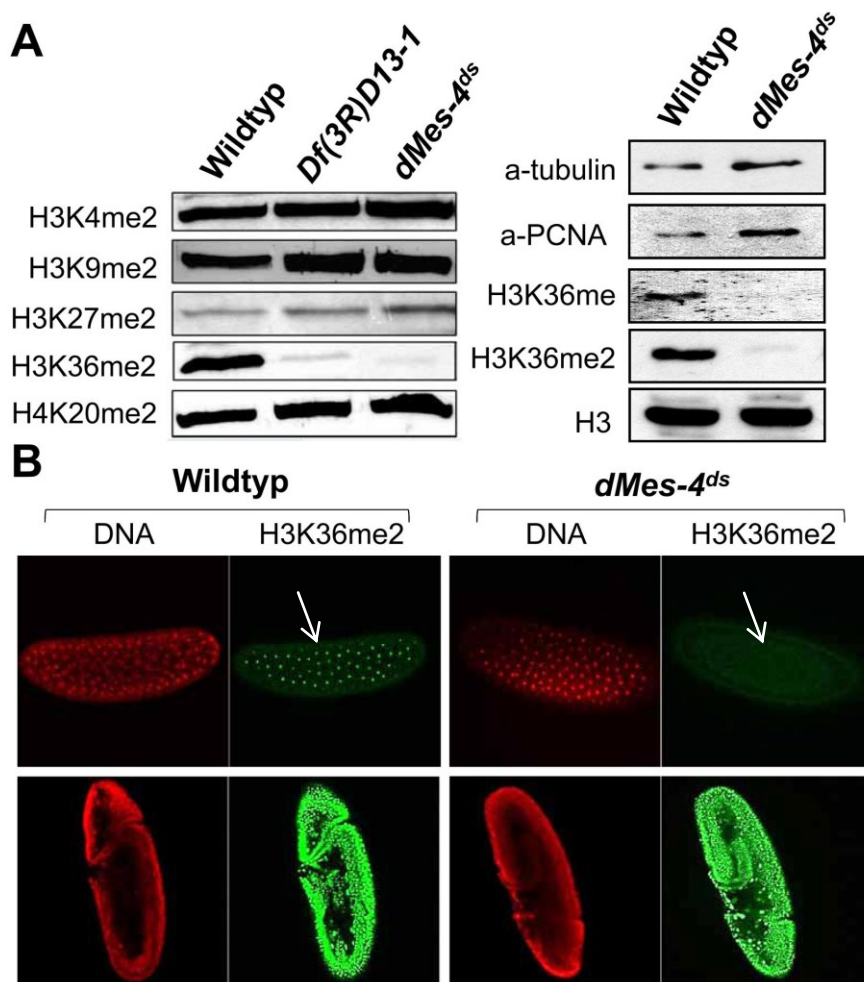


Abbildung 55: dMES-4, eine H3K36me1 und H3K36me2-HMTase in frühen Embryonalstadien.

(A) In 0–2 Stunden alten Embryonen der dMES-4-Mutanten *Df(3R)13D-1* bzw. *dMes-4^{ds}* ist eine H3K36me1/me2-Methylierung am Histon H3 stark reduziert und eine H3K27me2 schwach erhöht. H3K4me2, H3K9me2 und H4K20me2 sind nicht verändert im Western-Blot. Als Ladekontrollen dienen Tubulin, PCNA und Histon H3. (B) Immunzytologische Untersuchung im Wildtyp und an dMES-4 Null-Mutanten [*dMes-4^{ds}*] zeigen einen Verlust der frühen H3K36me2 Methylierung. In der Gastrulation ist die H3K36me2-Methylierung von dMES-4 unbeeinflusst. Der immunzytologische Nachweis erfolgte mit den angegebenen Antikörpern. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

3.5.3 HYPB als H3K36me3-HMTase wird durch dMES-4 nicht beeinflusst

Durch die Untersuchung an *dMes-4^{null}*-Mutantenembryonen konnte gezeigt werden, dass eine H3K36me2-Methylierung im zellulären Blastoderm nicht von dMES-4 anhängig ist (Abb. 55). In *Drosophila* ist bekannt, dass das SET-Domänen-Protein HYPB in der Lage ist, H3K36 zu modifizieren (Bell et al., 2007). Mit einem monoklonalen HYPB-Antikörper (Bell et al., 2007) wurden die frühen Embryonalstadien und die Verteilung des endogenen HYPB Proteins untersucht. HYPB ist im syncytialen Blastoderm nicht vorhanden, sondern nur im zellulären Blastoderm nachzuweisen. HYPB ist ausschließlich am Euchromatin der somatischen Zellkerne lokalisiert, die Polzellen sind frei von HYPB-Protein (Abb. 56 A-C). Da eine H3K36me3-Methylierung durch HYPB eine vorhergehende Methylierung von H3K36 bedingt, wurden auch *dMes-4*-Mutantenembryonen untersucht (Abb. 56C). Die ausschließlich in den somatischen Zellkernen lokalisierte Verteilung von HYPB wird durch den Verlust der enzymatischen Aktivität von dMES-4 nicht beeinflusst.

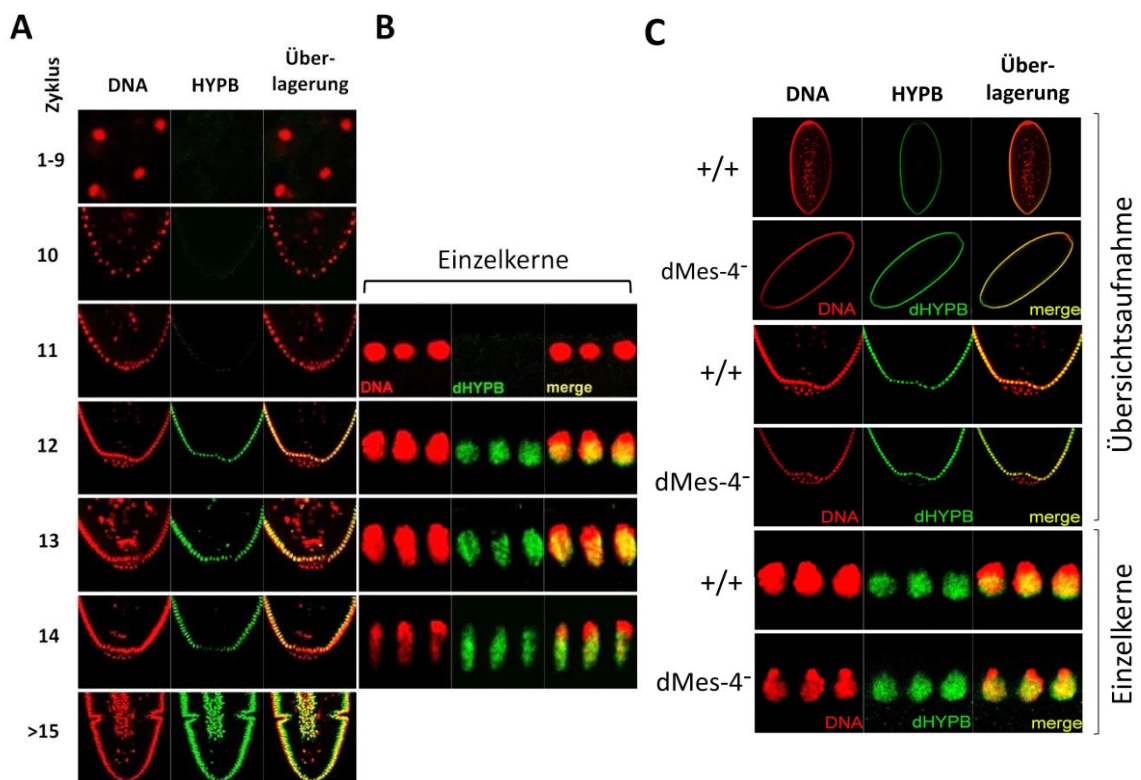


Abbildung 56: Verteilung der H3K36me3-Methyltransferase HYPB in frühen Embryonen des Wildtyps und in dMES-4-Mutantenembryonen.

(A) Nachweis von HYPB während des Synzytiums (Zyklus 1–9) des zellulären Blastoderm (Zyklus 10–14) und der Gastrulation (Zyklus >15) in *Drosophila*-Wildtypembryonen. Der Nachweis erfolgte mittels eines monoklonalen HYPB-Antikörpers (B) Verteilung von HYPB an vergrößerten Einzelkernen des zellulären Blastoderms der Stadien (11–14). (C) Nachweis von HYPB in Wildtyp- und *dMES-4^{null}*-Embryonen des zellulären Blastoderms (Zyklus 12). Die Färbung erfolgte mit DAPI.

Eine Beeinflussung von HYPB durch dMES-4 konnte nicht gezeigt werden und deutet darauf hin, dass HYPB möglicherweise *in vivo* auch H3K36me1/me2 katalysieren kann oder eine bislang unbekannte H3K36me1/me2-Methyltransferase in den somatischen Zellkernen des zellulären Blastoderms aktiv ist.

3.6 Lokalisation und Verteilung von dMES-4

3.6.1 dMES-4 ist im frühen Embryo mit Furchungskernen kolokalisiert

Wie in zytologischen Färbungen zum SU(VR)2-1-Proteins in den frühen Furchungsteilungen bereits gezeigt wurde finden, beginnend vom syncytialen Blastoderm hin zum zellulären Blastoderm, verschiedene Differenzierungsschritte statt. Besonders bedeutsam ist dabei die Organisation vom Furchungschromatin zum Eu- und Heterochromatin. Ab dem ersten Kernteilungszyklus ist dMES-4 in den Embryonen mit den endogenen Antikörpern nachweisbar und das dMES4-Protein ist in frühen Stadien der Entwicklung präferenziell am Furchungschromatin der Furchungskerne lokalisiert. Die Assoziierung ist besonders gut an den Furchungskernen im frühen Embryo sichtbar (Abb. 57). Bis zum Kernteilungszyklus 10 ist dMES-4 in steigender Konzentration an den Furchungskernen gebunden. Mit dem Erreichen vom Kernteilungszyklus 11 beginnt ein sehr starker Konzentrationsabfall an der dMES-4-Proteinmenge (Abb. 57).

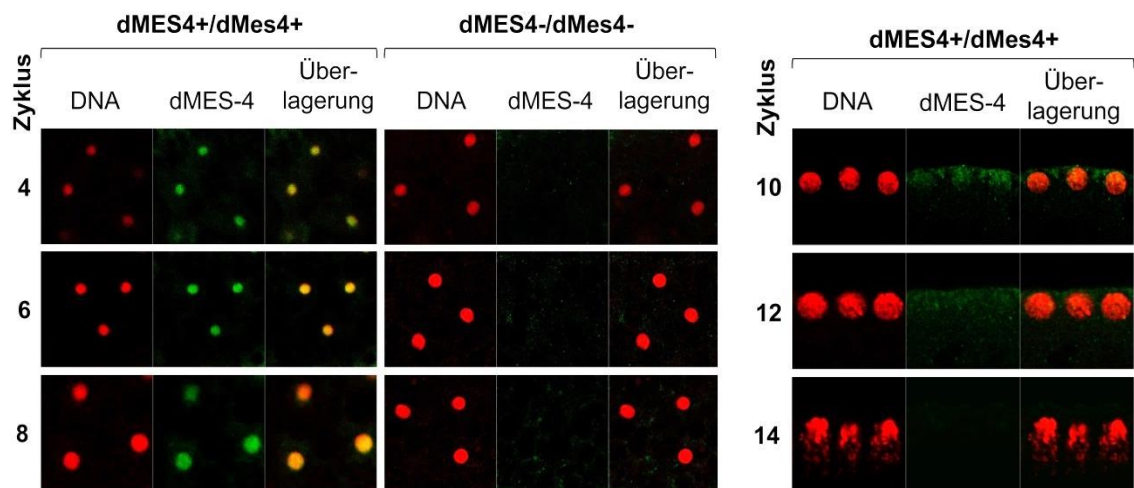


Abbildung 57: Verteilung von dMES-4 während früh embryonaler Furchungsteilungen.

Die H3K36-Methyltransferase dMES-4 ist in den frühen Furchungsteilungen bis zum Zyklus 10 mit der DNA der Furchungskerne assoziiert. In dMES-4^{null}-Embryonen homozygoter *dMes-4^{ds}*-Weibchen konnte kein dMES-4 nachgewiesen werden. Ein Nachweis von dMES-4 in späteren Furchungsstadien von 11. bis zum 14. Zyklus war nicht möglich. Die MES-4 wurden mit einem dMES-4-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

Die beobachtete Reduktion an dMES-4-Protein geht einher mit der einsetzenden zygotisch gesteuerten Gentranskription und der Herausbildung eines zellulären Blastoderms. In den gebildeten Polzellen ist dMES-4 nicht gebunden, obwohl sie nachweislich eine H3K36me1- und H3K36me2-Methylierung aufweisen (Abb. 54).

3.6.2 dMES-4-Bindung mit dem 4. Chromosom

Durch die Immunmarkierung polytärer Speicheldrüsenchromosomen des Wildtyps mit einem generierten polyklonalen dMES-4-Antikörpern konnte eine Assoziation von dMES-4 besonders am 4. Chromosom nachgewiesen werden (Abb. 58A) (Aleksyenko et al., 2014). Im heterochromatischen Chromozentrum ist dMES-4 nur schwach gebunden. Ein vergleichbares Verteilungsmuster mit einer deutlichen Assoziation von dMES-4 am vierten Chromosom und dem Chromozentrum konnte ebenfalls mit einem monoklonalen dMES-4-Antikörper (Bell et al. 2008) gezeigt werden (Abb. 58B). An den larvalen Speicheldrüsenchromosomen von *dMes-4^{null}*-Mutanten konnte mit dem monoklonalen Antikörper keine Färbung am vierten Chromosom und dem Chromozentrum beobachtet werden, da in diese kein dMES-4 bilden (Abb. 58B).

