

**Aus dem Adolf-Butenandt-Institut der Universität München
Lehrstuhl für Molekularbiologie
Vorstand: Prof. Dr.rer.nat. Peter Becker**

**DYNAMIK UND LOKALISATION DES
DOSISKOMPENSATIONSKOMPLEXES IN
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Martin Neumann
aus
Hannover**

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr.rer.nat. Peter Becker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Haferlach

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Roscher
Priv.Doz. Dr. P. Lohse

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.med. Tobias Straub

Dekan: Prof. Dr.med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2005

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

Morales V, Straub T, Neumann MF, Mengus G, Akhtar A and Becker PB.
**Functional integration of the histone acetyltransferase MOF into the dosage
compensation complex**
EMBO J. 2004, 23:2258-2268

Straub T*, Neumann MF*, Prestel M, Kaether C, Haass C and Becker PB.
**Stable chromosomal association of Drosophila MSL2 forms a functional genomic
compartment**
2004 eingereicht
*Co-Erstautoren

1	THEORETISCHER TEIL.....	6
1.1	Epigenetische Regulierung der Genexpression und Folgen der Deregulierung.....	6
1.1.1	Chromatin und Genexpression.....	7
1.1.2	DNA-Methylierung.....	8
1.1.3	Histon-Modifikationen.....	10
1.1.3.1	Histon-Acetylierung.....	11
1.1.3.2	Histon-Methylierung.....	12
1.1.4	<i>Nucleosome remodeling</i>	13
1.1.5	Drosophila als Modellsystem.....	14
1.2	Der Dosiskompensationskomplex.....	15
1.2.1	Aufbau des Dosiskompensationskomplexes.....	17
1.2.2	MSL2 in zentraler Position.....	19
1.2.3	Die Histon-Acetyl-Transferase MOF.....	21
1.2.4	Parallelen zur X-Inaktivierung beim Menschen.....	22
1.3	Dynamik des Zellkerns.....	23
1.3.1	Architektur des Zellkerns.....	24
1.3.2	Dynamik nuklearer Proteine.....	26
1.3.3	Das Heterochromatin-Protein1 (HP1).....	29
1.3.4	Positionierung von Chromosomen-Territorien.....	31
1.4	GFP und konfokale Mikroskopie.....	33
1.4.1	GFP als Fusionsprotein.....	33
1.4.2	Photobleichen.....	35
1.4.2.1	FRAP-Experimente.....	35
1.4.2.2	FLIP-Experimente.....	37
1.4.3	Konfokale Mikroskopie.....	38
1.5	Fragestellung.....	41
2	ERGEBNISSE	42
2.1	Vorbemerkungen.....	42
2.1.1	Expression von GFP in Drosophila-Zelllinien.....	42
2.1.2	Sequenzvergleich für MSL2.....	42
2.1.3	Promotorenvergleich.....	44
2.2	Expression von MSL2-GFP in SF4-Zellen	46
2.2.1	MSL2-GFP wird schnell abgebaut.....	46
2.2.2	Transiente Transfektion von <i>hsp-msl2-gfp</i> in SF4-Zellen.....	48
2.2.3	Induktion des Metallothioneinpromotors.....	49
2.2.4	Stabile Zelllinien für MSL2-GFP.....	49
2.2.5	Lokalisation von MSL2-GFP.....	52
2.3	Funktionelle Aktivität von MSL2-GFP	54
2.3.1	MSL2-GFP ersetzt das endogene MSL2 <i>in vivo</i>	54
2.3.2	MSL2-GFP interagiert mit dem DCC <i>in vivo</i>	55
2.3.3	MSL2-GFP interagiert mit MSL1 <i>in vitro</i>	57
2.3.4	MSL2-GFP stabilisiert MSL1 in KC-Zellen.....	58
2.4	GFP-Fusionen von MSL1 und MOF.....	60
2.5	Punktmutationen von MOF-GFP	62

2.6	Dynamische Untersuchungen	66
2.6.1	Mitose	66
2.6.2	HP1 α als Kontrollsystem	69
2.6.3	Dynamik von MSL2	74
3	DISKUSSION	79
3.1	Mit GFP fusionierte MSL-Proteine lokalisieren am X-Chromosom	79
3.2	Expressionsniveau von MSL2	81
3.3	Integration von MOF in den DCC	83
3.4	Schnelle Dynamik von HP1α	84
3.5	Stabile Assoziation von MSL2 mit dem X-Chromosom	86
4	ZUSAMMENFASSUNG	90
5	METHODEN	92
5.1	Manipulation von Nukleinsäuren	92
5.1.1	Gel-Elektrophorese	92
5.1.2	Klonierungen	92
5.1.2.1	Konstruktion von pEGFP-hsp-msl2 und pEGFP-sv40-msl2	92
5.1.2.2	Konstruktion von mtn-msl2-gfp	93
5.1.2.3	Konstruktion von pEGFP-C1-hsp-msl2 und pEGFP-C1-sv40-msl2	93
5.1.2.4	Konstruktion von pEGFP-hsp-msl1 und pEGFP-hsp-mof	94
5.1.2.5	Konstruktion der Plasmide mit MOF-Punktmutationen	94
5.1.2.6	Konstruktion von pFastBac-msl2-gfp	95
5.1.3	RT-PCR	95
5.1.4	Sequenzierung	96
5.2	Manipulation von Proteinen	96
5.2.1	Baculovirus-Expression	96
5.2.2	Western-Blots	97
5.2.3	Immunpräzipitation	98
5.3	Zellbiologische Methoden	98
5.3.1	Zelllinien	98
5.3.2	Transiente Transfektion und stabile Zelllinien	99
5.3.3	Einfrieren von Zelllinien	100
5.3.4	Zellextrakt	100
5.3.5	Immunfluoreszenz	100
5.3.6	Mikroskope	101
6	ANHANG	103
6.1	Plasmide	103
6.2	Sequenzen	105
6.2.1	Sequenz von MSL2	105
6.2.2	Primer	108
7	LITERATURVERZEICHNIS	109

