

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG  
VON HISTON-METHYLTRANSFERASEN  
AUS *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Birgit Czermin  
aus  
Altenerding**

**2004**

**Erklärung:**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. P. Becker betreut. Die Fachvertretung übernahm freundlicherweise Prof. Dr. R. Grosschedl.

**Ehrenwörtliche Versicherung:**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 12.08.2004

Dissertation eingereicht am 19.8.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter B. Becker

2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Grosschedl

Mündliche Prüfung am 22.11.2004

Für meine Eltern  
und Großeltern

*Sokrates, der alte Greis,  
Sagte oft in tiefen Sorgen:  
„Ach, wieviel ist doch verborgen,  
Was man immer noch nicht weiß.“*

*Wilhelm Busch*

---

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden bereits teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Czermin B, Schotta G, Hülsmann B, Brehm A, Becker PB, Reuter G and Imhof A:  
**Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila**  
*EMBO Reports*, Vol 2, No 10, October 2001

Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A and Pirrotta V:  
**Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites**  
*Cell*, Vol 111, 185-196, October 2002

Eskeland R\*, Czermin B\*, Böke J, Bonaldi T, Regula JT, and Imhof A:  
**The N-terminus of Drosophila SU(VAR)3-9 mediates its dimerisation and regulates its methyltransferase activity**  
*Biochemistry*, Vol. 43 (12), 3740 – 3749, March 2004  
\*Co-Erstautoren

Die Publikationen befinden sich im Anhang.



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>CHROMATIN</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>DIE VERPACKUNG DER DNA</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>HISTONE</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>HETEROCHROMATIN</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>DIE MODIFIKATIONEN DER HISTONE</b>	<b>28</b>
2.5.1	ACETYLIERUNG	28
2.5.2	HISTONDEACETYLASEN	29
2.5.3	PHOSPHORYLIERUNG	30
2.5.4	ADP-RIBOSYLIERUNG	30
2.5.5	UBIQUITINYLIERUNG	31
2.5.6	ANDERE MODIFIKATIONEN	32
<b>2.6</b>	<b>METHYLIERUNG</b>	<b>32</b>
2.6.1	DIE STABILITÄT DER METHYLIERUNG	34
2.6.2	ÜBERBLICK ÜBER HISTON-METHYLTRANSFERASEN	35
2.6.3	DIE SET-DOMÄNE	35
2.6.4	ARGININ-METHYLTRANSFERASEN	37
<b>2.7</b>	<b>BEDEUTUNG DER HISTON-LYSINMETHYLIERUNG</b>	<b>38</b>
2.7.1	REPRESSION DURCH HISTONMETHYLIERUNG	38
2.7.2	AKTIVIERUNG DURCH HISTONMETHYLIERUNG	39
2.7.3	METHYL-PHOSPHO-SWITCH-HYPOTHESE	40
2.7.4	EIN HISTON-CODE?	41
<b>2.8</b>	<b>POSITION EFFECT VARIEGATION</b>	<b>41</b>
<b>2.9</b>	<b>SU(VAR)3-9 UND HP1</b>	<b>44</b>
<b>2.10</b>	<b>DIE FRÜHE ENTWICKLUNG VON <i>DROSOPHILA</i></b>	<b>48</b>
2.10.1	DER BEGINN DER ENTWICKLUNG	48
2.10.2	DIE FESTLEGUNG VON ACHSEN UND SEGMENTEN	49
2.10.3	DIE HOMÖOTISCHEN GENE	51
<b>2.11</b>	<b>PCG PROTEINE</b>	<b>54</b>
<b>2.12</b>	<b>DIE EINZELNEN PROTEINE DES 600 kDA-E(Z)/ESC-KOMPLEXES</b>	<b>56</b>

2.12.1	E(Z)	56
2.12.2	ESC	62
2.12.3	P55	65
2.12.4	SU(Z) 12	66
2.12.5	RPD3	66
<b>2.13</b>	<b>POLYCOMB</b>	<b>67</b>
<b>2.14</b>	<b>INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEN EZ/ESC PROTEINEN</b>	<b>68</b>
<b>2.15</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>69</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>70</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>70</b>
3.1.1	VERBRAUCHSMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	70
3.1.2	VEKTOREN UND KONSTRUKTE	71
3.1.3	OLIGONUKLEOTIDE	72
3.1.4	BAKTERIENSTÄMME	73
3.1.5	ZELLINIEN	73
3.1.6	ANTIKÖRPER	73
3.1.7	ENZYME UND KITS	74
3.1.8	GERÄTE	74
<b>3.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>75</b>
3.2.1	GRUNDLEGENDE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	75
3.2.2	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA UND PROTEINEN	80
3.2.3	MUTAGENESE VON BESTEHENDEN PLASMIDEN	81
3.2.4	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	82
3.2.5	PROTEINFÄRBE-METHODEN	83
3.2.6	WESTERN BLOT	84
3.2.7	FLIEGENHALTUNG	86
3.2.8	HERSTELLUNG VON <i>DROSOPHILA</i> EMBRYO-EXTRAKT ("TRAX")	88
3.2.9	IMMUNPRÄZIPITATION VON MYC-SU(VAR)3-9 AUS MYC-TRAX	90
3.2.10	KULTUR VON <i>DROSOPHILA</i> /SF9-ZELLEN	91
3.2.11	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON <i>DROSOPHILA</i> ZELLEN	92
3.2.12	STABILE TRANSFEKTION VON <i>DROSOPHILA</i> ZELLEN	92
3.2.13	VIRENPRODUKTION IM BACULO-SYSTEM	93
3.2.14	EXTRAKT AUS BACULO-INFIZIERTEN BZW. AUS <i>DROSOPHILA</i> -ZELLEN	99
3.2.15	AFFINITÄTSREINIGUNG DER E(Z)-KOMPLEX-KOMPONENTEN	99
3.2.16	IN VITRO TRANSLATION FÜR INTERAKTIONSTUDIEN	100

3.2.17	BINDUNGSSTUDIEN MIT DEN E(Z) KOMPLEX-PROTEINEN	101
3.2.18	BL21 EXPRESSION VON PROTEINEN MIT HIS/INTEIN TAG	102
3.2.19	EXPRESSION VON GST-POLYCOMB UND BINDUNG AN GST-BEADS	104
3.2.20	MARKIERUNG VON H3 UND DESSEN BINDUNG AN POLYCOMB	105
3.2.21	MARKIERUNG VON PEPTIDEN UND DEREN BINDUNG AN POLYCOMB	105
3.2.22	BINDUNG VON SU(VAR)3-9 AN PEPTIDE	106
3.2.23	HISTONEXPRESSION UND REINIGUNG	107
3.2.24	OKTAMER-REKONSTITUTION	109
3.2.25	RADIOAKTIVE PCR FÜR DAS 146- BZW. 248 BP-FRAGMENT	110
3.2.26	HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN MONONUKLEOSOMEN (SALZDIALYSE)	113
3.2.27	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON SSDNA	114
3.2.28	ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA) MIT SSDNA	115
3.2.29	HDAC ASSAY	115
3.2.30	HIM ASSAY	116
3.2.31	LUCIFERASE ASSAY	116
3.2.32	REINIGUNG VON UNGETAGTEM HP1	117
3.2.33	BINDUNG VON DNA AN DYNABEADS	120

## **4 ERGEBNISSE** **122**

---

<b>4.1</b>	<b>ASSOZIATION VON HDAC1 MIT SU(VAR)3-9 IN DROSOPHILA</b>	<b>122</b>
4.1.1	AUFREINIGUNG VON MYC-SUV39 AUS DROSOPHILA EXTRAKTEN	122
4.1.2	SU(VAR)3-9 KANN H3- K9AC METHYLIEREN	123
4.1.3	SU(VAR)3-9 IST MIT DER DEACETYLASE HDAC1 ASSOZIERT	125
4.1.4	HDAC1 IST MIT METHYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT ASSOZIERT	127
<b>4.2</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN AN REKOMBINANTEM SU(VAR)3-9</b>	<b>128</b>
4.2.1	KLONIERUNG VON WT SU(VAR)3-9 UND DELETIONSMUTANTEN	128
4.2.2	OPTIMIERUNG DER AUFREINIGUNG VON SU(VAR)3-9	130
4.2.3	TEST VON LAGERBEDINGUNGEN	132
4.2.4	SU(VAR)3-9 LIEGT ALS DIMER VOR	134
4.2.5	SU(VAR)3-9 BINDET AN K9-METHYLIERTES PEPTID	135
4.2.6	SU(VAR)3-9 BINDET NICHT AN SSDNA	138
<b>4.3</b>	<b>HERSTELLUNG EINER STABILEN HA-SU(VAR)3-9 ZELLINIE</b>	<b>140</b>
4.3.1	DIE STABILEN ZELLEN LASSEN SICH DURCH CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> INDUZIEREN	140
4.3.2	EXPRESSION VON HA-SU(VAR)3-9 IM ZEITABLAUF	141
4.3.3	HA-SU(VAR)3-9 ZEIGT GERINGE AKTIVITÄT	142
<b>4.4</b>	<b>DER E(Z)/ESC-KOMPLEX BESITZT METHYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT</b>	<b>144</b>

4.4.1	AUFREINIGUNG EINES E(Z)-ESC-KOMPLEXES AUS <i>DROSOPHILA</i> EMBRYOS	144
4.4.2	REKONSTITUTION EINES REKOMBINANTEN E(Z)-KOMPLEXES	147
4.4.3	E(Z) METHYLIERT LYSIN 9 AUS DEM H3-TAIL	148
4.4.4	E(Z) METHYLIERT AUCH LYSIN 27 AUS DEM H3-TAIL	151
4.4.5	LYSIN 27 IST <i>IN VIVO</i> METHYLIERT	154
4.4.6	POLYCOMB BINDET BEVORZUGT AN METHYLIERTES H3-K27	156
<b>4.5</b>	<b>HERSTELLUNG DES E(Z)-KOMPLEXES IM BACULOSYSTEM</b>	<b>159</b>
4.5.1	HERSTELLUNG VON BACULO-VIREN	159
4.5.2	REINIGUNG DES E(Z)-KOMPLEXES AUS BACULO	163
4.5.3	AKTIVITÄT DES BACULO-EXPRIMIERTEN E(Z)	165
4.5.4	UNTERSUCHUNG DER AFFINITÄT VON E(Z)	167
4.5.5	INTERAKTIONSSSTUDIEN	172
4.5.6	LUCIFERASE-ASSAY	180
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>185</b>
<b>5.1</b>	<b>SU(VAR)3-9</b>	<b>185</b>
5.1.1	GERINGE AKTIVITÄT DES ENZYMS AUS EINER STABILEN ZELLINIE	185
5.1.2	DI- UND TRIMETHYLIERUNG	185
5.1.3	INTERAKTIONEN VON SU(VAR)3-9	186
5.1.4	MODELL DES HETEROCHROMATIN- <i>SPREADING</i>	188
<b>5.2</b>	<b>E(Z)</b>	<b>190</b>
5.2.1	DAS SUBSTRAT DER METHYLIERUNGSREAKTION: K9 UND K27?	190
5.2.2	ZUSAMMENSETZUNG DES KOMPLEXES	193
5.2.3	BINDUNG VON POLYCOMB AN METHYLIERTES H3- K27	193
5.2.4	MINIMALER PROTEINKOMPLEX, DER FÜR EINE METHYLIERUNG NOTWENDIG IST	195
5.2.5	PROBLEME DES BACULOSYSTEMS	196
5.2.6	INTERAKTIONEN DER EINZELNEN PROTEINE AUS DEM E(Z)/ESC-KOMPLEX	197
5.2.7	LUCIFERASE-ASSAY	199
5.2.8	E(Z) UND REPRESSION	200
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>203</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>206</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>228</b>

Inhaltsverzeichnis	9
--------------------	---

---

<b>9 LEBENSLAUF</b>	<b>230</b>
---------------------	------------

<b>10 ANHANG</b>	<b>231</b>
------------------	------------

# 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	Anti-
AK	<b>Antikörper</b>
APS	<b>Ammoniumperoxodisulfat</b>
AS, AA	<b>Aminosäure, Amino acid</b>
ATP	<b>Adenosyltriphosphat</b>
bp	<b>Basenpaare</b>
BPB	<b>Bromphenolblau</b>
BSA	<b>Bovine Serum Albumine</b> <i>Rinderserumalbumin</i>
Ci	<b>Curie</b>
cpm	<b>Counts per minute</b> <i>Zerfälle pro Minute</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
CV	<b>Column Volume</b> <i>Säulenvolumen</i>
d (vor Proteinname)	<b>Drosophila-</b>
Da	<b>Dalton</b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DNA	<b>Desoxyribonucleicacid</b> <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ds	<b>Double strand</b> <i>Doppelstrang</i>
DTT	<b>Dithiothreitol</b>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	<b>Ethylendiamintetraacetat</b>
EMSA	<b>Electrophoretic mobility shift assay</b>
FCS	<b>Fetal calf serum</b> <i>Fötales Kälberserum</i>
H3-K9	Lysin <b>9</b> im Histon <b>H3</b>
HAT	<b>Histon-Acetyltransferase</b>
HDAC	<b>Histon-Deacetylase</b>
HIM, HMT	<b>Histon-Methyltransferase</b>
IgG	<b>Immunglobulin G</b>
IP	<b>Immunpräzipitation</b>
IVT	<b>In vitro Translation</b>
kbp	<b>Kilobasenpaare</b>
mRNA	<b>messenger-Ribonucleicacid</b> <i>Boten-Ribonukleinsäure</i>
NP-40	<b>Nonidet P-40</b>
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
PAGE	<b>Polyacrylamidgelelektrophorese</b>
PBS	<b>Phosphate Buffered Saline</b> <i>Phosphat gepufferte Kochsalzlösung</i>

PCR	<b>Polymerase Chain Reaction</b> <i>Polymerasekettenreaktion</i>
PVDF	<b>Poly(vinylidene difluoride)</b>
RNA	<b>Ribonucleicacid</b> <i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	<b>Revolutions per minute</b> Umdrehungen pro Minute
RT	<b>Raumtemperatur</b>
SAM	<b>S-Adenosyl-L-Methionin</b>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	<b>Single strand</b> <i>Einzelstrang</i>
TEMED	<b>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin</b>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	<b>Trichostatin A</b>
wt	<b>Wild Typ</b> Form eines Proteins
XC	<b>Xylencyanol</b>

Abkürzungen für Aminosäuren:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 CHROMATIN

Chromatin wurde um 1880 von W. Flemming benannt, der es unter dem Lichtmikroskop als leicht anfärbbare Bereiche im Zellkern beobachtete und in Anlehnung an das griechische Wort „chroma“ (Farbe) bezeichnete. Er wählte dieses Wort als vorläufige Bezeichnung für eine Substanz, deren chemische Zusammensetzung und Funktion unbekannt war.

Kurz darauf, 1884, wurden die Histone entdeckt (Kossel, 1911), kleine basische Proteine, die sich im Zellkern befinden. Erst Jahrzehnte später wurde die DNA als Träger der Erbinformation bestimmt (Avery, 1944).

Durch Färbung mit Chromosomenfarbstoffen, z.B. mit Karminessigsäure, lassen sich einzelne Chromosomenabschnitte deutlicher als andere färben. Auf Vorschlag von E. Heitz (Heitz, 1928) ist zwischen Hetero- und Euchromatin zu unterscheiden. Mit Heterochromatin bezeichnete er die intensiv angefärbten Bereiche, die nach der Zellteilung nicht dekondensieren, mit Euchromatin diejenigen Bereiche des Chromatins, die nach einer Zellteilung wieder dekondensieren. Er stellte eine Hypothese auf, nach der das Euchromatin Gen-reich und aktiv sei, Heterochromatin arm an Genen und inaktiv (Heitz, 1934). Diese Definitionen von Heterochromatin und Euchromatin ähneln den heutigen Ansichten (siehe Kapitel 2.4).

Durch die Forschung der letzten Jahrzehnte stellte sich heraus, dass *eine* Aufgabe des Chromatins, welches aus der DNA und den Histonen besteht, die Kompaktierung des langen Moleküls DNA ist. Außerdem spielt es eine Rolle in der Regulierung zellulärer Funktionen wie Genexpression und Chromosomenstabilität.

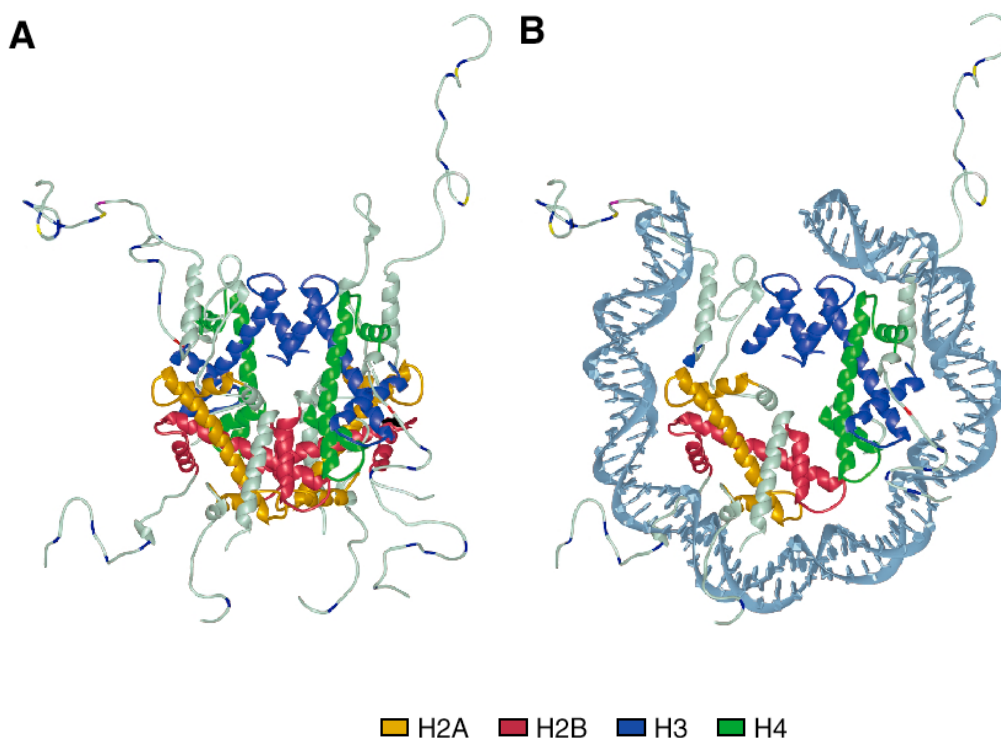
### 2.2 DIE VERPACKUNG DER DNA

Die Länge der DNA beträgt in menschlichen Zellen ca. 2 m und besteht aus  $2,75 \times 10^9$  Basenpaaren. Der Durchmesser einer Zelle ist aber um den Faktor  $10^7$  kleiner. Die DNA muss folglich um ein Vielfaches kompaktiert werden. In Bakterien wird diese Verpackung durch Superspiralisierung und Ausbildung von DNA-Schleifen erreicht, während in Eukaryoten die DNA in Chromatin verpackt wird (Vaquero et al., 2003).



Eine erste Kompaktierung wird in Eukaryoten durch den Zusammenbau von Nukleosomen erreicht. Ein Nukleosom besteht aus 147 Basen DNA, welche 1,75mal um ein Histonoktamer gewunden sind. Das Histonoktamer wiederum setzt sich zusammen aus acht Histonen: je zwei Histone H3 und H4 bilden ein Tetramer, dessen Form man sich wie eine „Thunfischdose“ vorstellen kann. Auf jeder Seite des Tetramers ist ein Heterodimer aus H2A und H2B angelagert (Karantza et al., 1996). Ein Nukleosom besitzt einen Durchmesser von 6,6 nm und eine Höhe von 5,6 nm.

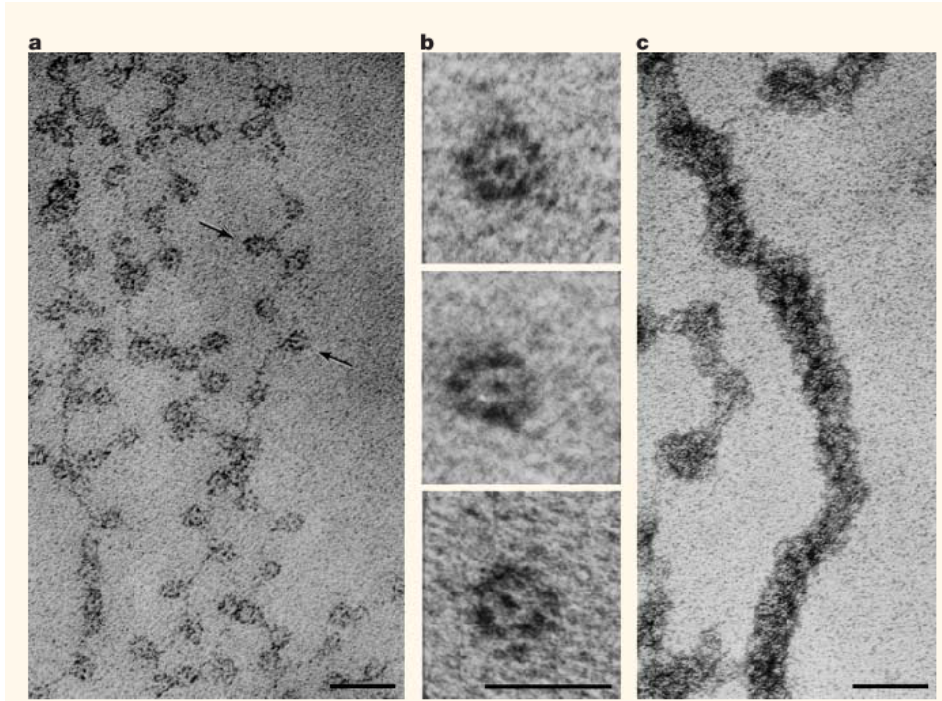
1997 gelang es, die Kristallstruktur der Nukleosoms mit Hilfe von Röntgenstrahlen bei 2,8Å zu ermitteln (Luger et al., 1997).



**Abb. 1: Struktur des Nukleosoms (Luger et al., 1997). A: Oktamer, bestehend aus den acht Histonen. B: Darstellung des Nukleosoms. Gezeigt sind nur 73 bp der DNA sowie die mit der DNA assoziierten Histone, also nur jeweils eines der vier Histone.**

Stellt man sich nun vor, dass die DNA nacheinander um viele solcher Oktamere gewunden wird, entsteht ein Gebilde, welches einer Perlenkette (englisch *beads on a string*) ähnelt. Diese Struktur, die unter Niedrigsalzbedingungen (1 mM Salz) einen Durchmesser von ca. 10 nm hat, kann man auch im Elektronenmikroskop sehen. Sie existiert in dieser Form wahrscheinlich nicht *in vivo*. Im Jahre 1973 gelang eine solche Aufnahme erstmals. Abb. 2(b) zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von einzelnen Nukleosomen, Abb. 2(a)

die Perlenkettenstruktur, die sich bei Niedrigsalz ausbildet. Erhöht man die Salzkonzentration *in vitro* auf über 100 mM, dann bildet sich eine kompaktere Struktur mit einem Durchmesser von 30 nm aus (siehe Abb. 2c).



**Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Chromatins (Olins and Olins, 2003).** (a) Perlenketten-Struktur unter Niedrigsalzbedingungen. Größenmarker: 30 nm. (b) Isolierte Mononukleosomen aus Chromatin (nach Nukleasebehandlung). Größenmarker: 10 nm. (c) Chromatin bei mittlerer Ionenstärke. Die 30 nm-Struktur bildet sich aus. Größenmarker: 50 nm.

Die Nukleosomen bewirken eine Kompaktierung der DNA um den Faktor 7. Im Nukleosom interagiert DNA mit den basischen Histonen. Folgende Wechselwirkungen wurden gefunden: Amidstickstoff-Atome aus der Aminosäuren-Hauptkette der Histone bilden Wasserstoffbrücken zu Phosphatgruppen der DNA, Argininseitenketten interagieren mit der kleinen Furche der DNA. Histone wechselwirken auch über nichtpolare Kontakte mit der Desoxyribose, und oft finden sich Wasserstoffbrücken sowie ionische Wechselwirkungen zwischen Sauerstoffatomen aus den DNA-Phosphatgruppen und basischen sowie Hydroxyl-Seitenketten der Aminosäuren. Außerdem wurde eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen einer Leucin-Seitenkette und einem Thymin gefunden (Luger et al., 1997).

Die DNA liegt innerhalb des Nukleosoms stark gebogen und in der B-Form vor (Richmond and Davey, 2003). Neuere Untersuchungen zeigten, dass das Nukleosom von ca. 3000 Wassermolekülen umgeben ist. Von diesen bilden 121 Wassermoleküle

Wasserstoffbrücken zu DNA und Histonen gleichzeitig aus. Weitere hunderte von Wassermoleküle bilden indirekte Brücken zwischen der DNA und den Histonen und tragen so zur Stabilität des Nukleosoms bei (Davey et al., 2002).

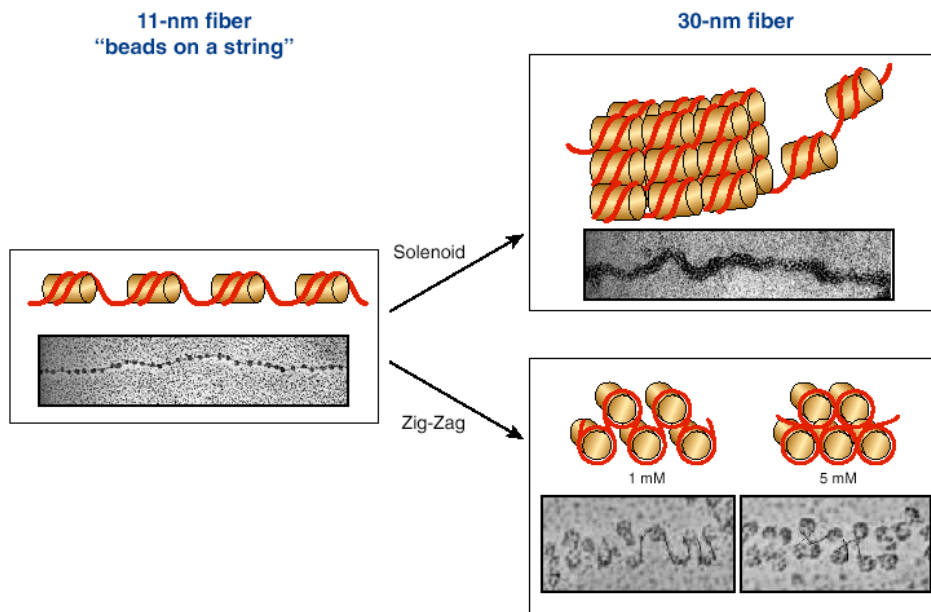
Zwischen den einzelnen Nukleosomen liegt „freie“ DNA, genannt Linker-DNA, deren Länge ca. 10 - 90 Basenpaare beträgt. Zur weiteren Kompaktierung wird *in vivo* das Linker-Histon H1 bzw. H5 eingebaut, welches mit der Linker-DNA wechselwirkt, jedoch kein Bestandteil des Nukleosoms ist. Komplexe aus H1 und Nukleosomen, die insgesamt von 168 Basenpaaren umgeben sind, nennt man „Chromatosomen“ (van Holde, 1988). Durch den Einbau des Linkerhistons wird eine weitere Kompaktierung um den Faktor 6 sowie eine Stabilisierung erreicht. Die entstehende Struktur wird auch 30 nm-Faser genannt. Ist H1 oder H5 präsent, bildet sich keine Perlenkettenstruktur aus (Oudet et al., 1975).

H1 ist größer als die anderen Histone und in der Evolution weniger konserviert. Es bindet an die Linker-DNA an der Symmetrieachse des Nukleosoms, also zwischen der ins Nukleosom ein- und austretenden DNA, ohne die Histone zu berühren (Zhou et al., 1998). H1 besitzt zwei Schwänze (N- und C-Terminus) und einen globulären Teil. Besonders durch seine positiven Ladungen im langen C-Terminus kann es mit der Linker-DNA interagieren, die negativ geladenen DNA-Stränge näher zueinander führen und dadurch eine Kompaktierung und Stabilisierung erreichen.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus bei der Bildung der 30 nm-Faser involviert die N-Termini der Kernhistone (siehe auch Kapitel 2.3). Man nimmt an, dass die N-Termini, im folgenden auch *tails* genannt, die einzelnen Nukleosomen aneinander ketten können, indem sie die Ladung der DNA neutralisieren (Hansen, 2002) und auf diese Weise zusammen mit H1 zur Bildung der 30 nm-Faser beitragen. Die Histone H2A und H2B, welche stabil assoziieren können, bilden ein Dimer, das am oberen und unteren Ende des Tetramers aus H3 und H4 angelagert ist. An ihrer „Ober“- sowie „Unterseite“ gibt es stark saure Bereiche, die eventuell mit einigen *tails* interagieren können (Luger and Richmond, 1998).

Es existieren zwei verschiedene Modelle für die Struktur der 30 nm-Faser. (1) Man könnte sich vorstellen, dass die Nukleosomen sich in einer gewundenen Anordnung befinden, welche sechs Nukleosomen pro DNA-Windung enthält (Finch and Klug, 1976; Thoma et al., 1979; Widom and Klug, 1985). Diese spiralige Anordnung wird auch als Solenoid bezeichnet und ist in Abb. 3 rechts oben zu sehen. (2) Es könnte aber auch sein, dass die Nukleosomen eine Zick-Zack-Struktur annehmen (Bednar et al., 1998; Horowitz et al.,

1994; Leuba et al., 1994; Woodcock et al., 1993), welche je nach Salzbedingungen unterschiedlich dicht ist (siehe Abb. 3 rechts unten). Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen favorisieren das Zick-Zack-Modell (Bednar et al., 1998). Als man einen Nukleosomenstrang dehnte und die Anziehungskräfte mit Laser maß, bildete sich eine Zick-Zack-Struktur aus (Cui and Bustamante, 2000).

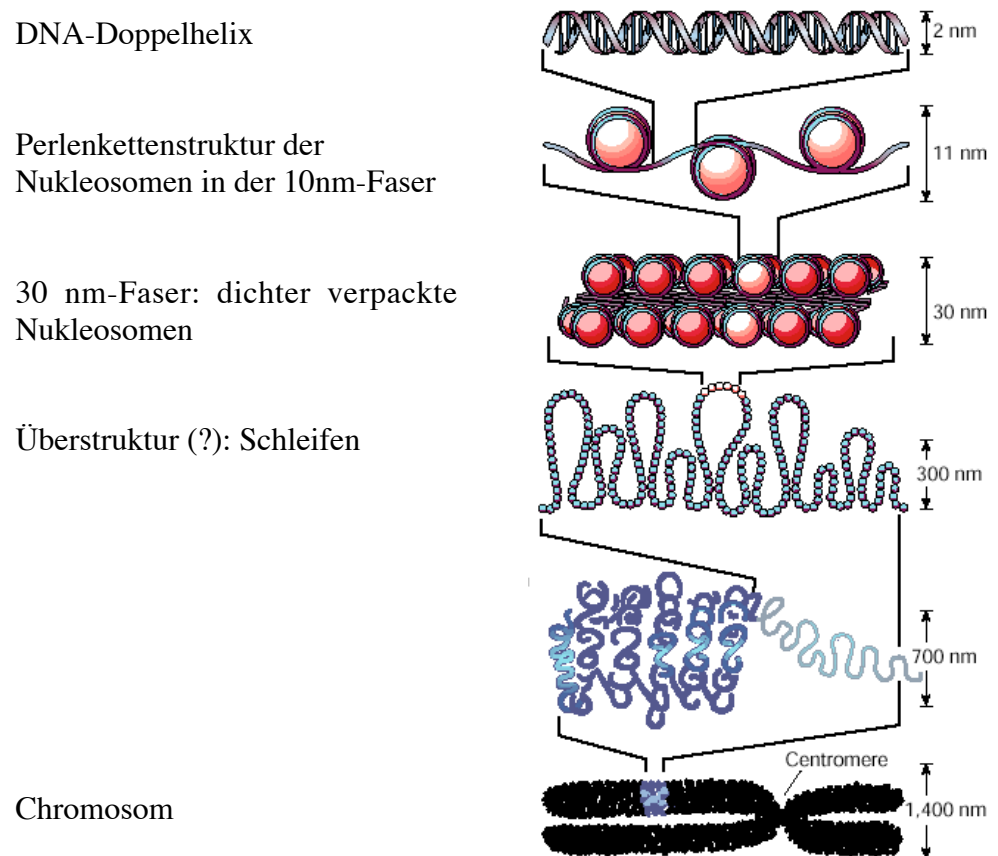


**Abb. 3: Modelle für die 30 nm-Faser (Vaquero et al., 2003).** Die 10 nm-Faser (links) könnte nach weiterer Kondensierung zur 30 nm-Faser in einer Solenoid-Form (oben) oder in einer Zick-Zack-Form (unten) vorliegen.

Kürzlich erhielt aber das Solenoid-Modell Bestätigung durch *in vivo*-Daten: Um die Chromatinstruktur *in vivo* zu untersuchen, wurde aus einer Zelllinie isoliertes, kondensiertes, homogenes Chromatin mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht (Ghirlando et al., 2004). Dabei fand man durch Messung von physikalischen Größen wie Sedimentationskoeffizient und Dichte die Solenoid-Struktur bestätigt. Das untersuchte 15,5 kbp lange DNA-Stück hatte eine stabförmige Struktur angenommen, mit einer Länge von ca. 170 nm und einem Durchmesser von ca. 40 nm. Vor allem der Durchmesser stimmt mit den theoretisch postulierten Abmessungen des Solenoid-Modells überein.

Über die weitere Kompaktierung und die sich daraus ergebenden übergeordneten Strukturen ist wenig bekannt. Es wird angenommen, dass sich die 30 nm-Faser weiter zusammenlagert, bis schließlich nach mehreren Stufen der Kondensierung die Chromosomen vorliegen. Histon H1 könnte durch seine Fähigkeit zur Selbst-Assoziierung über die globuläre Domäne (Carter and van Holde, 1998) Interaktionen zwischen

verschiedenen Fasern vermitteln. Speziell in der Mitose liegen die Chromosomen besonders dicht gepackt vor und formen wegen dem doppelten Chromosomensatz ein typisches „X“. Einen Überblick über die Verpackungsstufen gibt Abb. 4.



**Abb. 4: Verpackungsstufen der DNA (aus Felsenfeld and Groudine, 2003).**

Die Überstruktur könnte Chromosomen-Schleifen beinhalten (siehe Abb. 4). Innerhalb des Kerns wurde vor 30 Jahren ein Netz von proteinreichen Fibrillen entdeckt und „nukleare Matrix“ benannt (Berezney and Coffey, 1974). Dieses Netzwerk interagiert wahrscheinlich mit Elementen des Zytoskeletts im Cytoplasma (Wan et al., 1999). Die nukleare Matrix besteht v.a. aus einem Protein-Netzwerk, aber auch aus AT-reichen DNA-Sequenzen. Man erhält die nukleare Matrix, indem man Zellkerne mit DNaseI oder Restriktionsenzymen behandelt und den an der Kernmembran haftenden Rückstand isoliert. Die DNA-Fragmente, die man hierdurch erhält, werden „MARS“ genannt (*matrix attachment regions*) (Allen et al., 2000), oder auch „SARs“ (*scaffold attachment regions*).

Verdau von Chromatin mit DNaseI, einem Enzym, welches doppelsträngige DNA schneiden kann, gibt einen Aufschluß darüber, wie gut zugänglich die DNA innerhalb des

Chromatins ist (Weintraub and Groudine, 1976). Unterschiede in der DNaseI-Sensitivität sind wahrscheinlich auf die Kompaktierung der 30 nm-Faser zurückzuführen (van Holde and Zlatanova, 1995). Für DNaseI gut zugängliche Bereiche des Chromatins sind, so nimmt man an, auch für Transkriptionsfaktoren besser zugänglich. MARs treten oft an den Enden von DNaseI-zugänglichen Stellen auf (Bode and Maass, 1988). Dies ist konsistent mit dem „Schleifen-Domänen-Modell“, bei dem man davon ausgeht, dass die Chromatinstränge in einer Serie von Schleifen organisiert sind, deren untere Enden mit der nuklearen Matrix assoziiert sind (siehe Abb. 4, „Überstruktur“).

Schleifen wurden auch im Elektronenmikroskop entdeckt, als man Mitose-Chromosomen ohne Histone untersuchte (Paulson and Laemmli, 1977). In *Drosophila* können die Chromatin-Schleifen 4,5 bis Hunderte von kbp lang sein (Gasser and Laemmli, 1986). Man glaubt, dass die Schleifen topologisch unabhängig sind (Marsden and Laemmli, 1979), und dass z.B. Enhancer-Elemente, die sich auf einer Schleife befinden, nicht mehr mit dem zugehörigen Promotor auf einer anderen Schleife wechselwirken können. Enhancer sind DNA-Elemente, die die von Promotoren ausgehende Transkription über weite Strecken stimulieren können (Dillon and Grosveld, 1994).

MARs können benachbarte Enhancer in ihrer Aktivität steigern (Forrester et al., 1994) oder als „Grenzelemente“ (*boundary elements* oder *insulators*) wirken und auf diese Weise Gene vor Positionseffekten bewahren (Positioneffekte siehe Kapitel 2.8) (Jenuwein et al., 1997).

Damit *boundary*-Elemente wirken können, ist die Bindung von Proteinen an die DNA-Sequenzen nötig. Ein bekanntes Protein in *Drosophila*, welches an ein *boundary element*, das *gypsy* Retrotransposon, bindet und dessen DNA-Bindungsdomäne aus zwölf Zink-Fingern besteht, ist Su(Hw) (Gerasimova et al., 2000). Zink-Finger-Proteine binden meist an DNA in einer sequenzspezifischen Weise (Jantz et al., 2004).

Es gibt zwei Modelle, die die Wirkung der *boundary*- bzw. *insulator*-Elemente zu beschreiben versuchen. Klassischerweise geht man davon aus, dass ein *insulator* wie eine „Wand“ funktioniert, vor der das sich ausbreitende Heterochromatin anhält. Das erste, „aktive“ Modell geht davon aus, dass der *insulator* als Bindungs- oder Eintrittsstelle für Enzyme fungiert, die entweder Chromatin kovalent modifizieren, oder die Nukleosomen bzw. die DNA-Topologie verändern (Fourel et al., 2004). Es wurde z.B. gefunden, dass starke Histonacetylierung als natürlicher *insulator* wirkt (Litt et al., 2001b; Mutskov et al., 2002). Dieser aktive Prozess kann dann die Ausbreitung von Heterochromatin verhindern oder die Wirkungsweisen von Enhancern einschränken.

Das zweite, passive Modell schlägt vor, dass ein großer DNA-gebundener Proteinkomplex eine physikalische Barriere gegen das Heterochromatin darstellt (Fourel et al., 2004). Alternativ könnten sich auch *boundary*-Elemente zu einer subnuklearen Struktur zusammenfinden oder an eine nukleare Struktur wie die Matrix binden, und dadurch die Ausbreitung von Heterochromatin behindern (Gerasimova et al., 2000; Ishii and Laemmli, 2003).

Da in diesem Abschnitt viel von Heterochromatin die Rede war, soll dieser Begriff nach einer kurzen Beschreibung der Histone im Abschnitt 2.4 erläutert werden.

### 2.3 HISTONE

Das Oktamer besteht aus Histonen. Histone sind kleine, stark basische Proteine, welche aus einer globulären Domäne und einer N-terminalen Elongation, genannt *tail*, bestehen. Über die globulären Domänen interagieren die Histone untereinander. Die *tails* sind ca. 15 bis 30 Aminosäuren lang und machen nur 25% der Gesamtmasse der Histone aus. Die Konformation der *tails* ist nicht genau bekannt: In den Kristallstrukturen erscheinen sie ungeordnet, ebenso in Lösung (Smith and Rill, 1989). Es könnte auch sein, dass sie mit der Linker-DNA interagieren (Angelov et al., 2001). Einige Gruppen finden eine  $\alpha$ -helikale Konformation in Lösung (Baneres et al., 1997; Hansen et al., 1998). Die *tails* sind hochkonserviert von der Hefe bis zu den Säugetieren. Dies deutet darauf hin, dass ihnen eine wichtige Rolle zukommt. Deletiert man die *tails* von H3 und H4 in Hefe, ist das letal (Ling et al., 1996). Vertauscht man die *tails* oder deletiert man nur einen *tail*, so hat dies einen weniger dramatischen Effekt: Sie scheinen zu einem Teil redundant zu sein. *In vitro* jedoch kann man auch Nukleosomen mit Histonen zusammenbauen, welche überhaupt keine *tails* mehr haben.

Die *tails* der Histone sind relativ gut zugänglich, da sie aus dem Nukleosom „herausragen“ (Luger et al., 1997) und somit für Protein-Protein-Interaktionen zur Verfügung stehen. Sie können sowohl mit sich selbst als auch mit anderen Proteinen als auch mit DNA (Dimitrov and Moss, 1994) wechselwirken.

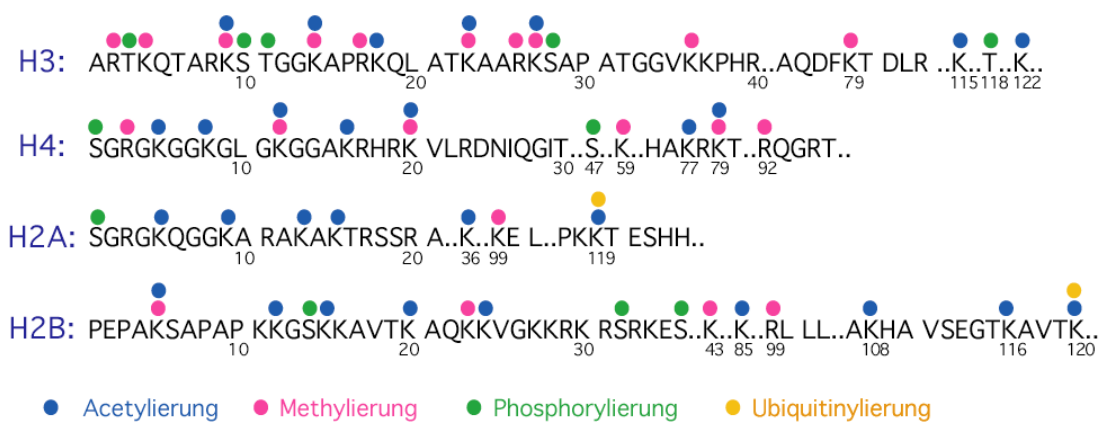
Das Oktamer ist *in vitro* nur unter hohen Salzkonzentrationen (mehr als 1 M) stabil. Bei mittleren Salzkonzentrationen bilden sich H3/H4-Tetramere und H2A/H2B-Dimere aus (Eickbush and Moudrianakis, 1978). *In vivo* fand man, dass ein ständiger Austausch der einzelnen Histone stattfindet. Mit Hilfe von GFP-markierten Histonen wurde ermittelt,



dass ca. 50% des gesamten H2B durch passive Mechanismen ausgetauscht werden. Bei H3 und H4 liegt dieser Anteil nur bei 20% (Kimura and Cook, 2001).

Chromatin kann durch zwei verschiedene Gruppen von Proteinen verändert werden: Zum einen die sogenannten „Remodelling-Maschinen“, welche die Chromatinstruktur unter ATP-Hydrolyse verändern können, zum anderen die Histon-modifizierenden Enzyme, die unterschiedliche kovalente Modifikationen an die Histon-*tails* anbringen können (Näheres zu den Modifikationen in Kapitel 2.5 und 2.6).

Die am besten untersuchte Modifikation stellt wohl die Acetylierung dar. Daneben gibt es auch noch Phosphorylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung, Ubiquitinylierung sowie Biotinylierung. In Abb. 5 sind die wichtigsten Modifikationen zusammengefasst. In letzter Zeit sind nicht nur neue Modifikationen innerhalb der N-terminalen *tails* gefunden worden, sondern auch in den globulären Domänen. Wie in der folgenden Abbildung leicht zu erkennen ist, können viele Lysine entweder methyliert *oder* acetyliert werden. Der „Bedeutung“ der Histonmodifikationen ist das Kapitel 2.7 gewidmet.



**Abb. 5: Modifikationen der Histon-*tails*.** Verändert nach [www.abcam.com](http://www.abcam.com).

Synthese und Zusammenbau von neuen Nukleosomen findet v.a. in der S-Phase statt, also dann, wenn auch die DNA repliziert wird (Osley, 1991). H3 und H4, die während der Replikation in die Nukleosomen eingebaut werden, weisen ein spezielles Acetylierungsmuster auf, das typisch für neusynthetisierte Histone ist: Lysin 5 und Lysin 12 im H4 sind durch die Histonacetyltransferase HAT1 acetyliert (Chang et al., 1997). Nach der Synthese werden die Histone zunächst in den Nucleus transportiert und acetyliert. Alsdann bringen Histonchaperone die Histone zur DNA: Zunächst, in einem langsamen



Schritt, wird H3 und H4 auf die DNA geladen. Neuere Publikationen behaupten, dass dies nicht als Tetramer (Krude and Keller, 2001; Smith and Stillman, 1989), sondern als Dimer geschieht (Tagami et al., 2004). Dies ist allerdings noch umstritten. Das Protein CAF1 (*chromatin assembly factor 1*) katalysiert diesen Schritt. Alternativ kann auch RCAF (*replication coupled assembly factor*) (Tyler et al., 1999) als Chaperon eingesetzt werden. Anschließend, in einer schnelleren Reaktion, wird H2A und H2B hinzugefügt und die DNA vollständig um das Oktamer geschlungen. Diese Reaktion kann durch Nap1 (*nucleosome assembly protein 1*) erleichtert werden (Chang et al., 1997; Ishimi et al., 1984). Die Chaperone müssen dabei mit Proteinkomplexen zusammenarbeiten, die für einen regelmäßigen Abstand zwischen den Nucleosomen sorgen, indem sie die Nucleosomen mobilisieren. Solche Komplexe, die wiederum hochkonserviert zwischen den einzelnen Spezies sind, benutzen ATP als Energiequelle, und haben meist ISWI als Untereinheit (Langst and Becker, 2001).

Außerdem findet Nucleosomen-*assembly* außerhalb der S-Phase an Stellen statt, an denen die DNA repariert wird bzw. transkribiert wird (Martini et al., 1998). In Prozessen, die vollständig ohne DNA-Synthese ablaufen, wird das Protein HIRA benötigt, um Nucleosomen zusammenzubauen (Ray-Gallet et al., 2002).

Während dieser replikationsunabhängigen Prozesse werden Histone eingebaut, die nicht während der S-Phase exprimiert wurden, und die eine andere Aminosäuresequenz aufweisen (Grove and Zweidler, 1984). „Ersatzhistone“ bzw. „Histonvarianten“ existieren für alle Histone bis auf H4. Im folgenden soll kurz auf die Histonvarianten eingegangen werden:

Histon H3.3 unterscheidet sich vom „normalen“ H3 in vier Aminosäuren und kann sowohl während als auch außerhalb der S-Phase in Nucleosomen eingebaut werden (Ahmad and Henikoff, 2002a). Aus diesem Grund ist es als „kanonisches“ Histon aufzufassen, und das „normale“ H3 als dasjenige Histon, das nur während der Replikation verwendet wird. In Pilzen ähnelt die einzige Histonvariante dem H3.3 der Tiere (Ahmad and Henikoff, 2002b). Mutiert man im „normalen“ H3 in *Drosophila* eine der vier Aminosäuren, so dass sie H3.3 entsprechen, ist bereits teilweise replikationsunabhängiger Einbau in Nucleosomen möglich (Ahmad and Henikoff, 2002b). Histon H3.3 wird vor allem in transkriptionell aktive Loci eingebaut. Im Gegensatz zu H3 kann Histon H3.3 ohne N-Terminus in Nucleosomen eingebaut werden. Dies weist darauf hin, dass die am Zusammenbau beteiligten Proteinkomplexe grundsätzlich andere sind. Kürzlich wurde

nachgewiesen, dass der Einbau von H3.3 durch HIRA, nicht CAF1, erfolgt (Tagami et al., 2004).

Durch mehrere Runden von Austausch während der Transkription kann es zu einer Anreicherung von H3.3 an aktiven Stellen kommen. Auf diese Art kann an K9 methyliertes H3, welches typisch für Heterochromatin ist (siehe Kapitel 2.4) gegen H3.3 ausgetauscht werden, und dies stellt eine Markierung des Chromatins als „aktives“ Chromatin dar (Ahmad and Henikoff, 2002b).

CENP-A (*centromere protein A*) ist eine H3-Variante, die sich am Zentromer der Säugetiere findet (Palmer et al., 1991). In allen eukaryotischen Zellen scheint es solche zentromer-spezifischen Varianten zu geben, die auch „CenH3s“ genannt werden. Die Zentromer-H3s sind ein spezifischeres Merkmal für Zentromere als repetitive DNA-Elemente (Saffery et al., 2003).

Von H2A existieren die meisten Varianten. H2A.Z findet sich in Hefe in der Nähe von stillgelegten Regionen im Genom und verhindert das Ausbreiten des Heterochromatins in Euchromatin (Meneghini et al., 2003). Nukleosomen, die H2A.Z enthalten, sind weniger stabil, da die Interaktion mit H3 und H4 geschwächt ist. Dies könnte zu transkriptioneller Aktivierung führen, da die Ausbildung von höheren Chromatinstrukturen verhindert wird (Fan et al., 2002).

MacroH2A ist am inaktiven X-Chromosom bei Mensch und Maus angereichert (Chadwick and Willard, 2002). Die globuläre C-Terminus von MacroH2A kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren behindern, und Nukleosomen mit MacroH2A können nicht durch SWI/SNF-Komplexe verschoben werden (Angelov et al., 2003).

Am inaktiven X-Chromosom findet sich *kein* H2A-Bbd (*barr body deficient*) (Chadwick and Willard, 2001), was darauf hindeutet, dass dieses Paar von H2A-Varianten alternative Chromatinzustände markiert.

H2A.X findet sich überall im Chromatin. Nach DNA-Doppelstrangbrüchen, z.B. nach Einwirkung von Chemikalien oder Auftreten von Rekombination, wird das in der Nähe liegende H2A.X phosphoryliert (Rogakou et al., 1998) und könnte eine Rolle im anschließenden Reparatur-Prozeß spielen.

In der folgenden Tabelle sind die Histonvarianten noch einmal zusammengestellt.

Histonvariante	Eigenschaften
H2A.Z	weniger stabile Nukleosomen, befindet sich in der Nähe von Heterochromatin in Hefe
MacroH2A	Nur in Wirbeltieren; am C-Terminus findet sich eine globuläre Domäne; angereichert am inaktiven X in Säugern
H2A-Bbd	Nur in Wirbeltieren; vom inaktiven X ausgeschlossen
H2A.X	Wird phosphoryliert nach DNA-Doppelstrangbrüchen
CenH3	Zentromerische Form von H3; variable Länge/Sequenz des N-Terminus
H3.3 (Pflanzen: H3.2)	Ersetzt H3; Unterschied in Aminosäure 31 und einigen anderen Stellen; kann außerhalb der Replikation eingebaut werden; markiert evtl. aktives Chromatin

Tabelle 1: Histonvarianten (Henikoff et al., 2004).

## 2.4 HETEROCHROMATIN

Heterochromatin ist hochkondensiert und transkriptionell inaktiv, während Euchromatin weniger kondensiert und transkriptionell aktiv ist. Zytologisch definiert wurde Heterochromatin, wie schon erwähnt, bereits 1928 von E. Heitz, der im Mikroskop stark gefärbte Regionen im Zellkern von Moosen beobachtete, welche keine zyklischen Veränderungen durchliefen (Heitz, 1928).

**Konstitutives** Heterochromatin, also Heterochromatin, welches in allen somatischen Zellen gleichermaßen zu finden ist, tritt z.B. am Centromer und an den Telomeren (den Chromosomenenden) auf. Sein Verpackungszustand wird normalerweise nach Replikation und Mitose aufrechterhalten.

**Fakultatives** Heterochromatin ist ebenfalls dicht gepackt und es findet sich keine Genexpression dort. Die Entscheidung, diese DNA so dicht zu verpacken, ist allerdings zellspezifisch, kann also von Zelle zu Zelle variieren. Beispiele hierfür sind das inaktive X-Chromosom in Säugetieren, die *mating type*-Gene in Pilzen (Cavalli, 2002), stillgelegte Hox-Gene (siehe Kapitel 2.10) und *imprinting*-Regionen.

Allgemeine Kennzeichen von Heterochromatin sind z.B. die Anwesenheit von HP1 (Einzelheiten zu HP1 siehe Kapitel 2.9), di- sowie trimethyliertes H3-K9 (Schotta et al., 2002), hypoacetylierte Histone, stark repetitive DNA-Sequenzen, sehr regelmäßiger Nukleosomenabstand (Sun et al., 2001; Wallrath and Elgin, 1995), DNA-Methylierung am

Cytosin (CpG-Dinukleotide) in Säugern sowie Pflanzen und eine geringe Sensitivität gegenüber Nukleasen.

Bei der DNA- und Histonmethylierung stellt sich die Frage, welche Modifikation zuerst auftritt. In *Neurospora crassa* ist die Trimethylierung von H3-K9 eine Voraussetzung für jede Art von DNA-Methylierung (Tamaru and Selker, 2001): Dim5, eine SET-Domänen-Histonmethyltransferase, die H3-K9 (Lysin 9 im Histon H3) trimethylieren kann, ist für die DNA-Methylierung wichtig. Dim5 ist eine Abkürzung für *deficient in DNA methylation*.

Im Gegensatz dazu wird in *Arabidopsis thaliana* Dimethylierung von H3-K9 benötigt, um DNA-Methylierung zu erhalten. Diese Dimethylierung wird durch das Enzym Kryptonite ausgeführt, welches zur Familie der Su(var)3-9 Enzyme gehört (Näheres über Su(var)3-9 siehe Kapitel 2.9). Die H3-K9-Methylierung spielt aber nur eine Rolle für die Methylierung von CpNpG - und nicht wie in *Neurospora* CpG - -Sequenzen (Jackson et al., 2004).

Die DNA-Methylierung wurde schon länger in Zusammenhang mit Repression beobachtet, allerdings ist nicht klar, wie diese Repression genau vor sich geht. Sie ist auf jeden Fall Chromatin-vermittelt. Die DNA-Methylierung könnte die direkte Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotoren behindern (Bird and Wolffe, 1999), oder die Chromatinstruktur verändern, indem repressive Nukleoproteinkomplexe an methylierte DNA rekrutiert werden (Kass et al., 1997). Proteine, die an methylierte CpG-Sequenzen binden, wie z.B. Methyl-CpG-Bindungsdomänen (MBD)-Proteine, können HDAC-enthaltende Komplexe an die methylierte DNA führen (Jones et al., 1998b; Zhang et al., 1999), was zu Repression führt.

Histon- und DNA-Methylierung stellen ein System dar, das voneinander abhängt und wahrscheinlich in Kombination sicherstellt, dass stillgelegte Regionen des Genoms auch in diesem Zustand bleiben (Sims et al., 2003).

Die Rolle von Heterochromatin besteht einerseits in einer Schutzfunktion: Die DNA wird so dicht gepackt, dass keine Rekombinationen zwischen den hochrepetitiven Sequenzen auftreten (Grewal and Klar, 1997; Guarente, 2000).

Andererseits spielt Heterochromatin eine Rolle in der Schwesterchromatid-Kohäsion und der Chromosomensegregation (Bernard et al., 2001; Peters et al., 2001). Zusätzlich dazu reguliert es die Genexpression während der Entwicklung und Zelldifferenzierung: Z.B. sind Heterochromatin-ähnliche Strukturen an der Inaktivierung von Homöobox-Genen oder des *mating-type*-Locus in Pilzen beteiligt (Cavalli, 2002). In weiblichen Säugetieren

ist Heterochromatin an der Inaktivierung von einem der beiden X-Chromosomen beteiligt (Avner and Heard, 2001; Heard et al., 2001).

Heterochromatin ist oftmals mit relativ dekondensiertem Euchromatin durchsetzt. Ist Heterochromatin an einem Ort etabliert, kann es sich entlang der DNA ausbreiten (*spreading*) und die benachbarten Gene stilllegen. Dieses Phänomen macht man beispielsweise für das Auftreten von *position effect variegation* verantwortlich (siehe Kapitel 2.8).

Wie kommt es dazu, dass bestimmte Bereiche des Genoms in Heterochromatin verpackt werden? Der RNA-Interferenz-Mechanismus (RNAi), der auch an posttranskriptionaler Gen-Stillegung beteiligt ist (Hannon, 2002), ist an den initialen Schritten zum Aufbau von Heterochromatin beteiligt (Volpe et al., 2002). Die Proteine aus dem RNAi-Weg scheinen nur zur Initiierung, nicht zum weitergehenden Erhalt des Heterochromatins nötig zu sein (Hall et al., 2002). An zentromerischen repetitiven Sequenzen kommt es in sehr geringem Ausmaß zu Transkription, die dazu führt, dass in der Nähe der repetitiven Sequenzen doppelsträngige RNA auftritt (Reinhart and Bartel, 2002). Diese wird durch eine Helicase namens „Dicer“ in kürzere, ca. 21 bis 24 Nukleotide lange, doppelsträngige RNAs gespalten (Bernstein et al., 2001). Diese RNAs können dann, so vermutet man, entweder mit DNA oder naszierender RNA hybridisieren, oder einen RISC-ähnlichen Komplex binden (RISC steht für *RNA-induced silencing complex*) (Tuschl et al., 1999). Über diesen Komplex wird dann wahrscheinlich das histonmodifizierende Enzym Su(var)3-9 zu den repetitiven Sequenzen gelenkt. Ist einmal das typische H3-K9-Methylierungssignal gesetzt, kann HP1 über seine Chromodomäne (siehe Kapitel 2.9) daran binden. Über die Bindung von HP1 und nachfolgende Bindung von weiteren Su(var)3-9-Molekülen könnte sich das Heterochromatin ausbreiten (*spreading*). Auf diese Art könnte es zur Stillegung von größeren Bereichen, z.B. längeren repetitiven Sequenzen und auch die sich daran anschließenden Gene, kommen.

Deletiert man Komponenten aus dem RNAi-Mechanismus, kommt es zum Verlust der H3-K9-Methylierung, Derepression von normalerweise stillgelegten Transgenen sowie einer Störung der Zentromer-Funktion in *S. pombe* (Volpe et al., 2002).

In der Hefe *S. cerevisiae* sind die SIR-Proteine (*silent information regulator*) an der Bildung von hochkompaktem Heterochromatin beteiligt (Braunstein et al., 1996), wie z.B.

an den *silent-mating-type*-Kassetten und den Telomeren. Die SIR-Proteine werden schrittweise an die Nukleosomen rekrutiert: Zuerst bindet ein Komplex aus Sir2 und Sir4 an die Nukleosomen (Hoppe et al., 2002). Sir2 ist eine evolutinär stark konservierte NAD<sup>+</sup>-abhängige Histondeacetylase und deacetyliert vor allem H4-K16 (Imai et al., 2000). Sir3 und Sir4 binden bevorzugt an hypoacetylierte *tails* der Histone H3 und H4 (Carmen et al., 2002). Nachdem auch Sir3 an den Sir2/4-Komplex gebunden hat, deacetyliert Sir2 weitere Histon-*tails*, was zur Bindung von noch mehr Sir2/3/4-Komplexen führt. Auf diese Weise können sich die Sir-Proteine ausbreiten (Moazed, 2001).

Um dem Ausbreiten des Heterochromatin Grenzen zu setzen, haben die Zellen verschiedene Mechanismen entwickelt. Einer dieser Mechanismen beruht darauf, dass spezialisierte DNA-Sequenzen, die oben (Kapitel 2.2) schon erwähnten *boundary elements*, die Grenze zwischen verschiedenen Chromatindomänen markieren und als Barrieren gegen die Effekte von Silencern und Enhancern in der Nachbarschaft wirken können (Labrador and Corces, 2002; West et al., 2002).

Die Analyse des Methylierungsmusters entlang der *mating-type*-Region in *S. pombe* ergab, dass zwei invertierte *repeats* das Heterochromatin begrenzen und dadurch vom benachbarten Euchromatin abgrenzen (Noma et al., 2001). Innerhalb der *repeats* findet sich vor allem H3-K9-Methylierung, ein Marker für Heterochromatin (siehe auch Kapitel 2.7.1), während im daneben liegenden Euchromatin H3-K4 methyliert ist (siehe auch Kapitel 2.7.2). Deletiert man einen der beiden *repeats*, breitet sich das Heterochromatin in das benachbarte Euchromatin aus.

Direkt neben der heterochromatischen Region im  $\beta$ -Globin-Locus von Hühnern, welche starke an H3-K9-Methylierung zeigt, fand sich ein *peak* von H3-K4-Methylierung und Histonacetylierung (Litt et al., 2001a).

H3-K4-Methylierung sowie Histonacetylierung werden also als „Barrieren“ gegen das Ausbreiten von Heterochromatin verstanden (Dhillon and Kamakaka, 2002; West et al., 2002), und die *boundary*-Elemente könnten hierbei als Bindungsstellen z.B. für Histonacetyltransferasen dienen, die das Binden von anderen *silencing*-Proteinen verhindern und damit auch das Ausbreiten des Heterochromatins.

Ein anderer vorgeschlagener Mechanismus ist, dass die *boundary*-Elemente miteinander oder mit einer nuklearen Struktur wechselwirken, und dadurch Schleifen bilden, die dem Ausbreiten des Heterochromatins entgegenstehen (Labrador and Corces, 2002).

---

In *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass ein tRNA-Gen, welches in der Nähe von Heterochromatin liegt und durch RNA-Polymerase III transkribiert wird, eine Barriere gegen Heterochromatin darstellt (Donze and Kamakaka, 2001). Der RNA-Polymerase III-Komplex ist sehr groß, besteht aus 26 Untereinheiten und bedeckt ca. 150 bp. Der Komplex muss vollständig sein, damit das tRNA-Gen als Barriere dienen kann. Ein möglicher Mechanismus, wie dieses tRNA-Gen als Barriere gegen Heterochromatin agieren könnte, ist folgender: Der große und stabil gebundene Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase stellt eine physikalische Blockade für die Bindung der SIR-Proteine und die darauffolgende Ausbreitung des Heterochromatins dar.

Außerdem wurde berichtet, dass der Einbau von H2A.Z in Nukleosomen, einer Histonvariante (siehe auch Kapitel 2.3), das Ausbreiten von Heterochromatin verhindert. H2A.Z hindert die SIR-Proteine in *S. cerevisiae* daran, an Nukleosomen zu binden und in Gene vorzudringen, die den Telomeren benachbart sind (Meneghini et al., 2003).

Ein weiterer Mechanismus, der das Binden der SIR-Proteine verhindern kann, ist die Methylierung von H3-K79 (Methylierung siehe Kapitel 2.6) (Ng et al., 2003a; van Leeuwen and Gottschling, 2002). Diese Methylierung tritt in Zusammenhang mit Transkription auf: Der Paf1-Komplex, der mit der elongierenden RNA-Polymerase II assoziiert ist, interagiert mit dem Methyltransferase-enthaltenden Komplex COMPASS sowie der Methyltransferase Dot1 (Krogan et al., 2003). COMPASS enthält die Methyltransferase Set1 (spezifisch für H3-K4), und Dot1 kann H3-K79 methylieren. Es scheint, dass die Methyltransferasen mit der RNA-Polymerase „mitlaufen“ und durch die Histonmethylierung ein Signal setzen, welches für vor kurzem stattgefundene Transkription steht und auch nach der Dissoziation der Methyltransferase bestehen bleibt (Ng et al., 2003b).

## 2.5 DIE MODIFIKATIONEN DER HISTONE

### 2.5.1 ACETYLIERUNG

Acetylierung ist eine eher kurzlebige, dynamische Modifikation; sie ist reversibel und kann durch Histon-Deacetylasen (HDACs) von den Histonen entfernt werden. Die Halbwertszeit der Deacetylierung beträgt nur 7 bis 30 min, wobei es unterschiedliche *pools* an Histonen gibt, die unterschiedliche Halbwertszeiten haben (Chestier and Yaniv, 1979). Acetylierung findet man vor allem an den Histonen H3 und H4.

Enzyme, welche die Acetylierung durchführen, nennt man Histonacetyltransferasen (HATs). Diese transferieren eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins. Histonacetyltransferasen treten oft in Komplexen mit mehreren Untereinheiten auf.

Phillips (Phillips, 1963) und Allfrey (Allfrey et al., 1964) berichteten als erstes über die Acetylierung der Histone. Sie wurde bald in Zusammenhang mit aktiver Transkription gebracht. Nach Entwicklung von Antikörpern, die spezifisch acetylierte Lysine im Histon H4-*tail* erkennen (Turner et al., 1992), war es möglich, die Verteilung von unterschiedlich acetylierten Histonen in Zellen zu untersuchen.

Neu synthetisierte Histone sind z.B. an Lysin 5 und 12 des Histons H4 acetyliert (siehe auch Kapitel 2.3) (Sobel et al., 1994). Acetyliertes H4-K16 tritt im Zusammenhang mit dem hyperaktiven männlichen X-Chromosom in *Drosophila* auf, während H4-K12-Acetylierung in transkriptionell nicht aktiven Regionen von Hefe und *Drosophila*, jedoch nicht beim Menschen, zu finden ist (Turner et al., 1992).

Wie könnte die Histonacetylierung die Transkription beeinflussen?

Es stellte sich heraus, dass viele transkriptionelle Coaktivatoren Histonacetyltransferase-Aktivität besitzen (z.B. GCN5, P300/CBP, MOF, TAF(II)250).

Die Acetylierung reduziert teilweise die positive Ladung der Histone, und vermindert dadurch deren Affinität zur negativ geladenen DNA (Hong et al., 1993; Workman and Kingston, 1998). Die DNA ist dann besser zugänglich für Transkriptionsfaktoren (Lee et al., 1993; Vettese-Dadey et al., 1996). In Crosslinking-Experimenten konnte jedoch nach Acetylierung festgestellt werden, dass die Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren und Histonen nicht schwächer ist (Mutskov et al., 1998).



Außerdem könnte die Acetylierung die übergeordneten Strukturen des Chromatins verändern, und ein „Auffalten“ des Chromatins bewirken. Derartige Beobachtungen konnten in Ultrazentrifugations- sowie elektronenmikroskopischen Experimenten gemacht werden (Garcia-Ramirez et al., 1995; Hansen et al., 1989). H2A und H2B, die am oberen und unteren Ende des Nukleosoms kleine, begrenzte stark saure Bereiche besitzen und eventuell mit nicht modifizierten, positiv geladenen *tails* interagieren (Luger et al., 1997), könnten an dieser Auffaltung beteiligt sein.

Ein weiteres Modell schlägt vor, dass durch die Acetylierung der Histontails die Interaktionen mit anderen Proteinen verändert werden. Man fand z.B. dass die Bromodomäne an acetyliertes H4 binden kann (Dhalluin et al., 1999; Jacobson et al., 2000). Die Bromodomäne findet sich in vielen Transkriptionsaktivatoren und HATs, z.B. TAF (II)250 oder PCAF (Zhang and Reinberg, 2001). Haben diese Proteine an die Histone gebunden, könnten sie auch andere Proteine rekrutieren, die wiederum die Chromatinstruktur verändern (Hassan et al., 2002).

Manche Acetyltransferasen können nicht nur Histone, sondern auch andere Substrate acetylieren (Brown et al., 2000). Beispiele für Acetylierungssubstrate sind E2F (Martinez-Balbas et al., 2000) sowie p53 (Gu and Roeder, 1997).

### 2.5.2 HISTONDEACETYLASEN

Histondeacetylasen entfernen Acetylgruppen von Lysinen und sind meist transkriptionale Repressoren. Sie sind in drei Klassen eingeteilt: Klasse I kommt ubiquitär vor, Klasse II ist gewebespezifisch exprimiert. Klasse I und Klasse II sind sensitiv gegenüber dem Inhibitor Trichostatin A (TSA). Klasse III ist nicht TSA-sensitiv, braucht NAD<sup>+</sup> als Cofaktor – ist deswegen also abhängig vom Metabolismus - und ist homolog zu Sir2, einem *silencing* Faktor aus Hefe, der Deacetylase-Aktivität besitzt (Imai et al., 2000). Sirs (siehe Kapitel 2.4) sind an der Bildung von hochkompaktem Chromatin in Hefe beteiligt (Braunstein et al., 1996) und werden für das *silencing* am sogenannten *mating type* Locus und an den Telomeren in Hefe verantwortlich gemacht. Sir2-ähnliche Proteine wurden in vielen Eukaryoten gefunden.

Die meisten HDACs sind im Gegensatz zu den HATs eher unspezifisch, nur Sir2 scheint Lysin 16 aus H4 als Substrat zu bevorzugen (Imai et al., 2000).

Die erste identifizierte Histondeacetylase war HDAC1. Durch Sequenzvergleiche stellte man fest, dass dieses Protein identisch war mit Rpd3, einem Transkriptionsregulator aus Hefe (Vidal and Gaber, 1991).

Die meisten Deacetylasen spielen eine Rolle in der Transkriptionsrepression. Im Gegensatz dazu ist die Deacetylase Hos2 aus Hefe, die u.a. H4-K16 deacetylieren kann, mit aktiven Genen assoziiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Aufrechterhaltung des aktiven Status (Wang et al., 2002).

### 2.5.3 PHOSPHORYLIERUNG

Alle Histone, auch Histon H1, können phosphoryliert auftreten. Ebenso wie die Acetylierung ist die Phosphorylierung reversibel. Phosphorylierung von H1 und H3 wird in Zusammenhang gebracht mit Chromosomenkondensation und -segregation (Guo et al., 1995). Diese Funktion ist hoch konserviert, von *Tetrahymena* bis zu den Wirbeltieren. Außer in der Mitose tritt die Phosphorylierung als Antwort auf Wachstumsfaktorsignale auf. Vor allem die Promotoren von *immediate early* Genen werden dann an H3-K14 phosphoryliert (Mahadevan et al., 1991), aber auch acetyliert (Thomson et al., 2001).

In Eukaryoten tritt Phosphorylierung von Serin 10 und Serin 28 in H3 während der Mitose auf, wobei die höchste Phosphorylierung in der Metaphase zu beobachten ist. Dabei sind fast alle H3s phosphoryliert. Diese genomweite Phosphorylierung wird durch die Aurora-B-Typ Kinasen katalysiert (Hsu et al., 2000) und durch die Proteinphosphatase 1 wieder rückgängig gemacht (Francisco et al., 1994). In Hefe ist die Phosphorylierung von H3 wahrscheinlich nicht für die Mitose notwendig.

Die Phosphorylierung beeinflusst andere Modifikationen: Acetylierung von Lysin 14 in H3 wird durch die Serin 10-Phosphorylierung gefördert (Lo et al., 2000), während sich Methylierung an Lysin 9 und Serin 10-Phosphorylierung im Histon H3 gegenseitig behindern (Rea et al., 2000).

### 2.5.4 ADP-RIBOSYLIERUNG

Die nukleare Poly-ADP-Ribose-Polymerase kann bis zu 250 ADP-Einheiten an verschiedene nukleare Proteine anhängen, unter anderem an Histone (Jacobson and Jacobson, 1999). Die ADP-Ribose wird entweder auf Glutaminsäure innerhalb eines Polyglutaminsäure-Bereiches oder aber auf einzelne Arginine übertragen. Die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) wird durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert, was zum vermehrten Auftreten von ADP-ribosylierten Histonen führt. Man vermutet, dass die ADP-Ribose-Moleküle der DNA ähneln und die Histone von der DNA entfernen, damit Reparaturmaschinen Zugang zur DNA haben (Althaus, 1992). H1 und H2B sind diejenigen Histone, an denen ADP-Ribosylierung meistens auftritt (Kappus et al., 1993), es können

jedoch auch die anderen Histone auf diese Art modifiziert werden. ADP-Ribosylierung wird bevorzugt in hyperacetylierten Histonen gefunden, dieser Zusammenhang ist bei H4 besonders deutlich (Golderer and Grobner, 1991). Mit zunehmendem Alter von Zellen nimmt diese Modifikation ab (Mishra and Das, 1992).

Die Quelle für die ADP-Ribose stellt das  $\text{NAD}^+$  dar. Auf diese Weise spielt auch der metabolische Zustand der Zelle – ebenso wie für die Deacetylierung durch Sir2 - für die ADP-Ribosylierung eine Rolle (Vaquero et al., 2003).

Es wurde sowohl Mono- als auch Poly-ADP-Ribosylierung beobachtet. Während die Mono-ADP-Ribosylierung einen repressiven Effekt zu haben scheint, ist die Rolle der verzweigt auftretenden Poly-ADP-Ribose noch umstritten. Der Effekt der verzweigten Polymerstruktur auf Chromatin ist wahrscheinlich v.a. struktureller Natur: Poly-ADP-Ribosylierung bewirkt eine offenere Chromatinstruktur, welche die Transkription erleichtern könnte (Huletsky et al., 1989).

Sir2-Proteine haben ebenfalls eine schwache unspezifische mono-ADP-Ribosylierungs-Aktivität gegenüber Histonen. Die Funktion dieser Aktivität *in vivo* ist nicht klar, sie könnte jedoch eine Rolle in der transkriptionellen Repressionsfunktion der Sir-Proteine spielen (Tanny et al., 1999).

Außer in der DNA-Reparatur spielt die ADP-Ribosylierung also auch in der Chromatinregulation eine Rolle. Bis jetzt wurde allerdings nur PARP1 als Enzym gefunden, welches überzeugend Histone ribosylieren kann (de Murcia et al., 1988). Die Poly-ADP-Ribosylierung kann durch Poly-ADP-Ribose-Glycohydrolase wieder abgebaut werden.

### 2.5.5 UBIQUITINYLIERUNG

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes Peptid, das normalerweise als Poly-Ubiquitin an die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen in Proteinen angehängt wird, welche für den Abbau im 26S-Proteasom vorgesehen sind (Pickart and Cohen, 2004). Alle Histone bis auf H4 wurden bisher mit Ubiquitin modifiziert vorgefunden, wobei H2A und H2B bei weitem am häufigsten betroffen sind (Belz et al., 2002). An den Histonen wurde sowohl Mono- als auch Poly-Ubiquitinylierung gefunden. An Lysin 119 in 10% aller H2A-Moleküle findet sich ein Mono-Ubiquitin, und Lysin 123 in H2B ist mono-ubiquitinyliert (Vaquero et al., 2003). Im Gegensatz zu Poly-Ubiquitinylierung wurde die Mono-Ubiquitinylierung mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung gebracht, da in transkriptionell aktivem Chromatin im Makronukleus von *Tetrahymena* monoubiquitinylierte Histone zu finden

sind (Davie et al., 1991). TAF(II)250 scheint ein mono-ubiquitinylierendes Enzym zu sein (Pham and Sauer, 2000).

H2A- und H2B-Mono-Ubiquitinylierung kann die Interaktion des H2A/H2B-Dimers mit dem Tetramer aus H3 und H4 abschwächen (Li et al., 1993) und scheint also ebenfalls einen strukturellen Effekt auf Chromatin zu haben.