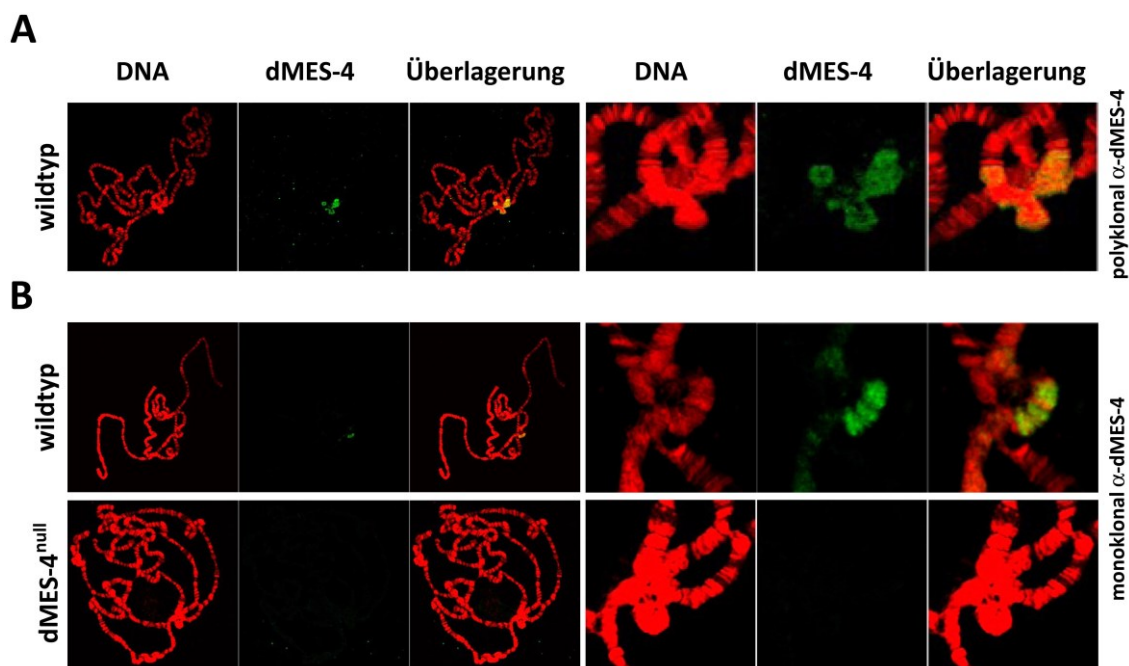


Abbildung 58: Bindung von endogenem dMES-4 am vierten Chromosom in polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*.

(A) Lokalisation von dMES-4 an polytären Chromosomen in der Gesamtübersicht mit dem schwach angefärbten Chromozentrum mit dem gut gefärbten vierten Chromosom. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen dMES-4-Antikörper. (B) Chromosomen des Wildtyps und *dMes-4^{null}* in der Gesamtübersicht sowie eine Vergrößerungen des Chromozentrums mit dem heterochromatischen vierten Chromosom. Der Nachweis des endogenen dMES-4-Proteins erfolgte in diesen Präparaten mit einem monoklonalen dMES-4-Antikörper (Bell et al. 2008). In *dMes-4^{null}* konnte kein dMES-4 mit den verwendeten Antikörpern nachgewiesen werden.

3.6.3 Verteilung von FLAG-V5-dMES-4 in Ovarien und Embryonen

Für *dMes-4* konnte ein FlyFos-Klon mit der Nummer 024854 isoliert werden. Dieser ca. 27 kb große FlyFos-Klon wurde modifiziert, so dass durch eine Fusionskassette am 5'-Bereich von *dMes-4* ein FLAG-V5-dMES-4 (FF-dMes-4) Fusionsproteins gebildet wird (Abb. 59). Das Konstrukt steht unter Kontrolle des endogenen *dMes-4*-Promotors.

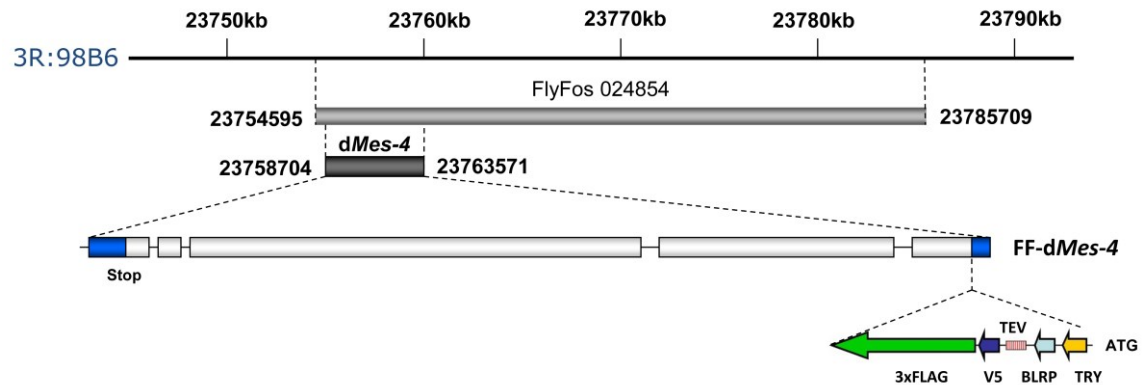


Abbildung 59: Lokalisation und Modifikation des FlyFos dMES-4-Konstruktes.

Der FlyFos-Klon 024854 beinhaltet die chromosomale Region 3R:98B6 mit dem darin enthaltenen *dMes-4*-Genlocus. Diese Region kodiert für das Gen *dMes-4* mit allen regulatorischen Elementen. Für die Erzeugung eines N-terminalen dMES-4-Fusionproteins wurden Fusionstags am 5'-Bereich eingefügt.

Nach der erfolgreichen Etablierung von FLAG-V5-dMES-4-FlyFos-Fliegenlinien (FF-dMes-4) wurden Ovarien dieser homozygoten Linien im Westernblot und immunzytologisch untersucht. Zytologische Färbungen der Ovarien zeigten in den Oogenesestadien 5 bis 8 eine Co-Lokalisation von FLAG-V5-dMES-4 mit den Nährzellen. Eine Detektion von FLAG-V5-dMES-4 in den Follikelzellen konnte nicht beobachtet werden (Abb. 60A). An Extrakten isolierter Ovarien der FF-Mes-4-Fliegenlinie konnte FLAG-V5-dMES-4 im Westernblot mit α -V5-Antikörpern nachgewiesen werden. Das theoretische Molekulargewicht stimmt mit dem nachgewiesenen Molekulargewicht von FLAG-V5-dMES-4 überein (Abb. 60B).

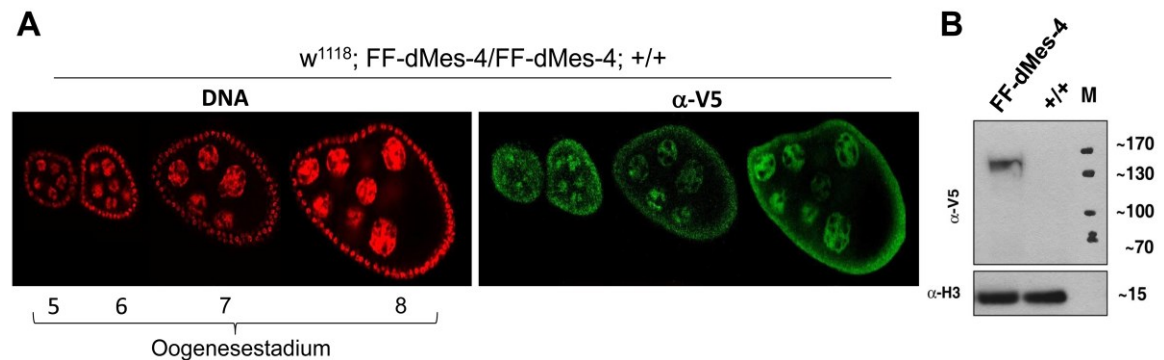


Abbildung 60: Das FLAG-V5-dMES-4-Fusionsprotein wird in Ovarien exprimiert. (A) Immunzytologischer Nachweis des Fusionsproteins mit α -V5-Antikörpern in den Ovarienstadien 5 bis 8. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. **(B)** Nachweis von FLAG-V5-dMES-4 mit α -V5-Antikörpern an ovarialen Extrakten im Westernblot. Als Ladekontrolle diente Histon H3.

Für das endogene dMES-4-Protein konnte gezeigt werden, dass dMES-4 in den frühen embryonalen Stadien an den Furchungskernen des Synzytiums anlagert ist (Abb. 57). Mit dem monoklonalen V5-Antikörper konnte das FLAG-V5-dMES-4-Fusionsprotein ebenfalls an den frühen Furchungskernen der homozygoten transgenen Fliegenlinie nachgewiesen werden (Abb. 61). Dieses Ergebnis bedeutet darauf hin, dass das FLAG-V5-dMES-4-Protein in der Lage ist, die gleichen chromosomalen Areale der Furchungskerne zu besetzen wie das endogene dMES-4. Die Fusionsanteile FLAG-V5 des Fusionsproteins beeinflussen die Bindung nicht, da es die gleichen Verteilungsmuster aufweist wie beim endogenen dMES-4-Protein beobachtet. Im Westernblot ist FLAG-V5-MES4 in embryonalen Extrakten nachzuweisen (Abb. 61C).

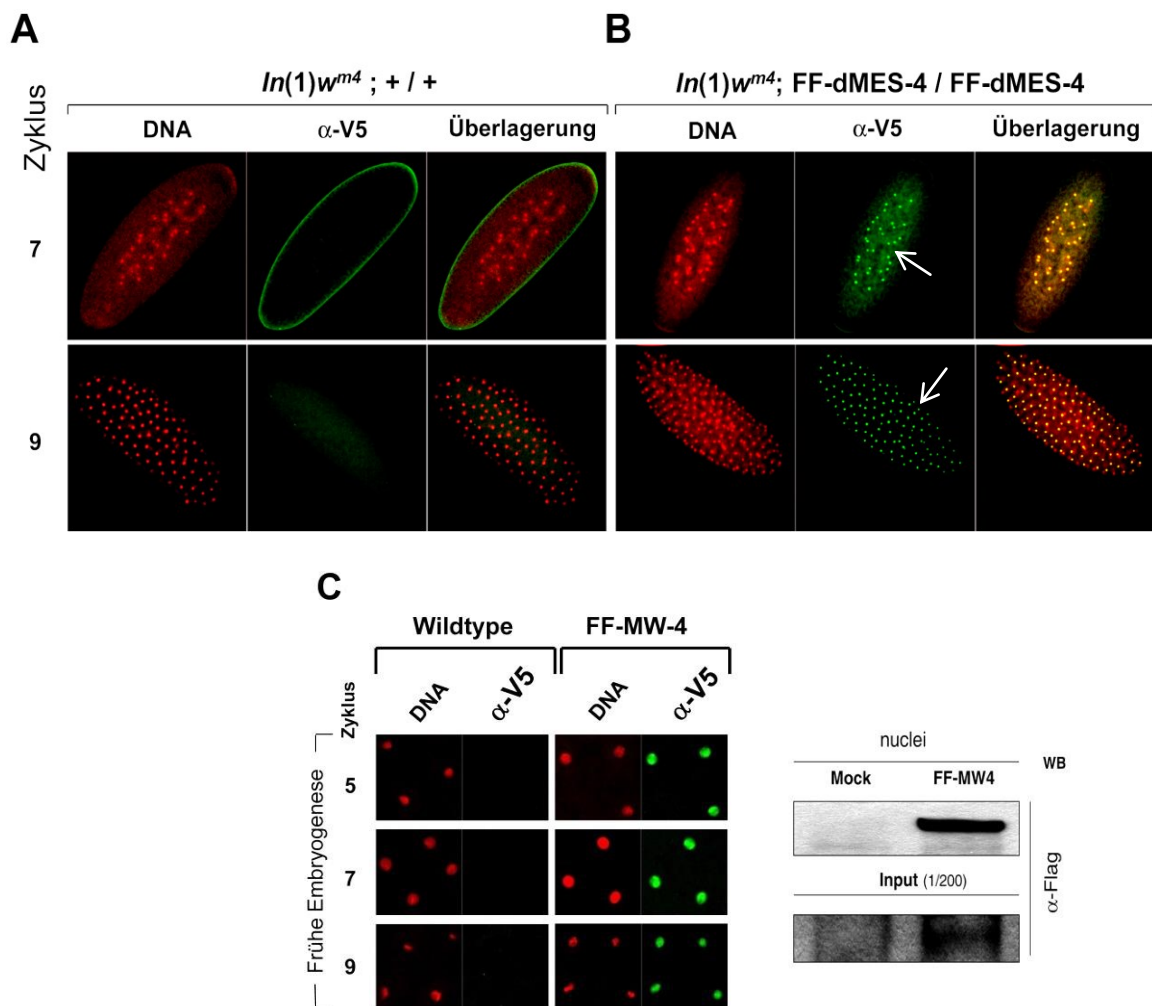


Abbildung 61: FLAG-V5-dMES-4-Fusionsproteine sind mit frühen Furchungskernen assoziiert. (A) Eine Färbung von w^{m4h}/w^{w4h} , +/+-Embryonen mit dem monoklonalen V5-Antikörper zeigte keine spezifischen Signale. (B) Übersichtsaufnahmen und Nachweis des FLAG-V5-dMES-4-Fusionsproteins mit α -V5-Antikörpern in homozygoten transgenen Embryonen der Stadien 7 und 9. (C) Vergrößerte Aufnahme zur Antikörperfärbungen mit α -V5-Antikörpern an Einzelkernen in den Zyklen 5,7 und 9 vom Wildtyp- und Transgen. Westernblot an isolierten Kernen und Kernextrakten der FLAG-V5-dMES-4-Fliegenlinien bzw. dem Wildtyp mit einem α -FLAG-Tag-spezifischen Antikörper.

Nach der Charakterisierung von FLAG-V5-dMES-4 in Ovarien und Embryonen transgener Fliegenlinien wurden Speicheldrüsenchromosomen untersucht.