8	LEBENS LAUF	122
9	DANKSAGUNG	123

1 Theoretischer Teil

1.1 Epigenetische Regulierung der Genexpression und Folgen der Deregulierung

Das vollständige Genom enthält deutlich mehr Information als für die Funktion einer einzelnen Zelle notwendig wäre. Während der Entwicklung oder in differenzierten Körperzellen wird nur ein kleiner Teil aller vorhandenen Gene benötigt und exprimiert. Hieraus ist ersichtlich, dass Strategien notwendig sind, um Gene entsprechend ihrem Expressionsstatus zu markieren. Wenn man an differenzierte somatische Zellen denkt, ist auch klar, dass diese Markierung von aktiven oder inaktiven Genen über den gesamten Zellzyklus aufrechterhalten oder weitergegeben werden muss. Dies geschieht unter anderem durch so genannte epigenetische Regulationsmechanismen. Unter Epigenetik versteht man die vererbte Information über die Funktion von Genen, die nicht auf der Nukleotidsequenz des Genoms basiert. Eine Modifikation auf dieser Ebene vermag die Expression eines Gens und damit den Phänotyp einer Zelle massiv zu beeinflussen, ohne dass dies eine Änderung der Nukleotidsequenz bedingt. Das klassische Beispiel für eine epigenetische Regulation ist die DNA-Methylierung und seine Funktion in der X-Inaktivierung beim Menschen, dem Phänomen der genomischen Prägung (*imprinting*), der Bildung des Heterochromatins oder der Regulation zell- und gewebsspezifischer Genexpression. Weiterhin beinhaltet diese aber auch Histon- und weitere DNA-Modifikationen sowie strukturelle Änderungen der Chromatinstruktur, auch wenn oft nicht geklärt ist, ob die Vererbung dieser Modifikationen ausschließlich auf epigenetischen Mechanismen beruht, oder doch eine Erkennung von zu Grunde liegenden DNA-Sequenzen beinhaltet. Aus medizinischer Sicht ist hierbei von Interesse, dass eine Deregulation dieser epigenetischen Modifikationen durch die enge Verknüpfung mit der Steuerung der Genexpression zur Entartung und Tumorentstehung führen kann. Aus der wachsenden Zahl von Verbindungen zwischen epigenetischen Regulationsmechanismen und medizinischen Krankheitsbildern sollen im folgenden Kapitel einige exemplarisch dargestellt werden. Einen Schwerpunkt bilden hierbei die Histonmodifikationen, da durch das in dieser Arbeit untersuchte Modellsystem der Dosiskompensation eine Acetylierung des Histons H4 vermittelt wird. Da die genannten Modifikationen an den Bestandteilen des Nukleosoms angreifen und damit die Struktur des Chromatins ändern, wird zunächst kurz die Chromatinstruktur und ihr Einfluss auf die Genexpression vorgestellt.

1.1.1 Chromatin und Genexpression

Ein Grundproblem der menschlichen Zelle besteht darin, seine auf der genomischen DNA gespeicherte Information in jeder menschlichen Zelle im Nucleus zu verpacken, dabei jedoch die DNA offen für Transkription und andere regulatorische Prozesse zu halten [19]. In eukaryotischen Zellen geschieht dies im Rahmen des Chromatins, einer komplexen Struktur, die auf der Grundeinheit des Nukleosoms basiert [71]. In den Nukleosomen sind um ein Histon-Oktamer 146 Basenpaare der DNA in $1\frac{3}{4}$ links gerichteten superhelikalen Windungen gewunden (Abbildung 1) [109]. Das Histon-Oktamer besteht aus je zwei Kopien der Histon H2A, H2B, H3 und H4, Proteinen mit einer zentralen, annähernd globulären Domäne und flexiblen Armen an den carboxy- und aminoterminalen Enden. Benachbarte Nukleosomen sind durch kürzere DNA-Abschnitte (sog. *linker-DNA*), welche durch das Histon H1 an den Ein- und Austrittsstellen des Nukleosoms geführt werden, miteinander verbunden [78;219]. Für übergeordnete Chromatinstrukturen und -faltungen sind die Wechselwirkungen zwischen den Nukleosomen untereinander sowie mit Nicht-Histon-Proteinen im Zellkern von entscheidender Bedeutung [79]. Die Wechselwirkungen