In Hefe wurde gefunden, dass eine Mono-Ubiquitinylierung von H2B an Lysin 123 durch Rad6 für eine darauffolgende Methylierung von H3-K4 durch den COMPASS-Komplex und für eine Methylierung von H3-K79 durch Dot1 unbedingt notwendig ist (Briggs et al., 2002; Sun and Allis, 2002).

Die Ubiquitinylierung kann wieder entfernt werden, und ist daher für Transkriptionsregulation geeignet (Henry et al., 2003).

### **2.5.6 ANDERE MODIFIKATIONEN**

Außer den bisher besprochenen Modifikationen gibt es noch die Methylierung, welche in Kapitel 2.6 besprochen wird, sowie andere Modifikationen, über die sehr wenig bekannt ist.

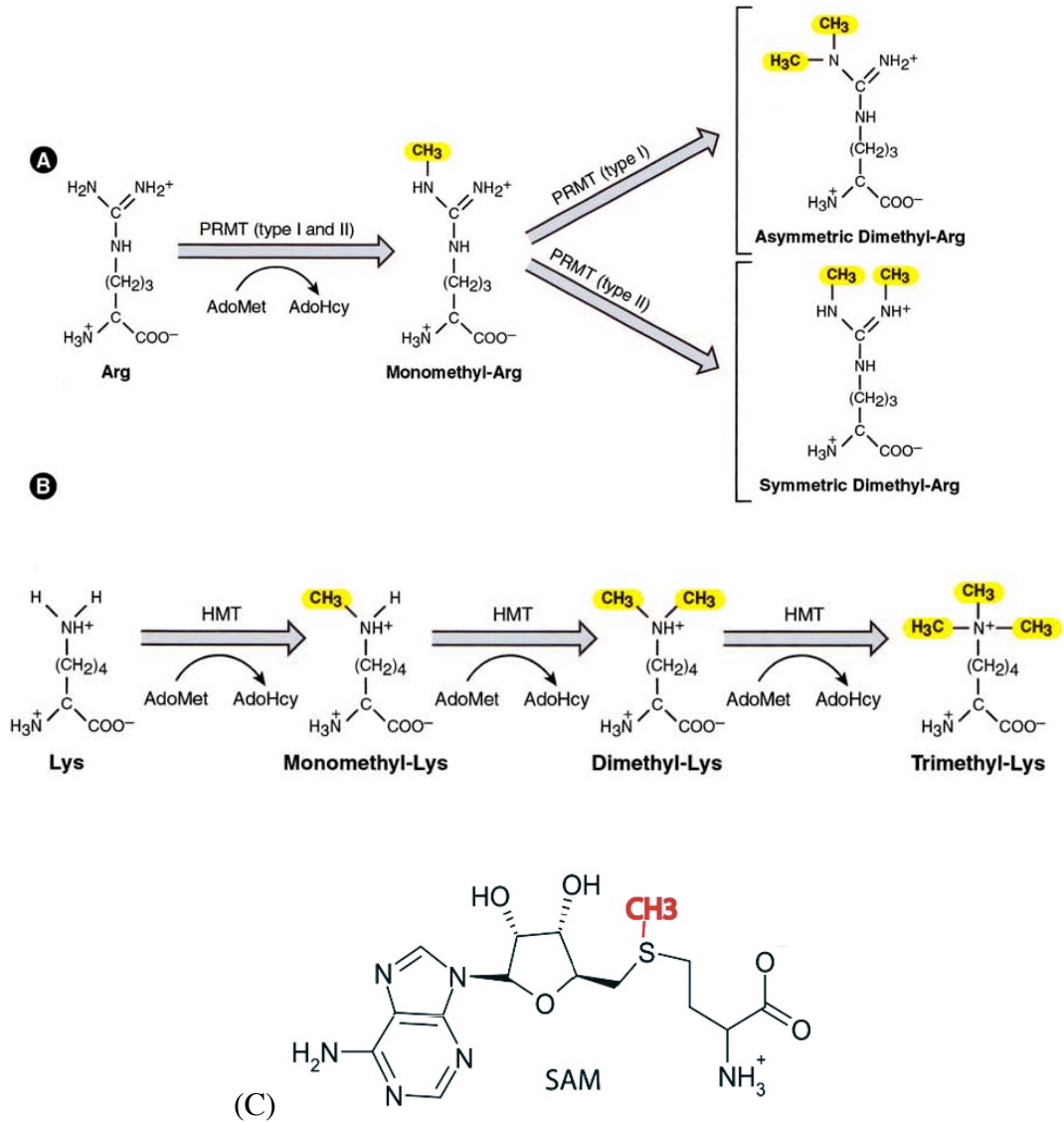
Da ist zuerst einmal die Biotinylierung zu nennen. Biotin, auch Vitamin B genannt, wurde vor ca. 70 Jahren als Coenzym für CO<sub>2</sub>-fixierende Carboxylasen entdeckt (Kogl, 1936). Über die Biotinylierung von Histonen ist noch fast nichts bekannt. Das Enzym Biotinidase, welches Biotin auf Lysine in allen Histonen übertragen kann, scheint auch die Rückreaktion zu katalysieren (Hymes and Wolf, 1999). Kürzlich wurde über die Biotinylierung von H4-K8 und H4-K12 berichtet (Camporeale et al., 2004).

Als weitere Modifikationen sind noch die SUMOylierung zu erwähnen (Shiio and Eisenman, 2003), und die Transglutaminylierung.

## **2.6 METHYLIERUNG**

Die Histonmethylierung wurde schon 1964 gefunden (Murray, 1964), es blieb aber lange unklar, was für eine Funktion diese Modifikation hat. Die Enzyme, welche die Methylierung der Histone durchführen, nennt man Histonmethyltransferasen (HMT oder HIM). Sie katalysieren die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf Arginin oder Lysin. Arginin kann mono- oder dimethyliert werden, letzteres in symmetrischer oder asymmetrischer Weise (siehe Abb. 6 A). Die Enzyme, die diese Reaktion ausführen, werden Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) genannt. Lysin

kann an seiner  $\epsilon$ -Aminogruppe sowohl mono- als auch di- und trimethyliert werden (siehe Abb. 6 B). Diese Reaktion wird von Enzymen ausgeführt, die meist eine SET-Domäne enthalten.



**Abb. 6: Lysin- und Argininmethylierung (aus Zhang and Reinberg, 2001).** **A: Mechanismus der Arginin-Methylierung.** Das Produkt ist ein mono- oder dimethyliertes Arginin, letzteres kann asymmetrisch oder symmetrisch sein. **B: Mechanismus der Lysin-Methylierung.** Hier können bis zu drei Methylgruppen eingebaut werden. **C: S-Adenosyl-L-Methionin (SAM).**

Im weiteren Text wird hauptsächlich auf die Lysin-Methylierung und die Lysin-Histonmethyltransferasen eingegangen, da in dieser Arbeit mit diesen Enzymen gearbeitet wurde.

### 2.6.1 DIE STABILITÄT DER METHYLIERUNG

Die Lysin-Methylierung ist äußerst stabil. Durch die Methylierung wird keine Ladung verändert, und die Bindung ist nicht durch benachbarte Iminogruppen – wie bei der Arginin-Methylierung der Fall – destabilisiert (Jenuwein, 2001). Bis jetzt wurden keine Enzyme gefunden, die eindeutige Demethylasen sind. Verschiedentlich wurden Überlegungen über oxidative bzw. hydrolytische Mechanismen zur Demethylierung angestellt (Bannister et al., 2002).

Da die Halbwertszeit der Histone genau so lang wie die Halbwertszeit der Methylierung ist, wurde daraus geschlossen, dass Methylierung ein irreversibler Prozess ist (Byvoet et al., 1972). Nach 100 Tagen findet man beispielsweise, dass ca. 20% des H3 ausgetauscht worden ist (Waterborg, 1993). Im allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Lysin-Methylierung nicht durch eine einfache Reaktion wie z.B. eine Hydrolyse rückgängig zu machen ist (Bannister et al., 2002). Während der Transkription oder Replikation der DNA könnte jedoch ein methyliertes Histon durch ein unmethyliertes ersetzt werden, und auf diese Weise könnte die Methylierung entfernt werden. Tatsächlich findet außerhalb der Replikation ein Einbau von Histonen in Nukleosomen statt, wobei hier die Histonvarianten statt der „Standardhistone“ eingebaut werden (siehe Kapitel 2.3). Das würde aber implizieren, dass in Regionen ohne Transkription die Methylierung sehr lange erhalten bliebe. Eine andere Möglichkeit wäre das Entfernen der *tails*. Im Micronukleus von *Tetrahymena*, in dem keine Transkription stattfindet, wurde eine verkürzte Version von H3 gefunden (Allis et al., 1980). Hierbei fehlen die ersten sechs Aminosäuren aus dem N-Terminus und damit auch Arginin 2 und Lysin 4. Lysin 4-Methylierung ist ein Signal für aktive Transkription (siehe Kapitel 2.7.2) und könnte auf diese Art und Weise entfernt werden.

## 2.6.2 ÜBERBLICK ÜBER HISTON-METHYLTRANSFERASEN

Einen Überblick über die bis jetzt beschriebenen Methyltransferasen, geordnet nach Lysin- und Arginin-Methyltransferasen, gibt die folgende Tabelle:

Spezifität	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Drosophila</i>	<i>Maus/Mensch</i>
H3 K4	Set1	Set1	Trx, Ash1	Set9, ALL-1, MLL, ALR-1/2, ALR, Set1, SMYD3
H3 K9	nicht vorhanden	Clr4	Su(var)3-9, Ash1, E(Z)	Suv39h1/2, G9a, Eu-HMTase, ESET, SETDB1
H3 K 27	nicht vorhanden		E(Z)	Ezh2, G9a
H3 K36	Set2			NSD1
H3 K79	Dot1	SPBC1539	Cg10272-PA/PC (grappa)	Dot1L
H4 K20	nicht vorhanden	Set9	PR-Set7, Ash1, Suv4-20	PR-Set7, Suv4-20h1/2
H3 R2				CARM1
H3 R17				CARM1
H3 R26				CARM1
H4 R3				PRMT1

**Tabelle 2: Überblick über die bis jetzt beschriebenen Histon-Methyltransferasen.** Zusammengestellt aus zwei Reviews (Sims et al., 2003; Lachner et al., 2003).

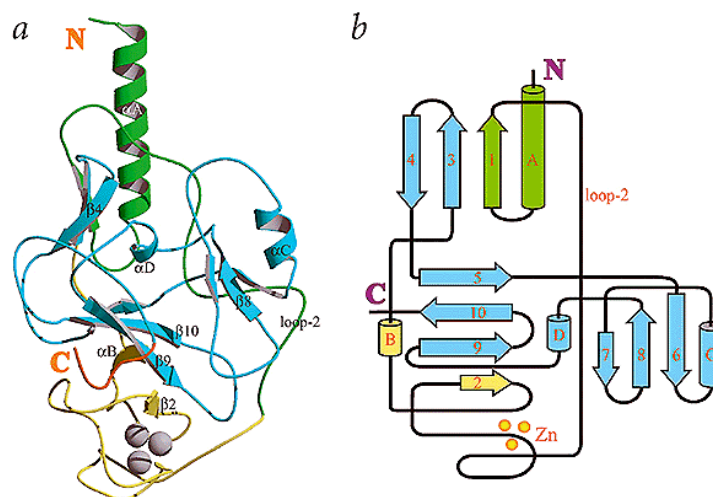
## 2.6.3 DIE SET-DOMÄNE

Viele der Lysin-Methyltransferasen besitzen eine sogenannte SET-Domäne, die der katalytischen Domäne in Pflanzenmethyltransferasen ähnelt, z.B. derjenigen der „Rubisco large subunit lysine methyltransferase“ (Rubisco LSMT) (Rea et al., 2000; Yeates, 2002). Rubisco LSMT methyliert nicht Histone, sondern ein Lysin im Enzym Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate-Carboxylase/Oxygenase ist ein Enzym, das in Pflanzen an der CO<sub>2</sub>-Assimilation beteiligt ist).

Im Genom von Maus und Mensch wurden mehr als 50 Proteine vorhergesagt, welche eine SET-Domäne besitzen (Lachner et al., 2003). Diese Domäne wurde nach den drei Proteinen Su(var)3-9, Enhancer of Zeste und Trithorax benannt, da sie in allen drei Proteinen vorhanden ist (Jones and Gelbart, 1993; Tschiersch et al., 1994). Die SET-Domäne ist ca. 130 Aminosäuren lang, und es wurde gezeigt, dass sie für die Methyltransferaseaktivität verantwortlich ist (Rea et al., 2000). Es ist also zu erwarten,

dass in der Zukunft noch weitere Methyltransferasen mit SET-Domänen gefunden werden. Allerdings ist das Vorhandensein einer SET-Domäne nicht zwingend: Dot1 trimethyliert K79, welches sich im globulären Teil von H3 befindet, und weist keine solche Domäne auf (Feng et al., 2002).

Innerhalb der SET-Domäne liegen die meisten konservierten Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus. Abb. 7a zeigt ein Schleifendiagramm der SET- sowie der flankierenden Domänen aus Clr4 (Min et al., 2002), Abb. 7b ein topologisches Diagramm. Die SET-Domäne ist türkis dargestellt, die prä-SET-Domäne (N-flankierende Domäne) gelb und die post-SET-Domäne (C-flankierende Domäne) rot. Die flankierenden Domänen sind – zumindest in Su(var)3-9 (Rea et al., 2000) – wichtig für die Aktivität: Die N-flankierende Domäne stabilisiert die SET-Domäne in ihrer Struktur, während die C-flankierende Domäne in manchen Enzymen das aktive Zentrum komplettiert (Xiao et al., 2003b).



**Abb. 7: Struktur der SET-Domäne von Clr4, dargestellt als Schleifendiagramm (Min et al., 2002).** A: Grün = N-Terminus, gelb = präSET, cyan = SET, rot = postSET. Die Kugeln stellen Zinkionen dar. B: Topologisches Diagramm der Methyltransferasedomäne von Clr4. Helices sind alphabetisch benannt,  $\beta$ -Faltblätter numeriert, von N- zu C-Terminus.

Von folgenden Methyltransferasen wurde bisher die Struktur der SET-Domäne bestimmt: Rubisco LSMT (Trievel et al., 2002), Set7/9 (Jacobs et al., 2002; Kwon et al., 2003; Wilson et al., 2002; Xiao et al., 2003a), Dim5 (Zhang et al., 2002) und Clr4 (Min et al., 2002).

Von den bisher publizierten SET-Domänen-Strukturen bestehen die N-flankierenden Domänen von Clr4 und Dim-5 (eine Methyltransferase aus *Neurospora*, die H3-K9 methyliert) aus cysteinreichen Regionen, so wie dies auch in Su(var)3-9 der Fall ist.



Eine besondere Rolle scheint die „mittlere“ Region innerhalb der SET-Domäne zu spielen, die auch „SET-I-Domäne“ genannt wird: Je nach Enzym ist sie verschieden lang, unterbricht überraschenderweise die SET-Domäne und weist nur geringe Ähnlichkeiten zwischen den Enzymen auf (Xiao et al., 2003b). Sie scheint Substratspezifität zu verleihen, also wichtig zu sein z.B. für die Unterscheidung zwischen H3-K4 und H3-K9.

Ein enger Kanal, durch den das zu methylierende Lysin in die Nähe des Cofaktors SAM kommt, bestimmt durch seine Abmessungen, ob ein Lysin nur monomethyliert wird (wie durch Set7/9) oder aber trimethyliert werden kann (wie durch Dim-5) (Xiao et al., 2003b). Je mehr Methylgruppen sich am Lysin befinden, desto „sperriger“ wird die Aminosäure, und in den engen Kanal von Set7/9 paßt ein monomethyliertes oder dimethyliertes Lysin nicht mehr hinein (Zhang et al., 2003). Jedoch gibt es auch assoziierte Proteine, die die Fähigkeit zur Trimethylierung regulieren (Zhang et al., 2003).

#### **2.6.4 ARGININ-METHYLTRANSFERASEN**

Die Arginin-Methyltransferasen sind weniger gut untersucht als die Lysin-Methyltransferasen. Dies kann man teilweise darauf zurückführen, dass die Argininmethylierung in Säugern schwierig nachzuweisen ist (Gary and Clarke, 1998). Argininmethyltransferasen können verschiedene Substrate methylieren, darunter RNA-prozessierende und –transportierende Proteine sowie unter anderem auch Histone (Aletta et al., 1998).

Arginin-Methyltransferasen besitzen keine SET-Domäne. Bisher wurde nur die Spezifität von CARM1 und PRMT1 untersucht (siehe Tabelle 2). Es existieren aber noch weitere Arginin-Methyltransferasen, genannt PRMT 2,3 und 5.

CARM1 wurde als Protein entdeckt, welches mit einem Hormon-Rezeptor-Coaktivator interagiert (Chen et al., 1999a). Außerdem ist es ein Coaktivator der Expression von Hormonrezeptoren (Koh et al., 2001). Diese Ergebnisse legten nahe, dass eine Histon-Argininmethylierung eine Aktivierung von Transkription darstellt. In Chromatin-Immunpräzipitationsexperimenten fand man, dass die Methylierung von H3-K17 sowie die Anwesenheit von CARM1 am gleichen Promoter mit Transkriptionsaktivierung korrelieren (Bauer et al., 2002).

## 2.7 BEDEUTUNG DER HISTON-LYSINMETHYLIERUNG

Erstaunlicherweise liegen Lysine, welche mit transkriptionell aktivem Chromatin assoziiert werden (z.B. Lysin 4 in H3), oft sehr nahe an Lysinen, die repräsentativ für stillgelegtes Chromatin (z.B. Lysin 9 in H3) sind. Im folgenden sollen nun einige für repressives bzw. aktives Chromatin typische Lysin-Methylierungen erwähnt werden.

### 2.7.1 REPRESSION DURCH HISTONMETHYLIERUNG

Die am besten und ausführlichsten untersuchte Modifikation ist wohl das methylierte Lysin 9 von Histon H3. In verschiedensten Zusammenhängen wurde über die *silencing*-Effekte dieser Modifikation berichtet (Noma et al., 2001).

**Lysin 9**-Methylierung tritt v.a. im Heterochromatin, also den transkriptionell nicht aktiven Regionen im Genom, auf, z.B. in pericentrischem Heterochromatin. In der Maus ist dort vor allem die trimethylierte Form von Lysin 9 sowie monomethyliertes H3-K27 angereichert, während in *Drosophila* weniger Trimethylierung auftritt. Di- und trimethyliertes Lysin 9 im Histon H3 stellt eine Bindungsstelle für HP1 dar, was für die Bildung von Heterochromatin von Bedeutung ist. H3-K9-Methylierung findet sich auch am vierten Chromosom in *Drosophila*. Diese Modifikation hängt jedoch im Gegensatz zur Methylierung im Chromozenter – der Verbindungsstelle von mehreren Centromeren - nicht von Su(var)3-9 ab (Schotta et al., 2002).

In *S. cerevisiae* findet sich keine H3-K9/K27 sowie H4-K20-Methylierung (Briggs et al., 2001; Schotta et al., 2004).

Lysin 9- Di- sowie **Lysin-27**-Trimethylierung scheinen für den Prozeß der Inaktivierung des X-Chromosoms in Säugern von Bedeutung zu sein (Plath et al., 2003; Silva et al., 2003; Okamoto et al., 2004; Rougeulle et al., 2004). Dabei wird über die *Xist*- RNA ein Ezh2-enthaltender Komplex zum X-Chromosom gebracht, welcher dann Lysin 27 methyliert. Für die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes wird aber zusätzlich noch die Lysin 9-Methylierung benötigt. Möglicherweise kann Ezh2 auch dieses Lysin *in vivo* methylieren, da die Reaktion *in vitro* möglich ist. Su(var)3-9 ist daran nicht beteiligt.

Methylierung an **Lysin 20** von H4 wurde ebenfalls mit stillgelegtem Chromatin in Zusammenhang gebracht. Die H4-K20-Methylierung kann als Mono-, Di- sowie Trimethylierung vorliegen und verhindert dadurch vermehrte Acetylierung von Lysin 16 in

H4, welches in aktivem Chromatin, z.B. dem hyperaktiven X-Chromosom in *Drosophila*, gefunden wird. Die Reaktion wird katalysiert durch PR-Set7, welches dimethylieren kann (Nishioka et al., 2002b). H4-K20-Methylierung findet sich v.a. in kondensierten Regionen in *Drosophila* Chromosomen (Nishioka et al., 2002b).

Interessanterweise wurde kürzlich berichtet, dass sowohl H3-K9-Dimethylierung als auch H4-K20-Dimethylierung in Immunfluoreszenzexperimenten in Euchromatin zusammen auftritt, genauso wie eine Trimethylierung der beiden Lysine, die vornehmlich in Heterochromatin angereichert ist (Schotta, 2004). Die Trimethylierung von H4-K20 in pericentrischem Heterochromatin scheint von Su(var)3-9 abzuhängen: Deletiert man Su(var)3-9 in Mäusezellen, so tritt die H4-Trimethylierung sowie die H3-K9-Trimethylierung nicht mehr auf.

Zwei neue Methyltransferasen, die ebendieses H4-K20 di- und trimethylieren können und ebenfalls SET-Domänen enthalten, sind Suv4-20h1 und h2 (Schotta, 2004). Durch Interaktion mit HP1 könnten sie an die Histone gelangen, die schon von Suv3-9 methyliert wurden.

Andererseits methyliert Ash1, ein epigenetischer Aktivator, ebenfalls H4-K20 (und H3-K4 sowie H3-K9). Dessen Methylierungsmuster scheint gerade die Bindung von HP1 und Polycomb – zwei Proteine die mit stillgelegtem Chromatin in Zusammenhang gebracht werden - zu verhindern und TrxG-Proteine, welche für die Aufrechterhaltung des aktiven Chromatinstatus verantwortlich sind, anzuziehen (Beisel et al., 2002).

### 2.7.2 AKTIVIERUNG DURCH HISTONMETHYLIERUNG

In transkriptionell aktivem Euchromatin ist **H3-K4** methyliert. V. a. Trimethylierung wird bei aktiver Transkription beobachtet (Santos-Rosa et al., 2002), während Dimethylierung ein eher allgemeines Signal für Euchromatin zu sein scheint (Sims et al., 2003). Die H3-K4-Methylierung tritt zusammen mit Acetylierung auf, z.B. im Macronukleus von *Tetrahymena* (Strahl et al., 1999), der transkriptionell aktiv ist.

Die Methylierung von H3-K4 verhindert, dass H3-K9 von Su(var)3-9 methyliert wird (Nishioka et al., 2002a). Auch der repressive NuRD-Komplex kann nicht an H3 binden, wenn K4 methyliert ist (dies ist nicht der Fall für H3-K9-Methylierung) (Zegerman et al., 2002).

Die Methylierung von **H3-K79** scheint daran beteiligt zu sein, die Ausbreitung von Heterochromatin zu verhindern (siehe auch Kapitel 2.4): In Hefe wurde beobachtet, dass Methylierung von K79 neben heterochromatischen Bereichen vorkommt und das

Ausbreiten des Heterochromatins behindert (Ng et al., 2003a). Dot1 ist die Methyltransferase, die diese Methylierung im globulären Teil des Histons H3 ausführt. Wenn K79 methyliert ist, können Sir-Proteine nicht binden. Wenn die Sir-Proteine jedoch an unmodifiziertes H3 gebunden haben, kann Dot1 K79 nicht methylieren, was zu hypomethyliertem H3 führt (van Leeuwen et al., 2002).

Ebenfalls in Hefe wurde entdeckt, dass die Ubiquitinylierung von H2B-K123 eine Voraussetzung für die Methylierung von H3-K4 durch den COMPASS-Komplex ist (Dover et al., 2002). Dies ist ein interessantes Beispiel dafür, dass es nicht nur zwischen einzelnen Modifikationen innerhalb eines Histons, sondern auch zwischen verschiedenen Histonen innerhalb eines Nukleosoms zu Wechselwirkungen und Beeinflussungen kommen kann.

### **2.7.3 METHYL-PHOSPHO-SWITCH-HYPOTHESE**

Die H3-K9-Methylierung ist wahrscheinlich ein sehr langlebiges Signal, und nicht ohne weiteres rückgängig zu machen. Eine Zelle könnte sich von diesem Signal, wie oben beschrieben, während Replikation oder Transkription durch Austausch des ganzen Histons befreien. Eine andere Möglichkeit wurde von Fischle und Allis geäußert: Eine Phosphorylierung am Serin 10, welches direkt neben dem Lysin 9 liegt, könnte die Methylierung unwirksam machen (Fischle et al., 2003a). *In vitro* wurde beobachtet, dass die Chromodomäne von HP1 nicht mehr an ein H3-Peptid binden kann, welches außer der K9-Methylierung eine Phosphorylierung am S10 aufweist (unpublizierte Mitteilung in Fischle et al., 2003a). Auf diese Art und Weise könnten Methylierungen „unsichtbar“ gemacht werden, die normalerweise über mehrere Zellgenerationen vererbbar sind (Ayyanathan et al., 2003).

Während der Mitose können beide Modifikationen, Methylierung an H3-K9 sowie Phosphorylierung an H3-S10, gleichzeitig auftreten (unpublizierte Mitteilung in Fischle et al., 2003a). Nach der Mitose dephosphoryliert PPI (Protein Phosphatase I) Serin 10 (Hsu et al., 2000). Beides sind Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung wirklich ein „Schalter“ sein könnte, der in beide Richtungen funktioniert, da diese Modifikation auch wieder entfernt werden kann.

Fischle und Allis halten die Idee eines Methyl-Phospho-Schalters für übertragbar auf andere Lysine. Betrachtet man die Sequenz des Histons H3, so erkennt man, dass mehrere Lysine entweder neben einem Serin oder einem Threonin liegen - beides Substrate für eine

Phosphorylierung. Das ist der Fall z.B. bei Thr3/Lys4, Lys27/Ser28, theoretisch auch bei Thr21/Lys22 sowie Lys79/Thr80 (dort wurde noch keine Phosphorylierung beobachtet).

### 2.7.4 EIN HISTON-CODE?

Kleine Unterschiede in Histonmodifikationen haben eine große Wirkung: Lysine die sehr nahe beieinanderliegen - wie z.B. H3-K4 und H3-K9 - können methyliert werden und haben dabei ganz unterschiedliche Funktionen. Die Methylierung tritt außerdem als Di- oder Trimethylierung auf, was ebenfalls unterschiedliche Bedeutungen haben kann. Früh wurde deswegen vorgeschlagen, dass es einen „Histon-Code“ geben müsse, in dessen Kontext jeder Modifikation bzw. jeder Kombination von Modifikationen eine bestimmte Rolle zukommen müsse (Strahl and Allis, 2000).

Es treten bestimmte Modifikationen immer im gleichen *Zusammenhang* auf, wie z.B. H3-K9-Methylierung und stillgelegtes Chromatin (siehe Kapitel 2.4). Andere Modifikationen treten immer *zusammen* auf, wie z.B. die Phosphorylierung von H3-S10 und H3-S28 während der Chromosomenkondensation in der Mitose (siehe Kapitel 2.5.3). Manche Modifikationen sind stark *dynamisch* und variieren während des Zellzyklus. Wieder andere Modifikationen könnten sich gegenseitig in der Wirkung *verstärken* ohne voneinander abzuhängen, wie die Acetylierung von H3-K9/14 und die Phosphorylierung von H3-S10 an *immediate early*-Genen (Thomson et al., 2001).

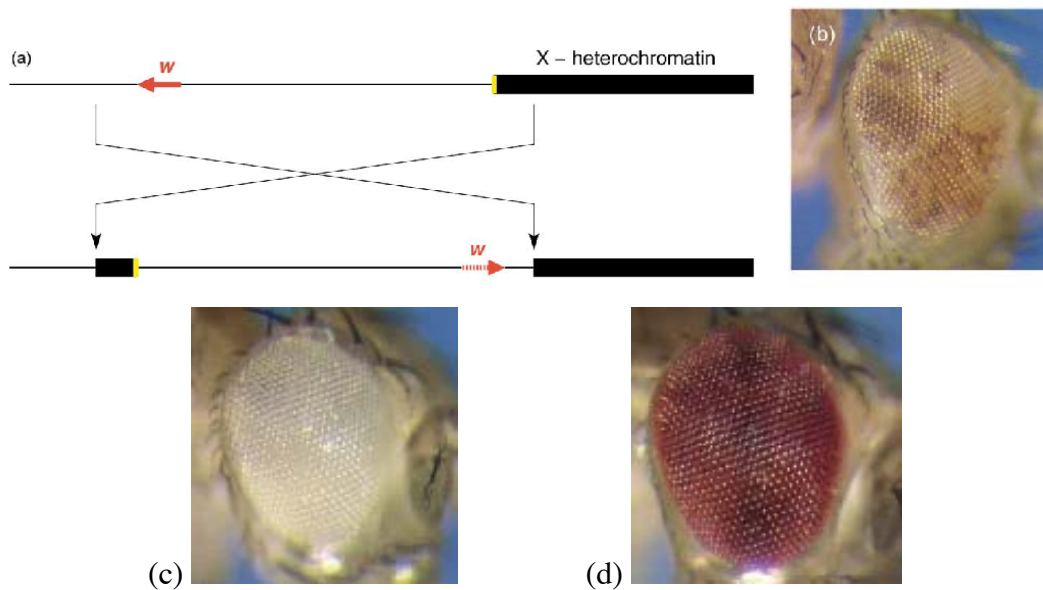
Ein Code impliziert, dass durch Neukombination von Modifikationen unterschiedliche Funktionen ausgeübt werden können. Für die Histonmodifikationen ist dies noch nicht abschließend nachgewiesen.

## 2.8 POSITION EFFECT VARIATION

*Position effect variegation* ist ein Phänomen, welches auftritt, wenn Gene durch in der näheren Umgebung liegendes Heterochromatin beeinflusst werden. Die ersten Untersuchungen hierzu hatte J. Müller vor ca. 75 Jahren angestellt, als er bemerkte, dass *Drosophila*-Fliegen statt roten rot-weiß-marmorierte (sogenannte „variierte“) Augen hatten, nachdem sie mit Röntgenstrahlen behandelt worden waren.

Es stellte sich heraus, dass das *white*-Gen für die Kontrolle der Augenpigmente zuständig ist. Normalerweise haben Fliegen rote Augen. Ist das *white*-Gen abgeschaltet, bilden sich keine Pigmente und die Fliege hat weiße Augen. Durch ein chromosomales Rearrangement kann das *white*-Gen an einen anderen Locus gebracht werden. Im Fliegenstamm *In(1)w<sup>m4</sup>*,

ausgesprochen „white mottled four“ (Muller, 1930) wurde es durch eine zufällige, Röntgenstrahl-induzierte Mutation in Form einer Inversion in die Nähe von pericentrischem Heterochromatin auf dem X-Chromosom plaziert (siehe Abb. 8a). Weiterführende Untersuchungen bestimmten die Bruchpunktstellen (Appels and Hilliker, 1982; Lefevre, 1976).



**Abb. 8:** (a) Durch eine Inversion kommt das *white*-Gen im Fliegenstamm  $In(1)w^{m4}$  in die Nähe von Heterochromatin. (b) Variegation des *white*-Gens im Stamm  $In(1)w^{m4}$ . Das stillgelegte Gen äußert sich durch weiße Farbe in manchen Augenzellen. (c) Weißes Auge zum Vergleich. (d) Rotes Auge zum Vergleich (Schotta et al., 2003a).

In manchen Augenzellen wird dieses Gen nun stillgelegt: Das ist der Fall, wenn sich das Heterochromatin über das benachbart liegende *white*-Gen hinweg ausbreitet. Da die Stilllegung je nach Augenzelle verschieden ist, resultiert eine Fliege, die rot-weiß-gesprenkelte bzw. marmorierte Augen hat (siehe Abb. 8b). Dies nennt man auch variierte Expression. Der *silencing*-Effekt wird stabil über viele Zellteilungen hinweg vererbt. Die Lebensfähigkeit der Fliegen wird dadurch nicht beeinträchtigt, da keiner der beiden Bruchpunkte in wichtigen Genen liegt (Schotta et al., 2003b).

*Position effect variegation* kann man auch in Säugern und in Hefe beobachten (Dillon and Festenstein, 2002). In Mäusen werden CD2- und  $\beta$ -Globin-Gene weiterhin exprimiert, wenn man sie in heterochromatische Regionen bringt. Erst nachdem die darin enthaltenen

Locus-Kontroll-Regionen teilweise deletiert worden waren, stellte sich der Positionseffekt ein (Festenstein et al., 1996; Milot et al., 1996).

*Drosophila*-Fliegen, die eine solche variierte Expression des *white*-Gens aufweisen, kann man dazu benutzen, um nach anderen Proteinen zu suchen, welche die Variegation entweder verstärken (*enhancer*) oder abschwächen (*suppressor*). Hierdurch kann man Proteine identifizieren, die Einfluß auf das Heterochromatin und dessen Struktur haben. Schon Muller hatte bemerkt, dass der variierte Phänotyp der Fliegen extrem empfindlich auf modifizierende Faktoren reagiert. Bestimmte Unter-Stämme des  $w^{m4}$ -Stammes eignen sich dazu besonders gut, z.B. der  $w^{m4h}$ -Stamm (Reuter et al., 1985). Es wird nach dominanten Modifiern des Positionseffektes gesucht. Dies geschieht folgendermaßen: Hat die Fliege nach einer Mutagenese mehr weiße Segmente im Auge als der rot-weiße Vergleichsstamm (z.B. ganz weiße Augen wie in Abb. 8c), so nennt man zunächst die Mutante *Enhancer of PEV* oder kurz E(var). Hat die Fliege „röttere“ Augen (z.B. wie in Abb. 8d), wenn ein bestimmtes Gen mutiert ist, so spricht man von einem Suppressor der PEV (also Su(var)) (Reuter and Spierer, 1992). In letzterem Fall geht man davon aus, dass das nicht mutierte Protein das Ausbreiten des Heterochromatins fördert, was in einer Stilllegung des *white*-Gens resultieren würde. Da nun das mutierte Protein diesen Effekt nicht mehr haben kann, breitet sich das Heterochromatin nicht aus und die Augen bleiben rot.

In Anlehnung an die Benennung der Mutanten als E(var) und Su(var) nennt man auch die unmutierten Gene und Proteine dann E(var) und Su(var).

Su(var)3-9 kann zusammen mit Su(var)2-5 und Su(var)3-7 in eine von vier Dosis-Klassen eingeteilt werden (Reuter and Szidonya, 1983). Die drei Proteine gehören der Gruppe der Haplo-Suppressor-Loci, die einen Triplo-Enhancer-Effekt zeigen, an (Reuter and Szidonya, 1983). Das bedeutet, wenn nur eine Kopie von z.B. Su(var)3-9 im Genom vorhanden ist statt zwei, reduziert sich der Positionseffekt, und wenn drei Kopien davon vorhanden sind, verstärkt sich der Effekt. Die Idee eines Massen-Aktions-Modelles (*mass-action-model*) entwickelte sich (Locke et al., 1988): In diesem Modell wird Heterochromatin als Multimer-Protein-Komplex angesehen, der von der Konzentration der einzelnen Komponenten abhängig ist.

Durch Klonierungen wurde festgestellt, dass diese drei Gene (Su(var)3-9, 2-5 sowie 3-7) Heterochromatin-assoziierte Proteine codieren (Cleard et al., 1997; Fanti et al., 1998; James and Elgin, 1986; Schotta and Reuter, 2000).

Insgesamt wurden ca. 150 Gene als E(var)- bzw. Su(var)-Stämme mit dem *In(1)w<sup>m4</sup>* Fliegenstamm isoliert (Schotta et al., 2003a). Jedoch sind noch nicht alle E(var)s und Su(var)s identifiziert.

## 2.9 SU(VAR)3-9 UND HP1

Su(var)3-9 (und dessen homologes Hefe-Protein Clr4) waren die ersten Histon-Methyltransferasen, die kloniert wurden (Rea et al., 2000; Tschiersch et al., 1994). Beide methylieren Lysin 9 in H3. Ursprünglich war das Protein in genetischen *screens* entdeckt worden, die nach Suppressoren von *position effect variegation* suchten. In diesen wurde Su(var)3-9 als dominanter Suppressor von PEV identifiziert (Tschiersch et al., 1994).

Das Protein besitzt eine SET-Domäne, die nahe dem C-Terminus des Proteins liegt. Neben der SET-Domäne von Su(var)3-9 liegt eine cysteinreiche prä-SET-Domäne (Rea et al., 2000), welche für die Enzymaktivität wichtig ist. Eine weitere konservierte Domäne in Su(var)3-9 ist die Chromodomäne, siehe Abb. 9.



Abb. 9: Schematische Darstellung von *Drosophila* Su(var)3-9.

Die Gesamtlänge des Proteins aus *Drosophila* beträgt 635 Aminosäuren. In *Drosophila* und anderen Insekten hat Su(var)3-9 mit dem eukaryontischen Transkriptions-Initiationsfaktor eIF2 $\gamma$  ein alternativ gespleißtes Exon gemeinsam (Krauss and Reuter, 2000), so dass das Protein in Säugern kürzer ist (Aagaard et al., 1999).

Außerdem existiert neben dem Protein SUV39H1 in Säugern noch eine Testis-spezifische Version, genannt SUV39H2 (O'Carroll et al., 2000). Dieses testis-spezifisch exprimierte Protein ist zu 59% mit SUV39H1 identisch und besitzt eventuell redundante Funktionen, weist aber einen stark basischen N-Terminus auf (Zhang and Reinberg, 2001).

SUV39H1 kann zellzyklusabhängig phosphoryliert werden; man findet Phosphogruppen v.a. am C-Terminus (Aagaard et al., 2000; Firestein et al., 2000). Auch vor, in und nach der Chromodomäne kann das Protein phosphoryliert werden.



Su(var)3-9 interagiert über seinen N-Terminus mit Su(var)2-5 (auch genannt HP1, siehe weiter unten) (Aagaard et al., 1999; Schotta et al., 2002) und in Yeast-2-Hybrid-Studien mit dem C-Terminus von Su(var)3-7 (Schotta et al., 2002).

SUV39H1 reprimiert die Transkription, wenn es über eine Gal4-DNA-Bindedomäne an DNA gebunden wird (Firestein et al., 2000). SUV39H1 kann über mehrere hundert Kilobasen hinweg als Repressor wirken und dabei basale Promotoren stilllegen.

Während der Mitose, genauer gesagt während der Prometaphase, assoziiert SUV39H1 vorübergehend mit Zentromeren, dissoziiert aber während des Übergangs von der Meta- zur Anaphase wieder (Aagaard et al., 2000). Die Chromo- und HP1-Interaktions-Domäne von SUV39H1 wurden schon früh dafür verantwortlich gemacht, dass das Protein im allgemeinen mit Heterochromatin assoziiert ist (Melcher et al., 2000).

*Drosophila* Su(var)3-9 findet sich in Immunfluoreszenzexperimenten hauptsächlich im Heterochromatin des Chromozenters und am vierten Chromosom. Außerdem befindet es sich an Telomeren und wenigen euchromatischen Stellen (Schotta et al., 2002; Schotta et al., 2003b).

SUV39H1 und HP1 wurden auch an bestimmten euchromatischen Stellen beobachtet. SUV39H1 geht mit dem Tumorsuppressorprotein Rb eine Assoziation ein (Vandel et al., 2001). Rb wiederum kann mit E2F wechselwirken, ein DNA-bindendes Protein, welches an den Cyclin-E-Promoter bindet. Auf diese Art und Weise wird SUV39H1 über Rb an diesen Promoter gebracht und methyliert dort die Histone, was für die Regulation des Promoters *in vivo* von Bedeutung ist (Nielsen et al., 2001).

Bei Überexpression von SUV39H1 in Zellen kommt es zu schweren Defekten in der Mitoseprogression und der Chromosomensegregation (Melcher et al., 2000).

Wird SUV39H1 in Mäusen überexprimiert, zeigen die transgenen Mäuse Wachstumsverzögerung und Störungen in der Erythrozytendifferenzierung (Czvitkovich et al., 2001). Mäuse, denen entweder SUV39H1 oder H2 fehlt, sind normal in ihrer Entwicklung. Mäuse, die weder das eine noch das andere Protein exprimieren (Doppelnulmutanten), sind in ihrem Wachstum verzögert, sterben oft sogar vor der Geburt, und die Männchen sind unfruchtbar und leiden an Hypogonadismus (Peters et al., 2001). Es kommt auch zu chromosomalen Instabilitäten, da die Chromosomensegregation gestört ist. Infolgedessen ist auch das Tumorrisiko erhöht, besonders dasjenige der B-Zellen (Peters et al., 2001).

Das an K9 methylierte Histon H3 stellt eine Bindungsstelle für HP1 dar, das Heterochromatin-Protein 1 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). HP1 ist ebenfalls ein Suppressor von PEV, genannt Su(var) 2-5 (Eissenberg et al., 1990). Das Gen wurde mit Hilfe eines Antikörpers kloniert, der gegen eine Fraktion von Kernproteinen aus *Drosophila* gerichtet war (James and Elgin, 1986). Dieser Antikörper bindet bevorzugt an Heterochromatin.

HP1 ist ein 201 Aminosäuren langes Protein, das eine N-terminalen Chromodomäne sowie eine C-terminale Chromo-Shadow-Domäne besitzt. Dazwischen liegt eine Verbindungsregion (*hinge region*). HP1 bindet über die Chromodomäne an das methylierte Lysin 9 im Histon H3 (Bannister et al., 2001). Dabei wurde festgestellt, dass es das trimethylierte Lysin gegenüber dem dimethylierten Lysin bevorzugt (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002). Wird HP1 in der Chromodomäne mutiert (V26M), so kann es nicht mehr an methyliertes Lysin 9 binden und verliert auch seine Funktion im *silencing* (Jacobs et al., 2001). Die V26M-Mutation ist diejenige Mutation, über die HP1 als Su(var)2-5 identifiziert wurde.

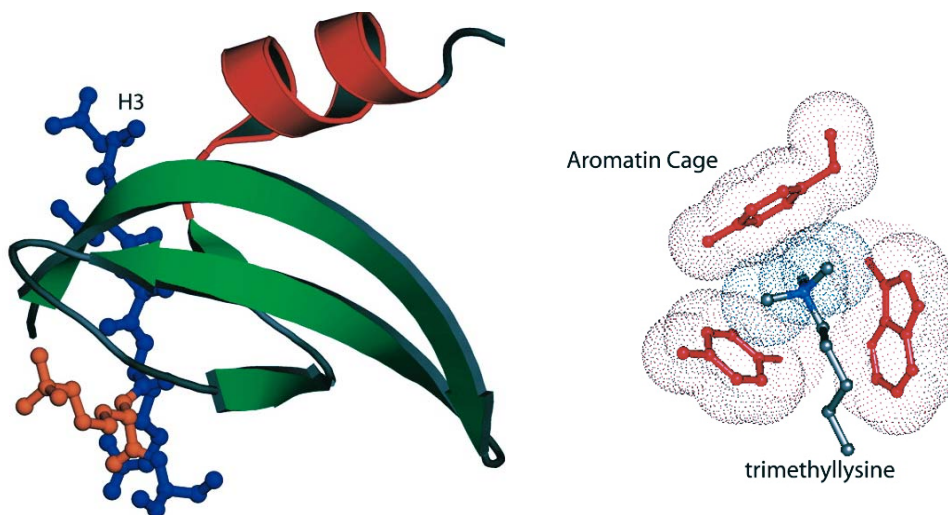
Während die Chromodomäne also dazu dient, mit Histonen zu interagieren, ist die Chromo-Shadow-Domäne die Dimerisationsdomäne (Brasher et al., 2000; Smothers and Henikoff, 2000; Wang et al., 2000; Ye et al., 1997). Die dazwischenliegenden *hinge*-Domäne kann, zumindest in einer *Xenopus*-Isoform, DNA binden (Meehan et al., 2003). In Yeast-2-Hybrid-Tests wurde die Interaktion mit Su(var)3-9 auf die Chromo-Shadow-Domäne zurückgeführt (Schotta et al., 2002). Außerdem wurde berichtet, dass die Chromo-Shadow-Domäne mit Su(var)3-7 interagiert (Delattre et al., 2000) sowie mit p150 und CAF1 (Murzina et al., 1999). Die Interaktion mit dem Origin Recognition Complex benötigt hingegen Chromo- und Chromo-Shadow-Domäne (Pak et al., 1997). Interessanterweise fand man HP1 über seine Chromo-Shadow-Domäne mit dem Lamin-B-Rezeptor assoziiert, einem Bestandteil der inneren Kernmembran (Ye et al., 1997; Ye and Worman, 1996).

HP1 kann phosphoryliert werden (Eissenberg et al., 1994). Die Phosphorylierung ändert die DNA-Bindungseigenschaften von HP1, und es wurde vorgeschlagen, dass die dynamische Phosphorylierung und Dephosphorylierung von HP1 die *silencing*-Aktivität des Proteins regulieren: Ohne Phosphorylierung geht die *silencing*-Eigenschaft verloren (Zhao et al., 2001).

Die Deletion von HP1 in *Drosophila* ist letal (Eissenberg et al., 1992). Man beobachtet fehlgesteuerte Genregulation und mitotische Defekte (Eissenberg and Hartnett, 1993; Fanti et al., 1998).

In Chromosomenfärbungen von *Drosophila* tritt HP1 entlang des vierten Chromosoms, an den Telomeren und in der Nähe von Zentromeren auf (Fanti et al., 2003; James et al., 1989).

Die Chromodomäne von HP1 wurde zusammen mit einem methylierten Peptid, welches die Sequenz des H3-N-Terminus (AA 1-15) besitzt, kristallisiert (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002; Nielsen et al., 2002). Man fand heraus, dass der Histon-*tail* als  $\beta$ -Strang zwischen anderen  $\beta$ -Strängen der Chromodomäne liegt, die wie ein Sandwich angeordnet sind (Abb. 10 links). Die Methylammoniumgruppe des Lysins wird von drei aromatischen Seitenketten der Chromodomäne wie durch einen Käfig umgeben (Abb. 10 rechts). Die Bindung der Chromodomäne tritt nur auf, wenn das Peptid methyliert ist, da die Chromodomäne an keine natürlich auftretende Peptidsequenz bindet (Smothers and Henikoff, 2000).



**Abb. 10:** Links: HP1-Chromodomäne mit H3 Peptid (blau), welches an K9 methyliert ist (Methyllysin orange dargestellt). Rechts: Ein aromatischer Käfig umgibt das Methyllysin (Khorasanizadeh, 2004).

Die Affinität von HP1 zum methylierten H3-K9-Peptid ist nicht sehr stark: Die Dissoziationskonstanten  $K_D$ , wie sie durch isothermale Kalorimetrie bestimmt wurde, liegt bei 2,5  $\mu\text{M}$  für das trimethylierte Peptid und 7  $\mu\text{M}$  für das dimethylierte Peptid (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002). Von einer andere Gruppe wurde eine  $K_D$  für das dimethylierte Peptid von 0,7 $\mu\text{M}$  gemessen (Nielsen et al., 2002). Zu diesen relativ hohen

Dissoziationskonstanten passt, dass HP1 dynamische Bindung an Heterochromatin zeigt, das heisst es kann innerhalb kurzer Zeit ausgetauscht werden (Cheutin et al., 2003; Festenstein et al., 2003).

Su(var)3-9 und HP1 stellen ein interdependentes System dar (Schotta et al., 2002): Durch HP1 erfolgt die Assoziation von Su(var)3-9 mit Heterochromatin, und HP1 bindet nur an H3-K9, welches zuvor methyliert worden ist. Deletiert man HP1, so verteilt sich Su(var)3-9 auch über euchromatische Regionen und methyliert dort die Histone. In Su(var)3-9-Nullmutanten hingegen beobachtet man kaum mehr HP1 innerhalb des Heterochromatins am Chromozenter, sowie reduzierte H3-K9-Methylierung. Su(var)3-9 scheint die Methyltransferase zu sein, die hauptsächlich für die Bildung von Heterochromatin zuständig ist (Schotta et al., 2002). Da jedoch eine Deletion von Su(var)3-9 nicht letal ist, müssen noch andere Methyltransferasen vorhanden sein, die die gleichen Aufgaben übernehmen können.

## **2.10 DIE FRÜHE ENTWICKLUNG VON *DROSOPHILA***

### **2.10.1 DER BEGINN DER ENTWICKLUNG**

Nach der Befruchtung eines *Drosophila*-Eies kommt es zu einer Serie von Kernteilungen ohne Zellteilung. Dadurch entsteht eine grosse Zelle mit 512 Kernen, genannt Syncytium (Gehring, 1987). Die meisten Kerne wandern in die Peripherie und bilden dort ein einschichtiges syncytiales Blastoderm. Nach weiteren vier Kernteilungen stülpt sich die Plasmamembran ein und umhüllt jeden Kern, so dass viele einzelnen Zellen entstehen. Diese Struktur nennt man nun zelluläres Blastoderm: Sie besteht aus ca. 6000 Zellen. Am posterioren Ende des Embryos sind ein paar Kerne von dem Blastoderm abgesetzt, sie sind die Vorläufer der Keimbahnzellen (primordiale Keimzellen).

Bis zum Stadium des zellulären Blastoderms hängt die Entwicklung von Vorräten an maternaler mRNA und eingelagerten Proteinen ab. Während der schnellen Zellteilungen am Anfang ist kaum Zeit für Transkriptionsaktivität. Die Transkription nimmt erst zu, wenn die Zellularisierung des Blastoderms abgeschlossen ist.

Während der Gastrulation wandern Teile der außen liegenden Zellen in das Innere des Embryos ein. Daraus entsteht später Darm, Muskulatur und weitere innere Gewebe. An einem anderen Bereich des Embryos wandert etwas später eine weitere Gruppe in das Innere, um dort das zentrale Nervensystem auszubilden.

Im Inneren des Embryos bleiben Gruppen von Zellen scheinbar undifferenziert: Sie bilden Imaginalscheiben aus und bringen später die Strukturen des erwachsenen Tieres (Imago) hervor.

### 2.10.2 DIE FESTLEGUNG VON ACHSEN UND SEGMENTEN

Die Hauptachsen des Insektenkörpers werden vor der Befruchtung festgelegt, indem die Oocyte durch die sie umgebenden Follikelzellen Signale erhält. In diesen Stadien wird die anterior-posteriore sowie die dorsoventrale Achse festgelegt. Dafür sind die *egg-polarity*-Gene verantwortlich. Sie sind maternal bestimmt und bilden initiale Gradienten aus (Nusslein-Volhard, 1979).

Zu den *egg-polarity*-Genen gehören vier Faktoren: Die mRNAs *nanos* und *bicoid* sowie die Transmembranrezeptoren *Torso* und *Toll*.

Die *bicoid*-mRNA wird am vorderen Ende des Eies abgelegt (siehe Abb. 11). Nach der Befruchtung wird das Protein hergestellt. Das *bicoid*-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos aktivieren oder reprimieren kann. Das Maximum des *bicoid*-Gradienten befindet sich am anterioren Ende (Driever and Nusslein-Volhard, 1988a; Driever and Nusslein-Volhard, 1988b).

Am anderen Ende des Embryos werden die *Nanos*-mRNA (Wang and Lehmann, 1991) und das Protein „Oskar“ abgelegt. Aus dem speziellen Plasma am posterioren Ende des Embryos entsteht später das Cytoplasma der Keimbahnzellen. *Nanos* bildet ebenfalls einen Gradienten aus, mit Maximum am posterioren Ende (siehe Abb. 11). Die Anwesenheit von *nanos* inhibiert die Translation der *bicoid*-mRNA (Payre et al., 1994).

Die beiden Rezeptoren *Torso* und *Toll* sind über die gesamte Cytoplasmamembran verteilt (Morgan and Mahowald, 1996). Sie werden in speziellen Bereichen durch extrazelluläre Signale kurz nach der Fertilisation aktiviert: *Torso* im posterioren und anterioren Bereich, und *Toll* im ventralen Bereich (siehe Abb. 11). *Torso* markiert die Stellen der Terminalstrukturen, die sich am Kopf- und Schwanzende der Larve bilden werden; es ist also an der Ausbildung des Terminalsystems beteiligt. *Toll* hingegen ist für die Ausbildung der dorso-ventralen Polarität des Embryos verantwortlich.

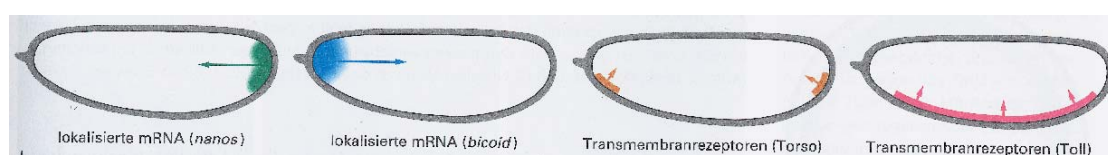


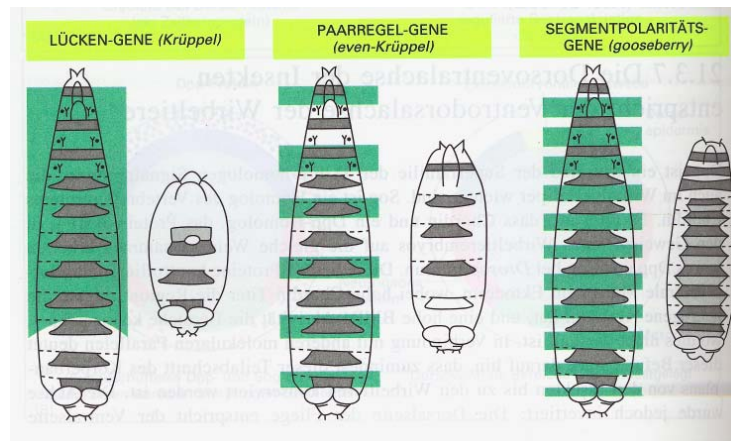
Abb. 11: Die vier Gradientensysteme, die das Ei polarisieren (Alberts et al., 2004).

Die Aktivierung des *Toll*-Rezeptors an der Ventralseite kontrolliert die Verteilung von *Dorsal*. Dieses Protein, das sich normalerweise inaktiv im Cytoplasma aufhält, wandert in den ventral gelegenen Zellen in den Zellkern, in den dorsal gelegenen Zellen bleibt es im Cytoplasma (Rushlow et al., 1989). Hierdurch bildet sich ein weiterer Gradient aus. Im Zellkern schaltet *Dorsal* verschiedene Gene entweder ab oder an; dies hängt von seiner spezifischen Konzentration im jeweiligen Kern ab. Hohe Konzentrationen von *Dorsal* bewirken beispielsweise die Expression des Gens *twist*, niedrige Konzentrationen die Expression von *decapentaplegic (dpp)*. Hohe Konzentration von *dpp* sind verantwortlich für die Entwicklung der extraembryonalen Membran, mittlere Konzentrationen sind beteiligt an der Entwicklung des dorsalen Ektoderms, niedrige Mengen erlauben die Ausbildung des neurogenen Ektoderms. Dies ist ein Beispiel dafür, wie ein initiales Signal die Ausbildung mehrerer sukzessiver Gradienten beeinflusst, die wiederum eine Rolle in der Organbildung spielen.

Nachdem die anterior-posteriore Achse festgelegt ist, verfeinern die *segmentation*-Gene das Muster, das durch die *egg-polarity*-Gene etabliert wurde (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Sie sind die ersten Genprodukte des Embryos. Man unterteilt sie in *gap*, *pair-rule*- und *segment-polarity*-Gene. Die meisten der *segmentation*-Gene codieren für genregulierende Proteine.

Die *gap*-Gene werden, kontrolliert durch die *egg-polarity*-Gene, nur in bestimmten Regionen exprimiert. Sie sind für die grobe Untergliederung des Embryos zuständig. Mutiert man diese Gene, fehlen der Larve ein oder mehrere Segmente. Beispielsweise bewirkt eine Mutation in dem Gen „Krüppel“, dass der Larve die hinteren Segmente vollständig fehlen (siehe Abb. 12).

Anschließend werden die *pair-rule*-Gene aktiviert. Mutiert man diese Gene, werden alternierende Segmente deletiert, so dass die Larve nur die Hälfte der üblichen Segmentzahl besitzt (siehe Abb. 12). Innerhalb dieser Gengruppe gibt es jedoch Unterschiede: Manche davon betreffen die geradzahligen Segmente (wie z.B. *even-skipped* (Macdonald et al., 1986), andere die ungeradzahligen (z.B. *fushi tarazu* – die japanische Übersetzung dafür heißt „nicht genug Segmente“ (Wakimoto et al., 1984)), wieder andere betreffen gleich dicke Segmente (z.B. *hairy*).



**Abb. 12: Phänotypen, die durch Mutationen in den Segmentierungs-Genen zustande kommen (Alberts et al., 2004).** Grün unterlegte Bereich in der jeweils linken Darstellung sind in der Mutante (rechts) deletiert oder durch ein spiegelbildliches Duplikat ersetzt.

Die dritte Gruppe von aktivierten Genen sind die *segment-polarity-Gene* (Gehring and Hiromi, 1986). Mutationen in diesen Genen führen dazu, dass die Segmentzahl korrekt ist, jedoch innerhalb eines Segmentes eine Hälfte fehlt, die durch Spiegelung eines Restsegmentes ersetzt wird. Ein Beispiel hierfür ist das Gen *gooseberry* (siehe Abb. 12).

Der initiale Gradient entlang der anterior-posterioren Achse führt also dazu, dass es zu einer geordneten Expression der *gap*-Gene kommt, was wiederum zu einer Expression der *pair-rule*-, *segment polarity*- sowie anschließend der homöotischen Gene (siehe folgendes Kapitel) führt. Durch diese hierarchisch geordneten Signale kommt es in einigen Teilen des Embryos zur Expression der Gene, in anderen nicht. Die fortschreitende Untergliederung des Embryos resultiert in der folgenden Segmentierung: Drei Kopf-, drei Thorax- und ungefähr 10 Abdominalsegmente (Gehring, 1987).

### 2.10.3 DIE HOMÖOTISCHEN GENE

Die homöotischen Gene liegen in ähnlicher Form in fast allen Tieren und auch dem Menschen vor (Carrasco et al., 1984; Levine et al., 1984; McGinnis et al., 1984b). Deren Genprodukte verleihen den Zellen bzw. Segmenten „Identität“, regeln die korrekte Abfolge der Segmente und spielen eine Rolle in der Ausbildung des anterior-posterioren Achse. Die erste homöotische Mutation wurde schon 1915 entdeckt (Bridges and Morgan, 1923). Homöotische Mutationen transformieren bestimmte Körperteile oder ein ganzes Körpersegment in die entsprechenden Strukturen anderer Körperteile, und ändern dadurch

den Aufbau des ganzen Organismus (Gehring, 1987). Ist z.B. das *Antennapedia*-Gen mutiert, so dass es fälschlicherweise im Kopfbereich exprimiert wird, sind die normalerweise am Kopf auftretenden Antennen in Beine umgewandelt (Struhl, 1981b). Die meisten *Antennapedia*-Mutationen sind durch chromosomale Inversionen verursacht, die das 5'-Ende des Gens von der codierenden Sequenz trennen (Gehring, 1987). Wird das *Antennapedia*-Gen unter die Kontrolle eines *heat-shock*-Promoters gebracht und das Protein nach einem Hitzeschock der Larven überexprimiert, so findet sich statt einer Antenne ein Bein am Kopf der erwachsenen Fliegen (Schneuwly et al., 1987).

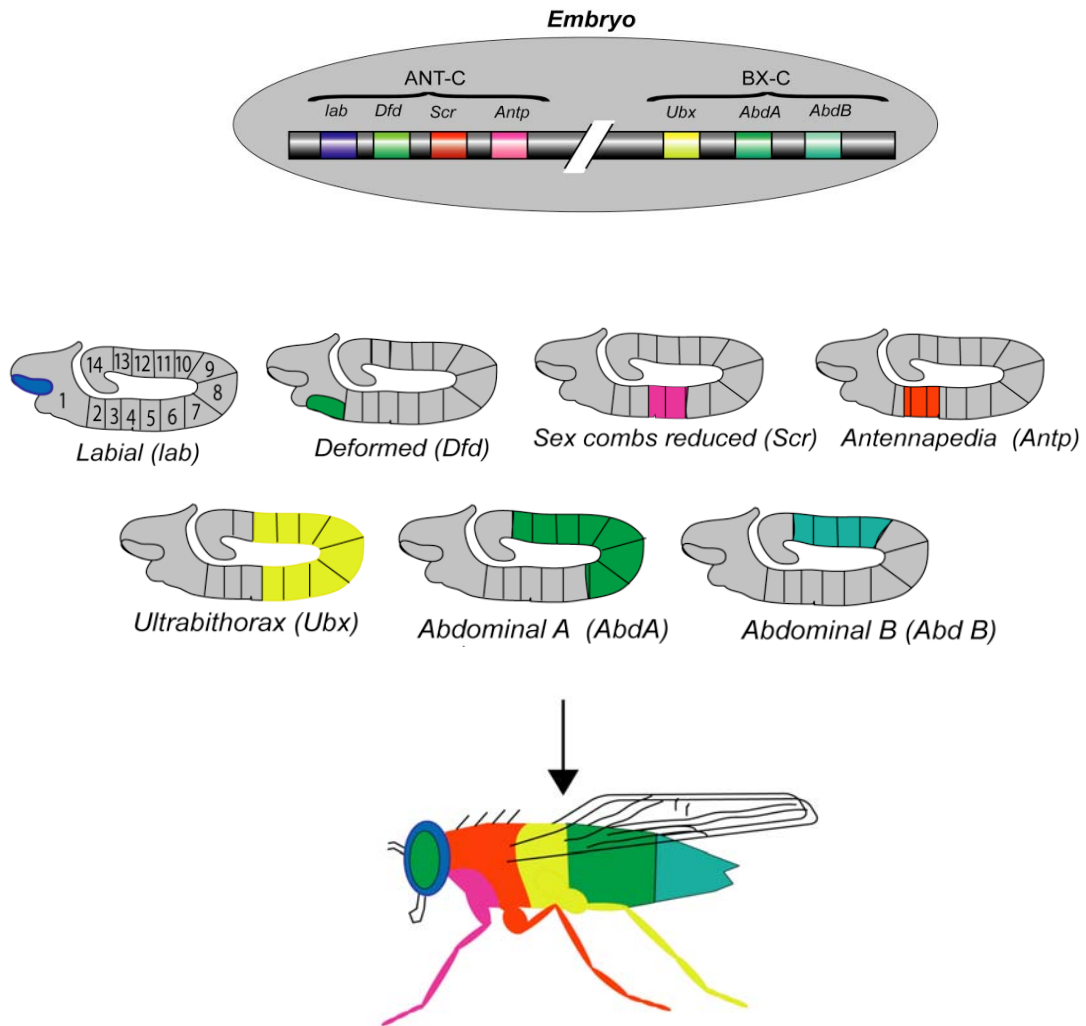
Die acht homöotischen Gene liegen bei *Drosophila* in zwei Genclustern vor, dem Bithorax-Komplex sowie dem *Antennapedia*-Komplex. In Wirbeltieren findet man 38 homöotische Gene, die in vier Clustern organisiert sind (Graham et al., 1989).

Die Gene des Bithorax-Komplexes kontrollieren in *Drosophila* die Unterschiede zwischen den Abdominal- und Thorakalsegmenten (Lewis, 1978), und die Gene des *Antennapedia*-Komplexes kontrollieren die Unterschiede zwischen Thorax- und Kopfsegmenten (Kaufman, 1983).

Die homöotischen Gene codieren für genregulierende Proteine, welche alle eine hochkonservierte, 180 bp lange DNA-Bindungsdomäne haben, die sogenannte „Homöodomäne“ bzw. „Homöobox“/„Hox“ (Desplan et al., 1985; McGinnis et al., 1984a). Deshalb werden die Gene, die für diese Faktoren codieren, zusammenfassend als Hox-Gene bezeichnet.

Entlang des Chromosoms liegen die Homöobox-Gene geordnet vor: Ihre Reihenfolge entspricht auch der Reihenfolge, in der sie entlang der Körperachse des Embryos exprimiert werden (siehe Abb. 13 oben und Mitte). Normalerweise dominiert das weiter posterior liegende Gen die vorherigen, so dass das letzte aktive Gen den Charakter des Segments bestimmt (Gehring, 1987). Die Anordnung und Expression der homöotischen Gene bei anderen Tieren entspricht demselben Muster wie bei *Drosophila*.





**Abb. 13: Oben: Schematische Darstellung der Anordnung der homöotischen Gene in *Drosophila*.** Diese sind unterteilt in den Antennapedia-Komplex (ANT-C) sowie den Bithorax-Komplex (BX-C). **Mitte: Expression der einzelnen Proteine in den verschiedenen Segmenten.** **Unten: Kontrolle der Fliegenkörperteile durch die einzelnen homöotischen Gene.**

Das Expressionsmuster der Hox-Gene wird sehr früh in der Entwicklung des Organismus durch die Segmentationsgene festgelegt, und bleibt während der ganzen Entwicklung erhalten. Da die Produkte der Segmentationsgene aber nach kurzer Zeit verschwinden, benötigt die Zelle andere Proteine, die die Expression der homöotischen Gene aufrechterhalten oder unterdrücken. Diese Funktion wird von den Polycomb- und Trithorax-Proteinen übernommen. Polycomb-Gruppen-Proteine (PcG) halten die Expression der homöotischen Gene in abgeschaltetem Zustand, während die Trithorax-Gruppen-Proteine (TrxG) homöotische Gene im angeschalteten Zustand halten. So erhalten die Zellen ein „Langzeitgedächtnis“, das ihnen während der fortschreitenden Entwicklung

den Ort entlang der Körperachse signalisiert. Nicht nur die segmentspezifische Identität der Larvensegmente, sondern auch die Strukturen der erwachsenen Fliege werden durch dieses Gedächtnis gesteuert (siehe Abb. 13 unten).

## 2.11 PCG PROTEINE

PcG Proteine sind transkriptionelle Repressoren (TrxG Proteine hingegen Aktivatoren), die das Expressionsmuster, welches durch die Segmentationsgene etabliert wurde, aufrechterhalten. PcG-Proteine werden schon maternal vererbt, aber ihre Anwesenheit während der frühen Entwicklung verhindert nicht die initiale Expression der homöotischen Gene. Ihr *silencing*-Aktivität wird erst während der Gastrulation detektierbar, und dann werden nur solche homöotischen Gene stillgelegt, die zu dieser Zeit nicht aktiv sind (Pirrotta et al., 2003).

Bisher wurden ca. 15 PcG-Mitglieder entdeckt, die allerdings nicht durch ein gemeinsames Strukturmotiv oder eine gemeinsame Domäne verbunden sind, sondern durch ihre Funktion (Simon, 2003).

PcG Proteine erhalten den reprimierten Status der von ihnen kontrollierten Gene über eine lange Zeit und über viele Zellteilungen hinweg. Dadurch halten sie die Gene in abgeschaltetem Zustand, während der Entwicklung oder über verschiedene Entwicklungsstufen hinweg. Dieses epigenetische Phänomen wurde transkriptionelles oder Chromatin-Gedächtnis benannt (Cavalli and Paro, 1998).

Wenn man die PcG Proteine wegnimmt, dann sind deren Zielgene dereprimiert. Das kann sich z.B. darin äußern, dass sich vordere Körpersegmente wie das am weitesten hinten gelegene entwickeln, also einen posterioren Charakter annehmen. Schwache Mutationen in PcG Proteinen bewirken oft, dass sich das zweite und dritte Beinpaar wie das erste entwickeln. Das erste Paar ist normalerweise mit sogenannten "Sex combs" ausgestattet. Bei einer schwachen PcG Mutation entwickeln oft die hinteren Beinpaare ebenfalls diese sex combs. Daher kommt der Name "Polycomb".

Um die Homöoboxgene kontrollieren zu können, müssen die PcG und TrxG Proteine mit der DNA interagieren. Überraschenderweise wurden bisher zwar in *Drosophila* DNA-Sequenzen gefunden, die Bindungsstellen für PcG und TrxG Proteine darstellen können (Zink et al., 1991), aber bis jetzt wurden sehr wenige DNA-bindenden Proteine unter den PcG-Proteinen entdeckt. Neben PHO (Pleiohomeotic) ist dies z.B. Pho-like (Phol) (Wang et al., 2004). Ein weiteres Protein, über welches PcG Proteine an DNA binden könnten, ist

das TrxG Protein GAGA (auch genannt Trithorax-like) (Farkas et al., 1994). Neben diesen Proteinen muss es noch weitere geben, da auch DNA-Sequenzen, die keine Bindungsstellen für PHO oder GAGA enthalten, Pc-Proteine rekrutieren können (Horard et al., 2000).

Die DNA-Bindungsstellen werden PREs genannt, dies steht für *polycomb response element* (Lyko and Paro, 1999). Manchmal werden sie auch als „CMM“ bezeichnet, als *cellular memory module*. Innerhalb des Bithorax-Komplexes gibt es ein DNA-Element namens Fab-7, an dem Polycomb und der GAGA-Faktor kolokalisieren. Dieses Fab-7-Element scheint ein solches *memory module* zu sein, da es bei benachbarten Regionen das *silencing* induziert, nach einer Aktivierung aber in diesem aktivierten Zustand bleibt: Sein Zustand scheint mitotisch vererbbar zu sein (Cavalli and Paro, 1998).

Zu den PcG-Proteinen gehören z.B. neben Polycomb (Pc) (Paro and Hogness, 1991) auch Polyhomeotic (Ph) (DeCamillis et al., 1992; Dura et al., 1985), Enhancer of Zeste (E(Z)) (Jones and Gelbart, 1990; Jones and Gelbart, 1993), Extra-sex combs (Esc) (Struhl, 1981a), Posterior Sex Combs (Psc) (Adler et al., 1991; Brunk et al., 1991; Martin and Adler, 1993), Polycomblike (Pcl) (Duncan, 1982), Scm (Sex combs on mid leg) (Bornemann et al., 1996), Sce (Sex combs extra) (Fritsch et al., 2003), Pho (Pleiohomeotic) (Brown et al., 1998), Scr (sex combs reduced) (Reuter and Scott, 1990) und asc (additional sex combs) (Sinclair et al., 1998). Trithorax-Gruppen-Proteine sind z.B. Trithorax (Trx) (Breen and Harte, 1991; Ingham, 1985), Brahma (Brm) (Tamkun et al., 1992), Ash 1 und 2 (Absent, small or homeotic discs) (Tripoulas et al., 1994), Trl (Trithorax-like = GAGA) (Farkas et al., 1994) und Moira (Brizuela and Kennison, 1997; Harding et al., 1995).

PcG-Proteine treten in Komplexen auf, die stark konserviert zwischen verschiedenen Species sind (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Muller et al., 2002).

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Komponenten von verschiedenen PcG-Komplexen, die bis jetzt charakterisiert wurden.

<b>2 MDa PRC1 (PRC 1)</b>	<b>1 MDa E(Z)-ESC-Komplex</b>	<b>600 kDa-E(Z)-ESC-Komplex (= PRC2)</b>	<b>PRC3</b>
PC, (PCL) PH, PSC SCM, HSC4 Zeste, dSbf1, dRing1 Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie z.B. TAFs	E(Z) ESC p55 SU(Z)12 RPD3 PCL	E(Z) ESC p55 SU(Z)12 (RPD3) (PHO?)	Ezh2 2 x Eed RbAp46/48 Su(z)12
(Shao et al., 1999)	(Tie et al., 2001) (Tie et al., 2003)	(Ng et al., 2000) (Poux et al., 2001a) (Poux et al., 2001b)	(Kuzmichev, 2004)

**Tabelle 3: Übersicht über verschiedene publizierte PcG-Komplexe. PRC steht für Polycomb Repressive Complex.**

Die Zusammensetzung der Komplexe ist teilweise noch kontrovers. Z.B. findet sich nicht in jeder publizierten Reinigung RPD3 als Komponente des 600 kDa-Komplexes (Tie et al., 2003).

Die Komplexe sind evolutionär konserviert. In menschlichen Zellen findet man beispielsweise einen Komplex, der dem PRC1-Komplex aus *Drosophila* stark ähnelt. Er besteht aus Homologen zu PC, PH, PSC, dRING und SCM, zeigt aber keine Interaktion mit TAF-Proteinen (Levine et al., 2002). Obwohl die Komplexe zwischen *Drosophila* und Mensch also nicht komplett konserviert sind, haben sie die gleiche Funktion in der Repression von Transkription (Lavigne et al., 2004).

Viele PcG-Proteine konnten noch keinem Komplex zugeordnet werden, so dass zu vermuten ist, dass noch weitere Komplexe bestehen.

## **2.12 DIE EINZELNEN PROTEINE DES 600 kDa-E(Z)/ESC-KOMPLEXES**

In dieser Arbeit wurde v.a. mit dem 600 kDa-Komplex gearbeitet. Deswegen sollen die Proteine dieses Komplexes hier vorgestellt werden.

### **2.12.1 E(Z)**

E(Z) (Enhancer of Zeste) ist ein ca. 87 kDa großes Protein, das eine C-terminale SET-Domäne enthält. Außerdem finden sich zwei SANT-Domänen darin (siehe Abb. 14), von denen die erste relativ konserviert ist, die zweite weniger konserviert. SANT-Domänen

finden sich häufig in Chromatin-Remodelling-Komplexen und HAT-Komplexen und scheinen wichtig zu sein für die Interaktion mit den Histon-*tails* (Boyer et al., 2002).



**Abb. 14: Schematische Darstellung von E(Z). Entnommen aus dem Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).**

Homologe Proteine zu E(Z) aus *Drosophila* sind MES2 in *C. elegans*, sowie EZH2 bzw. ENX sowie EZH1 in Säugetieren.

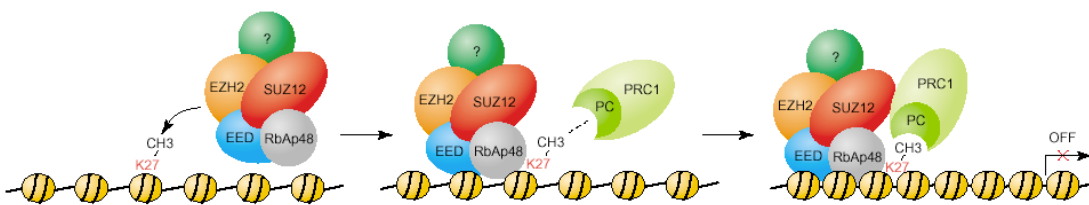
In Säugetieren gibt es die zwei Homologen Ezh1 und Ezh2. Ezh2 wird vor allem während der Embryonalentwicklung, Ezh1 vermehrt im Erwachsenenalter exprimiert (Laible et al., 1997; O'Carroll et al., 2001).

Überexpression von E(Z) bewirkt verstärktes PEV des *white* Gens (Laible et al., 1997). E(Z) scheint also nicht nur eine Rolle bei der PcG-vermittelten Repression von Genen zu spielen, sondern kann auch an *silencing*-Prozessen des Heterochromatins beteiligt sein. Normalerweise zeigen PcG-Proteine keine PEV-Suppressor-Wirkung und umgekehrt. Nullmutationen von Ezh2 in Mäusen bewirken, dass die Embryos schon in frühen Entwicklungsstufen sterben (O'Carroll et al., 2001). Null bis drei Stunden nach der Fertilisation einer Mäuse-Eizelle ist das maternal vererbte Ezh2 hauptsächlich mit dem mütterlichen Genom assoziiert, und erst nach 6 Stunden findet es sich im paternalen Pronucleus (Erhardt et al., 2003).