Das endogene dMES-4 zeigte beim Nachweis mit poly- bzw. monoklonalen dMES-4-Antikörpern eine bevorzugte Bindung am heterochromatischen vierten Chromosom und eine etwas abgeschwächte Bindung im heterochromatischen Chromozentrum (Abb. 57). Die polytären Chromosomen der FLAG-V5-dMES-4-transgenen Fliegenlinie wurden präpariert, fixiert, gespreitet und die Verteilung von FLAG-V5-dMES-4 mit entsprechenden Antikörpern untersucht (Abb. 62)

w^{m4}; FF-MW-4

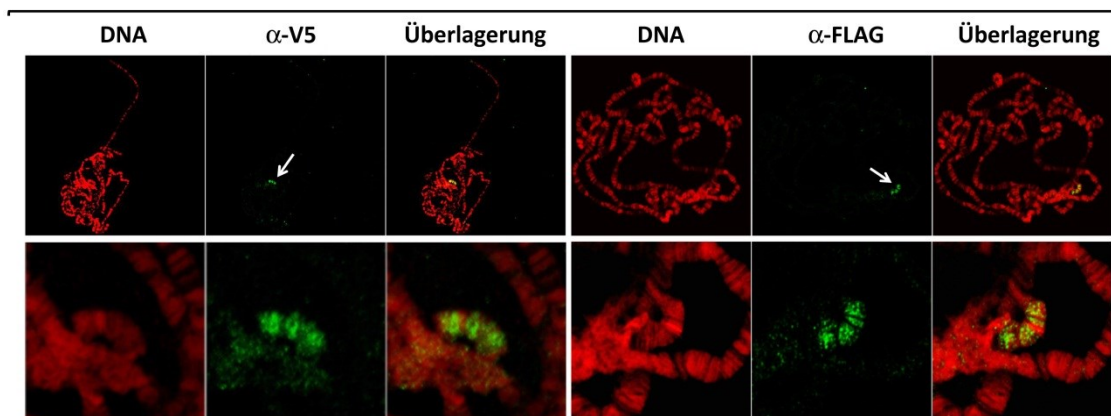


Abbildung 62: Nachweis von FLAG-V5-dMES-4 in Polytänchromosomen mithilfe von V5- und FLAG-Tag-Antikörpern. Die dMES-4-Fusionsproteine sind eindeutig in den homozygoten FF-Mes-4-Fliegenlinien am vierten Chromosom und im Chromozentrum gebunden. Der Nachweis der Lokalisation erfolgte mit α -V5- und α -FLAG-tag-spezifischen Antikörpern. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

Die immunzytologische Analyse der FLAG-V5-dMES-4-Fusionsproteine mit den V5- und FLAG-Tag-Antikörpern erlaubte eine Bestimmung der dMES-4-Proteinbindung im Chromatin der polytären Speicheldrüsenchromosomen. Die durch den endogenen Promotor induzierten dMES-4-Fusionsproteine sind in den larvalen polytären Speicheldrüsenchromosomen am heterochromatischen vierten Chromosom und im Chromozentrum mit beiden Antikörpern unabhängig voneinander nachweisbar (Abb. 62). Das dMES-4-Fusionsprotein ist an den gleichen chromosomalen Regionen lokalisiert, wie es auch für die endogenen dMES-4-Proteine gezeigt werden konnte (Abb. 57B). Die Fusionstags am N-terminus haben auf das Verteilungsmuster von FLAG-V5-dMES-4 im Vergleich mit dem Wildtyp zytologisch keinen Einfluss.

Proteine, welche wie dMES-4 eine lokale Anreicherung im vierten Chromosom zeigen, sind das HP1-Protein, SETDB1 und POF. Da das vierte Chromosom einen überwiegend heterochromatischen Charakter aufweist, ist dort auch eine H3K9me2-Methylierung zu

finden. An Speicheldrüsenchromosomen konnte in *dMes-4^{null}*-Mutanten und in *SU(VAR)2-1^{null}*-Mutanten eine Veränderung der H3K9me2-Methylierung im Vergleich zum Wildtyp nicht gezeigt werden. Um einen Effekt von dMES-4 auf Proteine, die auch am vierten Chromosom binden, zu analysieren, wurde die Verteilung des POF-Proteins an polytären Chromosomen des Wildtyps, *Su(var)2-1^{null}* und *dMes-4^{null}* untersucht.

3.6.4 POF (*Painting Of Fourth*) in *Su(var)2-1*- und *dMes-4*-Mutanten

Das POF-Protein (*painting of fourth*) ist hauptsächlich am heterochromatischen vierten Chromosom gebunden. Die Bindung von POF am vierten Chromosom ist HP1 abhängig, was durch eine Co-Lokalisierung von POF mit HP1 an Genen des vierten Chromosoms gezeigt werden konnte. Wahrscheinlich ist POF für eine Aktivierung von Genen und HP1 für eine Repression von Genen am vierten Chromosom verantwortlich (Johansson et al., 2007a; Johansson et al., 2007b). In *SU(VAR)2-1^{null}* und *dMES-4^{null}* wird die POF-Bindung am 4. Chromosom offenbar nicht beeinflusst, da die Verteilung von POF in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist (Abb. 63).

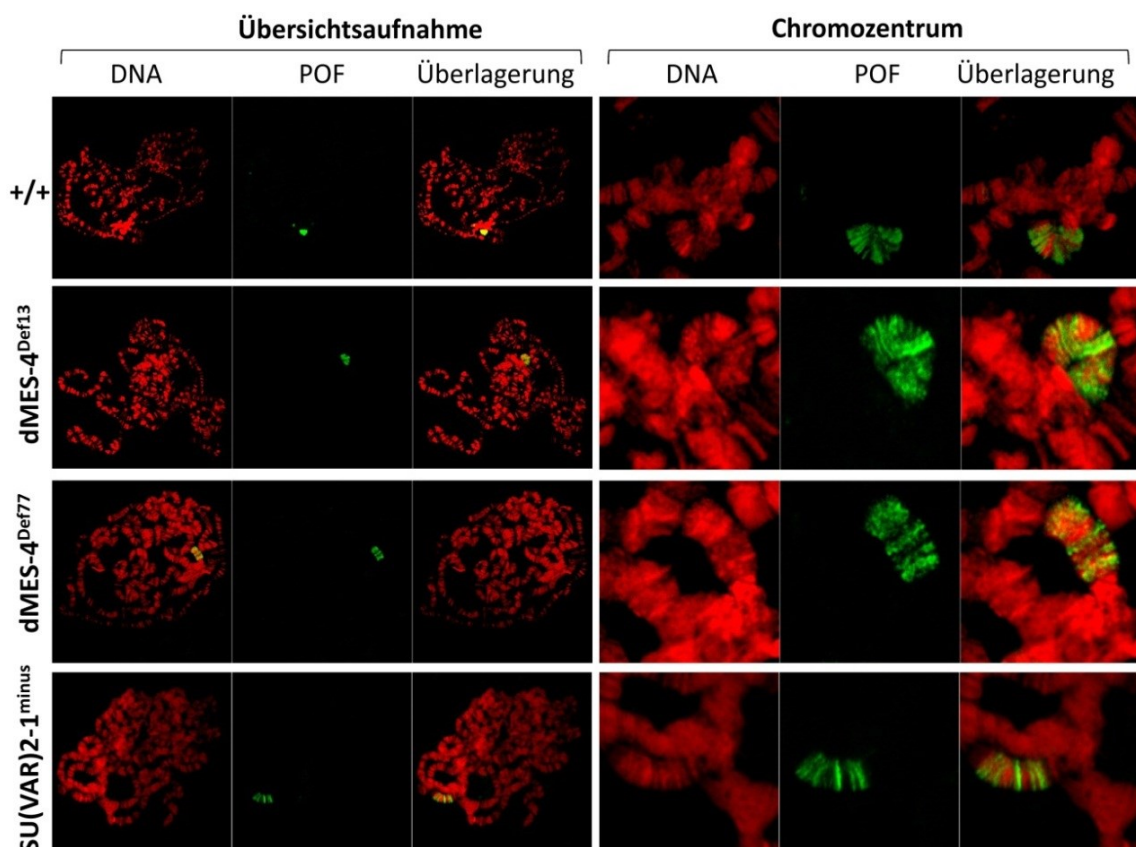


Abbildung 63: Bindung von POF (*painting of fourth*) am vierten Chromosom polytärer Speicheldrüsenchromosomen aus *Su(var)2-1*- und *dMes-4*-Mutanten. Verglichen wurde eine Verteilung von POF in *dMES-4^{null}*- und *SU(VAR)2-1^{null}*-Mutantenlarven. Die Lokalisation von POF im Wildtyp ist auf das vierte Chromosom beschränkt. Eine Um- bzw. Fehlverteilung von POF in *dMES-4^{Def13}*, *dMES-4^{Def77}* sowie in *SU(VAR)2-1^{null}*-Larven ist in keinem der Präparate zu erkennen.

4 Diskussion

Die Epigenetik beschreibt zellererbliche Veränderungen in der Genaktivität, welche nicht direkt durch differentielle DNA-Veränderungen verursacht werden. Während der gesamten Ontogenese eines Organismus spielen Transkriptionsfaktoren, Chromatin-Proteine, chromatinmodifizierende Proteine sowie verschiedene *non-coding-RNA*'s eine entscheidende Rolle (Elgin and Workman, 2002; Lippman and Martienssen, 2004). Durch das Zusammenwirken dieser epigenetischen Faktoren werden differentielle Chromatinzustände etabliert, die räumlich und zeitlich getrennte Expressionsmuster der Gene hervorrufen. Dabei reguliert die Chromatinkonformation im Wesentlichen die Zugänglichkeit der DNA an den einzelnen Genen eines Chromosoms. Wird z.B. die epigenetische Stilllegung von Genen nicht präzise gesteuert, kann die bedingte Genexpression zu Entwicklungsdefekten führen. Faktoren, welche eine besondere Bedeutung im Aufbau von Chromatinkonformationen haben, wie z.B. beim Eu- und Heterochromatin, konnten in *Drosophila melanogaster* erstmals mit Hilfe von *Su(var)*- und *E(var)*-Mutationen in der Positionseffekt-Variegation identifiziert werden.

Alle verfügbaren genetischen Daten forderten, dass bis zu Beginn meiner Arbeiten noch nicht molekular charakterisierte *Su(var)2-1*-Gen eine besondere Bedeutung für die Etablierung von heterochromatischem Gensilencing besitzt. *Su(var)2-1*-Mutationen gehören zu den stärksten isolierten dominanten *Su(var)*'s. Zytologische Analysen zeigen einen signifikanten Suppressoreffekt der *Su(var)2-1⁰¹*-Mutation auf Heterochromatin-Spreading im *T(1;4)w²⁵⁸⁻²¹* PEV-Rearrangement (Reuter et al., 1982b). *Su(var)2-1*-Mutationen supprimieren Gensilencing in allen getesteten PEV-Rearrangements, unabhängig vom induzierenden Heterochromatin und unabhängig vom euchromatischen Material, welches durch Heterochromatisierung inaktiviert wird (Reuter et al., 1982b). Diese allgemeine Wirkung auf PEV veranschaulicht, dass SU(VAR)2-1 ein grundlegender Regulator bei der Etablierung heterochromatischer Chromatinzustände ist.

Weiterhin manifestieren *Su(var)2-1*-Mutationen interessante pleiotrope Effekte. *Su(var)2-1*-Allele sind Butyrat-sensibel und zeigen eine letale Wechselwirkung mit zusätzlichem Y-Heterochromatin (Reuter et al., 1982a). Die Wechselwirkung mit Inhibitoren der Histon-Deacetylierung ließ vermuten, dass SU(VAR)2-1 Prozesse der

Histon-Deacetylierung kontrolliert. Elektrophoretische Analysen der Acetylierungszustände der Histone H3 und H4 lieferten weitere Hinweise auf eine Rolle von SU(VAR)2-1 bei der Kontrolle der Histon-Deacetylierung (Dorn et al., 1986). Zusätzlich zeigen die ursprünglich isolierten *Su(var)2-1*-Allele alle eine rezessive weibliche Sterilität. Diese ist Follikelzell-abhängig und der beobachtete Verlust von Follikelzellen führt zur Apoptose der Eikammern (Szabad et al., 1988a).

Molekulare Klonierung von *Su(var)2-1*

Su(var)2-1 wurde zuerst mit einer im *In(1)w^{m4h}* Stamm spontanen entstanden Mutation identifiziert (Reuter et al., 1982b). Die molekulare Analyse dieser Mutation zeigte, dass eine Sequenzveränderung in einem aus 10 hintereinanderliegenden Thyminen umfassenden Sequenzbereich durch Insertion eines zusätzlichen Thymins hervorgerufen wurde. Diese Abfolge von Thyminen stellt offensichtlich einen Hot-Spot für Mutationen dar. Von den insgesamt 20 molekular definierten *Su(var)2-1*-Mutanten wird bei vier Allelen durch Verlust bzw. Zusatz eines Thymins ein Frameshift im *Su(var)2-1*-Gen hervorgerufen. Dieser Frameshift führt infolge eines Stopp-Codons im ORF zu einem verkürzten SU(VAR)2-1-Protein.

Ausgehend von der Crossover-Kartierung (Reuter et al., 1982b) konnte das *Su(var)2-1* Gen in Komplementationsanalysen mit einer Serie von Deletionen und Duplikationen (Ryder et al., 2007) in der Region 31AB im 2L Chromosomenarm lokalisiert werden.

Feinkartierung mittels einer Serie von BSC-Deletionen (Cook et al., 2012) identifizierte schließlich das Gen CG5694 als *Su(var)2-1* (vgl. Ergebnisse 3.1.3.). Die Deletionsanalysen belegen, dass *Su(var)2-1* zur Gruppe der haplo-sensiblen *Su(var)*-Gene gehört. Bei haplo-sensiblen *Su(var)*- oder *E(var)*-Genen wird bereits durch den Verlust einer der beiden Genkopien ein dominanter *Su(var)*- bzw. *E(var)*-Effekt manifestiert (Schotta et al., 2003).