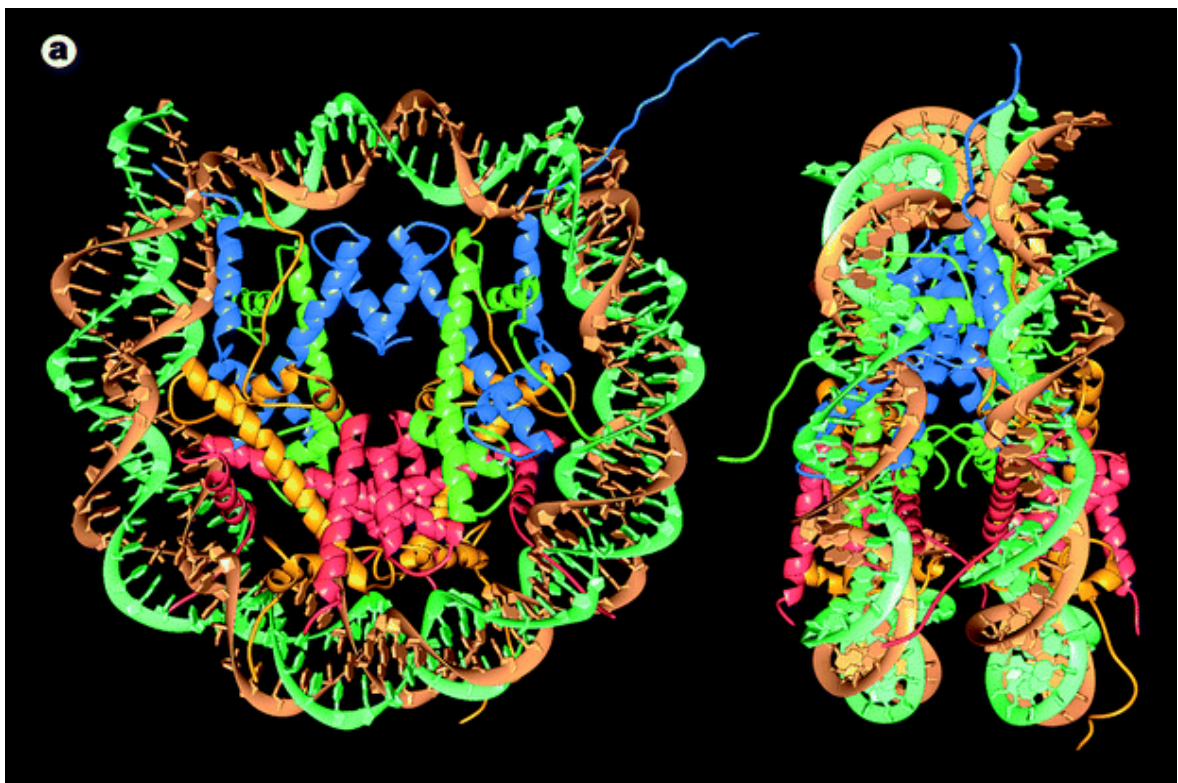


Abbildung 1 Die Struktur des Nukleosoms mit der DNA und den vier Histonpaaren. Aus dem Nukleosom heraus ragen die flexiblen *Histontails*. Die Abbildung wurde aus [109] entnommen.

werden hierbei hauptsächlich über die N-terminalen Domänen der Histone des Histonoktamers (*core histones*) vermittelt. Diese flexiblen N-terminalen Arme ragen aus dem Nukleosomenkern weit hinaus und sind auf Grund ihres hohen Anteils an basischen Aminosäuren Arginin und Lysin positiv geladen.

Die dichte Verpackung der DNA im Chromatin hat einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression. Da der DNA-Metabolismus, wie Transkription, Reparatur oder Replikation, in der Regel über DNA-bindende Proteine vermittelt wird, hat die Chromatinverpackung zunächst eine repressive Funktion [146]. Auch mikroskopisch ist dies in der Unterscheidung zwischen Heterochromatin als dicht gepackter DNA mit eher repressiven Charakter und dem Euchromatin als Region eher aktiver Gene mit einer niedrigeren DNA-Dichte sichtbar. Für die Bindung dieser Proteine muss also zunächst die Chromatinstruktur gelockert werden [19]. Dies betrifft sowohl die Ebene der übergeordneten Faltung als auch die Ebene der einzelnen Nukleosomen [193]. Zwei grundlegende Mechanismen werden beschrieben, die die inhibitorische Natur des Chromatins zumindest partiell überwinden und die Chromatinstruktur dynamisch gestalten [210]. Der erste greift durch *nucleosome-remodeling*-Faktoren an den Histon-DNA-Wechselwirkungen an und hat zunächst einen lokalen, transienten Charakter (Kapitel 1.1.4). Der zweite betrifft Modifikationen der N-terminalen Arme der Histone, wie z. B. die Acetylierung des Histons H4 durch MOF, und damit eine Änderung der Wechselwirkung zwischen Nukleosomen und in der Folge der Chromatinstruktur (Kapitel 1.1.3). Weiterhin haben diese Modifikationen eine Funktion in der Erkennung der Nukleosomenstruktur und der Rekrutierung von Proteinen [191].

1.1.2 DNA-Methylierung

Ein klassisches Beispiel für eine epigenetische Regulierung der Genexpression ist die DNA-Methylierung von Cytosin-Basen, die in CpG-Dinukleotiden positioniert sind [24]. Auch wenn diese CpG-Folgen im gesamten Genom generell unterrepräsentiert sind, existieren kürzere DNA-Sequenzen, so genannte CpG-Inseln, die einen hohen Anteil an CpG-Dinukleotiden aufweisen [196]. Diese Inseln sind vorwiegend in proximalen Promotor-Regionen von nahezu der Hälfte aller Gene zu finden und in differenzierten Zellgeweben normalerweise unmethyliert. Eine Hypermethylierung dieser Promotor-Region führt zu einer Inaktivierung der betreffenden Genexpression. Die Repression der Genexpression ist hierbei nicht eine reine Folge der DNA-Methylierung, sondern ein

komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren. So gibt es eine Reihe von Proteinen, die in der Lage sind, methyliertes Cytosin zu binden - MBD (*methylated DNA binding domain*) genannt [121]. Von diesen Proteinen wurde *in vitro* gezeigt, dass sie als transkriptionelle Repressoren wirken können [93;138;213]. Interessanterweise treten diese Proteine in Kontakt mit einem größeren Proteinkomplex, einem Co-Repressor-Komplex, der unter anderem als Untereinheit Histon-Deacetylasen besitzt. Dies legt einen Mechanismus nahe, wie es von der DNA-Methylierung als epigenetischer Markierung über die Histon-Deacetylierung zu einer Änderung der Chromatinstruktur und damit der Schaffung und Beibehaltung von transkriptionell inaktiven Regionen kommt [206].

Eine weitere charakteristische Eigenschaft der DNA-Methylierung ist die Vererbung des DNA-Musters auf die Tochterzelle. Die Festlegung und Beibehaltung des Musters der DNA-Methylierung wird hierbei im Wesentlichen über drei Methyl-Transferasen gesteuert. Für die Neumethylierung sind Dnmt3a und Dnmt3b (DNA-Methyl-Transferasen 3a und 3b) verantwortlich, während Dnmt1 ein zum Teil früh in der Entwicklung festgelegtes Methylierungsmuster über Zellgenerationen hinweg propagiert [142]. Hierbei bindet Dnmt1 bevorzugt an hemimethylierte DNA [162], methyliert direkt nach der Replikation die neu replizierten DNA-Stränge [105] und ermöglicht so die epigenetische Informationsweitergabe auf die Tochterzelle.