Kürzlich wurde gezeigt, dass E(Z) eine Methyltransferase ist, die H3-K27 sowie H3-K9 methylieren kann (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Muller et al., 2002).

Die Methylierung von H3-K27 schafft eine Bindungsstelle für Polycomb (siehe Kapitel 2.13). Neben unserer Arbeitsgruppe haben dies auch noch andere Gruppen beobachtet (Cao et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002). Eine intakte Chromodomäne von Polycomb ist für die korrekte Lokalisation von Polycomb und anderen PcG-Proteinen an Polytän-Chromosomen erforderlich (Fischle et al., 2003b). Die Methylierung von H3-K27 ist wichtig, wenn nicht unabdingbar für das *silencing* der Hox-Gene (Muller et al., 2002).

Ein möglicher Mechanismus für das *silencing* wäre folgender (siehe Abb. 15): Der E(Z)/ESC-Komplex wird durch einen noch unbekanntem Mechanismus an die schon reprimierten Stellen gebracht. Dabei könnte beispielsweise das DNA-bindende Protein PHO eine Rolle spielen (Poux et al., 2001b). Nachdem E(Z), welches sich in einem Komplex mit anderen Proteinen befindet, H3 methyliert hat, bindet Polycomb spezifisch an dieses methylierte Histon. Polycomb wiederum ist Bestandteil des Proteinkomplexes PRC1, der durch diese Wechselwirkung an die methylierten Stellen rekrutiert wird. PRC1 könnte verhindern, dass Chromatin-Remodeling an diesen Stellen stattfindet. Der SWI/SNF-Komplex erhöht normalerweise die Zugänglichkeit von Chromatin durch Verschieben der Nukleosomen. PRC1 kann *in vitro* SWI/SNF-Remodeling verhindern, ohne die Nukleosomen unzugänglich zu machen (Levine et al., 2002; Shao et al., 1999). Dies bewirkt *in vitro* eine Repression der Transkription (King et al., 2002).



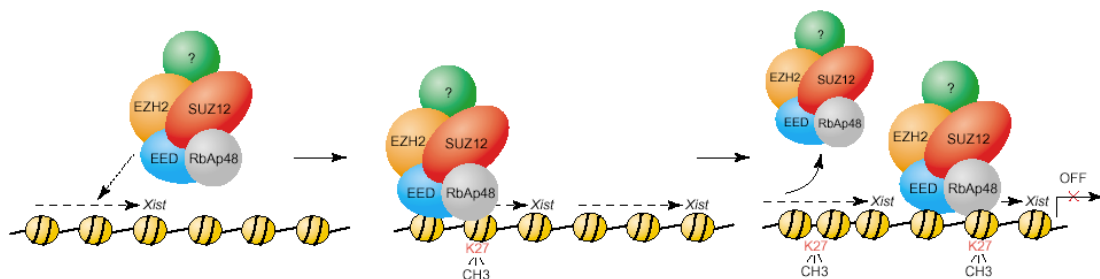
**Abb. 15: Möglicher Mechanismus des E(Z)-vermittelten *silencings* von homöotischen Genen (Cao and Zhang, 2004a).** Zunächst methyliert der E(Z)/ESC-Komplex H3-K27, anschließend bindet Pc. Dieses befindet sich in einem repressiven Komplex, der Transkription verhindert.

Alternativ könnten DNA-bindende Proteine eine Rekrutierung des PRC-Komplexes unabhängig von methyliertem H3 bewirken (Cao and Zhang, 2004a): Das DNA-bindende Protein Zeste ist direkt mit dem PRC1-Komplex assoziiert und verstärkt seine inhibitorische Wirkung, vor allem an *templates*, die eine Zeste-Bindungsstelle besitzen (Mulholland et al., 2003). Das Protein GAGA, welches wie Zeste an PREs binden kann, ist nicht stabil mit dem PRC1-Komplex assoziiert, verstärkt aber ebenfalls dessen inhibitorische Wirkung und kann den PRC-Komplex an seine DNA-Bindungsstellen rekrutieren (Mulholland et al., 2003). Durch ihre Interaktionen mit PcG-Proteinen könnten GAGA und Zeste die lokalen Konzentrationen an repressiven Komplexen erhöhen und dadurch eine Rolle im *silencing* spielen.

Dazu passt, dass PcG-Komplexe an einigen PREs gefunden wurden, ob nun das korrespondierende Gen reprimiert war oder nicht (Breiling et al., 2001). Eventuell signalisiert erst das methylierte H3, dass dieses Gen zu reprimieren ist.

Interessanterweise wurde gefunden, dass ein *in vitro* rekonstituierter minimaler PRC-Komplex nach seiner Bindung an ein Polynukleosomen-Templete ein weiteres Polynukleosom binden kann und bei diesem ebenfalls Remodelling und Transkription reprimiert (Lavigne et al., 2004). Er kann also eine „Überbrückung“ herstellen. Die einzelnen PRC-Komplexe könnten dabei mehrere Nukleosomen-*templates* binden, oder miteinander interagieren. Durch einen ähnlichen Mechanismus könnte die Repression über lange Distanzen ausgeübt werden, und z.B. weit auseinanderliegende PREs könnten auf diese Weise in ein Cluster gebracht werden (Lavigne et al., 2004).

Ezh2 spielt auch eine Rolle beim Prozess der X-Chromosom-Inaktivierung. Am inaktiven X tritt neben Histon H4-Hypoacetylierung, Anreicherung der Histon-Variante MacroH2A, DNA-Methylierung auch H3-K27-Trimethylierung auf. Diese H3-Methylierung erscheint sehr bald nachdem die nicht-codierende *Xist* RNA das Chromosom bedeckt. Zusammen mit der *Xist* RNA und der Trimethylierung findet man auch den Ezh2-Eed-Komplex am inaktiven X (Plath et al., 2003), jedoch ist seine Präsenz nur für die Initiierung der Inaktivierung notwendig. Die *Xist* RNA am inaktiven X ist notwendig und ausreichend für die Rekrutierung des Ezh2-Eed-Komplexes. Ob nach der Methylierung der PRC1-Komplex oder andere Proteinkomplexe an das inaktive X binden, ist noch nicht geklärt (Cao and Zhang, 2004a).



**Abb. 16: Frühe Schritte in der X-Inaktivierung (Cao and Zhang, 2004a).** *Xist* RNA bedeckt das zu inaktivierende X-Chromosom und rekrutiert dadurch den Ezh2-Eed-Komplex. Dieser trimethyliert H3-K27. Die ständige Präsenz dieses Komplexes ist nicht notwendig für die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes; dies ist angedeutet durch den Komplex, der sich von der DNA entfernt.

PcG und TrxG-Proteine sind in vielen Krankheiten missreguliert. Besonders die hämatopoetischen Zellen sind davon betroffen (Haupt et al., 1991; Raaphorst et al., 2000). E(Z) steht im Zusammenhang mit Zellproliferation: In Lymphomazellen, die proliferieren, wurde eine erhöhte Menge an EZH2 gefunden im Vergleich zu nichtproliferierenden

Lymphomazellen (Visser et al., 2001). Um festzustellen, ob die Überexpression von EZH2 ein Grund oder eine Folge der verstärkten Proliferation war, wurde EZH2 in menschlichen Zellen überexprimiert. Eine von zwei Zelllinien zeigte verstärkte Proliferation, die andere nicht. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es auch vom Zelltyp abhängen kann, ob eine EZH2-Überexpression zu verstärkter Proliferation führt.

Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass EZH2 in Prostatakrebs überexprimiert ist (Varambally et al., 2002). Prostatakrebs ist die zweithäufigste Krebsart bei Männern nach Lungenkrebs. In Mikroarray-Experimenten wurde EZH2 als dasjenige Gen identifiziert, das von 55 untersuchten Genen in metastasierenden Prostatakrebs-Geweben am stärksten hochreguliert ist im Vergleich zu nicht-metastasierenden Tumoren. Eed zeigte keine solche Missregulierung.

EZH2 findet sich v.a. in bösartigen, fortgeschrittenen Stadien von Prostatakrebs: Je weiter fortgeschritten die Tumore in ihrer Bösartigkeit sind, desto mehr EZH2 wird exprimiert. EZH2 könnte daher ein Indikator bzw. Biomarker dafür sein, wie aggressiv ein einzelner Tumor ist (Varambally et al., 2002).

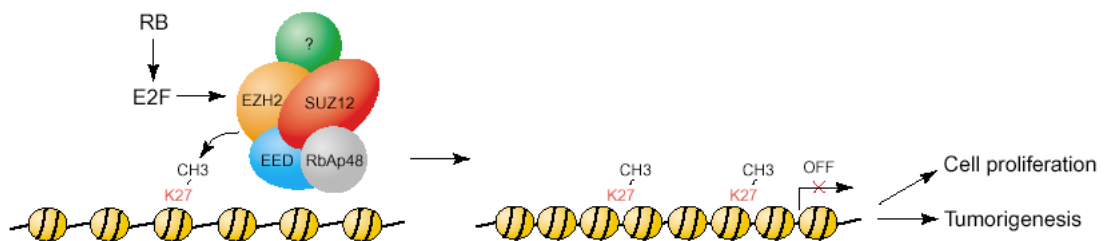
Es stellte sich heraus, dass EZH2 auch direkt mit der Bösartigkeit von Brustkrebs korreliert (Kleer et al., 2003). EZH2-mRNA sowie -Protein sind in invasiven Brustkrebstumoren erhöht, vergleicht man sie mit normalem Brustgewebe. In Mikroarray-Untersuchungen konnte wieder eine Korrelation mit der Aggressivität der Tumoren hergestellt werden. Diese hängt von einer intakten SET-Domäne sowie interessanterweise von einer assoziierte HDAC-Aktivität ab (Kleer et al., 2003).

Wie könnte EZH2 an der Tumorbildung beteiligt sein? Der Mechanismus, nach dem dies geschieht, ist noch nicht klar. EZH2 und Su(z)12 stehen unter der Kontrolle des Rb-E2F-Weges (Bracken et al., 2003). Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind notwendig für die Kontrolle von EZH2 und Eed: E2F-Expression verhindert die Expression von EZH2 und Eed. Da EZH2 und Eed Zielgene von E2F sind, stellen sie mögliche Oncogene dar. Es wurde gefunden, dass EZH2 und Eed für die Proliferation der meisten Zellen unabdingbar sind. Ihre Überexpression führt wahrscheinlich zu einer Missregulation der EZH2/Eed-Ziele aufgrund von verändertem Niveau an H3-K27-Methylierung, was wiederum in unkontrollierter Zellproliferation führt (Cao and Zhang, 2004a). Sie sind außer in Prostata- und lymphatischen Tumoren auch in vielen anderen Tumoren überexprimiert (Bracken et al., 2003). In 10-15% der untersuchten Tumoren ist der EZH2-Locus amplifiziert, was zu der Hypothese führte, dass dieses Protein nicht nur ein Tumormarker ist, sondern aktiv an der Tumorbildung beteiligt ist. Im Gegensatz zur allgemeinen Annahme, dass PcG-



Proteine den reprimierten Zustand von Genen erhalten, äußerten Bracken et al. die Vermutung, dass EZH2 an der Aufrechterhaltung eines aktivierten Zustandes beteiligt sein müsse.

Offene Fragen sind: Ist eine erhöhte Expression von Ezh2 und Su(z)12 der Grund oder die Folge einer erhöhten Aggressivität der Tumore? Was sind die Zielgene des EZH2-Komplexes, die für die erhöhte Proliferation verantwortlich sind?



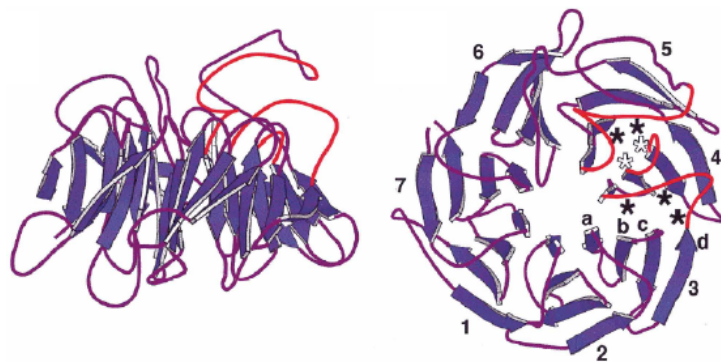
**Abb. 17: Rolle von Ezh2 in der Tumorbildung (Cao and Zhang, 2004a).** Rb und E2F kontrollieren die Expression von Ezh2. Durch noch unbekannte Mechanismen kommt es zu Zellproliferation und Tumorbildung. Wahrscheinlich ist das Niveau an H3-K27-Methylierung verändert.

EZH2 hat auch eine Bedeutung in der frühen B-Zell-Entwicklung und V(D)J-Rekombination (Su et al., 2003): Deletiert man EZH2 in Mäusen durch einen konditionalen *knock-out*, so kommt es zu verminderter Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark. Der Grund für diese verminderte Entwicklung scheint im reduzierten Rearrangement eines bestimmten V-J-Genclusters innerhalb des Gens für die schwere Immunglobulinkette zu liegen. Proteine, die an der Rekombination beteiligt sind, waren durch den *EZH2-knock-out* nicht betroffen, der Zellzyklus war nicht gestört, und die Histone H3 und H4 zeigten unveränderte Acetylungsmuster. Der einzige feststellbare Unterschied gegenüber normalen B-Zellen infolge des *knock-outs* von EZH2 in Maus-B-Zellen bestand in einer reduzierten H3-K27-Methylierung des speziellen V-Gens. Der Mechanismus, wie EZH2 die Rekombination genau dieses V-Gens beeinflusst, ist spekulativ (Ramsden and Zhang, 2003): Die Methylierung könnte ein Signal für die Rekombinationsenzyme sein; oder die Zugänglichkeit des Chromatins könnte verändert sein. EZH2 könnte aber auch durch die Methylierung Signale setzen und auf diese Weise die Rekombinationsmaschinen inklusive der Proteine, die am DNA-Schnitt beteiligt sind (RAG-Proteine), zu diesen V-Genen dirigieren. Ein Hinweis, der für diese Hypothese spricht, ist die reduzierte Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen, die in *EZH2-knock-out*-Zellen beobachtet werden (Su et al., 2003).

### 2.12.2 ESC

Extra-sex combs (ESC) ist ein 55 kDa großes Protein. Homologe Proteine sind MES6 in *C. elegans* sowie EED in Maus (Schumacher et al., 1996). Es besteht hauptsächlich aus mehreren WD40-Motiven. Das WD40-Motiv ist aus 44 bis 60 Aminosäuren aufgebaut, das normalerweise das Dipeptid „GH“ 11-24 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt aufweist und das „WD“-Peptid am C-Terminus (Smith et al., 1999; van der Voorn and Ploegh, 1992). Da dieses Motiv im gut charakterisierten G-Protein G $\beta$  vorkommt, welches eine Rolle im Transmembran-Signalisierungsprozess spielt, werden oft alle Proteine, die einen WD-Repeat aufweisen, als „G $\beta$ “- oder „Transducin“-ähnlich bezeichnet. Die WD-Motiv-Proteine sind aber in die verschiedensten Prozesse involviert, z.B. RNA-Processing, Zytoskelett-Aufbau oder transkriptioneller Kontrolle (Smith et al., 1999). Ein homologes Protein zu ESC, das humane WAIT-1, befindet sich im Gegensatz zu ESC im Cytoplasma und kann mit Intergrinen interagieren (Rietzler et al., 1998).

Das WD40-Motiv ist in ESC ca. 7 mal wiederholt und es kann sich wahrscheinlich eine runde, propellerähnliche Struktur ausbilden (siehe Abb. 18) (Ng et al., 1997). Diese Struktur ist sogar gegen Trypsin resistent (Tie et al., 1998). Man nimmt an, dass ESC durch seine Struktur besonders gut Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen kann.



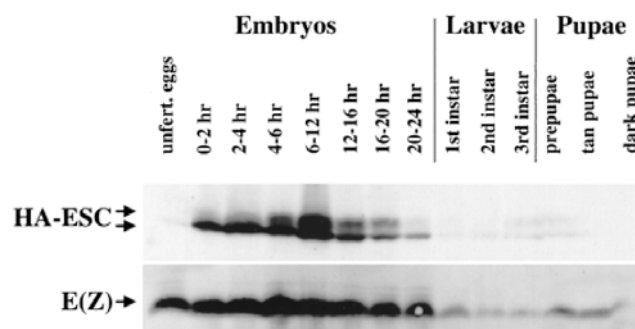
**Abb. 18: Vorhersage der Struktur des ESC-Proteins (Ng et al., 1997).** Die WD40-Motive bilden wahrscheinlich eine Propellerstruktur.

ESC interagiert *in vitro* direkt mit E(Z), wie durch Coimmunpräzipitationen aus *Drosophila*-Extrakt und GST-*pull-down*-Experimente gezeigt werden konnte (Jones et al., 1998a). Die Interaktionsdomäne innerhalb von E(Z), die mit ESC wechselwirkt, besteht aus einem 33 Aminosäure langen Bereich fast direkt am N-Terminus des Proteins. ESC selbst interagiert über die WD-Repeats mit E(Z). Die Interaktion findet sich nicht nur in

den *Drosophila*-Proteinen, sondern ist in Mensch und Maus konserviert (Jones et al., 1998a). Einzelheiten über die Interaktionen zwischen den Proteinen des 600 kDa-Komplexes finden sich in Kapitel 2.14.

ESC wird in der frühen *Drosophila*-Entwicklung gebraucht, aber überraschenderweise und – untypisch für PcG-Proteine – kaum mehr in der späteren Entwicklung (Simon et al., 1995; Struhl and Brower, 1982). Mit Hilfe einer temperatursensitiven ESC-Fliegenmutante konnte festgestellt werden, dass bei einem ESC-*knock-out* die meisten Larvensegmente sich wie das achte Segment entwickelten (Struhl, 1981a). Dieser Phänotyp tritt nur auf, wenn ESC zu einer bestimmten Zeit während der der Entwicklung – gegen Ende des Blastoderms, dies entspricht der Zeitspanne zwischen 3,5 und 5,5 Stunden nach dem Legen bei einer Temperatur von 29°C - nicht vorhanden ist. Davor oder danach hat ein Knock-out kaum Auswirkungen (Struhl and Brower, 1982). ESC spielt also eine wichtige Rolle bei der Initiierung des PcG-*silencing*.

E(Z) und ESC werden v.a. in *Drosophila*-Embryos exprimiert, kaum mehr in Larven oder Puppen (siehe Abb. 19). ESC scheint in *Drosophila* in zwei Formen aufzutreten. Die im SDS-Gel langsamer laufende Form ist phosphoryliert und wird bevorzugt in Komplexen gefunden (Ng et al., 2000). Später in der *Drosophila*-Entwicklung nehmen beide Proteine mengenmäßig stark ab.



**Abb. 19: Expressionsprofil von E(Z) und ESC während der *Drosophila*-Entwicklung (Ng et al., 2000).** ESC liegt in zwei Formen vor, die langsamer laufende Form ist phosphoryliert. Beide Proteine treten v.a. in Embryos auf, später in der Entwicklung nimmt ihre Menge stark ab.

Neben ESC gibt es in *Drosophila* ein Protein, welches diesem sehr ähnlich ist und „ESC-like“ oder ESCL genannt wurde. Über dieses Protein ist bis jetzt sehr wenig bekannt. Es kann ESC nicht vollständig ersetzen. Es unterscheidet sich v.a. am N-Terminus von ESC

(siehe Abb 20), und besitzt ein eigenes Gen. Fehlt den *Drosophila*-Weibchen ESCL, dann sind sie steril.

```

Esc      -----MSSDKVKNNGNEPEESEES-----CGDES 23
ESCL    MTEETNPSEISPPSEEPPEAEDESTDHSPAEAVLSNNSSSVCNVVEPDDEHEVNSVDREDTA 60
          .*. * * **:. .* * :

Esc      ASYTTNSTTSRSKSPSSSTRSKRRGRRSTKSKPKSRAAYKYDTHVKENHGANIFGVAFNT 83
ESCL    SLFSTTTTTTRSKSPN--TRKLNRLCRRIKAPKMQPLYKYSSHVREDHNHQIFGVQFNP 118
          : :*. :*:*****. ** . * * * : . . ***. :*:*:*. :***** **.

Esc      LLGKDEPQVFATAGSNRVTVYECPRQGG-----MQLLHCYADDPDFVFYTCAWSYDLK 137
ESCL    FLDRGQPQVFATVGKDRVSIYECEFRSTGQESCEGIRLLQVYADPDDESFYTCAWSYDSV 178
          :*. :. :*****. * . :*:*:*** * . * :*:*: *****. * * *****

Esc      TSSPLLAAGYRGVIRVIDVEQNEAVGNYIGHGQAINELKFHFKLQLLLSGSKDHAIRL 197
ESCL    TGDVLAAGYRGVIRIFNPVKHQCSKNYIGHGHAINELKFHPTRPQLLLSGSKDHSRLR 238
          *. * :*****:*****: : :. . *****:***** : *****:*.

Esc      WNIQSHVCIAILGGVEGHRDEVLSIDFNMRGDRIVSSGMDHSLKWLCLNTEPFHFKIELS 257
ESCL    WNIQSDVCVAVFGGVEGHRDEVLSVDFDLRGDRIMSSGMDHSLKWLRLDKPDIKEAIELS 298
          *****. * :*:*:*****:***:*****:***** * :. * :. *

Esc      NTFSEQKSTLPFPPTVKHFPDFSTRDIHRNYVDCVQWFGNFVLSKSCENAIVCWKPGQLH 317
ESCL    SGFSPNKNTGPFPTIKEHFPDFSTRDIHRNYVDCVQWFGDFVFSKSCENSIVCWKPGKLS 358
          . * * :*. * *****. :. :*****:*****:***:*****:*****:*.

Esc      QSFQVQKPSDSSCTIIAEFEYDECEIWFVRFQFNPNQKVIAGNQGKVVWELDPSPDE 377
ESCL    ESWHEIKPQESATTVLHHFDYKMCIEIWFVRFQFNPNQKILALGNQLGTTFWELDCNDPN 418
          :*: :*:*:*. :* :. * . *****. * . ***:***** * . :***** . * :

Esc      GAHMTTLHNSRSVATVVRQIAFSRDASVLVYVCDDATVWRWNRQ-----TTSI----- 425
ESCL    LTKCSQLVHPKSNSTIRQTSFSKDGSIILVCDDSTVWRWDRVNZDECFZAKRIFLILLN 478
          : : * :. * : :*: * :*:*. * :* * * :*****: * : . *

Esc      -----
ESCL    PIPYLCNHSYFQCNVYLQYZVCYYAZHLYTILIVLTIYVKLCZIFZHZIPRYLFYSITFLM 538

Esc      -----
ESCL    IKZLRKYHMLLCEWRGLYLZCLYFNZLTCTQZKLZTLKIK 579

```

**Abb 20: Alignment der Proteinsequenzen von ESC und ESCL.** Erstellt mit Hilfe der Internet-Seite <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>.

In Säugern gibt es vier Isoformen von Eed, die ihren Ursprung in verschiedenen Translations-Start-Stellen der gleichen mRNA haben (Kuzmichev, 2004). Der PRC2-Komplex scheint drei Isoformen von Eed zu beinhalten, darunter die längste Form, PRC3

die zwei kürzesten. Je nach enthaltener Isoform ändert sich die Spezifität der Komplexe in Bezug auf die Methylierung von H3-K27 in Oligonukleosomen: PRC2 wurde als H1-methylierender Komplex identifiziert, dessen Aktivität in Bezug auf H1 durch Zugabe von Oligonukleosomen gesteigert wird (Kuzmichev, 2004). PRC2 kann H1-K26 methylieren, H3-K27 jedoch nur wenn H3 sich *nicht* in einem Nukleosomen-Array befindet. PRC2 scheint also als Substrat H1 zu bevorzugen, PRC3 hingegen ist spezifisch für H3-K27 in Oligonukleosomen. Da die Komplexe in ihren anderen Untereinheiten übereinstimmen, verleihen die verschiedenen Isoformen von Eed die Substratspezifität. Die Anwesenheit der längsten Isoform bewirkt, dass H1 gegenüber H3 als Substrat bevorzugt wird.

### 2.12.3 p55

p55, auch als Nurf55 oder RbAp46/48 in Säugetieren benannt, ist ein nukleares Protein, das in vielen verschiedenen Komplexen auftritt, z.B. CAF-1 (Tyler et al., 1996), HAT1 und NURF (Martinez-Balbas et al., 1998). Es ist hochkonserviert in Tieren, Pflanzen und Pilzen. p55 hat ebenfalls eine WD40-Struktur mit sieben Wiederholungen dieses Motivs (Tyler et al., 1996). Wie ESC kann es deshalb wahrscheinlich mit vielen anderen Proteinen wechselwirken.

P55 ist oft mit Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen assoziiert (Martinez-Balbas et al., 1998; Tyler et al., 1996). RbAp46/48 kann die Histonacetyltransferase-Aktivität des HAT1-Komplexes steigern (Verreault et al., 1998).

Der Name der Säugetier-Homologen RbAp kommt daher, dass p55 ursprünglich als Protein beschrieben wurde, welches *in vitro* mit dem Retinoblastoma-Protein interagieren kann (Qian et al., 1993).

Es wurde beobachtet, dass p55 an Chromatin binden kann (Martinez-Balbas et al., 1998). Diese Interaktion beruht auf einer Bindung an Histone, vor allem von H4 und H2A (Verreault et al., 1998). Nur etwa 5% von seiner Gesamtmenge sind im E(Z)/ESC-Komplex enthalten (Tie et al., 2001).

In Chromosomenfärbungen findet man p55 überall entlang der Chromosomen (Martinez-Balbas et al., 1998), was nicht weiter verwunderlich ist, da es in vielen Proteinkomplexen enthalten ist. Es scheint von heterochromatischen Bereichen teilweise ausgeschlossen zu sein (Tyler et al., 2001).

### 2.12.4 Su(z) 12

Su(z) 12 ist eine Abkürzung für Suppressor of Zeste. Es gehört zur Pc-Gruppe und ist überraschenderweise auch ein starker Suppressor von PEV (Birve et al., 2001). Außer bei Su(z)12 wurde nur noch bei E(Z) beobachtet, dass es neben einer Repression der homöotischen Gene eine Rolle bei PEV spielt. Das ca. 100 kDa große Protein wird während der gesamten Entwicklung von *Drosophila* benötigt, um homöotische Gene reprimiert zu halten. Auch in Wirbeltieren und Pflanzen finden sich homologe Proteine (Birve et al., 2001).

Su(z)12 besitzt einen Zinkfinger, eine Domäne, die DNA binden kann. Bis jetzt allerdings wurde DNA-Bindung von Su(z)12 noch nicht beobachtet.

Su(z)12 interagiert mit der Chromo-Shadow-Domäne von HP1 $\alpha$  *in vitro* und *in vivo*, HP1 muss hierfür als Dimer vorliegen (Yamamoto et al., 2004). Dies wurde an den entsprechenden Maus-Proteinen gezeigt. Hierdurch könnte Su(z)12 den E(Z)/ESC-Komplex in die Nähe von an H3-K9 methylierten Histonen bringen. Außerdem reprimiert Su(z)12 in Gegenwart von HP1 die Transkription (Yamamoto et al., 2004).

Su(z)12 wurde, neben EED, kürzlich als notwendig für die Aktivität von EZH2 *in vitro* beschrieben (Cao and Zhang, 2004b). *In vivo* scheint es ebenfalls direkt an der Methylierung von H3-K27 beteiligt zu sein, denn bei einem *knockdown*-Experiment (Su(z)12 wurde in HeLa-Zellen um ca. 75% reduziert) trat verminderte Methylierung auf (Cao and Zhang, 2004b).

Su(z)12 wurde – wie E(Z) und ESC – als Zielgen für E2F identifiziert (Weinmann et al., 2001). Diese spielen wie oben schon erwähnt oft eine Rolle in der Proliferation.

In verschiedenen Tumoren wurde eine Überexpression von Su(z) beschrieben (Cao and Zhang, 2004a; Kirmizis et al., 2003): Dazu zählen Darm-, Brust- und Leberkrebs.

### 2.12.5 RPD3

RPD3 ist eine Histondeacetylase (HDAC). Sie tritt des öfteren zusammen mit p55 auf und findet sich in verschiedenen Komplexen. Rpd3 befindet sich z.B. im Sin3-Komplex (Kasten et al., 1997) sowie in einem Komplex mit N-CoR (Heinzel et al., 1997).

RPD3 wird an Polytän-Chromosomen an vielen Stellen beobachtet (Tie et al., 2003).

Ursprünglich wurde RPD3 in einem genetischen *screen* entdeckt, der nach Mutationen suchte, die das *position effect variegation* in *Drosophila* beeinflussen (De Rubertis et al., 1996).

Mutationen in Rpd3 bewirken einen Phänotyp der *Drosophila*-Larven, der an *fushi-tarazu*-Mutationen (ein *pair-rule*-Gen, siehe Kapitel 2.10.2) erinnert: Die ungeraden abdominalen Segmente gehen verloren (Mannervik and Levine, 1999). Rpd3 spielt also auch eine Rolle für die Segmentierung des *Drosophila*-Embryos.

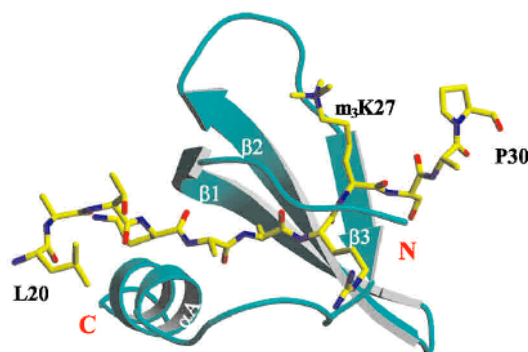
Aufgrund seiner Fähigkeit, Histone deacetylieren zu können, ist RPD3 wichtig für die Repression der Transkription – global im Genom (Vogelauer et al., 2000) oder auch lokal an Promotoren (Kadosh and Struhl, 1997). Die Deacetylierung durch RPD3 kann überall im Genom stattfinden (Robyr et al., 2002), und erst durch andere Proteine, welche mit RPD3 assoziiert sind, findet eine genspezifische Repression statt.

Rpd3 kann alle Histone deacetylieren bis auf H4-K16 (Suka et al., 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rpd3 mit der Histonmethyltransferase Su(var)3-9 interagiert (Czermin et al., 2001).

## 2.13 POLYCOMB

Das Protein Polycomb enthält wie HP1 eine Chromodomäne. Es kann spezifisch an methyliertes H3-K27 binden, was in dieser Arbeit (Czermin et al., 2002) und in weiteren Publikationen (Cao et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002) dargelegt wird. Mittlerweile ist auch die Struktur der Chromodomäne von Polycomb, die ein methyliertes Peptid bindet, gelöst (siehe Abb. 21) (Min et al., 2003). Die Strukturen der Chromodomänen von HP1 und Polycomb sind sich sehr ähnlich, z.B. wird das methylierte Lysin in beiden über einen aromatischen Käfig gebunden. Wie HP1 bevorzugt auch Pc ein trimethyliertes gegenüber einem mono- bzw. dimethyliertem Lysin (Fischle et al., 2003b).



**Abb. 21:** Die *Drosophila* Polycomb-Chromodomäne in einem Komplex mit trimethyliertem H3-K27-Peptid (Min et al., 2003). Die Chromodomäne ist als Schleifenmodell dargestellt, das Peptid als Stäbchenmodell.

Polycomb kann über seine Chromodomäne dimerisieren (Min et al., 2003). Dies ist erstaunlich, da HP1 ebenfalls dimerisiert, aber über seine Chromo-Shadow-Domäne. Da jede Chromodomäne einen Histon-*tail* – die aus sterischen Gründen aus verschiedenen Nukleosomen kommen müssen - binden kann, liegen die *tails* in einem Pc-Dimer sehr nahe aneinander. Die Dimerisation der Chromodomäne verleiht Polycomb Spezifität in Bezug auf methylierte Lysine, so dass es zwischen methyliertem Lysin 9 und 27 unterscheiden kann. Außerdem sind für die Bindung an trimethyliertes H3-K27 zusätzlich neun Aminosäuren innerhalb des Histons (AA 20 bis 29) wichtig, da Pc auch mit ihnen wechselwirkt (Fischle et al., 2003b; Min et al., 2003). Dadurch kommt weitere Spezifität zustande. Vertauscht man die Chromodomänen von Pc und HP1, findet man die Proteine im Nukleus jeweils dort, wo vorher das andere Protein zu finden war: Während HP1 normalerweise v.a. an Stellen mit methyliertem H3-K9 angereichert ist, ist gerade dort Pc nicht zu detektieren (Fischle et al., 2003b).

Neben der spezifischen Bindung von Polycomb an methyliertes H3 gibt es daneben noch eine nicht modifikationsabhängige Interaktion mit den Histon-*tails* von H3 und H4 (Breiling et al., 1999). Polycomb kann aber auch mit Nukleosomen, die Histone ohne *tails* haben, interagieren. An dieser Interaktion mit Histonen ist der C-Terminus von Polycomb beteiligt.

Pc ist Bestandteil des PRC1-Komplexes, und seine Funktion scheint die Rekrutierung des Komplexes an H3-K27-methylierte Nukleosomen zu sein (siehe Kapitel 2.12.1).

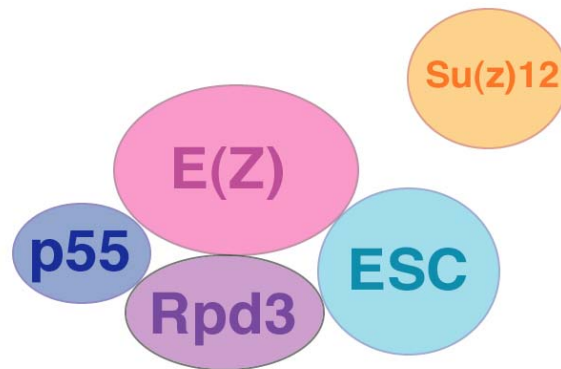
In Experimenten, die sehr frühe *Drosophila*-Extrakte benutzen (0-3 Stunden), wird PC assoziiert mit ESC, E(Z), PHO, PH, RPD3 und GAGA gefunden (Poux et al., 2001b). Diese Interaktion kann in älteren Embryos nicht mehr detektiert werden, PC scheint also nur vorübergehend mit diesen Proteinen eine Wechselwirkung einzugehen.

## **2.14 INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEN EZ/ESC PROTEINEN**

ESC interagiert direkt mit dem N-Terminus von E(Z): Dies wurde in Co-Immunpräzipitationen beobachtet, und an Chromosomen kolokalisieren beide Proteine (Tie et al., 1998). Außerdem wurde eine Interaktion zwischen RPD3 und ESC in einer Co-Immunpräzipitation sowie einer Gelfiltration beobachtet (Tie et al., 2001). Durch Verwendung *in-vitro*-translatierte Proteine in einem GST-*pull-down*-Experiment wurden Interaktionen zwischen den (damals bekannten) Komponenten des E(Z)/ESC-Komplexes



wie folgt bestimmt (Tie et al., 2001):



**Abb. 22: Interaktionen zwischen den Proteinen des E(Z)/ESC-Komplexes (Tie et al., 2001).** Gezeichnet nach den Experimenten von Tie et al (2001). Su(z)12 war damals noch nicht als Komplexbestandteil bekannt.

Es wurde keine Interaktion zwischen ESC und p55 beobachtet.

Andere Autoren berichten, dass E(Z) (bzw. das Maus-Homologe EZH2) nur mit ESC interagiert und mit keinem der anderen Proteine (Cao and Zhang, 2004b). Sie finden ein DNA-bindendes Protein namens AEBP2 in ihrem Komplex, welches mit p55 und Su(z)12 wechselwirkt.

Weitere Einzelheiten werden in Kapitel 5.2.6 in der Diskussion angesprochen werden.

## 2.15 AUFGABENSTELLUNG

Als diese Arbeit begonnen wurde, Ende 2000, war Su(var)3-9 die einzige bekannte Histon-Methyltransferase. Ausgangspunkt für diese Arbeit waren *Drosophila*-Kernextrakte, die für Transkriptionsexperimente im Labor Becker hergestellt wurden. In diesen Extrakten konnte mit einem Methyltransferase-Assay nach einer ersten Fraktionierung über Ionenaustauschchromatographie mehrere *peaks* von Histon-Methyltransferase-Aktivität aufgetrennt werden, sowie in einem der *peaks* auch die Anwesenheit von Su(var)3-9 bestätigt werden. Die Vermutung, dass die bis dahin nur wenig aufgereinigten Fraktionen weitere Methyltransferasen enthielten, lag nahe.

Die Aufgabenstellung lautete also, Su(var)3-9 und weitere Histonmethyltransferasen - wenn möglich auch deren Komplexe - aufzureinigen und zu charakterisieren.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN

Produkt	Bezogen von
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Greiner
1,5-, 3,5- und 5 ml-Reagenzröhrchen	Sarstedt
15- und 50 ml-Gefäße	Sarstedt
250 ml-Zentrifugationsgefäße (steril)	Corning
Amplify-Lösung	Amersham Biosciences
BioRex 70-Material	BioRad
Biotin-16-dUTP	Roche
Bradford-Reagenz	BioRad
Cellfectin-Reagenz	GibcoBRL
Chitin-Agarose- <i>beads</i>	NEB
Desoxyribonukleotide	Roche
Dialyseschläuche	Spectrum
DNA-Standard „Smart Ladder“	Eurogentec
Elektroporationsküvetten	Molecular Bio Products
Entwicklerlösung für Western Blots (ECL)	Amersham Biosciences
Feinchemikalien, Lösungsmittel und Medienzusätze	Sigma, Roth, Merck, Difco, BD
Filter (0,45 und 0,22 µm)	Roth
Filterpapier Whatman 3 MM	Whatman
Geneticin (G418)	PAA Laboratories
Glutathion-Sepharose-4B	Pharmacia Biotech
HA-Agarose- <i>beads</i>	Roche
Hybond N+ (PVDF)-Membran	Amersham Biosciences
Kolloidales Coomassie	Novex, Invitrogen
M2-Agarose (Flag- <i>beads</i> )	Sigma
Magnetische <i>beads</i> (MyOne)	Dynal
Medium für <i>Drosophila</i> - und Schmetterlingszellen (Schneiders <i>Drosophila</i> Medium und SF-900)	Gibco Invitrogen
Miracloth-Gewebe	Calbiochem
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen
Pasteurpipetten	Roth
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml und 0,5 ml	Biozym und GeneAmp
Photometerküvetten	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sörensen
Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, PMSF)	Roche
ProteinG/A-Sepharose (Protein G/A- <i>beads</i> )	Pharmacia Biotech
Proteinkonzentrationsröhrchen	Pall Filtron

QuickSpin Säulchen	Boehringer Mannheim
Radiochemikalien	Amersham
Röntgenfilme	Fuji
Rotiphorese Acrylamid-Bisacrylamidmischung	Roth
S-Adenosyl-L-(methyl- <sup>3</sup> H)Methionin (SAM) Spezifische Aktivität 74 Ci/mmol bzw. 183 mCi/mg Konzentration 1 mCi/ml bzw. 37 MBq/ml	Amersham Pharmacia Biotech
SDS-Einmalgelkassetten	Invitrogen
Silikonisierte 1,5 ml-Reaktionsgefäße	Biozym
Spritzen und Zubehör	Becton Dickinson
Talonbeads	BD Biosciences
Vorgefertigte Säulen für Chromatographie-System	Pharmacia
Zellkulturschalen und -flaschen	Greiner

### 3.1.2 VEKTOREN UND KONSTRUKTE

Folgende Vektoren wurden für Klonierungen verwendet:

Name	Besonderheit	Bezogen von
pET15b	6x his <i>tag</i>	Novagen
pMyb2	Intein- <i>tag</i>	NEB
pFastBac HT A, B, C	N-terminaler His- <i>tag</i>	Invitrogen
pFastBac 1	Ohne <i>tag</i>	Invitrogen
pActGal4(1-147)SK	N-terminal Gal4-DNA-Bindungs-Domäne	A. Courey (Fisher et al., 1996)
pRmHA	HA- <i>tag</i> , pUC19 backbone	vorhanden im Labor

Liste der verwendeten Kontrukte, die entweder von anderen Gruppen bezogen wurden, im Labor vorhanden waren oder selbst konstruiert wurden (letztere sind **fett** hervorgehoben):

Name: Insert (in Vektor)	Bemerkung	Bezogen von oder kloniert über folgende Restriktionsendonukleasen
Renilla-Luciferase pRLuc-TK	Normalisierung im Luciferase-Assay	Promega
Firefly-Luciferase G <sub>5</sub> DE <sub>5</sub> -tkLuc	Aktivitätsmessung im Luciferase-Assay	A. Courey (Chen et al., 1998)
<b>Su(var)3-9 wt (in pMyb2)</b>	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Chitin- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>Su(var)3-9 Deletionsmutanten (in pMyb2): Δ152, Δ213, Δ279, Δ409, Δ487</b>	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Chitin- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>Su(var)3-9 wt (in pET15b)</b>	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Talon- <i>beads</i>	NdeI - XhoI

<b>Su(var)3-9 Deletionsmutanten (in pET15b): Δ152, Δ213, Δ279, Δ409, Δ487</b>	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Talon- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>Su(var)3-9 V221M (in pMyb2 und pET15b)</b>	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Chitin/Talon- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>Su(var)3-9 ΔSET (in pET15b)</b>	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Talon- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>Su(var)3-9 H557R Δ279 (in pET15b)</b>	hyperaktive Mutante, <i>E. coli</i> Exp. Reinigung über Talon- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>Su(var)3-9 H561K Δ279 (in pET15b)</b>	inaktive Mutante, <i>E. coli</i> Exp. Reinigung über Talon- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>Su(var)3-9 wt (in pRmHA)</b>	stabile Transfektion von <i>Drosophila</i> -Zellen	SmaI - XbaI
Rpd3 (in pActGal4 SK)	Luciferase-Assay	A. Brehm
<b>E(Z) (in pActGal4 SK)</b>	Luciferase-Assay N-terminaler Flag- <i>tag</i>	KpnI - BglII
<b>E(Z) (in pMyb2)</b>	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Chitin- <i>beads</i>	NdeI - XhoI
<b>ESCL (in pFastBac HT A)</b>	Baculovirus-Herstellung N-terminaler 6xhis- <i>tag</i>	EcoRI - KpnI
<b>ESC (in pFastBac HT B)</b>	Baculovirus-Herstellung N-terminaler 6xhis- <i>tag</i> und HA- <i>tag</i>	XbaI - KpnI
<b>E(Z)-flag (in pFastBac 1)</b>	Baculovirus-Herstellung N-terminaler Flag- <i>tag</i>	EcoRI - XbaI
ESC-HA (in pET28)	<i>E. coli</i> Proteinexpression N-terminaler HA- <i>tag</i>	V. Pirrotta
<b>Su(z)12 (in pFastBac HT B)</b>	Baculovirus-Herstellung N-terminaler 6x-his- <i>tag</i>	BamHI – KpnI
pNEO	Herstellung von stabilen <i>Drosophila</i> -Zelllinien	A. Brehm
HP1 (ohne <i>tag</i> )	<i>E. coli</i> Expression	J. Eisenberg
H3 K9A, K27A, K9+27A (in pET28)	<i>E. coli</i> Expression H3- Punktmutanten	D. Reinberg
pPacDorsal, pPacTwist	Aktivatoren im Luciferase-Assay	A. Courey
Polycomb (in pGEX)	GST- <i>tag</i> , <i>E. coli</i> Proteinexpression	V. Pirrotta

### 3.1.3 OLIGONUKLEOTIDE

Hier findet sich die Sequenz des REPDES-Oligonukleotids. Die Sequenzen der Primer für Klonierungen sind der Datenbank des Imhof-Labors zu entnehmen.

Name	Sequenz	Länge
REPDES	TAGTCCCGTACTCTGTCCCGTACTCTGTCCCGTACTCC GTCTCGTACTCTGTCCCATATTGGTCCCGTACTGGTCC CGCACATGGTCCCGAACTGGTCCCCTAC	104 bp

### 3.1.4 BAKTERIENSTÄMME

Für Klonierungen und Plasmidamplifikationen wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) verwendet, für Proteinexpressionen *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene).

#### Genotypen:

- **DH5 $\alpha$** : *E. coli* F<sup>-</sup>  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)<sub>U169</sub> recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44  $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1 (Hanahan, 1983)
- **BL21(DE3)pLysS**: *E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal  $\lambda$  (DE3) (Studier et al., 1990)

pLysS: Chloramphenicol-Resistenz bei Konzentrationen unter 40  $\mu$ g/ml, jedoch sensitiv bei Konzentrationen über 100  $\mu$ g/ml.

### 3.1.5 ZELLINIEN

Es wurden *Drosophila*-Zellen für Transfektionen (SL2-Zellen sowie Sf4-Zellen) verwendet. Für Expressionen im Baculosystem wurden Schmetterlingszellen (Sf9) benutzt.

### 3.1.6 ANTIKÖRPER

Antikörper	Bezogen von	Verdünnung in Western Blots	Zweitantikörper
$\alpha$ -E(Z)	A. Otte	1:1000	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -ENX	abcam	1:500	$\alpha$ -goat
$\alpha$ -ESC	V. Pirrotta	1:1000	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -Ezh1	Abcam	1:500	$\alpha$ -goat
$\alpha$ -flag	Sigma	1:1000	$\alpha$ -Maus
$\alpha$ -Gal4	upstate	1:500	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -H3-K9 dimethyl	upstate	1:1000	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -H3-K9 trimethyl (H3-K27 trimethyl)	Prim Singh	1:500	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -HA	Roche	1:1000	$\alpha$ -Maus
$\alpha$ -HP1	S. Elgin	1:50- 1:200	$\alpha$ -Maus
$\alpha$ -myc 9E10	eigene Produktion	1:1000	$\alpha$ -Maus
$\alpha$ -p55	im Labor	1:1000	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -Polycomb	V. Pirrotta	1:1000	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -Rpd3	A. Courey	1:1000	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -Su(var)3-9	Gunter Reuter, Halle	1:1000	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -Su(z)12	A. Rasmuson-Lestander	1:1000	$\alpha$ -chicken

Die Zweitantikörper waren jeweils mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurden von Dianova bezogen. Sie wurden in Verdünnungen von 1:5000 ( $\alpha$ -Maus) bzw. 1:10000 ( $\alpha$ -Rabbit) eingesetzt.

### 3.1.7 ENZYME UND KITS

Produkt	Bezogen von
Effectene Transfektions-Kit	Qiagen
Expand High Fidelity Kit	Roche
Klenow-Enzym	NEB
Luciferase-Assay-Kit	Promega
Plasmidisolations-Kit	Qiagen
Quik Change Mutagenesis Kit	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Roche, NEB, Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega
T4 DNA-Ligase	NEB
T4-Polynukleotidkinase	NEB
Taq Polymerase	Genaxxon
Trypsin (modifiziert, zum Sequenzieren)	Promega

### 3.1.8 GERÄTE

Gerät	Bezogen von
-80°-Schränke	GFL
Agarosegelkammern	EMBL Heidelberg und Eigenbau Werkstatt des Butenandt-Institutes
Autoklav	H+P
Bakterieninkubator/Schüttler	New Brunswick Scientific
Chromatographiesystem „Äkta“	Amersham Pharmacia Biotech
Drehrad	neoLab
Elektroporationsgerät	BioRad
Entwickler für Röntgenfilme	Agfa
Filmkassetten	Appligene
French Press	Thermo Spectronic
Geigerzähler	Genitron
Geldokumentationssystem	Pharmacia Biotech
Geltrockner	BioRad
Homogenisierer	Yamato
Inkubator für <i>Drosophila</i> -Käfige	Bavaria
Laborschüttler	Roth
Labor-Tischzentrifuge	Eppendorf (Modell 5415 C) Heraeus (Biofuge pico)
Labor-Zentrifugen	Sorvall (Modell RC5C), Heraeus/Kendro (Cryofuge 6000i)
Leitfähigkeitsmesser	Hanna Instruments
Lichtmikroskop Zellkultur	Zeiss
Luminometer	Berthold

Lyophilisierer	Eigenbau Werkstatt Butenandt-Institut
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikrowelle	LG
PCR-Maschine	MWG, Perkin Elmer
pH-Meter	Mettler Toledo
Phosphoimager	Fuji
Power Supplies	Pharmacia, Consort, BioRad
Reinstwasseranlage	Elga Labwater
Rotoren	SS34, Super-LiteGSA (Sorvall DuPont), Ti50, TLA55 (Beckman)
Rührer	Heidolph
SDS-Gelkammern und Western Blot-System	Novex
Sterilwerkbänke	PMV
Szintillationszähler mit Drucker	Beckman
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschallgerät	Branson
Ultrazentrifugen	Beckman Coulter (Optima Max-E und Optima LE-80K)
UV-Meter (Photometer)	Pharmacia Biotech
UV-Transilluminatoren	Bachofer
Vortexer	Bachofer
Wärmeschrank 26°C ( <i>Drosophila</i> -Zellen)	LMS
Wärmeschrank 37°C (Bakterien)	Memmert
Wasserbad	Braun

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 GRUNDLEGENDE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 3.2.1.1 PCR FÜR KLONIERUNGEN

PCRs wurden wie folgt in 0,2 ml-Gefäßen pipettiert:

100 – 500 ng Template-DNA  
 1 µl Primer (100 pmol/µl *stock*-Konzentration), forward und reverse jeweils  
 1 µl 10 mM dNTP-Mix (der vier Nucleotide)  
 5 µl 10x Puffer für PCR (mit MgCl<sub>2</sub>)  
 1 µl Polymerase  
 Wasser ad 50 µl

Für Klonierungen wurde meist der „Expand High Fidelity“ Kit (Roche) verwendet, der neben einer Taq-Polymerase auch eine proofreading Polymerase enthält. Dies senkt die Fehlerrate von  $2,6 \cdot 10^{-5}$  auf  $8,5 \cdot 10^{-6}$ .

Für analytische PCRs wurde Taq-Polymerase der Firma Genaxxon verwendet. Die PCRs wurden nach folgendem Temperaturprogramm in PCR-Maschinen der Firmen Perkin Elmer bzw. MWG durchgeführt:

5 min	95°C	Denaturierung	1x
30 sec	95°C	Denaturierung	25-35x
30 sec	55°C	Annealing der Primer	
1 min/kb	72°C	Elongation	
5 min	72°C	Elongation	1x

Nach der PCR wurden 5 µl des Reaktionsansatzes entnommen und auf einem Agarosegel analysiert. Falls genug Produkt vorhanden war, wurde es direkt in einem präparativen Ansatz mit den passenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt.

### 3.2.1.2 GELELEKTROPHORESE VON AGAROSEGELEN

Agarosegele wurden in Konzentrationen von 0,7 bis 2% (w/v) hergestellt. Dazu wurde 1x TBE-Puffer zusammen mit der abgewogenen Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Der Lösung wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und anschließend das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Nachdem die Proben (die ca. 10 – 20 µl Volumen hatten) mit 5 µl 5x-Laufpuffer versetzt und in die Probenauftragstaschen eingefüllt worden waren, wurde die Elektrophorese mit 10 V/cm Gel-Länge durchgeführt. Als Größenstandard diente die „Smart Ladder“ (Eurogentec). Die Gele konnten aufgrund des im Gel bereits enthaltenen Ethidiumbromids direkt unter UV-Licht betrachtet und fotografiert werden. Für präparative Ansätze (z.B. Aufreinigung einer PCR) wurden die gleichen Gele verwendet, die Taschen wurden vergrößert und die Proben mit entsprechend mehr Ladepuffer versehen.

#### **1xTBE Puffer:**

90 mM Tris  
90 mM Borsäure  
2 mM EDTA

#### **5x-Gelladepuffer:**

50% (v/v) Glycerin  
10 mM EDTA  
für **Bluejuice**: 0,05% (w/v) Bromphenolblau  
0,05% (w/v) Xylencyanol  
für **Orange G**: 0,05% (w/v) Orange G



### 3.2.1.3 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (Amersham Pharmacia Biotech) nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und in ca. 20-30 µl TE aufgenommen.

### 3.2.1.4 DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA-ENDEN

Vor einer Ligation (siehe Kapitel 3.2.1.5) wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmidmoleküle mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP; 1 U/µl, Promega) entfernt, um intramolekulare Selbstligation zu verhindern. Dazu wurden 10 - 15 µg linearisierte Plasmid-DNA mit 1 U SAP und Reaktionspuffer des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 200 µl über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.1.2).

### 3.2.1.5 LIGATION VON DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments in das zuvor linearisierte und dephosphorylierte Plasmid erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 Ligase; 5 U/µl, NEB). 200 - 300 ng Plasmid, 0,5 - 1 µg des entsprechenden DNA-Fragmentes, 5 U T4 Ligase und Ligationspuffer des Herstellers wurden in einem Endvolumen von 10 µl über Nacht bei RT inkubiert. Das molare Verhältnis zwischen Plasmid und Insert betrug ca. 1:3.

1 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E. coli* verwendet (siehe Kapitel 3.2.1.8).

### 3.2.1.6 HERSTELLUNG ELEKTRISCH KOMPETENTER ZELLEN

Aus einer Glycerinkultur wurden *E. coli* DH5α- oder BL21 als Übernachtskultur in LB „null“ (= ohne Antibiotika) gezogen. Diese Kultur wurde am Morgen in 500 ml LB null verdünnt und bei 37°C und 200 rpm auf einem Bakterienschüttler vermehrt, bis die OD<sub>600</sub> ca. 0,5 bis 0,7 betrug.

Die Bakterien wurden 15 min auf Eis gekühlt, und dann 20 min bei 4200 rpm in der Heraeus-Zentrifuge abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in 250 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser aufgenommen, abzentrifugiert (4200 rpm, 20 min), wieder in 250 ml eiskaltem Wasser aufgenommen und nochmals abzentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und wiederum abzentrifugiert (4200

rpm, 10 min). Dieses Pellet wurde in dem gleichen Volumen (z.B. Pellet ca. 1 ml, Aufnahme in 1 ml) 15% (v/v) Glycerinlösung aufgenommen, in Aliquots von 50 oder 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

**LB-Medium:**

1% (w/v) Bacto-Trypton

1% (w/v) NaCl

0,5% Bacto-Yeast

### **3.2.1.7 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER *E. COLI***

Alternativ wurden *E. coli* auch chemisch kompetent hergestellt.

Dazu wurde eine in 5 ml LB null geschüttelte Übernachtskultur von DH5α oder BL21 auf 500 ml LB+CaCl<sub>2</sub> expandiert und bei 18-22°C geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,6 erreicht war. Dies kann je nach Bakterienwachstum 30 bis 48 Stunden in Anspruch nehmen. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt und bei 2000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und wie oben abzentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 3 ml DMSO wurden unter leichtem Schütteln hinzugefügt. Die Bakterien wurden in 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

**TB-Puffer:**

15 mM CaCl<sub>2</sub>

250 mM KCl

10 mM PIPES

55 mM MnCl<sub>2</sub>

sterilfiltrieren (nicht autoklavieren)

**LB+CaCl<sub>2</sub>:**

LB wie oben

+10 mM CaCl<sub>2</sub>

### **3.2.1.8 TRANSFORMATION VON *E. COLI***

#### **a) elektrisch kompetente *E. coli***

100 µl kompetente *E. coli* (Herstellung siehe Kapitel 3.2.1.6) wurden mit 1-1,5 µl Ligationsansatz (siehe Kapitel 3.2.1.5) versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Firma Molecular Bio Products) mit 1mm-Spalt gefüllt. Nach einem Elektroschock von 1,4 V bei 400 Ω (BioRad Gene Pulser) wurden die Zellen unter Zugabe von 300 µl LB aus der Küvette geholt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit

100 µg/ml Ampicillin (Roth) ausplattiert. Nach 16 - 24 h Inkubation bei 37°C wurden Klone entsprechend der weiteren Verwendung gepickt.

#### **b) chemisch kompetente *E. coli***

100 µl kompetente *E. coli* (siehe Kapitel 3.2.1.7) wurden mit 1-1,5 µl Ligationsansatz (siehe Kapitel 3.2.1.5) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Zellen für 2 min bei 42 °C und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei RT mit 300 µl LB- Medium versetzt und 30 min bei 37 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin (Roth) ausplattiert. Nach 16 - 24 h Inkubation bei 37°C wurden Klone entsprechend der weiteren Verwendung gepickt.

#### **3.2.1.9 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IM MINI-MAßSTAB**

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden nach folgender Methode (Birnboim and Doly, 1979) gewonnen: Von einer 5 ml-Übernachtskultur in entsprechendem Selektionsmedium (verwendete Antibiotika siehe unten) wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert, in 300 µl P1-Puffer aufgenommen, mit 300 µl P2-Puffer versetzt, 5 min bei RT inkubiert, mit 300 µl P3-Puffer versetzt und 10 min auf Eis stengelassen. Anschließend wurden die Zelltrümmer (10 min bei 13 000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand mit 630 µl Isopropanol versetzt und die DNA ausgefällt (Zentrifugation bei 4°C, 13 000 rpm, Tischzentrifuge, 10 min). Das DNA-Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 20 µl 1x TE aufgenommen.

##### **Puffer P1:**

50 mM Tris pH 8,0  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNase A

##### **Puffer P2:**

200 mM NaOH  
1% (w/v) SDS

##### **Puffer P3:**

3 M Kaliumacetat pH 5,5

##### **1x TE:**

10 mM Tris pH 8,0  
1 mM EDTA

Antibiotika:

Antibiotikum (gelöst in ..)	Endkonzentration in LB:
Ampicillin (Wasser bzw. Ethanol)	100 µg/ml
Chloramphenicol (Ethanol)	10 µg/ml
Kanamycin (Wasser)	30 µg/ml

### 3.2.1.10 RESTRIKTIONSANALYSE

Restriktionsanalysen von Miniprep-DNA (ca. 500 ng DNA) wurden meist in einem Volumen von 10 µl nach Angaben der Hersteller der jeweiligen Restriktionsenzyme durchgeführt. Für präparative Ansätze, z.B. um 10 –20 µg DNA zu spalten, wurde der Ansatz entsprechend vergrößert und darauf geachtet, dass die DNA-Konzentration 100 ng/µl nicht überstieg

### 3.2.1.11 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IM MAXI-MAßSTAB

Um 100 bis 500 µg Plasmid-DNA herzustellen, wurden *E. coli* DH5α-Zellen mit der gewünschten DNA transformiert (siehe Kapitel 3.2.1.8) und auf LB-Platten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika (siehe Kapitel 3.2.1.9) ausgestrichen. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium (+Antibiotika) für 6-8 Stunden bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde dann am Abend in 500 ml LB-Medium (+Antibiotika) gegeben und über Nacht bei 37°C/200 rpm auf einem Bakterenschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die dicht bewachsene Bakteriensuspension für eine „Maxi-Prep“ nach Anleitung der Firma Qiagen GmbH verwendet, die auf der alkalischen Lyse beruht.

### 3.2.1.12 SEQUENZIERUNG VON DNA

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wurde von der Firma MWG, Ebersberg, durchgeführt.

## 3.2.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA UND PROTEINEN

Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, wurde in einer Glasküvette 995 µl Wasser vorgelegt und 5 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung dazugegeben. Anschließend wurde die Absorption des Leerwertes und der Probe bei 260 nm im Photometer gemessen. Da eine dsDNA-Lösung der Konzentration 50 µg/ml eine Absorption von 1,0 bei 260 nm aufweist, kann die DNA-Konzentration aus dem gemessenen Absorptions-Wert wie folgt berechnet werden:

$$A * 10\,000 = \text{Konzentration in ng}/\mu\text{l}$$

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Bradford-Reagenz (BioRad) bestimmt. In Einmal-Plastikküvetten wurde je 800  $\mu\text{l}$  Wasser und 1-5  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz wurde der Inhalt der Küvetten gemischt und 5 min bei RT stengelassen. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer bestimmt. Als Leerwert diente eine Lösung ohne Protein; außerdem wurde immer eine Eichkurve mit BSA erstellt, die von 1 bis 50  $\mu\text{g}$  BSA/1 ml Lösung reichte. Anhand dieser Eichkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### 3.2.3 MUTAGENESE VON BESTEHENDEN PLASMIDEN

Mit Hilfe des *in vitro*-Mutagenese-Kits „QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) können schon existierende Plasmide ortsspezifische mutiert werden, ohne dass auf ssDNA-Methoden zurückgegriffen werden muss. Er kann für Punktmutationen, Deletionen und Insertionen verwendet werden.

Um eine Mutation in ein bestehendes Plasmid einzuführen, muss ein komplementäres Primerpaar vorliegen, das die gewünschte Mutation enthält. Idealerweise sollte die Mutation in der Mitte des Primers liegen.

Zunächst einmal wurde eine DNA-Synthesereaktion mit der Pfu-DNA-Polymerase durchgeführt, die zu einer Primerextension über die ganze Länge des Plasmids führte. Es entstanden Plasmide, welche die Mutation und pro Strang je eine Lücke enthalten.

#### **Pfu-Reaktion (in 0,2 ml Gefäß):**

5  $\mu\text{l}$  10x Pfu-Puffer  
 5 bis 50 ng DNA-Template  
 je 125 ng Primer  
 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10 mM jeweils)  
 1  $\mu\text{l}$  PfuTurbo DNA Polymerase  
 H<sub>2</sub>O ad 50  $\mu\text{l}$

Für die Pfu-Reaktion wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95°C	30 sec	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	18x
Annealing	55°C	30 sec	
Elongation	68°C	8 min	

Nach der PCR wurde direkt 1  $\mu\text{l}$  DpnI zu der Reaktion gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. DpnI baut die noch vorhandenen nichtmutierten (und methylierten) DNA-Stränge ab, so dass nach dieser Reaktion nur noch die neusynthetisierten (und daher

mutierten) Plasmide in der Reaktion vorhanden sind. Diese Plasmide sind zirkulär, enthalten aber eine Lücke.

Letzteres stört nicht, da nach der Transformation von 1 µl der Reaktion in kompetente *E. coli*-Zellen (z.B. DH5α) die Plasmide von den Bakterien selbst durch Ligation repariert werden.

Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert, über Nacht bei 37°C wachsen gelassen und die entstandenen Kolonien nach einer Miniprep analysiert. Enthielt der Mutagenese-Primer neben der gewünschten Mutation auch noch eine für das Plasmid neue Restriktionsschnittstelle, so kann durch einen Restriktionsverdau leicht festgestellt werden, ob die neue Schnittstelle und damit auch die Mutation eingeführt wurde. Zur Sicherheit wurden die mutierten Plasmide sequenziert.

### 3.2.4 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das Gelsystem der Firma Novex verwendet. Zwischen zwei zusammenhängende vorgefertigte Plastikplatten wurden Trenn- und Sammelgel nacheinander eingegossen. Nach dem Gellauf wurden die Plastikplatten getrennt und die Gele entweder mit Coomassie oder Silber angefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

Pro Gel wurden 6 ml Trenngel und 2 ml Sammelgel angesetzt.

#### **Trenngel (10%):**

2,4 ml Wasser  
2 ml Acrylamidmix (30/0,8)  
1,5 ml 1,5M Tris pH 8,8  
30 µl 20% SDS  
30 µl 20% APS  
2,5 µl TEMED

#### **Sammelgel (5%):**

1,4 ml Wasser  
0,33 ml Acrylamidmix (30/0,8)  
0,25 ml 1M Tris pH 6,8  
10 µl 20% SDS  
10 µl 20% APS  
2 µl TEMED

Zur Herstellung von Gelen mit anderen Sammelgel-Prozentigkeiten (z.B. 8%, 15% oder 18%) wurde die Menge der eingesetzten Acrylamidlösung bei konstantem Endvolumen variiert.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt, so dass dessen Endkonzentration „1x“ betrug. Anschließend wurden die Proben 3 min auf 95°C erhitzt und in die Probenauftragstaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 40 bis 50 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

**SDS-Ladepuffer:**

192 mM Glycerin  
25 mM Tris  
0,1% (w/v) SDS

**4x SDS-Probenladepuffer:**

200 mM Tris pH 6,8  
8% (w/v) SDS  
40% (v/v) Glycerin  
4,2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,2% (w/v) Bromphenolblau

## 3.2.5 PROTEINFÄRBEMETHODEN

### 3.2.5.1 COOMASSIEFÄRBUNG

Die zu färbenden Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese für 5 min in der Fixierlösung geschüttelt und anschließend mit Färbelösung für 30 min angefärbt. Das Entfärben erfolgte meist über einen längeren Zeitraum in der Entfärbelösung. Zum schnelleren Entfärben wurde der Entfärbelösung ein Zellstoffpapier zugesetzt, das das überschüssige Coomassie binden kann. Dieses Papier wurde mehrmals erneuert, bis der Gelhintergrund klar wurde. Nach Erreichen des gewünschten Entfärbegrades wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems fotografiert, ausgewertet, und in einem Gelrockner auf Filterpapier getrocknet.

**Fixierlösung:**

50% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure

**Färbelösung:**

10% (v/v) Essigsäure  
0,025% (w/v) Coomassie (G-250)

**Entfärbelösung:**

10% (v/v) Essigsäure

### **3.2.5.2 SILBERFÄRBUNG (NACH BLUM):**

Das fertig gelaufene SDS-Gel wurde für zwei Stunden oder über Nacht in Fixierer inkubiert (für alle Schritte wurde jeweils ein Laborschüttler verwendet). Anschließend wurde das Gel drei mal für 20 min mit Waschlösung gewaschen und 1 min in Thiosulfatlösung eingelegt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit Wasser wurde das Gel für eine Stunde in Silbernitratlösung inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal kurz mit Wasser gewaschen und das Gel in den Entwickler gelegt, bis die Banden die gewünschte Intensität angenommen hatten. Dann wurde sofort die Stop-Lösung auf das Gel gegeben. Dokumentation und Auswertung erfolgten wiederum mit dem Geldokumentationssystem.

#### **Fixierer:**

40% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Essigsäure

#### **Waschlösung:**

30% (v/v) Ethanol

#### **Thiosulfatlösung:**

0,02% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

#### **Silbernitratlösung:**

0,2% (w/v)  $\text{AgNO}_3$

#### **Entwickler:**

3% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
0,05% (v/v)  $\text{H}_2\text{CO}$  (Formaldehyd)  
0,0004% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

#### **Stop-Lösung:**

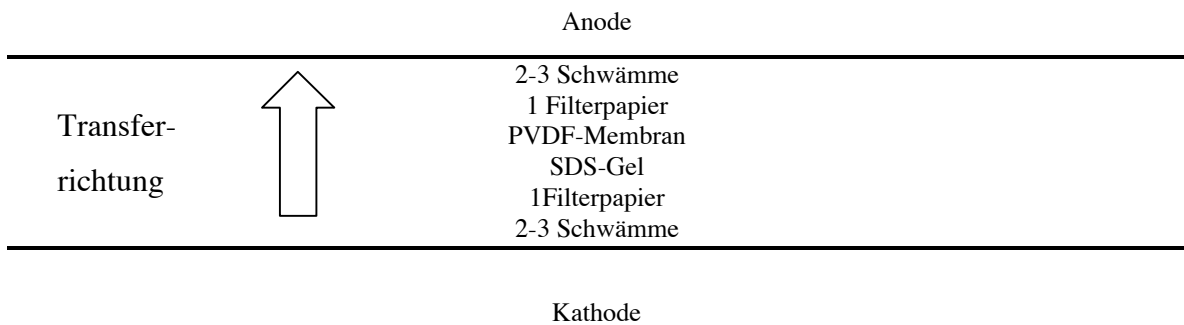
0,5% (w/v) Glycin

### **3.2.6 WESTERN BLOT**

Der Western Blot dient dazu, die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen und durch eine Immunreaktion spezifisch zu detektieren.

Nach Benetzen der auf Gelgröße zurechtgeschnittenen PVDF-Membran (Hybond P, Amersham Biosciences) mit Methanol wurde diese zusammen mit dem Gel, Filterpapieren und den Schwämmen in Westernblotpuffer getränkt. Das Western-Blot-„Sandwich“ wurde wie folgt zusammengebaut:





Der Western Blot wurde mit einer Stromstärke von 400 mA für eine Stunde durchgeführt.

**Western Blot Puffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
15% (v/v) Methanol  
0,02% (w/v) SDS

Anschließend wurde die mit den Proteinen „beladene“ Membran für eine halbe Stunde in 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver (gelöst in PBS + 0,1% Tween) inkubiert. Die so abgesättigte Membran wurde dann für eine Stunde mit der Primärantikörper-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) in PBS + 0,1% Tween wurde die Membran für 30 min mit dem verdünnten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend erneut dreimal (je 10 min) in PBS + 0,1% Tween gewaschen.

**Primärantikörperlösung:**

Antikörper in 5% (w/v) fettfreiem  
Milchpulver, in PBS-Tween gelöst;  
Verdünnung je nach Antikörper von  
1:500 bis 1:2000

**Sekundärantikörperlösung:**

Antikörper, mit Meerrettichperoxidase  
gekoppelt (in 5% (w/v) fettfreiem  
Milchpulver, in PBS-Tween gelöst);  
Verdünnung: 1:10 000

Nach dem Waschen wurde der Western Blot mit dem ECL-Kit<sup>TM</sup> (*enhanced chemoluminescence*, Western Blotting Detection Reagent; Amersham Biosciences) entwickelt. Die Membran wurde hierzu auf ein Stück Haushaltsfolie gelegt und für eine Minute mit 1 ml eines 1:1-Gemisches aus Lösung A und Lösung B benetzt. Anschließend wurde die Membran in Folie verpackt und in einer Filmkassette gegen einen Röntgenfilm (Super RX, Fuji) exponiert.

### 3.2.7 FLIEGENHALTUNG

Zur Gewinnung größerer Mengen wt *Drosophila*-Embryoextraktes wurden wt *Drosophila melanogaster* (Canton R) (Taufliegen) „in Kultur“ gehalten. Die Fliegen haben eine Entwicklungszeit von ca. 10 Tagen, so dass jede 2. Woche das Sammeln von Embryos möglich war.

Die einzelnen Aktivitäten während einer „Fliegenwoche“ sind:

Tag 1	Dienstag	Ansetzen von neuen Larvenboxen aus einer Übernachtsammlung von Embryos
Tag 10 bis 11	Donnerstag/Freitag	Transfer der neu geschlüpften Fliegen in die Käfige
Tag 11 bis mind. 15	Freitag bis Dienstag	Tägliches Füttern der Fliegen
Tag 13 bis 18	Sonntag bis Freitag	Sammeln von Embryos alle 12 h, Aufbewahrung bei 4°C
Tag 15 = Tag 1	Dienstag	Ansetzen von neuen Larvenboxen
Tag 18	Freitag	Herstellung des Embryo-Extraktes
Tag 11 bis 18		Reinigen der Larvenboxen
Tag 19 oder später		Reinigen der Käfige

#### 3.2.7.1 ANSETZEN VON LARVENBOXEN

In 8 weiße Plastikboxen mit Gitterdeckel wurden jeweils mehrere gefaltete, saugfähige Zellstoffpapierschichten gelegt, wobei auf der einen Seite eine kleine „Rinne“ freigelassen wurde. Anschließend wurde die Hefemischung zubereitet und auf und unter das Papier gegossen.

##### **Hefemischungs-Rezept für eine Larvenbox:**

250 ml Wasser  
 3 ml Ortho-Phosphorsäure  
 0,5 ml Propionsäure  
 37,5 g Zucker  
 56,5 Brauereihefe (fein gemahlen und gesiebt)  
 0,75 g Nipagin

Die über Nacht auf den Agarplatten gesammelten Embryos wurden mit Hilfe eines Haushaltspinsels von den Platten heruntergewaschen und durch drei immer feiner werdende Siebe von gröberen Partikeln abgetrennt. Die Embryos wurden in ca. 10 ml 70% Ethanol resuspendiert. Anschließend wurden 8 Rundfilterpapiere in zwei Hälften geschnitten und auf jede Hälfte wurden ca. 0,5 ml der Embryosuspension gegeben. Nach

dem Trocknen der Filterpapiere wurden diese auf die Zellstoffschichten gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Filterpapiere durch die Hefemischung gut befeuchtet wurden. In jede Box wurden zwei Filterpapiere gelegt. Die Boxen wurden sorgfältig verschlossen und im großen Fliegeninkubator oben auf die Regale gestellt.

### **3.2.7.2 TRANSFER DER NEU GESCHLÜPFTEN FLIEGEN IN DIE KÄFIGE**

Vor dem Transfer der Fliegen wurden die Käfige vorbereitet. Dazu wurden die Plastikkäfige hinten mit einem Vorhangstoff verschlossen und vorne ein Schlauch aus Vorhangstoff angebracht, und in den Fliegeninkubator gestellt. In jeden Käfig wurden zwei Apfelsaft-Agarplatten (siehe Kapitel 3.2.7.4) gelegt, auf die jeweils ein großer Klecks Hefepaste gegeben wurde.

Die frisch geschlüpften Fliegen in den Larvenboxen wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt, schnell in einen großen Erlenmeyerkolben geschüttelt und ungefähr abgewogen. In jeden Käfig wurden ca. 30 g Fliegen gesetzt. Dies entspricht einer Zahl von ca. 30 000 Fliegen. Nachdem der Erlenmeyerkolben in einen Käfig geleert worden war, wurde schnellstmöglich der vordere Eingang mittels eines Knotens verschlossen.

Die leeren Larvenboxen wurden bei -20°C eingefroren, um alle noch nicht geschlüpften Fliegen abzutöten.

### **3.2.7.3 TÄGLICHES FÜTTERN DER FLIEGEN UND SAMMELN DER EMBRYOS**

Morgens und abends wurden jeweils die zwei Apfelsaft-Agarplatten in den Käfigen ausgetauscht. Dazu wurden pro Käfig zwei frische Platten mit einem Klecks Hefepaste versehen. Die Knoten an den Käfigen wurden vorsichtig geöffnet. Nachdem sich die Fliegen etwas beruhigt hatten, wurden die neuen Platten in die Käfige gelegt und gleichzeitig die belegten Platten entfernt. Hilfreich dabei ist das Abschütteln der auf den alten Platten sitzenden Fliegen, um möglichst wenig Fliegen entkommen zu lassen. Nachdem bei allen Käfigen die Agarplatten ausgetauscht worden waren, wurden die Käfige wieder mit einem Knoten im Vorhangstoff verschlossen.

Die mit Embryos belegten Platten wurden bis zum Ende der Sammelperiode, normalerweise bis zum Ende der Woche, bei 4°C aufbewahrt und dann für den Extrakt verwendet.

### 3.2.7.4 HERSTELLUNG VON AGARPLATTEN UND HEFEPASTE (FUTTER)

#### Rezept für ca. 200 Apfelsaft-Agarplatten:

- Ca. 500 g Fadenagar in 12 l entionisiertem Wasser bei ca. 110°C zum Kochen bringen; hierzu wird ein sehr großer Topf benötigt.
- Temperatur auf 80°C zurückstellen, nachdem der Fadenagar geschmolzen ist.
- Zum Agar dazugeben: 3,5 l Apfelsaft  
750 ml Rübensirup  
420 ml 10% (w/v) Nipaginlösung (gelöst in Ethanol)
- Alles gut verrühren.
- Mittels eines Plastikbechers den flüssigen Agar entnehmen und jeweils ca. 80 ml davon in eine 16cm-Petrischale geben.
- Nach dem Erkalten des Agars die Plastikplatten im Kühlraum aufbewahren.