Die molekulare Analyse von *Su(var)2-1*-Mutationen wurde zunächst bei 12 Allelen durchgeführt, die aus früheren Isolationsexperimenten stammen (Reuter and Wolff, 1981; Sinclair et al., 1983; Ryder et al., 2007) (vgl. 3.1.4.). Zusätzlich wurden weitere 9 *Su(var)2-1* Allele molekular analysiert, die in einem neuen *Su(var)*-Sättigungsscreen (Sänger, 2017) isoliert worden sind.

Alle diese Mutationen zeigen Transheterozygot mit der Deletion *Df(2L)2-1^{ds}* die für *Su(var)2-1*-Mutanten typischen phänotypischen Defekte. *Df(2L)2-1^{ds}* deletiert den

gesamten ORF von *Su(var)2-1*. Zur Generierung einer solch präzisen Deletion wurde das CRISPR-Cas9-System erfolgreich eingesetzt (vgl. 3.1.5). Parallel dazu erfolgte die Generierung mehrerer Rescue-Transgene, die unter endogenem Promoter das SU(VAR)2-1-Protein ohne bzw. mit Antikörper-Tag exprimieren. Die eingesetzten Transgene stellen FlyFos-Klone dar, die sich von Fosmiden ableiten und ca. 30-40kb genomische Regionen einschließen (Ejsmont et al., 2009). Der Einsatz dieser Klone für die Rescue-Analysen stellt einen experimentellen Fortschritt dar. Es kann durch diese FlyFos-Klone abgesichert werden, dass alle regulatorischen Elemente in den Transgenen vorhanden sind. Kreuzungen mit FlyFos-Transgenen bestätigten eindeutig das Vorliegen von *Su(var)2-1*-Allelen (vgl. 3.1.7.3). In den heterozygoten *Su(var)2-1^{x/+}/pFlyFos[Su(var)2-1⁺]* Genotypen wurde stets der dominante Su(var)-Effekt in den untersuchten *Su(var)2-1*-Mutanten gerettet (Su⁺ Phänotyp).

Zur Kontrolle der Rescue-Analysen erfolgte zusätzlich der Einsatz eines mutierten FlyFos-Transgens, welches die mit *Su(var)2-1⁰⁶* verbundene molekulare Veränderung (Q153Stopp) enthält. Die Mutation wurde durch Nutzung eines bakteriellen Rekombinationssystems in den FlyFos-Klon eingeführt. Mit dem mutierten FlyFos-Klone-Transgen wird kein Rescue des dominanten Su(var)-Effektes beobachtet.

All diese Experimente ermöglichten es, nachzuweisen, dass CG5694 *Su(var)2-1* entspricht und *Su(var)2-1*-Mutationen zur Gruppe der haplo-*Su(var)*-Gene gehört.

***Su(var)2-1* kodiert für ein Protein mit einer EWG/NRF Domäne**

In dem von *Su(var)2-1* kodiertem Protein wird in der N-terminalen Region eine Homologie zu der sogenannten EWG/NRF-Domäne gefunden (vgl. 3.1.6). Diese Domäne wurde zuerst im Erect wing Protein von *Drosophila* (Virbasius et al., 1993) beschrieben. Eine homologe EWG/NRF-Domäne wird auch in den Säugerprotein NRF1 (Virbasius et al., 1993; Scarpulla, 2006) und dem Zebrafisch NRF (Becker et al., 1998) gefunden. Für NRF1 gibt es Hinweise, dass die EWG/NRF-Domäne Dimere bildet und DNA-bindend ist (Virbasius et al., 1993). Ein Sequenzvergleich zwischen insgesamt fünf Proteinen mit einer EWG-Domäne (SU(VAR)2-1, *Drosophila*-EWG, Maus-NRF1, Zebrafisch-NRF, *Nematostella*-NRF und einem *Anopheles*-EWG Protein) zeigt, dass in der SU(VAR)2-1-EWG-Domäne nur Homologie zu etwa 100 Aminosäuren des C-Terminus der EWG-Domänen der NRF Proteine vorliegt (vgl. 3.1.6). SU(VAR)2-1 unterscheidet sich von allen anderen bisher bekannten EWG-Domänenproteinen durch

das Vorhandensein eines C2H2 Zink-fingermotivs. Bei den *Crustacea* werden Proteine gefunden, die Homologie zu dem C2H2-Zinkfinger enthaltenden Bereich von SU(VAR)2-1 besitzen (Krauss, persönliche Mitteilung). Die Sequenzvergleiche zeigen, dass SU(VAR)2-1 nur bei den Arthropoden eindeutig nachgewiesen werden kann und somit kein hochkonservierter Chromatin-faktor ist. Offensichtlich ist bei SU(VAR)2-1 analog zu dem Zinkfingerprotein SU(VAR)3-7 die 3D-Struktur für die Funktion des Proteins bedeutsam. Mutationen des *Drosophila ewg*-Gens zeigen keinen Effekt auf Gensilencing im w^{m4h} -Rearrangement.

Die zahlreichen genetischen Hilfsmittel, die im Verlauf der Analysen von *Su(var)2-1* entwickelt wurden, ermöglichten es schließlich, unterschiedliche Gruppen von Mutationen zu identifizieren. Von den 21 isolierten *Su(var)2-1* Mutationen sind insgesamt 12 Frameshift-Mutationen und neun Punktmutationen. Die Frameshift-Mutationen manifestieren alle für *Su(var)2-1* typische pleiotrope Effekte und zeigen einen agametischen Phänotyp in Weibchen (keine Eier). Unter insgesamt 110 neuen, für das 2. Chromosom isolierten *Su(var)*-Mutationen (Sänger, 2017), konnten fünf neue *Su(var)2-1*-Punktmutationen identifiziert werden.

Für die funktionelle Analyse der SU(VAR)2-1 EWG-Domäne ist z.B. die neu identifizierte *Su(var)2-1*⁷⁸ Mutation interessant. Diese Mutation (S26F) betrifft eine zwischen SU(VAR)2-1 und dem Maus/Mensch NRF1 Protein konservierte Aminosäure. Mit Hilfe des generierten SU(VAR)2-1-spezifischen polyklonalen Antikörpers kann die Rolle der EWG Domäne für die chromosomale Assoziation des SU(VAR)2-1⁷⁸ Mutantenproteins während der Entwicklung untersucht werden.

Zentrales Anliegen der Arbeiten besteht in der Prüfung, ob die EWG-Domäne bei der entwicklungspezifischen Assoziation von SU(VAR)2-1 mit Heterochromatin eine Kontrollfunktion besitzt. Erste Analysen belegen, dass das SU(VAR)2-1⁷⁸ Protein in Heterozygoten mit einer *Su(var)2-1*-Deletion eine Bindung an Banden der larvalen Polytänchromosomen wie beim Wildtyp zeigt. Zukünftige Arbeiten müssen noch prüfen, ob die früh embryonale Heterochromatinbindung betroffen ist. Alternativ besteht die Möglichkeit, die Chromosomenassoziation eines SU(VAR)2-1-Proteins mit einer kompletten Deletion der EWG-Domäne zu analysieren.

SU(VAR)2-1 ist nur im embryonalen Blastoderm mit Heterochromatin assoziiert

Mit Hilfe von *Su(var)*-Mutationen identifizierte Chromatinfaktoren, die eine zentrale Rolle bei der Etablierung von Heterochromatin besitzen, stellen typische Heterochromatin-assoziierte Proteine dar (SU(VAR)3-9, SU(VAR)2-5 [HP1], SU(VAR)3-7). Andere Faktoren, wie SU(VAR)3-3 (LSD1) oder SU(VAR)3-1 (JIL1) werden entwicklungspezifisch sowohl im Euchromatin als auch im Heterochromatin gefunden. LSD1 bei *Drosophila* ist nur in der frühen Embryonalentwicklung (Blastoderm) Heterochromatin-assoziiert (Rudolph et al., 2007). Zu diesem Zeitpunkt wird Heterochromatin etabliert und LSD1 schützt prospektive heterochromatische Regionen gegen die Etablierung aktiver Histonmodifizierungen (Demethylierung von H3K4me1 und H3K4me2). Offensichtlich besitzt auch die Deacetylase RPD3 in der frühen Embryogenese eine analoge protektive Funktion und ist Bestandteil des frühembryonalen LSD1, HP1 und SU(VAR)3-9 Proteinkomplexes (Rudolph et al., 2007). LSD1 wird in der späteren Entwicklung nur in den euchromatischen Interbanden und nicht im Heterochromatin gefunden. Die H3S10 Kinase JIL1 ist ebenfalls ein Interbandenprotein, wird aber zugleich im Heterochromatin gebunden und kontrolliert hier die Heterochromatin-spezifische H3K9me2S10p Doppelmarkierung (Wang et al., 2014).

Für das SU(VAR)2-1 Protein konnten wir eine interessante entwicklungspezifische Bindung zu Heterochromatin nachweisen (vgl. 3.1.10 und 3.2.1). SU(VAR)2-1 ist zunächst ein abundantes Chromatinprotein der Furchungskerne.

Eine vergleichbare Assoziation von SU(VAR)2-1 mit den Furchungskernen wird bereits im Eizellkern über die gesamte Oogenese gefunden (vgl. Abbildung 39). Das Chromatin des Eizellkerns zeigt ebenfalls wie in den Furchungskernen eine abundante Histonacetylierung (J. Kessler, persönliche Mitteilung). Dieser Sachverhalt könnte darauf hinweisen, dass die Differenzierung des für die Furchungskerne typischen Chromatinzustandes bereits während der Oogenese im Eizellkern etabliert wird.

Vergleichbar mit SU(VAR)2-1 ist auch die Histon-demethylase LSD1 ein abundantes Protein der Furchungskerne (Rudolph et al., 2007). Beide Proteine werden in frühen Embryonen nach Immunopräzipitation tatsächlich auch copräzipitiert und assoziieren offensichtlich zusammen mit der H3K36 Methyltransferase NSD (MES-4) in einem frühembryonalen Proteinkomplex (vgl. 3.3.5). Die Assoziation vom SU(VAR)2-1 mit einem MES-4 enthaltenden embryonalen Proteinkomplex wird durch eine Serie weiterer

experimenteller Befunde unterstützt. Hefe-Dihybrid-Analysen weisen auf eine direkte Interaktion von SU(VAR)2-1 mit MES-4 hin (Walther, 2003). Die Interaktion erfolgt zwischen der C-terminalen Region von SU(VAR)2-1 und der N-terminalen Region von MES-4, die ein PWWP Motiv enthält. Die MES-4 „Loss-of-function“ Mutationen, die in der vorliegenden Arbeit generiert wurden, enthüllten eine entwicklungspezifische Funktion von MES-4 bei der Etablierung von H3K36me1 und H3K36me2 in Furchungskernen (vgl. 3.5.2). Im Blastoderm wird diese Funktion von der HYPB Methyltransferase übernommen (Bell et al., 2007). Weil MES-4 Mutationen keinerlei *Su(var)2-1* spezifische phänotypische Effekte zeigen, kann geschlossen werden, dass SU(VAR)2-1 in Furchungskernen die H3K36-KMTase MES-4 rekrutiert. Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 (polyklonaler Antikörper oder Protein-Tag bei transgenen Linien mit SU(VAR)2-1 Fusionsproteinen) lieferten den Beweis, dass beide Proteine auch in vivo interagieren (vgl. 3.3.8). Daraus schlussfolgern wir, dass SU(VAR)2-1 tatsächlich MES-4 rekrutiert und somit indirekt die H3K36me1/me2 Methylierung im Furchungschromatin kontrolliert. Im Furchungschromatin wird kein H3K36me3 nachgewiesen. Die MES-4-abhängige H3K36me1/me2 Methylierung ist nicht essentiell und alle MES-4-Null Embryonen entwickeln sich normal. Ein maternaler Effekt kann ausgeschlossen werden, weil alle MES-4-Null Tiere homozygot lebensfähig und fertil sind.

Für die Analyse von MES-4 Nullmutationen auf PEV wurden neue Mutationen mit Hilfe von CRISPR-Cas9 generiert. Diese stellen präzise Deletionen für den gesamten ORF dar (vgl. Abbildung 50). Die Mutationen zeigen einen dominanten *Su(var)*-Effekt im Weibchen, während im Männchen nur ein rezessiver *Su(var)*-Effekt nachgewiesen wird (vgl. Abbildung 51). Dies ist bisher das erste *Su(var)*-Gen, für das dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern nachgewiesen wurde (Reuter pers. Mitteilung). Der *Su(var)*-Effekt von MES-4 Mutationen lässt vermuten, dass die frühembryonale H3K36me1/me2 Modifizierung eine Rolle bei der Bildung von Heterochromatin im embryonalen Blastoderm besitzen könnte. Immunozytologische Analysen von H3K9me2 und der Bindung von HP1 werden gegenwärtig in MES-4-Null Embryonen durchgeführt. Eine Assoziation von MES-4 mit HP1 Komplexen und die Bindung von MES-4 im heterochromatischen Chromozentrum der larvalen Polytänchromosomen konnte durch Alekseyenko et al., (2014) nachgewiesen werden. Die Bindung von MES-4 im heterochromatischen Chromozentrum konnte von mit einem

neu generierten polyklonalen Antikörper bestätigt werden. Besonders prominent ist eine Färbung am überwiegend heterochromatischen 4. Chromosoms nachweisbar (vgl. 3.6.2).

Weil MES-4 in *Su(var)2-1* Null Polytänochrosomen normal verteilt ist, spielt offensichtlich SU(VAR)2-1 bei der Heterochromatinbindung von MES-4 in der späteren Entwicklung keine Rolle. Unabhängig von der MES-4 Bindung im 4. Chromosom und der signifikant schwächeren Bindung im heterochromatischen Chromozentrum, besteht die Möglichkeit, dass der *Su(var)* Effekt von MES-4 Mutationen primär auf eine Funktion von MES-4 bei der Bildung von Heterochromatin in der frühen Embryonalentwicklung (Rekrutierung durch SU(VAR)2-1) hinweist.