Einen besonderen Stellenwert besitzt dieser Vererbungsmechanismus im Rahmen der genomischen Prägung (*imprinting*). Hierunter versteht man das Phänomen, dass bestimmte väterliche oder mütterliche Allele trotz identischer Nukleotidsequenz unterschiedlich exprimiert werden, ein Paradebeispiel epigenetischer Regulierung der Genexpression. Viele dieser genomisch geprägten Gene spielen im Rahmen des fetalen Wachstums eine Rolle [131]. Ein gemeinsames Motiv der nicht exprimierten Allele ist hierbei die DNA-Hypermethylierung sowie die Histon-Hypoacetylierung des Genorts [60;175]. Aber auch in anderen epigenetisch regulierten Systemen spielt die DNA-Methylierung eine zentrale Rolle. So existiert ein positives *Feedback* zwischen DNA-Methylierung und der Histonmethylierung in der Bildung von Heterochromatin und der damit verbundenen Transkriptionsrepression weiter Teile des Genoms [197]. Die X-Inaktivierung beim Menschen und die Kondensation im Barr-Körperchen beinhaltet ebenfalls eine DNA- und Histon-Hypermethylierung sowie eine Histon-Hypoacetylierung eines der weiblichen X-Chromosomen (s. a. Kapitel 1.2).

Angesichts dieser Involvierung der DNA-Methylierung in fundamentale Zellprozesse ist es nicht überraschend, dass eine Deregulation der DNA-Methylierung auf einer der genannten

Ebenen zu vielfältigen Krankheitsbildern führt. So ist in vielen, wenn nicht sogar in den meisten Neoplasien eine Hypermethylierung von Cytosin-Basen zu finden, was eine irreversible Stilllegung von Genen zur Folge hat [17;171]. Hiermit einhergehend ist auch in vielen Tumoren eine Überexpression der Methyltransferasen zu finden [92;170]. Störungen der genomischen Prägung liegen Krankheitsbildern wie dem Prader-Willi-Syndrom (PWS) oder dem Angelman-Syndrom (AS) zu Grunde, in denen Deletionen im Bereich des Chromosoms 15 ausschließlich das paternale (PWS) oder das maternale (AS) Chromosom betreffen [14]. Und schließlich sei noch erwähnt, dass das methyliertes Cytosin bindende Protein MECP2 (Methyl-CpG-Bindeprotein 2) beim Rett-Syndrom mutiert ist und es dadurch zur unkontrollierten Expression von normalerweise inaktiven Genen kommt. Dies führt bei fast ausschließlich betroffenen Mädchen im Alter von ca. 2 Jahren zu einer fortschreitenden geistigen Behinderung [100].

1.1.3 Histon-Modifikationen

Histone können auf vielfältigste Weise posttranslational modifiziert werden. Vor allem die flexiblen aminoterminalen Domänen, die außerhalb des Nukleosomen-Kerns liegen, sind hiervon betroffen (Abbildung 2) [210]. Die Möglichkeit posttranslationaler Modifikation umfasst die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Ubiquitinierung oder Biotinylierung einzelner Aminosäuren [78]. Über diese Modifikationen werden zum einen Histon-Histon-Wechselwirkungen sowie Histon-DNA-Wechselwirkungen und damit das Ausmaß der Faltung der Nukleosomenkette, zum anderen die Wechselwirkung mit Proteinen, die bestimmte Modifikationen erkennen, beeinflusst. Beispiele für letztere sind Proteine mit Bromo- oder Chromodomänen, die spezifisch mit acetylierten bzw. methylierten Lysin-Resten interagieren können [13;52;148]. Da durch Veränderung der Histonstruktur auch der Zugang zur DNA reguliert werden kann, fasst eine weit verbreitete Vorstellung die Kombinationsmöglichkeiten von verschiedenen Histonmodifikationen als „Histon-Code“ auf, der den funktionellen Zustand eines Chromosomenabschnitts definiert [88]. Dieser bietet die Möglichkeit durch Histonmodifikationen von einem transkriptionell aktiven in einen inaktiven Chromatinzustand oder umgekehrt zu wechseln, mit großem Einfluss auf die Entwicklung einer Zelle.

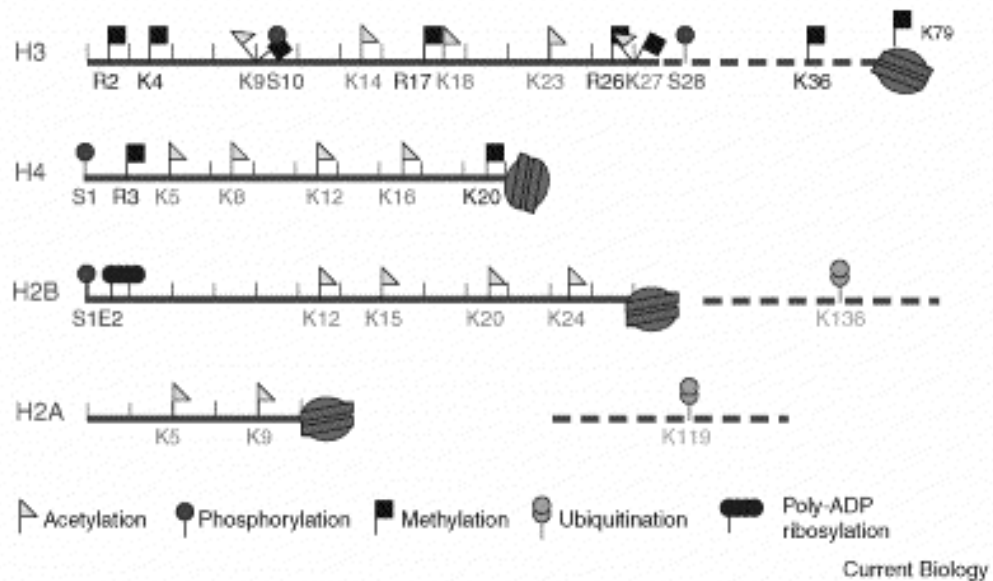


Abbildung 2 Die Abbildung zeigt eine Übersicht von möglichen Histonmodifikationen. Die durchgezogene Linie symbolisiert die N-terminalen Enden der Histone, die unterbrochene Linie die C-terminalen sowie im Falle von H3 auch Anteile der globulären Domäne. Die Abbildung wurde aus [85] übernommen.