#### Hefepaste (Futter):

In einer Küchenmaschine wurden folgende Zutaten gemischt:

- 750 ml Wasser
- 4,6 ml Propionsäure
- 1 Packung = 500 g vakuumverpackte Backhefe

Die Paste wurde verrührt, bis eine erußbutterartige Konsistenz erreicht war.

### 3.2.8 HERSTELLUNG VON *DROSOPHILA* EMBRYO-EXTRAKT (“TRAX”)

Die über mehrere Tage hinweg gesammelten Embryos wurden von den Apfelsaft-Agarplatten mit Hilfe von einem Haushaltspinsel und kaltem Leitungswasser abgewaschen. Durch drei übereinander liegende Siebe mit immer kleineren Maschen wurden die Embryos aufgereinigt: das erste Sieb dient der Abtrennung von ganzen Fliegen, das zweite fängt Flügel und andere kleinere Verunreinigungen ab und im dritten Sieb sammeln sich die Embryos.

Die Embryos wurden in einen Plastikbecher überführt und mit Embryo-Waschpuffer auf 200 oder 400 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Zum anschließenden Dechorionieren der Embryos wurde 60 ml „Chlorbleiche“ (Natriumhypochloritlösung mit 6-14% aktivem Chlor) pro 200 ml Embryosuspension dazugegeben und die Mischung für 2,5 min auf einem Magnetrührer gerührt. Sofort daraufhin wurden die Embryos in das feinste Sieb überführt und für 10 min mit kaltem Leitungswasser gewaschen.

Um die Chorionhüllen abzutrennen, wurden die Embryos wieder in einen Plastikbecher gegeben und in 1 l Embryowaschpuffer resuspendiert. Durch kräftiges Rühren wurde der Vorgang des Ablösens der Embryohüllen beschleunigt. Nachdem sich die Embryos unten im Becher abgesetzt hatten und die Hüllen oben, wurden letztere durch Dekantieren

abgetrennt und verworfen. Dieser Schritt wurde noch zweimal mit jeweils 11 0,7% NaCl-Lösung wiederholt.

Die Embryos wurden durch einen Büchnertrichter abgenutscht, einmal mit 200 ml entionisiertem Wasser gewaschen und dann möglichst gut durch das Vakuum auf dem Filterpapier getrocknet. Die Embryos wurden abgewogen, sofort auf Eis gestellt und das Gewicht wurde notiert.

Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Pro g Embryo wurden 6 ml Nu-I Puffer vorbereitet, d.h. der Puffer wurde mit DTT und PMSF versehen. Die Embryos wurden in 1 ml pro g Embryo Nu-I resuspendiert und durch einen Yamato-Homogenisierer passiert (5 Passagen bei 1500 Umdrehungen pro Minute). Die Kerne bleiben bei diesem Schritt intakt.

Das Homogenat wurde durch ein Miracloth-Tuch filtriert und direkt in einen GSA-Zentrifugenbecher gegeben. Das Miracloth-Tuch wurde mit dem restlichen Nu-I-Puffer durchgespült.

Im anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Kerne abgetrennt. Die Zentrifugation erfolgte im GSA Rotor der Sorvall Zentrifuge für 15 min bei 8000 rpm. Der Überstand, bestehend aus Cytoplasma, wurde anschließend vorsichtig abgegossen, und die Seitenwände der Zentrifugenbecher wurden mit Einmal-Papiertüchern von Lipiden befreit. Das Kernpellet wurde in 1 ml Nu-II Puffer (versehen mit DTT und PMSF) pro g Embryo resuspendiert, wobei vermieden wurde, das unter dem Kernpellet liegende gelbe Dotterpellet mitzususpendieren. Zur vollständigen Resuspension wurde ein Hand-Homogenisierer mit loseem Stopfen verwendet. Das Volumen der resuspendierten Kerne wurde in einem Messzylinder bestimmt.

Die resuspendierten Kerne wurden auf Ultrazentrifugenbecher aufgeteilt, und es wurde jeweils 10% des Volumens an 4 M Ammoniumsulfatlösung hinzugefügt, um die Kernproteine zu extrahieren. Die Zentrifugenbecher wurden für 20 min auf einem Drehrad rotiert und dann in einer gekühlten Ultrazentrifuge für eine Stunde bei 35 000 rpm zentrifugiert (Ti 60 Rotor).

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer 10 ml-Pipette abgenommen, wobei darauf geachtet wurde, dass die an der Oberfläche schwimmende Lipidschicht möglichst wenig aufgewirbelt wurde. Die Lipide würden die darauffolgende Ammoniumsulfatfällung stören. Das Volumen des Überstandes wurde gemessen und pro ml wurden 0,3 g fein gemahlene Ammoniumsulfatpulver in kleinen Portionen über einen Zeitraum von 5 min dazugegeben. Anschließend wurde für weitere 10 min gerührt. Die ausgefallenen Proteine

wurden in der Sorvallzentrifuge (SS34 Röhrchen) für 30 min bei 15 000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen. Die Seiten der Zentrifugenröhrchen wurden wiederum von Lipiden befreit. Das Proteinpellet wurde aus dem Röhrchen entnommen und mit Hilfe eines kleinen Homogenisators in 0,2 ml HEMG40-Puffer pro g Embryo resuspendiert.

Die Proteinlösung wurde zunächst dreimal 45 min gegen HEMG40 (je 1 l) dialysiert und dann über Nacht gegen 3 l HEMG100.

Am nächsten Morgen wurde das noch nicht vollständig in Lösung gegangene Protein durch Zentrifugation (15 000 rpm im SS34 Rotor der Sorvallzentrifuge für 10 min) abgetrennt und der Überstand, genannt „TRAX“, wurde in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Embryo-Waschpuffer:**

0,7% (w/v) NaCl  
0,04% (v/v) Triton-X 100

**Nu-I Puffer:**

15 mM Hepes-KOH, pH 7.6  
10 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM EDTA, pH 8.0  
0,5 mM EGTA, pH 8.0  
350 mM Saccharose

**Nu-II Puffer:**

15 mM Hepes, pH 7.6  
110 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM EDTA, pH 8.0

**HEMG Puffer:**

25 mM Hepes, pH 7.6  
X mM KCl (HEMG 40= HEMG + 40 mM KCl)  
12.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM EDTA, pH 8.0  
10 % (v/v) Glycerol

Nu-I, Nu-II und HEMG Puffer wurden direkt vor der Verwendung mit DTT (Endkonzentration 1 mM) und PMSF (Endkonzentration 0,2 mM) versetzt.

### **3.2.9 IMMUNPRÄZIPITATION VON MYC-SU(VAR)3-9 AUS MYC-TRAX**

50 – 200  $\mu\text{l}$  TRAX von den myc-Su(var)3-9-Fliegen bzw. vereinigten ResQ-Fractionen wurden mit 10  $\mu\text{l}$  9E10 anti-myc-Antikörper in einem Gesamtvolumen von 200 - 800  $\mu\text{l}$  BC100 für 3 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Drehrad rotiert. Dann wurden 30  $\mu\text{l}$  ProteinG-beads (Pharmacia Biotech) dazugegeben und für eine weitere Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert. Die

*beads* wurden einmal mit IPH300, einmal mit IPH100 und einmal mit IPH50 gewaschen und in 50 µl 1xHIM Puffer resuspendiert. Anschließend wurde entweder ein HIM oder HDAC-Assay direkt an den *beads* durchgeführt.

**BC100:**

25 mM HEPES pH 7,6  
200 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 mM EGTA  
10% (v/v) Glycerin  
1 mM DTT  
0,2 mM PMSF

**IPH Puffer:**

50 mM Tris pH 7,5  
x mM NaCl  
0,5% (v/v) NP40  
0,2 mM PMSF

**1xHIM Puffer:**

16 mM NaCl  
20 mM Tris pH 8,0  
1 mM DTT

### 3.2.10 KULTUR VON *DROSOPHILA*/SF9-ZELLEN

*Drosophila* Sf4 sowie SL2 Zellen und Sf9-Zellen (aus *Spodoptera frugiperda*) wurden bei 26°C im Inkubator gehalten. Für die Zellhaltung wurden Zellkulturflaschen verwendet, für Proteinexpressionen Schalen. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen gesplittet und mit frischem Medium versorgt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen immer adhärent wuchsen und sich nicht in zu großer Zahl von der Oberfläche lösten. Falls dies der Fall war, ein Anzeichen von zu dichter Kultur, wurden möglichst alle Zellen durch Schütteln von der Oberfläche abgelöst und in eine frische Flasche mit frischem Medium überführt, wobei die Verdünnung zwischen 1:5 und 1:10 betrug.

**Medium für Sf4 und SL2-Zellen:**

Schneiders *Drosophila* Medium, revised; von Invitrogen  
mit 10% FCS und Glutamin, Penicillin (50 U/ml) +Streptomycin (50 µg/ml) versetzt

**Medium für Sf9-Zellen:**

Sf-900 II SFM von Invitrogen  
mit 10% FCS und Glutamin, Penicillin (50 U/ml) +Streptomycin (50 µg/ml) versetzt  
Für die Erstinfektion im Baculosystem wurde kein FCS zugegeben.

### **3.2.11 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON *DROSOPHILA* ZELLEN**

Für transiente Transfektionen können Sf4 Zellen oder SL2-Zellen verwendet werden. SL2-Zellen werden mit höherer Effizienz transfiziert.

Die SL2-Zellen wurden aus einer Zellkulturflasche entnommen, in der sie adhärent wuchsen, und gezählt. Die Zellen wurden z.B. in 6-*well*-Platten ausgesät; pro *well* wurden  $1,5\text{-}2 \cdot 10^6$  Zellen angesetzt. Die Zellen wurden einen Tag lang in der 6-*well*-Platte bei 26°C wachsen gelassen; falls sie am nächsten Tag gesund aussahen und adhärent wuchsen, wurden sie transfiziert.

Für die Transfektion wurde mit dem „Effectene Transfection Reagent“ der Firma Quiagen gearbeitet.

Je nach Zielsetzung des Versuches werden verschiedene Plasmide zur Transfektion eingesetzt. Luciferase-Assays z.B. erfordern eine Mischung von mehreren Plasmiden (siehe Kapitel 3.2.31), während für einen Expressionstest eines Proteins normalerweise nur das jeweilige Plasmid allein transfiziert wird.

Das Plasmid bzw. Plasmidgemisch (Gesamtmenge z.B. 2 µg) wurde mit 150 µl Puffer EC und 24 µl Enhancer versetzt, gevortext und 2 bis 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Effectene-Reagenz dazugegeben, wieder gemischt und 10 min bei RT inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 2 ml frisches Medium (+10% Serum) auf die Zellen gegeben. Die DNA-Komplexe wurden mit 600 µl Medium versetzt, mit diesem durch Auf- und Abpipettieren vermischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben.

Die Zellen wurden für 2 Tage bei 26°C gehalten. Anschließend wurden sie durch Auf- und Abpipettieren des Mediums von den *wells* gelöst und durch Zentrifugieren geerntet (10 min, 3000 rpm, 4°C).

### **3.2.12 STABILE TRANSFEKTION VON *DROSOPHILA* ZELLEN**

Für stabile Transfektionen können ebenfalls SL2 oder Sf4-Zellen verwendet werden. Die Zellen wurden prinzipiell genauso transfiziert wie bei transienten Transfektionen (siehe Kapitel 3.2.11). Gestartet wurde aber mit ca.  $1 \cdot 10^7$  Zellen in einer 10 cm-Kulturschale. Einen Tag nach dem Aussäen wurden die Zellen mit insgesamt 2 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die DNA setzte sich dabei wie folgt zusammen: Es wurden 1,8 µg des jeweils gewünschten Plasmids verwendet; zusätzlich wurden noch 0,2 µg des Plasmids pNeo



hinzugegeben, welches eine Geneticin-Resistenz vermittelt. Um die Transfektion durchzuführen, wurden 16 µl Enhancer, 300 µl Puffer EC und 60 µl Effectene-Reagenz benötigt. Die Zellen wurden vor dem Aufträufeln der DNA-Lipidkomplexe mit 7 ml frischem Medium versehen.

Anschließend wurden die Zellen auf den 10cm-Kulturschalen zunächst für 2 Tage bei 26°C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden sie in Zellkulturflaschen überführt, da für die längeren Kultivierungszeiten Flaschen praktischer sind und das Medium nicht so leicht verdunstet. Außerdem wurden 200 µl Geneticin (G418, Konzentration 50 mg/ml, PAA Laboratories) pro 10 ml Medium hinzugegeben. Geneticin selektiert die Zellen, so dass nach längerer Zeit nur diejenigen überleben, welche durch das pNeo-Plasmid resistent gegen Geneticin sind. Da das "gewünschte" Plasmid in viel größerer Menge eingesetzt wird als pNeo-Plasmid, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die überlebenden Zellen neben pNeo auch das "gewünschte" Plasmid aufgenommen haben.

Geneticin muss nach ca. 4 Tagen erneuert werden. Die Zellen wurden dann jeweils mit etwas frischem, Geneticin-haltigem Medium versetzt und unter dem Mikroskop betrachtet. Normalerweise sterben bald nach Zugabe des Geneticins große Mengen von Zellen ab. Einige wenige überleben aber und bilden "Zellhaufen", welche sich später kontinuierlich vermehren. Nach einigen Wochen sind die Zellen stabil und können auf Expression des gewünschten Plasmides getestet werden.

### **3.2.13 VIRENPRODUKTION IM BACULO-SYSTEM**

Für die Virenproduktion im Baculo-System wurde das „Bac-to-Bac“ Baculovirus-Expressionssystem der Firma Invitrogen verwendet.

Dieses System dient der Herstellung rekombinanter Baculoviren und basiert darauf, dass eine Expressionskassette, die aus einem Baculo-spezifischen Promoter und dem gewünschten Gen besteht, durch ortsspezifische Transposition in einen Baculo-Shuttle-Vektor (Bacmid) gebracht wird. Nach der Isolierung des entstandenen Bacmids aus Bakterien erfolgt die Transfektion der Sf9-Insektenzellen, um einen *Virusstock* herzustellen. Dieser *Virusstock* wird zur Infektion von Sf9-Zellen verwendet, die daraufhin das gewünschte rekombinante Protein exprimieren.

### 3.2.13.1 KLONIERUNG IN DAS DONORPLASMID

Zunächst wurden die gewünschten Inserts in die Vektoren des Bac-to-Bac-Systems (Ampicillin-Resistenz) kloniert. Hierfür stehen die pFastBac HT-Vektoren zur Auswahl, die einen 6x-His-*tag* an den N-Terminus des Proteins anhängen, und der pFastBac 1-Vektor (ohne *tag*). Diese Vektoren enthalten einen Polyhedrin-Promoter, hinter den das gewünschte Insert platziert wird, und flankierende Tn7-Elemente.

Die Klonierung des gewünschten Gens erfolgte durch eine PCR. Hierbei wurden spezifische Primer für die jeweilige cDNA entwickelt und diese mit einer Restriktionsschnittstelle versehen. Nach Durchführung der PCR (siehe Kapitel 3.2.1.1), Restriktionsverdau der PCR (siehe Kapitel 3.2.1.10) und Aufreinigung des PCR-Fragments aus einem Agarosegel (siehe Kapitel 3.2.1.3) wurde das Insert in die mit den passenden Restriktionsenzymen geschnittenen Vektoren aus dem FastBac-System ligiert (siehe Kapitel 3.2.1.5) und das ligierte Plasmid in *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Nach Selektion der Kolonien auf Ampicillinresistenz, Überprüfung der darin enthaltenen Plasmide auf korrektes Insert mittels Restriktionsanalyse und Maxiprep der DNA (siehe 3.2.1.11) wurde das Plasmid sequenziert (3.2.1.12).

### 3.2.13.2 TRANSFORMATION DER *E. COLI* DH10BAC

Dieses rekombinante Plasmid wurde in *E.coli* DH10bac-Zellen transformiert, die ein Bacmid (mit Kanamycin-Resistenz) sowie ein Helferplasmid (mit Tetrazyklin-Resistenz) enthalten. Das Helferplasmid codiert für eine Transposase, die die Transposition zwischen dem Tn7-Element auf dem pFastBac-Plasmid und der Tn7-Zielstelle auf dem Bacmid bewerkstelligt. Nach der Transposition enthält das Bacmid die Expressionskassette (mit Promoter und gewünschten Insert) und wird aus den *E.coli*-Zellen gewonnen.

Vor Beginn der Transformation wurden spezielle LB-Platten vorbereitet, die einen Mix von verschiedenen Antibiotika enthielten (siehe unten).

Ein Aliquot von chemisch kompetenten DH10bac-*E.colis* wurde aufgetaut, mit 1  $\mu$ g des pFastBac-Konstruktes versehen, 30 min auf Eis inkubiert, für 45 Sekunden bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert, gekühlt und 900  $\mu$ l LB-Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden bei 37°C und 220 rpm in einem 15ml-Gefäß geschüttelt und dann auf die vorbereiteten LB-Platten ausplattiert. Nach 48 Stunden bei 37°C waren weiße und blaue Kolonien zu sehen. Weiße Kolonien, die im Bacmid die

Expressionkassette enthalten sollten, wurden nochmals zur Kontrolle auf den speziellen LB-Platten ausgestrichen.

**LB-Platten für DH10bac *E. coli*:**

50 µg/ml Kanamycin  
 7 µg/ml Gentamicin  
 10 µg/ml Tetracyclin  
 100 µg/ml Bluo-gal  
 40 µg/ml IPTG

**3.2.13.3 KONTROLLE DER BACMID-DNA**

Um die weißen Kolonien auf die Anwesenheit der Expressionskassette zu testen, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die PCR wurde dabei direkt „aus der Kolonie“ durchgeführt, und die DNA wurde nicht vorher in einer Miniprep isoliert. Dazu wurde von der wiederausgestrichenen Kolonie eine Pipettenspitze mit Bakterien abgenommen und in 100 µl Wasser resuspendiert. Die PCR ist angesichts des sehr langen DNA-Moleküls (135 kb) aussagekräftiger als eine Restriktionsanalyse.

Für die PCR wurden vier verschiedene Primer verwendet: M13 forward, M13 reverse, und zwei für das Insert spezifische Primer (typischerweise diejenigen, die auch für die erste PCR verwendet wurden) in folgenden Kombinationen:

- M13 forward + M13 reverse
- M13 forward + Insert-spezifischer Primer reverse
- Insert-spezifischer Primer forward + M13 reverse
- Beide insertspezifischen Primer

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**PCR-Ansatz für Baculokontrolle in 50 µl**

1 µl Rekombinante Bacmid-DNA = Bakteriensuspension  
 5 µl 10x PCR-Puffer (Genaxxon, mit 25 mM MgCl<sub>2</sub>)  
 1 µl Nucleotid-Mix (10 mM jeweils für jedes Nucleotid)  
 1,25 µl von beiden PCR-Primern aus einer 10 µM Lösung  
 39 µl Wasser  
 0,5 µl Taq-Polymerase (Genaxxon)

Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

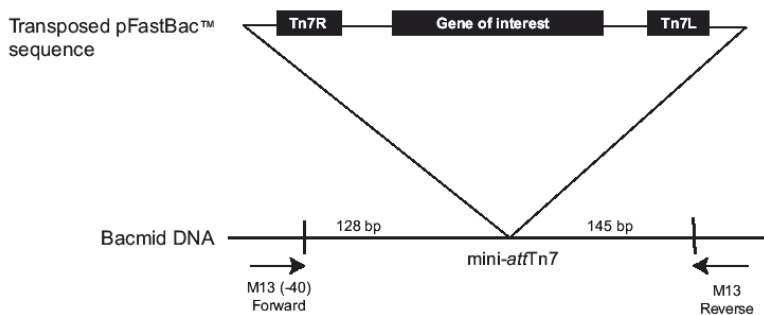
3 min	95°C Denaturierung	1x
45 sec	95°C Denaturierung	25x
45 sec	55°C Annealing	
5 min	72°C Extension	
7 min	72°C letzte Extension	1x

Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und unter UV sichtbar gemacht.

Zur Berechnung der Größen der PCR-Fragmente wurde folgende Tabelle benutzt:

Probe	Primer	Größe des PCR-Produktes
Bacmid ohne Insert	M13 fwd + M13 rev	300 bp
Bacmid + pFastBac 1	M13 fwd + M13 rev	2300 bp + Insert
Bacmid + pFastBac 1	M13 fwd + spez. rev	Ca. 1000 bp + Insert
Bacmid + pFastBac 1	Spez. Fwd + M13 rev	Ca. 1000 bp + Insert
Bacmid + pFastBac HT	M13 fwd + M13 rev	2430 bp + Insert
Bacmid + pFastBac HT	M13 fwd + spez. rev	Ca. 1100 bp + Insert
Bacmid + pFastBac HT	Spez. Fwd + M13 rev	Ca. 1100 bp + Insert

Nur mit Kolonien, die in mindestens drei der vier PCR-Reaktionen ein Produkt der erwarteten Größe lieferten, wurde weitergearbeitet.



### 3.2.13.4 MINIPREP DER HOCHMOLEKULAREN BACMID-DNA

Von den zum 2. mal ausgestrichenen Kolonien, die abermals weiß auf den Bluo-gal-Platten geblieben waren und außerdem positiv in der PCR-Kontrollreaktion waren, wurden Mini-Kulturen in 5 ml LB (+50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml Bluo-gal, 40 µg/ml IPTG) angesetzt und über Nacht wachsen gelassen.

Die Isolierung der Bacmid-DNA erfolgte nach der „Mini-Methode“ (siehe Kapitel 3.2.1.9) und nicht über kleine Säulchen, da sonst die hochmolekulare DNA Schaden nehmen kann.

Die DNA wurde in ca. 30 µl TE aufgenommen.

### 3.2.13.5 TRANSFEKTION VON INSEKTENZELLEN (ERSTINFEKTION)

Jeweils  $1-2 \cdot 10^6$  Sf9-Zellen pro well wurden in einer 6-well-Platte ausgesät. Den Zellen wurde 1 Stunde Zeit gegeben, sich abzusetzen.

Für jedes Bacmid wurden 2 *wells* angesetzt, außerdem wurden 2 *wells*, die nicht transfiziert wurden, als Kontrolle verwendet.

1 µg Bacmid-DNA bzw. ca. 20 µl der Bacmid-Miniprep wurden mit 100 µl Sf-900-Medium (serumfrei) versetzt. 6 µl Cellfectin-Reagenz (Invitrogen) wurden ebenfalls mit 100 µl Sf-900-Medium (serumfrei) versetzt und mit der DNA-Medium-Mischung vereinigt. Während diese Lösung für 30 min bei RT inkubiert wurde, wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Sf-900-Medium gewaschen und kein frisches Medium mehr daraufgegeben. Nach Zugabe von weiteren 800 µl Medium (serumfrei) zur DNA-Cellfectin-Mischung wurden die entstandenen DNA-Lipid-Komplexe tropfenweise auf die Sf9-Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 26°C mindestens 5 Stunden bis über Nacht in diesem serumfreiem Medium belassen (Gesamtvolumen 1 ml), und dann mit zusätzlichen 2 ml Sf-900-Medium (+ 10% Serum) versetzt. Nach 5 Tagen Inkubation bei 27°C wurde der Überstand von den Zellen abgetrennt (Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm); er stellte den „P1-stock“ dar und wurde bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Während der Herstellung des P1-stocks wurden im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen meist noch keine Anzeichen von viraler Infektion festgestellt.

Folgende Charakteristika sind normalerweise bei infizierten Zellen festzustellen:

<b>Infektionsphase</b>	<b>Phänotyp</b>	<b>Beschreibung</b>
Früh (0-24h)	Vergrößerter Zelldurchmesser	25-50%ige Steigerung des Durchmessers
	Vergrößerte Zellkerne	Kerne scheinen Zellen auszufüllen
Spät (24-72h)	Stop des Zellwachstums	... im Vergleich zur nicht infizierten Kultur
	Granuläres Aussehen der Zellen	Vesikel sichtbar
	Ablösen der Zellen	Zellen schwimmen im Medium
Sehr spät (72-x h)	Lyse der Zellen	Monolayer der Zellen löst sich auf

### 3.2.13.6 VIRUSAMPLIFIKATION

Der P1-stock stellt nur eine schwach konzentrierte Virenlösung dar und wird dazu verwendet, höher konzentrierte *stocks* herzustellen. Der Titer des P1-stocks liegt normalerweise bei  $10^6$  bis  $10^7$  plaque forming units (pfu)/ml und kann durch Amplifikation (= P2-stock) auf das 10fache dieses Wertes gesteigert werden.

Jeweils  $7,5 \cdot 10^6$  Sf9-Zellen wurden in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer Stunde hatten sich die Zellen abgesetzt. Das Sf-900-Medium wurde abgesaugt und 2 ml frisches Medium (+ 10% Serum) auf die Zellen gegeben. 1 ml des P1-Virusstocks wurde auf die Zellen pipettiert und die Zellen wurden für 1 Stunde auf einem langsamen Schüttler inkubiert. Anschließend wurden weiter 10 ml Medium (+ 10% Serum) auf die Zellen gegeben und diese für 5-7 Tage bei 26°C gehalten.

Als sich Anzeichen von starker Infektion zeigten, wurden die Zellen und Zelltrümmer (500 rpm für 5 min) abgetrennt, der Überstand abgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Dieser Überstand ist der P2-stock.

Um einen noch höher konzentrierten stock zu erhalten, wurde das gleiche Verfahren angewendet wie eben beschrieben. Es wurden jedoch  $1,2 \cdot 10^7$  Sf9-Zellen in 15cm-Schalen verwendet (die zugehörigen Mengen Medium sind 4 ml vor Zugabe der Viren, 15 ml nach Zugabe der Viren). Es wurde 1 ml P1-stock zu jeder Platte gegeben. Der so hergestellte P3-stock wurde für Proteinexpressionen verwendet und bei 4°C aufbewahrt.

#### **3.2.13.7 INFEKTION VON INSEKTENZELLEN UND EXPRESSION DES REKOMBINANTEN PROTEINS**

Für die Expression der gewünschten Proteine wurden ebenfalls Sf9-Zellen verwendet. Diese wurden in 15 cm-Platten ausgesät ( $1,2 \cdot 10^7$  pro Platte). Nach einer Stunde hatten sie sich abgesetzt und das Sf-900-Medium wurde erneuert (10 ml pro Schale). Der gewünschte Virus wurde in Mengen von 200 bis 600 µl pro Platte tropfenweise auf die Zellen gegeben. Bei Coinfektionen wurden die verschiedenen Viren gemischt, bevor sie auf die Zellen geträufelt wurden.

Die Zellen wurden für eine Stunde langsam auf einem Schüttler geschwenkt, dann mit weiteren 10 ml Sf-900-Medium (+ 10% Serum) versetzt, und 2 bis 2,5 Tage bei 26°C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 1000 rpm) und für die Herstellung von Ganzzellextrakten verwendet.

#### **3.2.13.8 VIRUSAMPLIFIKATION ZUR ERHALTUNG DES STOCKS**

Zur Erhaltung des Virusstocks ist es erforderlich, rechtzeitig eine Amplifikation anzusetzen. Eine Amplifikation empfiehlt sich auch, wenn der vorhandene Virusstock schon länger gelagert wurde bzw. wenn die Proteinexpression merklich zurückgeht.

Jeweils  $1,2 \cdot 10^7$  Sf9-Zellen wurden in 15 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer Stunde hatten sich die Zellen abgesetzt. Das Sf-900-Medium wurde abgesaugt und 4 ml frisches

Medium (+ 10% Serum) auf die Zellen gegeben. 1 ml des noch vorhandenen *Virusstocks* wurde auf die Zellen pipettiert und die Zellen wurden für 1 Stunde auf einem langsamen Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 15 ml Medium (+ 10% Serum) auf die Zellen gegeben und diese für 5-7 Tage bei 26°C gehalten.

Zellen und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (500 rpm für 5 min), der Überstand abgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

### **3.2.14 EXTRAKT AUS BACULO-INFIZIERTEN BZW. AUS *DROSOPHILA*-ZELLEN**

Nachdem das gewünschte Protein in den Sf9-Zellen oder in *Drosophila* Zellen (Sf4 oder SL2) exprimiert worden war, mussten die Zellen aufgeschlossen werden.

Die Zellen wurden mittels eines Gummischabers oder durch Auf- und Abpipettieren von den Zellkulturschalen abgelöst und zusammen mit dem Mediumüberstand in 50 ml-Gefäße überführt. Die Zellen wurden pelletiert (10 min, 2000 rpm, 4°C) und in BC 300 + 0,1% NP40 resuspendiert. Für jede 15 cm-Platte einer Baculoinfektion wurden 0,5 ml Puffer verwendet, so dass sich z.B. nach einer Expression in 5 Platten die Zellen in 2,5 ml Puffer befanden. Bei 6-*well*-Platten wurden die Zellen in ca. 100 µl Puffer gelöst, bei 6 cm-Platten in ca. 200 µl. Die Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Wiederauftauen aufgeschlossen, und der Zelldebris wurde abzentrifugiert (10 min, 13 000 rpm, Tischzentrifuge bei 4°C). Der so erhaltene Überstand ist der "Baculoextrakt" oder "Zellextrakt". Dieser wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

### **3.2.15 AFFINITÄTSREINIGUNG DER E(Z)-KOMPLEX-KOMPONENTEN**

Da die Komponenten des E(Z)-Komplexes jeweils mit einem *tag* versehen wurden, ist es möglich, diese einzeln oder zusammen über Affinitätschromatographie aufzureinigen. Hierbei wird das *getagte* Protein durch Agarosebeads, die mit dem entsprechenden Antikörper gekoppelt sind, aus dem Extrakt "herausgefischt". Anschließend können Untersuchungen entweder direkt an den *beads* durchgeführt werden, oder das Protein kann alternativ eluiert werden.

Um E(Z) allein oder zusammen mit koexprimierten Proteinen aufzureinigen, wurde eine Affinitätsreinigung über den Flag-*tag* von E(Z) durchgeführt. Dazu wurden 400 µl Ganzzellextrakt, 75 µl Flag-*beads*-1:1-Gemisch in BC 100 (Sigma) und 800 µl BC0 zusammenpipettiert und für 2 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die *beads* dreimal mit BC 300+0,1% NP40 für jeweils 20 min gewaschen. Die so gewaschenen *beads* wurden direkt eingesetzt (z.B. für Methyltransferase-Assays). Im Falle einer Elution

wurden die *beads* in 100  $\mu$ l BC 100 aufgenommen, mit Flag-Peptid versetzt (Endkonzentration 200 ng/ $\mu$ l) und über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand abgenommen, dieser enthält das eluierte Protein. Nochmaliges Inkubieren in der selben Puffermenge für 30 min eluiert noch mehr Protein, allerdings in geringerer Konzentration. An den *beads* selbst bleiben beträchtliche Mengen nicht-eluiertes Protein haften.

**BC Puffer:**

25 mM HEPES pH 7,6

x mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 mM EGTA

0,5 mM EDTA

10 % (v/v) Glycerin

Analog hierzu wurden Reinigungen der anderen Komponenten durchgeführt: myc-p55 wurde über den Anti-myc-Antikörper 9E10 aufgereinigt, HA-ESCL wurde über HA-*beads* angereichert und his-Su(z)12 wurde mit Hilfe von Talon*beads* (BD Biosciences) konzentriert. Hierbei wurde stets darauf geachtet, dass die Inkubation des Extraktes mit den *beads* in genügend großem Volumen durchgeführt wurde, so dass möglichst wenig andere Protein aus dem Extrakt unspezifisch an die *beads* binden.

### **3.2.16 IN VITRO TRANSLATION FÜR INTERAKTIONSTUDIEN**

In einer *in vitro* Translationsreaktion wird Protein hergestellt, welches mit S<sup>35</sup> radioaktiv markiert ist und deswegen in Interaktionsstudien leicht detektiert werden kann.

**IVT-Reaktion:**

12,5  $\mu$ l Reticulocyten-Lysat

1  $\mu$ l TNT-Puffer (Promega)

0,5  $\mu$ l Aminosäure-Mix ohne Methionin (Promega)

0,5  $\mu$ l RNase-Inhibitor (Promega)

0,5  $\mu$ l T7 Polymerase (Promega)

1  $\mu$ l S35-markiertes Methionin (Amersham)

0,5 – 1  $\mu$ g DNA

H<sub>2</sub>O ad 25  $\mu$ l

Die Reaktion wurde für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Zur Kontrolle der Reaktion wurde 1  $\mu$ l entnommen und auf einem 10 bzw. 12% SDS-Gel aufgetragen. Nach Fixierung des Gels in Coomassie-Fixierer wurde das Gel für 30 min in Amplify-Lösung geschwenkt, auf einem Filterpapier getrocknet, für eine Stunde mit einem Phosphoimager-*screen* bedeckt und dann mit der Aida Software ausgewertet.



**Coomassie-Fixierer:**

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

**3.2.17 BINDUNGSSTUDIEN MIT DEN E(Z) KOMPLEX-PROTEINEN**

Bindungsstudien wurden entweder mit *in vitro* translatierten Proteinen oder noch häufiger mit Baculo-exprimierten Proteinen + Western Blot Detektion durchgeführt.

**3.2.17.1 BINDUNGSSTUDIEN MIT IVT PROTEINEN:**

Zunächst wurde das *getagte* Protein an *beads* gebunden: 200 µl des entsprechenden Baculo-Extraktes wurden mit 30 µl *beads* in einem Gesamtvolumen von 500 µl für 2 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit BC300/0,1%NP40 wurde 5 µl des Reticulocyten-Lysates, das das *in vitro* translatierte Protein enthielt, auf die *beads* gegeben und in einem Gesamtvolumen von 500 µl BC100 für 2 Stunden inkubiert. Dann wurde fünfmal mit BC100/0,1%NP40 gewaschen und die gebundenen Proteine von den *beads* mit Hilfe von SDS-Ladepuffer eluiert. Nach Auftrag der Proben auf ein SDS-Gel wurde dieses mit Coomassie gefärbt (siehe Kapitel 3.2.5.1), fotografiert, so gut wie möglich entfärbt, mit Amplify behandelt, auf Filterpapier getrocknet, gegen einen Phosphoimager-*screen* exponiert und mit Hilfe der Aida-Software ausgewertet.

**3.2.17.2 BINDUNGSSTUDIEN MIT BACULO-EXPRIMIERTEN PROTEINEN:**

Nach einer Koexpression von zwei Proteinen (A und B) in Sf9-Zellen wurde deren Wechselwirkung untersucht.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung wurden *beads* verwendet, die mit einem Antikörper versehen sind und spezifisch den *tag* des Proteins A binden. Zunächst wurden die *beads* mit BSA inkubiert, um unspezifische Bindungen an das Trägermaterial zu verringern:

**Blockieren der beads:**

100 µl BC100

60 µl *beads*-Mischung 1:1 in Puffer

10 µl BSA (10 mg/ml)

Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 4°C auf einem Drehrad. Der Überstand wurde nach einer kurzen Zentrifugation (Tischzentrifuge, 3000 rpm, 2 min) abgenommen.

Anschließend wurde der beide Proteine A und B enthaltende Sf9-Extrakt (siehe Kapitel 3.2.14) auf die blockierten *beads* gegeben. Als Hintergrundkontrolle wurde Extrakt, der nur das nicht-bindende Protein B enthielt, verwendet.

**Bindungsreaktion:**

*beads*

+ 900  $\mu$ l BC100

+ 80  $\mu$ l Baculoextrakt (A+B oder nur B enthaltend)

Der Extrakt wurde zwei Stunden bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Dann wurden die *beads* abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 3000 rpm, 3 min, 4°C) und der Überstand abgenommen.

Das Waschen erfolgte durch Aufwirbeln der *beads* in BC300/0,1% NP40, gefolgt von einer 20 minütigen Inkubation am Drehrad bei 4°C und dem Abzentrifugieren der *beads* (Tischzentrifuge, 3000 rpm, 3 min, 4°C). Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Dann wurden die *beads* noch einmal mit BC100 gewaschen, der Überstand abgenommen und 5  $\mu$ l SDS-Ladepuffer zu den *beads* gegeben.

Nach Erhitzen auf 95°C wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion des Proteins B erfolgte nach einem Western Blot mit einem für Protein B spezifischen Antikörper.

### **3.2.18 BL21 EXPRESSION VON PROTEINEN MIT HIS/INTEIN TAG**

1  $\mu$ l pMyb-Plasmid wurde in 50  $\mu$ l BL21(DE3)pLys-Zellen transformiert und über Nacht auf Chloramphenicol-Ampicillin-LB-Platten bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien von der Platte abgenommen und in 100 ml LB gegeben (mit 100  $\mu$ l Amp und 30  $\mu$ l Chloramphenicol). Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden jeweils 5 bis 10 ml der Vorkultur auf 0,5 l LB + Chloramphenicol + Ampicillin verdünnt (gesamt 4 l LB) und bei 37°C geschüttelt bis die OD<sub>600</sub> ca. den Wert von 0,8 bis 0,9 erreicht hatte. Dann wurden die Bakterien mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei 18°C über Nacht weiterschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 20 min, 4°C, in Heraeus-Zentrifuge), das Pellet in 30 ml Lysis Puffer (1 mM Imidazol) resuspendiert, in ein 50 ml-Gefäß gegeben und die Bakterien 3 min bei -180°C schockgefroren. Die Bakterien wurden bei 37°C aufgetaut (dauert ca. 15 –20 min), dabei lysieren die Bakterien und die Lösung wird zähflüssig. Nach Ultraschallbehandlung (2 mal je 1 min, Amplitude 60%, bis Lösung

nicht mehr dickflüssig ist) wurde das Bakterienlysat in SS34-Röhrchen geben und der Zelldebris abzentrifugiert (30 min, 20 000 rpm, 4°C, Sorvall-Zentrifuge). Der Überstand wurde mit 2 ml *Talonbeads*-Puffergemisch versetzt (Die *Talonbeads* wurden vor Verwendung 2 mal mit Lysis Puffer (1 mM Imidazol) gewaschen und im gleichen Volumen ebendieses Puffers resuspendiert, so dass eine 1:1-Mischung entstand) und für 1 - 1,5 h im Kühlraum rotiert. Anschließend wurden die *Talonbeads* abzentrifugiert (10 min, 1000 rpm, 4°C), in 5 ml Lysis Puffer (1 mM Imidazol) aufgewirbelt und in BioRad-Säulchen (15 ml Volumen) gegeben. Es wurden folgende Waschschrte (jeweils 10 ml Puffer für jeden Schritt) mit steigenden Imidazol-Konzentrationen durchgeführt: 3 mal mit 1 mM, 1 mal mit 5 mM, 2 mal mit 15 mM. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit ca. 6 ml 100 mM Imidazolpuffer; dabei wurden jeweils 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 10 – 15 µl entnommen und auf einem SDS-Gel analysiert. Die am höchsten konzentrierten Fraktionen wurden vereinigt, drei mal gegen jeweils 1 l BC 100 dialysiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

**Lysis buffer:**

20 mM Tris pH 8.0

200 mM NaCl

0.05% NP40

Imidazol: 1, 5, 15, 100 mM

Expressionen von Proteinen mit *Intein-tag* laufen sehr ähnlich ab. Im Unterschied zu obigem Protokoll wurden die BL21-Zellen mit dem jeweils passenden pMyb-Plasmid transformiert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien wurden diese in Intein-Säulen-Puffer aufgenommen und wie oben schockgefroren, aufgetaut, mit Ultraschall behandelt und der Überstand in der Sorvall-Zentrifuge abgetrennt. Die *Chitinbeads* (New England Biolabs) wurden vor Verwendung zweimal mit Intein-Säulen-Puffer gewaschen und dann wurde eine 1:1-Mischung aus ebendiesem Puffer und den *beads* hergestellt. Der Bakterienüberstand wurde mit 3 ml 1:1-Gemisch *Chitinbeads* versetzt und bei 4°C für 2 Stunden rotiert. Die *beads* wurden anschließend abzentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4°C), in 5 ml Säulenpuffer resuspendiert und in eine BioRad-Plastiksäule (15 ml) gegeben. Die *beads* wurden dreimal mit jeweils 10 ml Säulenpuffer gewaschen, einmal mit 5 ml Elutionspuffer OHNE DTT und einmal mit 1 ml Elutionspuffer MIT DTT. Anschließend wurde das Säulchen unten verschlossen, 650 µl Elutionspuffer MIT DTT auf die Säule gegeben und diese auch mit dem Deckel verschlossen. Die Säule wurde über Nacht bei 4°C stehengelassen. Am nächsten Tag wurden 6 ml Elutionspuffer MIT DTT darauf

gegeben und das Protein eluiert, wobei 5 ml-Fractionen aufgefangen wurden. Jeweils 10 bis 15 µl von jeder Fraktion wurde auf einem SDS-Gel analysiert.

Die am höchsten konzentrierten Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**Intein-Säulen-Puffer:**

20 mM Tris pH 8  
500 mM NaCl  
0,1 mM EDTA  
0,1% Triton X-100

**Elutionspuffer OHNE DTT:**

20 mM Tris pH 8  
150 mM NaCl  
0,1 mM EDTA

**Elutionspuffer MIT DTT:**

Siehe obigen Elutionspuffer,  
DTT zu einer Endkonzentration von 35 mM dazugeben.

### **3.2.19 EXPRESSION VON GST-POLYCOMB UND BINDUNG AN GST-BEADS**

Die Expression von GST-Polycomb läuft sehr ähnlich ab wie die gerade eben (siehe Kapitel 3.2.18) geschilderte Expression von Intein/*his-getagten* Proteinen.

Nach der Transformation von dem GST- bzw. GST-PC-Plasmid in BL21(DE3)pLys-Zellen, Ausplattieren der Bakterien und Inkubation über Nacht wurden am nächsten Tag mehrere Kolonien von der Platte abgenommen und analog zu oben eine Vorkultur herangezogen.

Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur auf 1l ausgedehnt und weitergeschüttelt, bis die  $\text{OD}_{600}$  ca. den Wert von 0,8 bis 0,9 erreicht hatte. Dann wurden die Bakterien mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 3-4 Stunden weitergeschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , in Heraeus-Zentrifuge), das Pellet in 25 ml PBS resuspendiert, in ein 50 ml-Gefäß gegeben und die Bakterien 3 min bei  $-180^{\circ}\text{C}$  schockgefroren. Die Bakterien wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Nach Ultraschallbehandlung (1 mal je 1 min, Amplitude 50%) wurde das Bakterienlysat in SS34-Röhrchen geben und abzentrifugiert (30 min, 20 000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , Sorvall-Zentrifuge). Der Überstand wurde mit 1 ml (Bettvolumen) GST-beads (Glutathion-Sepharose-4B) versetzt und für eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  am Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die beads dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml PBS wurde ein 1:1-Gemisch hergestellt.

**PBS:**

1,36 M NaCl

0,13 M KCl

0,04 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0,018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

auf pH 7,4 eingestellt

**3.2.20 MARKIERUNG VON H3 UND DESSEN BINDUNG AN POLYCOMB**

Histon H3 wurde entweder durch Methylierung oder Acetylierung radioaktiv markiert.

Für die Methylierung wurde HIM $\alpha$  verwendet: Ca. 10-20  $\mu$ g "wildtyp" (= nicht mutiertes) H3, K9A-H3 bzw. K27A-H3 wurde in 100  $\mu$ l Reaktionsvolumen zusammen mit <sup>3</sup>H-markiertem SAM und 15  $\mu$ l HIM $\alpha$  für 45 min bei 30°C inkubiert.

Für die Vergleichsreaktion wurde GCN5 zur Acetylierung verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 100  $\mu$ l wurden 18  $\mu$ g Histon H3 zusammen mit 4  $\mu$ g bakteriell hergestelltem GCN5 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Imhof) und 2  $\mu$ l <sup>3</sup>H-markiertem Acetyl-CoA (5,8 Ci/mmol, Amersham) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Von beiden Reaktionen wurde mittels Szintillationszählung die spezifische Aktivität bestimmt. Durch Zugabe von nicht markiertem H3 wurde die Aktivität pro  $\mu$ g H3 angepasst.

In 200  $\mu$ l PBS wurden die *beads*, die entweder nur GST oder GST-Polycomb gebunden hatten (Herstellung siehe Kapitel 3.2.19), zusammen mit den verschiedenen markierten Histonen H3 über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit BC300 gewaschen und durch Zugabe von 50  $\mu$ l 0,1 M Glutathion eluiert. Die Elution erfolgte für 30 min bei 4°C. Das eluierte Material wurde an p81-Anionenaustauscherpapier gebunden und die daran haftende Radioaktivität im Szintillationszähler vermessen.

**3.2.21 MARKIERUNG VON PEPTIDEN UND DEREN BINDUNG AN POLYCOMB**

20  $\mu$ g H3-Peptid (AA 21-34 oder AA 1-19) wurden in einem Gesamtvolumen von 120  $\mu$ l zusammen mit 30  $\mu$ l HIM $\alpha$  und 10  $\mu$ l radioaktiv markiertem SAM für zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Durch Entnahme eines kleinen Aliquots wurde die spezifische Markierung des Peptides im Szintillationszähler bestimmt.

100  $\mu$ l *beads*, welche entweder nur GST oder GST-PC gebunden hatten (Herstellung siehe Kapitel 3.2.19) wurden in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l PBS mit den beiden Peptiden inkubiert, wobei deren spezifische Markierung angeglichen worden war. Die Gesamtmenge Peptid betrug jeweils 10  $\mu$ g. Die Inkubation erfolgte für 2,5 Stunden bei 4°C

am Drehrad. Anschließend wurde dreimal mit BC300 gewaschen und durch Zugabe von 50 µl 0,1M Glutathion (30 min bei 4°C) eluiert. Durch Messung im Szintillationszähler wurde die Bindung des Peptids an PC bestimmt.

### **3.2.22 BINDUNG VON SU(VAR)3-9 AN PEPTIDE**

Verschiedene H3 Peptide (AA 1 bis 19, entweder unmodifiziertes Peptid oder an K9 dimethyliertes Peptid) wurden durch die Firma PSL an Thiolink *beads* (Pierce) gekoppelt und als 1:1-Gemisch in BC100 resuspendiert. 20 µl der so an *beads* gekoppelten Peptide wurden zusammen mit ca. 400 ng Protein (HP1 oder Su(var)3-9 Δ213) in einem Gesamtvolumen von 600 µl BC100 für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit BC300/0,1%NP40 für jeweils 20 min am Drehrad bei 4°C wurde das gebundene Protein durch saure Elution (Puffer siehe unten) von den *beads* gelöst. Die Elution erfolgte ebenfalls für 20 min bei 4°C am Drehrad, mit jeweils 50 µl Elutionspuffer. Das auf diese Weise eluierte Protein wurde auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und dann entweder Silber-gefärbt (siehe Kapitel 3.2.5.2) oder für einen Western Blot verwendet.

Für einen Kompetitionsversuch wurden die Proteine zusammen mit den peptid-gekoppelten *beads* und entweder 1, 10 oder 100 µg freiem unmodifiziertem, H3K9 monomethyliertem, H3K9 dimethyliertem oder H3K4 dimethyliertem freiem Peptid inkubiert. Der weitere Versuchsablauf entsprach obiger Anleitung.

#### **BC X:**

X mM KCl  
25 mM HEPES pH 7,6  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.5 mM EGTA  
0,1 mM EDTA  
10% Glycerin  
0.2 mM PMSF  
1 mM DTT

#### **Saurer Elutionspuffer:**

100 mM Glycin pH 2.5  
500 mM KCl

### 3.2.23 HISTONEXPRESSION UND REINIGUNG

#### Tag 1: Transformation

Kompetente BL21pLys(DE) wurden mit ca. 1 µg Plasmid-DNA, die für das gewünschte Histon kodiert, transformiert und die Bakterien wurden auf LB-Platten mit den Antibiotika Chloramphenicol und Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Außerdem wurden 18 l LB-Medium hergestellt. Die Expression kann entweder in einem Fermenter oder in 36 Flaschen à 500 ml durchgeführt werden.

#### Tag 2: Bakterienwachstum

Die Bakterien auf den LB-Platten wurden mit 5 ml LB-Medium von den Platten gewaschen und in das vorbereitete Medium in den Flaschen gegeben, das mit 0,1 mg/ml Ampicillin (Endkonzentration) und 30 µg/ml Chloramphenicol versetzt worden war. Die Flaschen wurden bei 37°C und 200 rpm Schüttelgeschwindigkeit inkubiert und in regelmäßigen Abständen wurde die OD<sub>600</sub> gemessen. Sobald die optische Dichte den Wert 0,6 bis 0,7 erreicht hatte, wurden die Bakterien durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert und für weitere 3 Stunden bei 37°C geschüttelt.

Die Bakterien wurden alsdann abzentrifugiert (Heraeus Zentrifuge, 1l-Becher, jeweils 15 min bei 4000 rpm) und die Zellpellets bei -20°C bis zum nächsten Tag eingefroren.

#### Tag 3: *Inclusion bodies* Präparation

Die Bakterienpellets wurden in 10 bis 15 ml Waschpuffer resuspendiert, so dass das Gesamtvolumen unter 35 ml lag (diese Menge kann maximal auf einmal in der French Press aufgeschlossen werden). PMSF und β-Mercaptoethanol wurden in Endkonzentrationen von 0,2 mM bzw. 5 mM zu den resuspendierten Zellen gegeben.

Die Zellen wurden durch 3 bis 6 maliges Passieren durch die French Press bei einem Druck von 800 bis 1000 psi lysiert und die DNA wurde durch Sonifikation auf Eis (50 ml Falcon-Gefäß, große Spitze, 5 min, jeweils 5 sec an/aus, maximale Intensität) zerkleinert, bis die Viskosität abgenommen hatte (letzteres wurde durch eine 200µl-Pipette überprüft). Die freigesetzten inclusion bodies wurden in SS34-Röhrchen (Sorvall-Zentrifuge, 18 000 rpm, 4°C, 20 min) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Triton-Waschpuffer (der frisch hinzugegebenes 0,2 mM PMSF und 5 mM β-Mercaptoethanol enthielt) resuspendiert und dann wieder abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, 20 000 rpm, 20 min, 4°C). Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, hierzu wurde der Waschpuffer ohne Triton eingesetzt. Aliquots der Waschschriffe wurden zur Überprüfung des

Reinigungseffekts auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Pellet, das mit zunehmendem Waschen heller geworden war, wurde zur Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht eingefroren.

#### **Tag 4: *Inclusion bodies*-Auffaltung**

Auf das gefrorene Pellet wurde 1 ml DMSO gegeben, bis dieses bei RT aufgetaut war. Dann wurden ca. 5 ml *Unfolding* Puffer dazugegeben und das Pellet wurde resuspendiert. Nach und nach wurde mehr *Unfolding* Puffer hinzugefügt, bis das Gesamtvolumen ca. 30 ml betrug. Anschließend wurde die Suspension für eine Stunde im Kühlraum am Drehrad rotiert. Die nicht in Lösung gegangenen Proteine wurden durch Zentrifugation (Ultrazentrifuge, 30 000 rpm, Ti 45 Rotor, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) abgetrennt; der Überstand enthielt das Histon. (Der Rückstand kann optional noch einmal mit *Unfolding* Puffer + DTT extrahiert werden; dieses Verfahren bringt eine leichte Erhöhung der Histonausbeute, jedoch auch mehr Kontamination). Der Überstand wurde dreimal gegen 1 l SAU200 Puffer dialysiert, das letzte Mal über Nacht.

#### **Tag 5: SP-Sepharose-Reinigung an der FPLC**

Ungelöste Proteine wurden durch Zentrifugation (Sorvall, 20 000 rpm, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) abgetrennt, der dialysierte Überstand wurde auf eine Hitrap SP-Sepharose-Säule geladen und die gebundenen Proteine durch einen linearen Gradienten (in 5 CV von 0% auf 40% B, in weiteren 5 CV von 40% auf 100%B, wobei A = SAU200 und B = SAU600) eluiert (50 ml loop, 1 ml Fraktionen, max. Druck 0,8 MPa, flow 1,5 ml/min).

Vor dem Lauf war die Säule mit dem „hitrap equilibration“-Programm äquilibriert worden, welches die Säule erst mit 0% B (= SAU200), dann mit 100% B (= SAU600) und dann wieder mit 0% B wäscht. Dasselbe Programm wurde nach dem Lauf zum Reinigen der Säule verwendet.

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf 15% SDS-Gelen auf das Histon untersucht. Dazu wurden je 5  $\mu\text{l}$  der Fraktion auf ein 18% SDS-Gel geladen. Die histon-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, dreimal für je eine Stunde gegen je 1 l entionisiertes Wasser dialysiert, in 1 ml-Portionen aliquotiert und lyophilisiert.

#### **Waschpuffer:**

50 mM Tris pH 7,5  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA  
5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,2 mM PMSF

#### **Triton-Waschpuffer:**

Waschpuffer mit 1% (v/v) TritonX-100



**Unfolding Puffer:**

7 M GuanidiniumHCl  
 20 mM Tris pH 7,5  
 10 mM DTT

**SAU200/600 Puffer:**

7 M Harnstoff  
 20 mM Natriumacetat pH 5,2  
 200 bzw. 600 mM NaCl  
 1 mM EDTA  
 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

**3.2.24 OKTAMER-REKONSTITUTION**

Die lyophilisierten Histone wurden in einer ungefähren Konzentration von 1 mg/ml in *Unfolding* Puffer aufgenommen. Um die Histone in gleichen Verhältnissen mischen zu können, wurde die UV-Absorption der jeweiligen Histone unverdünnt bei 275 nm bestimmt. Dazu wurden UV-Einmalküvetten aus Plastik verwendet. Aus dieser Absorption wurde zunächst die gewichtete Absorption berechnet:

$$A = \text{Abs.} : Q$$

wobei: **A** = gewichtete Absorption

**Abs.** = die bei 275 nm gemessene Absorption in *Unfolding* Puffer

**Q** = Gewichtungsfaktor der Histone

(hierbei ist Q für H2A: 4050; H2B: 6070; H3: 4040; H4: 5400)

Aus den berechneten A-Werten für die einzelnen Histone wurde der kleinste ausgewählt (z.B. derjenige von H3) und mit „a“ bezeichnet.

Anschließend wurden die Volumina der einzelnen Histonlösungen bestimmt. Das Volumen der Lösung mit dem kleinsten a-Wert wurde als „v“ bezeichnet. Die zur Rekonstitution des Oktamers einzusetzende Menge für das jeweilige Histon ergibt sich wie folgt:

$$x = (a * v) : A$$

wobei **x** = die einzusetzende Menge des jeweiligen Histons in  $\mu$ l ist.

Die Lösung, deren Wert A am kleinsten ist, wird dabei vollständig aufgebraucht.

Zu den so berechneten Mengen der einzelnen Histonlösungen wurde noch einmal das gleiche Volumen an *Unfolding* Puffer gegeben, und dann diese Mischung bei 4°C gegen *Refolding* Puffer dialysiert (zweimal für 1h, einmal über Nacht; jeweils 1 l).

Das ausgefallene Protein wurde kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 13 000 rpm, 5 min) und der Überstand wurde in Centricon-Röhrchen (Ausschlußgröße 30 K) auf ca. 2 ml

aufkonzentriert (7000 rpm in Sorvall Zentrifuge, SS34 Rotor, 4°C, jeweils 20 bis 30 min Zentrifugation, dann Kontrolle des verbleibenden Volumens).

Anschließend wurde das entstandene Oktamer über eine Superdex200-Säule aufgereinigt, um es von Tetramer und nicht assemblierten Histonen abzutrennen (flow 1 ml/min, 2 ml-Fractionen, 0,7 MPa max. Druck, gesamter Lauf 1,2 CV, Laufpuffer: *Refolding* Puffer). Die Fraktionen wurden auf einem 18% SDS-Gel analysiert, und diejenigen Fraktionen, die die einzelnen Histone im 1:1:1:1-Verhältnis enthielten, wurden vereinigt und über Centricon (Ausschlußgröße 30 K) aufkonzentriert (von ca. 14 ml auf ca. 1 ml). Die Oktamerlösung wurde mit dem gleichen Volumen an Glycerin versetzt (Endkonzentration 50%) und bei -20°C aufbewahrt.

**Unfolding Puffer:**

Siehe Histonexpression und Reinigung

**Refolding Puffer:**

2 M NaCl  
10 mM Tris pH 7,5  
1 mM EDTA  
5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 3.2.25 RADIOAKTIVE PCR FÜR DAS 146- BZW. 248 BP-FRAGMENT

Zur Herstellung des 146 bp und 148 bp-Fragmentes wurde eine PCR mit radioaktiv markiertem dCTP am rDNA Promoter durchgeführt.

Dazu wurde folgende Reaktion angesetzt:

	146 bp rDNA Promoter Fragment	248 bp rDNA Promoter Fragment
H <sub>2</sub> O	850 $\mu$ l	850 $\mu$ l
10x PCR Puffer	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
2 mM dCTP	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
10 mM dA/G/TTP	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Primer LP2 (100 mM)	-	5 $\mu$ l
Primer LP7 (100 mM)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Primer LP86 (100 mM)	5 $\mu$ l	-
Template (pMr974)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Taq Polymerase	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
$\alpha$ -32P-dCTP	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
gesamt	1 ml	1 ml

Die Sequenz der Primer kann der Datenbank im Becker-Labor entnommen werden.

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	94°C	1 min	25x
Annealing	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	

Am Ende der PCR wurde *kein* Kühschritt durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen wurden vor der Aufreinigung Ethanol-gefällt, um das Volumen zu reduzieren und nicht eingebaute radioaktive Nukleotide zu entfernen. Dazu wurde die 1 ml-Reaktion auf 3 Portionen aufgeteilt (je 333 µl), mit je 33 µl 3M Natriumacetat, 825 µl 100% Ethanol und 3,3 µl Glycogen versetzt und bei -20°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die PCR-Reaktion durch Zentrifugieren gefällt (20 min, 13 000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl 1x TE gelöst. Zu der DNA-Lösung wurden 20 µl OrangeG-Ladepuffer gegeben.

Um die PCR-Produkte aufzureinigen, kann entweder ein Agarosegel oder ein Polyacrylamidgel verwendet werden. Das Agarosegel eignet sich gut für das 146 bp Fragment, das 248 bp Fragment kann dadurch jedoch nicht komplett sauber gewonnen werden und zeigt bei nachfolgenden Acrylamidgelen immer eine etwas höher laufende zusätzliche Bande.

#### **Aufreinigung über Agarosegel:**

Ein großes 2% Agarosegel (Puffer: ca. 200 ml 1x TBE) mit Ethidiumbromid wurde hergestellt. Die Taschenlänge betrug jeweils ca. 2,5 cm; dadurch konnte eine ganze PCR-Reaktion in eine Tasche gefüllt werden. Nach dem Auftragen der PCR-Reaktion wurde das Gel 3 Stunden bei ca. 120 V laufen gelassen. Die PCR-Bande wurde dann unter UV-Licht ausgeschnitten.

Das Gelstück mit der radioaktiven DNA wurde in 2 Hälften aufgeteilt. Um die DNA aus dem Gelstück zu isolieren, wurde das Gelstückchen in einen kleinen Filterpapier-„Trichter“ gelegt, der sich in einem Eppendorf-Gefäß befand. Dieses Gefäß (ohne Deckel) besaß ein kleines Loch am Boden und befand sich wiederum in einem zweiten Eppendorf-Gefäß. Diese „Anordnung“ wurde zentrifugiert (5 min, 13000 rpm, RT). Der im Gelstück enthaltene Puffer wurde auf diese Art zusammen mit der DNA eluiert, zurück blieb die Agarosematrix im Filterpapier. 1 µl des Eluats wurde im Szintillationszähler vermessen und daraus die Gesamtmenge der radioaktiven Counts errechnet. Zur Aufkonzentrierung kann die DNA durch Ethanol gefällt werden.

**Aufreinigung über Polyacrylamidgel:**

Ein 4% Polyacrylamidgel (Puffer 0,5x TBE) wurde nach folgendem Rezept zwischen zwei Glasplatten gegossen:

H <sub>2</sub> O	31,6 ml
10x TBE	2 ml
30% Acrylamidgemisch „Rotiphorese“	6 ml
20% APS (w/v)	375 µl
TEMED	30 µl

Die Proben wurden auf das Gel geladen und das Gel bei ca. 100-120 V laufen gelassen, bis der OrangeG-Farbstoff ca. die Hälfte der Laufstrecke zurückgelegt hatte. Anschließend wurde eine der beiden Glasplatte abgenommen und das Gel mit Frischhaltefolie bedeckt. In der Dunkelkammer wurde ein Film für 5 min auf das Gel aufgelegt, um die Lage der Banden festzustellen. Anhand dieses Filmes wurden dann bei Tageslicht die Banden aus dem Gel ausgeschnitten.

Um die DNA aus den Polyacrylamid-Gelstückchen zu isolieren, wurde auf jedes Gelstück 600 µl Elutionspuffer gegeben und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Überstand ist die "Elution 1". Übernachtinkubation im selben Volumen Elutionspuffer und gleichen Bedingungen wird "Elution 2" genannt.

Anschließend wurden die Eluate vereinigt und mit Ethanol gefällt. Hierzu wurden 300 µl 5 M NaCl-Lösung und 167 µl 10% (v/v) SDS-Lösung zu den 1,2 ml der DNA-Elution gegeben (Endkonzentrationen: 1M NaCl, 1% SDS) und 1 min gevortext. Alsdann wurde das gleiche Volumen an Chloroform (hier: 1,5 ml) zur DNA gegeben, und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (5 min, 13000 rpm, 4°C). Die obere, DNA enthaltende Phase wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt, mit 3 Volumina 100% Ethanol und 10 µl Glycogen der Konzentration 20 mg/ml versetzt und eine Stunde bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde abzentrifugiert (30 min, 13000 rpm, 4°C), einmal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Auf das getrocknete DNA-Pellet wurde 100 µl Wasser gegeben. Aus einer 1:10-Verdünnung wurde die spezifische Radioaktivität am Szintillationszähler ermittelt.

**DNA-Elutionspuffer  
für Acrylamid-Elutionen:**

0,5 M Ammoniumacetat

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1% (w/v) SDS

1 mM EDTA

### 3.2.26 HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN MONONUKLEOSOMEN (SALZDIALYSE)

Zur Herstellung von Mononukleosomen muss zunächst das Verhältnis DNA-Histone titriert werden. Idealerweise stehen DNA und Oktamer im Verhältnis 1:1, so dass nahezu keine freie DNA mehr in der Mischung vorliegt.

Die Konzentration der DNA und vor allem des Oktamers ist schwer abzuschätzen, deswegen werden mehrere Reaktionsansätze mit jeweils unterschiedlichem Verhältnis DNA-Oktamer gebraucht, um das Verhältnis 1:1 zu treffen. Teilweise ist auch eine zweite genauere Titration erforderlich. Um eine gute Detektion in den nachfolgenden Experimenten zu gewährleisten, wird radioaktiv markierte DNA (das 146 oder das 248 bp Fragment) verwendet (Herstellung siehe Kapitel 3.2.25). Deren Menge kann sehr gering gehalten werden; um jedoch bessere Handhabung zu erreichen, wird die Reaktion mit kalter DNA "aufgefüllt".

Für jedes DNA-Oktamer-Verhältnis wurde ein Reaktionsansatz wie folgt in einem silikonisierten Reaktionsgefäß zusammenpipettiert (hier der Ansatz für das 146 bp-Fragment):

**Nukleosomen-assembly:**

4,8 µl 5 M NaCl (Endkonzentration 2 M)

0,25 µl Tris pH 7,3 (Endkonzentration 1 M)

1 µg kalte DNA, z.B. ein DNA-Standard oder kaltes 146 bp-Fragment

0,2 µl heißes 146 bp-Fragment

Anschließend wurden verschiedene Mengen Oktamer dazugegeben, die sich um das Verhältnis 1:1 bewegten (z.B. 0,7 bis 1,5:1), und die Reaktion mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt.

Die Mischung wurde 10 min auf 37°C inkubiert. Dann wurde jeweils 30 µl Verdünnungspuffer zu jeder Reaktion gegeben und für 30 min bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden alle Ansätze für 2 Stunden gegen 1l 1x TE bei RT dialysiert.

Um die kleinen Mengen zu dialysieren, wurde ein sogenanntes Mikrodialysiersystem verwendet: Von einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde das untere Ende mit einer scharfen Klinge abgeschnitten, und in den Deckel ein großes Loch geschnitten. Oben zwischen Deckel und Gefäßrand wurde ein kleines Stück Dialysemembran gelegt, der Deckel geschlossen und das Gefäß auf Dichtigkeit überprüft, indem von der unteren, jetzt offenen Seite 500 µl Wasser eingefüllt wurden. War nach 5 min kein Auslaufen des Wassers bei auf dem Kopf gestellten Gefäß zu beobachten, wurde das Wasser wieder entfernt und

stattdessen ein Reaktionsansatz eingefüllt. Für jeden einzelnen Ansatz wurde ein derart vorbereitetes Reaktionsgefäß benötigt.

Nach der Dialyse wurden von jedem Ansatz ca. 8 µl (= ca. 20%) entnommen und nach Zugabe von 1 µl 50% (v/v) Glycerin als Ladepuffer auf ein kleines 4,5% natives TBE-Gel geladen. Als Vergleich diente freie radioaktiv markierte DNA. Nach einer Stunde Vorlauf des Gels ohne Probe (bei 100 V) folgte der Hauptlauf bei ca. 100 V, bis das mit aufgetragene BPB die Mitte des Gels erreicht hatte (ca. 2 Stunden).

Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier getrocknet und entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht gegen einen Röntgenfilm exponiert, oder für eine Stunde mit einem Phosphoimager-*screen* bedeckt und dann mit der Aida Software ausgewertet.

**Verdünnungspuffer:**

1x TE  
0,01% BSA

**4,5% natives Gel im Novex System:**

4,5% (w/v) Polyacrylamid-Lösung „Rotiphorese“  
0,5x TBE  
Gesamtvolumen ca. 6 ml für 1 Gel

**Laufpuffer:**

0,5x TBE

### **3.2.27 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON ssDNA**

Die einzelsträngige DNA "REPDES" wurde freundlicherweise von F. Azorin zur Verfügung gestellt. Sie ist 104 bp lang und wurde chemisch synthetisiert. Die Sequenz ist in Kapitel 3.1.3 zu finden.

Die ssDNA wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv markiert.

Dazu wurde folgende Reaktion angesetzt:

**Markierungsreaktion für ssDNA:**

1 µl ssDNA pREPDES  
1 µl T4-Polynukleotidkinase  
1 µl T4-PNK-Puffer 10x  
1 µl  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (Amersham)  
6 µl Wasser

Die Reaktion wurde für 1,5 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, und anschließend das Enzym für 20 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  hitzeinaktiviert.

Die radioaktiv markierte ssDNA wurde von den freien Nukleotiden über ein Gelfiltrationssäulchen („QuickSpin“) abgetrennt, und die Effizienz der Markierungsreaktion wurde im Szintillationszähler gemessen.

### **3.2.28 ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA) MIT ssDNA**

Die Inkubation der Proteine mit der radioaktiv markierten ssDNA erfolgte in silanisierten Reaktionsgefäßen. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 20 µl, die Salzkonzentration 150 mM KCl.

#### **Reaktionsansatz für ssDNA-EMSAs:**

1 µl verdünnte, radioaktiv markierte ssDNA (ca. 15 –20 000 cpm)  
1 bis 10 µl Protein (in BC300)  
1 bis 10 µl BC0  
0,5 µl BSA (10 mg/ml)  
BC150 ad 20 µl

Die Reaktionsansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert, anschließend wurde sofort 2 µl Bromphenolblau-Ladepuffer dazugegeben und die Reaktionsansätze auf einem 4% nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Das 4% Gel wurde 1 bis 2 Stunden bei 60V/ 8mA vorgelaufen; als Laufkontrolle wurde Bromphenolblau-Ladepuffer mit aufgetragen. Wenn dieser das Gel ca. zur Hälfte passiert hatte, wurden die Proben aufgetragen und das Gel wurde ca. für weitere 2 Stunden bei 60 V laufen gelassen. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier getrocknet und bei -80°C über Nacht gegen einen Röntgenfilm exponiert.

#### **4% natives Gel in Novex-Gelkassetten (große Taschen):**

6,4 ml Wasser  
1,2 ml Acrylamidmix "Rotiphorese" (30/0,8)  
0,4 ml 10x TBE  
80 µl 20% APS (w/v)  
6 µl TEMED

#### **Laufpuffer:**

0,5x TBE

#### **Ladepuffer:**

50% (v/v) Glycerin  
0,05% Bromphenolblau

### **3.2.29 HDAC ASSAY**

20 µl ProteinG-*beads*, die nach einer Immunpräzipitation mit dem 9E10 Antikörper erhalten wurden und die sich in Puffer IPH befanden, bzw. 20 µl-Aliquots von Säulenfraktionen (z.B. ResourceQ) wurden für 90 min bei 30°C mit 2 µl <sup>3</sup>H-markierten

Hühner-Histonen (25 000 cpm/ $\mu$ l) inkubiert. Dann wurden 230  $\mu$ l IPH150 Puffer sowie 65  $\mu$ l einer 1M HCl/0.16M Essigsäure-Mischung dazugegeben. Anschließend wurden 700  $\mu$ l Ethylacetat daraufpipettiert, kräftig gevortext, kurz zentrifugiert und 500  $\mu$ l von der oberen Phase abgenommen. Diese wurden für die Szintillationszählung verwendet.

**IPH 150:**

50 mM Tris pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,1% (v/v) NP40  
0,2 mM PMSF

### **3.2.30 HIM ASSAY**

Histonmethyltransferase-Assays nach der „spot-and-count“-Methode sind eine schnelle und einfache Methode, um in Chromatographiefraktionen oder rekombinant hergestellten Proteinen Methyltransferase-Aktivität zu detektieren.

Die Histonmethyltransferase-Assays wurden in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Dazu wurden entweder 1  $\mu$ g H3-Peptid bzw. 3  $\mu$ g Histon H3 bzw. 10  $\mu$ g Oktamer (Herstellung siehe Kapitel 3.2.24) zusammen mit 500 nCi *S*-Adenosyl-(methyl-<sup>3</sup>H)-L-Methionin (25  $\mu$ Ci ml<sup>-1</sup>) (Amersham) in Methyltransferasepuffer und 5, 10 oder 25  $\mu$ l aufgereinigtem Protein bzw. Säulenfraktion oder 15  $\mu$ l Agarosebeads (bei Immunpräzipitationen) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Aufträufeln von ca. 40  $\mu$ l des Reaktionsansatzes auf p81-Filterpapier gestoppt (*spot*). Die Filterpapierchen wurden drei mal 10 Minuten in 50 mm Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.2 gewaschen und anschließend getrocknet. Der Einbau von <sup>3</sup>H-gelabelten Methylgruppen wurde nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen (*count*).

**Methyltransferase-Puffer:**

50 mM Tris pH 8.0  
0,5 mM DTT

### **3.2.31 LUCIFERASE ASSAY**

Für Luciferase-ReporterAssays wurden mit Sf4 oder besser mit SL2-Zellen durchgeführt. Die Transfektion wurde wie in Kapitel 3.2.11 durchgeführt. Es wurden 6-*well*-Platten mit jeweils 1,5-2\*10<sup>6</sup> Zellen verwendet.

Für einen Luciferase-Assay werden immer mehrere verschiedenen Plasmide gleichzeitig transfiziert: das Firefly-Luciferase-Reporterplasmid G<sub>5</sub>DE<sub>5</sub>tkLuc, das Renilla-Luciferase-



Reporterplasmid pRLuc-TK, der Gal4-Vektor ohne Insert, und das jeweilige Effektorplasmid (hier z.B. E(Z) bzw. Rpd3), das für das zu untersuchende Protein als Gal4-Fusionsprotein codiert. Von den beiden Reporterplasmiden wurde jeweils 100 ng eingesetzt, vom Effektorplasmid variierende Mengen von 0,1 bis 2 µg und der „leere“ Gal4-Vektor wurde zum Auffüllen auf 2 µg Gesamt-DNA-Menge benutzt.

Die Plasmide wurden, wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben, in die SL2-Zellen transfiziert und anschließend für 2 Tage bei 26°C gehalten.

Für den Luciferase-Assay wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von den *wells* abgelöst, in 15 ml- Gefäße überführt und abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und wieder abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm, 4°C)

Anschließend wurden die Zellen in 100 µl 1:4 verdünntem Passive Lysis Buffer (alle Reagenzien für den Luciferase-Assay von Promega) suspendiert und 15 min bei RT stehen gelassen. Zur Beschleunigung der Lyse wurde hin und wieder gevortext. Der Zelldebris wurde abzentrifugiert (10 min, 13 000 rpm, 4°C) und vom Überstand wurden 10 µl auf den Boden eines 5 ml-Sarstedt-Röhrchens gegeben. Dazu wurden 100 µl Luciferase Assay Substrate gegeben und die Lumineszenz der Firefly-Luciferase wurde sofort am Luminometer vermessen. Nachdem alle Proben gemessen worden waren, wurde 100 µl Stop and Glow-Reagenz dazugegeben und wiederum die Lumineszenz gemessen. Das Stop and Glow-Reagenz stoppt durch pH-Änderung die Lumineszenz der Firefly-Luciferase und man kann die dann aktive Renilla-Luciferase vermessen.

Die Firefly-Luciferase-Werte konnten durch Normalisierung über die Renilla-Werte vergleichbar gemacht werden.

### **3.2.32 REINIGUNG VON *UNGETAGTEM* HP1**

HP1 wurde als *ungetagtes* Protein (Zhao and Eissenberg, 1999) hergestellt und aufgereinigt.

1 µl des HP1-Plasmides (dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von J. Eissenberg) wurde in BL21(DE3)pLys transformiert und die Bakterien wurden auf Chloramphenicol-Ampicillin-LB-Platten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden mehrere Kolonien von der Platte abgenommen und in 50 ml LB (mit Chloramphenicol und Ampicillin) gegeben. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur auf 1,5 l expandiert (LB mit Chloramphenicol und Ampicillin) und weiterhin bei 37°C geschüttelt, bis die OD<sub>600</sub> ca. den Wert 0,6 erreicht

hatte. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 mM IPTG induziert und weiter geschüttelt. Nach drei Stunden Schütteln bei 30°C wurden die Bakterien pelletiert, in 40 ml Lysis Puffer (100 mM NaCl) aufgenommen, eingefroren, wieder aufgetaut, mit Ultraschall behandelt (2 mal je 1 min, Amplitude 50%, dazwischen je 1 min Pause) und festes NaCl zu einer Endkonzentration von 0,3 M dazugegeben. Anschließend wurde der Zelldebris abzentrifugiert (18 000 rpm, Sorvall-Zentrifuge, 30 min, 4°C) und der Überstand dreimal jeweils eine Stunde gegen Lysispuffer (100 mM NaCl) dialysiert. Alternativ kann auch der Überstand mit Lysis Puffer ohne NaCl verdünnt werden, was aber das Volumen der HP1-Lösung stark erhöht.