Eine Heterochromatinbindung von SU(VAR)2-1 ist nur im frühen embryonalen Blastoderm nachweisbar, während in Polytänochrosomen das Protein eine Bandenspezifische Assoziation zeigt. Dies veranschaulicht, dass SU(VAR)2-1 für die Etablierung und nicht für die „Maintenance“ von Heterochromatin von Bedeutung ist. Die Bindung mit Banden in larvalen Polytänochrosomen zeigt, dass SU(VAR)2-1 in der späteren Entwicklung eine wichtige regulatorische Funktion im transkriptionell inaktiven Euchromatin besitzt.

SU(VAR)2-1 ist ein Schlüsselregulator der genomweiten Histon-Deacetylierung

Immunozytologische Analysen der Histon-Acetylierung in SU(VAR)2-1-Null Larven zeigen eine signifikante Erhöhung von H3K9ac, H3K27ac, H4K5ac, H4K8ac und H4K16ac. Keine Veränderung wurde gefunden für H3K18ac, H3K23ac und H4K12ac. Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurden die Analysen zu H3K9ac, H3K27ac und H4K16ac auch an embryonalem Gewebe und in der Oogenese durchgeführt. In allen untersuchten Entwicklungsstadien wird eine signifikante Erhöhung der Histon-Acetylierung nachgewiesen. Alle diese Histon-Acetylierungen sind sowohl im Euchromatin als auch im Heterochromatin stark erhöht. Im Heterochromatin wird normalerweise kein H3K9ac und H3K27ac gefunden. Geringe Mengen von H4K5ac, H4K8ac und H4K16ac können jedoch im Heterochromatin beim Wildtyp nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass SU(VAR)2-1 in der frühen Embryonalentwicklung, wenn dieses Protein mit Heterochromatin assoziiert ist, die Etablierung von H3K9ac und H3K27ac aktiv ausschließt sowie eine Akkumulation von

H4K5ac, H4K8ac und H4K16ac verhindert, obwohl es selbst keine konservierten vorhergesagten Struktur motive von Histondeacetylasen besitzt.

Besonders interessant ist der Befund, dass in SU(VAR)2-1-Null Larven H3K9me2 und HP1 im Heterochromatin keine signifikante Reduktion zeigen, obwohl gleichzeitig eine starke H3K9 Acetylierung nachweisbar ist. H3K9ac und H3K9me2 schließen sich aus, denn beide Markungen können nicht gleichzeitig am Lysin 9 von Histon H3 etabliert werden. Die Koexistenz von H3K9ac und H3K9me2 im Heterochromatin könnte sowohl durch eine differentielle Modifizierung der beiden H3-Moleküle eines Nukleosoms als auch durch alternierende H3K9ac und H3K9me2 Modifizierung aufeinanderfolgender Nukleosomen erklärt werden.

Ein anderer Sachverhalt liegt bei H3K27ac vor. Hier zeigen neue Analysen dass das Auftreten bzw. die Erhöhung von H3K27ac zu einer gleichzeitigen Reduktion von H3K27me2 im Heterochromatin und im Euchromatin führt.

In Eukaryoten stellt RPD3 (HDAC1) eine Histon-Deacetylase dar, die offensichtlich enzymatische Aktivität gegenüber unterschiedlichen Histone-Acetylierungen besitzt. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine Aktivität gegenüber H4K5ac und H4K12ac nachgewiesen werden (Rundlett et al., 1996). In *Drosophila* und im Säugersystem (Seto and Yoshida, 2014) wird eine Aktivität der RPD3 Homologen gegenüber H3K9ac und H3K27ac gezeigt (Tie et al., 2009). Diese Literaturbefunde belegen, dass RPD3 (HDAC1) in Abhängigkeit des Proteinkomplexes, in dem es assoziiert ist, ein breites Spektrum unterschiedlicher Histon-Acetylierungen entfernen kann (Tie et al., 2009).

Durch Immunopräzipitation an larvalen Speicheldrüsenextrakten konnten wir zeigen, dass SU(VAR)2-1 und RPD3 in vivo direkt interagieren. Gleichzeitig war es möglich, mittels eines spezifischen polyklonalen RPD3 Antikörper nachzuweisen, dass in SU(VAR)2-1-Null Larven die Bindung von RPD3 an polytären Speicheldrüsenchromosomen signifikant reduziert ist. Diese Ergebnisse fordern, dass SU(VAR)2-1 ein wesentlicher Kontrollfaktor der Rekrutierung von RPD3 in larvalen Speicheldrüsen ist.

In SU(VAR)2-1-Null Tieren werden gleichzeitig mehrere Acetylierungsmarkierungen dereguliert und somit muss geklärt werden, ob all diese durch RPD3 deacetyliert werden oder SU(VAR)2-1 auch eine Interaktion mit anderen Deacetylasen der verschiedenen bekannten Klassen zeigt. Zur Klärung dieser Frage könnten zunächst in den RPD3-Null Larven analysiert werden, welche der Acetylierungen erhöht sind, die

auch in SU(VAR)2-1-Null Larven dereguliert werden. Parallel dazu besteht die Möglichkeit, auf in vivo Interaktion von SU(VAR)2-1 mit anderen bekannten Deacetylasen zu testen. Hierfür wurden zunächst SIRT2- und SIRT4-Transgene generiert, die V5-Flag Fusionsproteine exprimieren. Nach Immunopräzipitation von SU(VAR)2-1 mit einem polyklonalen Antikörper konnte kein SIRT2-V5-Flag und SIRT4-V5-Flag copräzipitiert werden. Dies weist darauf hin, dass keine direkte Bindung von SU(VAR)2-1 zu diesen Deacetylasen vorliegt. Für SIRT7 wurden Knockoutlinien mit CRISPR-Cas9 generiert. Immunzytologische Analysen konnten in den homozygoten Larven keine signifikante Veränderung von H3K9ac und H3K27ac nachweisen (Chen, 2017).

Die funktionelle Rolle von SU(VAR)2-1 bei der Etablierung von Heterochromatin

Die Isolation neuer Punktmutationen für *Su(var)2-1* ermöglichte es, eine getrennte Analyse der funktionellen Rolle von SU(VAR)2-1 in der Oogenese und dem heterochromatischen Gensilencing durchzuführen. Einige der Punktmutationen sind homozygot lebensfähig und fertil. Mit Hilfe der *Su(var)2-1^{Su4}* P180S Punktmutation wurde es erstmals möglich, Embryonen zu analysieren, die von homozygoten Mutanten-Weibchen produziert werden. Die Analyse dieser Embryonen fordert, dass das SU(VAR)2-1 Protein für die Deacetylierung der Histone nach Abschluss der Furchungsteilungen beim Übergang zum Blastoderm essentiell ist. SU(VAR)2-1 rekrutiert die Histondeacetylase/en, die für die Beseitigung der embryonalen Histonacetylierung eine wesentliche Voraussetzung sind und zur Etablierung eines „naiven“ Chromatinzustandes zu frühen. Eine immunzytologische Färbung von *Su(var)2-1^{Su4}* homozygoten Embryonen sollte prüfen, ob RPD3 in den Blastoderm-Kernen noch mit Chromatin assoziiert ist. Die *Su(var)2-1^{Su4}* homozygoten Embryonen zeigen, dass im Vergleich zum Wildtyp keine Entfernung von H3K9ac und H3K27ac im Bereich des Heterochromatins stattfindet und diese Acetylierungen im Gegensatz zum Wildtyp akkumuliert werden. Obwohl eine signifikante Anreicherung der Acetylierung sowohl im Heterochromatin als auch im Euchromatin nachweisbar ist, sind diese Embryonen nicht letal sondern zeigen nur einen epigenetischen Defekt bei der Bildung von Heterochromatin und der Etablierung von heterochromatischem Gensilencing. Dies führt zum Verlust von H3K9me2S10p infolge eines Ausschlusses der JIL1-Bindung zum Heterochromatin. SU(VAR)2-1 kontrolliert somit primär die

Entfernung der abundanten Histone-Acetylierung durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen wie RPD3. Dies ist für die Bindung von JIL1 ins Heterochromatin und eine Etablierung der H3K9me2S10p Doppelmarkierung essentiell. Somit wird der starke Su(var)-Effekt von *Su(var)2-1*-Mutationen primär durch den Ausfall der Deacetylierung von Furchungschromatin und der Nichtetablierung der H3K9me2S10p Doppelmarkierung im Heterochromatin hervorgerufen. Für die Bindung von JIL1 ins Heterochromatin könnte u.a. auch die MES-4-abhängige H3K36me1/me2 Modifizierung verantwortlich sein und somit die Etablierung der H3K9me2S10p Doppelmarkierung im Heterochromatin beeinflussen. Das wäre auch eine mögliche Erklärung für den Su(var)-Effekt von MES-4 Mutationen. Für weitere Arbeiten ist es somit notwendig in MES-4 Nullmutanten immunzytologische Analysen zur Bindung von JIL1 und der Etablierung von H3K9me2S10p durchzuführen.

Es kann angenommen werden, dass RPD3 in Furchungsembryonen vorhanden ist. Hier scheint es aber inaktiv oder nur schwach aktiv zu sein. Alternativ ist auch denkbar, dass RPD3 während der Furchung nicht durch SU(VAR)2-1 ans Chromatin rekrutiert wird. Weiterführende immunzytologische Analysen sollten somit durchgeführt werden, um diese offenen Fragen, auch unter Einsatz der neuen *Su(var)2-1* Punktmutationen klären zu können. Mutationen für einen Faktor, der die Interaktion zwischen SU(VAR)2-1 und RPD3 (z.B. kovalente Modifizierung von SU(VAR)2-1 oder RPD3) oder die enzymatische Aktivität von RPD3 kontrolliert, sollten zu einem Entwicklungsstopp während der Furchungsteilung führen.

SU(VAR)2-1 ein zentraler Regulator der Midblastula-Transition bei *Drosophila*

Zusammenfassend führten die Untersuchungen zur Funktion von *Su(var)2-1* zu folgendem Modell. Die nachgewiesene Heterochromatinbindung von SU(VAR)2-1 ist essentiell für Histon-Deacetylierung bei der Transition von Furchungschromatin zu einer „naiven“ Chromatinkonformation, die für die differentielle Etablierung von Heterochromatin und Euchromatin im frühen embryonalen Blastoderm (Midblastula-Transition) erforderlich ist. Das SU(VAR)2-1-Protein kontrolliert dabei durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen (z.B. RPD3) die Entfernung der abundanten Histonacetylierung. Ein Ausfall dieser Funktion durch den Verlust von SU(VAR)2-1 resultiert in einer signifikanten Anreicherung verschiedener Histon-Acetylierung im Heterochromatin und Euchromatin. Als eine wichtige Folge dieser epigenetischen

Defekte im Heterochromatin wird die H3K9me2S10p Doppelmarkierung von Heterochromatin durch JIL1 ausgeschlossen. Diese Defekte in der epigenetischen Indizierung von Heterochromatin führen zu einer signifikanten Suppression von Silencingprozessen. Parallel reguliert SU(VAR)2-1 über die Kontrolle der Histon-Deacetylierung die Etablierung einer normalen Struktur von Euchromatin. Dies führt zu einer komplexen Deregulation von Genaktivitäten in somatischen Geweben. Obwohl der Einfluss von SU(VAR)2-1 auf die Kontrolle der Chromatinstruktur massiv ist, sind die homozygoten Mutantentiere nicht letal. Dies verdeutlicht auch die hohe Dynamik epigenetischer Prozesse und veranschaulicht zugleich die hohe Kapazität der eukaryotischen Zellen epigenetische Defekte zu kompensieren.

5 Zusammenfassung

Su(var)-Gene identifizieren epigenetische Faktoren, die am Aufbau von Heterochromatin und bei Prozessen zum Stilllegen von Genen in *Drosophila melanogaster* von besonderer Bedeutung sind. *Su(var)*-Gene kodieren für Proteine die Bestandteile des Chromatins modifizieren und oftmals eine funktionelle evolutionäre Konservierung aufweisen.

Su(var)2-1-Mutationen zeigen ein interessantes Spektrum phänotypischer Effekte, einschließlich weiblicher Sterilität, Hyperacetylierung von Histonen, letaler Wechselwirkung mit Y-Heterochromatin und eine Butyrat-Empfindlichkeit. Das *Su(var)2-1*-Gen wurde molekular charakterisiert und ist ein dominanter Suppressor für das *In(1)w^{m4h}*-PEV-Rearrangement. Es kodiert für ein neues Chromatinprotein mit einer NLS-binding and DNA-binding and dimerisation domains of Nrfl (EWG Domäne) und einem C2H2-Zink-Finger-Motiv. Mapping- und Komplementationsanalysen mit isolierten Mutanten lassen auf eine komplexe Proteinfunktion von SU(VAR)2-1 in der Ontogenese von *Drosophila* schließen. In der frühen Embryogenese ist SU(VAR)2-1 mit dem Heterochromatin assoziiert, in der späteren Entwicklung ist es aber an den Banden der larvalen Polytänchromosomen lokalisiert. SU(VAR)2-1 interagiert innerhalb der polytänen Speicheldrüsenchromosomen mit RPD3. Ein Verlust von SU(VAR)2-1 in *Su(var)2-1*-Mutanten führt dort zu einer deutlichen Hyperacetylierung von H3K9, H3K27, H4K8 und H4K16. Die heterochromatischen Indizierungen H3K9me2 und HP1 sind durch den Verlust von SU(VAR)2-1 nicht betroffen. SU(VAR)2-1 ist besonders wichtig für die Etablierung einer normalen Oogenese in *Drosophila*. Durch den Verlust von SU(VAR)2-1 können keine späten Stadien der Oogenese gebildet werden, was zu einer rezessiv weiblichen Sterilität führt.

In der frühen Embryogenese interagiert SU(VAR)2-1 nicht nur mit dem Heterochromatin sondern auch mit dMES-4/NSD, einem *Drosophila*-Homolog des humanen WHSC1-Proteins (dWHSC1). Das Gen *dMes-4* ist wie *Su(var)2-1* ein *Su(var)*-Gen. *Drosophila*-MES-4 kontrolliert in der frühen Embryogenese die H3K36me1- und H3K36me2-Methylierung. Im Blastoderm ist dMES-4 wahrscheinlich funktionell durch die H3K36-Methyltransferase HYPB substituiert. In polytänen Speicheldrüsenchromosomen assoziiert dMES-4 mit dem vierten Chromosom und kann *in vitro* H3K36me1 und H3K36me2 am Histon H3 katalysieren.