1.1.3.1 Histon-Acetylierung

Die Histon-Acetylierung von Lysin-Resten in den aminoterminalen flexiblen Histon-Domänen ist die am ausführlichsten untersuchte Histonmodifikation [210]. Die Histone H2B (K5, K12, K15, K20), H3 (K9, K14, K18, K23) und H4 (K5, K8, K12, K16) können an vier, Histon H2a (K5, K9) an zwei Lysin-Resten acetyliert werden [190]. Die Acetylierung wird durch eine ganze Familie von Histon-Acetyl-Transferasen (HAT), die meist in größeren Proteinkomplexen vorliegen, vermittelt. Sie werden zum einen entsprechend ihrer subzellulären Lokalisation in zwei Typen (zytoplasmatisch vs. subnuklear) oder auf Grund ihrer Sequenzhomologien in sechs verschiedene Familien eingeteilt [190]. Es wird allgemein angenommen, dass durch die Acetylierung die positive Ladung der Histone teilweise neutralisiert wird und damit die Wechselwirkungen mit der DNA sowie die Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkungen geschwächt werden [64;220]. Hierdurch entsteht eine gelockerte Struktur, die den Zugang für Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, erleichtert [104] und die Histonacetylierung generell mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung bringt [173]. Hinzu treten noch Transkriptionsfaktoren, die spezifisch acetyliertes Lysin erkennen und durch die Histonmodifikation rekrutiert werden können [22]. Interessanterweise ist hierunter auch die Bromodomäne, die in fast allen Histon-Acetyl-Transferasen vorkommt [222] und somit

einen Mechanismus der Selbstrekrutierung beinhaltet. Dies impliziert auch ein mögliches Modell, wie die Acetylierung als Histonmodifikation über die Replikation und die Mitose als stabile Markierung aufrechterhalten werden könnte (s. a. das Kapitel „Dynamik des Zellkerns“).

Als Gegenspieler der Histon-Acetyl-Transferasen treten Histon-Deacetylasen (HDAC) auf, die ermöglichen, die Markierung der Histonacetylierung aufzuheben und damit eine rasche Austauschintensität bei insgesamt erhaltener Histonmodifikation ermöglichen. Die HDAC werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt [117]. Generell wird die Hypoacetylierung einer Chromatinregion mit einer restriktiveren Struktur und damit einer Suppression der Transkription in Verbindung gebracht.

Störungen im Zusammenspiel von HAT und HDAC stehen auf vielfältige Weise mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung [112;201;207]. So wurden in kolorektalen, gastralen und anderen epithelialen Tumoren, aber auch in hämatologischen Malignomen, vermehrt Mutationen oder Translokationen der beiden Histon-Acetyl-Transferasen CBP und p300 gefunden [72]. Das Rubinstein-Taybi-Syndrom, eine Entwicklungsstörung mit erhöhter Tumorentstehung, wurde ebenfalls auf eine Mutation von CBP zurückgeführt [135].

Ein Subtyp (M2) der akuten myeloischen Leukämie (AML) steht demgegenüber wieder mit einer t(8;11)-Translokation in Verbindung, welche ein AML1-ETO-Fusionsprotein produziert [215]. Durch die Wechselwirkung mit Histon-Deacetylasen kommt es zu einer fehlgeleiteten Inaktivierung von für die Myelozyten-Differenzierung wichtigen Genen. Auch in Non-Hodgkin-Lymphomen sind die Transkriptionsrepressor-Proteine Laz3/BCL6 überexprimiert und führen zur Rekrutierung von HDAC und folgender Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen [53]. Aus diesem Zusammenhang zwischen Histon-Acetylierung und Tumorentwicklung sind in jüngerer Zeit Therapievorschläge mit HDAC-Inhibitoren entwickelt worden [117].

1.1.3.2 Histon-Methylierung

Die Methylierung von Histonen wird durch Histon-Methyl-Transferasen vermittelt, die Methylgruppen von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf Arginin- oder Lysin-Reste übertragen. Diese können mono-, di- oder tri- (nur Lysin-Reste) methyliert werden [225]. Die Histonmethylierung unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht grundsätzlich von der Histonacetylierung. So ist bislang keine Histon-Demethylase bekannt, die die

Histonmethylierung reversibel machen würde [12]. Diese Eigenschaft macht die Histonmethylierung auch zu einem Kandidaten für eine stabile epigenetische Markierung. Allerdings kann neueren Arbeiten zu Folge durch das Enzym PAD4 (*human peptidylarginine deiminase 4*) methyliertes Arginin in Citrullin und Methylamin umgewandelt werden [48;216]. Dies würde einen Mechanismus eröffnen, die Histonmethylierung und seine regulatorischen Auswirkungen zu antagonisieren.