### 3.2.32.1 DEAE-SÄULE

Eine 20 ml-DEAE-Säule wurde in Lysis Puffer (100 mM NaCl) äquilibriert. Die Probe, deren Volumen ca. 15 ml betrug, wurde vor dem Auftragen filtriert. Dann wurde der Säulenlauf mit folgenden Parametern durchgeführt:

Geschwindigkeit	2 ml/min
Max. Druck	0,5 MPa
Fraktionsgröße	5 ml
Auftrag in	100 mM NaCl (Lysis Puffer)
Waschen nach Auftrag	2 CV, 100 mM NaCl
Gradient	In 0 CV auf 400 mM NaCl 5 CV 400 mM (=Elution)

Die Fraktionen wurden auf einem 15% SDS-Gel analysiert und die HP1-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Diese Lösung wurde mit Lysis Puffer (ohne NaCl) 1:4 verdünnt, so dass die NaCl-Konzentration auf 100 mM sank.

### 3.2.32.2 RESOURCE Q

Nach dem Äquilibrieren einer 6 ml-ResourceQ-Säule in Lysis Puffer (100 mM/400 mM/100 mM) wurden die vereinigten HP1-Fraktionen nach Filtrieren manuell aufgetragen, da das Volumen sehr groß war. Zum manuellen Auftragen wurde das Injektionsventil auf "inject" und die Pumpe auf 1 ml/min gestellt.

Anschließend wurde die Säule folgendermaßen laufen gelassen:

Geschwindigkeit	1 ml/min
Max. Druck	1,1 MPa
Fraktionsgröße	2 ml
Auftrag in	100 mM NaCl (Lysis Puffer)
Waschen nach Auftrag	entfällt
Gradient	In 10 CV von 100 mM auf 400 mM NaCl

Die Fraktionen wurden anschließend auf einem 15% SDS-Gel analysiert, die HP1-enthaltenden Fraktionen, die bei ca. 0,2 – 0,25 M NaCl eluierten, wurden zusätzlich per Wester Blot identifiziert und dann vereinigt (Gesamtvolumen ca. 5-6 ml bei drei vereinigten Fraktionen).

### 3.2.32.3 SUPERDEX200

Eine große Superdex200-Säule (120 ml CV) wurde in Lysis Puffer (100 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurden die vereinigten Fraktionen der vorhergehenden Säule aufgetragen und die Säule mit folgendem Programm laufen gelassen:

Geschwindigkeit	0,5 ml/min
Max. Druck	0,8 MPa
Fraktionsgröße	2 ml
Elution	Isokratisch bei 100 mM NaCl, ca. 200 ml

Die HP1-enthaltenden Fraktionen wurden wiederum über Western Blot identifiziert (15% SDS-Gel) und vereinigt (Gesamtvolumen ca. 10 ml).

### 3.2.32.4 MONOQ

Als letzte Säule wurde eine MonoQ-Säule (1 ml CV, HR 5/5) benutzt. Die vereinigten Fraktionen wurden filtriert, und die Säule in Lysis Puffer (100 mM) äquilibriert. Zum Säulenlauf wurden folgende Parameter verwendet:

Geschwindigkeit	0,5 ml/min
Max. Druck	5 MPa
Fraktionsgröße	0,3 ml
Auftrag in	100 mM NaCl (Lysis Puffer)
Waschen nach Auftrag	2 CV, 100 mM NaCl
Gradient	In 10 CV von 100 mM auf 400 mM NaCl

HP1 wurde per Coomassie-Gel und Western Blot (je 15% Gele) identifiziert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt (meist eluiert HP1 von der MonoQ-Säule in zwei *peaks*), aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **Lysis Puffer HP1:**

100 mM Tris pH 7,3  
 4 mM EDTA  
 0,4 mM EGTA  
 4 mM DTT  
 1 mM PMSF

je nach Bedarf wird NaCl zugesetzt (100 bzw. 400 mM)

### 3.2.33 BINDUNG VON DNA AN DYNABEADS

Um Untersuchungen über die DNA-Bindung von Proteinen durchzuführen, kann man statt eines EMSAs (siehe Kapitel 3.2.28) auch DNA an *beads* binden und über einen Western Blot untersuchen, ob daran Proteine binden.

Um diese Experimente durchführen zu können, muss die DNA zuerst an *beads* gebunden werden. Als DNA wurde eine 12malige Wiederholung einer 207bp langen 5S-rDNA-Sequenz verwendet, die sich im pAI-Vektor befindet.

100 µg des pAI-Vektors (ca. 5500 bp) wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym SacII geschnitten, was in einer Linearisierung des Vektors resultiert. Nach einer Kontrolle auf einem Agarosegel, ob der Restriktionsverdau komplett war, wurde der Vektor mit XbaI geschnitten. Hierbei wird ganz nahe an der SacII-Schnittstelle verdaut, ein sehr kleines Stück wird vom Vektor abgetrennt. Der linearisierte Vektor besitzt an den Enden also eine XbaI-Stelle mit 5'-Überhang des antisense-Stranges sowie eine SacII-Schnittstelle mit 3'-Überhang des sense-Stranges.

Die DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 100 µl TE resuspendiert. Anschließend wurde eine Klenow-Reaktion angesetzt, um die "fehlenden Basen" der XbaI-Stelle mit Biotin-gelabelten Nukleotiden aufzufüllen:

**Klenow-Reaktion:**

100 µl TE mit DNA  
20 µl 10x Puffer für Klenow  
20 µl Biotin-16-dUTP  
jeweils 0,4 µl dATP, dGTP, dCTP (100 mM)  
5 µl Klenow-Enzym  
Wasser ad 200 µl

An der SacII-Stelle können keine Basen durch das Klenow-Enzym eingebaut werden, er wird daher auch nicht mit Biotin markiert. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Klenow-Enzym durch eine Inkubation für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Die nicht eingebauten Nukleotide sowie das Biotin-markierte dUTP wurden durch eine kleine Gelfiltrationssäule abgetrennt (QuickSpin-Säulchen).

Die so gereinigte DNA, die nur an dem einen Ende mit Biotin markiert ist, wurde mit PstI geschnitten, um die rDNA-Wiederholungen vom Rest des Vektors abzutrennen. Auf einem Agarosegel sieht man zwei annähernd gleich große Banden (ca. 2500 und 3000 bp). Die untere der Banden ist mit Biotin markiert und wird in einer Bindungsreaktion an die *Dynabeads* (Dynal) gebunden:

**Dynabeads-Bindung der Biotin-markierten DNA:**

Ca. 20 µg DNA (= ca. 150 µl des PstI-Verdaus)

150 µl Kilobase-Binder (Dynal)

60 µl Dynabeads (10 mg/ml, Dynal), von denen der Überstand abgenommen wurde

Nach zwei Stunden Inkubation am Drehrad wurden die *beads* fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und dreimal mit 1x TE. Anschließend wurden die *beads* in 50 µl TE aufgenommen.

Zur Kontrolle, ob sich die DNA wirklich an den *beads* befindet, wurde eine kleine Menge der *beads* mit EcoRI inkubiert. EcoRI schneidet jeweils zwischen den 207bp-DNA-Wiederholungen. Auf einem Agarosegel kann man eine Bande bei ca. 200 bp detektieren, wenn die DNA wirklich an die *beads* gebunden hat.

War dies der Fall, kann die an *beads* gebundene DNA für Bindungsstudien mit Proteinen verwendet werden.

**Dynabeads-Waschpuffer:**

1x TE

1M NaCl

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ASSOZIATION VON HDAC1 MIT SU(VAR)3-9 IN *DROSOPHILA*

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt wurden schon publiziert und sind daher relativ knapp gehalten.

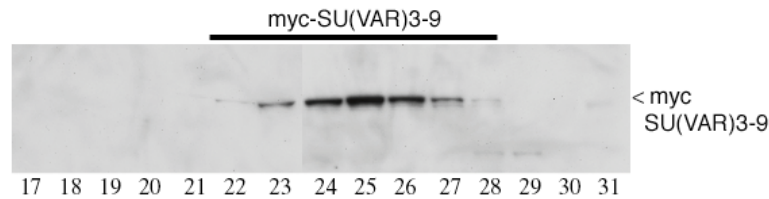
Durch einen genetischen *screen*, der nach *modifiers of position effect variegation* sucht (zuerst beschrieben von (Spofford, 1967)), wurde Su(var)3-9 entdeckt (Tschiersch et al., 1994).

Im Jahr 2000 konnte gezeigt werden, dass das Protein Methyltransferase-Aktivität besitzt (Rea et al., 2000) und spezifisch Lysin 9 (K9) des Histons H3 methyliert. Ob es jedoch mit anderen Proteinen interagiert oder sogar in Komplexen vorliegt, war weithin unbekannt und ist immer noch Gegenstand der Forschung.

#### 4.1.1 AUFREINIGUNG VON MYC-SUV39 AUS *DROSOPHILA* EXTRAKTEN

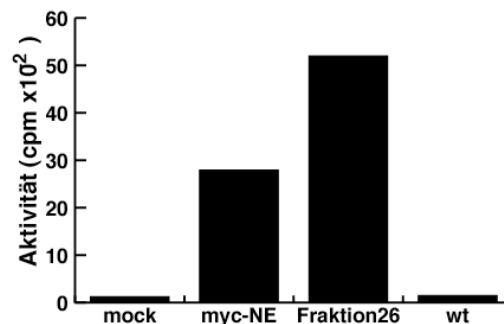
Um mögliche Interaktionspartner von Su(var)3-9 besser charakterisieren zu können und dabei der *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen, wurde Extrakt aus *Drosophila* Embryos untersucht, der aus einem mutierten Fliegenstamm gewonnen wurde. Dieser Stamm, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gunter Reuter (Halle), exprimiert Su(var)3-9 als triple-myc-*getagtes* Protein (Aagaard et al., 1999) unter der Kontrolle eines Hitzeschock-Promotors. Das heißt, durch Anwendung eines Hitzeschocks (37°C) kann die Expression des myc-Proteins induziert werden. Der Vorteil eines solchen *getagten* Extraktes liegt darin, dass dieser nicht nur durch aufwändige Säulenchromatographie aufgereinigt werden muß, sondern eine Anreicherung des Proteins auch durch den myc-*tag*, also eine Affinitätsreinigung, sehr leicht möglich ist.

Nachdem Embryos des Myc-Su(var)3-9-Fliegenstammes über mehrere Tage hinweg gesammelt worden waren, wurde ein 15minütiger Hitzeschock bei 37°C gegeben. Es hatte sich herausgestellt, dass kürzere Hitzeschocks vorteilhafter sind, da dann die Aktivität der Histon-Methyltransferase Su(var)3-9 höher ist. Nach Herstellung eines Kernextrakts (siehe Kapitel 3.2.8) aus den so behandelten Embryos wurde der Kernextrakt zunächst über eine ResourceQ-Säule aufgereinigt (analog zu Kapitel 3.2.32.2). Aliquots aus den Fraktionen wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot auf Anwesenheit von myc-Su(var)3-9 überprüft.



**Abb. 23: ResQ-Fractionen des myc-TRAX auf Western Blot.** Ein Kernextrakt aus Embryos, die myc-Su(var)3-9 exprimieren, wurde auf einer ResourceQ-Säule aufgetrennt. Jeweils 20  $\mu$ l von jeder Fraktion wurde auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Myc-Su(var)3-9 wurde nach dem anschließenden Western Blot mit anti-myc-Antikörper 9E10 detektiert.

Wie in Abb. 23 zu sehen, eluiert myc-Su(var)3-9 als singulärer *peak*. Die nachfolgende Immunpräzipitation mit dem 9E10 Anti-myc-Antikörper und Protein G-*beads* wurde sowohl aus dem ungereinigten Kernextrakt als auch aus den vereinigten Fraktionen der ResourceQ-Säule durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.9). Es zeigte sich, dass in beiden Fällen spezifisch Methyltransferaseaktivität präzipitiert werden konnte (siehe Abb. 24).

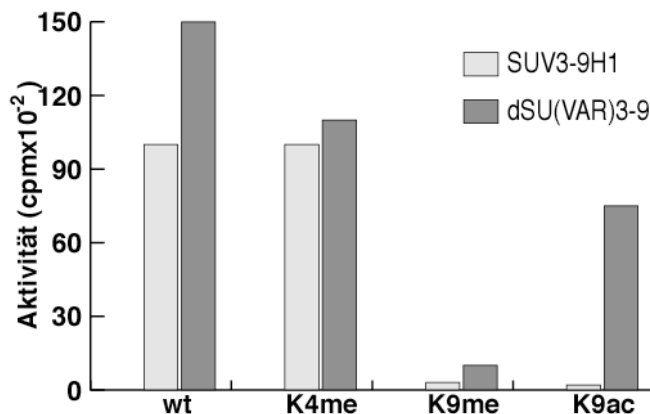


**Abb. 24: HIM-Assay mit dem immunpräzipitierten Material.** Ein ungereinigter myc-Su(var)3-9-Kernextrakt (myc-NE) bzw. die teilweise gereinigte ResourceQ-Fraktion 26 wurden für eine Immunpräzipitation mit dem anti-myc-Antikörper 9E10 verwendet. Daraufhin wurde ein HIM-Assay direkt an den *beads* durchgeführt. Als Kontrollen wurden Immunpräzipitationen ohne Antikörper ("mock") durchgeführt oder ein Wildtyp-Extrakt verwendet.

#### 4.1.2 SU(VAR)3-9 KANN H3- K9AC METHYLIEREN

Um die Lysin-Spezifität der Immunpräzipitate zu analysieren, wurden diese in einem HIM Assay (siehe Kapitel 3.2.30) mit verschiedenen Peptiden als Substrat inkubiert, die jeweils dem N-terminalen *tail* des Histons H3 (Aminosäure 1- 20) entsprechen, aber unterschiedliche Modifikationen an den Lysinen tragen. Im einzelnen sind dies das

unmodifizierte "Wildtyp"-Peptid (wt), das an Lysin 4 dimethylierte Peptid (K4me), das an Lysin 9 dimethylierte Peptid (K9me) sowie das an Lysin 9 acetylierte Peptid (K9ac). Rekombinantes Su(var)3-9 (human) kann nur das wt und das K4me-Peptid methylieren, während im Gegensatz dazu das K9ac Peptid für immunpräzipitiertes Su(var)3-9 aus Fliegen ebenfalls ein Substrat darstellt (siehe Abb. 25).

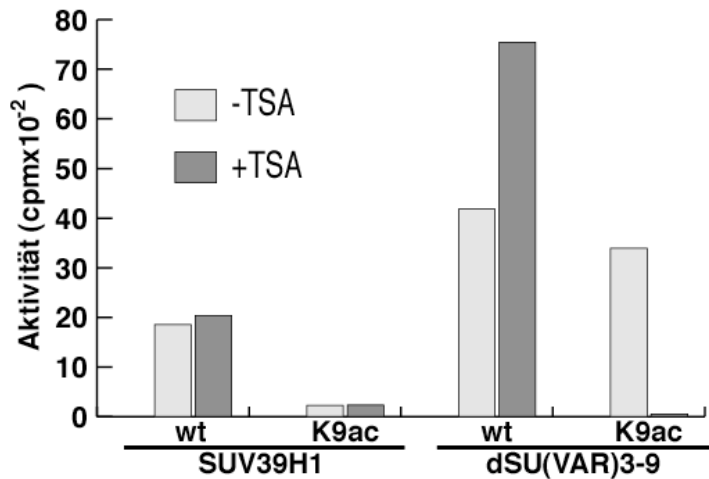


**Abb. 25: HIM-Assay zur Untersuchung der Spezifität von rekombinantem SUV3-9H1 und immunpräzipitiertem dSu(var)3-9.** Humanes Su(var)3-9 wurde rekombinant hergestellt; Su(var)3-9 aus dem myc-Su(var)3-9 Extrakt wurde über eine ResourceQ-Säule gereinigt und dann mit Hilfe des 9E10-Antikörpers immunpräzipitiert. Diese beiden Proteine wurden in einem HIM-Assay eingesetzt. Als Substrat diente unmodifiziertes (wt), Lysin4-dimethyliertes (K4me), Lysin9-dimethyliertes (K9me) bzw. Lysin9-acetyliertes (K9ac) H3-Peptid.

Um herauszufinden, ob dieses Ergebnis auf die Anwesenheit einer Histon-Deacetylase im präzipitierten Material zurückzuführen ist, wurde der gleiche Versuch noch einmal durchgeführt, diesmal unter Zugabe von Trichostatin A (TSA), einem spezifischen Deacetylase-Inhibitor. Es stellte sich heraus, dass Zugabe von TSA die Methylierung des K9ac Peptides merklich reduzierte (Abb. 26).

Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Methyltransferase Su(var)3-9 mit einer Deacetylase assoziiert ist. Diese könnte vor der Methylierungsreaktion das acetylierte Lysin deacetylieren und somit die Methylierung des Lysins erst ermöglichen.

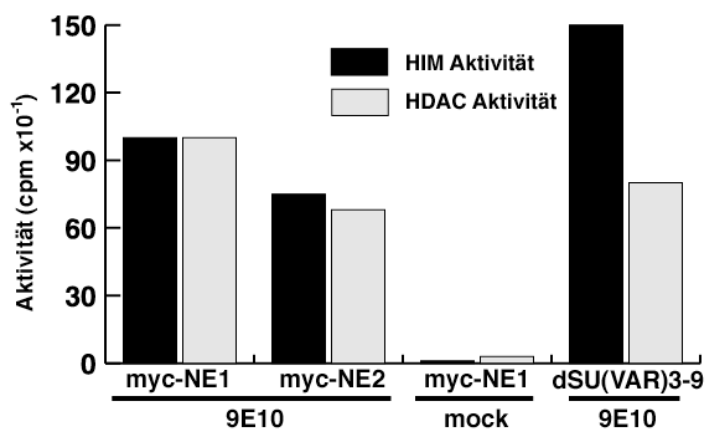




**Abb. 26:** Aktivität von rekombinantem humanen SUV39H1 und immunpräzipitiertem dSu(var)3-9 bei Zugabe von TSA (50 nM). Der gleiche Versuch wie in Abb. 25 wurde wiederholt, mit dem Unterschied, dass entweder TSA (gelöst in Ethanol) in einer Endkonzentration von 50 nM eingesetzt wurde, oder Ethanol allein (-TSA) zugegeben wurde.

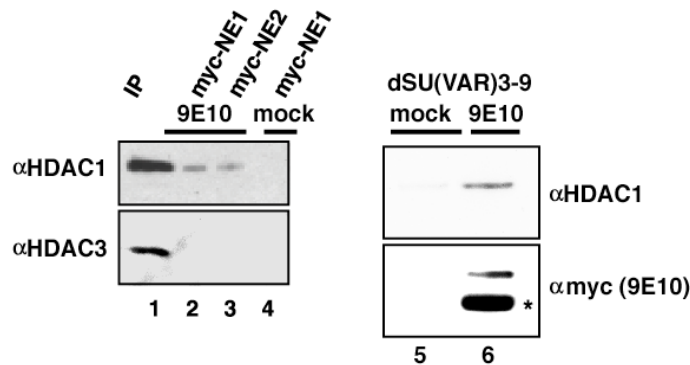
#### 4.1.3 SU(VAR)3-9 IST MIT DER DEACETYLASE HDAC1 ASSOZIIERT

Um genauer festzustellen, ob nun wirklich eine Histondeacetylase für den beobachteten Effekt verantwortlich war, wurde das immunpräzipitierte myc-Su(var)3-9 aus dem Embryo-Kernextrakt auf HDAC-Aktivität überprüft. Das Ergebnis des HDAC-Assays (siehe Kapitel 3.2.29) ist in Abb. 27 dargestellt. Mit anti-myc-Antikörper präzipitiertes Su(var)3-9, das direkt aus dem Kernextrakt stammt, zeigt genauso wie präzipitiertes Protein aus den teilweise gereinigten ResourceQ-Fractionen eine HDAC-Aktivität.



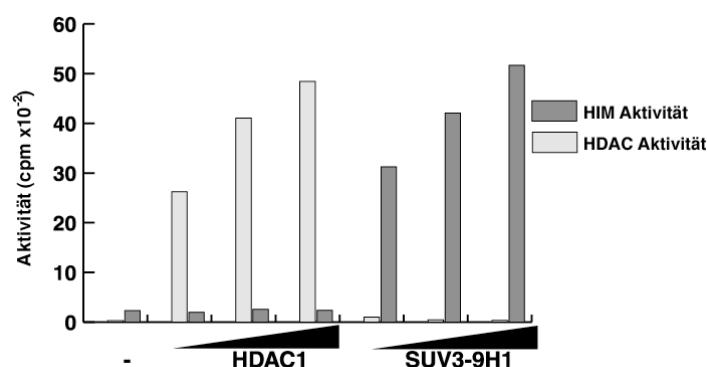
**Abb. 27:** HDAC-Aktivität von immunpräzipitiertem myc-Su(var)3-9. Zwei ungereinigte myc-Su(var)3-9-Kernextrakte (myc-NE 1 und 2) bzw. die teilweise gereinigte ResourceQ-Fraktion 26 (dSu(var)3-9) wurden für eine Immunpräzipitation mit dem anti-myc-Antikörper 9E10 verwendet. Daraufhin wurde ein HDAC- sowie HIM-Assay direkt an den *beads* durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation ohne Antikörper ("mock") durchgeführt.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen HDAC1 und HDAC3 konnte auf einem Western Blot festgestellt werden, dass HDAC1 mit Su(var)3-9 copräzipitiert (siehe Abb. 28). HDAC3 wurde hingegen nicht detektiert. Die Abwesenheit von anderen Histondeacetylasen kann aus diesem Experiment nicht geschlussfolgert werden. HDAC1 wurde sowohl in den beiden Kernextrakten (Abb. 28 links) sowie in den teilweise gereinigten Fraktionen gefunden (Abb. 28 rechts).



**Abb. 28: Western Blot des IP-Materials aus Abb. 27.** Nachdem die *beads* aus obigem Versuch in Ladepuffer aufgekocht worden waren, wurden die Proben auf ein 10%SDS-Gel geladen und geblottet. Die Detektion erfolgte entweder mit anti-HDAC1 (oberer Teil des Blots), anti-HDAC3 oder anti-myc-Antikörper (unterer Teil des Blots). Die Input-Spur (IP) enthält ca. 30% des Materials, welches für die Immunpräzipitation verwendet wurde. Der Stern bezeichnet die leichte Kette des Antikörpers 9E10, welche im Blot ebenfalls durch den Maus-Zweitantikörper detektiert wird.

Um sicherzugehen, dass Su(var)3-9 keine intrinsische HDAC-Aktivität besitzt, wurde das rekombinante Protein in einem HDAC-Assay getestet; ebenso wurde rekombinantes HDAC1 auf Methyltransferase-Aktivität untersucht. In beiden Fällen (siehe Abb. 29) konnte keine intrinsische Aktivität der Enzyme festgestellt werden.



**Abb. 29: HIM und HDAC Assay mit rekombinanten Proteinen.** Zum Ausschluß intrinsischer Aktivität wurden die rekombinanten Proteine Su(var)3-9 (aus *E.coli*) sowie HDAC1 jeweils auf HIM- und HDAC-Aktivität geprüft.

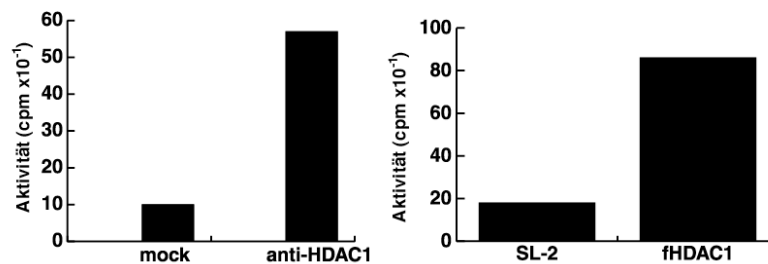
#### 4.1.4 HDAC1 IST MIT METHYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT ASSOZIIERT

Um die Interaktion zwischen HDAC1 und Su(var)3-9 zu bestätigen, wurde das "umgekehrte" Experiment durchgeführt:

Einmal wurde mit einem anti-HDAC1-Antikörper aus den teilweise gereinigten ResourceQ-Fractionen HDAC1 präzipitiert (analog zur Immunpräzipitation mit dem 9E10 Antikörper, siehe Kapitel 3.2.9) und auf mitreinigende HIM-Aktivität in einem Methyltransferase-Assay (siehe Kapitel 3.2.30) geprüft.

In einem zweiten Experiment wurde als Ausgangsmaterial Zellextrakt aus SL-2 Zellen verwendet, die mit HDAC1 stabil transfiziert worden waren. Diese Zellen überexprimieren HDAC1 als Flag-*getagtes* Protein. Auch hier wurde eine Immunpräzipitation, diesmal mit anti-Flag-Antikörper (analog zu Kapitel 3.2.9), durchgeführt und anschließend das präzipitierte Material auf HIM-Aktivität getestet.

Das Ergebnis der beiden Versuche ist in Abb. 30 dargestellt.



**Abb. 30: HIM-Aktivität einer Immunpräzipitation aus partiell gereinigten Fraktionen (links), sowie aus SL-2 Zellen.** Es wurde anti-HDAC1-Antikörper verwendet (links) bzw. anti-Flag-Antikörper (rechts). „SL-2“ bezeichnet die nicht transfizierte Kontroll-Zelllinie, „fHDAC1“ die Zelllinie welche stabil Flag-HDAC1 exprimiert. Es wurde ein HIM-Assay an *beads* durchgeführt.

Sowohl der anti-HDAC1-Antikörper als auch der Flag-Antikörper können HDAC-Aktivität präzipitieren und Methyltransferaseaktivität copräzipitieren.

## 4.2 UNTERSUCHUNGEN AN REKOMBINANTEM SU(VAR)3-9

### 4.2.1 KLONIERUNG VON WT SU(VAR)3-9 UND DELETIONSMUTANTEN

Um genauere Untersuchungen mit Su(var)3-9 anstellen zu können, wurde die cDNA in einen Expressionsvektor kloniert und das rekombinante Protein in *E. coli* exprimiert. Es stellte sich heraus, dass die Expression des Volllängenproteins im Vektor pMyb (NEB), welcher ein Intein-tag am C-Terminus des Proteins anbringt, mit Problemen behaftet war. Es wurde zwar eine aktive Methyltransferase produziert, diese erwies sich aber in einem SDS-Gel als zu klein (Daten nicht gezeigt).

Deswegen wurde die cDNA in einen 6xhis-Vektor kloniert (siehe Kapitel 3.2.1). Dazu wurden passende Primer für das *Drosophila*-Volllängenprotein Su(var)3-9 entwickelt und die cDNA durch die Restriktionsenzyme NdeI und XhoI in den Vektor pET15b (Novagen) eingeführt. Als Produkt einer Expression erhält man ein Fusionsprotein, welches aus dem gewünschten Protein und einem N-terminalen 6x Histag besteht.

Mit der gleichen Vorgehensweise wurden auch Deletionsmutanten hergestellt. Die Deletionsmutanten wurden so konzipiert, dass ausgehend vom N-Terminus her das Protein mehr und mehr verkürzt wurde. Meist wurde eine ganze Domäne weggelassen.

Zusätzlich dazu wurde eine Punktmutation in der Chromodomäne, V221M, eingeführt.

Abb. 31 zeigt einen schematischen Überblick über die verschiedenen Deletions- und Punktmutanten, Abb. 32 einen Western Blot bzw. ein Coomassie-Gel der exprimierten Proteine.

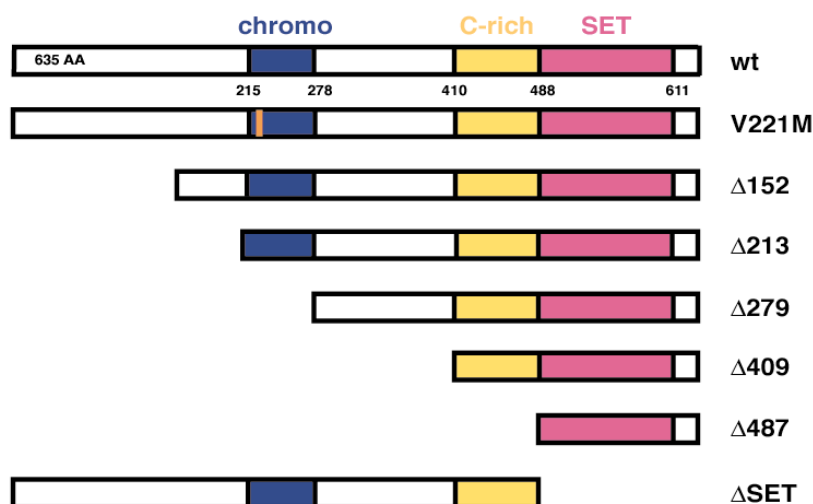
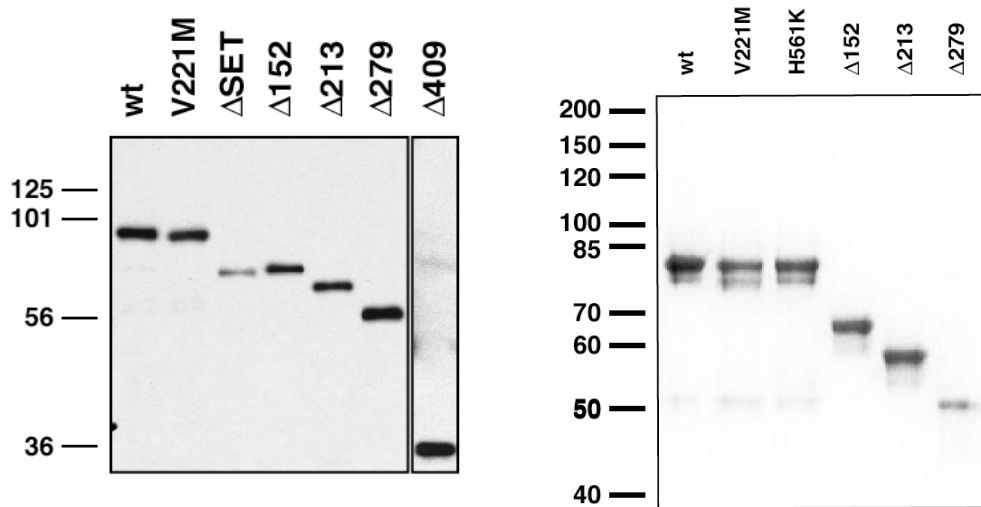
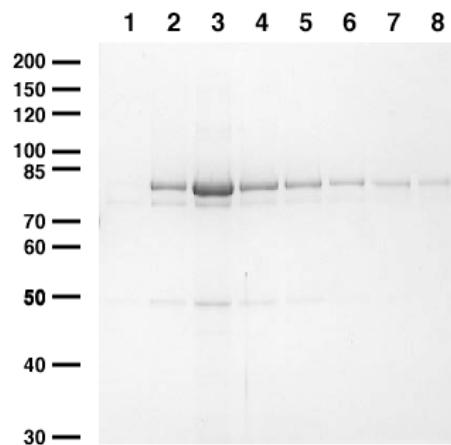


Abb. 31: Deletions- und Punktmutanten von *Drosophila* Su(var)3-9



**Abb. 32: Western Blot (links) und Coomassie-Gel (rechts) der verschiedenen Mutanten.** Ungefähr gleiche Mengen der Proteine wurden auf 10%SDS-Gele aufgetragen und entweder mit Coomassie gefärbt (rechts) oder geblottet (links). Die Detektion der verschiedenen Mutanten im Western Blot erfolgte mit einem anti-Su(var)3-9-Antikörper, der freundlicherweise von G. Reuter (Halle) zur Verfügung gestellt wurde.

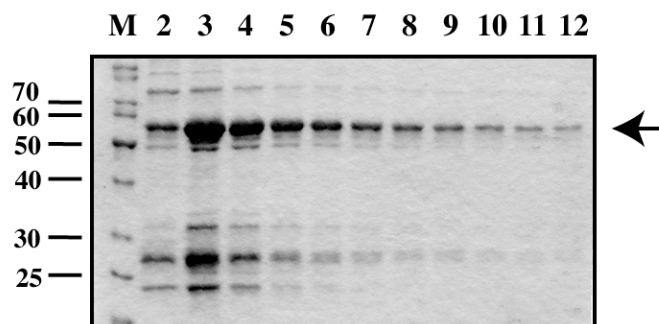
Nach Herstellung der Konstrukte konnten alle Proteine löslich in *E.coli* exprimiert werden. Dazu wurden BL21-Bakterien verwendet (siehe Kapitel 3.2.18). Die überexprimierten Proteine wurden über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierzu wurde das Bindungsvermögen des 6x-Histags an zweiwertige Ionen ausgenutzt: durch Bindung des tags (und damit des ganzen Proteins) an das komplexierte Cobalt in den „Talonbeads“ (Clontech) konnten die meisten kontaminierenden Proteine abgetrennt werden und sauberes rekombinantes Protein durch Elution mit 100 mM Imidazol gewonnen werden. Abb. 33 zeigt beispielhaft eine Elutionsreihe von den Talonbeads. Die höchste Proteinkonzentration wird in den Anfangsfractionen erreicht.



**Abb. 33: Coomassie-gefärbtes 10% SDS-Gel, welches die einzelnen Fraktionen der Elution von Talonbeads zeigt.** Hier wurde das Volllängenprotein Su(var)3-9 (wt) mittels des 6x-his-tags an Talonbeads gebunden und mit 100 mM Imidazol eluiert. Anschließend wurde je 15  $\mu$ l von jeder 0,5 ml-Fraktion auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, welches Coomassie-gefärbt wurde.

#### 4.2.2 OPTIMIERUNG DER AUFREINIGUNG VON SU(VAR)3-9

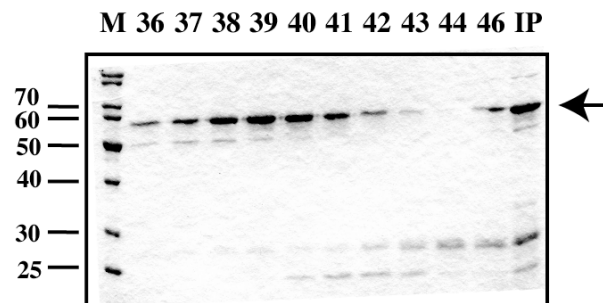
Nach der Affinitätsreinigung über Talonbeads (siehe Kapitel 3.2.18) liegt rekombinantes Su(var)3-9 schon relativ sauber vor. Wie jedoch in Abb. 33 für das wt Protein und in Abb. 34 für die Deletionsmutante  $\Delta$ 213 ersichtlich, sind noch einige kontaminierende Banden mit v.a. kleinerem Molekulargewicht vorhanden.



**Abb. 34: Reinigung von rekombinatem Su(var)3-9  $\Delta$ 213.** Als erster Schritt erfolgt die Bindung über den 6x-his-tag an die Talonbeads, nach dem Waschen wurde mittels 100 mM Imidazol in 0,5 ml-Fractionen eluiert. Der Hauptteil des Proteins befindet sich in Fraktion 3 und 4. Für dieses Coomassie-Gel wurden jeweils 10  $\mu$ l der jeweiligen Fraktion auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen.

Um das gewünschte Protein vollständig rein zu erhalten, wurde an diese Affinitätsreinigung noch zwei weitere Reinigungsschritte angeschlossen, die auf

Säulenchromatographie beruhen. Es stellte sich dabei heraus, dass eine Gelfiltration über eine Superdex200-Säule direkt nach der Talonelution die meisten kontaminierenden Banden abtrennt, und dann das gewünschte Protein fast rein vorliegt. Für die Gelfiltration wurden nur die am höchsten konzentrierten Talonfraktionen verwendet (Säulenlauf analog zu Kapitel 3.2.32.3). Abb. 35 zeigt die von der Superdex200-Säule eluierten Fraktionen der  $\Delta 213$ -Deletionsmutante.

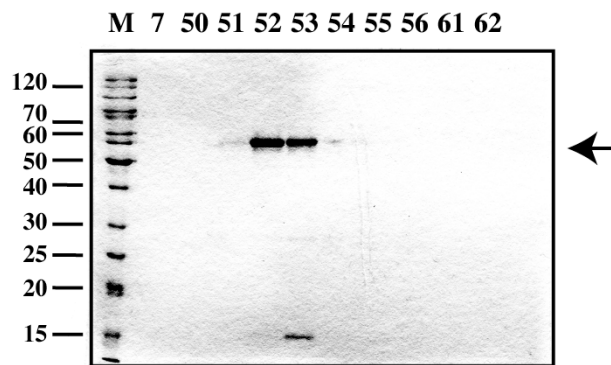


**Abb. 35: Su(var)3-9  $\Delta 213$  nach der Elution von einer Superdex200-Säule.** Fraktion 3 und 4 der Talonelution wurden vereinigt und auf eine Superdex200-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Diese wurde isokratisch mit BC250 laufen gelassen. Von den 2 ml-Fraktionen wurde jeweils 20  $\mu$ l auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt.

Das Protein lag nun sauberer vor, allerdings bewirkte die Gelfiltration eine Verdünnung des Proteins, so dass es über sehr viele Fraktionen hinweg eluiert.

Um das Protein zu konzentrieren und weiter zu reinigen, wurde an die Gelfiltration ein Anionentauscher-Lauf (MonoQ-Säule) angeschlossen. Dieser Säulenlauf wurde analog zu Kapitel 3.2.32.4 durchgeführt.

Wiederum wurden nur die *peak*-Fraktionen auf diese Säule geladen, wobei die Salzkonzentration vor dem Beladen der Säule auf 100 mM abgesenkt wurde, um die Bindung an das Säulenmaterial zu ermöglichen.



**Abb. 36: Su(var)3-9 nach der Elution von der MonoQ-Säule.** Fraktion 37 bis 41 der Superdex200-Elution wurden vereinigt und durch Verdünnen mit BC0 auf die Salzkonzentration von BC100 gebracht. Die MonoQ-Säule wurde mit einem Gradienten von 10% B (BC100) auf 100% B (BC1000) in 10 CV entwickelt; dabei wurden 0,5 ml-Fraktionen gesammelt. Von diesen Fraktionen wurde jeweils 15  $\mu$ l auf ein 15% SDS-Gel geladen und Coomassie gefärbt.

Das reine Protein eluiert als scharfer *peak* in Fraktion 52 und 53 (dies entspricht einer Salzkonzentration von ca. 450 mM), wie in Abb. 36 zu sehen. Fraktion 53 enthält noch eine niedermolekulare Verunreinigung.

### 4.2.3 TEST VON LAGERBEDINGUNGEN

Wird Su(var)3-9 über Stunden bei 4°C stehen gelassen bzw. bei 4°C dialysiert, verliert es nach und nach an Aktivität (Daten nicht gezeigt). Deswegen muss es zur längeren Aufbewahrung eingefroren werden. Doch auch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen könnte einen negativen Effekt auf die Reaktivität des Enzyms haben.

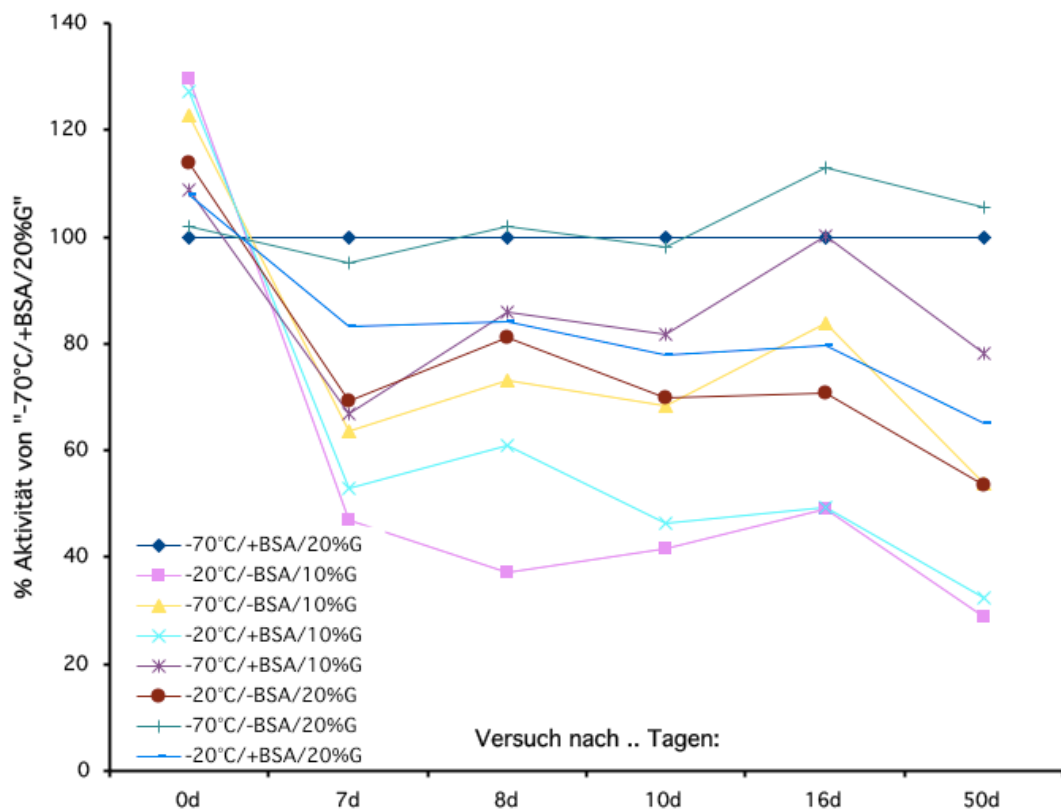
Aus diesem Grund wurde ein Test mit dem rekombinanten 6x-his-tag  $\Delta$ 213 Su(var)3-9 durchgeführt, um die am wenigsten schädigenden Lagerbedingungen für das Enzym herauszufinden. Dabei wurden verschiedene Kombinationen von Lagertemperatur, Glyceringehalt, Ab- oder Anwesenheit von BSA und verschiedenartige Reaktionsgefäße ausprobiert. Die Reaktionsgefäße wurden mehrmals im Abstand von mehreren Tagen immer wieder aufgetaut und eingefroren. Dabei wurde jedes Mal die Aktivität des Enzyms in einem HIM Assay (siehe Kapitel 3.2.30) getestet.

Nach der Elution von den Talonbeads wurde das Enzym  $\Delta$ 213 gegen einen Puffer mit 100 mM KCl dialysiert, in Aliquots aufgeteilt und verschieden behandelt: Es wurde entweder mit 10 oder 20% Glycerin versetzt, zusätzlich wurde entweder 0,1 mg/ml BSA dazugegeben oder nicht, und das Enzym in silikonisierte oder normale Reaktionsgefäße



gegeben. Anschließend wurde jeweils ein HIM Assay durchgeführt und dann die Aliquots entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Nach 7, 8, 10, 16 Tagen und nach 7 Wochen wurden die Aliquots wieder aufgetaut, für einen Methylierungs-Assay verwendet und wieder eingefroren. Nach Messung der eingebauten spezifischen Radioaktivität wurde der Versuch ausgewertet. Die Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}/+\text{BSA}/20\%\text{Glycerin}$  wurde dabei gleich 100% gesetzt, da dies die Standardlagerform war. In Abb. 13 sind alle anderen Bedingungen auf diese Lagerform bezogen. Außerdem wurde bald festgestellt, dass sich kein Unterschied zwischen normalen und silikonisierten Reaktionsgefäßen bestand, so dass in Abb. 37 nur die Ergebnisse für die "normalen" Gefäße dargestellt sind.



**Abb. 37: Aktivität von SU(VAR)  $\Delta 213$  bei verschiedenen Lagerbedingungen.** Su(var)3-9 wurde rekombinant hergestellt und bei verschiedenen Bedingungen gelagert (siehe Legende). Vor dem Einfrieren und nach einigen Tagen (s.o.) wurden die Aliquots wieder aufgetaut und ein HIM-Assay am H3-Peptid durchgeführt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  derjenigen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  klar vorzuziehen ist, da bei letzterer das Enzym stärker an Aktivität verliert. Ebenso deutlich ist der Vorteil, den eine 20%ige Glycerinlösung im Vergleich zu einer 10%igen

zeigt. Außerdem bringt der Zusatz von BSA eine leichte Verbesserung, v.a. wenn die Glycerinkonzentration nur 10% beträgt *oder* die Lagertemperatur nur  $-20^{\circ}\text{C}$  ist.

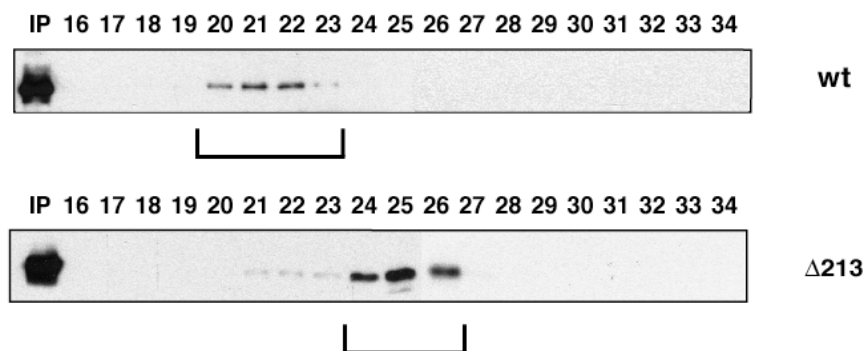
Die idealen Lagerbedingungen bestehen also in 20% Glycerin,  $-70^{\circ}\text{C}$  und Zusatz von BSA.

#### 4.2.4 SU(VAR)3-9 LIEGT ALS DIMER VOR

Kinetische Untersuchungen an wt Su(var)3-9 sowie den Deletionsmutanten zeigten, dass das Volllängenprotein ca. 20 mal schneller methylieren kann als z.B.  $\Delta 213$  (Eskeland et al., 2004). Dieser enorme Unterschied könnte auf die Konformation des wt Enzyms zurückzuführen sein, oder aber auch in einer Assoziation von Enzym-Monomeren, so dass Multimere entstehen. Für letztere Möglichkeit spricht die Beobachtung einer konzentrationsabhängigen Aktivitätssteigerung, die des öfteren bei Multimer-Enzymen auftritt. Bei höheren Enzymkonzentrationen werden dabei mehr Substratmoleküle per Enzymmolekül umgesetzt (Eskeland et al., 2004). Für das wt Protein trifft eine solche konzentrationsabhängige Aktivitätssteigerung oberhalb einer Konzentration von ca.  $0,5 \mu\text{M}$  zu, nicht jedoch für die  $\Delta 213$ -Deletionsmutante.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine mittels Gelfiltrationschromatographie analysiert.

Rekombinantes wt Protein bzw. die  $\Delta 213$  Mutante wurden auf eine kleine Superdex200-Säule (CV = 23 ml) aufgetragen und die Fraktionen auf einem Western Blot analysiert, welcher mit anti-Su(var)3-9-Antikörper entwickelt wurde (siehe Abb. 38).



**Abb. 38: Elutionsprofil von wt Su(var)3-9 und der Deletionsmutante  $\Delta 213$  nach einer Superdex200-Gelfiltration.** Je ca.  $5 \mu\text{g}$  Talon-gereinigtes Protein wurde auf eine Superdex200-Säule aufgetragen. Von jeder  $0,5 \text{ ml}$ -Fraktion wurden  $10 \mu\text{l}$  auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen und geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem anti-Su(var)3-9-Antikörper

$\Delta 213$  eluiert gemäß eines Vergleiches mit dem Größenstandard bei ca.  $66 \text{ kDa}$ , was dem Molekulargewicht des Monomers in etwa entspricht. Dagegen eluiert das wt Protein früher,

nämlich schon bei etwa 160 kDa. Dies könnte dadurch verursacht sein, dass das wt Su(var)3-9 Dimere bildet.

Die Gelfiltration hat also die Hypothese gestärkt, dass das wt Protein als Dimer vorliegen könnte.

#### 4.2.5 SU(VAR)3-9 BINDET AN K9-METHYLIERTES PEPTID

Die Chromodomäne von HP1 bindet an methyliertes Lysin 9 aus dem H3-*tail* (Lachner et al., 2001; Nielsen et al., 2002). Die Chromodomäne von Su(var)3-9 hat eine sehr ähnliche Sequenz (siehe Alignment in Abb. 39) und auch eine sehr ähnliche Tertiärstruktur (Horita et al., 2001) wie HP1. Deswegen stellte sich die Frage, ob Su(var)3-9, genauso wie HP1, an methyliertes H3-Peptid besser bindet als an unmethyliertes Peptid.

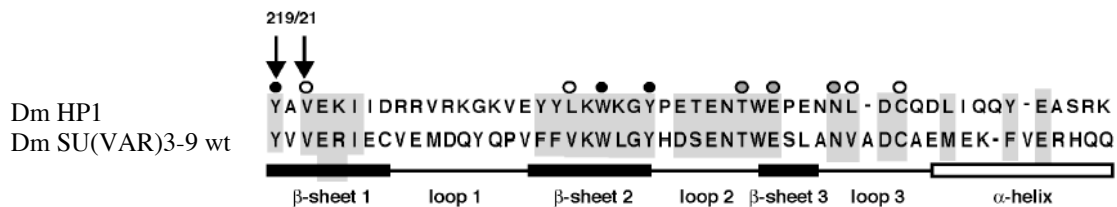
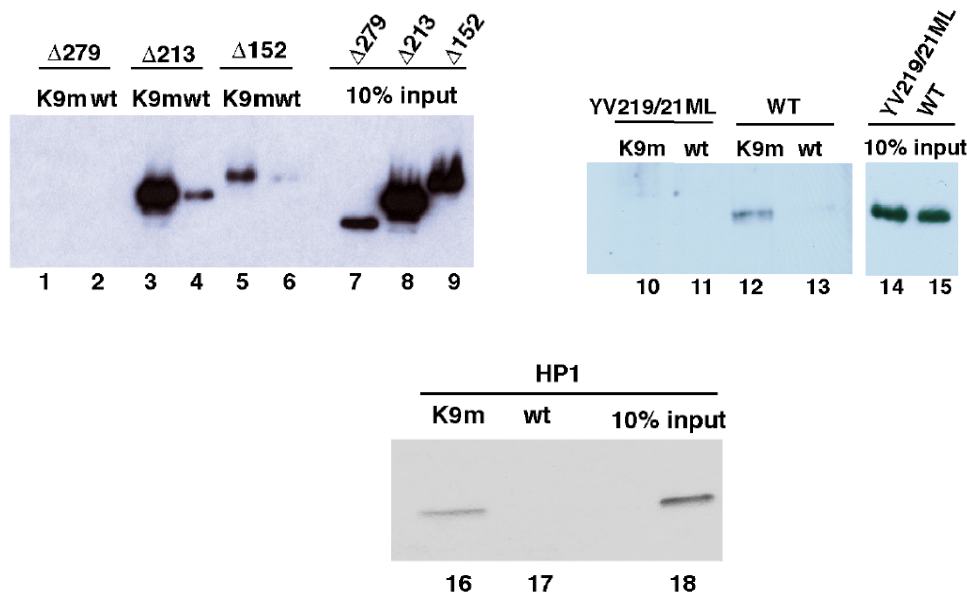


Abb. 39: Alignment der Chromodomänen von HP1 und Su(var)3-9.

In anfänglichen Experimenten mit unmodifizierten Histonen an *beads* wurde festgestellt, dass Su(var)3-9 unspezifisch an diese bindet und sich erst löst, wenn die *beads* in SDS-Probenpuffer aufgeköcht werden. Um diesen hohen unspezifischen Hintergrund zu vermeiden, wurden Peptide verwendet, die an *beads* gebunden waren, und die Elution wurde mit Hilfe eines sauren Puffers durchgeführt, der 100 mM Glycin pH 2,5 enthielt.

Verschiedene rekombinant hergestellte Mutanten von Su(var)3-9 (Herstellung siehe Kapitel 3.2.18) sowie rekombinantes HP1 (Aufreinigung siehe Kapitel 3.2.32) wurden auf Peptide gegeben, die an *beads* gebunden waren (siehe Kapitel 3.2.22). Dabei handelte es sich einerseits um das wt Peptid, andererseits um das an K9 dimethylierte Peptid. Nach mehrmaligem Waschen wurde, wie erwähnt, sauer eluiert, und die Eluate auf einem Western Blot analysiert. Abb. 40 zeigt die Bindung der Proteine an die zwei verschiedenen Peptide.



**Abb. 40:** Bindung der verschiedenen Mutanten an wt und K9m Peptid (jeweils an *beads*; oben); außerdem Bindung von HP1 an wt und K9m Peptid (unten). Die verschiedenen Su(var)3-9-Deletionsmutanten wurden mit den *beads* (Beschriftung über den Blots) inkubiert, gewaschen, sauer eluiert und die Eluate auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des anti-Su(var)3-9-Antikörpers (oben) bzw. durch Coomassie (unten).

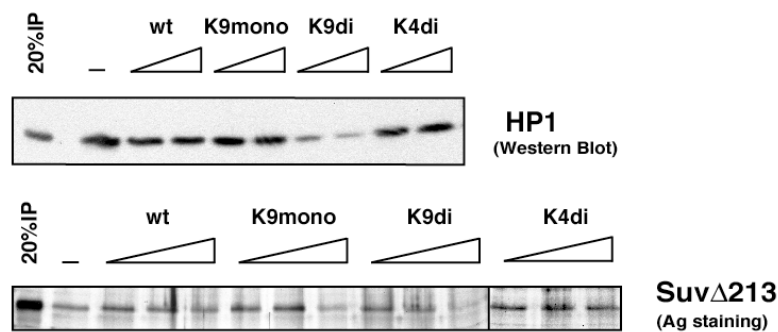
Wt Su(var)3-9 (Spur 12 und 13) sowie die beiden Deletionsmutanten  $\Delta 152$  und  $\Delta 213$  (Spur 3/4 und 5/6) binden stärker an das methylierte Peptid als an das unmethylierte. Fehlt die Chromodomäne ganz wie in der Deletionsmutanten  $\Delta 279$  (Spur 1 und 2) oder ist sie an entscheidender Stelle mutiert wie z.B. bei der Punktmutante YV219/21ML (Spur 10 und 11), tritt dieser Effekt nicht auf. Die den Aminosäuren Y219 und V221 entsprechenden Bausteine sind in HP1 am aromatischen Käfig beteiligt, der wichtig ist für die Bindung von HP1 an das methylierte Lysin 9. Insgesamt beobachtet man eine verminderte Bindungsfähigkeit der Punktmutanten und der Deletionsmutanten  $\Delta 279$ , so dass im Western Blot kaum Signale detektiert werden konnten.

Im Vergleich dazu bindet HP1, wie erwartet, das methylierte Peptid besser als das unmethylierte (Spur 16 und 17).

Um dieses Versuchsergebnis zu bestätigen und um HP1 und Su(var)3-9 in ihrer Affinität zu dem methylierten H3-Peptid besser vergleichen zu können, wurde zusätzlich zu HP1 bzw. Su(var)3-9 und dem K9-methylierten Peptid (an den *beads*) noch ein weiteres, nicht *beads*-gebundenes Peptid der Reaktion zugesetzt (siehe Kapitel 3.2.22). Dieses Peptid stellt eine Konkurrenz zu dem K9-methylierten Peptid an *beads* dar. Als Kompetitor-Peptide

wurden verwendet: unmethyliertes H3 Peptid, an K9 monomethyliertes Peptid, an K9 dimethyliertes Peptid und an K4 dimethyliertes Peptid.

Abb. 41 zeigt das Ergebnis dieses Wettbewerbsversuches. Die „Rest“-mengen von HP1 bzw. Su(var)3-9, welche in Gegenwart des Kompetitors noch an das *beads*-gebundene K9m-Peptid binden, wurden durch Western Blot (HP1) bzw. Silberfärbung (Su(var)3-9) detektiert.



**Abb. 41: Konkurrenz durch verschiedene Peptide.** Über den Spuren sind die verschiedenen Peptide angegeben, die als Kompetitor in steigenden Mengen zu den Bindungsreaktionen gegeben wurden. Es wurden 1, 10 und 100  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Kompetitor-Peptids zu HP1 bzw. Su(var)3-9  $\Delta 213$  gegeben, die jeweils an wt oder K9m-Peptide an *beads* gebunden hatten. Nach der Inkubation wurde gewaschen und sauer eluiert. HP1 wurde in einem Western Blot detektiert, Su(var)3-9  $\Delta 213$  mit einer Silberfärbung.

HP1 lässt sich erwartungsgemäß durch das K9-dimethylierte Peptid besser von den *beads* lösen als durch das K4-methylierte Peptid. Das monomethylierte Peptid scheint ebenso schlecht zu konkurrieren wie das K4-methylierte Peptid.

Su(var)3-9 hingegen kann nicht so gut zwischen Mono- und Dimethylierung an K9 unterscheiden, beide Peptide stellen eine Konkurrenz zum K9m-Peptid an den *beads* dar. Auch ist die Konkurrenz insgesamt etwas schwächer und fällt nicht so vollständig aus wie bei HP1. Deutlich wird allerdings, dass das wt Peptid und das an K4 methylierte Peptid nicht so gut konkurrieren können wie die beiden an K9 methylierten Peptide.

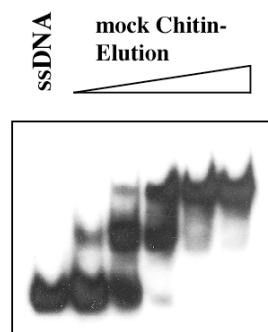
Zusammenfassend kann man sagen, dass Su(var)3-9 ebenso wie HP1 bevorzugt an Lysin 9 bindet, wenn es methyliert ist. Allerdings ist die Affinität nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei HP1, was unter anderem auch daran liegen kann, dass das wt Peptid, da es ja auch ein Substrat von Su(var)3-9 darstellt, durch die SET-Domäne gebunden werden kann.

#### 4.2.6 SU(VAR)3-9 BINDET NICHT AN SSDNA

Su(var)3-9 methyliert Lysin 9 im H3-*tail*. Diese Modifikation ist als typisch "heterochromatisch" einzustufen. Deswegen stellte sich die Frage, ob Su(var)3-9 an Heterochromatin-DNA-Sequenzen binden kann. Diese DNA-Bindung könnte das Enzym an den Ort seines Wirkens führen. Su(var)3-7, ein Zinkfinger-Protein, welches wie Su(var)3-9 einen Haplo-Suppressor/Triplo-Enhancer-Effekt zeigt und mit Heterochromatin assoziiert ist, kann beispielsweise an Satelliten-DNA binden (Cleard and Spierer, 2001). Satelliten-DNA, welche aus vielen Tandem-Repeats besteht, ist vor allem in centromerischem Heterochromatin zu finden (Pardue and Gall, 1970). In *Drosophila* wurden 11- und 12mere, bestehend aus G- und C-reichen Sequenzen, identifiziert (Abad et al., 1992), und "Dodecasatelliten-DNA" genannt. Diese DNA hat meist die Sequenz  $(RRN)_m(RN)_n$ , wobei R ein A oder G und N ein beliebiges Nukleotid ist.

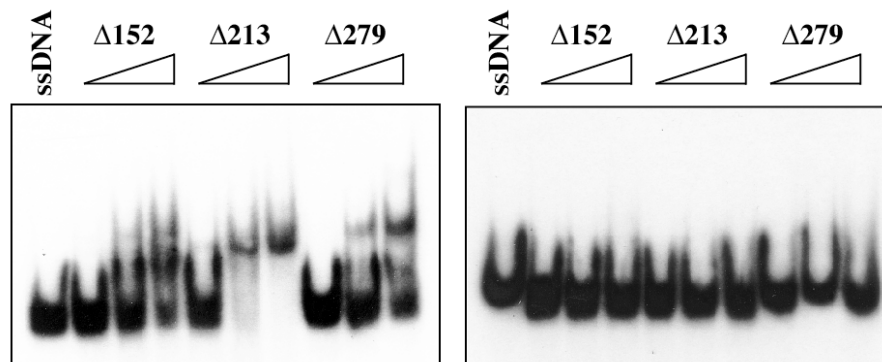
Um festzustellen, ob Su(var)3-9 an diese hochrepetitiven Sequenzen bindet, wurde ein 104bp langes einzelsträngiges DNA-Fragment, welches nur aus verschiedenen Variationen der Konsensus-Sequenz besteht (Sequenz siehe Kapitel 3.1.3), an einem Ende radioaktiv markiert (siehe Kapitel 3.2.27). Anschließend wurde ein EMSA mit der markierten DNA und verschiedenen Deletionsmutanten von Su(var)3-9, gereinigt über Chitinbeads, durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.28).

Um zu testen, ob Verunreinigungen, die zusammen mit den exprimierten Proteinen von den Chitinbeads eluieren, für einen Bandshift-Effekt verantwortlich sein könnten, wurde zunächst eine Elution ("mock") von Chitinbeads durchgeführt, und zwar von *beads*, die für die Aufreinigung eines anderen, nicht DNA-bindenden Proteins verwendet worden waren. Steigende Mengen dieser Elution verursachten einen Bandshift (siehe Abb. 42).



**Abb. 42: "Bandshift" mit "mock"-Chitinelution.** SsDNA wurde mit 1, 5, 10 15 bzw. 20  $\mu$ l der mock-Chitin-Elution inkubiert und über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  exponiert.

In anfänglichen Experimenten mit Su(var)3-9 konnte eine starke Bindung der Deletionsmutanten an die einzelsträngige DNA beobachtet werden. Wie in Abb. 43 links zu sehen, ist bei jeder dieser Mutanten eine DNA-Bindung zu beobachten. Da aber aus dem vorhergehenden Experiment bekannt war, dass auch kleine Verunreinigungen, die mit der Chitin-Elution auftreten, DNA binden können, wurden die Su(var)3-9-Deletionsmutanten über eine Superdex200-Säule weiter aufgereinigt. Nachdem entsprechende Mengen wiederum in einem EMSA getestet wurden, stellte sich heraus, dass sie ihre DNA-Bindungs-Aktivität verloren hatten. In Abb. 43 rechts kann man kein verzögertes Laufverhalten der radioaktiv markierten DNA beobachten.



**Abb. 43: Bandshift von ssDNA mit "ungereinigten" (links) und "gereinigten" (rechts) Su(var)3-9 Deletionsmutanten.** Diese waren als Intein-*getagte* Protein exprimiert worden und entweder nur über Chitinbeads gereinigt worden ("ungereinigt") oder zusätzlich über eine Superdex200-Säule aufgetrennt ("gereinigt"). Anschließend erfolgte die Inkubation von steigenden Mengen Protein mit der markierten ssDNA, die Auftrennung über ein natives Gel sowie die Exposition des getrockneten Gels gegen einen Röntgenfilm bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Somit kann geschlussfolgert werden, dass die untersuchten Su(var)3-9 Deletionsmutanten *in vitro* und in den verwendeten Konzentrationen nicht an ssDNA binden, sondern dass der bei nur über die Chitinbeads gereinigten Proteinen beobachtete Shift auf andere, kontaminierende Proteine in der Präparation zurückzuführen ist.

Für andere Proteine, welche über *beads* (z.B. Chitinbeads) aufgereinigt werden, bedeutet das, dass auch bei ihnen genau untersucht werden muss, ob ihre EMSA-Aktivität originär ist oder durch mitreinigende Proteine verursacht ist.

### 4.3 HERSTELLUNG EINER STABILEN HA-SU(VAR)3-9 ZELLINIE

Um Su(var)3-9 und mögliche Interaktionspartner besser in einer *in vivo*-Situation untersuchen zu können als mit dem bakteriell exprimierten Protein, und um größere Mengen als durch die *myc-tag* Fliegen zu gewinnen, wurden *Drosophila* Sf4 Zellen stabil mit Su(var)3-9 transfiziert (Methode siehe unter Kapitel 3.2.12). Diese Zellen exprimieren nach Induktion ein HA-getagtes Volllängen-Su(var)3-9. Die Induktion erfolgt durch CuSO<sub>4</sub>, da das Gen unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promoters steht.

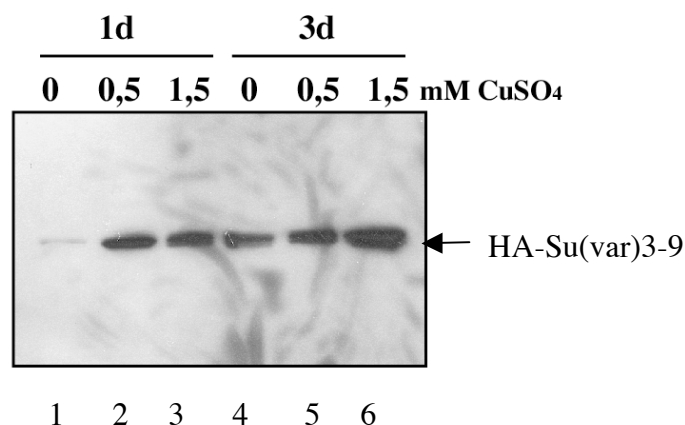
Wie in Kapitel 3.2.12 beschrieben, wurden die Zellen über einen längeren Zeitraum gegen Geneticin selektiert. Die überlebenden Zellen wurden vermehrt, und einige grundlegende Experimente, die im Folgenden beschrieben sind, wurden an diesen Zellen durchgeführt.

#### 4.3.1 DIE STABILEN ZELLEN LASSEN SICH DURCH CuSO<sub>4</sub> INDUZIEREN

Zunächst einmal sollte getestet werden, ob die transfizierten Zellen HA-Su(var)3-9 herstellen, und durch welche Konzentration an CuSO<sub>4</sub> die Expression am besten induziert wird.

Die stabilen HA-Su(var)3-9-Zellen wurden in Kulturschalen ausgesät, mit verschiedenen Konzentrationen CuSO<sub>4</sub> induziert und nach einem oder drei Tagen auf die Expression des HA-Proteins untersucht (Herstellung des Extraktes siehe Kapitel 3.2.14). Während dieser Zeit wurden die Zellen in CuSO<sub>4</sub> belassen, das Medium wurde nicht ausgetauscht.

Abb. 44 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.



**Abb. 44: Untersuchung der Induzierbarkeit der stabilen Su(var)3-9-Zellen.** Je ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen wurden in eine 6cm-Kulturschale ausgesät und mit entweder 0, 0,5 oder 1,5 mM CuSO<sub>4</sub> induziert. Nach einem bzw. drei Tagen Inkubation bei 26°C wurde ein Ganzzelleextrakt in BC500 hergestellt, und 20% davon (also 20% einer 6cm-Schale) auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit  $\alpha$ -HA-Antikörper entwickelt.



Die Banden auf dem Western Blot für die Induktion mit 0,5 bzw. 1,5 mM CuSO<sub>4</sub> (Spur 2/3 sowie 5/6) haben in ungefähr die gleiche Intensität. Daraus lässt sich ableiten, dass beide Konzentrationen an CuSO<sub>4</sub> für die Induktion verwendet werden können. Außerdem besteht kein großer Unterschied zwischen den Proben, welche für einen (Spur 1-3) bzw. drei Tage (Spur 4-6) induziert wurden. Man kann also schon nach einem Tag Induktion den Zellextrakt herstellen.

Interessanterweise zeigen die Spuren mit "0 mM" CuSO<sub>4</sub> (Spur 1 und 4) ebenfalls ein Western Blot-Signal. Das heißt, auch ohne Induktion mit CuSO<sub>4</sub> wird das HA-*getagte* Protein bereits exprimiert. Der Promoter scheint also die Expression nicht vollständig zu kontrollieren. Außerdem zeigen die beiden Nullproben unterschiedliche starke Signale, was darauf hindeutet, dass die „Expression ohne Induktion“ nicht konstant ist.

#### **4.3.2 EXPRESSION VON HA-SU(VAR)3-9 IM ZEITABLAUF**

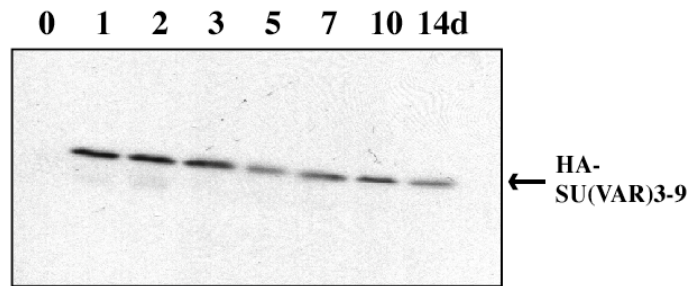
Im obigen Experiment wurde schon festgestellt, dass zwischen einer Induktionszeit von einem bzw. drei Tagen kein Unterschied zu sehen war. Es sollte aber dennoch getestet werden, ob sich die Expression nach noch längerer Zeit erhöht, und ob längeres Verbleiben der Zellen in CuSO<sub>4</sub> diese am Wachstum hindert.

Die stabilen HA-Su(var)3-9-Zellen wurden in einer Rollflasche bei höherer Konzentration kultiviert und bei ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml gehalten. Vor der Induktion wurden Zellen entnommen und daraus ein Extrakt hergestellt (siehe Kapitel 3.2.14). Nach der Induktion wurden die Zellen beobachtet und in regelmäßigen Abständen wurden Zellen für Extrakte entnommen.

Es konnte durch tägliches Beobachten der Zellen keine Wachstumsverzögerung festgestellt werden, obwohl sie permanent in 1,5 mM CuSO<sub>4</sub> gehalten wurden. Auch traten keine erhöhten Mengen von Zelltrümmern o.ä. auf, was auf ein Absterben der Zellen hingedeutet hätte.

Das HA-*getagte* Protein konnte in diesem Versuch erst nach Induktion der Zellen detektiert werden, es trat also keine Expression ohne Kupfersulfat auf. Des weiteren zeigt der Western Blot in Abb. 45, dass in den ersten drei Tagen nach Induktion das Niveau der Proteinexpression annähernd konstant bleibt, während später die Menge von HA-Su(var)3-9 in den Zellen abzunehmen scheint.

Aus diesem Experiment wurde geschlussfolgert, dass in der Tat Induktionszeiten von einem bzw. drei Tagen genügen, um maximale Mengen von HA-Su(var)3-9 zu exprimieren.

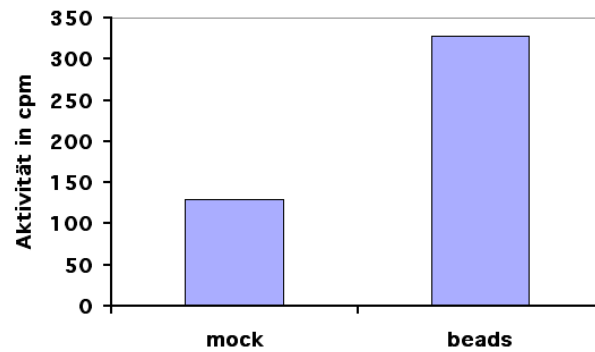


**Abb. 45: Untersuchung der Expression von HA-Su(var)3-9 in den stabilen Zellen nach unterschiedliche langer Induktionszeit.** Stabile HA-Su(var)-Zellen wurden in einer Rollerbottle bei etwa  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml gehalten. Vor der Induktion wurden ca.  $5 \cdot 10^8$  Zellen abgenommen und davon ein Extrakt in 1ml BC200 hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 mM  $\text{CuSO}_4$  induziert und nach jeweils 1,2,3,5,7,10 und 14 Tagen wurde die ungefähr gleiche Zellzahl entnommen. Nach Abschätzung der Proteinkonzentrationen durch Bradford-Assay wurde jeweils 2% (also 20  $\mu\text{l}$ ) des Extraktes auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, geblottet und mit  $\alpha$ -HA-Antikörper detektiert.

### 4.3.3 HA-SU(VAR)3-9 ZEIGT GERINGE AKTIVITÄT

HA-Su(var)3-9 aus der stabilen Zelllinie sollte auf Aktivität getestet werden, da ein aktives Enzym für spätere Interaktionsstudien und Reinigungen vorteilhaft ist.

Aus diesem Grund wurde das Protein unter Ausnutzung des HA-tags angereichert und auf Aktivität getestet. Der Ganzzellextrakt aus den stabilen, mit  $\text{CuSO}_4$  induzierten Zellen sowie aus nicht transfizierten Vergleichszellen (Herstellung siehe Kapitel 3.2.14) wurde mit anti-HA-Agarosebeads versetzt, um HA-Su(var)3-9 daran zu binden. Nach einigen Waschschritten wurde ein HIM-Assay mit dem H3-Peptid als Substrat direkt an den *beads* durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.30). Wie in Abb. 46 zu sehen, liegt die Aktivität etwas über dem Hintergrund ("mock"). Betrachtet man allerdings die Menge an eingebauter Radioaktivität in cpms, wird deutlich, dass dies nur äußerst wenig Aktivität ist.



**Abb. 46: Aktivität von HA-Su(var)3-9 aus der stabilen Zelllinie.** 1 ml Zellextrakt von induzierten HA-Su(var)3-9-Zellen wurde mit 50  $\mu$ l (Bettvolumen) HA-Agarosebeads für 2 h unter Rotieren inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit BC300/0,1%NP40 wurde ein HIM Assay mit 20  $\mu$ l beads durchgeführt. Außerdem wurde der ungereinigte Extrakt (15  $\mu$ l) sowie der Überstand nach der Immunpräzipitation (15  $\mu$ l) im HIM Assay getestet. Mock bezeichnet den Extrakt aus der nicht transfizierten Sf4-Zelllinie.

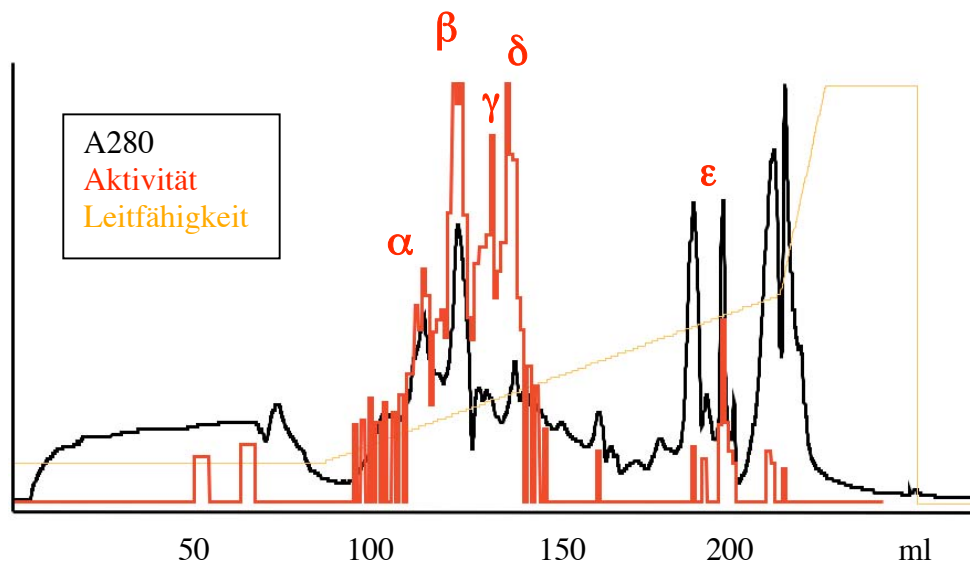
Um sicherzugehen, dass nicht das  $\text{CuSO}_4$  die Aktivität des Enzyms vermindert, wurde in einem weiteren Experiment Zellextrakt von nicht induzierten, stabilen HA-Su(var)3-9-Zellen verwendet. Auch hier zeigte sich das gleiche Ergebnis: an den beads haftet kaum Aktivität.

Es muss also festgehalten werden, dass die stabilen Zellen wohl HA-Su(var)3-9 exprimieren (wie im Western Blot festgestellt), jedoch scheint das Enzym nicht oder nur kaum aktiv zu sein.