6 Literatur

- Aka, J. A., Kim, G. W. and Yang, X. J.** (2011). K-acetylation and its enzymes: overview and new developments. *Handb Exp Pharmacol* **206**, 1-12.
- Alekseyenko, A. A., Gorchakov, A. A., Zee, B. M., Fuchs, S. M., Kharchenko, P. V. and Kuroda, M. I.** (2014). Heterochromatin-associated interactions of Drosophila HP1a with dADD1, HIP1, and repetitive RNAs. *Genes Dev* **28**, 1445-60.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R. and Mirsky, A. E.** (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 786-94.
- Allis, C. D. and Jenuwein, T.** (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* **17**, 487-500.
- Aravind, L. and Iyer, L. M.** (2002). The SWIRM domain: a conserved module found in chromosomal proteins points to novel chromatin-modifying activities. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0039.
- Bajusz, I., Sipos, L., Gyorgypal, Z., Carrington, E. A., Jones, R. S., Gausz, J. and Gyurkovics, H.** (2001). The Trithorax-mimic allele of Enhancer of zeste renders active domains of target genes accessible to polycomb-group-dependent silencing in Drosophila melanogaster. *Genetics* **159**, 1135-1150.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. and Kouzarides, T.** (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-4.
- Becker, T. S., Burgess, S. M., Amsterdam, A. H., Allende, M. L. and Hopkins, N.** (1998). not really finished is crucial for development of the zebrafish outer retina and encodes a transcription factor highly homologous to human Nuclear Respiratory Factor-1 and avian Initiation Binding Repressor. *Development* **125**, 4369-4378.
- Bell, O., Wirbelauer, C., Hild, M., Scharf, A. N., Schwaiger, M., MacAlpine, D. M., Zilbermann, F., van Leeuwen, F., Bell, S. P., Imhof, A. et al.** (2007). Localized H3K36 methylation states define histone H4K16 acetylation during transcriptional elongation in Drosophila. *EMBO J* **26**, 4974-84.
- Bender, L. B., Cao, R., Zhang, Y. and Strome, S.** (2004). The MES-2/MES-3/MES-6 complex and regulation of histone H3 methylation in *C. elegans*. *Curr Biol* **14**, 1639-43.
- Bender, L. B., Suh, J., Carroll, C. R., Fong, Y., Fingerman, I. M., Briggs, S. D., Cao, R., Zhang, Y., Reinke, V. and Strome, S.** (2006). MES-4: an autosome-associated histone methyltransferase that participates in silencing the X chromosomes in the *C. elegans* germ line. *Development* **133**, 3907-17.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-7.
- Bone, J. R., Lavender, J., Richman, R., Palmer, M. J., Turner, B. M. and Kuroda, M. I.** (1994). Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in Drosophila. *Genes Dev* **8**, 96-104.
- Candido, E. P., Reeves, R. and Davie, J. R.** (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **14**, 105-13.
- Capowski, E. E., Martin, P., Garvin, C. and Strome, S.** (1991). Identification of grandchildless loci whose products are required for normal germ-line development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **129**, 1061-72.

- Carpenter, A. T.** (1975). Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. I. Structure, arrangement, and temporal change of the synaptonemal complex in wild-type. *Chromosoma* **51**, 157-82.
- Celniker, S. E., Dillon, L. A., Gerstein, M. B., Gunsalus, K. C., Henikoff, S., Karpen, G. H., Kellis, M., Lai, E. C., Lieb, J. D., MacAlpine, D. M. et al.** (2009). Unlocking the secrets of the genome. *Nature* **459**, 927-30.
- Cha, B.-J., Koppetsch, B. S. and Theurkauf, W. E.** (2001). In Vivo Analysis of *Drosophila* bicoid mRNA Localization Reveals a Novel Microtubule-Dependent Axis Specification Pathway. *Cell* **106**, 35-46.
- Chen, X.** (2017). Characterization and Functional Analysis of Sirtuins, Putative Histone Deacetylases in *Drosophila melanogaster*. *Masterarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Chintapalli, V. R., Wang, J. and Dow, J. A. T.** (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature genetics* **39**, 715-20.
- Clegg, N. J., Honda, B. M., Whitehead, I. P., Grigliatti, T. A., Wakimoto, B., Brock, H. W., Lloyd, V. K. and Sinclair, D. A. R.** (1998). Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect expression of the heterochromatic gene light in the absence of a chromosome rearrangement. *Genome* **41**, 495-503.
- Clegg, N. J., Whitehead, I. P., Brock, J. K., Sinclair, D. A., Mottus, R., Stromotich, G., Harrington, M. J. and Grigliatti, T. A.** (1993). A cytogenetic analysis of chromosomal region 31 of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**, 221-230.
- Conrad, T., Cavalli, F. M., Holz, H., Hallaceli, E., Kind, J., Ilik, I., Vaquerizas, J. M., Luscombe, N. M. and Akhtar, A.** (2012). The MOF chromobarrel domain controls genome-wide H4K16 acetylation and spreading of the MSL complex. *Dev Cell* **22**, 610-24.
- Cook, R. K., Christensen, S. J., Deal, J. A., Coburn, R. A., Deal, M. E., Gresens, J. M., Kaufman, T. C. and Cook, K. R.** (2012). The generation of chromosomal deletions to provide extensive coverage and subdivision of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol* **13**, R21.
- Cooper, K. W.** (1959). Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in *Drosophila melanogaster*, and the theory of "heterochromatin". *Chromosoma* **10**, 535-88.
- Dhayan, A., Rajavelu, A., Rathert, P., Tamas, R., Jurkowska, R. Z., Ragozin, S. and Jeltsch, A.** (2010). The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. *The Journal of biological chemistry* **285**, 26114-20.
- Di Stefano, L., Ji, J. Y., Moon, N. S., Herr, A. and Dyson, N.** (2007). Mutation of *Drosophila* Lsd1 disrupts H3-K4 methylation, resulting in tissue-specific defects during development. *Curr Biol* **17**, 808-12.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G.** (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**, 1475-89.
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C. and Cheng, X.** (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* **6**, 227.
- Dorn, R., Heymann, S., Lindigkeit, R. and Reuter, G.** (1986). Suppressor mutation of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affecting chromatin properties. *Chromosoma* **93**, 398-403.
- Dorn, R., Krauss, V., Reuter, G. and Saumweber, H.** (1993). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, E(var)3-93D, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11376-11380.
- Ebert, A.** (1999). Molekulare Charakterisierung des In(1)^{w^{m4}}-Rearrangements und Etablierung eines Modellsystems zur Analyse von heterochromatischen Proteinkomplexen in *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit - Martin-Luther-Universität Halle*.
- Ebert, A., Lein, S., Schotta, G. and Reuter, G.** (2006). Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res* **14**, 377-92.

- Ejsmont, R. K., Sarov, M., Winkler, S., Lipinski, K. A. and Tomancak, P.** (2009). A toolkit for high-throughput, cross-species gene engineering in *Drosophila*. *Nat Methods* **6**, 435-7.
- Elgin, S. C. and Hood, L. E.** (1973). Chromosomal proteins of *Drosophila* embryos. *Biochemistry* **12**, 4984-91.
- Elgin, S. C. and Reuter, G.** (2013). Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a017780.
- Elgin, S. C. and Workman, J. L.** (2002). Chromosome and expression mechanisms: a year dominated by histone modifications, transitory and remembered. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 127-9.
- Fanti, L., Berloco, M. and Pimpinelli, S.** (1994). Carnitine suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics* **244**, 588-595.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M. and Pimpinelli, S.** (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* **2**, 527-38.
- FlyBase, C.** (2012). FlyBase incorporation of BDGP in situ webpage gene expression annotations, (ed).
- Fodor, B. D., Shukeir, N., Reuter, G. and Jenuwein, T.** (2010). Mammalian Su(var) genes in chromatin control. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 471-501.
- Fong, Y., Bender, L., Wang, W. and Strome, S.** (2002). Regulation of the different chromatin states of autosomes and X chromosomes in the germ line of *C. elegans*. *Science* **296**, 2235-8.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., Wildonger, J. and O'Connor-Giles, K. M.** (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* **194**, 1029-35.
- Gratz, S. J., Ukken, F. P., Rubinstein, C. D., Thiede, G., Donohue, L. K., Cummings, A. M. and O'Connor-Giles, K. M.** (2014). Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics* **196**, 961-71.
- Graveley, B. R., Brooks, A. N., Carlson, J. W., Duff, M. O., Landolin, J. M., Yang, L., Artieri, C. G., van Baren, M. J., Boley, N., Booth, B. W. et al.** (2011). The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**, 473-9.
- Greer, E. L. and Shi, Y.** (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* **13**, 343-57.
- Grossniklaus, U. and Paro, R.** (2014). Transcriptional silencing by polycomb-group proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a019331.
- Grunstein, M. and Gasser, S. M.** (2013). Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**.
- Hayashi, S., Ruddell, A., Sinclair, D. A. R. and Grigliatti, T.** (1990). Chromosomal structure is altered by mutations that suppress or enhance position effect variegation. *Chromosoma* **99**, 391-400.
- Holowatyj, A., Yang, Z. Q. and Pile, L. A.** (2015). Histone lysine demethylases in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* **9**, 36-44.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R. and Reuter, G.** (1998). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci* **54**, 80-93.
- Jin, Y., Wang, Y., Walker, D. L., Dong, H., Conley, C., Johansen, J. and Johansen, K. M.** (1999). JIL-1: a novel chromosomal tandem kinase implicated in transcriptional regulation in *Drosophila*. *Mol Cell* **4**, 129-35.
- Johansson, A. M., Stenberg, P., Bernhardsson, C. and Larsson, J.** (2007a). Painting of fourth and chromosome-wide regulation of the 4th chromosome in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **26**, 2307-16.
- Johansson, A. M., Stenberg, P., Pettersson, F. and Larsson, J.** (2007b). POF and HP1 bind expressed exons, suggesting a balancing mechanism for gene regulation. *PLoS Genet* **3**, e209.
- Kadosh, D. and Struhl, K.** (1998). Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev* **12**, 797-805.
- King, R. C.** (1970). Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*.

- Kingston, R. E. and Tamkun, J. W.** (2014). Transcriptional regulation by trithorax-group proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a019349.
- Kondo, S. and Ueda, R.** (2013). Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics* **195**, 715-21.
- Kornberg, R. D.** (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-71.
- Levine, M.** (2010). Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr Biol* **20**, R754-63.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*.
- Lippman, Z. and Martienssen, R.** (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364-70.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-60.
- McQuilton, P., St Pierre, S. E. and Thurmond, J.** (2012). FlyBase 101--the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res* **40**, D706-14.
- Mendjan, S. and Akhtar, A.** (2007). The right dose for every sex. *Chromosoma* **116**, 95-106.
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T. K., Koche, R. P. et al.** (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**, 553-60.
- Mitchison, T. J. and Sedat, J.** (1983). Localization of antigenic determinants in whole *Drosophila* embryos. *Dev Biol* **99**, 261-4.
- Morris, J. and Lehmann, R.** (1999). *Drosophila* oogenesis: versatile spn doctors. *Curr Biol* **9**, R55-8.
- Muller, H. J.** (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Journal of Genetics* **22**, 299-334.
- Pei, J. and Grishin, N. V.** (2007). PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics* **23**, 802-8.
- Pikaard, C. S. and Mittelsten Scheid, O.** (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a019315.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. et al.** (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-9.
- Reuter, G., Dorn, R. and Hoffmann, H. J.** (1982a). Butyrate sensitive suppressor of position-effect variegation mutations in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **188**, 480-5.
- Reuter, G., Dorn, R., Wustmann, G., Friede, B. and Rauh, G.** (1986). Third chromosome suppressor of position-effect variegation loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics MGG* **202**, 481-487.
- Reuter, G., Giarre, M., Farah, J., Gausz, J., Spierer, A. and Spierer, P.** (1990). Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of a gene encoding an unusual zinc-finger protein. *Nature* **344**, 219-223.
- Reuter, G., Werner, W. and Hoffmann, H. J.** (1982b). Mutants affecting position-effect heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **85**, 539-551.
- Reuter, G. and Wolff, I.** (1981). Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **182**, 516-9.
- Richards, E. J. and Elgin, S. C.** (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.
- Richmond, T. J. and Davey, C. A.** (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**, 145-50.
- Robinson, P. J., Fairall, L., Huynh, V. A. and Rhodes, D.** (2006). EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6506-11.
- Rothwell, W. F. and Sullivan, W.** (2007). Fixation of *Drosophila* embryos. *CSH Protoc* **2007**, pdb prot4827.

- Roudier, F., Ahmed, I., Berard, C., Sarazin, A., Mary-Huard, T., Cortijo, S., Bouyer, D., Caillieux, E., Duvernois-Berthet, E., Al-Shikhley, L. et al.** (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J* **30**, 1928-38.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Rudolph, T., Lu, B., Westphal, T., Szidonya, J., Eissenberg, J. and Reuter, G.** (1999). New type of CyO and TM3 green balancers. *Drosophila Information Service* **82**, 99-100.
- Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schafer, C., Phalke, S., Walther, M., Schmidt, A., Jenuwein, T. et al.** (2007). Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* **26**, 103-15.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M. and Grunstein, M.** (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14503-8.
- Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D. et al.** (2007). The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* **177**, 615-29.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. et al.** (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 797-813.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. and Smith, M.** (1977a). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**, 687-95.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977b). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sänger, P.** (2017). Su(var)-Mutationen und die Identifizierung neuer Chromatinfunktionen. . *Masterarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Santos-Rosa, H. and Caldas, C.** (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2381-402.
- Scarpulla, R. C.** (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* **97**, 673-83.
- Scarpulla, R. C.** (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* **88**, 611-38.
- Schäfer, C.** (2004). Charakterisierung neuer DmWhsc1-Allele und ihr Einfluß auf die Histon-Methylierung in *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit - Martin-Luther-Universität Halle*.
- Schotta, G., Ebert, A., Dorn, R. and Reuter, G.** (2003). Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 67-75.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. and Reuter, G.** (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* **21**, 1121-31.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D. and Jenuwein, T.** (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**, 1251-62.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-64.
- Seto, E. and Yoshida, M.** (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a018713.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K. L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M. R. et al.** (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**, 96-9.

- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A. and Casero, R. A.** (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-53.
- Silver, L. M., Wu, C. E. and Elgin, S. C.** (1978). Immunofluorescent techniques in the analysis of chromosomal proteins. *Methods Cell Biol* **18**, 151-67.
- Sinclair, D. A. R., Mottus, R. C. and Grigliatti, T. A.** (1983). Genes which suppress position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* are clustered. *Molecular and General Genetics MGG* **191**, 326-333.
- Sinclair, D. A. R., Ruddell, A. A., Brock, J. K., Clegg, N. J., Lloyd, V. K. and Grigliatti, T. A.** (1992). A cytogenetic and genetic characterization of a group of closely linked second chromosome mutations that suppress position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **130**, 333-344.
- Sinclair, D. A. R., Schulze, S., Silva, E., Fitzpatrick, K. A. and Honda, B. M.** (2000). Essential genes in autosomal heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* **109**, 9-18.
- Straub, T. and Becker, P. B.** (2007). Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nat Rev Genet* **8**, 47-57.
- Sun, F. L., Cuaycong, M. H., Craig, C. A., Wallrath, L. L., Locke, J. and Elgin, S. C. R.** (2000). The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*: interspersed euchromatic and heterochromatic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5340-5345.
- Szabad, J., Reuter, G. and Schröder, M.-B.** (1988a). The effects of two mutations connected with chromatin functions on female germ-line cells of *Drosophila*. *Molecular and General Genetics MGG* **211**, 56-62.
- Szabad, J., Reuter, G. and Schroder, M. B.** (1988b). The effects of two mutations connected with chromatin functions on female germ-line cells of *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **211**, 56-62.
- Tessarz, P. and Kouzarides, T.** (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 703-8.
- Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C. A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M. O., Scacheri, P. C. and Harte, P. J.** (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development* **136**, 3131-41.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G.** (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* **13**, 3822-31.
- Turner, B. M., Birley, A. J. and Lavender, J.** (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* **69**, 375-84.
- Vezzoli, A., Bonadies, N., Allen, M. D., Freund, S. M., Santiveri, C. M., Kvinlaug, B. T., Huntly, B. J., Gottgens, B. and Bycroft, M.** (2010). Molecular basis of histone H3K36me3 recognition by the PWWP domain of Brpf1. *Nature structural & molecular biology* **17**, 617-9.
- Vidal, M. and Gaber, R. F.** (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 6317-27.
- Vidali, G., Boffa, L. C., Bradbury, E. M. and Allfrey, V. G.** (1978a). Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2239-43.
- Vidali, G., Boffa, L. C., Mann, R. S. and Allfrey, V. G.** (1978b). Reversible effects of Na-butyrate on histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* **82**, 223-7.
- Virbasius, C. A., Virbasius, J. V. and Scarpulla, R. C.** (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* **7**, 2431-45.
- W. Sullivan, M. A., R.S. Hawley.** (2000). *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Wallrath, L. L. and Elgin, S. C.** (1995). Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev* **9**, 1263-77.
- Walther, M.** (2003). Molekulare Analyse von SU(VAR)3-98B und des interagierenden SU(VAR)2-1 Proteins in *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit*, 1-100.
- Wang, C., Li, Y., Cai, W., Bao, X., Girton, J., Johansen, J. and Johansen, K. M.** (2014). Histone H3S10 phosphorylation by the JIL-1 kinase in pericentric heterochromatin and on the fourth chromosome creates a composite H3S10phK9me2 epigenetic mark. *Chromosoma* **123**, 273-80.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Peng, W., Zhang, M. Q. et al.** (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**, 897-903.
- Westphal, T. and Reuter, G.** (2002). Recombinogenic effects of suppressors of position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics* **160**, 609-621.
- Woodcock, C. L., Skoultchi, A. I. and Fan, Y.** (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res* **14**, 17-25.
- Wustmann, G., Szidonya, J., Taubert, H. and Reuter, G.** (1989). The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **217**, 520-7.
- Xu, L., Fong, Y. and Strome, S.** (2001). The *Caenorhabditis elegans* maternal-effect sterile proteins, MES-2, MES-3, and MES-6, are associated in a complex in embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5061-6.
- Yokoyama, R., Pannuti, A., Ling, H., Smith, E. R. and Lucchesi, J. C.** (2007). A plasmid model system shows that *Drosophila* dosage compensation depends on the global acetylation of histone H4 at lysine 16 and is not affected by depletion of common transcription elongation chromatin marks. *Mol Cell Biol* **27**, 7865-70.
- Zhang, K. and Dent, S. Y.** (2005). Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. *J Cell Biochem* **96**, 1137-48.

7 Anhang

Verwendete Primer:

132	ATGGTGATTCTATTTTGATCGGTTTTT
174	TGCGAATTCTTGTGACAATGGATG
130	AACCAACAGTTTGTGTTTCTCCTGTCATA
rp49_frw	TGTCTTCCAGCTTCAAGATGACCATC
rp49_rev	CTTGGGCTTGCGCCATTTGTG
P1	AGCAACAAGAGCCAGCAA
P2	GAGTGGAACAGTGTGGGA
P3	TCATCAGGACGGACAGGCA
P4	GGCTCAGGGGAATCACAA
P5	GCCATTTAGCAGTCAGTTCTC
P6	TCGTATAATCGTAAAGCCCTCA
P7	GCATAACAGGAACACGAAAAC
P8	AGCACATTTACTTGGCTCGAC
chiRNA_seq	GAGCGCAACGCAATTAATGTGAG
Avi_rev	CTTCTGGGCCTCGAAAATATCATTGAGTC
ds_DIG_for	ATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAG
ds_DIG_rev	CTACAGGAACAGGTGGTGGCGGCCCTCG
eEF1delta_for	GAAAGTAGAGGCATTGGACAAAATTC
eEF1delta_rev	CCAAGCGCTTCACTGTGGCAGTCAA
CG_56_RT_rev	GCTCAGGGGAATCACAAAGT
CG_56_RT_for	TGCCGAACCTTTATTCTAAAGAAGC
ds_forw	GATCCTAATTGAATTAGCTCTAATTG
2-1_rev	CACACACTCGCAGCGAACGCTTGCAATG
45	CAGAGCCAGAATCAGTAATAGTTGATAATT
169	GTGGTTATATGCTATCAATTTACAAAAGC
105	GATATTGTTTGTGTTTGTGCGATTTTAACAATTGC
GSP65	TGAGAGCAATTCGTGGTTTTTTCAGTAAGG
GSP130	AACCAACAGTTTGTGTTTCTCCTGTCATA
GSP309	AGAATAAAGTTCGGCATCACAG
P106	TCGTTTAGTAGGTGTTTCGTTTATCCCAATATCA
P85	ATACTCAGAGCTCGACTTGCCCGGGCCTTGACAGC
Gal_rev	TCATCGGAAGAGAGTAG
Gal_for	CCTCCTCAATCTCATTAC
RT_1f	CCATGGTGAACAGGAAACGAG
RT_1r	CATCTGTCCGGTCAACTTCCTCATC
Mes4_null_for	ATGAAGCTGAGCACGGACGCGCACTCCG
Mes4_null_rev	CCTTCTTGCTGTTGTTTCAATTAAGTCGTCC

Primer für CRISPR/Cas-9 –HDR [*Su(var)2-1* knock out]

5694-5'_HR_Spe	TAACTAGTGTACGCACCAAGAATTCGCAATGATTAAC
5694-5'_HR_Pst	TACTGCAGACAATTGGCTGAACAATACGATAAC
5694-3'_HR_Eco	TAGAATTCGTGTATCAAACCTGCGGTCTTACGC
5694-3'_HR_Not	TAGCGGCCGCTTTTCGGTATGTACCTCAACCCAAC

gRNA1_2_1sense	CTTCGAATTCTTGGTGCCTACTGA
gRNA1_2_1asens	AAACTCAGTACGCACCAAGAATTC
gRNA2_2_1sense	CTTCGAGGTACATACCGAAAAGAC
gRNA2_2_1asens	AAACGTCTTTTCGGTATGTACCTC

Primer für CRISPR/Cas-9 –HDR Primer [*Su(var)2-1* AVI knock in]

F_HR_1_AscI-AvrII	ATGGCGCGCCGCGCCTAGGAGAAGTTAAATCAATGGAAATTATAC
R_HR_1_XhoI	ATCTCGAGCCCAAATTCTCCGATAATAGTTTATC
Rest_1_AscI	ATGGCGCGCCACATTTTAATCCATAGTTAAG
Rest_1_SpeI	ATACTAGTCAGTAGGGTTCCTCTACAGTATGTC
AscI_avi_for	CGCGCCCTACTCATGCCACTCAATCTTCTGGGCCTCGAAAATATCA TTCAGTCCC
AvrII_avi_rev	CTAGGGGACTGAATGATATTTTCGAGGCCCAGAAGATTG AGTGGCATGAGTAGGG
gRNA3_2_1sense	CTTCGTAGAGGAACCCTACTGTTT
gRNA3_2_1aense	AAACAAACAGTAGG GTTCTCTAC

Primer für: p[UASTattB,w⁺gen.eEFmut. Strep-TagII-*Su(var)2-1-V5-3xFLAG*]

e2F_mut_forw	GCTTCTCGGCAAGATCGCTAGCGGCTCTTGTCAG
e2F_mut_back	CTGACAAGAGCCGCTAGCGATCTTGCCGAGAAGC
Strep1_forw	AGTGACAAATGGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGA AAAAGATGAAAAAGAT
Strep2_back	ATCTTTTTCATCTTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA AGCCATTTGTCACT
2-1 genom_f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAAAT ATTTATTTAGACGACTCCCAAACAC
2-1genom_rev	AGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGAA GTTAAATCAATGGAAATTATACGCC

Primer für: pP[RS5 w+ gen. *Su(var)2-1-V5*] & pP[RS5 w+ gen. *Su(var)2-1-V5-3xFLAG*]

2-1genom_rev	AGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGAAGT TAAATCAATGGAAATTATACGCC
short 220	AGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGCCATC GATCTGGAACACACACAAAAGGCTTG

Primer für: pP[RS5 w+gen. dMes-4-V5] & pP[RS5 w+ gen. dMes-4-V5-3xFLAG]

49forw_2	AGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGCTCCGGT GCTATAGACTCAATACTGGCATTG
49back_2	AGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTCGTCCTTC GCATCCATTGGCTCATCGTCCGC

Primer für: pP[UAST w+ gen. H3.3A -V5-6xHis] & pP[RS5 w+ gen. H3.3B -V5-6xHis]

H3.3A_xba_back	ATATCTAGAGGCCCGCTCGCCACGGATGCGTCT
H3.3A_eco_forw	ATAGAATTCGTTAACAATGCGGCTATTGGCATT
H3.3B Eco_forw	ATAGAATTCGTGGGCAAGGCCAACAGGCAGGCGGA
H3.3B Eco_back	ATAGAATTCAGCACG CTCGCCACG GATGCGGCGCGC

Primer für: pP[UAST w+; attB gen. eEF Su(var)2-1-V5-3xFLAG]

2-1 genom_f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAATA TTTATTTAGACGACTCCCAAACAC
2-1genom_rev	AGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGAAG TTAAATCAATGGAAATTATACGCC

Primer für: pP[UAST cDNA-Su(var)2-1-EGFP]

Xho_EGFP_forw	ATACTCGAGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACC
Xho_EGFP_back	ATACTCGAGCTCGACTTGCCCGGGCCTTGTACAGC
2-1cDNA-Eco	AAGAATTCATGGATGAAAAAGATAAAGCTCAA
2-1cDNA-Not	ATGCGGCCGCCAGAAGTTAAATCAATGGAAATTA

Primer zur Herstellung von pFlyFos-Konstrukten:

C CG2807_F	5'- GAT TAC TAA TGA TCC CAA GAA CCA GTA CGA GCG GTA CGA GTT GGA CTA CAC GCT AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C CG2807_R	5'- ATT GGT ATC TTA GAG AAT CCT ACC ACT AGC AGA TAA GCT ATT ACA ATT TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
C Suv4-20_F	5'- CAA CGG GCG CAG TTA CAT CTC ACC ATC ATA CAA ACA ACC ATC ACG GCC AGA AAG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
C Suv4-20_R	5'- CTC ATG GAA ATG GCA ACT GTG CTT AGT CAA TTT GCT TGG AGA TCA GTC GTT GGT TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
C Ubc9_F	5'- GAG TAC GAG AAG CGC GTG CGT GCC CAG GCC CGC GCC ATG GCG GCC ACT GAG GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3'
C Ubc9_R	5'- GAT GTG TGT ATT TGT TAA TGT CTA TGT GGT AAA GGT GGT TGG CAG GAG CCC GAC TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
N CG5694_F	5'- CTA TCG ATA ACA TGG CAA TAA AAT ATA ACA TTT TAA TTC ACT TGC AGT GAC AAT GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
N CG5694_R	5'- CAA ACA AAA GTG GTA GGT TGG ATA TCA TGT TGT GTT GAG CTT TAT CTT TTT CAT CCT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
C CG5694_F	5'- CTC CGC CTT TCA ATG GCA CTG GGC GTA TAA TTT CCA TTG ATT TAA CTT CTG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
C CG5694_R	5'- AGG TTT TCT TGT AAA ATA ACA ATT TCT TAA CTT AAC TAT GGA TTA AAA TGT CTA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3'
C CG5694_def_F	5'- GGT TAT TTT GCA GTC ATA TGA TAG ACA ACA AAA GAA CAG AAAGTG CTT GTT GCT GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C CG5694_def_R	5'- GCT CAA CCA TCA TAT GCT GTA CGT TTT CGC TAA TGG AAC TGT TGT TCT TTT GCT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
C RPD3_F	5'- CGG GAT CAG GTT CCG GTG CCG GGG CCA AGG GCG CCA AGG AGA ACA ACA TTG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
C RPD3_R	5'- GTA CTT CGG CGG TCG CTT AAT TGG CTT CTA TAA CCA ATT GCG GCC GCC ACG TCA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3'
N_E(z)_F	5'- CAG TGT TTT TTA TAC GTA AAA TCA ACA AAT ATA AAG TCC CTC GAA GGC ATT ATG GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3'
N_E(z)_R	5'- ATG TAC TCC GAC TTG ACA CGC CTC TTC CAC TCG GGC GGC ACT TTA GTG CTA TTC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
C Jil1_F	5'- CTC GAG TTC AGC CGG AGA GGG CGC GGG CAA TGC GTC AAC TTT ATC AGT TCC AAG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
C Jil1_R	5'- CCT CCT TGA TTT CCA CCA CCT CCA CAT CAT CGC CGT CGT CAT CCT CAT GTC ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
C Su(var)3-7_F	5'- GGT TGT CAA ATC ACA ACA TTT CGG ACA ATG GTG AAC CAT AAC