In erster Linie steht die Histonmethylierung funktionell mit einer transkriptionellen Inaktivierung in Zusammenhang. Zum Beispiel spielt die Methylierung von H3K9, vermittelt durch SUV39H1 [165], eine entscheidende Rolle in der Heterochromatin-Bildung [168]. Auf der anderen Seite wird eine Methylierung von Histonen auch in transkriptionell aktiven Chromatinregionen gefunden, so z. B. die Methylierung von H3K4 [140]. Die beiden erwähnten Modifikationen schließen sich entsprechend ihrer unterschiedlichen Aufgaben gegenseitig aus [210]. Allerdings wird die funktionelle Auswirkung nicht ausschließlich durch die methylierte Aminosäure sondern vielmehr im Gesamtkontext mehrerer Histonmodifikationen vermittelt [204]. Ein Beispiel für Wechselwirkungen zwischen zwei Modifikationen ist die direkte Wechselwirkung der Histon-Methyltransferase SU(VAR)3-9 mit einer Histon-Deacetylase [49]. Für das Modellsystem der Dosiskompensation in der *Drosophila* von Bedeutung sind Beobachtungen, dass ein hohes Niveau von acetyliertem H4K16, wie z.B. am X-Chromosom der männlichen *Drosophila* verbunden mit einer Aktivierung der Transkription, ein niedriges Niveau von methyliertem H4K20 zur Folge hat und umgekehrt [167]. Auf Grund der Inkonsistenz mit anderen Experimenten, die einen anderen Antikörper benutzten, stellt sich allerdings die Frage, inwieweit dieses attraktive Modell von Aktivierung und Inaktivierung bestimmter Chromatinregionen aufrecht erhalten werden kann [58].

1.1.4 *Nucleosome remodeling*

Für eine strukturelle Änderung der Nucleosomenkette steht außer den schon angesprochenen Histonmodifikationen noch eine zweite Gruppe von Protein(komplex)en zur Verfügung, die Gruppe der so genannten *chromatin remodeling*-Faktoren. Diese gewinnen aus der Hydrolyse von ATP Energie, um in der Regel Histon-DNA-Wechselwirkungen zu schwächen [211], was zu einer erhöhten Mobilität und Nucleosomenverschiebung führen kann. Die Familie der *chromatin remodeling*-Faktoren

wird auf Grund von Ähnlichkeiten in der ATPase-Untereinheit in vier Gruppen eingeteilt: ISWI (*imitation of switch*), SWI/SNF (*switch/sucrose nonfermenting*), INO (*inositol*) und CHD (*chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein*) [210]. Auch wenn sie generell mit einer Lockerung der Chromatinstruktur und damit einer transkriptionellen Aktivierung in Verbindung stehen, gibt es innerhalb dieser Gruppe auch Komplexe, wie z.B. der NuRD-Komplex über Wechselwirkung mit Histon-Deacetylasen, die eine transkriptionelle Supprimierung bewirken [213;224]. Auch die Mechanismen, über die die *chromatin remodeling*-Faktoren wirken, sind stark unterschiedlich [63]. Von den zahlreichen verschiedenen Aspekten der *chromatin remodeling*-Faktoren, auf die hier nicht näher eingegangen wird (für eine Übersicht siehe z. B. [19]), sollen nur noch die Verbindungen zur Tumorentwicklung erwähnt werden. So stehen Mutationen von hSNF-INI1, einer Untereinheit des menschlichen SWI/SNF-Komplexes in Verbindung mit malignen rhabdoiden Tumoren [212] und der akuten Leukämien [179]. Ebenso wechselwirkt der SWI/SNF-Komplex mit Tumorsuppressoren wie BRCA1, c-myc oder Rb (Retinoblastom-Protein) [25;37;223], durch deren Inaktivierung eine ungesteuerte Zellproliferation angestoßen werden könnte. Das Rb-Protein zeigt darüber hinaus, dass einzelne Aspekte der strukturellen Nukleosomenveränderung ineinander greifen, da Rb durch Rekrutierung von *chromatin remodeling*-Faktoren, HDACs, HMTs und DNA-Methyltransferasen die Inaktivierung von Zellzyklusgenen kontrolliert [193].

1.1.5 *Drosophila* als Modellsystem

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist eins der meist untersuchten Modellorganismen für fundamental biologische und genetische Phänomene. Die Vorteile dieses Organismen umfassen eine relativ kurze Lebensdauer, einfach zu handhabende Aufrechterhaltung von Fliegenstöcken, die Verfügbarkeit von verschiedenen Zelllinien sowie die vorliegende Sequenz des vollständigen euchromatischen *Drosophila*-Genoms [2;81]. In den 80er Jahren wurde erkannt, dass viele fundamentale Prozesse in der Entwicklung, z. B. solche, die den Körperaufbau bestimmen, zwischen Säugetieren und Fliegen konserviert sind [103]. Weiterhin wurde nach der Veröffentlichung des *Drosophila*-Genoms festgestellt, dass ein Großteil (60-75%) von menschlichen Genen, die in Krankheiten involviert sind, ein Analogon in der Fruchtfliege besitzt [166;174]. Zwischen dem menschlichen Genom und dem Wurm- oder Hefe-Genom ist dieser Anteil deutlich geringer. Zusammen mit der Weiterentwicklung molekulargenetischer Techniken,

wie z.B. der RNAi (*RNA-mediated interference*), haben diese Eigenschaften dazu geführt, dass die *Drosophila melanogaster* verstärkt als Modellorganismus für die Erforschung molekularer Grundlagen von menschlichen Krankheiten benutzt wird [23]. Dies umfasst neben der Tumorforschung auch neurologische Krankheiten wie M. Parkinson oder Alzheimer, Schlafstörungen, endokrinologische Krankheiten oder auch den Prozess des Alterns [200]. Für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte System der Dosiskompensation sind grundlegende Komponenten des DCC sowie Parallelen zum Menschen im folgenden Kapitel zusammengefasst. Als weiterer neben den bereits genannten Vorteilen der *Drosophila* als Modellorganismus erwies sich in dieser Arbeit auch der Umstand, dass mit den *Drosophila*-Zelllinien für eine geraume Zeit bei Raumtemperatur gearbeitet werden konnte, was insbesondere die dynamischen Untersuchungen erleichterte. Auf der anderen Seite stellte sich angesichts der mikroskopischen Untersuchungen von subnuklearen Strukturen die geringe Größe der *Drosophila*-Zellen als gravierender Nachteil heraus.