## 4.4 DER E(Z)/ESC-KOMPLEX BESITZT METHYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT

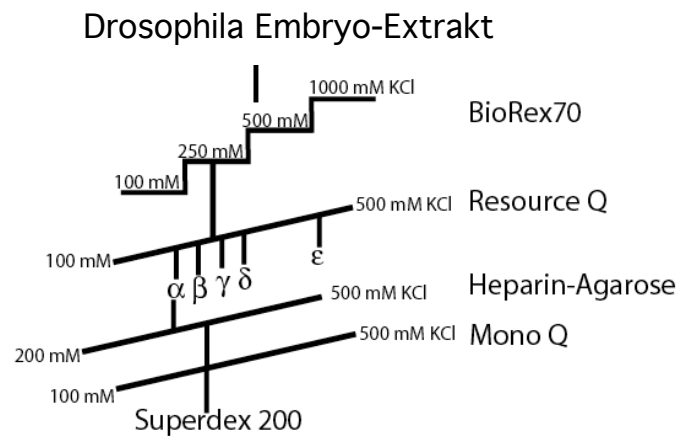
### 4.4.1 AUFREINIGUNG EINES E(Z)-ESC-KOMPLEXES AUS *DROSOPHILA* EMBRYOS

Um neue Methyltransferasen und Methyltransferase-Komplexe aus *Drosophila* aufzureinigen, wurde *Drosophila* Wildtyp-Kernextrakt (Herstellung siehe Kapitel 3.2.8) aus Embryos chromatographisch fraktioniert. Nach einer ersten Anreicherung von Methyltransferase-Aktivität in der 250 mM-Fraktion einer BioRex70-Säule wurde diese Fraktion weiter auf einer ResourceQ-Säule aufgetrennt. Dadurch wurden mindestens fünf verschiedene *peaks* von Methyltransferase-Aktivität erhalten, die mit HIM  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  bzw.  $\epsilon$  bezeichnet wurden. Das Elutionsprofil der ResourceQ-Säule ist in Abb. 47 zu sehen.



**Abb. 47:Resource-Q-Elution.** Durch die ResourceQ-Säule werden verschiedene Methyltransferase-Aktivitäten aufgetrennt, die mit HIM  $\alpha$  bis  $\epsilon$  benannt wurden. Die Aktivität der Fraktionen wurde in HIM-Assays gemessen, die das H3-Peptid als Substrat verwendeten.

Die HIM $\alpha$ -Aktivität wurde im Anschluß an die ResourceQ-Säule weiter gereinigt. Das Schema dazu ist in Abb. 48 zu sehen.

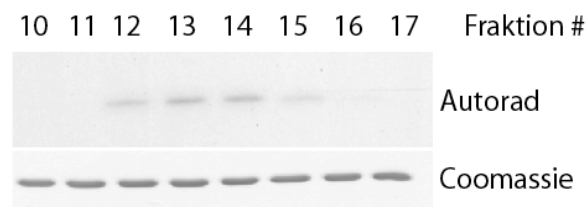


**Abb. 48:** Reinigungsschema für den HIM $\alpha$ -Komplex aus *Drosophila* Kernextrakt.

HIM  $\beta$  enthält Su(var)3-9, HIM  $\alpha$  hingegen E(Z). Um E(Z) und möglicherweise mitreinigende Proteine, die zusammen mit E(Z) eventuell als Komplex vorliegen, zu untersuchen, wurde der E(Z)-enthaltende *peak* weiter aufgereinigt. Dies erfolgte über drei weitere Säulen, nämlich eine Heparin-Agarose, eine MonoQ sowie eine Superdex200 (siehe Abb. 48).

Die Anwesenheit von Methyltransferase-Aktivität wurde nach jeder Säule mit einem HIM Assay am H3-Peptid nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.30), und E(Z) wurde mit einem Antikörper detektiert (siehe Kapitel 3.2.6).

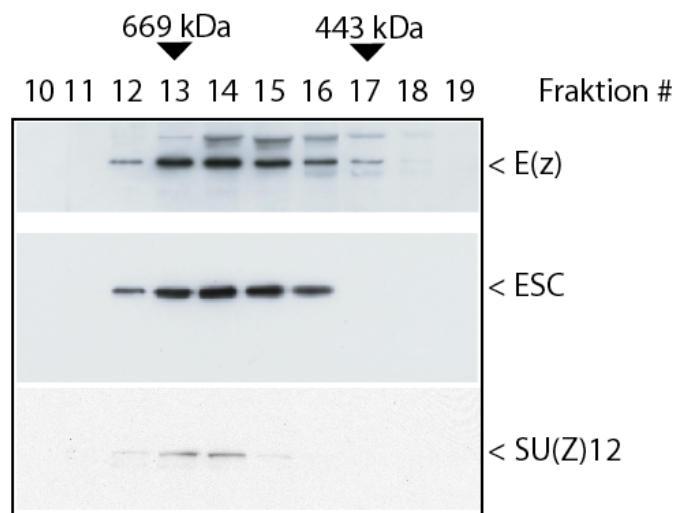
Nach der Superdex200-Gelfiltration wurden die Fraktionen auf Methyltransferaseaktivität untersucht, wobei diesmal das komplette Histon H3 (Herstellung siehe Kapitel 3.2.23) als Substrat verwendet wurde. Abb. 49 zeigt das Autoradiogramm sowie die Coomassiefärbung der Histone.



**Abb. 49: Methyltransferase-Assays am Histon H3.** 20  $\mu$ l jeder Fraktion, die von der Superdex200-Säule eluierte, wurde in einem Methyltransferase-Assay untersucht. Als Substrat diente nicht das H3-*tail*-Peptid, sondern das ganze Histon H3. Aliquots dieser Reaktion wurden auf ein 18% SDS-Gel geladen, welches anschließend mit Coomassie gefärbt (siehe untere Spur), mit Amplify behandelt und gegen einen Röntgenfilm exponiert wurde (obere Spur: Autoradiographie).

In Fraktion 12 bis 15 befindet sich eine Methyltransferase, welche H3 methyliert.

Um festzustellen, ob E(Z) zusammen mit dieser Aktivität reinigt, wurden Aliquots dieser Superdex200-Fractionen auf einem Western Blot untersucht (siehe Abb. 50), welcher mit anti-Enx- (für die Detektion von E(Z)), anti-ESC sowie anti-SU(Z)12-Antikörper inkubiert wurde.



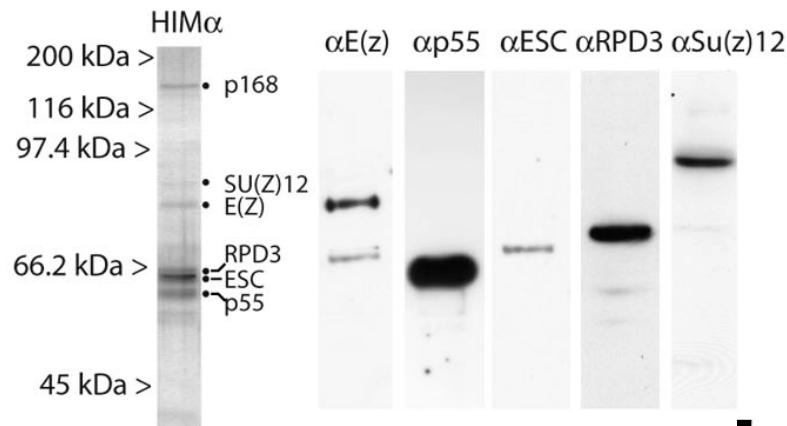
**Abb. 50: Detektion einiger Komponenten des E(Z)-Komplexes nach der Superdex200 mittels Western Blot.** Je 20  $\mu$ l der Superdex200-Fractionen wurde auf ein 10% Gel geladen. Die Proteine wurden in einem Western Blot detektiert. Es wurde humaner anti-Enx-Antikörper verwendet, um E(Z) zu detektieren. Gegen die beiden anderen Proteine wurden *Drosophila*-Antikörper eingesetzt.

Wie in Abb. 50 zu sehen, reinigt E(Z) genau in den Fraktionen, die auch Methyltransferase-Aktivität zeigen (Nr. 12 bis 15). Ebenfalls in diesen Fraktionen konnten ESC und SU(Z)12 nachgewiesen werden. Alle Proteine sowie die Methyltransferase-Aktivität erreichen ihr Maximum in Fraktion 13 und 14.

Durch einen Vergleich mit einem Größenstandard für die Superdex200-Säule konnte festgestellt werden, dass der E(Z) enthaltende HIM $\alpha$ -Komplex bei einer ungefähren Größe von 600-650 kDa eluiert. Dies entspricht der schon publizierten Größe des E(Z)-ESC-Komplexes aus Embryos (Ng et al., 2000).

Um die *peak*-Fraktionen der Superdex200-Säule genauer zu untersuchen, wurden die vereinigten Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches einerseits mit Silber gefärbt wurde (siehe Abb. 51 links) bzw. für einen Western Blot verwendet wurde. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (siehe Abb. 51 rechts) konnte die Anwesenheit der einzelnen

Komponenten des E(Z)-ESC-Komplexes bestätigt werden: es finden sich auch p55 und RPD3 in diesem Komplex.



**Abb. 51: Silbergefärbtes Gel sowie Western Blot des HIM $\alpha$ -Komplexes.** Die *peak*-Fraktionen von der Superdex200-Säule wurden vereinigt und auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, welches im Anschluss daran mit Ag gefärbt wurde (links) bzw. auf einem Western Blot (rechts) auf die Anwesenheit der einzelnen Komplexkomponenten untersucht wurde. Die verwendeten Antikörper sind über den Spuren angeschrieben.

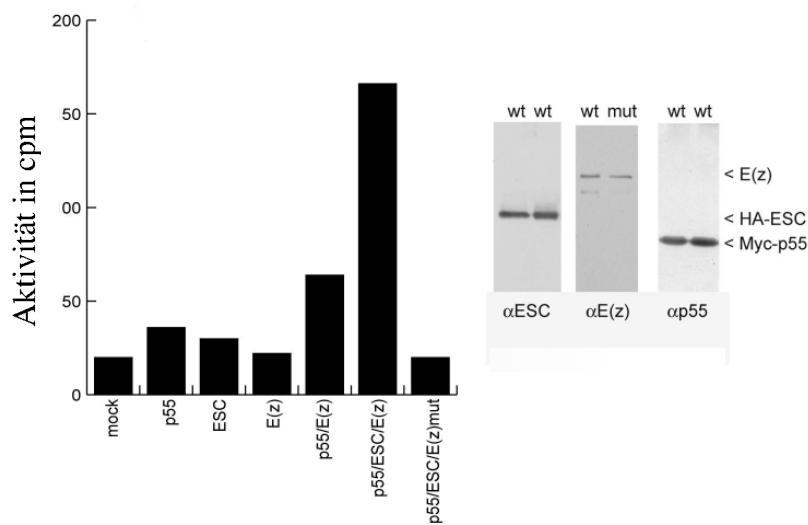
#### 4.4.2 REKONSTITUTION EINES REKOMBINANTEN E(Z)-KOMPLEXES

Wurde E(Z) als *Drosophila* Intein-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über *Chitinbeads* gereinigt und entweder ein HIM-Assay direkt an den *beads* oder nach einer Elution durchgeführt, so zeigte sich nur geringe Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde vermutet, dass E(Z), um als Methyltransferase fungieren zu können, eventuell andere Komponenten des Komplexes benötigt.

Histonmodifizierende Proteine brauchen des öfteren noch andere Proteine zusätzlich zur katalytischen Untereinheit, um ihr Substrat zu erkennen. Zum Beispiel ist für die Funktion des humanen HAT1 p48 notwendig, welches ein histonbindendes Protein ist und eine WD40-Domäne enthält (Verreault et al., 1998). P55 und ESC, beides Proteine aus dem E(Z)-Komplex, haben ebenso wie p48 WD40-Domänen, die für die Histonbindung erforderlich sind (Sathe and Harte, 1995, Simon et al., 1995).

Um zu testen, ob E(Z) noch andere Komponenten benötigt, um als Methyltransferase arbeiten zu können, wurde rekombinantes E(Z) über seinen Intein-*tag* an *Chitinbeads* gebunden und p55, ESC oder beide zu E(Z) gegeben. P55 wurde als *myc-getagtes* Protein in *Baculo*-infizierten Schmetterlingszellen (siehe Kapitel 3.2.14) exprimiert, und ESC als *HA-getagtes* Fusionsprotein in *E. coli*. Das Ergebnis des HIM-Assays (Durchführung siehe Kapitel 3.2.30) an *beads* ist in Abb. 52 zu sehen.



**Abb. 52: Rekonstitution der EZ-Aktivität.** Links: Rekombinantes Intein-E(Z) sowie HA-ESC wurden in *E. coli* exprimiert; myc-p55 wurde im Baculosystem als Extrakt hergestellt. Diese Proteine wurden entweder allein auf HIM-Aktivität untersucht oder in unterschiedlichen Kombinationen (siehe Beschriftung) zusammengegeben, inkubiert, und über den myc-tag von p55 gereinigt. Anschließend wurde ein HIM-Assay mit dem Histon H3 als Substrat durchgeführt. Rechts: Western Blot der Proteine, die für die Rekonstitution verwendet wurden (10% SDS-Gel).

Die einzelnen Proteine allein zeigten keine Methyltransferase-Aktivität am Histon H3. E(Z) mit p55 zusammen hat eine schwache Aktivität, die sich verstärkt, wenn ESC dazugegeben wird. Wurde E(Z) als SET-Domänen-Mutante eingesetzt, ist keine Aktivität mehr detektierbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass E(Z) wohl nur zusammen mit anderen Proteinen seine Methyltransferase-Aktivität entfaltet, und dass eine intakte SET-Domäne für die katalytische Aktivität notwendig ist.

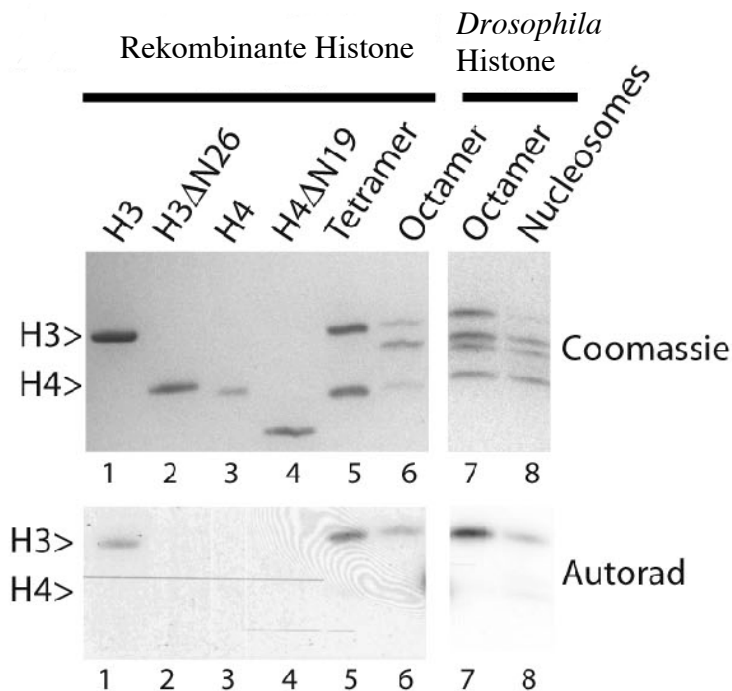
#### 4.4.3 E(Z) METHYLIERT LYSIN 9 AUS DEM H3-TAIL

Um festzustellen, welche Substrate HIM $\alpha$  umsetzen kann, wurden HIM-Assays mit unterschiedlichen Histonen, dem Oktamer und Nukleosomen durchgeführt.

Dazu wurden die Aliquots der vereinigten ResourceQ-Fractionen mit rekombinatem Histon H3, globulärem H3, Histon H4, globulärem H4 sowie rekombinatem Tetramer und Oktamer (Herstellung der Histone siehe Kapitel 3.2.23, Herstellung des Oktamers siehe Kapitel 3.2.24) in einem HIM-Assay inkubiert. Die globulären Histone wurden als Substrat eingesetzt, um zu testen, ob HIM $\alpha$  Aminosäuren methylieren kann, die sich außerhalb des



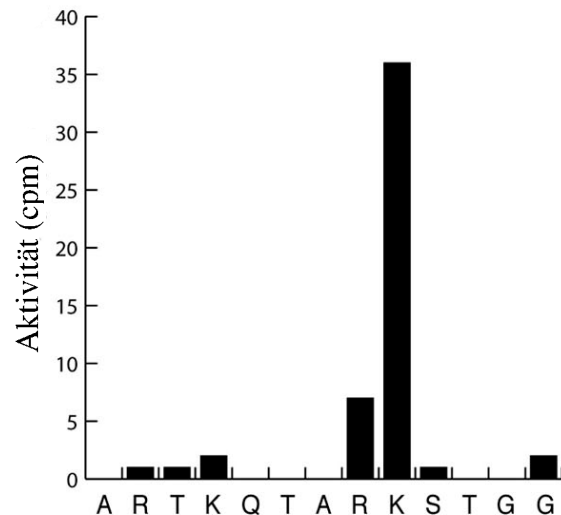
Histon-*tails* befinden. Ferner wurden als Substrate aus *Drosophila* isoliertes Oktamer und Nukleosomen verwendet.



**Abb. 53: HIM $\alpha$ -Methyltransferaseaktivität an verschiedenen Substraten.** Die vereinigten HIM $\alpha$ -Fraktionen wurden mit unterschiedlichen Substraten (siehe Beschriftung) in einem HIM-Assay inkubiert. Anschließend wurde jeweils die ganze Reaktion auf ein 18% SDS-Gel geladen, mit Coomassie gefärbt (obere Hälfte) sowie gegen einen Röntgenfilm exponiert (untere Hälfte). Die Deletionsmutanten von H3 und H4 bestehen nur noch aus dem globulären Teil des Histons.

Wie in Abb. 53 zu sehen, methyliert der HIM $\alpha$ -Komplex H3, jedoch nicht H4 oder die globulären Histone. Tetramer, Oktamer sowie Nukleosomen sind gleichermassen Substrate für diesen Komplex. Dieser Versuch zeigte, dass das Ziel der Methylierung der H3 *tail* ist.

Um genauer festzustellen, welche Aminosäure(n) das Ziel der Methylierungsreaktion von E(Z) ist/sind, wurde ein Peptid, welches den ersten 19 Aminosäuren des H3 *tails* entspricht, als Substrat für HIM $\alpha$  eingesetzt. Als Methylgruppendonor diente radioaktiv markiertes  $^3\text{H}$ -S-Adenosyl-methionin. Das methylierte Peptid wurde im Anschluß an diese Reaktion vom N-Terminus her Edman-abgebaut (durchgeführt am IGBMC in Straßburg). Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 54 zu sehen.



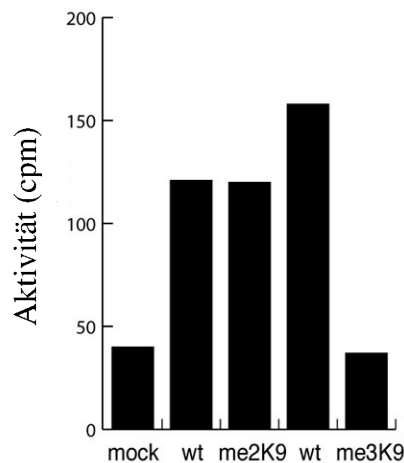
**Abb. 54: Edman-Abbau des von HIM $\alpha$  methylierten H3-Peptides.** Die Radioaktivität, welche in jedem Abbau-Zyklus freigesetzt wurde, ist in diesem Diagramm dargestellt. Die Buchstaben bezeichnen die Aminosäuren, der Abbau erfolgte von N-Terminus her.

Bei Lysin 9 fand sich ein großer *peak*. Aus diesem Grund wurde geschlossen, dass Lysin 9 aus dem H3 *tail* für E(Z) eine mögliche Substrat-Aminosäure ist.

Um genauer festzustellen, wie viele Methylgruppen durch E(Z) an Lysin 9 angefügt werden können, wurden an K9 prämethylierte Peptide verwendet.

Wurde ein prämethyliertes H3-Peptid, welches die Aminosäuren 1 bis 19 aus dem H3 *tail* umfasst und an K9 bereits *zwei* Methylgruppen trägt, im HIM-Assay (siehe Kapitel 3.2.30) mit HIM $\alpha$  getestet, so zeigte sich, dass weitere Radioaktivität eingebaut werden konnte (siehe Abb. 55 linker Teil des Diagramms, 2. und 3. Säule). Anscheinend kann ein dimethyliertes Lysin 9 von E(Z) noch weiter methyliert werden, das heißt trimethyliert werden.

Um auszuschließen, dass andere Aminosäuren unspezifisch methyliert werden, wurde ein 16 Aminosäuren umfassendes, an K9 *trimethyliertes* Peptid als Negativkontrolle in einen HIM-Assay mit HIM $\alpha$  eingesetzt. Ein trimethyliertes Lysin kann theoretisch nicht mehr weiter methyliert werden und sollte daher kein Substrat mehr für eine Methyltransferase sein.



**Abb. 55: HIM Assay mit HIM $\alpha$  an prämethylierten Peptiden.** HIM $\alpha$  wurde in einem HIM-Assay mit an K9 dimethyliertem (me2K9) Peptid (AA 1-19) bzw. mit an K9 trimethyliertem (me3K9) Peptid (AA 1-16) inkubiert. "wt" bezeichnet das entsprechende unmethylierte Peptid.

Es zeigte sich (siehe Abb. 55 rechter Teil, letzte zwei Säulen), dass in das trimethylierte Peptid durch HIM $\alpha$  keine weitere Radioaktivität mehr eingebaut werden kann, also keine anderen Aminosäuren unspezifisch methyliert werden.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass HIM $\alpha$  offensichtlich in der Lage ist, K9 im Histon H3 zu trimethylieren.

#### 4.4.4 E(Z) METHYLIERT AUCH LYSIN 27 AUS DEM H3-TAIL

Die Umgebung von Lysin 9 und Lysin 27 aus dem H3-tail weisen große Ähnlichkeit auf. Es besteht eine Übereinstimmung von 4 Aminosäuren, die um K9 bzw. K27 herum liegen: in Abb. 56 sind die ersten 30 Aminosäuren des H3-tails abgebildet. Wie man sieht, kommt die Sequenz "ARKS" zweimal vor.

**MARTKQTARK STGGKAPRKQ LATKAARKSA.....**

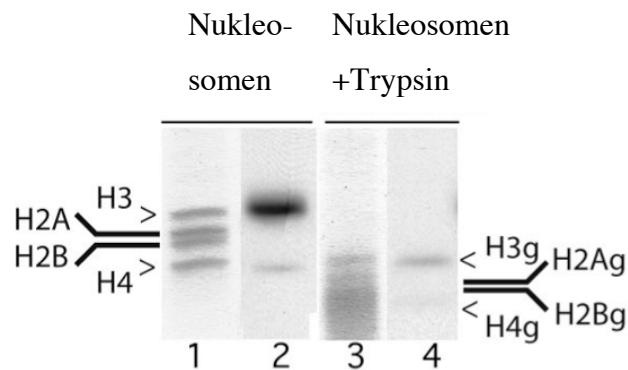
**Abb. 56: Sequenz des N-Terminus des Histons H3.**

Aus diesem Grunde wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass E(Z) nicht nur Lysin 9, sondern auch Lysin 27 methylieren kann.

Um dies herauszufinden, kann man beispielsweise den H3 tail des Histons H3 nach einer Methylierungsreaktion durch tryptischen Verdau "abschneiden" und den verbleibenden globulären Teil des Histons auf Einbau von Radioaktivität untersuchen:

*Drosophila* Nucleosomen (Herstellung von Nucleosomen siehe Kapitel 3.2.26) wurden als Substrat für HIM $\alpha$  im HIM-Assay verwendet (siehe Kapitel 3.2.30). Nach Einbau der Tritium-markierten Methylgruppen wurde die Reaktion entweder gestoppt oder Trypsin hinzugegeben. Trypsin schneidet zwischen Aminosäure 26 und 27 im Histon H3. Zurück bleibt ein globuläres Histon, welches aber noch das zu untersuchende Lysin 27 enthält. Die so behandelten Nucleosomen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

Es zeigte sich, dass Trypsin den *tail* vollständig abschneidet: in Abb. 57 sieht man deutlich den Unterschied zwischen Spur 1, welche die unbehandelten Nucleosomen enthält, und Spur 3, welche mit Trypsin verdaut wurde. Im Autoradiogramm erkennt man für die unbehandelten Nucleosomen das vertraute Bild (Spur 2 in Abb. 57): H3 wird methyliert. Ist jedoch der N3-*tail* abgeschnitten worden, ist trotzdem noch eine Bande in der Höhe des globulären H3 zu sehen.

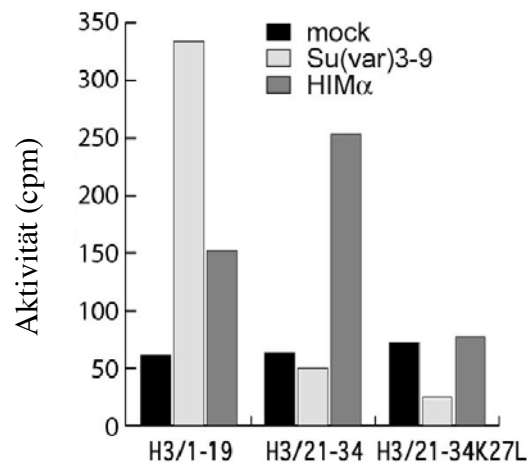


**Abb. 57: HIM $\alpha$  methyliert auch den globulären Teil von Histon H3.** *Drosophila* Nucleosomen wurden durch HIM $\alpha$  methyliert. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von SDS-Ladepuffer gestoppt oder es wurde 2  $\mu$ g Trypsin dazugegeben und für 10 min inkubiert. Die Proben wurden auf einem 18% SDS-Gel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt (Spuren 1 und 3) sowie gegen einen Röntgenfilm exponiert (Spuren 2 und 4). Die Methylierung von H4 ist durch eine Kontamination in der Nucleosomen-Präparation verursacht.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Methyltransferase-Aktivität in HIM $\alpha$  neben K9 auch eine/mehrere Aminosäuren im globulären Teil des Histons H3 methyliert. Eine dieser Aminosäuren könnte Lysin 27 sein.

Wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben, kann E(Z) nicht den globulären Teil des Histons H3 methylieren. Dies ist jedoch kein Widerspruch zu dem Ergebnis in Abb. 57, da hier zuerst methyliert wurde und dann erst der *tail* abgeschnitten wurde. Es ist vielmehr zu vermuten, dass E(Z), um auch Lysin 27 methylieren zu können, zusätzliche Aminosäuren braucht: etwa um sein Substrat erkennen zu können.

Um genau festzustellen, ob E(Z) auch Lysin 27 methyliert, wurde ein Peptid, das Aminosäure 21 bis 34 umfasst, als Substrat im HIM-Assay mit HIM $\alpha$  verwendet. Zusätzlich zu diesem Peptid wurde ein punktmutiertes Peptid verwendet, dessen Lysin 27 in Leucin verändert worden war (K27L). Als Vergleichsenzym wurde Su(var)3-9 eingesetzt; von diesem ist bekannt, dass es nur Lysin 9 methyliert.

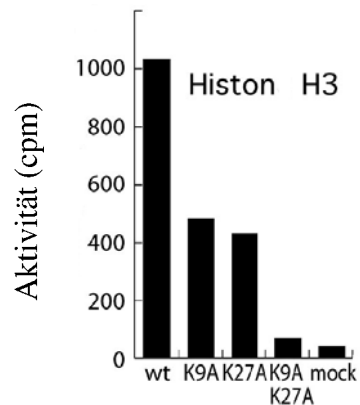


**Abb. 58: Aktivität von HIM $\alpha$  und Su(var)3-9 auf Peptiden.** H3 Peptide, welche entweder AA 1-19 oder AA 21-34 umfassten, wurden mit HIM $\alpha$  bzw. Su(var)3-9 in einem HIM Assay inkubiert. Das 21-34-Peptid wurde in der "wildtyp" Form benutzt oder mit einer Punktmutation (K27L). "Mock" bezeichnet den Ansatz ohne Enzym.

Abb. 58 zeigt, dass Su(var)3-9 nur das Peptid, das Aminosäure 1 bis 19 umfasst, methylieren kann. HIM $\alpha$  dagegen kann sowohl das Peptid 1-19 als auch 21-24 methylieren. Wenn Lysin 27 mutiert ist, kann kein Einbau von radioaktiv markierten Methylgruppen mehr gemessen werden.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass E(Z) als Komponente des HIM $\alpha$ -Komplexes also neben Lysin 9 auch Lysin 27 methylieren kann.

Um dieses Ergebnis weiter zu bestätigen, wurde ein punktmutiertes Histon H3 als Substrat in einem HIM-Assay verwendet. Es wurden folgende mutierte Histone hergestellt (siehe Kapitel 3.2.23) und neben dem nicht mutierten "wildtyp" Histon H3 als Substrat für HIM $\alpha$  eingesetzt: K9A, K27A, sowie die Doppelmutante K9+27A.



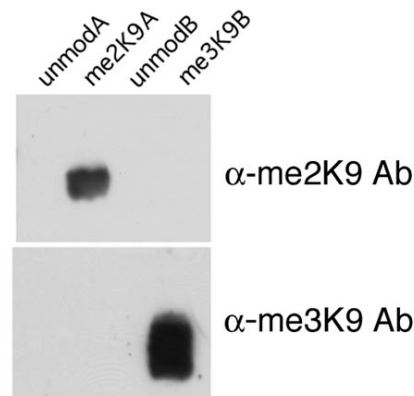
**Abb. 59: HIM-Aktivität von HIM $\alpha$  auf verschiedenen Histonen H3.** HIM $\alpha$  wurden mit unmodifiziertem H3 bzw. den Punktmutanten K9A/ K27a sowie K9+27A inkubiert. "Mock" ist die Reaktion mit wt H3, ohne Enzym.

Wie in Abb. 59 zu sehen, werden sowohl das wt H3 als auch die beiden Histone methyliert, die nur jeweils eine einzige Mutation tragen. Die eingebaute Aktivität fällt in Falle der beiden letzteren allerdings geringer aus, da von den beiden möglichen Lysinen nur mehr eines zur Verfügung steht. Die Doppelmutation K9+27A kann nicht mehr von E(Z) als Substrat verwendet werden.

#### 4.4.5 LYSIN 27 IST *IN VIVO* METHYLIERT

Des weiteren kann man mit Antikörpern, welche spezifisch di- oder trimethyliertes K9 aus H3 detektieren, *Drosophila*-Nukleosomen untersuchen, um festzustellen, ob diese Modifikationen auch *in vivo* vorkommen.

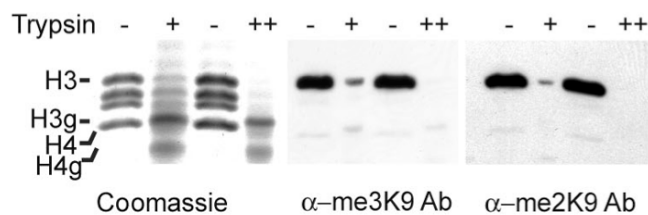
Zunächst einmal sollten die im Labor vorhandenen Antikörper auf ihre Spezifität hinsichtlich Di- und Trimethylierung untersucht werden. Der anti-Dimethyl-K9-Antikörper wurde von Upstate bezogen, der anti-Trimethyl-K9-Antikörper wurde dankenswerterweise von P. Singh zu Verfügung gestellt. Unmodifiziertes, di- sowie trimethyliertes H3-Peptid wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet (siehe Kapitel 3.2.6) und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. Abb. 60 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.



**Abb. 60: Test der anti-Methyl-K9-Antikörper auf einem Western Blot.** Unmodifiziertes H3-Peptid (AA 1-19), bezeichnet mit "unmodA"; an K9 dimethyliertes Peptid (AA 1-19); unmodifiziertes H3-Peptid (AA 1-16), bezeichnet mit "unmodB"; sowie an K9 trimethyliertes Peptid (AA 1-16) wurden auf einem 18% SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit den anti-Di/Trimethyl-Antikörpern inkubiert.

Der Anti-Dimethyl-K9-Antikörper erkennt nur K9-dimethyliertes Peptid, der Anti-Trimethyl-K9-Antikörper nur K9-trimethyliertes Peptid. Es besteht also keine Kreuzreaktivität zwischen den beiden Modifikationen an Lysin 9.

Um herauszufinden, ob *Drosophila*-Nukleosomen *in vivo* di- bzw. trimethyliert sind, wurden diese mit Trypsin verdaut, auf ein SDS-Gel aufgetragen, Coomassie gefärbt sowie nach einem Western Blot mit dem anti-Di- bzw. Tri-Methylantikörper inkubiert.



**Abb. 61: Detektion von Di- und Trimethylierung an H3-K9 in *Drosophila* Nukleosomen.** *Drosophila* Nukleosomen wurden mit entweder 1 oder 2  $\mu$ g Trypsin (+ bzw. ++) verdaut und dann auf einem 18% SDS-Gel aufgetrennt. Die Nukleosomen wurden entweder Coomassie gefärbt (siehe links) oder mit anti-Di/Trimethyl-H3-K9-Antikörper detektiert.

Wie in Abb. 61 links im Coomassie-Gel zu sehen, verdaut eine größere Menge Trypsin die *tails* komplett, und es bleiben nur die globulären Histone übrig.

Wie im Western Blot (rechts in Abb. 61) zu erkennen, treten beide Modifikationen in *Drosophila* auf. Jedoch detektiert der anti-Dimethyl-K9-Antikörper die Modifikation nur, wenn das Histon H3 intakt ist. Globuläres H3 wird nicht erkannt. Dagegen erhält man mit

dem anti-Trimethyl-K9-Antikörper auch ein Signal, wenn die *tails* schon abverdaut sind. Das heißt, der Antikörper kann auch schwach eine Modifikation im globulären H3 detektieren, die wohl der K9-Trimethylierung sehr ähnlich ist. Dies könnte das trimethylierte K27 sein.

Diese Erkenntnis war auch für weitere Versuche unseres Kooperationspartners wichtig, die in der Publikation von 2002 durchgeführt wurden (Czermin et al., 2002).

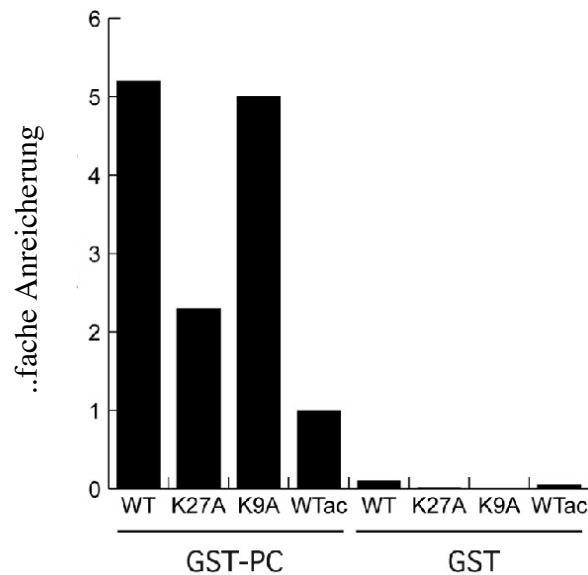
#### **4.4.6 POLYCOMB BINDET BEVORZUGT AN METHYLIERTES H3-K27**

Die Chromodomäne von HP1 bindet spezifisch an di- sowie trimethyliertes Lysin 9 im H3-*tail* (Bannister et al., 2001; Nielsen et al., 2002). Es könnte sein, dass aufgrund der Struktur der Chromodomäne von Polycomb und der Konservierung von kritischen Aminosäuren Polycomb ebenfalls eine solche spezifische Bindung an ein methyliertes Lysin zeigt.

Zu diesem Zweck wurde Polycomb als GST-Fusionsprotein sowie zum Vergleich GST allein in *E. coli* exprimiert und jeweils an GST-*beads* gebunden (siehe Kapitel 3.2.19).

Parallel dazu wurde Histon H3 (unmodifiziert, K9A mutiert bzw. K27A mutiert) entweder durch HIM $\alpha$  methyliert bzw. durch GCN5 acetyliert (siehe Kapitel 3.2.20). Die spezifische eingebaute Radioaktivität wurde mit nicht modifiziertem H3 angeglichen. Die so vorbereiteten H3s wurden zu GST an *beads* bzw. zu GST-Polycomb an *beads* gegeben, inkubiert und gewaschen. Anschließend wurde mit Glutathion eluiert und das Eluat auf P81-Anionenaustauscherpapier aufgetragen. Die mit PC bzw. GST assoziierte Radioaktivität, also die markierten Histone, konnten alsdann im Szintillationszähler gemessen werden. In Abb. 62 ist abzulesen, um welchen Faktor im Vergleich zum acetylierten Histon H3 die methylierten Histone besser an PC binden.





**Abb. 62: Bindung von Pc an methyliertes H3.** GST allein oder GST-PC wurden mit GCN5-acetyliertem H3 (WTac) sowie mit HIM $\alpha$ -methyliertem "wildtyp" (WT), K27A bzw. K9A mutiertem H3 inkubiert. Die spezifische Radioaktivität war dabei angeglichen worden; als 100% wurde dabei das von GCN5 acetylierte H3 gesetzt (WTac). Nach Inkubation, Waschen, Elution mit Glutathion und Bestimmung der miteluierten Radioaktivität im Szintillationszähler wurde die Bindungsaffinität der einzelnen metyhlierten Histone zu PC im Vergleich zum acetylierten H3 bestimmt.

Das wt Histon H3, welches an K9 *und* K27 durch HIM $\alpha$  methyliert worden war, bindet um den Faktor 5 besser an Polycomb als die acetylierte Kontrolle. *Nur* an K27 methyliertes H3 - die K9 Mutante von H3 - bindet genauso gut wie das K9/K27-methylierte Histon. Für den Fall, dass nur K9 methyliert wurde (K27A -Mutante), lässt sich lediglich eine um den Faktor 2,5 erhöhte Bindung an PC feststellen.

Insgesamt kann man also festhalten, dass PC an Histon H3 verstärkt bindet, wenn dieses zuvor durch HIM $\alpha$  methyliert worden ist. PC scheint dabei die Bindung an das methylierte K27 gegenüber dem methylierten K9 zu bevorzugen.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde ein ähnlicher Versuch durchgeführt, der anstelle von Histon H3 Peptide verwendet, die jeweils nur ein Lysin enthalten. Dies waren das Peptid 1-19 sowie das Peptid 21-34.

Diese Peptide wurden durch HIM $\alpha$  methyliert (siehe Kapitel 3.2.21) und auf *beads* gegeben, die GST bzw. GST-PC gebunden hatten (Herstellung siehe Kapitel 3.2.19). Nachdem die *beads* gewaschen worden waren, wurde GST bzw. PC mit Glutathion eluiert und das Eluat auf P81-Anionenaustauscherpapier aufgetragen. Die mit PC bzw. GST

---

eluierte Radioaktivität konnte alsdann im Szintillationszähler bestimmt werden. Dabei zeigte sich das gleiche Ergebnis: PC bindet bevorzugt an methyliertes K27 (Daten nicht gezeigt).

## 4.5 HERSTELLUNG DES E(Z)-KOMPLEXES IM BACULOSYSTEM

Nachdem die meisten der bis jetzt aufgeführten Versuche mit Proteinen aus *Drosophila* Kernextrakt durchgeführt worden waren, sollte als nächstes der E(Z)-Komplex *in vitro* rekonstituiert werden. In einem solchen System lassen sich besser Mutationen einführen, Interaktionen studieren sowie Charakterisierungen vornehmen. Da E(Z), wenn es als einzelnes Protein in *E. coli* exprimiert wird, keine Methyltransferase-Aktivität zeigt, sollte es im Baculo-System hergestellt werden. Die Ausbeuten sind hierbei zwar viel geringer, jedoch erhalten die Proteine posttranslationale Modifikationen, und es können mehrere Proteine gleichzeitig exprimiert werden.

### 4.5.1 HERSTELLUNG VON BACULO-VIREN

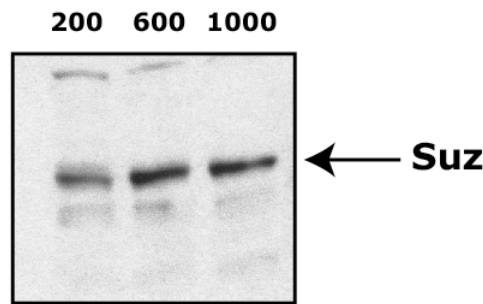
Für die Expression eines vollständigen E(Z)-Komplexes wurden Viren für E(Z), ESC bzw. ESCL, SU(Z)12, p55 sowie RPD3 benötigt. Um jedes Protein auch einzeln reinigen zu können, wurde jedes von ihnen mit einem *tag* versehen. Die *tags* wurden so gewählt, dass jedes Protein einen anderen *tag* erhielt. Dadurch wurden Affinitätsreinigungen und Interaktionsstudien möglich, die darauf beruhen, dass mehrere Proteine über den *tag* von *einem* der Komplexkomponenten gereinigt werden.

Von J. Müller (Heidelberg) wurde dankenswerterweise der Virus für Flag-E(Z) zur Verfügung gestellt, von A. Brehm (München) derjenige für Flag- und his-RPD3 sowie für myc-55. Die Viren für SU(Z)12, ESC und ESCL fehlten noch. Zur Herstellung der Viren im Baculo-System wurde das System "Bac-to-Bac" (Invitrogen) verwendet (siehe Kapitel 3.2.13).

#### 4.5.1.1 VIRUS FÜR SU(Z)12

SU(Z)12 wurde über PCR in den Vektor pFastBac HAT eingeführt, und nach Rekombination im *E. coli*-Stamm "DH10bac" wurde die entstandene Virus-DNA in Sf9-Zellen transfiziert (siehe Kapitel 3.2.13). Der Virus wurde amplifiziert und auf Expression des Proteins untersucht.

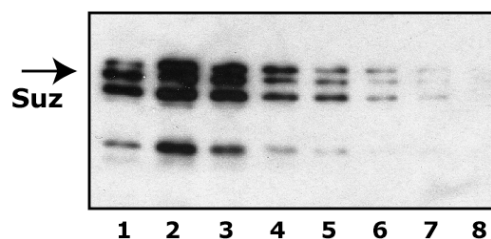
Da die Proteinmenge bei dieser ersten Testexpression nicht besonders groß war, sollte durch eine Titrationsreihe festgestellt werden, welche Menge an Virus optimal für eine Proteinexpression war. Jeweils eine Platte Sf9-Zellen wurde mit 200, 600 bzw. 1000  $\mu$ l SU(Z)12-Virus infiziert. Der Extrakt (Herstellung siehe Kapitel 3.2.14) wurde ohne weitere Aufreinigung auf einem Western Blot analysiert. Abb. 63 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.



**Abb. 63: Titration des SU(Z)12-Virus.** Je eine 15cm-Platte mit  $1,2 \cdot 10^7$  Sf9-Zellen wurde mit 200 bzw. 600 bzw. 1000  $\mu\text{l}$  SU(Z)12-Virus infiziert. Nach zwei Tagen wurde 500  $\mu\text{l}$  Extrakt hergestellt und 2  $\mu\text{l}$  davon auf ein 7,5% SDS-Gel geladen. Mit Hilfe des anti-SU(Z)12-Antikörpers wurde das Protein auf dem Western Blot detektiert. Beschriftung über den Spuren:  $\mu\text{l}$  SU(Z)12-Virus pro Platte.

Die Expression bei Infektion mit 200  $\mu\text{l}$  Virus ist schwächer als bei den Infektionen mit 600 oder 1000  $\mu\text{l}$  Virus. Zwischen den beiden letztgenannten ist jedoch kein Unterschied im Western Blot zu sehen. Die optimale Virusmenge wurde auf 600  $\mu\text{l}$  für SU(Z)12 festgelegt.

Außerdem wurde versucht, SU(Z)12 über den *his-tag* aufzureinigen. Ein Sf9-Extrakt, der SU(Z)12 überexprimiert hatte, wurde über *Talonbeads* gegeben, und das gebundene Protein wurde mit Imidazol eluiert (Talonpräparationen wurden analog zu Kapitel 3.2.18 durchgeführt). Abb. 64 zeigt den Western Blot der eluierten Fraktionen.



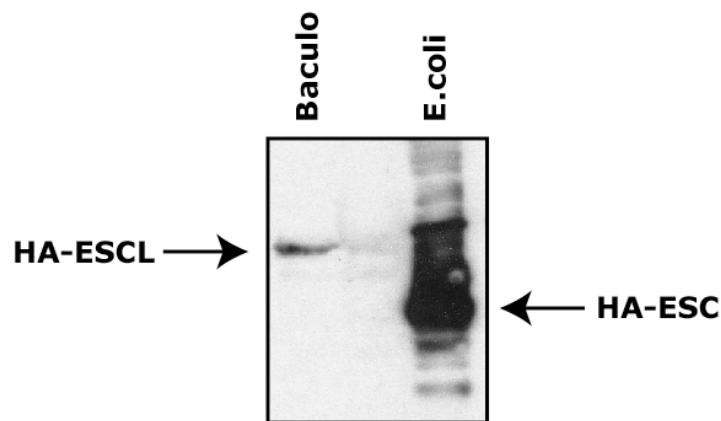
**Abb. 64: Talonreinigung von SU(Z)12.** 1 ml SU(Z)12-Extrakt aus Baculo wurde gegen Lysis Puffer/1mM Imidazol dialysiert und über Nacht mit 300  $\mu\text{l}$  *Talonbeads* inkubiert. Anschließend wurde mit Lysis Puffer mit 1 mM/ 5 mM/ 15 mM Imidazol gewaschen, mit 100 mM Imidazol eluiert und 200  $\mu\text{l}$ -Fraktionen aufgefangen. Jeweils 10  $\mu\text{l}$  von jeder Fraktion wurden auf ein 10% SDS-Gel geladen und mit anti-SU(Z)12-Antikörper auf dem Western Blot detektiert. Unter dem Gel sind die Fraktionsnummern angegeben.

In Fraktion 2 und 3 ist das meiste Protein enthalten. Der Antikörper detektiert mehrere Banden. Auch auf einem Coomassiegele tritt SU(Z)12 in mehreren Banden auf, wie durch Massenspektroskopie festgestellt (siehe Kapitel 4.5.2). Die Gesamtproteinmenge nach der

Aufreinigung war jedoch relativ klein, verglichen mit einer Standard-Proteinexpression in *E. coli*.

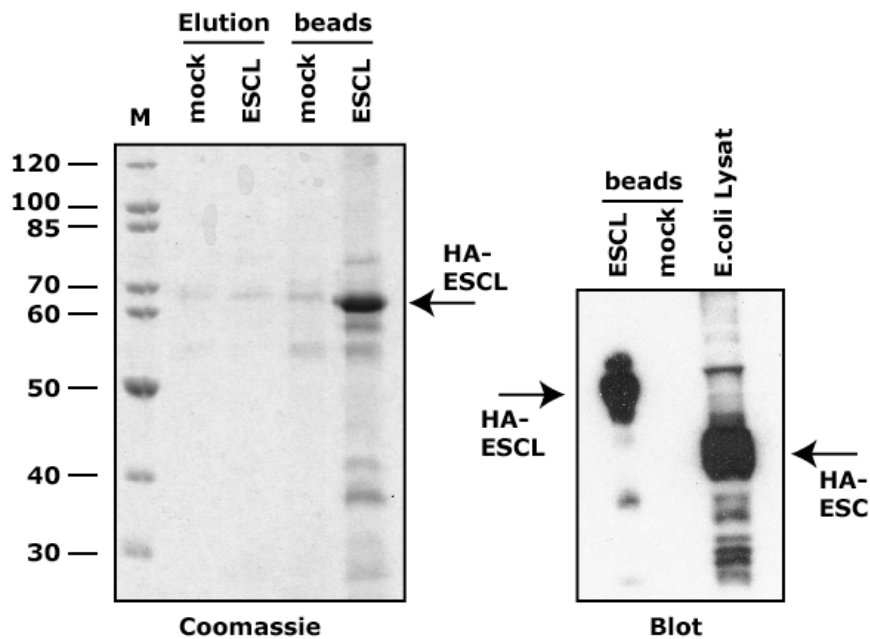
#### 4.5.1.2 VIRUS FÜR ESCL

Auch für ESCL wurde ein Virus, wie in Kapitel 3.2.13 beschrieben, hergestellt. In einem ersten Expressionstest, in dem ein Teil des Baculoextraktes (Herstellung siehe Kapitel 3.2.14) auf einem Western Blot analysiert wurde, konnte eine schwache Bande detektiert werden (siehe Abb. 65). Diese läuft etwas langsamer, bei etwa 65 kDa, als die Vergleichsbande von bakteriell exprimiertem HA-ESC (ca. 55 kDa), was durch das größere Molekulargewicht von ESCL und den zusätzlichen *his-tag* zu erklären ist.



**Abb. 65: Erste Expression von ESCL.** 2  $\mu$ l von einem ESCL-Baculo-Extrakt (Infektion von  $1,2 \cdot 10^7$  Zellen mit 600  $\mu$ l Virus) wurden auf ein 10% SDS-Gel geladen ("Baculo"). Als Positivkontrolle wurden 2  $\mu$ l eines *E. coli*-Lysates aufgetragen, welches ESC exprimiert. Die Detektion auf dem Western Blot erfolgte mit anti-HA-Antikörper.

Um genauer festzustellen, ob der Virus wirklich das gewünschte Protein exprimiert, wurde eine Anreicherung von HA-ESCL über HA-*beads* durchgeführt. Aus einer neuen, zweiten Infektion von Sf9-Zellen wurde wiederum Extrakt hergestellt und mit HA-*beads* versetzt. Nach Waschen der *beads* wurde versucht, das gebundene ESCL-Protein durch Zugabe von HA-Peptid zu eluieren. Das Eluat und die noch an die *beads* gebundenen Proteine wurden auf einem Western Blot sowie im Coomassie-Gel analysiert (siehe Abb. 66).



**Abb. 66: Zweite Expression von ESCL.** Links: 200  $\mu$ l ESCL-Baculo-Extrakt wurde für 2 Stunden mit 80  $\mu$ l HA-beads in 800  $\mu$ l BC100 inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit BC300/0,1% NP40 gewaschen und über Nacht mit 20  $\mu$ g HA-Peptid in 100  $\mu$ l BC100 eluiert. 20  $\mu$ l des Eluats sowie die eine Hälfte der *beads*, die mit SDS-Ladepuffer aufgekocht wurden, wurden auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt. Mock bezeichnet einen nicht infizierten Sf9-Extrakt. Rechts: die andere Hälfte der *beads* wurde auf einem Western Blot analysiert. Als Vergleich wurde wie oben 2  $\mu$ l *E. coli*-Lysat mit ESC aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-HA-Antikörper.

Wie in Abb. 66 links zu sehen ist, hat HA-ESCL von den *beads* nicht eluiert, was einerseits an der evtl. nicht ausreichende Menge an HA-Peptid liegen könnte. Andererseits ist aus früheren Experimenten bekannt, dass die Elution von gebundenen Proteinen von HA-beads generell mit äußerst niedrigen Ausbeuten einhergeht. Die gesamte Menge an ESCL scheint vielmehr noch an die *beads* gebunden zu sein, wie im Coomassie-Gel gut zu erkennen ist. Diese Bande befindet sich ca. auf der gleichen Höhe wie die Western-Blot-Bande aus Abb. 65, nämlich bei ca. 65 kDa.

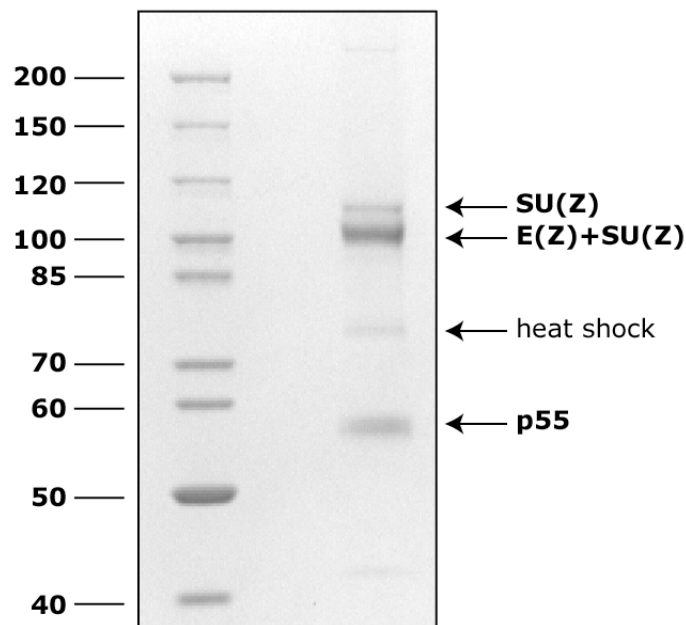
Eine weitere Bestätigung, dass der hergestellte Virus wirklich ESCL-Überexpression bewirkt, ist der Western Blot in Abb. 66 rechts. Das an den *beads* angereicherte Protein verursacht eine stärkere Bande auf dem Western Blot als der nicht aufgereinigte Extrakt in Abb. 65, und besitzt die erwartete Größe.

Parallel zur Herstellung des ESCL-Virus wurde versucht, einen Virus für ESC herzustellen. Bis zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit war es jedoch noch nicht gelungen, den Virus fertigzustellen.

### 4.5.2 REINIGUNG DES E(Z)-KOMPLEXES AUS BACULO

Nachdem der Virus für SU(Z)12 fertig gestellt worden war (nicht jedoch derjenige für ESCL oder ESC), wurden Sf9-Zellen mit dem Ziel der Reinigung eines Teilkomplexes infiziert.

Nach Infektion der Zellen mit den Viren für E(Z), SU(Z)12 sowie p55 (siehe Kapitel 3.2.13.7) und Herstellung des Extraktes (Kapitel 3.2.14) wurde E(Z) zusammen mit den anderen beiden Proteinen über den *Flag-tag* an *Flag-beads* angereichert und durch Inkubation mit *Flag-Peptid* eluiert (Durchführung siehe Kapitel 3.2.15). Das Eluat wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und Coomassie-gefärbt. Es ist in Abb. 67 zu sehen.

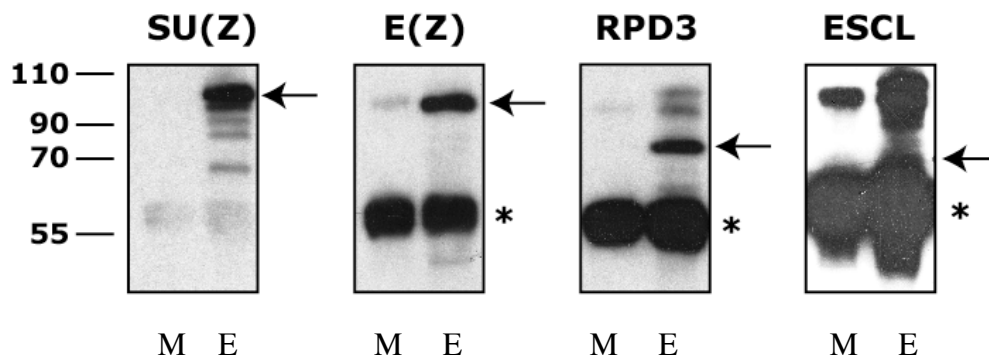


**Abb. 67: Komplex aus E(Z), SU(Z)12 und p55 auf Coomassie-Gel.** 150  $\mu$ l Baculo-Extrakt, der E(Z), SU(Z)12 und p55 als überexprimierte Proteine enthielt, wurde mit 150  $\mu$ l *Flag beads* (1:1-Mischung) in 600  $\mu$ l BC100 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit BC300/0,1%NP40 wurden 100  $\mu$ l der *beads* mit 7  $\mu$ g *Flag-Peptid* in 200  $\mu$ l Gesamtvolumen versetzt und über Nacht inkubiert, so dass E(Z) eluierte. 30  $\mu$ l des Eluats wurden auf ein 8% SDS-Gel aufgetragen und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die im Massenspektrometer identifizierten Proteine sind bezeichnet.

Nach dem Fotografieren des Gels wurden die sichtbaren Banden ausgeschnitten und im Massenspektrometer analysiert. Es stellte sich heraus, dass die dickere Bande bei ca. 100 kDa nicht nur E(Z), sondern auch SU(Z)12 enthält. Zusätzlich dazu fand sich SU(Z)12 auch in einer etwas langsamer laufenden Bande bei ca. 110 kDa. Dies passt zum Erscheinen von SU(Z)12 im Western Blot, wo mehrere Banden mit dem anti-SU(Z)12-

Antikörper reagieren. p55 konnte ebenfalls eindeutig identifiziert werden. Eine weitere sichtbare Bande zwischen 70 und 85 kDa ist ein kontaminierendes Hitzeschock-Protein. Die Proteine befinden sich nicht in einem absolut stöchiometrischen Verhältnis zueinander. E(Z) als das Protein, über welches die Aufreinigung erfolgt, ist stärker vertreten. p55 und SU(Z)12 sind jedoch in annähernd gleichen Mengen in diesem Teilkomplex enthalten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aufreinigung zumindest eines Teilkomplexes, der E(Z), SU(Z)12 und p55 enthält, über den Flag-tag von E(Z) möglich ist.

Nach Fertigstellung des ESCL-Virus wurden Sf9-Zellen probeweise mit den fünf verschiedenen Viren (E(Z), SU(Z)12, p55, ESCL und RPD3) infiziert und eine kleine Menge Extrakt wurde hergestellt (Kapitel 3.2.14). Es erfolgte wiederum eine Anreicherung über den Flag-tag von E(Z) (siehe Kapitel 3.2.15), jedoch wurden aufgrund der erwarteten kleinen Mengen der Proteine - die bei einer derartigen Coinfektion normalerweise der Fall ist - die Proteine nicht eluiert, sondern mittels SDS-Ladepuffer von den *beads* gelöst und auf einem Western Blot (siehe Abb. 68) detektiert.



**Abb. 68: Komplex aus E(Z), SU(Z)12, p55, RPD3 und ESCL im Western Blot.** 150 µl Extrakt, der E(Z), SU(Z)12, p55, RPD3 und ESCL als überexprimierte Proteine enthielt bzw. nicht infizierter "mock"-Extrakt, wurde in 0,3 ml BC100 mit 60 µl Flag-*beads*-Gemisch (1:1) versetzt und für 2 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen (s.o.) wurden 2x 30 µl der *beads* (1:1-Gemisch) mit Ladepuffer versetzt und auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Auf dem einen Blot wurde zuerst SU(Z)12 (mit anti-SU(Z)12), dann ESCL (mit anti-HA) und am Schluss RPD3 (mit anti-RPD3) detektiert, auf dem anderen Blot E(Z) (mit anti-Flag). Der Stern (\*) bezeichnet die Bande, die vom anti-Flag-Maus-Antikörper (welcher an die *beads* gekoppelt war und durch das Aufkochen der *beads* eluiert wurde) stammt. "M" = mock, E = Extrakt mit fünf Proteinen.

SU(Z)12, E(Z) und RPD3 sind sehr gut zu erkennen. Es erfolgt keine unspezifische Bindung von anderen Proteinen, die im Western Blot detektiert wurden, an die Flag *beads*. Die dicke Bande in der unteren Hälfte der meisten Western Blots ist durch den anti-Flag-Antikörper verursacht, der von den *beads* abgelöst wurde, und mit dem Sekundärantikörper



aus dem Western Blot kreuzreagiert. Diese starke Kreuzreaktion erschwert bei ESCL die Detektion der "richtigen" Bande so sehr, dass diese kaum noch zu erkennen ist, bzw. nur aus Kenntnis der Größe des Proteins annähernd zugeordnet werden kann. Für p55 erwies sich eine Detektion als unmöglich, da p55 genau zusammen mit der schweren Kette des Antikörpers läuft.

Dieses Problem könnte durch eine Elution der Komplexproteine von den *beads* mit Hilfe des Flag-Peptides umgangen werden. Hierzu benötigt man jedoch mehr Protein bzw. mehr Extrakt, da die Elution nur zu max. 50% erfolgt.

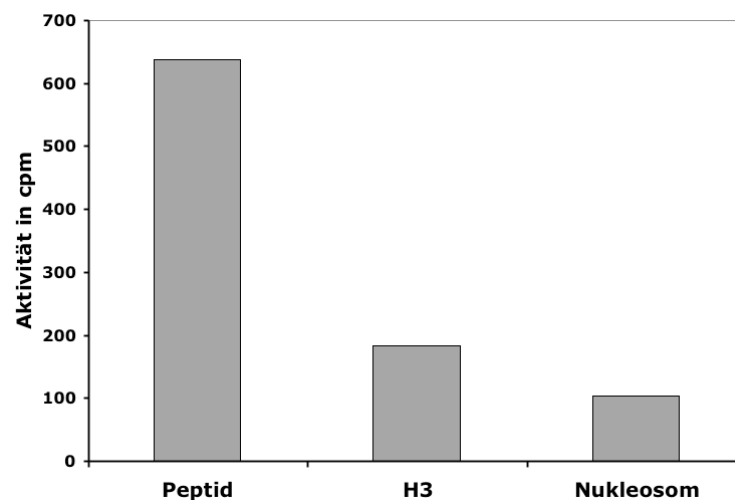
Noch besser als eine Detektion im Western Blot und äußerst wünschenswert wäre ein Coomassie-gefärbtes Gel, welches alle Komponenten des Komplexes zeigt. Auch hierzu braucht man größere Mengen Protein.

### **4.5.3 AKTIVITÄT DES BACULO-EXPRIMIERTEN E(Z)**

Wird E(Z) in *E. coli* exprimiert, so zeigt es in einem HIM Assay (siehe Kapitel 3.2.30) keine Aktivität.

Deswegen sollte E(Z) zusammen mit anderen Proteinen aus dem Komplex coexprimiert werden und auf Aktivität getestet werden.

Sf9-Zellen wurden mit den Viren für E(Z), SU(Z)12 und p55 infiziert (siehe Kapitel 3.2.13.7), und zwei Tage später wurde der Extrakt hergestellt (Kapitel 3.2.14). E(Z) wurde an Flag *beads* gebunden (Kapitel 3.2.15). Daraufhin wurde der HIM Assay an *beads* durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.30). Als Substrat diente entweder das H3 Peptid (AA 1-19), rekombinantes H3 oder rekombinantes Nukleosom. Die im Szintillationszähler vermessene Aktivität ist in Abb. 69 dargestellt.



**Abb. 69: Aktivität von E(Z) an verschiedenen Substraten.** E(Z) wurde zusammen mit SU(Z)12 und p55 in Baculo exprimiert. 600  $\mu$ l Extrakt wurden in 2 ml Gesamtvolumen mit 150  $\mu$ l Flag-beads (1:1) versetzt und 2 Stunden inkubiert. Nach Waschen mit BC300/0,1%NP40 wurden jeweils 30  $\mu$ l in einen HIM Assay eingesetzt. Als Substrat diente 1  $\mu$ g H3 Peptid (AA 1-19), 3  $\mu$ g Histon H3 sowie rekombinantes Nukleosom. Die Reaktion wurde auf p81-Filterpapier gespottet und im Szintillationszähler vermessen.

E(Z) zeigt die höchste Aktivität am kurzen Peptid. Je komplexer die Substrate werden, desto weniger scheint das Baculo-exprimierte Protein sie als Substrat zu verwenden. Die Aktivität ist im Vergleich zu anderen rekombinant hergestellten Methyltransferasen außerordentlich gering.

Die könnte eventuell daran liegen, dass die anderen beiden Komponenten des E(Z)-Komplexes, ESC und RPD3, noch nicht coexprimiert wurden und der unvollständige Komplex verminderte Aktivität zeigt. Es könnte auch sein, dass eine weitere Komponente fehlt, die der Komplex braucht, um seine volle Aktivität zu entfalten, die aber noch nicht identifiziert wurde.

Andererseits zeigt E(Z), welches allein in Baculo exprimiert wurde, ähnliche Aktivität an den verschiedenen Substraten. Die Anwesenheit von p55 und SU(Z)12 scheint also die Aktivität von E(Z) nicht zu verbessern.

Anstelle eines "Spot-and-Count"-Assays kann man auch die methylierten Substrate auf einem SDS-Gel auftrennen und anschließend den Einbau von Radioaktivität auf einem Röntgenfilm sichtbar machen. Da die Aktivität in Bezug auf das Histon H3 so gering war, musste bei diesem Versuch der Röntgenfilm für mehr als zwei Wochen exponiert werden, und die Signale waren trotzdem kaum zu sehen. Aus diesem Grund wird hier auf die Darstellung dieser Daten verzichtet.

#### 4.5.4 UNTERSUCHUNG DER AFFINITÄT VON E(Z)

E(Z) wurde daraufhin untersucht, ob es Bindung an DNA, Nukleosomen, Histone sowie H3-Peptide zeigt. Obwohl es keine Chromodomäne wie Su(var)3-9 besitzt, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es an Histone/Peptide binden kann.

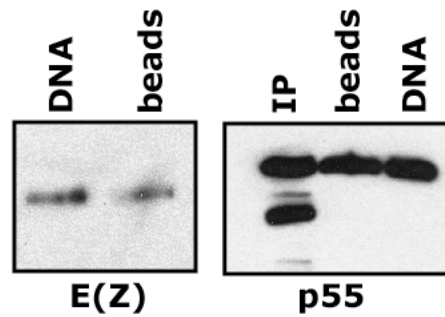
##### 4.5.4.1 UNTERSUCHUNG DER DNA-BINDUNG

Anstelle eines radioaktiven EMSAs kann man die Bindung von Proteinen an DNA auch untersuchen, indem man DNA verwendet, welche vorher an *beads*, z.B. magnetische *Dynabeads*, gebunden wurde. Die so gebundene DNA kann mit den Proteinen inkubiert werden und anschließend leicht gewaschen werden. Die gebundenen Proteine können auf einem Western Blot detektiert werden; es muss kein natives Gel gefahren werden, bei dem immer die Gefahr besteht, dass die fragilen DNA-Protein-Komplexe zerfallen.

E(Z) sowie p55 als eine weitere Komponente aus dem E(Z)-Komplex sollten daraufhin untersucht werden, ob sie an DNA binden.

Das grundsätzliche Problem bei Verwendung der magnetischen *beads*, so stellte sich in den Vorexperimenten heraus, ist die unspezifische Bindung der Proteine an die *beads*. Diese müssen daher vor Zugabe der Proteine mit BSA blockiert werden und nach der Bindungsreaktion relativ stringent gewaschen werden (300 mM KCl, 0,1% NP40). Als DNA wurde eine 12malige Wiederholung von 207bp aus der 5S-rDNA-Sequenz verwendet (Hansen et al., 1991; Simpson et al., 1985).

Nachdem also die DNA an die *beads* gebunden worden war (siehe Kapitel 3.2.33), wurde E(Z) bzw. p55 aus Baculoextrakt zu den *beads* gegeben, gewaschen und die daran gebundenen Proteine im Western Blot detektiert.



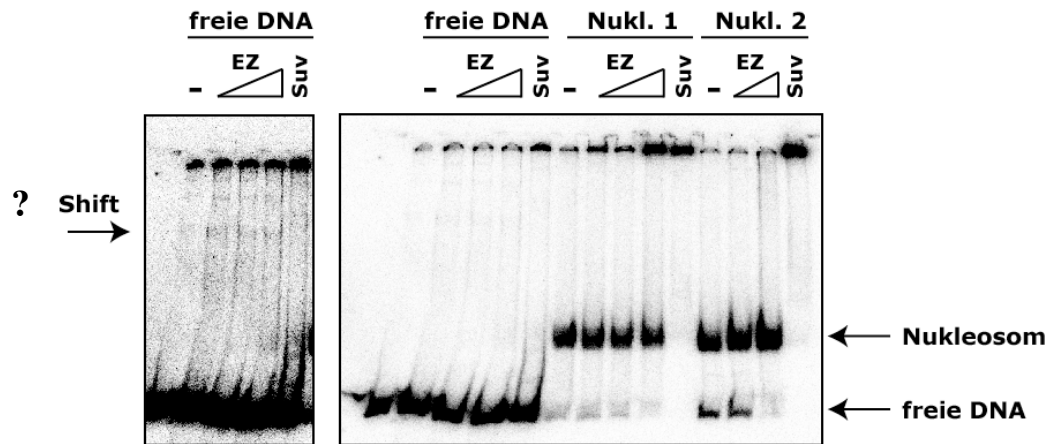
**Abb. 70: Bindung von E(Z) und p55 an DNA.** Für alle Reaktionen wurden silikonisierte Gefäße verwendet. 2  $\mu$ l der Dynabeads, welche entweder ca. DNA gebunden hatten oder nicht, wurden mit BSA blockiert und anschließend mit 30  $\mu$ l E(Z)- bzw. p55-Extrakt aus Baculo in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l BC100 inkubiert. Zusätzlich wurde 30  $\mu$ g BSA zur Bindungsreaktion gegeben. Nach der einstündigen Inkubation wurden die *beads* dreimal mit BC300/0,1%NP40 gewaschen, mit 5  $\mu$ l Ladepuffer versetzt und die von den *beads* gelösten Proteine auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. E(Z) wurde mit anti-Flag-Antikörper detektiert, p55 mit anti-p55-Antikörper. Der Input bei p55 beträgt 20% des verwendeten Materials.

Wie in Abb. 70 zu sehen ist, bindet E(Z) gleichermaßen an *beads* mit und ohne DNA. Es ist also keine Anreicherung von E(Z) über die rDNA möglich. Das gleiche trifft auch für p55 zu. Hier ist ebenfalls der Hintergrund von unspezifischer Bindung an die *beads* sehr hoch, so dass eine eventuelle Bindung nicht detektiert werden kann.

Es lässt sich unter den verwendeten Bedingungen keine starke Anreicherung von E(Z) und p55 an der rDNA-Promoter-DNA beobachten.

#### 4.5.4.2 UNTERSUCHUNG DER DNA- UND NUKLEOSOMEN-BINDUNG

Um die eventuelle Bindung von E(Z) an Mononukleosomen zu untersuchen, wurde aus rekombinanten Histonen das Oktamer hergestellt (siehe Kapitel 3.2.24) und Mononukleosomen am radioaktiv markierten 146 bp-rDNA-Fragment assembliert (Herstellung des Fragmentes siehe Kapitel 3.2.25, Zusammenbau der Nukleosomen siehe Kapitel 3.2.26). Anschließend wurde entweder die freie DNA oder die Nukleosomen mit steigenden Mengen E(Z) sowie einer Konzentration an Su(var)3-9 inkubiert und die Komplexe auf einem nativen Gel aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abb. 71 zu sehen, wobei der linke Teil der Abbildung nur eine dunklere Exposition des linken Teils des Gels darstellt.



**Abb. 71: Bindung von E(Z) an DNA und Mononucleosomen.** Radioaktiv markierte DNA (146 bp) bzw. zwei verschiedene Chargen Mononucleosomen (mit 146 bp DNA) wurden mit steigenden Mengen E(Z) bzw. Su(var)3-9 inkubiert und auf einem nativen Gel aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels wurde ein *screen* aufgelegt und die Signale mit Hilfe des Phosphoimagers ausgewertet. Der linke Teil der Abbildung ist eine dunklere Exposition des DNA-Teils des Gels.

Wie in Abschnitt 4.5.4.1 geschlussfolgert, bindet E(Z) nicht an DNA. Bei der dunkleren Exposition in Abb. 71 sieht man jedoch eine leichte Bande, die mit "Shift" bezeichnet wurde. Es ist aber davon auszugehen, dass diese Bande nicht dadurch verursacht wurde, dass E(Z) an die DNA bindet: Diese Bande ist ansatzweise auch in der Probe zu sehen, die nicht mit E(Z) versetzt wurde. In Anbetracht der großen Menge an freier DNA, die weiter unten im Gel läuft, ist dies nur ein sehr kleiner Anteil. Auch nimmt der "Shift" mit steigenden Proteinkonzentrationen nicht zu. Insgesamt kann man also davon ausgehen, dass E(Z) DNA nicht bindet.

Su(var)3-9 zeigt ein "Hochschmierer" der freien DNA-Probe, hier kann man keine richtig ausgeprägte Bande sehen. Auch Su(var)3-9 scheint also kein DNA-bindendes Protein zu sein (wie für ssDNA schon im Kapitel 4.2.6 festgestellt wurde).

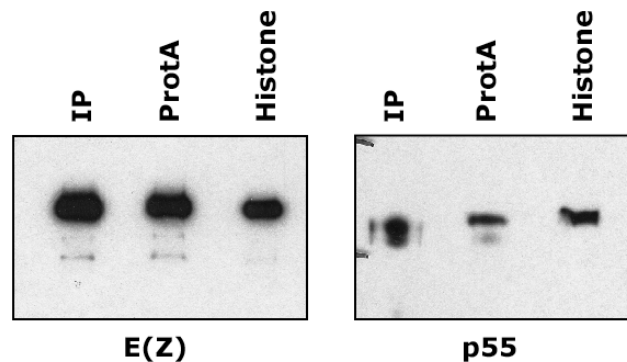
Die Mononucleosomen werden weder durch E(Z) noch durch Su(var)3-9 gebunden, auch in einer dunkleren Exposition des Gels sieht man keine Bande im höhermolekularen Bereich. In höheren Proteinkonzentrationen findet man Präzipitation der Nucleosomen im *well*.

Zusammenfassend kann man sagen, dass weder Su(var)3-9 noch E(Z) DNA oder Mononucleosomen unter den verwendeten Versuchsbedingungen binden können.

#### 4.5.4.3 UNTERSUCHUNG DER BINDUNG AN HISTONE

Es sollte untersucht werden, ob E(Z) sowie p55 an "nicht-rekombinante" Histone binden. Histone, welche aus einem eukaryontischen System stammen, besitzen höchstwahrscheinlich alle Modifikationen, die auch *in vivo* auftreten. Es könnte daher sein, dass manche Proteine nur an diese natürlich auftretenden Modifikationen, aber nicht an rekombinante Histone (wie z.B. in den Mononukleosomen verwendet) binden.

Kalbsthymus-Histone, welche schon an *beads* gebunden waren, und als Vergleich ProteinA an Agarosebeads als "unspezifisches Protein" wurden zusammen mit E(Z) oder p55 inkubiert. Nach Waschen der *beads* wurden die gebundenen Proteine auf einem Western Blot detektiert (siehe Abb. 72).



**Abb. 72: Bindung von E(Z) und p55 an Histone.** Kalbsthymus-Histone an Agarosebeads sowie ProteinA-Agarosebeads wurden mit BSA blockiert. Anschließend wurde über Flag-beads aufgereinigtes E(Z) bzw. p55-Baculo-Extrakt auf die *beads* gegeben, für eine Stunde bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 1 ml BC100 inkubiert und anschließend dreimal mit BC300/0,1%NP40 gewaschen. Mit Hilfe von SDS-Ladepuffer wurden die gebundenen Proteine von den *beads* gelöst und auf einem 10% Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag-Antikörper bzw. anti-p55-Antikörper. Der Input ist bei E(Z) 20%, bei p55 10% des eingesetzten Materials.