	CGC AGG CCA GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3'
C_Su(var)3-7_R	5'- GAC AGT GAT AAA GTC TTA AGT TAC GTT TGA TTC ATA TTT CCT AGG AGC TCT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
N_Ahyc89_F	5'- CGA GCA TAC TTT ATA ACC TGT TTC GGA TCC GTC TAA GTC GCC TAC AGA ATG GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3'
N_Ahyc89_R	5'- GCA GTC TTA TCA GCC AGA CTC AGG TCG GCA AAC GTT GTC TCC GGC ATT TTG GCC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
N_SetDB1_F	5'- GTC TCG CAA ATT TGC ATT AAT GTG TAA AGT TAA GTA AAC TCA TTA AAA CTA TGG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
N_SetDB1_R	5'- CTC CAC TGT GCT TCC ACT GCT CTC TAA GCA GTC CAC GGC TGT TGG CTG CCC AGA CTT GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3'
C_HP1_F	5'- TAA TCC ACT TCT ACG AAG AGC GCC TAT CCT GGT ACT CTG ATA ATG AAG ATG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
C_HP1_R	5'- TCG TTA AAT GTA TAA TCG TTC TTT TTC GCT TTC GAT GAT CCA ACT GTT TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
C_3_9_f	5'- GAT CTT CGG AGG CAA GAC AAT CAC ACC CGT TCT GGA CAG CCA GGT GGC AAA GAA GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C_3_9_b	5'- TTG CCG CTG ATG TTG TTC TTA AAA GTA GAA CCA TTC GGA TCC TAA CTA AAT TCT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
C_3_3_f	5'- GAA GTC GGA GGA GAA TTC AAA CTC AAA CAC TGC CGA CTC TAC GGA GCT ACA GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C_3_3_b	5'- AAC GCT CTA GGA GTA ACT GCT GGG GAC CAA ATC CAT CAC GCT AAA TAC ATT GTT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
C_Gcn5_f	5'- CTC CCT GGA GCG CTA CTT CCA GAC CAA GAT GCG CGA GCT GGG GCT GTG GGA CAA AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C_Gcn5_b	5'- TTA GTT CGA TTA AAT GTT CGG CCT TAT GCA GGG CTC CTC GGA ATC ACT GCA TCA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3'
N_dMES4_f	5'- GAA TTA ACG GTA GTG TTT AAT TGA CGA GAG CGC GAT TAA ACT GGA CCG CAG AAT GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
N_dMES4_b	5'- CAT TGC CGT GGG CAG CGT CGC CCT CGA TCT CGG AGT GCG CGT CCG TGC TCA GCT TCT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
C_lid_f	5'- GCG TGG CGT CCA CGA CGA CGC CGG GCA AGC AGC GGG CGG TGC AAT CGG CGC GGG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
C_lid_b	5'- GCG TAA AAC ACA ATC GGC TGT TAC TGC ACC TCC TGG ACT CTA TAT ACG TTA CTC TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
C_SUUR_f	5'- GAG AAG TGG TGG AGC ATC AGG ACC GAC CAA AAG AAA GCG ATT GGA ACT GTT CAA GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C_SUUR_b	5'- TAA TTG GAT TTG ATT TGA TTT GGT TTT TGT CAT TTT CAT TGA TTG CTG TTC ATC ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3'
C_mod58f	5'- GTT CAT TGA CCA CAA GCT GTC TAC TCT TAA ACT TAT GCC TAT AAA GGA GGG GAA AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C_mod58b	5'- TCT AGT ACA GGC ATT TAT TTC GGT TTA CGA ATG CAA CAA TCA ATTT AAAC TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'

Primer für CRISPR/Cas-9 –HDR [Mes-4/NSD knock out]

HA-1_SpeI	TAACTAGTATCTCGGAGTGC GCGTCCGTGCTCAGC
HA-1_PstI	TACTGCAGTCTTGATAAAGTCGTC CATGCTCCTTG
HA-2_NotI	TAGCGGCCGCACTACTTGTGGGACGACTTAATG
HA-2_EcoRI	TAGAATTCTCCGTGCGCAACTGCCTGAAGCTG
1gRNA_NSD_sens	CTTCGACGCGCACTCCGAGATCGA
1gRNA_NSD_asen	AAACTCGATCTCGGAGTGC GCGTC
2gRNA_NSD_sens	CTTCGTCGTC CCAAGTAGTTGA
2gRNA_NSD_asen	AAACTCAACTACTTGTGGGACGAC

Hergestellte transgene *Drosophila*-Linien:

Bezeichnung	Genotyp	Integr.Ort
2-1 ^{EGFP-10}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ UAS-cDNA <i>Su(var)2-1</i> EGFP]/CyO	30C1
2-1 ^{EGFP-1}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ UAS-cDNA <i>Su(var)2-1</i> EGFP]/CyO	39E3
2-1 ^{EGFP-18}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ UAS-cDNA <i>Su(var)2-1</i> EGFP]/CyO	44E1
2-1 ^{EGFP-13}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ UAS-cDNA <i>Su(var)2-1</i> EGFP]/CyO	49C1
2-1 ^{EGFP-8}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ UAS-cDNA <i>Su(var)2-1</i> EGFP]/TM6	85A5
2-1 ^{Strep-51D}	w ¹¹¹⁸ ; ZH-51D p[UAST.attB,w ⁺ gen Step-tag II 2-1-V5-3xFLAG]/CyRoi	ZH-51D
2-1 ^{Strep-86F}	w ¹¹¹⁸ ; ZH-86F p[UAST.attB w ⁺ gen Step-tag II-2-1-V5-3xFLAG]/CyRoi	ZH-86F
2-1 ^{V5-47}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5]/CyO	60E8
2-1 ^{V5-34}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5]/CyO	54E1
2-1 ^{V5-13}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5]/TM6	91C3
2-1 ^{V5-153}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5]/CyO	37D7
2-1 ^{FLAG-13}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5-3xFLAG]/TM6	75A8
2-1 ^{FLAG-16}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5-3xFLAG]/CyO	21B7
2-1 ^{FLAG-24}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5-3xFLAG]/TM6	83E2
2-1 ^{FLAG-37}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>Su(var)2-1</i> V5-3xFLAG]/CyRoi	40E5
H3.3A ^{V5}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ gen. H3.3A-V5-6xHis]/CyO	35C5
H3.3B ^{V5}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ gen. H3.3B-V5-6xHis]/CyO	26B5
CG7745 ^{V5-28}	w ¹¹¹⁸ ; p[UAST,w+ gen. CG7745-V5-6xHis]/TM6	99B
CG7745 ^{V5-25}	w ¹¹¹⁸ p[UAST,w+ gen. CG7745-V5-6xHis];+;+	16B9
dMES-4 ^{V5-56}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>dMes-4</i> -V5]/TM6	91F1
dMES-4 ^{V5-72}	w ¹¹¹⁸ p[RS5,w+ gen. <i>dMes-4</i> -V5];+;+	16C1
dMES-4 ^{V5-85}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>dMes-4</i> -V5]/TM6	100D1
dMES-4 ^{V5-99}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>dMes-4</i> -V5]/CyO	50E6
dMES-4 ^{V5-114}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>dMes-4</i> -V5]/CyO	26B4
dMES-4 ^{FLAG-37}	w ¹¹¹⁸ ; p[RS5,w+ gen. <i>dMes-4</i> -V5-3xFLAG];+;+	3C3
FlyFos ^{2-1-V5-FLAG}	w ¹¹¹⁸ ; p[dsRed,FlyFos026029- <i>Su(var)2-1</i> -V5-3xFLAG]/TM6	68A4[attp2]
FlyFos ^{Δ2-1-V5-FLAG}	w ¹¹¹⁸ ; p[dsRed,FlyFos026029- Δ <i>Su(var)2-1</i> -V5-3xFLAG]/TM6	68A4[attp2]
FlyFos ^{dMes4-V5-FLAG}	w ¹¹¹⁸ ; p[dsRed,FlyFos024854- V5-3xFLAG- <i>dMes-4</i>]/CyO	[attp40]

8 Publikationsliste

Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schafer, C., Phalke, S., Walther, M., Schmidt, A., Jenuwein, T. et al. (2007). Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* 26, 103-15.

Hoffmann, A., Funkner, A., Neumann, P., Juhnke, S., Walther, M., Schierhorn, A., Weininger, U., Balbach, J., Reuter, G. and Stubbs, M. T. (2008). Biophysical characterization of refolded *Drosophila* Spatzle, a cystine knot protein, reveals distinct properties of three isoforms. *J Biol Chem* 283, 32598-609.

Koryakov, D. E., Walther, M., Ebert, A., Lein, S., Zhimulev, I. F. and Reuter, G. (2011). The SUUR protein is involved in binding of SU(VAR)3-9 and methylation of H3K9 and H3K27 in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosome Res* 19, 235-49.

Messina, G., Damia, E., Fanti, L., Atterato, M. T., Celauro, E., Mariotti, F. R., Accardo, M. C., Walther, M., Verni, F., Picchioni, D. et al. (2014). Yeti, an essential *Drosophila melanogaster* gene, encodes a protein required for chromatin organization. *J Cell Sci* 127, 2577-88.

9 Danksagung

Ich möchte allen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, sehr herzlich meinen Dank aussprechen. Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Gunter Reuter, der mir dieses interessante Thema überlassen hat und die Arbeit methodisch sowie durch seine fortwährende Diskussionsfreude maßgeblich begleitete.

Dr. Lennart Suckau und Dr. Thomas Westphal danke ich für die sehr gute genetische Zusammenarbeit zum Start des *Su(var)2-1* Projektes. Dr. Andreas Fischer danke ich für die Unterstützung zur Entwicklung des Methyltransferase-Assays für dMES-4 und die Einführung in die konfokale Mikroskopie. Ich danke Dr. Thomas Rudolph, Dr. Christiane Lindner, Masato Yonezawa, Dr. Stefan Kubicek und Prof. Dr. Thomas Jenuwein für die stete Kooperationsbereitschaft insbesondere beim *Su(var)3-3*-Projekt. Dr. Sandy Mietzsch und Jeannette Keßler danke ich für die Diskussionen zur detaillierten Analyse der Oogenese von *Drosophila*. Dr. Kristin Wächter danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung von IP-Strategien und die Unterstützung bei der Analyse von dMES-4. Ein großer Dank gilt auch Dr. Kathleen Gebhardt und der Max-Planck-Arbeitsgruppe um Dr. Pavel Tomancak, der es mir ermöglichte, in Dresden Rekombinationstechniken zur Erstellung von *FlyFos*-Konstrukten zu erlernen.

Ich danke Dr. Dimitry E. Koryakov für die sehr gute Zusammenarbeit im *SuUR*-Projekt und seine exzellente zytologische Expertise zu polytären Chromosomen.

Dr. Elisabetta Damia danke ich für die erfolgreiche und intensive Zusammenarbeit beim *Yeti*-Projekt, dass ihr neue Perspektiven eröffnet hat. Dr. Juliane Buschmann danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die biochemischen Einblicke in die komplexe Welt der Nukleotidasen. Ramona Abe, Maria Kube, Melanie Klimm und Katrin Kittlaus danke ich für den Erhalt des Fliegenmaterials sowie die Bereitstellung von Sequenzdaten. Dr. Heiko Baisch, Stefanie Beuch, MSc. Xinxin Chen, Dr. Rainer Dorn, Dr. Kristina Irmeler, Dr. Sandro Lein, Dr. Claudia Nickel und Olaf Nickel danke ich für die sehr kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums in Halle und der Geduld während der Anfertigung meiner Dissertation.

10 Eidesstattliche Erklärung

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

Halle, den 18.09.2017

Persönliche Daten

Name, Vorname	Walther, Matthias
Geburtsdatum	25.09.1976
Geburtsort	Schwerin (Mecklenburg-Vorpommern)
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Werdegang

1983 – 1991	Polytechnischen Oberschule „Johann Riesner“ in Weißenborn (Sachsen)
1991 – 1995	„Geschwister Scholl-Gymnasiums“ in Freiberg; Abitur 1995
1995 - 1996	Grundwehrdienst in Rotenburg a.d. Fulda (Hessen)
Okt. 1996 - Apr. 2003	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Apr. 2003	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Betreuer: Prof. Dr. Gunter Reuter
Apr. 2003 – Feb. 2015	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; SFB610 – „Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz“ (Prof. Dr. Gunter Reuter)
Mrz. 2015 – Nov. 2015	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Interdisziplinären Zentrum für Nutzpflanzenforschung (IZN) (Labor Prof. Prof. Dr. Holger Deising / Dr. Gunter Reuter)
Dez. 2015 – Dez. 2016	wissenschaftlicher Mitarbeiter im DFG Projekt „Vergleichende Analyse von <i>Su(var)</i> Chromatinregulatoren bei <i>Drosophila</i> und der Maus“ (Prof. Dr. Gunter Reuter)
seit Jan. 2017	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik (MPI-IE) in Freiburg (Labor Prof. Dr. Thomas Jenuwein)