1.2 Der Dosiskompensationskomplex

Die Bedeutung der Aktivierung und Inaktivierung von Genen, die im ersten Kapitel unter den epigenetischen Regulationsmechanismen besprochen wurde, nimmt eine besonders offensichtliche Stellung im Ausgleich der Genexpression von geschlechtsspezifischen Chromosomen ein. Verschiedene Organismen, deren Geschlechtszugehörigkeit durch die Anzahl an X-Chromosomen vermittelt wird, haben im Laufe der Evolution verschiedene Arten der Dosiskompensation entwickelt [152], die auf den ersten Blick recht unterschiedlich erscheinen (Abbildung 3). Neben ähnlichen Modifikationsstrategien haben sie aber vor allem das gemeinsame Ziel, den Unterschied in der Anzahl der X-Chromosomen, eins beim männlichen gegenüber zweien beim weiblichen Organismus, zu kompensieren. Ohne diese Kompensation der Genexpression würden geschlechtsunabhängig für das Überleben der Zellen und damit des Organismus wichtige Gene, die auf dem X-Chromosom codiert sind, um den Faktor 2 unterschiedlich exprimiert. Dies kann im Falle einzelner Gene bis zu einer geschlechtsspezifischen erhöhten Sterblichkeit führen.

In Säugetieren wird hierzu in den somatischen weiblichen Zellen eines der beiden X-Chromosomen weitestgehend inaktiviert [111] und dadurch eine Dosiskompensation für die X-chromosomalen Gene zwischen männlichen und weiblichen Zellen erreicht.

Allerdings werden nicht alle Gene des X-Chromosoms inaktiviert. Bei den aktiv bleibenden X-chromosomalen Genen handelt es sich zum einen um das Gen XIST (*x inactive specific transcript*), welches in den Prozess der X-Inaktivierung maßgeblich eingebunden ist, zum anderen um Gene, für die auf dem Y-Chromosom eine homologe Entsprechung zu finden ist.

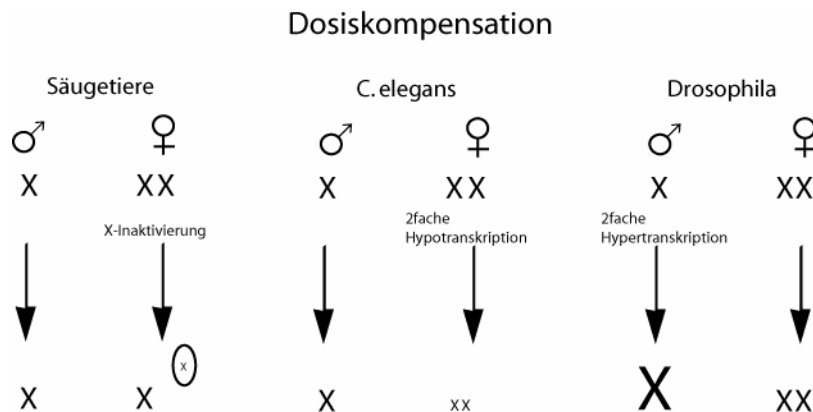


Abbildung 3 Die Abbildung veranschaulicht die im Text besprochenen Mechanismen der Dosiskompensation, die gewährleisten, dass X-chromosomale Gene (mit Ausnahmen) zwischen männlichen und weiblichen Organismen gleich stark exprimiert werden. Die Abbildung ist modifiziert nach [4].

Ein Großteil dieser Gene ist in der pseudoautosomalen Region am Ende der kleinen Chromosomenarme zu finden [100].

Ein anderer Weg der Dosiskompensation ist im Wurm *Caenorhabditis elegans* zu finden. Hier wird die Transkription der Gene beider X-Chromosome in allen weiblichen Zellen auf die Hälfte reduziert, so dass die Gesamtmenge an exprimierten X-chromosomalen Genen in weiblichen und männlichen Zellen wieder gleich ist [126].

Während bei den bisher besprochenen Organismen die Dosiskompensation in den weiblichen Zellen erfolgte, wählte die Evolution für die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* genau den umgekehrten Weg. Es werden in allen männlichen Zellen die X-chromosomalen Gene doppelt so stark exprimiert wie in weiblichen Zellen [134]. Verantwortlich ist hierfür der so genannte Dosiskompensationskomplex (DCC), der aus zumindest fünf Proteinen [20;205] und zwei nichtkodierenden RNAs [65;95;125] besteht. Dieser Komplex, der das Modellsystem der vorliegenden Arbeit bildet, ist in mehrfacher Hinsicht als Modell für fundamentale Zellvorgänge interessant. So modifiziert der Komplex über eine Acetyl-Transferase (MOF) [183] die Chromatinstruktur des X-Chromosoms mit der Auswirkung einer zweifachen X-chromosomalen Genexpression in den männlichen Zellen. Zum zweiten ist der Komplex ein gutes Studienobjekt für

grundlegende Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Strukturproteinen wie dem Histon H4 und den Proteinen des DCC), nichtkodierender RNA und DNA. Und schließlich bildet die Lokalisation des DCC in einem wohldefinierten Kompartiment des Nucleus, dem X-Chromosom, eine Basis für Untersuchungen über die nukleare Architektur und seine Dynamik (s. a. das Kapitel „Dynamik des Zellkerns“). Im Folgenden wird der DCC beschrieben, wobei der Schwerpunkt auf den in dieser Arbeit näher untersuchten Proteinen des DCC, MOF und MSL2, liegt.