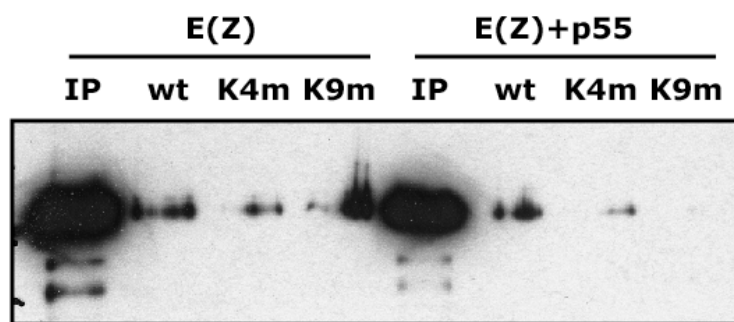
Trotz des stringenten Waschens und Blockierens der *beads* ist eine hohe unspezifische Bindung der untersuchten Proteine schon an die ProteinA-*beads* festzustellen. Aufgrund dieser hohen Hintergrundbindung ist es schwer, noch eine zusätzliche Anreicherung der Proteine an den Histonen zu beobachten. Für E(Z) kann eine etwas schwächere Bindung an die Histone als an ProteinA festgestellt werden. p55 scheint etwas stärker an die Histone als an ProteinA zu binden, was aufgrund von früheren Publikationen zu erwarten war (Verreault et al., 1998).

Insgesamt kann man festhalten, dass der Hintergrund bei diesem Experiment sehr hoch ist, und keine Anreicherung von E(Z) an Kalbsthymus-Histonen detektiert werden kann.

#### 4.5.4.4 UNTERSUCHUNG DER BINDUNG AN H3-PEPTIDE

Obwohl E(Z) keine Chromodomäne wie Su(var)3-9 besitzt, könnte es doch an sein eigenes, methyliertes Substrat bevorzugt binden, wie dies für Su(var)3-9 beobachtet worden war (siehe Kapitel 4.2.5).

Aus diesem Grunde wurden verschiedene Peptide an *beads*, nämlich das unmodifizierte "wildtyp" Peptid (AA 1-19), das an K4 dimethylierte Peptid und das an K9 dimethylierte Peptid, zusammen mit von Flag *beads* eluiertem E(Z) sowie E(Z)+p55 inkubiert und auf einem Western Blot untersucht, ob eine bevorzugte Bindung von E(Z) an eines dieser Peptide auftritt. Das Ergebnis ist in Abb. 73 zu sehen.



**Abb. 73: Bindung von E(Z) und E(Z)+p55 an verschiedene H3-Peptide.** Agarosebeads, die entweder 20 µg wt H3-Peptid (AA 1-19) bzw. an K4 dimethyliertes Peptid bzw. an K9 dimethyliertes Peptid trugen, wurden mit BSA blockiert und anschließend in einem Gesamtvolumen von 300 µl BC100 mit über Flag-*beads* gereinigtem E(Z) bzw. E(Z)+p55 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit BC300/0,1%NP40 wurde mit saurem Elutionspuffer eluiert und dieses Eluat auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag-Antikörper. Der aufgetragene Input ist 20% des verwendeten Materials.

Zunächst einmal fällt auf, dass das Western Blot-Signal für E(Z) in der Input-Spur deutlich, an den *beads* aber kaum zu sehen ist. Das heißt, die Bindung von E(Z) an Peptide scheint generell äußerst schwach zu sein. Am besten scheint E(Z) bzw. das mit p55 coexprimierte E(Z) an das wt Peptid zu binden. Das Signal für die anderen Peptide ist in allen anderen Fällen viel schwächer bzw. gar nicht zu sehen. Die schwache Bindung an das unmodifizierte Peptid könnte daher rühren, dass E(Z) an sein Substrat bindet.

Abschließend lässt sich also sagen, dass E(Z) keine besondere Affinität zu einer Modifikation aus dem H3-*tail* zu haben scheint.

#### 4.5.5 INTERAKTIONSTUDIEN

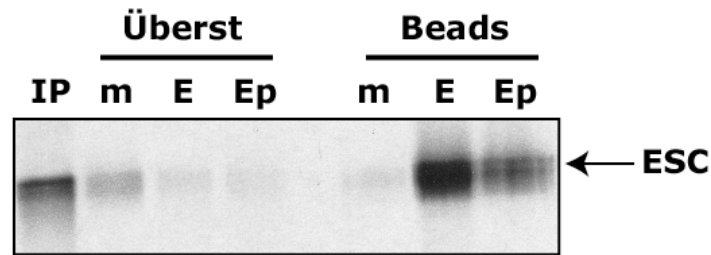
Zum Zeitpunkt der Publikation von Tie (Tie et al., 2001) war das Protein SU(Z)12 und dessen mögliche Präsenz in PcG-Komplexen noch unbekannt gewesen. Außerdem wurden deren Interaktionsstudien meist mit Proteinen aus *Drosophila* Embryoextrakten durchgeführt. Dabei könnte es zu Co-Immunpräzipitationen der verschiedenen Komponenten gekommen sein, die in einem solchen Extrakt nicht auszuschließen sind. Aus diesen Gründen sollten die Interaktionen in einem anderen System untersucht werden. Für die meisten dieser Studien wurden im Baculosystem coexprimierte Proteine verwendet. Dabei wurden meist jeweils zwei der E(Z)-Komplex-Proteine im Baculosystem coexprimiert. Ein Protein wurde durch seinen *tag* an entsprechende *beads* gebunden, und das andere Protein, was nur über das erste Protein an die *beads* binden kann, wurde alsdann im Western Blot detektiert. Auf diese Art kann man Rückschlüsse auf die Interaktionen zwischen den Proteinen erhalten.

Alle Experimente wurden wie in Kapitel 3.2.17 beschrieben durchgeführt.

##### 4.5.5.1 ESC BINDET AN E(Z)

ESC wurde als *in vitro* translatiertes, <sup>35</sup>S-markiertes Protein hergestellt (siehe Kapitel 3.2.16), da der Virus noch nicht fertiggestellt war und aus diesem Grund keine Coinfektionen von ESC + X durchgeführt werden konnten. Extrakte aus Sf9-Zellen, die entweder mit dem E(Z)-Virus allein oder mit E(Z)- und p55-Virus infiziert worden waren (Herstellung des Extraktes: siehe Kapitel 3.2.14), wurden zunächst mit anti-Flag-*beads* (Sigma) inkubiert, um E(Z) über seinen Flag-*tag* an die *beads* zu binden. Anschließend wurde das *in vitro* translatierte ESC auf die *beads* gegeben, gewaschen und die Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Auf einem Röntgenfilm konnte das markierte ESC, welches an E(Z) bzw. E(Z)+p55 gebunden hatte, detektiert werden (siehe Abb. 74).

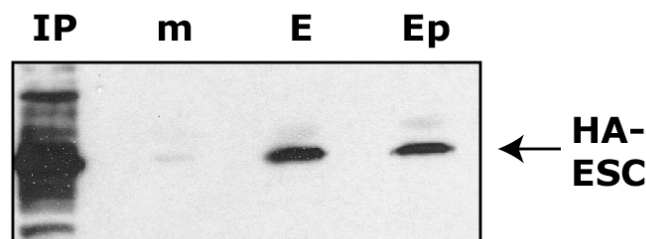




**Abb. 74: Bindung von *in vitro* translatiertem ESC an E(Z).** ESC wurde *in vitro* translatiert. 200  $\mu$ l Extrakt aus Flag-E(Z) bzw. Flag-E(Z)+myc-p55 infizierten Sf9-Zellen wurden mit Flag-beads inkubiert. Nach der Bindung von E(Z)/E(Z)+p55 an die Beads wurde das IVT ESC dazugegeben (Gesamtvolumen 300  $\mu$ l), inkubiert, fünfmal mit BC100/0,1%NP40 gewaschen und das gebundene Protein durch Aufkochen der beads in Ladepuffer eluiert. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Gel geladen, welches mit Coomassie gefärbt, getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert wurde. Der Input betrug 20% des eingesetzten ESC. Auf das Gel wurden eben falls die "angereicherten" Überstände der ESC-Bindungsreaktion aufgetragen. "Mock" bezeichnet die unspezifische Bindung von ESC an die Flag-beads, "E" bedeutet E(Z)-Extrakt, "Ep" E(Z)+p55-Extrakt.

Wie man in Abb. 74 erkennen kann, wurde ESC sowohl von E(Z) als auch von E(Z)+p55 an den beads gebunden. Passend dazu nimmt das Signal für ESC in den Überständen ab, je mehr Protein an die beads gebunden hatte. Die Mock-Reaktion zeigt nur eine sehr schwache unspezifische Bindung von ESC an die Flag-beads.

Die Bindung von ESC an E(Z) konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden: bakteriell exprimiertes HA-ESC wurde als Ganzzell-Lysat zu E(Z) bzw. E(Z)+p55 an beads gegeben, gewaschen, mit Ladepuffer eluiert und in einem Western Blot detektiert.



**Abb. 75: Bindung von HA-ESC an Flag-E(Z).** Aus 250  $\mu$ l Sf9-Extrakt wurde E(Z) bzw. E(Z)+p55 an 50  $\mu$ l Flag-beads gebunden, mit 15  $\mu$ l bakteriell exprimiertem HA-ESC versetzt, inkubiert, mit BC100/0,1%NP40 gewaschen und mit SDS-Ladepuffer "eluiert". Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. HA-ESC wurde im Western Blot mit anti-HA-Antikörper detektiert. "Mock" bezeichnet Extrakt aus nicht infizierten Sf9-Zellen, der ebenfalls an die beads "gebunden" wurde und mit HA-ESC versetzt wurde. Die Inputspur enthält 30% des Materials an ESC, das in die Bindungsreaktionen eingesetzt wurde.

Abb. 75 zeigt das gleiche Ergebnis wie Abb. 74: HA-ESC bindet an E(Z) und E(Z)+p55, der unspezifische Hintergrund ("mock") ist gering.

Man kann also beobachten, dass ESC als *in vitro* translatiertes und auch als bakteriell exprimiertes Protein spezifisch an E(Z) bindet. Die Anwesenheit von p55 scheint hier weder zu stören noch die Bindung zu verbessern. Nach den vorgeschlagenen Interaktionen (Tie et al., 2001) ist es wahrscheinlich, dass sich p55 und ESC nicht "berühren"; E(Z) als das verbindende Protein zwischen den beiden kann demnach ohne Probleme mehrere andere Proteine kontaktieren.

#### **4.5.5.2 p55 BINDET AN E(Z), RPD3 SOWIE AN SU(Z)12**

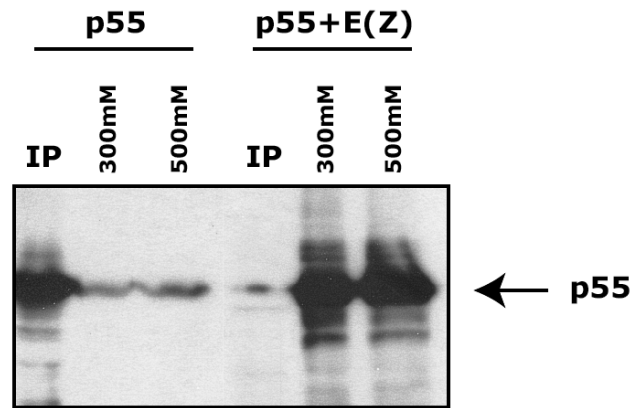
Von p55 ist bekannt, dass es an RPD3 bindet (Tyler et al., 1996). Nach Tie (Tie et al., 2001) interagiert es auch mit E(Z).

Die Interaktionen von p55 wurden mit Hilfe von Extrakten bestimmt, in denen entweder p55 allein exprimiert wurde oder gleichzeitig zusammen mit jeweils einem anderen Protein. Dieses andere Protein war entweder Flag-E(Z), Flag-RPD3 oder his-SU(Z)12. Durch Bindung des "anderen" Proteins an die passenden *beads* und Detektion von p55, welches wiederum an diese Proteine gebunden hat, kann man Rückschlüsse auf die Interaktionen zwischen p55 und den anderen Proteinen erhalten.

Wie schon im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, wurden die Extrakte, welche p55 sowie ein anderes Protein überexprimiert hatten, mit Flag- bzw. Talon*beads* inkubiert. Als Hintergrundkontrolle wurden die Extrakte verwendet, die nur myc-p55 als überexprimiertes Protein enthielten. Auf diese Art und Weise kann festgestellt werden, ob p55 unspezifisch an Flag-/Talon*beads* bindet.

Nach dem Waschen wurden die an *beads* gebundenen Proteine durch Erhitzen in SDS-Ladepuffer abgelöst. P55 konnte auf den Western Blots mit einem anti-p55-Antikörper nachgewiesen werden.

Zunächst das Ergebnis für p55/E(Z):



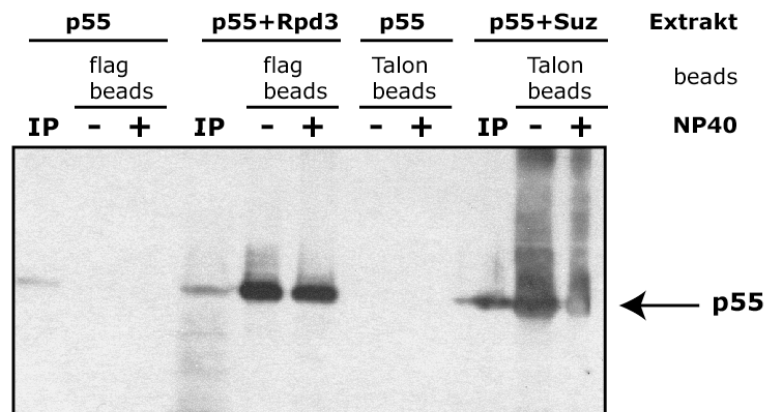
**Abb. 76: P55 bindet an E(Z).** 150  $\mu$ l Extrakt aus Baculo (p55 oder p55+E(Z)) wurde mit 50  $\mu$ l Flag *beads* in 300  $\mu$ l BC100 für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Waschen erfolgte mit BC300 oder BC500 (incl. 0,1%NP40). Die durch SDS-Ladepuffer abgelösten Proteine wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. P55 wurde mit anti-p55-Antikörper detektiert. Die Input-Spur enthält jeweils 7% des eingesetzten Materials.

In Abb. 76 ist jeweils der Input, also der ungereinigte Baculo-Extrakt, für p55 und für p55/E(Z) zu sehen. Zur Optimierung der Versuchsanordnung wurden zwei verschiedene Bedingungen für die Waschschrte getestet: 300 und 500 mM KCl. Wie aus Abb. 76 ersichtlich, besteht kein erkennbarer Vorteil darin, die Salzkonzentration zu erhöhen und die Waschschrte dadurch stringenter zu machen, da die beiden Spuren jeweils gleich aussehen.

p55 bindet in einem geringen Ausmaß unspezifisch an die Flag-*beads*. Da das Signal für den p55/E(Z)-Extrakt aber viel stärker ist, lässt sich daraus ableiten, dass p55 spezifisch an E(Z) bindet.

Des weiteren wurde die Bindung von p55 an RPD3 und SU(Z)12 untersucht. Wiederum wurden in Baculo coexprimierte Proteine verwendet. Als Vergleich diente Baculo-Extrakt mit p55 alleine. Die Durchführung der Bindungsversuche erfolgte wie oben angegeben (siehe auch Kapitel 3.2.17). Auf dem Western Blot wurde p55 detektiert.

Wie in Abb. 77 zu sehen, bindet p55 nicht unspezifisch an die Flag- bzw. Talon*beads*. Es ist keinerlei Hintergrundbande zu sehen. Diesmal wurde außerdem NP40 in einer Konzentration von 0,5% der Bindungsreaktion zugesetzt (+) bzw. nicht zugesetzt (-), um die Reaktionsbedingungen weiter auszutesten. Auch hier ist kaum ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Waschbedingungen zu erkennen.



**Abb. 77: Bindung von p55 an RPD3 und SU(Z)12.** 100  $\mu$ l Extrakt aus Baculo (p55 oder p55+RPD3 oder p55+SU(Z)12) wurde mit 50  $\mu$ l Flag-beads in 1 ml BC100 für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. In die Bindungsreaktion wurde zusätzlich 0,5% NP40 gegeben (+) oder nicht (-). Das Waschen erfolgte mit BC300 (incl. 0,1%NP40). Die durch SDS-Ladepuffer abgelösten Proteine wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. p55 wurde mit anti-p55-Antikörper detektiert. Die Input-Spur enthält jeweils 10% des eingesetzten Materials.

Wie aus Abb. 77 eindeutig ersichtlich ist, bindet p55 an RPD3. Diese Interaktion war schon von anderen Komplexen her bekannt, ist aber als eine Kontrolle der hier verwendeten Versuchsbedingungen anzusehen. Auch die Bindung an SU(Z)12 ist klar erkennbar, obwohl hier noch weitere Proteine auf dem Blot detektiert wurden und die Spuren sehr schmierig aussehen.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass p55 sowohl an E(Z) als auch an RPD3 und SU(Z)12 bindet.

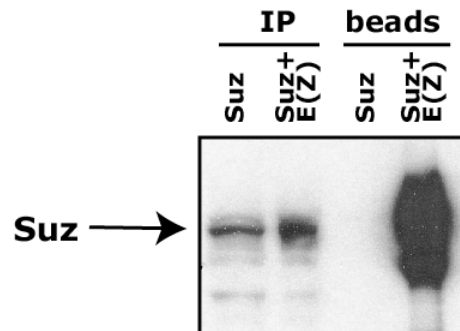
#### 4.5.5.3 SU(Z)12 BINDET AN E(Z) UND RPD3

Von SU(Z)12 ist noch relativ wenig bekannt. Speziell die Interaktionen von SU(Z)12 mit den anderen Komponenten des E(Z)-Komplexes wurden noch nicht untersucht.

Wie oben im Kapitel 4.5.5.2 schon dargestellt, bindet p55 an SU(Z)12. SU(Z)12 wurde in diesem Experiment über den his-tag an Talonbeads gebunden, und p55 wurde detektiert. Das "umgekehrte" Experiment, p55 über den 9E10-Antikörper an beads zu binden und SU(Z)12 zu detektieren, wurde zweimal durchgeführt, jedoch konnte nur eine schwache Bindung von SU(Z)12 an p55 festgestellt werden.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob SU(Z)12 direkt an E(Z) bindet. Die beiden Proteine wurden in Baculo coexprimiert (siehe Kapitel 3.2.14), und wie oben angegeben, wurde eines der beiden Proteine an beads gebunden und das andere auf dem

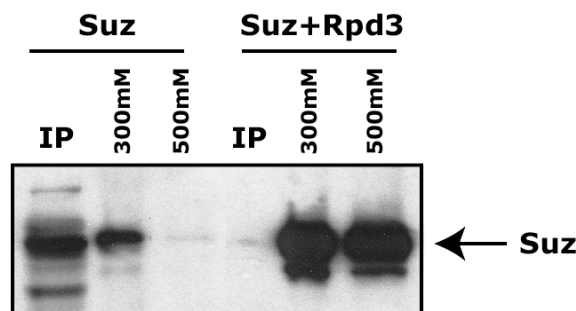
Western Blot detektiert (siehe Kapitel 3.2.17). In diesem Fall wurde E(Z) an die Flag-*beads* gebunden, und auf dem Blot wurde SU(Z)12 mittels eines anti-SU(Z)12-Antikörpers sichtbar gemacht.



**Abb. 78: SU(Z)12 bindet an E(Z).** 80  $\mu$ l Extrakt aus Baculo (SU(Z)12 oder SU(Z)12+E(Z)) wurde mit 60  $\mu$ l Flag-*beads* in 1 ml BC100 für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Waschen erfolgte mit BC300 (incl. 0,1%NP40). Die durch SDS-Ladepuffer abgelösten Proteine wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. SU(Z)12 wurde mit anti-SU(Z)12-Antikörper detektiert. Die Input-Spur enthält jeweils 10% des eingesetzten Materials.

Wie in Abb. 78 zu sehen, bindet SU(Z)12 vergleichsweise stark an E(Z). Es wurde keine unspezifische Bindung von SU(Z)12 an die Flag-*beads* beobachtet.

Außerdem wurde die Bindung von SU(Z)12 and RPD3 untersucht. Die coexprimierten Proteine wurden wie in Kapitel 3.2.17 bzw. eben beschrieben an *beads* gebunden, und mit Hilfe des anti-SU(Z)12-Antikörpers wurde festgestellt, ob SU(Z)12 mit RPD3 interagiert. RPD3 wurde als Flag-*getagtes* Protein eingesetzt und an Flag-*beads* gebunden. Der Waschschrift erfolgte mit zwei verschiedenen Puffern, die 300 bzw. 500 mM KCl enthielten. Abb. 79 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.



**Abb. 79: SU(Z)12 bindet an RPD3.** 150  $\mu$ l Extrakt aus Baculo (SU(Z)12 oder SU(Z)12+FlagRPD3) wurde mit 50  $\mu$ l Flag-*beads* in 300  $\mu$ l BC100 für 2,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Waschen erfolgte mit BC300 oder BC500 (incl. 0,1%NP40). Die durch SDS-Ladepuffer abgelösten Proteine wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. P55 wurde mit anti-p55-Antikörper detektiert. Die Input-Spur enthält jeweils 7% des eingesetzten Materials.

Zunächst einmal fällt in Abb. 79 auf, dass die unspezifische Bindung von SU(Z)12 an die Flag-*beads* mit einem Waschpuffer, welcher 500 mM statt 300 mM KCl enthält, drastisch reduziert werden kann. Bei 500 mM ist fast kein Hintergrundsignal mehr zu sehen. Die Bindung von SU(Z)12 an RPD3 scheint recht stark zu sein; der Waschpuffer mit höherer Salzkonzentration kann dieser Interaktion nichts anhaben. Des weiteren ist der Input des Extaktes "SU(Z)12+RPD3" viel geringer als derjenige des Extraktes "SU(Z)12". Dies könnte dadurch verursacht sein, dass bei einer Coexpression von zwei Proteinen im Baculosystem die Menge von SU(Z)12 stärker zurückgeht als erwartet, obwohl die Extrakte parallel hergestellt wurden und ihre absolute Proteinmenge identisch war. Um so eindeutiger ist das Signal von SU(Z)12 im Blot, da es ja trotz der geringeren eingesetzten Menge von SU(Z)12 um ein vielfaches stärker ist als die unspezifische Bindung des Proteins an die Flag-*beads*.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SU(Z)12 sowohl an E(Z) als auch an RPD3 bindet. Die Interaktion mit p55 wurde in Kapitel 4.5.5.2 beschrieben, konnte aber in einer "umgekehrten" Versuchsanordnung (p55 an *beads*, SU(Z)12 detektiert) nicht bestätigt werden.

#### 4.5.5.4 SU(Z)12 BINDET NICHT AN ESC UND ESCL

Des weiteren sollte untersucht werden, ob SU(Z)12 auch an ESC und ESCL bindet. Die Herstellung der Viren für ESC und ESCL Probleme erwies sich als zeitraubender als gedacht. Die Interaktion mit ESC konnte nur am bakteriell hergestellten HA-ESC untersucht werden, da zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit der Virus noch nicht fertig gestellt war. Der Virus für ESCL stand schon zur Verfügung, allerdings wurde noch keine Coexpression von SU(Z)12 und ESCL durchgeführt. Im Interaktionsversuch wurden daher Baculo-Extrakte eingesetzt, die das jeweilige Protein einzeln überexprimierten. SU(Z)12-Extrakt wurde also einerseits zu HA-*beads* gegeben, die HA-ESC als bakteriell hergestelltes Protein gebunden hatten. Als Hintergrundkontrolle dienten HA-*Beads* ohne ESC.

Zur Untersuchung der Interaktion mit ESCL wurden der ESCL-Extrakt und der SU(Z)12-Extrakt gemischt und die HA-*beads* daraufgegeben. Hintergrundkontrolle war in diesem Fall der SU(Z)12-Extrakt ohne ESCL auf HA-*beads*. Ansonsten wurden beide Versuche analog zu Kapitel 3.2.17 durchgeführt.



**Abb. 80: SU(Z)12 zeigt nur schwache Bindung an ESC und keine Bindung an ESCL.** *Links:* Bindung an ESC. Bakteriell exprimiertes HA-ESC wurde an HA-beads gebunden. Dann wurde 30  $\mu$ l SU(Z)12-Baculoextrakt dazugegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit BC300/0,1%NP40 wurden die Proben auf einem 10%SDS-Gel aufgetrennt. Für die Mock-Reaktion wurde SU(Z)12-Baculoextrakt auf HA-beads (ohne gebundenes ESC) gegeben. Der Input von SU(Z)12 beträgt 15% des für die Bindungsreaktion eingesetzten Materials. *Rechts:* Bindung an ESCL. 60  $\mu$ l mit BSA blockierte HA-beads wurden entweder mit 50  $\mu$ l SU(Z)12-Baculoextrakt allein oder mit 50  $\mu$ l SU(Z)12-Baculoextrakt + 100  $\mu$ l ESCL-Baculoextrakt in einem Gesamtvolumen von 1 ml BC100 für 2 Stunden inkubiert. Waschen und Probenauftrag erfolgte wie weiter oben angegeben. Der Input beträgt hier 10% der Bindungsreaktion. Die Detektion erfolgte in beiden Fällen mit anti-SU(Z)12-Antikörper.

Abb. 80 links zeigt den Versuch mit ESC. SU(Z)12 scheint nicht unspezifisch an die HA-beads zu binden. In der 3. Spur, die die eigentliche Bindung zeigen sollte, ist nur ein ganz schwaches Signal auf dem Blot zu sehen. Wenn überhaupt, liegt also nur eine sehr schwache Bindung von SU(Z)12 an ESC vor. Vor allem in Anbetracht der Stärke des Signals auf anderen Blots, die mit dem anti-SU(Z)12-Antikörper entwickelt wurden, lässt dieses Ergebnis nicht die Schlussfolgerung zu, dass SU(Z)12 an ESC bindet.

In Abb. 80 rechts ist der Western Blot für ESCL zu sehen. SU(Z)12 zeigt in diesem Fall unspezifische Bindung an die HA-beads, jedoch ist kein Signal in der letzten Spur zu sehen. Das bedeutet, dass SU(Z)12, zumindest unter diesen Versuchsbedingungen, nicht an ESCL bindet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass SU(Z)12 in den hier dargestellten Versuchen keine Interaktion mit ESC bzw. ESCL zeigt.

#### 4.5.5.5 ZUSAMMENFASSUNG DER INTERAKTIONEN

Aus den vorhergegangenen Kapiteln ergibt sich folgendes Bild:

- P55 bindet an E(Z), RPD3 und SU(Z)12
- ESC bindet an E(Z)
- SU(Z)12 bindet an E(Z) und RPD3

Noch nicht getestete Interaktionen bzw. Experimente mit nicht auswertbaren Ergebnissen sind: RPD3-E(Z), RPD3-ESC, sowie die Interaktionen von ESCL.

Im wesentlichen konnte das Bild bestätigt werden, welches durch Tie et al. (Tie et al., 2001) publiziert worden war. Kapitel 5.2.6 in der Diskussion zeigt eine Zusammenfassung der bestätigten Interaktionen sowie einen Vorschlag, wie der Komplex, der auch SU(Z)12 enthält, möglicherweise aussehen könnte.

#### 4.5.6 LUCIFERASE-ASSAY

E(Z) als Mitglied der Polycomb-Gruppe ist verantwortlich für die Erhaltung des reprimierten Zustandes bestimmter Gene. Um festzustellen, ob E(Z) auch in einem Testsystem, welches mehr der *in vivo*-Situation ähnelt, einen repressiven Effekt hat, wurde der sogenannte "Luciferase-Assay" verwendet.

Hierbei werden *Drosophila* Zellen mit einem Enzym, der Firefly Luciferase, transfiziert. Nach zwei Tagen Expression kann man direkt aus dem Zellextrakt bestimmen, wie viel Enzym vorhanden ist, indem man die Aktivität des Enzyms in einer Biolumineszenzreaktion bei 562 nm misst. Führt man gleichzeitig mit dem Luciferase-Plasmid ein Plasmid in die Zellen ein, welches für das potentiell aktivierende oder reprimierende Protein kodiert, so kann man den Effekt auf die Enzymreaktion messen. Das Protein muss allerdings als Fusionsprotein transfiziert werden, um dessen Bindung an das Luciferase-Plasmid zu gewährleisten.

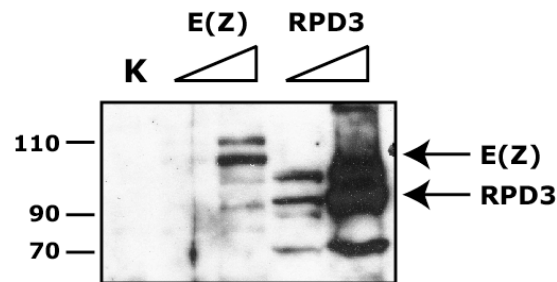
Zu diesem Zweck wurde das zu untersuchende Protein E(Z) als Gal4-DBD-(Gal4-DNA-Bindungs-Domäne)-Fusionsprotein kloniert, indem es in den Vektor pActGal4(1-147) (Fisher et al., 1996) legiert wurde. E(Z) wird dann in Zellen als Protein exprimiert, welches an die ersten 147 Aminosäuren der Gal4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert ist. Es steht unter der Kontrolle des Actin-Promoters und wird konstitutiv exprimiert.

Die Firefly-Luciferase wird durch das Plasmid G<sub>5</sub>DE<sub>5</sub>tkLuc (Chen et al., 1998), abgeleitet aus dem pGL3-Plasmid von Promega, codiert. Dieses Plasmid besitzt eine 5fache Bindungsstelle für Gal4, die UAS (*Upstream Activation Site*), und kann daher von Gal4-Fusionsproteinen gebunden werden. Zwischen den Gal4-Bindungsstellen und der Luciferase-cDNA befinden sich zusätzliche Bindungsstellen für Dorsal und Twist (siehe weiter unten).



Zusätzlich zu diesen beiden Konstrukten muss noch ein weiteres Plasmid, die Renilla Luciferase, in die Zellen gebracht werden, um eine Normalisation zu ermöglichen. Vor der Renilla-Luciferase-cDNA liegt auf dem Plasmid die Promotorregion der Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase (TK). Dieser Promotor bewirkt eine gemäßigte, konstitutive Expression.

Zunächst einmal sollte jedoch festgestellt werden, ob *Drosophila* SL2-Zellen das Gal4-E(Z)-Fusionsprotein überhaupt exprimieren. Zu diesem Zweck wurden SL2-Zellen nur mit dem Gal4-E(Z)-Vektor transfiziert (siehe Kapitel 3.2.11), und nach Herstellung eines Ganzzellextraktes wurde auf einem Western Blot untersucht, ob Gal4-E(Z) exprimiert wurde. Als Vergleich diente Gal4-RPD3, von dem bekannt war, dass es in SL2-Zellen exprimiert wird. Der mit anti-Gal4-Antikörper entwickelte Western Blot ist in Abb. 81 zu sehen.

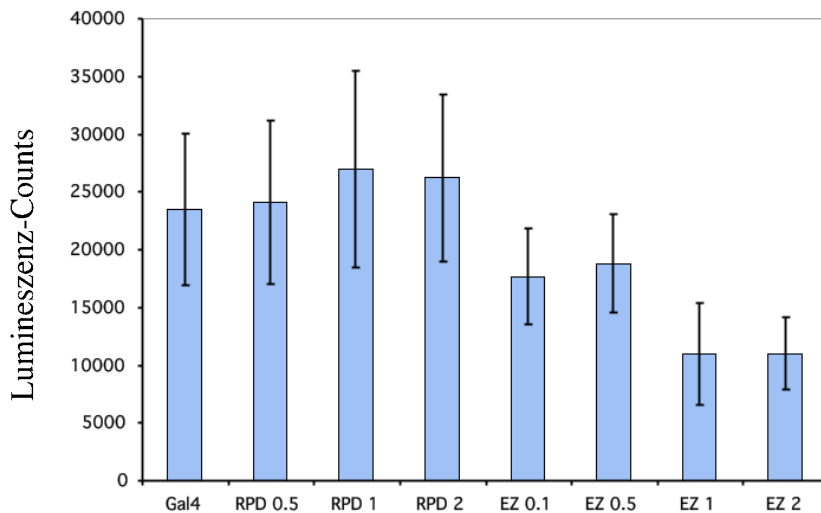


**Abb. 81: Expression von Gal4-RPD3 und Gal4-E(Z) in SL2 Zellen.**  $1,5 \cdot 10^6$  SL2-Zellen wurden je well in einer 6-well-Platte ausgesät. Nach einem Tag wurden sie mit  $0,5 \mu\text{g}$  DNA - entweder Gal4-RPD3 oder Gal4-E(Z) - transfiziert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen in  $100 \mu\text{l}$  BC300/0,1%NP40 aufgenommen und ein Ganzzellextrakt hergestellt. Auf ein 10% SDS-Gel wurden jeweils  $10 \mu\text{l}$  dieses Extraktes geladen und in einem Western Blot mit anti-Gal4-Antikörper detektiert. Links ist der Größenstandard in kDa angegeben.

Beide Proteine zeigen auf dem Western Blot ein Signal. RPD3 wird zu einem größeren Ausmaß exprimiert als E(Z), aber auch bei letzterem ist ein deutliches Signal zu sehen. Die Transfektion in die SL2-Zellen bewirkt also die gewünschte Produktion eines Proteins.

Im Vergleich zu Sf4 und KC-Zellen ist die Expression in SL2-Zellen stärker (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für die weiteren Experimente SL2-Zellen verwendet.

SL2-Zellen und ebenso Sf4-Zellen wurden also mit einer Kombination aus den für einen Luciferase-Assay erforderlichen Plasmiden transfiziert und anschließend wurde die Luciferase-Aktivität gemessen (Durchführung siehe Kapitel 3.2.31). In Abb. 82 ist ein Ergebnis abgebildet, welches für repräsentativ für mehrere Experimente dieser Art ist.



**Abb. 82: Luciferase-Assay mit RPD3 und E(Z).**  $1,5 \cdot 10^6$  SL2-Zellen wurden pro *well* in einer 6-*well*-Platte ausgesät. Für diese Transfektion wurden Dreifachansätze pipettiert. Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.31 beschrieben mit insgesamt  $2 \mu\text{g}$  DNA transfiziert. Dabei wurden steigende Mengen an Gal4-RPD- bzw. Gal4-E(Z)-Plasmid eingesetzt (Angabe in  $\mu\text{g}$ , siehe Legende unter dem Diagramm). Nach zwei Tagen wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt und die Aktivität der Luciferasen im Luminometer vermessen.

In die Zellen wurden Gal4-E(Z) sowie als Vergleich Gal4-RPD3 transfiziert. Für RPD3 wurde ein repressiver Effekt publiziert (Chen et al., 1999b), der sich jedoch in den meisten Experimenten nicht reproduzieren ließ. Wie in Abb. 82 zu sehen, sinkt die Aktivität der Luciferase bei den RPD3-Proben im Vergleich zum "leeren" Gal4-Vektor nicht ab, sondern steigt eher noch an.

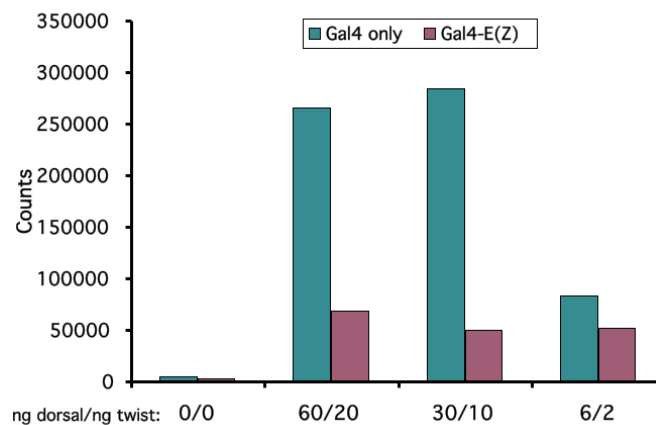
Im Gegensatz dazu wurde bei E(Z)-transfizierten Zellen immer ein repressiver Effekt beobachtet, der ca. die Größenordnung von 2 (Reduktion der Luciferase-Aktivität auf 50%) hatte.

Als problematisch erwiesen sich die großen Fehler (angegeben als SEM = standard error of the mean), mit denen die Experimente konstant behaftet waren.

Dieses Problem konnte schließlich dadurch gelöst werden, dass die 6-*well*-Platten, die für die Inkubation der Zellen im  $26^\circ\text{C}$ -Schrank verwendet wurden, mit Plastikfilm versiegelt wurden, so dass eine Verdunstung des Medium verhindert wurde. Durch eine unterschiedlich große Verdunstung sogar in benachbart liegenden *wells* wurden unterschiedliche Wachstumsbedingungen für die Zellen generiert, welche schließlich verantwortlich waren für die große Variation der Luciferase-Werte.

Da auch die nicht mit einem Repressor transfizierten Zellen Werte für die Luciferase-Aktivität lieferten, die nicht besonders hoch waren, wurde versucht, das ganze System zu

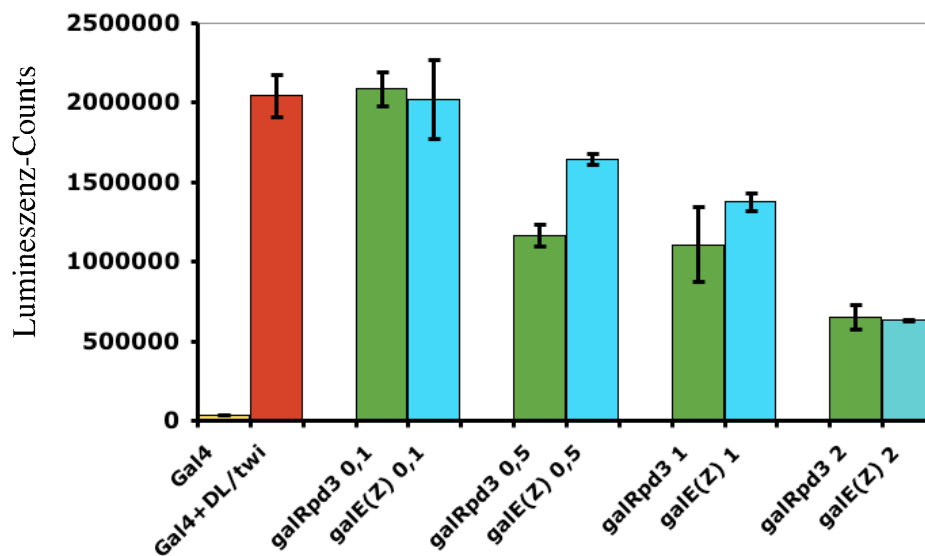
aktivieren. In einem aktivierten System, so die Überlegung, würde man vielleicht besser einen reprimierenden Effekt beobachten können, als in einem schwach aktivierten System. Als Aktivatoren wurden Dorsal und Twist verwendet, zwei Proteine, die zusammen die Transkription in SL2-Zellen aktivieren können (Shirokawa and Courey, 1997). In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob sich durch die Cotransfektion von Dorsal und Twist zusammen mit dem leeren Gal4-Vektor bzw. Gal4-E(Z) die Expression der Luciferasen tatsächlich erhöht, und welche Mengen von den Dorsal-/Twist-Vektoren dazu erforderlich waren. Die Verwendung von Dorsal/ Twist im Verhältnis 3:1 wurde aus (Shirokawa and Courey, 1997) entnommen und beibehalten. Abb. 83 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.



**Abb. 83: Titration von Dorsal und Twist.** In SL2-Zellen wurde jeweils 2 µg Gal4-Vektor bzw. 2 µg Gal4-E(Z) und die üblichen Mengen Renilla/Firefly-Luciferase transfiziert. Zusätzlich wurden verschiedene Mengen Dorsal- und Twist-Plasmide (siehe Legende oben) cotransfiziert. Nach zwei Tagen wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt.

Je mehr Dorsal/ Twist cotransfiziert wurden, desto höher ist die Aktivität der Luciferase. Im Vergleich zur Probe, welche nicht mit Dorsal/ Twist transfiziert worden war, erkennt man eine starke Aktivierung, die ca. den Wert 50 fach hat. Auch die Gal4-E(Z)-Proben zeigen eine Aktivierung, die jedoch deutlich geringer ausfällt. Der repressive Effekt von E(Z) ist also umso klarer, je "aktiver" das System ist.

Im nächsten Experiment wurde Gal4-E(Z) in das aktivierte System titriert. Hierbei wurden 30 bzw. 10 ng von Dorsal/ Twist mit steigenden Mengen Gal4-RPD3 und Gal4-E(Z) cotransfiziert.



**Abb. 84: Luciferase-Assay im aktivierten System mit RPD3 und E(Z).** 100 ng Renilla- und Firefly-Luciferase wurden zusammen mit 30 ng Dorsal und 10 ng Twist transfiziert. Zusätzlich wurden transfiziert: 2 µg Gal4-Vektor (rote Säule) und steigende Mengen an Gal4-RPD3 (grün) sowie Gal4-E(Z) (türkis). Die erste (gelbe) Säule stellt das nicht aktivierte System dar: hier wurde nur der Gal4-Vektor ohne Dorsal/Twist in die Zellen transfiziert. Roter Balken: Gal4-Vektor + Dorsal/Twist. Grün: RPD3. Türkis: E(Z). Fehlerbalken: SEM. Ansatz in Doppelproben. Die Zahlen neben dem Proteinamen geben die µg DNA an, die transfiziert wurden.

In Abb. 84 ist noch einmal deutlich zu sehen, dass das System durch geringe Mengen Dorsal/Twist aktiviert wird (vergleiche den roten = aktivierten Balken mit dem gelben). Die Zugabe von 2 µg RPD3 bzw. E(Z) bewirkt ein ca. 4faches Absinken der Luciferase-Aktivität. Zusammen mit den nun viel kleineren Fehlerbalken (angegeben als SEM) kann man nun eindeutig auf einen repressiven Effekt von RPD3 und E(Z) im Luciferase-Assay schließen.

Dieser Effekt muss jedoch noch auf die Enzymaktivität von E(Z) zurückgeführt werden. Es muss also klar werden, dass nur das aktive Enzym einen solchen Effekt hervorrufen kann. Zu diesem Zweck wurde Gal4-E(Z) in der SET-Domäne punktmuiert, so dass das Enzym nicht mehr aktiv ist (Rea et al., 2000).

Die Klonierungen dauerten zum Zeitpunkt der Abfassung noch an.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 SU(VAR)3-9

#### 5.1.1 GERINGE AKTIVITÄT DES ENZYMS AUS EINER STABILEN ZELLINIE

Das in stabil transfizierten *Drosophila*-Zellen exprimierte Enzym Su(var)3-9 zeigt, wie in Kapitel 4.3.3 zu sehen, kaum Aktivität. Die Expression des Proteins erfolgt nach Induktion mit CuSO<sub>4</sub>, da es sich unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promoters befindet. Es könnte sein, dass die Induktion für die Zellen Streß bedeutet, und dass die Aktivität von Su(var)3-9 aus diesem Grunde abnimmt. Eine ähnliche Streßsituation könnte vorliegen, wenn man die Embryos, die *myc-getagtes* Su(var)3-9 unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromoters exprimieren, durch Wärme induziert. In einem Experiment, welches die ideale Länge des 37°C-Hitzeschocks für die *Drosophila*-Embryos festlegen sollte, wurde ein abnehmende Enzymaktivität mit zunehmender Hitzeschock-Länge beobachtet (Daten nicht gezeigt). Wurde gar kein Hitzeschock gegeben, so war die Enzymaktivität am wenigsten beeinträchtigt. Bei 15 min, der minimalen Länge des Hitzeschocks, war die Aktivität bedeutend höher als bei einer Dauer von 2 Stunden. Das heisst, dass nicht nur die Proteinmenge allein für die Höhe der Aktivität entscheidend ist, sondern auch die Situation von Bedeutung ist, in der das Enzym synthetisiert oder eventuell modifiziert wird.

#### 5.1.2 DI- UND TRIMETHYLIERUNG

Wie schon erwähnt, katalysiert Su(var)3-9 die Methylierung von Lysin 9 im Histon H3. Verschiedentlich wurde berichtet, dass Su(var)3-9 trimethylieren kann (Lachner et al., 2003). Su(var)3-9, welches in unserem Labor rekombinant in *E. coli* exprimiert wurde, kann jedoch nur dimethylieren. Dies wurde einerseits beobachtet, als dem Enzym ein dimethyliertes H3-Peptid als Substrat zur Verfügung gestellt wurde und kein Einbau von Methylgruppen stattfand. Andererseits wurde dieses Ergebnis bestätigt durch massenspektrometrische Analyse: Su(var)3-9 fügt zuerst eine Methylgruppe, und dann in einem zweiten, nicht direkt anschließenden Schritt eine zweite Methylgruppe an ein H3-Peptid (Eskeland et al., 2004). Einbau einer dritten Methylgruppe erfolgt nur bei sehr hohen Substratkonzentrationen und langen Reaktionszeiten, und die Ausbeuten liegen unter 1%. Auch mit einem kompletten Histon H3 dimethyliert Su(var)3-9 nur. Su(var)3-9 kann in unseren Händen erst trimethylieren, wenn es durch eine Mutation der Aminosäure

557 (H557R) hyperaktiviert wurde (Rea et al., 2000). Diese Mutation ersetzt innerhalb der katalytisch wichtigen Sequenz „NHS“ ein stark konserviertes Histidin durch ein Arginin.

### 5.1.3 INTERAKTIONEN VON SU(VAR)3-9

In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass die Histonmethyltransferase Su(var)3-9 nach einer Immunpräzipitation aus einem *Drosophila*-Kernextrakt zusammen mit einer Histondeacetylase-Aktivität assoziiert ist. Diese Aktivität konnte als HDAC1 identifiziert werden (siehe Kapitel 4.1.3). Das zeitlich koordinierte Zusammenspiel der beiden Enzyme erlaubt die Deacetylierung eines prä-acetylierten H3-K9 und anschließende Methylierung des „freigewordenen“ Lysins.

Auf diese Art und Weise könnte das Abschalten eines Gens und die Stilllegung einer bestimmten Region des Genoms vor sich gehen. Als Ergebnis würde Euchromatin mit acetylierten Histonen in Heterochromatin verwandelt werden (siehe auch Kapitel 5.1.4 sowie Abb. 85).

In genetischen Studien war gezeigt worden, dass die Lokalisation von HP1 von Deacetylasen abhängt (Nakayama et al., 2001). Dies würde sehr gut in das vorliegende Modell passen: die Acetylierung muss erst entfernt werden, bevor HP1 an seine Bindungsstelle – methyliertes H3-K9 - binden kann.

In Luciferase-Essays konnte beobachtet werden, dass Suv39H1 auch ohne die katalytisch aktive SET-Domäne in der Lage war, einen repressiven Effekt auf die Reporterexpression auszuüben (Vaute et al., 2002). Dies könnte durch die bloße Rekrutierung von HDACs zustande kommen.

In der gleichen Publikation wurde über eine Interaktion von Suv39H1 aus Säugerzellen mit verschiedenen Histondeacetylasen berichtet (Vaute et al., 2002). Diese Wechselwirkung wurde, genau wie in vorliegender Arbeit beschrieben, durch Co-Immunpräzipitationen, Aktivitätstests und Western Blots nachgewiesen. Dabei wurde eine Wechselwirkung von Suv39H1 mit HDAC1, 2 und 3 gefunden. Dies ist auch eine Bestätigung unserer Ergebnisse mit *Drosophila*-Proteinen, und zeigt, dass die Interaktion von Su(var)3-9 mit Histondeacetylasen in der Evolution konserviert ist. Jedoch wurde eine Interaktion mit HDAC3 in vorliegender Arbeit nicht gefunden; über HDAC2 kann keine Aussage getroffen werden, da der Western Blot nur mit Antikörpern für HDAC1 und 3 untersucht worden war.

Su(var)3-9 kann mit unterschiedlichen Proteinen Wechselwirkungen eingehen. Außer HDAC1 sind die schon früher publizierten Proteine Su(var)3-7 und HP1 zu nennen (Schotta et al., 2002). Diese Interaktionen scheinen aber eher vorübergehender Natur zu sein, da in unseren Händen z.B. Su(var)3-9 nie mit HP1 assoziiert war. Es wurde bisher auch noch nicht über einen großen Komplex berichtet, der alle diese Proteine enthält.

Überraschenderweise kann Su(var)3-9 mit sich selbst über seinen N-Terminus interagieren. Das in dieser Arbeit durchgeführte Experiment, eine Gelfiltration, wurde durch weitere Experimente meiner Laborkollegin Ragnhild Eskeland bestätigt. Sie konnte durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ebenfalls eine Dimerisierung von Su(var)3-9 beobachten, die unter denaturierenden Bedingungen oder bei Deletion des N-Terminus verloren ging (Eskeland et al., 2004). Ihre GST-pull-down-Experimente zeigten, dass die Interaktionsdomäne im N-Terminus aus zwei Teilen besteht: die ersten 152 Aminosäuren können mit der direkt daran anschließenden Region (152-213) interagieren. Durch eine solche zweiteilige Interaktionsdomäne können nicht nur zwei Moleküle Su(var)3-9 interagieren, sondern es könnte auch eine intramolekulare Wechselwirkung in Form einer „Rückfaltung“ auftreten.

Ausgehend von der Struktur der Chromodomäne ist die Bindung von Su(var)3-9 an sein eigenes Substrat, das an K9 methylierte Peptid, zu erwarten (Brehm et al., 2004). Die Chromodomäne von Su(var)3-9 ist derjenigen von HP1, die ja relativ stark an methyliertes H3-K9 bindet, sehr ähnlich. Beide bilden einen aromatischen Bereich, der die Methylgruppen des Lysins umgibt. Die in dieser Arbeit vorgelegten Experimente (siehe Kapitel 4.2.5) zeigen Bindung von Su(var)3-9 an ein Peptid, das an H3-K9 methyliert ist. Diese Experimente waren jedoch mit Su(var)3-9 – im Gegensatz zu HP1 - problematisch durchzuführen und lieferten nicht immer eindeutige Aussagen. Dies könnte verschiedene Gründe haben. Zunächst einmal wurde bakteriell exprimiertes Protein verwendet, da für jeden Versuch große Mengen Protein eingesetzt werden mussten. Es könnte sein, dass diese rekombinanten Proteine in unterschiedlichem Ausmaß richtig gefaltet vorlagen, und eine falsch gefaltete Chromodomäne ist nicht in der Lage, eine spezifische Bindung einzugehen. Ein Ausweg könnte hier sein, dass Proteine verwendet werden, die im Baculo-System exprimiert wurden, da hier die Mißfaltung ein geringeres Problem darstellt. Allerdings mussten die Proteine immer in hoher Menge eingesetzt werden, um Bindung an das *beads*-gebundene Peptid überhaupt detektieren zu können. Eventuell können im

Baculo-System nicht solch große Mengen Protein ohne größeren Aufwand erhalten werden. Da der Nachweis der Bindung von HP1 an die gleichen Peptide (wt und K9-methyliert) ohne weiteres möglich ist, könnte auch die Stärke der Bindung der Su(var)3-9-Chromodomäne an methyliertes H3-K9 für die Detektionsprobleme verantwortlich sein.

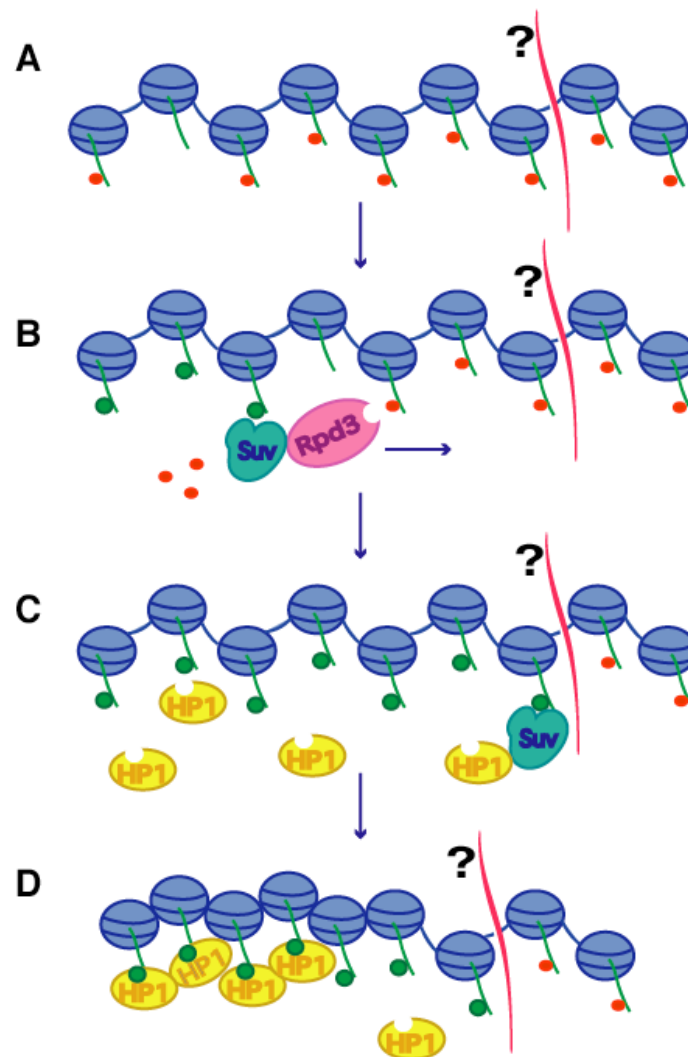
#### **5.1.4 MODELL DES HETEROCHROMATIN-SPREADING**

Hier kann man nun über die Funktion der Bindung von Su(var)3-9 an sein eigenes, bereits umgesetztes Substrat spekulieren, die in der vorliegenden Arbeit zwar beobachtet wurde, die aber keine sehr starke Interaktion darzustellen scheint. Ist diese Bindung von Su(var)3-9 an methyliertes H3-K9 ein Mechanismus für das *spreading* von Heterochromatin? Wenn Su(var)3-9 zwar an bereits methylierte Histone hingeführt werden soll, kann doch die permanente Bindung daran nicht das primäre Ziel sein, da es ein Enzym ist. Von daher wäre es nur logisch, dass die Chromodomäne von Su(var)3-9 eine schwächere und leichter zu lösende Bindung vermittelt, so dass das Enzym zum „nächsten“ Nukleosom weiterwandern kann und dort methylieren kann. Aufgrund der eventuell nicht besonders starken Bindung von Su(var)3-9 ist es deswegen möglich, dass ein Bindungsexperiment wie in dieser Arbeit durchgeführt (Peptid an *beads* gebunden) die Affinität der Su(var)3-9-Chromodomäne zu seinem eigenen Substrat schlecht zeigen kann, diese jedoch vorhanden ist und auch *in vivo* nur vorübergehender und schwacher Natur ist. Su(var)3-9 würde nach der Methylierungsreaktion Platz machen für andere Proteine wie HP1, die stärker an methylierte Histone binden und Funktionen innerhalb des Heterochromatin wahrnehmen könnten. Da Su(var)3-9 zunächst noch an das umgesetzte Substrat binden kann, wird verhindert, dass Su(var)3-9 sich sofort nach der enzymatischen Reaktion von dem methylierten Nukleosom entfernt und durch lineare Diffusion ein Konzentrationsgradient entsteht. Im Gegenteil, es könnte sich entlang eines DNA-Stranges bewegen und nacheinander alle Nukleosomen methylieren, die es vorfindet. Auf diese Weise wäre sichergestellt, dass sich ein repressives Signal kontinuierlich entlang eines DNA- bzw. Chromosomenabschnittes ausbreitet. Weiterführende Untersuchungen, ob z.B. durch Su(var)3-9 gleichzeitig ein methyliertes H3 gebunden werden kann und ein benachbart liegendes Nukleosom methyliert werden kann, stehen noch aus.

Die in dieser Arbeit gefundene Interaktion mit Rpd3 könnte Su(var)3-9 ermöglichen, auch dort zu methylieren, wo zuvor noch ein Signal für aktiv transkribiertes Chromatin in Form einer Acetylierung war. Auf diese Art und Weise könnte Su(var)3-9 auch Bereiche des Genoms methylieren, die zunächst kein Substrat für eine H3-K9-spezifische



Methyltransferase darstellen, und euchromatische Bereiche in heterochromatische Bereiche verwandeln.



**Abb. 85: Hypothetisches Modell des *spreadings* von Heterochromatin, vermittelt durch Su(var)3-9 und Rpd3. A:** Die Histone sind acetyliert. Die roten Punkte stellen H3-K9-Acetylierung dar. Die rote Linie soll ein *boundary*-Element symbolisieren, über das nichts näheres bekannt ist. **B:** Su(var)3-9 und Rpd3, die sich in einem Komplex befinden, „wandern“ zusammen die Nucleosomen entlang und deacetylieren und methylieren diese (grüne Punkte). Die Chromodomäne von Su(var)3-9 könnte dabei bewirken, dass die Proteine sich nicht von ihrem Wirkungsort entfernen. Das *boundary*-Element verhindert, dass die Methylierung sich unbegrenzt ausbreitet. **C:** HP1 kann ebenfalls mit Su(var)3-9 wechselwirken und an methyliertes H3-K9 binden. **D:** Infolge der Histonmethylierung und HP1-Bindung nimmt der Bereich heterochromatischen Charakter an, was sich z.B. in Kompaktierung äußern könnte. Der Bereich jenseits des *boundary*-Elementes bleibt euchromatisch.

Durch noch unbekanntes *boundary*-Elemente oder andere Signale, in Abb. 85 durch ein Fragezeichen angedeutet, könnten Su(var)3-9 und/oder Rpd3 aufgehalten werden, so dass sich das Heterochromatin nicht unbegrenzt weiter ausbreitet. So könnte z.B. das Ausbreiten von Heterochromatin ausgehend vom Zentromer begrenzt werden.

Nach der Methylierungsreaktion kann HP1 an die methylierten Histone binden. HP1 kann dimerisieren, und man könnte sich vorstellen, dass durch die Wechselwirkung von jeweils zwei Molekülen HP1 das Chromatin dichter gepackt wird.

Die in dieser Arbeit gefundene Interaktion zwischen Su(var)3-9 und Rpd3 sowie die Bindung von Su(var)3-9 an methyliertes H3-K9 über die Chromodomäne stellen einen Ausgangspunkt für folgendes *spreading*-Modell dar (siehe Abb. 85): zunächst deacetyliert Rpd3 die Histone, die acetyliert vorliegen (siehe a in Abb. 85). Dann methyliert Su(var)3-9, welches sich in einem Komplex mit der Deacetylase befindet, Lysin 9 im H3-*tail*, bindet über seine Chromodomäne kurzzeitig an das eben methylierte Substrat und wandert dann zusammen mit der Deacetylase weiter (siehe b). HP1 kann ebenfalls mit Su(var)3-9 wechselwirken (siehe c) anschließend an die methylierten Histone binden. Durch seine Dimerisierung kann es wahrscheinlich zur Kompaktierung des Chromatins beitragen (siehe d).

Durch das Zusammenwirken von verschiedenen Proteinen wie Su(var)3-9 und Rpd3 könnten also ganze Chromatin-Bereiche sukzessive heterochromatischen Charakter erhalten. Das vorgeschlagene Modell schließt nicht aus, dass weitere Proteine an den einzelnen Schritten beteiligt sind, die sich eventuell auch in einem Komplex mit den Enzymen befinden und beispielsweise Spezifität in bezug auf deren Wirkungsort vermitteln könnten.

## 5.2 E(Z)

### 5.2.1 DAS SUBSTRAT DER METHYLIERUNGSREAKTION: K9 UND K27?

Über eine mehrstufige Säulenreinigung konnte ein Komplex gereinigt werden, der E(Z) enthält und Lysin 9 und Lysin 27 aus dem H3-*tail* methyliert (siehe Kapitel 4.4). Dieser Komplex, der aus Wildtyp *Drosophila*-Embryos isoliert wurde, kann sowohl Oktamer als auch – wenn auch zu einem etwas geringeren Ausmaß – Nukleosomen modifizieren (siehe Abb. 53). Stellt man dem Methyltransferase-Komplex ein H3-Peptid zur Verfügung, welches die ersten 20 Aminosäuren aus dem *tail* enthält, so kann Lysin-9-Methylierung durch Edman-Abbau eindeutig festgestellt werden (siehe Abb. 54). Durch Verwendung von vormethylierten Peptiden (AA 1-20, K9 di- bzw. trimethyliert) sowie von mutierten Peptiden (AA 21-34, K27 mutiert) und mutierten Histonen (K9, K27 und K9+K27 mutiert) konnte die Spezifität weiter bestimmt werden.

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern konnte außerdem ein Nachweis dafür erfolgen, dass das Lysin 27 im Histon H3 *in vivo* (aus *Drosophila*-Nukleosomen) trimethyliert vorliegt. Der anti-K9-Trimethylierungs-Antikörper erkennt methyliertes Histon H3 auch dann, wenn der *tail* durch Trypsin entfernt wurde. Dies deutet auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers hin, der wohl auch – hier kann man nur spekulieren – methyliertes Lysin 27 erkennt. Der Antikörper weist jedoch keine Kreuzreaktion mit dimethyliertem Lysin 9 auf, so dass man davon ausgehen kann, dass Lysin 9 sowie Lysin 27 trimethyliert vorliegt. Mit absoluter Sicherheit kann man nicht auf die Lysin 27-Methylierung schließen, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit für die genannte Kreuzreaktion K9/K27 hoch, da die Umgebung der beiden Lysine sehr ähnlich ist (siehe Abb. 56). Für einen absoluten Nachweis bräuchte man einen Antikörper, der spezifisch *nur* methyliertes Lysin 27 erkennt und speziell unter diesem Gesichtspunkt entwickelt wurde.

Die Lysin 9-Methylierung wurde nicht von allen Gruppen, die über den E(Z)/ESC-Komplex publizierten, detektiert. Die Gruppe um D. Reinberg findet, ausgehend von einem Affinitäts-gereinigten Komplex aus humanen Zellen, am Oktamer bessere Aktivität als an Nukleosomen (Kuzmichev et al., 2002) und kommt damit zum selben Ergebnis wie die vorliegende Arbeit. Durch Edman-Abbau, Verwendung von mutierten Histonen sowie mutierten *tails* bestimmten sie ebenfalls Lysin 9 und Lysin 27 als Substrate für den humanen E(Z)/ESC-Komplex.

Im Gegensatz dazu sieht die Gruppe von Y. Zhang, dass ein aus HeLa-Zellen aufgereinigter Komplex Nukleosomen bevorzugt und nur Lysin 27 methyliert wird (Cao et al., 2002). Diese Aminosäure wurde als Substrat nach einer Mikrosequenzierung identifiziert und durch Verwendung von mutierten Histonen im Methyltransferase-Assay bestätigt.

J. Müller beobachtet bei seinem im Baculosystem rekonstituierten Komplex, dass Nukleosomen ein besseres Substrat sind als freie Histone. In seinem System werden auch E(Z) selbst und Su(z)12 methyliert (Muller et al., 2002). Durch Edman-Abbau stellte sich Lysin 27 als einzige methylierte Aminosäure heraus.

Es könnte sein, dass in unserem Komplex, der aus *Drosophila*-Kernextrakt gereingt wurde, eine geringe kontaminierende Methyltransferase-Aktivität enthalten ist, die H3-K9 methyliert, und E(Z) gar nicht in der Lage ist, H3-K9 zu methylieren. Nach der zweiten Säule innerhalb unserer chromatographischen Reinigung, der ResourceQ-Säule, trennen sich verschiedene *peaks* von Methyltransferasen, und benachbart zum *peak* von HIM $\alpha$ , der E(Z) enthält, befindet sich der *peak* HIM $\beta$  mit Su(var)3-9. Könnte es nun sein, dass

geringste Mengen an Su(var)3-9 die H3-K9-Methylierung verursachen? Dazu ist zu bemerken, dass sowohl bei Verwendung von Peptiden als Substrat als auch der Histone (siehe Abb. 58) die Verhältnisse K9/K27-Methylierung relativ ausgeglichen waren, d.h. beide Aminosäuren in ungefähr gleichem Ausmaß methyliert wurden. Die „mitreinigende“ Aktivität müsste also nahezu genau so viel bzw. genau so aktiv sein wie E(Z). Des Weiteren ist in unseren Händen Su(var)3-9 nicht in der Lage, ein Peptid zu trimethylieren. Dies gilt sowohl für das in *E. coli* exprimierte Protein, welches ein Peptid nur nach einer „Hyperaktivierungs“-Mutation trimethylieren kann, als auch für das aus myc-Su(var)3-9-Kernextrakt immunpräzipitierte Enzym: dieses kann ein an K9 dimethyliertes Peptid nicht weiter umsetzen. Damit kommt Su(var)3-9 als Methyltransferase, die ja auch ein H3-Peptid trimethylieren können muss (siehe Abb. 58), als zufällig mitreinigende Komponenten nicht in Frage.

Wird E(Z) im Baculosystem exprimiert, hat es normalerweise eine sehr geringe Aktivität, die jedoch detektierbar ist (siehe Abb. 69). Wenn man das H3-Peptid (AA 1-20) als Substrat verwendet, wird dieses methyliert. E(Z) kann an diesem Peptid *nur* K9 methylieren. Gibt man dem Enzym das Peptid 21-34 als Substrat, ist es *nicht* in der Lage, hier zu methylieren. Es stellt sich die Frage, ob E(Z) überhaupt so kurze Peptide als Substrate akzeptiert. Für das Peptid 1-20 ist dies der Fall. Warum das Peptid 21-34 nicht methyliert wird, soll dahingestellt bleiben, in jedem Fall kann rekombinantes E(Z) aus dem Baculosystem, auch ohne weitere Komplexkomponenten, H3-K9 in geringem Ausmaß methylieren. Da die Aktivität an Nukleosomen und Oktamer nicht besser ist, konnten wir bisher diese Substrate nicht zum Sequenzieren geben.

Obwohl Cao et al. immer nur eine Lysin-27-Methylierungsaktivität bei ihren im Baculosystem exprimierten Proteinen beobachten, konnten sie, als mutierte Histone H3 als Substrat eingesetzt wurde, eine schwach reduzierte Aktivität detektieren, als sie H3-K9 mutiert hatten (Cao and Zhang, 2004b). Ob H3-K9 für die Erkennung des Substrates H3 durch E(Z) von Bedeutung ist, muss noch weiter untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Frage nach der Kontamination in unserer Komplexreinigung zwar berechtigt ist und eine mitreinigende Aktivität nicht ganz ausgeschlossen werden kann, aber zumindest *in vitro* als rekombinantes, im Baculo-System exprimierte Protein zeigt E(Z) an H3-K9 im Peptid größere Aktivität als an H3-K27.

Es könnte sein, dass das aus *Drosophila*-Extrakten gereinigte Protein H3-K9 *in vitro* und unter bestimmten Versuchsbedingungen methyliert, die Spezifität *in vivo* jedoch auf H3-

K27 beschränkt ist. Ferner könnten die unterschiedlichen Reinigungsmethoden und Komplexkomponenten eine Rolle für die Substratspezifität spielen.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Analyse eines längeren Peptides oder eines ganzen Histon H3, welches von unserem rekombinanten E(Z) – mit und ohne die übrigen Komponenten des Komplexes in der Methylierungsreaktion - modifiziert worden ist. Bis jetzt war allerdings die Aktivität des im Baculosystem exprimierten Proteines noch zu niedrig, um eine Sequenzierungsreaktion durchführen zu können.

### **5.2.2 ZUSAMMENSETZUNG DES KOMPLEXES**

Als Untereinheiten des aus *Drosophila*-Kernextrakt gereinigten E(Z)-Komplexes konnten in dieser Arbeit E(Z), ESC, Su(z)12, p55 sowie Rpd3 (=HDAC1) identifiziert werden.

Zwei andere Gruppen finden nur die Untereinheiten E(Z), ESC, Su(z)12 sowie p55 (Kuzmichev et al., 2002; Muller et al., 2002), jedoch kein HDAC1. Cao et al. beobachten zusätzlich zu diesen vier Proteinen ein DNA-bindendes Protein, AEBP2, das mit dem Komplex assoziiert ist (Cao et al., 2002).

Tie et al. unterscheiden zwei verschiedene Komplexe, die als gemeinsame Untereinheiten E(Z), ESC, Su(z)12 sowie p55 aufweisen. Der sogenannte 600 kDa-Komplex besteht nur aus diesen Proteinen, und ein weiterer Komplex mit 1 MDa enthält zusätzlich noch Rpd3 und Pcl (Tie et al., 2001; Tie et al., 2003).

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen können durch verschiedene Reinigungsmethoden und Ausgangsbedingungen zustande kommen. Durch mehr oder weniger Salz, Detergens oder sonstige Parameter der Aufreinigung könnten Proteine von diesem Komplex verloren gehen. Zumindest der „Kernkomplex“ aus E(Z), ESC, Su(z)12 und p55 scheint jedoch bis zu einer Salzkonzentration von 2 M stabil zu sein (Muller et al., 2002).

Es könnte auch sein, dass einzelne Proteine nur eine transiente Interaktion mit diesen Komplexen aufweisen, z.B. HDAC1, welches ja auch in anderen Proteinkomplexen auftreten kann. Je nach Entwicklungs- oder Zellzyklusstufe könnten dann die Untereinheiten der Komplexe voneinander abweichen. Die Grenzen zwischen den einzelnen Komplexen sind also manchmal fließend.

### **5.2.3 BINDUNG VON POLYCOMB AN METHYLIERTES H3- K27**

Polycomb bindet an Histon H3, das an K27 methyliert ist. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch Bindung von rekombinanten Polycomb an durch den E(Z)/ESC-Komplex

methyliertes H3 nachgewiesen werden (siehe Abb. 62). Da Polycomb eine Chromodomäne enthält, war eine Bindung an ein methyliertes Lysin, ähnlich HP1, zu erwarten gewesen.

Die zum gleichen Zeitpunkt wie unsere Publikation erschienenen Arbeiten von Cao et al. und Kuzmichev et al. kamen zum selben Ergebnis. Beide beobachteten eine bessere Bindung von Pc an methylierte Peptide im Vergleich zu unmethylierten Peptiden in einem *pull-down*-Experiment (Cao et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002).

In letzter Zeit hat dieses Ergebnis Bestätigung durch weitere Arbeiten gefunden. Polycomb wurde zusammen mit einem an Lysin 27 trimethylierten Peptid kristallisiert und die Struktur wurde mit Hilfe von Röntgenstrahlen aufgeklärt (Fischle et al., 2003b; Min et al., 2003). Die Strukturen der Chromodomänen von HP1 und Polycomb sind sich sehr ähnlich, z.B. wird das methylierte Lysin in beiden über einen aromatischen Käfig gebunden. Wie HP1 bevorzugt auch Pc ein trimethyliertes gegenüber einem mono- bzw. dimethyliertem Lysin (Fischle et al., 2003b). Außerdem wurde eine Dimerisierung von Polycomb beobachtet. Die Dimerisation verleiht der Chromodomäne von Polycomb Spezifität in bezug auf methylierte Lysine, so dass es zwischen methyliertem Lysin 9 und 27 unterscheiden kann (Min et al., 2003). Polycomb und trimethyliertes H3-K27 colokalisieren in Polyän-Chromosomen (Fischle et al., 2003b).

Die Bindung von Pc an methyliertes H3-K27 sowie die Tatsache, dass Polycomb sich im PRC1-Komplex befindet, inspirierten das in Abb. 15 beschriebene Modell: Nachdem E(Z) H3-K27 methyliert hat, kann Pc an diese Histone spezifisch binden und dabei den PRC1-Komplex rekrutieren, der für die Repression verantwortlich ist.

Kürzlich wurde berichtet, dass PHO, ein DNA-bindendes Protein, mit E(Z) und ESC interagiert, und Pho-like, ein anderes, zu 80% identisches DNA-bindendes Protein, mit ESC (Wang et al., 2004). Diese Proteine befinden sich nicht in den oben genannten PcG-Komplexen. Ihre Bindung an PREs ist aber Voraussetzung dafür, dass der E(Z)/ESC-Komplex an die DNA rekrutiert werden kann. Erst nachdem der E(Z)-Komplex gebunden hat, kann Pc über seine Chromodomäne binden und auch andere Komplexe wie PRC1 zu den PREs führen.

Für E(Z) selbst konnte keine Bindung an methylierte Histon-Peptide beobachtet werden (siehe Abb. 73). Nachdem immer deutlicher wird, dass die Chromodomäne hochspezifisch einzelne Methylierungen erkennt, und bisher keine andere Domäne entdeckt wurde, die dies ebenso vermag aber ganz anders aufgebaut ist, verwundert es nicht, dass E(Z) keine Bindung an Histon-*tails* zeigt. Bis auf die SET-Domäne sowie die SANT-Domänen enthält

E(Z) keine bekannten Struktur motive – und auch keine Chromodomäne. Da es aber als Enzym in sehr engen Kontakt mit seinem Substrat, den Histonen, treten muss, wäre eine Bindung an nicht modifizierte Histone zu erwarten gewesen. Diese Bindung war offensichtlich weniger stark ausgeprägt als die Hintergrundbindung in meinen Experimenten, und deswegen nicht zu detektieren.

Hier könnte man die Versuchsbedingungen noch dahingehend optimieren, dass man den Hintergrund reduziert durch Verwendung von mehr Salz im Waschpuffer oder ähnliches. Eine weitere Möglichkeit wäre, rekombinante Histone anstelle der Kalbsthymus-Histone (Sigma) zu verwenden, da E(Z) vielleicht nur an völlig unmodifizierte Histone bindet und diese dann methyliert. Eventuell braucht E(Z) auch seine Partner aus dem Proteinkomplex, um spezifisch mit Histonen zu wechselwirken.

#### **5.2.4 MINIMALER PROTEINKOMPLEX, DER FÜR EINE METHYLIERUNG NOTWENDIG IST**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass rekombinantes E(Z) kaum Aktivität besitzt, diese Aktivität aber gesteigert werden kann, wenn man p55 und v.a. ESC dazugibt (siehe Abb. 52). Da zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente noch keine Baculoviren zur Herstellung aller Proteine zur Verfügung standen, stammten E(Z) und ESC aus bakterieller Produktion, p55 hingegen wurde im Baculosystem exprimiert. Insofern ist diese Kombination von Proteinen keine ideale Konstellation, zeigte aber trotzdem, dass E(Z) aktiver ist, wenn es mit anderen Komponenten aus dem Komplex assoziiert ist. Mittlerweile ist die Herstellung von fast allen Baculoviren (bis auf ESC) gelungen, die die Expression der Proteine aus dem E(Z)/ESC-Komplex erlauben (siehe Kapitel 4.5.1). Coexpressionsexperimente, die von Pierre Schilcher während der Abfassung dieser Arbeit durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von Su(z)12 die Aktivität von E(Z) noch weiter erhöht. Diese Experimente zeigten eine erhöhte Aktivität von E(Z) in bezug auf Histon H3, wenn außer ESCL noch Su(z)12 zusammen mit diesen beiden Proteinen im Baculosystem exprimiert wurde. Nach der Coexpression wurden die Proteine über den *flag-tag* von E(Z) gereinigt, und die Reaktionsprodukte auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der „Kernkomplex“, der Methyltransferaseaktivität zeigt, kann damit als E(Z) – ESC(L) – Su(z)12 bestimmt werden.

Basierend auf ihrem postulierten Modell des Ezh2-Eed-Komplexes (siehe weiter unten) beobachten Cao et al., dass für einen aktiven Komplex mindestens Ezh2, Su(z)12 sowie Eed notwendig sind (Cao and Zhang, 2004b). Zugabe von RbAp28 verbessert ihrer

Ansicht nach den Einbau von Su(z)12 in den Komplex und resultiert daher in erhöhter Aktivität. Damit kommt diese Gruppe trotz eines anderen Modells der Interaktion zum gleichen Schluß: neben E(Z) und ESC ist Su(z)12 ausschlaggebend für die Aktivität des Komplexes. Ihrer Ansicht nach kommt es nicht zu einem stabilen Komplex, exprimiert man RbAp48 zusammen mit Eed und Ezh2. Sie finden eine weitere Aktivierung des Ezh2-Eed-Su(z)12-RbAp48-Komplexes, wenn sie das DNA-bindende Protein AEBP2 hinzugeben.

Interessanterweise wurde gefunden, dass verschiedene Isoformen von Eed die Substratspezifität des Ezh2-Komplexes verändern können (Kuzmichev, 2004): nicht mehr nur H3, sondern auch das Histon H1 kann methyliert werden. H1 stellt für PRC2 das bevorzugte Substrat dar. H3 wird ebenfalls methyliert, aber nur wenn es sich nicht in einem nukleosomalen *array* befindet. Der PRC3-Komplex hingegen bevorzugt H3 als Substrat, wenn es sich in einer oligonukleosomalen Anordnung befindet.

Es gibt erste Hinweise darauf, dass sich je nach Isoform von Eed die Spezifität von Ezh2 ändert, so dass K9 *und* K27 methyliert werden können, und dass dies eine Rolle in der Tumorentstehung spielen könnte (unpublizierte Mitteilung von D. Reinberg).

Es könnte sein, dass je nach Komplexkomponenten die Substratspezifität auch der *Drosophila*-Komplexe unterschiedlich ist, und daher manche Gruppen K9-Methylierung beobachten, andere wiederum nicht. Es ist auch vorstellbar, dass andere Proteine mit dem E(Z)-ESC-Komplex wechselwirken, die bis jetzt nicht identifiziert wurden, und dessen Substratspezifität verändern. Es könnte sein, dass diese Komponenten nur lose mit dem Kernkomplex assoziiert sind, und dass daher die Substratspezifität *in vivo* anders als *in vitro* ist.

### 5.2.5 PROBLEME DES BACULOSYSTEMS

Ein noch nicht gelöstes Problem bei Verwendung der im Baculosystem exprimierten Proteine ist die Variabilität der Expression. Es schwanken sowohl die absoluten Mengen der Proteine, als auch deren Mengenverhältnisse und die Aktivität im Methyltransferase-Assay. Ein Grund für diese Variabilität scheint zu sein, dass sich die Viren während der Lagerung bei 4°C verändern. Amplifiziert man nämlich einen Virus, so kommt es teilweise zu viel höheren Proteinexpressionen direkt nach der Amplifikation. Diese hohen Expressionen sind jedoch nicht von Dauer. Ein Einfrieren des *stocks* anstelle einer Lagerung bei 4°C würde die Viren aber noch mehr schädigen.



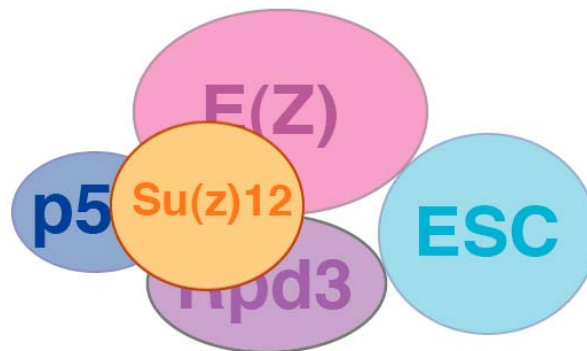
Ein anderer Grund könnte sein, dass die Sf9-Zellen sich in unterschiedlichen Wachstumsphasen, Konfluenzgraden etc. befinden, wenn sie infiziert werden. Geht es ihnen erkennbar schlecht, exprimieren sie überhaupt kein rekombinantes Protein.

Da sowohl Viren als auch Zellen sich schlecht beeinflussen lassen, gibt es keine wirkliche Möglichkeit, um die Expression zu stabilisieren. Es ist aus diesem Grund notwendig, jede Expression auf Proteinmenge und Methyltransferase-Aktivität zu testen, bevor weitergehende Experimente begonnen werden.

### 5.2.6 INTERAKTIONEN DER EINZELNEN PROTEINE AUS DEM E(Z)/ESC-KOMPLEX

Die verschiedenen Proteine des E(Z)/ESC-Komplexes interagieren nach meinen Bindungsstudien wie in Abb. 86 zu sehen. Im besonderen wurde die Wechselwirkung von p55 mit E(Z), Rpd3 und Su(z)12 beobachtet, von ESC und E(Z) und von Su(z)12 mit Rpd3 und E(Z) (siehe Kapitel 4.5.5). Nach meinen Bindungsstudien könnte sich Su(z)12 wie in Abb. 86 gezeigt in einer weiteren Ebene überhalb des bisher bekannten Komplexes befinden, und mit allen Proteinen außer ESC wechselwirken.

Noch nicht getestete Interaktionen bzw. Experimente mit nicht auswertbaren Ergebnissen sind: RPD3-E(Z), RPD3-ESC, sowie die Interaktionen von ESCL.



**Abb. 86: Interaktionen zwischen den verschiedenen Proteinen des E(Z)/ESC-Komplexes, basierend auf meinen Interaktionsstudien und der Publikation von Tie (Tie et al., 2001).**

Tie et al. hatten in einer Publikation von 1998 gezeigt, dass die Interaktion zwischen E(Z) und ESC über den N-Terminus von E(Z) sowie über die WD40-Domänen von ESC vermittelt wird (Tie et al., 1998). In einer weiteren Publikation benutzten sie GST-pull-down-Experimente, um die Interaktionen zwischen E(Z), ESC, p55 sowie Rpd3 weiter zu

untersuchen. Sie fanden dass sowohl E(Z) als auch Rpd3 mit den drei anderen Proteinen interagierten, p55 und ESC jedoch jeweils nur Interaktionen zu E(Z) und und Rpd3 ausbilden, und keine Interaktion zwischen p55 und ESC stattfindet (Tie et al., 2001).

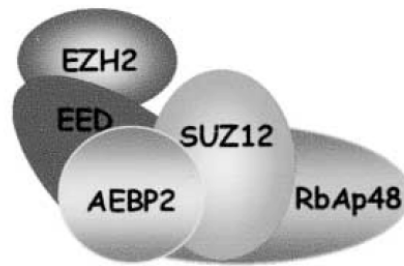
Meine Daten unterstützen dieses Modell. Bindungsstudien mit Su(z)12 und den anderen Proteinen des Komplexes, die im Baculosystem coexprimiert wurden, schlagen das in Abb. 86 gezeigte Modell vor, in dem Su(z)12 gleichzeitig mit p55, Rpd3 sowie E(Z) interagiert.

Yamamoto et al. untersuchten Su(z)12 näher und beobachteten eine direkte Interaktion zwischen Su(z)12 und E(Z). Ebenfalls durch GST-*pull-down*-Experimente grenzten sie die Interaktionsdomäne in Su(z)12 ein, die mit E(Z) in Kontakt tritt: Es ist die sogenannte „VEFS box“ (VRN2-EMF2-FIS2-Su(z)12). Diese Domäne liegt in der Nähe des C-Terminus. (siehe Abb. 87). Im Gegensatz dazu interagiert Su(z)12 mit HP1 über eine kleine Domäne, die zwischen dem Zinkfinger-Motiv und der VEFS-Box liegt (Yamamoto et al., 2004).



**Abb. 87:** Schematische Darstellung von Su(z)12 aus Säugern (Yamamoto et al., 2004).

Im Gegensatz hierzu behaupten Cao et al., dass E(Z) *nur* mit ESC interagiert und mit keinem anderen Protein aus dem Komplex in direktem Kontakt steht (Cao and Zhang, 2004b). Su(z)12 kann nach ihren Experimenten mit ESC, dem p55-Homologen RbAp48 sowie dem DNA-bindenden Protein AEBP2 interagieren und befindet sich inmitten von diesen Proteinen in einem Komplex (siehe Abb. 88). Betrachtet man das Fluorogramm zu diesem Experiment genauer, wäre auch eine Dimerisierung von Su(z)12 nicht ausgeschlossen, obwohl diese Möglichkeit im Text nicht angesprochen wird.



**Abb. 88: Zusammensetzung des Ezh2-Eed-Komplexes nach Cao, 2004 (Cao and Zhang, 2004b).** Nach diesem Vorschlag interagiert E(Z) nur mit Eed und befindet sich an der Peripherie des Komplexes.

Es bleibt also offen, wie der Komplex genau aufgebaut ist. Der nächste Schritt ist die genauere Ermittlung der in die Wechselwirkung involvierten Domänen. Dies wurde von Cao et al. und Yamamoto et al. schon für Su(z)12 und AEBP2 begonnen.

In diesem Zusammenhang wäre speziell interessant, welche Domänen von E(Z) an den Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beteiligt sind, und welche Auswirkungen dies auf die Bindung des Substrats hat.

Auch die vorgeschlagene Propellerstruktur von ESC (siehe Kapitel 2.12.2) stellt eine Herausforderung dar. Interagiert jede Propelleruntereinheit mit einem anderen Protein, oder wird z.B. die Bindung von E(Z) von allen Untereinheiten gemeinsam vermittelt?

### 5.2.7 LUCIFERASE-ASSAY

Im Luciferase-Assay wurde stets eine kleine, aber konstante Repression beobachtet, als E(Z) als Gal4-Fusionsprotein in die *Drosophila* SL2-Zellen transfiziert worden war (siehe Kapitel 4.5.6). Die Repression war nicht besonders ausgeprägt und bewegte sich in der Größenordnung von 2fach oder weniger. Durch Cotransfektion von Dorsal und Twist konnte das System stark aktiviert werden. Dann war die Repression, die durch Gal4-E(Z) vermittelt war, deutlich zu sehen. Die basale Aktivität des Thymidinkinase-Promotors reicht also nicht aus, um die E(Z)-vermittelte Repression sichtbar zu machen. Hierzu ist ein System mit aktivierter Genexpression notwendig. *In vivo* könnte folgende Situation vorliegen: basale Transkription liegt beispielsweise in der Nähe des Zentromers vor. E(Z) hingegen muss die Genexpression innerhalb des Euchromatins reprimieren, welches transkriptionell aktiv ist. An basaler und aktivierter Genexpression könnten unterschiedliche Faktoren beteiligt sein. In unseren Händen ist ein eindeutiger repressiver

Effekt der E(Z)-Transfektion nur zu beobachten, wenn das aktivierte System verwendet wurde.

Ein wichtiges, in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführtes Kontrollexperiment ist die Verwendung von Mutanten von E(Z), damit man die Repression auf die enzymatische Aktivität von E(Z) zurückführen kann. Hier bietet sich die SET-Domänen-Mutation H703K in Analogie zur Mutation H561K in Su(var)3-9 an, die die enzymatische Aktivität der SET-Domäne zerstört: Sie betrifft das katalytisch wichtige Motiv NHS, welches sich am C-Terminus der SET-Domäne befindet. Für Su(var)3-9 mit dieser Mutation konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Aktivität zerstört ist. Man würde erwarten, dass die Repression im E(Z)-Luciferase-Assay nicht mehr auftritt, da E(Z) mit dieser Mutation nicht mehr methylieren kann. Die Methylierung von H3-K27 wäre unterbunden, und damit das *silencing*. Während der Abfassung dieser Arbeit arbeitete Pierre Schilcher an der Klonierung von weiteren E(Z)-Konstrukten für dieses System. Eine weitere Kontrolle zur Feststellung, ob der repressive Effekt von E(Z) auf seine enzymatische Aktivität zurückzuführen ist, wäre die Aufreinigung von Gal4-E(Z) aus dem Lysat der SL2-Zellen mit Hilfe von anti-Gal4-Antikörpern und der Test auf Methyltransferase-Aktivität.

E(Z) könnte aber auch durch Interaktion mit Rpd3 einen repressiven Effekt ausüben. Rpd3 befindet sich nach unseren Untersuchungen ja in einem Komplex mit E(Z). Rpd3 könnte, nachdem es durch Gal4-E(Z) an den Promoter der Luciferase gebracht worden ist, die Histone deacetylieren und dadurch die Expression der Luciferase senken. Durch Verwendung von HDAC-Inhibitoren könnte man feststellen, ob der repressive Effekt von E(Z) durch Rpd3 vermittelt ist. Varambally et al. beobachteten in transienten Transfektions-Experimenten, dass die repressive Wirkung von Ezh2 in Tumorzellen von einer intakten SET-Domäne abhängt, aber auch von HDAC-Aktivität (Varambally et al., 2002). Blockiert man die HDAC-Aktivität durch TSA, so hat die Überexpression von Ezh2 keinen repressiven Effekt mehr.

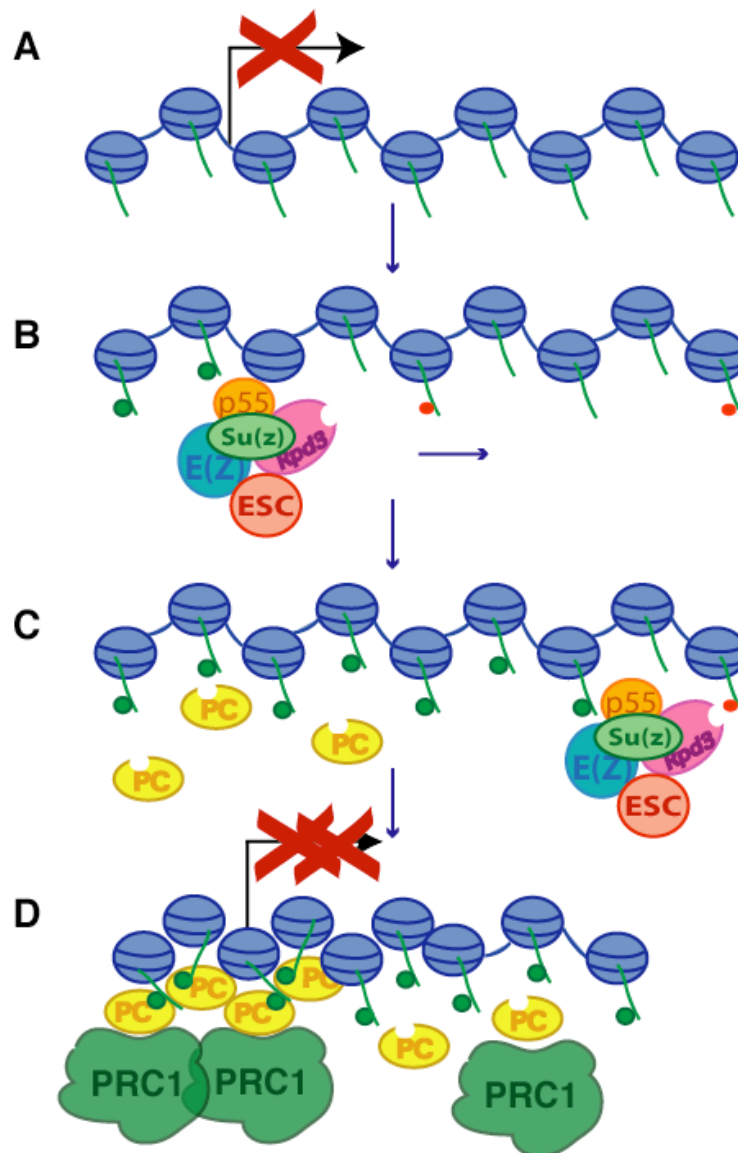
### **5.2.8 E(Z) UND REPRESSION**

In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass E(Z) eine Histon H3-spezifische Methyltransferase ist, die u.a. H3-K27 methylieren kann. Diese Modifikation ist, wie ebenfalls in vorliegender Arbeit gezeigt wurde, eine Bindungsstelle für das Protein Polycomb. Polycomb ist Bestandteil des PRC1-Komplexes.

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich, ähnlich wie im Kapitel 5.1.4, ein Modell entwickeln zur Rolle von E(Z) in der Repression der homöotischen Gene. Dies ist vereinfacht in Abb. 89 dargestellt.

E(Z) und die assoziierte Proteine ESC, p55, Su(z)12 sowie Rpd3 werden wahrscheinlich über DNA-bindende Proteine wie z.B. PHO an Promotoren von homöotischen Genen gebracht, die sich in abgeschaltetem Zustand befinden. Dieser erste Schritt – die Erkennung des reprimierten Zustandes – ist noch nicht klar. E(Z) kann daraufhin H3 methylieren. Eventuell vorhandene Acetylierungen könnten zuvor von der Deacetylase Rpd3 entfernt werden. Dies könnte analog zur Interaktion mit Su(var)3-9 passieren. Das spezifische Methylierungsmuster von E(Z), welches H3-K27 und H3-K9-Trimethylierung beinhaltet, wird von Polycomb erkannt und gebunden. Polycomb kann wie HP1 dimerisieren, bindet dabei aber wahrscheinlich *tails* aus zwei verschiedenen Nukleosomen. Es ist anzunehmen, dass Polycomb sich im Komplex PRC1 befindet, der auf diese Weise ebenfalls an die methylierten Histone bindet. Die Anwesenheit von PRC1 bewirkt wahrscheinlich die Repression der Transkription auch über längere Distanzen.

Die vorübergehende Repression der homöotischen Gene wird durch E(Z) in eine ständige transkriptionelle Repression verwandelt.



**Abb. 89: Hypothese der E(Z)-vermittelte Repression.** **A:** Ein homöotisches Gen ist abgeschaltet. **B:** Der E(Z)/ESC-Komplex erkennt den abgeschalteten Zustand und methyliert das Histon H3 an K9 und K27 (grüne Punkte). Eventuell vorhandene Acetylierungen (rote Punkte) könnten durch Rpd3 entfernt werden. **C:** Polycomb erkennt die H3-K27-Methylierung und bindet spezifisch daran. **D:** Polycomb kann über seine Chromodomäne dimerisieren. Es ist außerdem Bestandteil des PRC1-Komplexes. Dessen Anwesenheit hält wahrscheinlich das Gen im abgeschalteten Zustand. Der auf Dauer abgeschaltete Zustand soll durch den doppelt durchgestrichenen Pfeil symbolisiert werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Histon-Methyltransferasen Su(var)3-9 und E(Z) aus *Drosophila melanogaster* charakterisiert.

Die Histonmethylierung als Modifikation war schon länger bekannt gewesen, bis zum Jahr 2000 war jedoch vor allem die Acetylierung etwas genauer untersucht worden. Su(var)3-9 war die einzige bekannte Histon-Lysin-Methyltransferase, als diese Arbeit begonnen wurde. Zur Charakterisierung wurde das myc-getagte Enzym aus *Drosophila*-Kernextrakt durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und zunächst die Substratspezifität festgestellt. Wie das humane Enzym Suv39H1 methyliert es ebenfalls spezifisch H3-K9 (Lysin 9 im Histon H3). Das aus den Kernextrakten aufgereinigte Enzym besitzt aber auch die Fähigkeit, ein an H3-K9 präacetyliertes Substrat zu methylieren. Die Vermutung, dass Su(var)3-9 mit einer Histondeacetylase assoziiert ist, konnte durch Verwendung von TSA als HDAC-Inhibitor bestätigt werden. Es stellte sich heraus, dass HDAC1 (Rpd3) mit Su(var)3-9 assoziiert ist.

Um das Enzym besser untersuchen zu können, wurde es als Vollängenprotein und als Deletionsmutante in *E. coli* exprimiert. Die Aufreinigung des rekombinanten Enzyms sowie seine Lagerbedingungen wurden optimiert. Das Vollängenprotein Su(var)3-9 liegt – wie durch Gelfiltration festgestellt – als Dimer vor, die Interaktion mit sich selbst ist über den N-Terminus vermittelt.

Su(var)3-9 bindet an sein eigenes, bereits methyliertes Substrat. Dies wurde an Peptiden untersucht, die den ersten 20 Aminosäuren des Histons H3 entsprechen, und entweder an Lysin 9 dimethyliert oder unmodifiziert waren. Die Interaktion mit dem methylierten Substrat ist auf die Chromodomäne von Su(var)3-9 zurückzuführen, ist jedoch schwächer als die Wechselwirkung von HP1 mit methyliertem H3-K9.

Des Weiteren wurde eine *Drosophila*-Zelllinie stabil mit Su(var)3-9 transfiziert. Das überexprimierte Protein ist jedoch nur schwach aktiv.

Die Tatsachen, dass Su(var)3-9 mit HDAC1 interagiert sowie mit seinem eigenen Substrat assoziiert, ermöglichen die Aufstellung von Hypothesen über die bis jetzt kaum erhelltte Ausbreitung von Heterochromatin in euchromatische Bereiche. Durch die Wechselwirkung mit der Deacetylase könnte Su(var)3-9 auch in aktiv transkribierte Bereiche vordringen und diese methylieren. Die Acetylierung, Zeichen für aktive Transkription, würde durch die Methylierung ersetzt werden. Die Interaktion mit seinem umgesetzten Substrat könnte

verhindern, dass das Enzym sich nach der Reaktion entfernt, vielmehr könnte Su(var)3-9 entlang eines DNA-Stranges sukzessive alle Nukleosomen methylieren. Die darauffolgende Bindung von HP1 an methyliertes H3-K9 könnte den heterochromatischen Charakter des Chromatins verstärken und für längere Zeit festlegen.

Aus *Drosophila*-Kernextrakten gelang es weiterhin, den E(Z)/ESC-Komplex über Säulenchromatographie aufzureinigen. Dieser enthält neben E(Z), ESC, p55 und Rpd3 auch Su(z)12. E(Z), ESC und Su(z)12 gehören der Polycomb-Gruppe an. Deren Funktion ist die dauerhafte Repression der homöotischen Gene. Sie spielen daher eine wichtige Rolle im „Zellgedächtnis“ während der frühen Entwicklung von *Drosophila*. Es konnte gezeigt werden, dass der E(Z)/ESC-Komplex Lysin 9 sowie Lysin 27 im Histon H3 methyliert. Außerdem wurde *in vitro* ein Teilkomplex aus rekombinantem E(Z), p55 und ESC rekonstituiert, der das Histon H3 methylieren kann. Ein Teilkomplex, der E(Z) mit mutierter SET-Domäne enthält, ist nicht in der Lage, H3 zu methylieren. Die Vorhersage, dass E(Z) aufgrund seiner SET-Domäne eine Methyltransferase sein müsse, konnte durch vorliegende Untersuchungen bestätigt werden.

Polycomb ist ein weiteres Protein aus der Polycomb-Gruppe. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Protein spezifisch an das Histon H3 bindet, das an K27 trimethyliert ist. Polycomb besitzt wie HP1 eine Chromodomäne.

Aus den vorliegenden Daten kann folgendes Modell aufgestellt werden: Nach der Methylierung von H3-K9 sowie H3-K27 durch den E(Z)/ESC-Komplex in homöotischen Genen, die schon abgeschaltet sind und weiterhin reprimiert werden müssen, bindet Polycomb an dieses Methylierungsmuster. Polycomb befindet sich in einem großen Komplex mit weiteren Polycomb-Gruppen-Proteinen. Die Bindung dieses Komplexes an Chromatin könnte ein denkbarer Mechanismus sein, wie die dauerhafte Repression der homöotischen Gene vermittelt wird.

Um den E(Z)/ESC-Komplex genauer untersuchen zu können, wurden Viren für das Baculosystem hergestellt, so dass eine Einzel- oder auch Coexpression der Proteine möglich ist.

Die Aktivität von E(Z), das im Baculosystem exprimiert wurde, ist nicht besonders hoch. Es bindet unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen weder an DNA, noch an Histone noch an H3-Peptide, die methyliert sind.



Innerhalb des E(Z)/ESC-Komplexes bindet E(Z) an p55, Rpd3, ESC sowie Su(z)12. Su(z)12 interagiert mit p55, Rpd3 und E(Z). Die weiteren Interaktionen werden am besten durch eine bildliche Darstellung (siehe Abb. 86) vermittelt.

In einem Luciferase-Assay wurde eine repressive Wirkung von E(Z) festgestellt. Dieses Experiment bedarf allerdings eines aktivierten Systems. Ferner muss durch Mutationsanalysen sichergestellt werden, dass die repressive Wirkung auf die Methyltransferase-Aktivität von E(Z) zurückzuführen ist.

Kürzlich wurde entdeckt, dass E(Z) sowie Su(z)12 in verschiedenen Tumoren überexprimiert sind. Noch ist weder deren Funktion in den Tumorzellen klar, noch weiss man, ob die Überexpression der Grund oder eine Folge der Tumorbildung ist, noch kennt man alle Zielgene, die durch eine Überexpression von E(Z) und Su(z)12 beeinflusst werden. In nächster Zeit sind hier Einsichten in die Wirkungsweise von E(Z), Su(z)12 und anderen Polycomb-Gruppen-Proteinen zu erwarten.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. and Jenuwein, T. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J*, **18**, 1923-1938.
- Aagaard, L., Schmid, M., Warburton, P. and Jenuwein, T. (2000) Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres. *J Cell Sci*, **113** ( Pt 5), 817-829.
- Abad, J.P., Carmena, M., Baars, S., Saunders, R.D., Glover, D.M., Ludena, P., Sentis, C., Tyler-Smith, C. and Villasante, A. (1992) Dodeca satellite: a conserved G+C-rich satellite from the centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4663-4667.
- Adler, P.N., Martin, E.C., Charlton, J. and Jones, K. (1991) Phenotypic consequences and genetic interactions of a null mutation in the *Drosophila* Posterior Sex Combs gene. *Dev Genet*, **12**, 349-361.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002a) Epigenetic consequences of nucleosome dynamics. *Cell*, **111**, 281-284.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002b) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, **9**, 1191-1200.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004) *Molekularbiologie der Zelle, Vierte Auflage*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Aletta, J.M., Cimato, T.R. and Ettinger, M.J. (1998) Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci*, **23**, 89-91.
- Allen, G.C., Spiker, S. and Thompson, W.F. (2000) Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol*, **43**, 361-376.
- 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**, 786-794.
- Allis, C.D., Bowen, J.K., Abraham, G.N., Glover, C.V. and Gorovsky, M.A. (1980) Proteolytic processing of histone H3 in chromatin: a physiologically regulated event in *Tetrahymena* micronuclei. *Cell*, **20**, 55-64.
- Althaus, F.R. (1992) Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J Cell Sci*, **102** ( Pt 4), 663-670.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell*, **11**, 1033-1041.
- Angelov, D., Vitolo, J.M., Mutskov, V., Dimitrov, S. and Hayes, J.J. (2001) Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6599-6604.
- Appels, R. and Hilliker, A.J. (1982) The cytogenetic boundaries of the rDNA region within heterochromatin in the X chromosome of *Drosophila melanogaster* and their relation to male meiotic pairing sites. *Genet Res*, **39**, 149-156.
- Avery, O., MacLeod, C, McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.*, **79**, 137-158.

- Avner, P. and Heard, E. (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, **2**, 59-67.
- Ayyanathan, K., Lechner, M.S., Bell, P., Maul, G.G., Schultz, D.C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K. and Rauscher, F.J., 3rd. (2003) Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev*, **17**, 1855-1869.
- Baneres, J.L., Martin, A. and Parello, J. (1997) The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J Mol Biol*, **273**, 503-508.
- Bannister, A.J., Schneider, R. and Kouzarides, T. (2002) Histone methylation: dynamic or static? *Cell*, **109**, 801-806.
- 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**, 120-124.
- Bauer, U.M., Daujat, S., Nielsen, S.J., Nightingale, K. and Kouzarides, T. (2002) Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep*, **3**, 39-44.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J. and Woodcock, C.L. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14173-14178.
- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. and Sauer, F. (2002) Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*, **419**, 857-862.
- Belz, T., Pham, A.D., Beisel, C., Anders, N., Bogin, J., Kwozynski, S. and Sauer, F. (2002) In vitro assays to study protein ubiquitination in transcription. *Methods*, **26**, 233-244.
- Berezney, R. and Coffey, D.S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, **60**, 1410-1417.
- Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P. and Allshire, R.C. (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**, 2539-2542.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451-454.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Birve, A., Sengupta, A.K., Beuchle, D., Larsson, J., Kennison, J.A., Rasmuson-Lestander, A. and Muller, J. (2001) Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development*, **128**, 3371-3379.
- Bode, J. and Maass, K. (1988) Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry*, **27**, 4706-4711.
- Bornemann, D., Miller, E. and Simon, J. (1996) The Drosophila Polycomb group gene Sex comb on midleg (Scm) encodes a zinc finger protein with similarity to polyhomeotic protein. *Development*, **122**, 1621-1630.
- Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M. and Peterson, C.L. (2002) Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell*, **10**, 935-942.
- Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E. and Helin, K. (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J*, **22**, 5323-5335.

- Brasher, S.V., Smith, B.O., Fogh, R.H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P.R., Broadhurst, R.W., Ball, L.J., Murzina, N.V. and Laue, E.D. (2000) The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *Embo J*, **19**, 1587-1597.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M. and Broach, J.R. (1996) Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol*, **16**, 4349-4356.
- Breen, T.R. and Harte, P.J. (1991) Molecular characterization of the trithorax gene, a positive regulator of homeotic gene expression in *Drosophila*. *Mech Dev*, **35**, 113-127.
- Brehm, A., Tufteland, K.R., Aasland, R. and Becker, P.B. (2004) The many colours of chromodomains. *Bioessays*, **26**, 133-140.
- Breiling, A., Bonte, E., Ferrari, S., Becker, P.B. and Paro, R. (1999) The *Drosophila* polycomb protein interacts with nucleosomal core particles *In vitro* via its repression domain. *Mol Cell Biol*, **19**, 8451-8460.
- Breiling, A., Turner, B.M., Bianchi, M.E. and Orlando, V. (2001) General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature*, **412**, 651-655.
- Bridges, C. and Morgan, T. (1923) *Carnegie Inst. Washington Publ.*, **327**, 137.
- Briggs, S. D., Bryk, M., Strahl, B. D., Cheung, W. L., Davie, J. K., Dent, S. Y., Winston, F., Allis, C.D. (2001) Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **15**, 3286-3295.
- Briggs, S.D., Xiao, T., Sun, Z.W., Caldwell, J.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D. and Strahl, B.D. (2002) Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*, **418**, 498.
- Brizuela, B.J. and Kennison, J.A. (1997) The *Drosophila* homeotic gene *moira* regulates expression of engrailed and HOM genes in imaginal tissues. *Mech Dev*, **65**, 209-220.
- Brown, C.E., Lechner, T., Howe, L. and Workman, J.L. (2000) The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci*, **25**, 15-19.
- Brown, J.L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M.L. and Kassis, J.A. (1998) The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell*, **1**, 1057-1064.
- Brunk, B.P., Martin, E.C. and Adler, P.N. (1991) Molecular genetics of the Posterior sex combs/Suppressor 2 of zeste region of *Drosophila*: aberrant expression of the Suppressor 2 of zeste gene results in abnormal bristle development. *Genetics*, **128**, 119-132.
- Byvoet, P., Shepherd, G.R., Hardin, J.M. and Noland, B.J. (1972) The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, **148**, 558-567.
- Camporeale, G., Shubert, E.E., Sarath, G., Cerny, R. and Zempleni, J. (2004) K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *Eur J Biochem*, **271**, 2257-2263.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. and Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, **298**, 1039-1043.
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004a) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 155-164.

- Cao, R. and Zhang, Y. (2004b) SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Mol Cell*, **15**, 57-67.
- Carmen, A.A., Milne, L. and Grunstein, M. (2002) Acetylation of the yeast histone H4 N terminus regulates its binding to heterochromatin protein SIR3. *J Biol Chem*, **277**, 4778-4781.
- Carrasco, A.E., McGinnis, W., Gehring, W.J. and De Robertis, E.M. (1984) Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell*, **37**, 409-414.
- Carter, G.J. and van Holde, K. (1998) Self-association of linker histone H5 and of its globular domain: evidence for specific self-contacts. *Biochemistry*, **37**, 12477-12488.
- Cavalli, G. (2002) Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 269-278.
- Cavalli, G. and Paro, R. (1998) The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell*, **93**, 505-518.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*, **152**, 375-384.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2002) Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J Cell Biol*, **157**, 1113-1123.
- Chang, L., Loranger, S.S., Mizzen, C., Ernst, S.G., Allis, C.D. and Annunziato, A.T. (1997) Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry*, **36**, 469-480.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999a) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. and Courey, A.J. (1999b) A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev*, **13**, 2218-2230.
- Chen, G., Nguyen, P.H. and Courey, A.J. (1998) A role for Groucho tetramerization in transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **18**, 7259-7268.
- Chestier, A. and Yaniv, M. (1979) Rapid turnover of acetyl groups in the four core histones of simian virus 40 minichromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 46-50.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B. and Misteli, T. (2003) Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science*, **299**, 721-725.
- Cleard, F., Delattre, M. and Spierer, P. (1997) SU(VAR)3-7, a *Drosophila* heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation. *Embo J*, **16**, 5280-5288.
- Cleard, F. and Spierer, P. (2001) Position-effect variegation in *Drosophila*: the modifier Su(var)3-7 is a modular DNA-binding protein. *EMBO Rep*, **2**, 1095-1100.
- Cui, Y. and Bustamante, C. (2000) Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 127-132.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V. (2002) *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*, **111**, 185-196.
- Czermin, B., Schotta, G., Hulsman, B.B., Brehm, A., Becker, P.B., Reuter, G. and Imhof, A. (2001) Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep*, **2**, 915-919.

- Czvitkovich, S., Sauer, S., Peters, A.H., Deiner, E., Wolf, A., Laible, G., Opravil, S., Beug, H. and Jenuwein, T. (2001) Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mech Dev*, **107**, 141-153.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W. and Richmond, T.J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, **319**, 1097-1113.
- Davie, J.R., Lin, R. and Allis, C.D. (1991) Timing of the appearance of ubiquitinated histones in developing new macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Biochem Cell Biol*, **69**, 66-71.
- de Murcia, G., Huletsky, A. and Poirier, G.G. (1988) Modulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosylation). *Biochem Cell Biol*, **66**, 626-635.
- De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K. and Spierer, P. (1996) The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature*, **384**, 589-591.
- DeCamillis, M., Cheng, N.S., Pierre, D. and Brock, H.W. (1992) The polyhomeotic gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. *Genes Dev*, **6**, 223-232.
- Delattre, M., Spierer, A., Tonka, C.H. and Spierer, P. (2000) The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*: interaction between the heterochromatin-associated proteins Su(var)3-7 and HP1. *J Cell Sci*, **113 Pt 23**, 4253-4261.
- Desplan, C., Theis, J. and O'Farrell, P.H. (1985) The *Drosophila* developmental gene, engrailed, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature*, **318**, 630-635.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Dhillon, N. and Kamakaka, R.T. (2002) Breaking through to the other side: silencers and barriers. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 188-192.
- Dillon, N. and Festenstein, R. (2002) Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet*, **18**, 252-258.
- Dillon, N. and Grosveld, F. (1994) Chromatin domains as potential units of eukaryotic gene function. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 260-264.
- Dimitrov, S.I. and Moss, T. (1994) UV laser-induced protein-DNA crosslinking. *Methods Mol Biol*, **30**, 227-236.
- Donze, D. and Kamakaka, R.T. (2001) RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **20**, 520-531.
- Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2002) Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem*, **277**, 28368-28371.
- Driever, W. and Nusslein-Volhard, C. (1988a) The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell*, **54**, 95-104.
- Driever, W. and Nusslein-Volhard, C. (1988b) A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell*, **54**, 83-93.
- Duncan, I.M. (1982) Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **102**, 49-70.

- Dura, J.M., Brock, H.W. and Santamaria, P. (1985) Polyhomeotic: a gene of *Drosophila melanogaster* required for correct expression of segmental identity. *Mol Gen Genet*, **198**, 213-220.
- Eickbush, T.H. and Moudrianakis, E.N. (1978) The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*, **17**, 4955-4964.
- Eissenberg, J.C., Ge, Y.W. and Hartnett, T. (1994) Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem*, **269**, 21315-21321.
- Eissenberg, J.C. and Hartnett, T. (1993) A heat shock-activated cDNA rescues the recessive lethality of mutations in the heterochromatin-associated protein HP1 of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, **240**, 333-338.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V. and Elgin, S.C. (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9923-9927.
- Eissenberg, J.C., Morris, G.D., Reuter, G. and Hartnett, T. (1992) The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics*, **131**, 345-352.
- Erhardt, S., Su, I.H., Schneider, R., Barton, S., Bannister, A.J., Perez-Burgos, L., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Tarakhovskiy, A. and Surani, M.A. (2003) Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development*, **130**, 4235-4248.
- Eskeland, R., Czermin, B., Boeke, J., Bonaldi, T., Regula, J.T. and Imhof, A. (2004) The N-Terminus of *Drosophila* SU(VAR)3-9 Mediates Dimerization and Regulates Its Methyltransferase Activity. *Biochemistry*, **43**, 3740-3749.
- Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C. and Tremethick, D.J. (2002) The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol*, **9**, 172-176.
- Fanti, L., Berloco, M., Piacentini, L. and Pimpinelli, S. (2003) Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica*, **117**, 135-147.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M. and Pimpinelli, S. (1998) The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell*, **2**, 527-538.
- Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H. and Karch, F. (1994) The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature*, **371**, 806-808.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, **421**, 448-453.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K. and Zhang, Y. (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol*, **12**, 1052-1058.
- Festenstein, R., Pagakis, S.N., Hiragami, K., Lyon, D., Verreault, A., Sekkali, B. and Kioussis, D. (2003) Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science*, **299**, 719-721.
- Festenstein, R., Tolaini, M., Corbella, P., Mamalaki, C., Parrington, J., Fox, M., Miliou, A., Jones, M. and Kioussis, D. (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science*, **271**, 1123-1125.
- Finch, J.T. and Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1897-1901.

- Firestein, R., Cui, X., Huie, P. and Cleary, M.L. (2000) Set domain-dependent regulation of transcriptional silencing and growth control by SUV39H1, a mammalian ortholog of *Drosophila* Su(var)3-9. *Mol Cell Biol*, **20**, 4900-4909.
- Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C.D. (2003a) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*, **425**, 475-479.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D. and Khorasanizadeh, S. (2003b) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*, **17**, 1870-1881.
- Fisher, A.L., Ohsako, S. and Caudy, M. (1996) The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol Cell Biol*, **16**, 2670-2677.
- Forrester, W.C., van Genderen, C., Jenuwein, T. and Grosschedl, R. (1994) Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science*, **265**, 1221-1225.
- Fourel, G., Magdinier, F. and Gilson, E. (2004) Insulator dynamics and the setting of chromatin domains. *Bioessays*, **26**, 523-532.
- Francisco, L., Wang, W. and Chan, C.S. (1994) Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, **14**, 4731-4740.
- Fritsch, C., Beuchle, D. and Muller, J. (2003) Molecular and genetic analysis of the Polycomb group gene *Sex combs extra/Ring* in *Drosophila*. *Mech Dev*, **120**, 949-954.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. and Ausio, J. (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem*, **270**, 17923-17928.
- Gary, J.D. and Clarke, S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **61**, 65-131.
- Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell*, **46**, 521-530.
- Gehring, W.J. (1987) Homeo boxes in the study of development. *Science*, **236**, 1245-1252.
- Gehring, W.J. and Hiromi, Y. (1986) Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet*, **20**, 147-173.
- Gerasimova, T.I., Byrd, K. and Corces, V.G. (2000) A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Mol Cell*, **6**, 1025-1035.
- Ghirlando, R., Litt, M.D., Prioleau, M.N., Recillas-Targa, F. and Felsenfeld, G. (2004) Physical properties of a genomic condensed chromatin fragment. *J Mol Biol*, **336**, 597-605.
- Golderer, G. and Grobner, P. (1991) ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies. *Biochem J*, **277** ( Pt 3), 607-610.
- Graham, A., Papalopulu, N. and Krumlauf, R. (1989) The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell*, **57**, 367-378.
- Grewal, S.I. and Klar, A.J. (1997) A recombinationally repressed region between *mat2* and *mat3* loci shares homology to centromeric repeats and regulates directionality of mating-type switching in fission yeast. *Genetics*, **146**, 1221-1238.
- Grove, G.W. and Zweidler, A. (1984) Regulation of nucleosomal core histone variant levels in differentiating murine erythroleukemia cells. *Biochemistry*, **23**, 4436-4443.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.



- Guarente, L. (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev*, **14**, 1021-1026.
- Guo, X.W., Th'ng, J.P., Swank, R.A., Anderson, H.J., Tudan, C., Bradbury, E.M. and Roberge, M. (1995) Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *Embo J*, **14**, 976-985.
- Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. and Grewal, S.I. (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, **297**, 2232-2237.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Hansen, J.C. (2002) Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **31**, 361-392.
- Hansen, J.C., Ausio, J., Stanik, V.H. and van Holde, K.E. (1989) Homogeneous reconstituted oligonucleosomes, evidence for salt-dependent folding in the absence of histone H1. *Biochemistry*, **28**, 9129-9136.
- Hansen, J.C., Tse, C. and Wolffe, A.P. (1998) Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry*, **37**, 17637-17641.
- Hansen, J.C., van Holde, K.E. and Lohr, D. (1991) The mechanism of nucleosome assembly onto oligomers of the sea urchin 5 S DNA positioning sequence. *J Biol Chem*, **266**, 4276-4282.
- Harding, K.W., Gellon, G., McGinnis, N. and McGinnis, W. (1995) A screen for modifiers of Deformed function in Drosophila. *Genetics*, **140**, 1339-1352.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J. and Workman, J.L. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, **111**, 369-379.
- Haupt, Y., Alexander, W.S., Barri, G., Klinken, S.P. and Adams, J.M. (1991) Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*, **65**, 753-763.
- Heard, E., Rougeulle, C., Arnaud, D., Avner, P., Allis, C.D. and Spector, D.L. (2001) Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell*, **107**, 727-738.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, **387**, 43-48.
- Heitz, E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. *I Jb Wiss Bot 1928*, **69**, 762-818.
- Heitz, E. (1934) Die somatische Heteropyknose bei Drosophila melanogaster und ihre genetische Bedeutung (Cytologische Untersuchungen an Dipteren, III). *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **20**.
- Henikoff, S., Furuyama, T. and Ahmad, K. (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet*, **20**, 320-326.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A. and Berger, S.L. (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev*, **17**, 2648-2663.

- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P. and Bradbury, E.M. (1993) Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem*, **268**, 305-314.
- Hoppe, G.J., Tanny, J.C., Rudner, A.D., Gerber, S.A., Danaie, S., Gygi, S.P. and Moazed, D. (2002) Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol Cell Biol*, **22**, 4167-4180.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S. and Pirrotta, V. (2000) Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol*, **20**, 3187-3197.
- Horita, D.A., Ivanova, A.V., Altieri, A.S., Klar, A.J. and Byrd, R.A. (2001) Solution structure, domain features, and structural implications of mutants of the chromo domain from the fission yeast histone methyltransferase Clr4. *J Mol Biol*, **307**, 861-870.
- Horowitz, R.A., Agard, D.A., Sedat, J.W. and Woodcock, C.L. (1994) The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol*, **125**, 1-10.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Huletsky, A., de Murcia, G., Muller, S., Hengartner, M., Menard, L., Lamarre, D. and Poirier, G.G. (1989) The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. *J Biol Chem*, **264**, 8878-8886.
- Hymes, J. and Wolf, B. (1999) Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr*, **129**, 485S-489S.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, **403**, 795-800.
- Ingham, P.W. (1985) A clonal analysis of the requirement for the trithorax gene in the diversification of segments in *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol*, **89**, 349-365.
- Ishii, K. and Laemmli, U.K. (2003) Structural and dynamic functions establish chromatin domains. *Mol Cell*, **11**, 237-248.
- Ishimi, Y., Hirosumi, J., Sato, W., Sugawara, K., Yokota, S., Hanaoka, F. and Yamada, M. (1984) Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur J Biochem*, **142**, 431-439.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T. and Jacobsen, S.E. (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, **112**, 308-315.
- Jacobs, S.A., Harp, J.M., Devarakonda, S., Kim, Y., Rastinejad, F. and Khorasanizadeh, S. (2002) The active site of the SET domain is constructed on a knot. *Nat Struct Biol*, **9**, 833-838.
- Jacobs, S.A. and Khorasanizadeh, S. (2002) Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science*, **295**, 2080-2083.

- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eisenberg, J.C., Allis, C.D. and Khorasanizadeh, S. (2001) Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J*, **20**, 5232-5241.
- Jacobson, M.K. and Jacobson, E.L. (1999) Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem Sci*, **24**, 415-417.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. and Tjian, R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science*, **288**, 1422-1425.
- James, T.C., Eisenberg, J.C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A. and Elgin, S.C. (1989) Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol*, **50**, 170-180.
- James, T.C. and Elgin, S.C. (1986) Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol*, **6**, 3862-3872.
- Jantz, D., Amann, B.T., Gatto, G.J., Jr. and Berg, J.M. (2004) The design of functional DNA-binding proteins based on zinc finger domains. *Chem Rev*, **104**, 789-799.
- Jenuwein, T. (2001) Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol*, **11**, 266-273.
- Jenuwein, T., Forrester, W.C., Fernandez-Herrero, L.A., Laible, G., Dull, M. and Grosschedl, R. (1997) Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature*, **385**, 269-272.
- Jones, C.A., Ng, J., Peterson, A.J., Morgan, K., Simon, J. and Jones, R.S. (1998a) The *Drosophila* esc and E(z) proteins are direct partners in polycomb group-mediated repression. *Mol Cell Biol*, **18**, 2825-2834.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998b) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, **19**, 187-191.
- Jones, R.S. and Gelbart, W.M. (1990) Genetic analysis of the enhancer of zeste locus and its role in gene regulation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **126**, 185-199.
- Jones, R.S. and Gelbart, W.M. (1993) The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol*, **13**, 6357-6366.
- Kadosh, D. and Struhl, K. (1997) Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell*, **89**, 365-371.
- Kappus, S., Apweiler, R., White, C.J. and Whish, W.J. (1993) In vitro poly-(ADP-ribosylation) of chromatin proteins in the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Comp Biochem Physiol B*, **104**, 711-716.
- Karantza, V., Freire, E. and Moudrianakis, E.N. (1996) Thermodynamic studies of the core histones: pH and ionic strength effects on the stability of the (H3-H4)/(H3-H4)<sub>2</sub> system. *Biochemistry*, **35**, 2037-2046.
- Kass, S.U., Landsberger, N. and Wolffe, A.P. (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol*, **7**, 157-165.
- Kasten, M.M., Dorland, S. and Stillman, D.J. (1997) A large protein complex containing the yeast Sin3p and Rpd3p transcriptional regulators. *Mol Cell Biol*, **17**, 4852-4858.
- Kaufman, T.C. (1983) *Time, Space and Pattern in Embryonic Development*, p 365-383. Liss, New York.
- Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259-272.

- Kimura, H. and Cook, P.R. (2001) Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol*, **153**, 1341-1353.
- King, I.F., Francis, N.J. and Kingston, R.E. (2002) Native and recombinant polycomb group complexes establish a selective block to template accessibility to repress transcription in vitro. *Mol Cell Biol*, **22**, 7919-7928.
- Kirmizis, A., Bartley, S.M. and Farnham, P.J. (2003) Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, **2**, 113-121.
- Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Hayes, D.F., Sabel, M.S., Livant, D., Weiss, S.J., Rubin, M.A. and Chinnaiyan, A.M. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11606-11611.
- Kogl, F., Tonis, B. (1936) Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **242**, 43-73.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H. and Stallcup, M.R. (2001) Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*, **276**, 1089-1098.
- Kossel, A. (1911) Über die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. *Münchner Med. Wochenschrift*, **58**, 65-69.
- Krauss, V. and Reuter, G. (2000) Two genes become one: the genes encoding heterochromatin protein Su(var)3-9 and translation initiation factor subunit eIF-2gamma are joined to a dicistronic unit in holometabolic insects. *Genetics*, **156**, 1157-1167.
- Krogan, N.J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Ryan, O.W., Golshani, A., Johnston, M., Greenblatt, J.F. and Shilatifard, A. (2003) The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell*, **11**, 721-729.
- Krude, T. and Keller, C. (2001) Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 665-672.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., Reinberg, D. (2004) Different Ezh2-Containing Complexes Target Methylation of Histone H1 or Nucleosomal H3. *Molecular Cell*, **14**, 183-193.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev*, **16**, 2893-2905.
- Kwon, T., Chang, J.H., Kwak, E., Lee, C.W., Joachimiak, A., Kim, Y.C., Lee, J. and Cho, Y. (2003) Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9-AdoMet. *Embo J*, **22**, 292-303.
- Labrador, M. and Corces, V.G. (2002) Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell*, **111**, 151-154.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J. and Jenuwein, T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*, **116**, 2117-2124.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L. and Jenuwein, T. (1997) Mammalian homologues of the Polycomb-group gene

- Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *Embo J*, **16**, 3219-3232.
- Langst, G. and Becker, P.B. (2001) Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J Cell Sci*, **114**, 2561-2568.
- Lavigne, M., Francis, N.J., King, I.F. and Kingston, R.E. (2004) Propagation of silencing; recruitment and repression of naive chromatin in trans by polycomb repressed chromatin. *Mol Cell*, **13**, 415-425.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, **72**, 73-84.
- Lefevre, G. (1976) "The polytene chromosomes" (31-66) in "The Genetics and Biology of *Drosophila*". Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Leuba, S.H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., van Holde, K., Zlatanova, J. and Bustamante, C. (1994) Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11621-11625.
- Levine, M., Rubin, G.M. and Tjian, R. (1984) Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila*. *Cell*, **38**, 667-673.
- Levine, S.S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P. and Kingston, R.E. (2002) The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol*, **22**, 6070-6078.
- Lewis, E.B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, **276**, 565-570.
- Li, W., Nagaraja, S., Delcuve, G.P., Hendzel, M.J. and Davie, J.R. (1993) Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J*, **296** ( Pt 3), 737-744.
- Ling, X., Harkness, T.A., Schultz, M.C., Fisher-Adams, G. and Grunstein, M. (1996) Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev*, **10**, 686-699.
- Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D. and Felsenfeld, G. (2001a) Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*, **293**, 2453-2455.
- Litt, M.D., Simpson, M., Recillas-Targa, F., Prioleau, M.N. and Felsenfeld, G. (2001b) Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *Embo J*, **20**, 2224-2235.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R. and Berger, S.L. (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*, **5**, 917-926.
- Locke, J., Kotarski, M.A. and Tartof, K.D. (1988) Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics*, **120**, 181-198.
- 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**, 251-260.
- Luger, K. and Richmond, T.J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 140-146.
- Lyko, F. and Paro, R. (1999) Chromosomal elements conferring epigenetic inheritance. *Bioessays*, **21**, 824-832.

- Macdonald, P.M., Ingham, P. and Struhl, G. (1986) Isolation, structure, and expression of even-skipped: a second pair-rule gene of *Drosophila* containing a homeo box. *Cell*, **47**, 721-734.
- Mahadevan, L.C., Willis, A.C. and Barratt, M.J. (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*, **65**, 775-783.
- Mannervik, M. and Levine, M. (1999) The Rpd3 histone deacetylase is required for segmentation of the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6797-6801.
- Marsden, M.P. and Laemmli, U.K. (1979) Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*, **17**, 849-858.
- Martin, E.C. and Adler, P.N. (1993) The Polycomb group gene Posterior Sex Combs encodes a chromosomal protein. *Development*, **117**, 641-655.
- Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A. and Kouzarides, T. (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J*, **19**, 662-671.
- Martinez-Balbas, M.A., Tsukiyama, T., Gdula, D. and Wu, C. (1998) *Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 132-137.
- Martini, E., Roche, D.M., Marheineke, K., Verreault, A. and Almouzni, G. (1998) Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J Cell Biol*, **143**, 563-575.
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A. and Gehring, W.J. (1984a) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, **37**, 403-408.
- McGinnis, W., Hart, C.P., Gehring, W.J. and Ruddle, F.H. (1984b) Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell*, **38**, 675-680.
- Meehan, R.R., Kao, C.F. and Pennings, S. (2003) HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *Embo J*, **22**, 3164-3174.
- Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G. and Jenuwein, T. (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol*, **20**, 3728-3741.
- Meneghini, M.D., Wu, M. and Madhani, H.D. (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, **112**, 725-736.
- Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F. and Fraser, P. (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*, **87**, 105-114.
- Min, J., Zhang, X., Cheng, X., Grewal, S.I. and Xu, R.M. (2002) Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nat Struct Biol*, **9**, 828-832.
- Min, J., Zhang, Y. and Xu, R.M. (2003) Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev*, **17**, 1823-1828.
- Mishra, S.K. and Das, B.R. (1992) (ADP-ribosyl)ation pattern of chromosomal proteins during ageing. *Cell Mol Biol*, **38**, 457-462.
- Moazed, D. (2001) Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell*, **8**, 489-498.

- Morgan, M.M. and Mahowald, A.P. (1996) Multiple signaling pathways establish both the individuation and the polarity of the oocyte follicle in *Drosophila*. *Arch Insect Biochem Physiol*, **33**, 211-230.
- Mulholland, N.M., King, I.F. and Kingston, R.E. (2003) Regulation of Polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA. *Genes Dev*, **17**, 2741-2746.
- Muller, H. (1930) Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* 1930, **22**, 299 - 334.
- Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E. and Simon, J.A. (2002) Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell*, **111**, 197-208.
- Murray, K. (1964) The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry*, **127**, 10-15.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E. and Stillman, B. (1999) Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell*, **4**, 529-540.
- Mutskov, V., Gerber, D., Angelov, D., Ausio, J., Workman, J. and Dimitrov, S. (1998) Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol Cell Biol*, **18**, 6293-6304.
- Mutskov, V.J., Farrell, C.M., Wade, P.A., Wolffe, A.P. and Felsenfeld, G. (2002) The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes Dev*, **16**, 1540-1554.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.
- Ng, H.H., Ciccone, D.N., Morshead, K.B., Oettinger, M.A. and Struhl, K. (2003a) Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1820-1825.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2003b) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*, **11**, 709-719.
- Ng, J., Hart, C.M., Morgan, K. and Simon, J.A. (2000) A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol*, **20**, 3069-3078.
- Ng, J., Li, R., Morgan, K. and Simon, J. (1997) Evolutionary conservation and predicted structure of the *Drosophila* extra sex combs repressor protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 6663-6672.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V. and Laue, E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, **416**, 103-107.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E. and Kouzarides, T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **412**, 561-565.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002a) Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev*, **16**, 479-489.
- Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., Lis, J.T., Allis, C.D. and

- Reinberg, D. (2002b) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell*, **9**, 1201-1213.
- Noma, K., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*, **293**, 1150-1155.
- Nusslein-Volhard, C. (1979) *Determinants of Spatial Organization*, p 185. Academic Press, New York.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, **287**, 795-801.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A. and Jenuwein, T. (2001) The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol*, **21**, 4330-4336.
- O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D., Schweizer, D. and Jenuwein, T. (2000) Isolation and characterization of *Suv39h2*, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol*, **20**, 9423-9433.
- Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D. and Heard, E. (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, **303**, 644-649.
- Olins, D.E. and Olins, A.L. (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 809-814.
- Osley, M.A. (1991) The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem*, **60**, 827-861.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, **4**, 281-300.
- Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D.W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P. and Botchan, M.R. (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*, **91**, 311-323.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H. and Margolis, R.L. (1991) Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3734-3738.
- Pardue, M.L. and Gall, J.G. (1970) Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, **168**, 1356-1358.
- Paro, R. and Hogness, D.S. (1991) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 263-267.
- Paulson, J.R. and Laemmli, U.K. (1977) The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, **12**, 817-828.
- Payre, F., Crozatier, M. and Vincent, A. (1994) Direct control of transcription of the *Drosophila* morphogen *bicoid* by the serendipity delta zinc finger protein, as revealed by in vivo analysis of a finger swap. *Genes Dev*, **8**, 2718-2728.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M. and Jenuwein, T. (2001) Loss of the *Suv39h* histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, **107**, 323-337.
- Pham, A.D. and Sauer, F. (2000) Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science*, **289**, 2357-2369.



- Phillips, D.M. (1963) The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J*, **87**, 258-263.
- Pickart, C.M. and Cohen, R.E. (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 177-187.
- Pirrotta, V., Poux, S., Melfi, R. and Pilyugin, M. (2003) Assembly of Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Genetica*, **117**, 191-197.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B. and Zhang, Y. (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, **300**, 131-135.
- Poux, S., McCabe, D. and Pirrotta, V. (2001a) Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development*, **128**, 75-85.
- Poux, S., Melfi, R. and Pirrotta, V. (2001b) Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev*, **15**, 2509-2514.
- Qian, Y.W., Wang, Y.C., Hollingsworth, R.E., Jr., Jones, D., Ling, N. and Lee, E.Y. (1993) A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature*, **364**, 648-652.
- Raaphorst, F.M., van Kemenade, F.J., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K.M., Satijn, D.P., Otte, A.P. and Meijer, C.J. (2000) Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **157**, 709-715.
- Ramsden, D. and Zhang, Y. (2003) Everything is E(Z): linking histone methylation to B cell development. *Nat Immunol*, **4**, 101-103.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M., Lipinski, M. and Almouzni, G. (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell*, **9**, 1091-1100.
- 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. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Reinhart, B.J. and Bartel, D.P. (2002) Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, **297**, 1831.
- Reuter, G. and Spierer, P. (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays*, **14**, 605-612.
- Reuter, G. and Szidonya, J. (1983) Cytogenetic analysis of variegation suppressors and a dominant temperature-sensitive lethal in region 23-26 of chromosome 2L in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **88**, 277-285.
- Reuter, G., Wolff, I. and Friede, B. (1985) Functional properties of the heterochromatic sequences inducing wm4 position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **93**, 132-139.
- Reuter, R. and Scott, M.P. (1990) Expression and function of the homoeotic genes Antennapedia and Sex combs reduced in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development*, **109**, 289-303.
- Richmond, T.J. and Davey, C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, **423**, 145-150.
- Rietzler, M., Bittner, M., Kolanus, W., Schuster, A. and Holzmann, B. (1998) The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *J Biol Chem*, **273**, 27459-27466.
- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S.K., Wang, A., Suka, N. and Grunstein, M. (2002) Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell*, **109**, 437-446.

- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**, 5858-5868.
- Rougeulle, C., Chaumeil, J., Sarma, K., Allis, C.D., Reinberg, D., Avner, P. and Heard, E. (2004) Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol Cell Biol*, **24**, 5475-5484.
- Rushlow, C.A., Han, K., Manley, J.L. and Levine, M. (1989) The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell*, **59**, 1165-1177.
- Saffery, R., Sumer, H., Hassan, S., Wong, L.H., Craig, J.M., Todokoro, K., Anderson, M., Stafford, A. and Choo, K.H. (2003) Transcription within a functional human centromere. *Mol Cell*, **12**, 509-516.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002) Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**, 407-411.
- Sathe, S.S. and Harte, P.J. (1995) The *Drosophila* extra sex combs protein contains WD motifs essential for its function as a repressor of homeotic genes. *Mech Dev*, **52**, 77-87.
- Schneuwly, S., Klemenz, R. and Gehring, W.J. (1987) Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature*, **325**, 816-818.
- Schotta, G., Ebert, A., Dorn, R. and Reuter, G. (2003a) 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**, 1121-1131.
- Schotta, G., Ebert, A. and Reuter, G. (2003b) SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica*, **117**, 149-158.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., Jenuwein, T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, **18**, 1251-1262.
- Schotta, G. and Reuter, G. (2000) Controlled expression of tagged proteins in *Drosophila* using a new modular P-element vector system. *Mol Gen Genet*, **262**, 916-920.
- Schumacher, A., Faust, C. and Magnuson, T. (1996) Positional cloning of a global regulator of anterior-posterior patterning in mice. *Nature*, **384**, 648.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W. and Kingston, R.E. (1999) Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*, **98**, 37-46.
- Shiio, Y. and Eisenman, R.N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13225-13230.
- Shirokawa, J.M. and Courey, A.J. (1997) A direct contact between the dorsal rel homology domain and Twist may mediate transcriptional synergy. *Mol Cell Biol*, **17**, 3345-3355.
- Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T.B., Webster, Z., Peters, A.H., Jenuwein, T., Otte, A.P. and Brockdorff, N. (2003) Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell*, **4**, 481-495.

- Simon, J., Bornemann, D., Lunde, K. and Schwartz, C. (1995) The extra sex combs product contains WD40 repeats and its time of action implies a role distinct from other Polycomb group products. *Mech Dev*, **53**, 197-208.
- Simon, J.A. (2003) Polycomb group proteins. *Curr Biol*, **13**, R79-80.
- Simpson, R.T., Thoma, F. and Brubaker, J.M. (1985) Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure. *Cell*, **42**, 799-808.
- Sims, R.J., 3rd, Nishioka, K. and Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*, **19**, 629-639.
- Sinclair, D.A., Milne, T.A., Hodgson, J.W., Shellard, J., Salinas, C.A., Kyba, M., Randazzo, F. and Brock, H.W. (1998) The Additional sex combs gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. *Development*, **125**, 1207-1216.
- Smith, R.M. and Rill, R.L. (1989) Mobile histone tails in nucleosomes. Assignments of mobile segments and investigations of their role in chromatin folding. *J Biol Chem*, **264**, 10574-10581.
- Smith, S. and Stillman, B. (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell*, **58**, 15-25.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K. and Neer, E.J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, **24**, 181-185.
- Smothers, J.F. and Henikoff, S. (2000) The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol*, **10**, 27-30.
- Sobel, R.E., Cook, R.G. and Allis, C.D. (1994) Non-random acetylation of histone H4 by a cytoplasmic histone acetyltransferase as determined by novel methodology. *J Biol Chem*, **269**, 18576-18582.
- Spofford, J.B. (1967) Single-locus modification of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. I. White variegation. *Genetics*, **57**, 751-766.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G. and Allis, C.D. (1999) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14967-14972.
- Struhl, G. (1981a) A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature*, **293**, 36-41.
- Struhl, G. (1981b) A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature*, **292**, 635-638.
- Struhl, G. and Brower, D. (1982) Early role of the *esc+* gene product in the determination of segments in *Drosophila*. *Cell*, **31**, 285-292.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89.
- Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T. and Tarakhovskiy, A. (2003) *Ezh2* controls B cell development through histone H3 methylation and *Igh* rearrangement. *Nat Immunol*, **4**, 124-131.
- Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J. and Grunstein, M. (2001) Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell*, **8**, 473-479.
- Sun, F.L., Cuaycong, M.H. and Elgin, S.C. (2001) Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in *Drosophila melanogaster* pericentric heterochromatin. *Mol Cell Biol*, **21**, 2867-2879.

- Sun, Z.W. and Allis, C.D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, **418**, 104-108.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, **116**, 51-61.
- Tamaru, H. and Selker, E.U. (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, **414**, 277-283.
- Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C. and Kennison, J.A. (1992) *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*, **68**, 561-572.
- Tanny, J.C., Dowd, G.J., Huang, J., Hilz, H. and Moazed, D. (1999) An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell*, **99**, 735-745.
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, **83**, 403-427.
- Thomson, S., Clayton, A.L. and Mahadevan, L.C. (2001) Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol Cell*, **8**, 1231-1241.
- Tie, F., Furuyama, T. and Harte, P.J. (1998) The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) bind directly to each other and co-localize at multiple chromosomal sites. *Development*, **125**, 3483-3496.
- Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E. and Harte, P.J. (2001) The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development*, **128**, 275-286.
- Tie, F., Prasad-Sinha, J., Birve, A., Rasmuson-Lestander, A. and Harte, P.J. (2003) A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from *Drosophila* that contains polycomblike and RPD3. *Mol Cell Biol*, **23**, 3352-3362.
- Triebel, R.C., Beach, B.M., Dirk, L.M., Houtz, R.L. and Hurley, J.H. (2002) Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase. *Cell*, **111**, 91-103.
- Tripoulas, N.A., Hersperger, E., La Jeunesse, D. and Shearn, A. (1994) Molecular genetic analysis of the *Drosophila melanogaster* gene *absent, small or homeotic discs1* (*ash1*). *Genetics*, **137**, 1027-1038.
- 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**, 3822-3831.
- 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**, 375-384.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, **13**, 3191-3197.
- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T. and Kadonaga, J.T. (1999) The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature*, **402**, 555-560.
- Tyler, J.K., Bulger, M., Kamakaka, R.T., Kobayashi, R. and Kadonaga, J.T. (1996) The p55 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Mol Cell Biol*, **16**, 6149-6159.

- Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amriott, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R. and Kadonaga, J.T. (2001) Interaction between the Drosophila CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol Cell Biol*, **21**, 6574-6584.
- van der Voorn, L. and Ploegh, H.L. (1992) The WD-40 repeat. *FEBS Lett*, **307**, 131-134.
- van Holde, K. (1988) *Chromatin*. New York Springer-Verlag.
- van Holde, K. and Zlatanova, J. (1995) Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *J Biol Chem*, **270**, 8373-8376.
- van Leeuwen, F., Gafken, P.R. and Gottschling, D.E. (2002) Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell*, **109**, 745-756.
- van Leeuwen, F. and Gottschling, D.E. (2002) Genome-wide histone modifications: gaining specificity by preventing promiscuity. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 756-762.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. and Trouche, D. (2001) Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol*, **21**, 6484-6494.
- Vaquero, A., Loyola, A. and Reinberg, D. (2003) The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ*, **2003**, RE4.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Rubin, M.A. and Chinnaiyan, A.M. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, **419**, 624-629.
- Vaute, O., Nicolas, E., Vandel, L. and Trouche, D. (2002) Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, **30**, 475-481.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1998) Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol*, **8**, 96-108.
- Vettese-Dadey, M., Grant, P.A., Hebbes, T.R., Crane-Robinson, C., Allis, C.D. and Workman, J.L. (1996) Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo J*, **15**, 2508-2518.
- 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**, 6317-6327.
- Visser, H.P., Gunster, M.J., Kluin-Nelemans, H.C., Manders, E.M., Raaphorst, F.M., Meijer, C.J., Willemze, R. and Otte, A.P. (2001) The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **112**, 950-958.
- Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N. and Grunstein, M. (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature*, **408**, 495-498.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
- Wakimoto, B.T., Turner, F.R. and Kaufman, T.C. (1984) Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, **102**, 147-172.
- Wallrath, L.L. and Elgin, S.C. (1995) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev*, **9**, 1263-1277.
- Wan, K.M., Nickerson, J.A., Krockmalnic, G. and Penman, S. (1999) The nuclear matrix prepared by amine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 933-938.
- Wang, A., Kurdistani, S.K. and Grunstein, M. (2002) Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science*, **298**, 1412-1414.

- Wang, C. and Lehmann, R. (1991) Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*, **66**, 637-647.
- Wang, G., Ma, A., Chow, C.M., Horsley, D., Brown, N.R., Cowell, I.G. and Singh, P.B. (2000) Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol Cell Biol*, **20**, 6970-6983.
- Wang, L., Brown, J.L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J.A. and Jones, R.S. (2004) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell*, **14**, 637-646.
- Waterborg, J.H. (1993) Histone synthesis and turnover in alfalfa. Fast loss of highly acetylated replacement histone variant H3.2. *J Biol Chem*, **268**, 4912-4917.
- Weinmann, A.S., Bartley, S.M., Zhang, T., Zhang, M.Q. and Farnham, P.J. (2001) Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol Cell Biol*, **21**, 6820-6832.
- Weintraub, H. and Groudine, M. (1976) Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*, **193**, 848-856.
- West, A.G., Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2002) Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev*, **16**, 271-288.
- Widom, J. and Klug, A. (1985) Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, **43**, 207-213.
- Wilson, J.R., Jing, C., Walker, P.A., Martin, S.R., Howell, S.A., Blackburn, G.M., Gamblin, S.J. and Xiao, B. (2002) Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9. *Cell*, **111**, 105-115.
- Woodcock, C.L., Grigoryev, S.A., Horowitz, R.A. and Whitaker, N. (1993) A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9021-9025.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, **67**, 545-579.
- Xiao, B., Jing, C., Wilson, J.R., Walker, P.A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I.A., Blackburn, G.M. and Gamblin, S.J. (2003a) Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature*, **421**, 652-656.
- Xiao, B., Wilson, J.R. and Gamblin, S.J. (2003b) SET domains and histone methylation. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 699-705.
- Yamamoto, K., Sonoda, M., Inokuchi, J., Shirasawa, S. and Sasazuki, T. (2004) Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1alpha and enhancer of zeste 2. *J Biol Chem*, **279**, 401-406.
- Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J.C. and Worman, H.J. (1997) Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem*, **272**, 14983-14989.
- Ye, Q. and Worman, H.J. (1996) Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem*, **271**, 14653-14656.
- Yeates, T.O. (2002) Structures of SET domain proteins: protein lysine methyltransferases make their mark. *Cell*, **111**, 5-7.
- Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D. and Kouzarides, T. (2002) Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem*, **277**, 11621-11624.
- Zhang, X., Tamaru, H., Khan, S.I., Horton, J.R., Keefe, L.J., Selker, E.U. and Cheng, X. (2002) Structure of the *Neurospora* SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell*, **111**, 117-127.

- Zhang, X., Yang, Z., Khan, S.I., Horton, J.R., Tamaru, H., Selker, E.U. and Cheng, X. (2003) Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol Cell*, **12**, 177-185.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, **13**, 1924-1935.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, **15**, 2343-2360.
- Zhao, T. and Eissenberg, J.C. (1999) Phosphorylation of heterochromatin protein 1 by casein kinase II is required for efficient heterochromatin binding in *Drosophila*. *J Biol Chem*, **274**, 15095-15100.
- Zhao, T., Heyduk, T. and Eissenberg, J.C. (2001) Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem*, **276**, 9512-9518.
- Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A. and Muyltermans, S. (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature*, **395**, 402-405.
- Zink, B., Engstrom, Y., Gehring, W.J. and Paro, R. (1991) Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Embo J*, **10**, 153-162.

## 8 DANKSAGUNG

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter B. Becker bedanke ich mich sehr herzlich für die Betreuung und Förderung dieser Arbeit, die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen sowie die stete Gesprächsbereitschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Axel Imhof für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung, das fortwährende enthusiastische Interesse an allen Experimenten, seine große Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung bei jeglichen auftauchenden Fragen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Rudolf Grosschedl für die Übernahme der Fachvertretung vor der chemischen Fakultät sowie die Übernahme des Zweitgutachtens – trotz Umzug nach Freiburg -, Prof. Dr. K.-P. Hopfner für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission, sowie Prof. P. Cramer, Prof. Dr. A. Pfeifer und Prof. R.-P. Jansen für ihre Teilnahme an der Prüfungskommission.

Außerdem bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern V. Pirrotta (Genf), G. Reuter und Gunnar Schotta (Halle) für die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen des „Imhof-Labors“, Ragnhild Eskeland, Pierre Schilcher, Jörn Böke, Tiziana Bonaldi, Volker Seitz und Emilia Klankki für die gute Zusammenarbeit, die anregenden fachlichen Diskussionen, die stete Hilfsbereitschaft, sowie den Spaß im Labor.

Vielen Dank auch an Gernot Längst und Tobias Straub für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei jeder Art von Computerproblem, Daisy Schwarzlose für ihre Unterstützung in der Zellkultur, Heike Mitlöhner für die Bereitstellung von Medien und Fliegen-Agarplatten sowie allen Mitarbeitern der hauseigenen Werkstatt.

Ich danke Irene Vetter und Stefan Erhard für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Außerdem gilt mein Dank allen jetzigen und früheren Mitgliedern des „Becker-Lehrstuhles“ für permanente Diskussionsbereitschaft, Hilfsbereitschaft sowie die gute Stimmung an jedem Tag im Labor und bei den unvergesslichen Weihnachtsfeiern, Wandertagen, Grillfesten und Oktoberfestbesuchen! Falls nicht schon genannt, möchte ich hier den ganzen „6. Stock“ nennen (und ich hoffe, ich vergesse niemanden!): Annalisa (Nina) Izzo, Roger Ferreira, Violette Morales, Martin Neumann, Cedric Clapier, Gabrielle Mengus, Asifa Akhtar, Catherine Regnard, Matthias Prestel, Felix Hartlepp, Anton Eberharter, Philipp Greif, Ralf Strohner, Julia Hochstätter, Caroline Dachauer, Anna Schrader, Attila Nemeth, Angelika Kitziltas, Alexander Brehm, Angelika Mitterweger, Karim Bouazoune, Michael Korenjak, Josephine Sutcliffe, Ina Dahlsveen, Gregor Gilfillan, Rosemarie Lamm, Janek Brzeski, Rein Aasland, Carolin Brieger, Edith Müller, Herta Köber, sowie die Mitarbeiter der Gruppen Prof. Klobeck, Prof. Rupp und Prof. Hörz aus dem „7. Stock“.

Vielen Dank auch an alle guten Freunde außerhalb des Labors: Andreas Tauer, Anja Jüde, Kerstin Uhlend, Katrin Hasenkopf, Anne Schmid, Regina Fluhrer, Isabelle Frey, Nikolai Raffler, Melinda Kiss; außerdem an meine Schwester Franziska und an Stefan.



Schließlich möchte ich ganz herzlich meinen Eltern danken, die durch ihre immerwährende Unterstützung meine Ausbildung ermöglicht haben.

**Vielen Dank!**

## 9 LEBENSLAUF

### Persönliche Daten

---

Name: Birgit Elisabeth Czermin  
Geburtsdatum: 19.10.1974  
Geburtsort: Altenerding  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

9/1981 – 7/1985 Grundschule Dorfen  
9/1985 – 7/1994 Gymnasium Dorfen  
01.07.1994 Abitur

### Hochschulausbildung

---

11/1994 – 12/1998 Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
02.12.1998 Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker  
01/1999 – 12/1999 Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitskreis Prof. Dr. E. Winnacker/Dr. H. Zorbas  
01.03.2000 Diplom in Lebensmittelchemie der Universität Hamburg

### Forschungspraktikum

---

02.09. – 31.10.1997 Forschungspraktikum im Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitskreis Prof. Dr. E. Winnacker/Dr. H. Zorbas

### Promotion

---

01/2000 – 11/2000 Beginn der Promotion im Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitskreis Prof. Dr. E. Winnacker/Dr. H. Zorbas  
seit 12/2000 Promotion am Butenandt-Institut der med. Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitskreis Prof. Dr. P.B. Becker/Dr. A. Imhof

---

## 10 ANHANG

Dieser Anhang enthält die folgenden Publikationen:

Czermin B, Schotta G, Hülsmann B, Brehm A, Becker PB, Reuter G and Imhof A:  
**Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila**  
*EMBO Reports*, Vol 2, No 10, October 2001

Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A and Pirrotta V:  
**Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites**  
*Cell*, Vol 111, 185-196, October 2002

Eskeland R\*, Czermin B\*, Böke J, Bonaldi T, Regula JT, and Imhof A:  
**The N-terminus of Drosophila SU(VAR)3-9 mediates its dimerisation and regulates its methyltransferase activity**  
*Biochemistry*, Vol. 43 (12), 3740 – 3749, March 2004  
\*Co-Erstautoren