1.2.1 Aufbau des Dosiskompensationskomplexes

Unter dem Terminus DCC versteht man in erster Linie einen Komplex aus fünf Proteinen, von denen in Experimenten mit Mutationen einzelner Proteine gezeigt wurde, dass ihr Verlust zu einer spezifisch männlichen Sterblichkeit führt [108;194]. Im Einzelnen sind dies MSL1 (*male specific lethal 1*), MSL2, MSL3, die Helikase MLE (*maleless*) sowie die Histon-Acetyl-Transferase MOF (*male absent on first*). Diese fünf Proteine kolokalisieren in männlichen *Drosophila*-Zellen am X-Chromosom und können über Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen einzelne Proteine des Komplexes gemeinsam gereinigt werden. Ein potenziell weiterer Bestandteil des DCC nach diesen Kriterien ist die Histon-H3-Kinase JIL1, welche ebenfalls am X-Chromosom zweifach stärker angereichert ist und für die in der Immunpräzipitation eine Wechselwirkung mit MSL1, direkt oder indirekt, nachgewiesen wurde [89;217]. Die genaue Rolle von JIL1 für die Dosiskompensation ist im Moment etwas unklar, da Mutationen von JIL1 zwar das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Zellen erniedrigt, aber keine Auswirkungen auf die Lokalisation des DCC besitzt. Ob noch weitere Proteine dem Komplex angehören, bleibt offen. Schließlich bilden zwei nichtkodierende, teilweise redundante RNAs, roX1 und roX2, einen wesentlichen Bestandteil des Komplexes. Die roX-RNA scheint einen erheblichen Einfluss auf die korrekte Lokalisation des Komplexes am X-Chromosom zu haben [8;124;169]. Auch wenn der Einfluss nichtkodierender RNA auf die Transkription etliche interessante Aspekte aufweist, wie z.B. das Vorkommen von nichtkodierender RNA in der Dosiskompensation von Säugetieren und dem Wurm *Caenorhabditis elegans*, sollen diese hier nicht näher besprochen werden. Einen ersten Überblick mögen die Übersichtsartikel [4;73] liefern. Wie wird durch diesen Komplex die zweifache Hypertranskription von X-chromosomalen Genen vermittelt? Einen entscheidenden Einfluss hierauf scheint die Acetylierung von Histon H4 am Lysin 16, die durch die Acetyl-Transferase MOF vermittelt wird, zu haben.

Diese korreliert womöglich mit einer stärkeren Dekondensation des männlichen X-Chromosoms relativ zu den Autosomen und den weiblichen X-Chromosomen [28;183]. Dass durch diese epigenetische Markierung, die Histon-Acetylierung, eine supprimierte Chromatin-Transkription überwunden werden kann, wurde experimentell *in vitro* und *in vivo* gezeigt [5].

Der Weg zu dieser epigenetischen Modifikation, insbesondere der korrekten Lokalisation von MOF am X-Chromosom, scheint jedoch über mehrere Zwischenschritte zu verlaufen. Zunächst besitzt MSL2 eine gewisse Schlüsselposition in der Initiierung des Komplexes, da es in weiblichen Zellen nicht exprimiert wird und in Folge dessen auch nicht zur Ausbildung eines DCC kommt [151]. Für die fehlende Expression von MSL2 ist das Protein SXL (*sex lethal*), welches das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen „misst“, verantwortlich (eine Übersicht über SXL findet sich in [159]). Nachdem MSL2 in

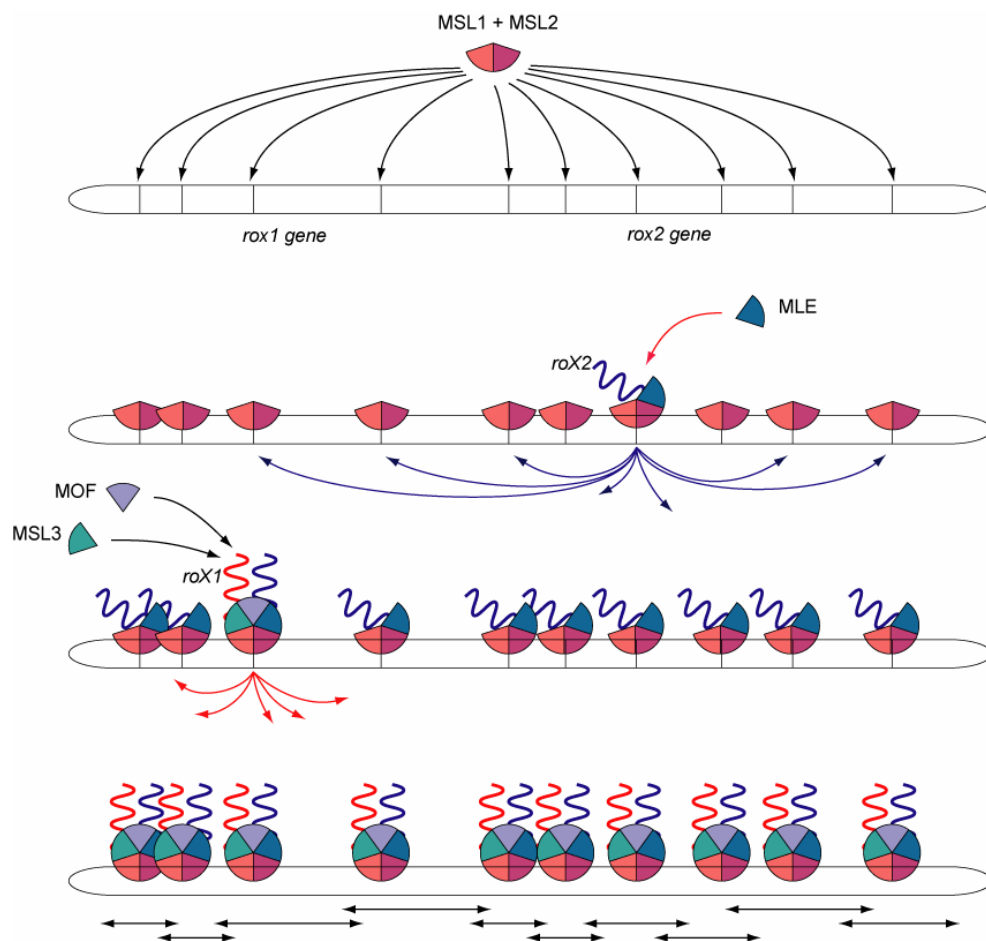


Abbildung 4 Aufbau des Dosiskompensationskomplexes. Die Bilder zeigen den Aufbau des DCC aus seinen fünf Proteinen und den zwei roX-RNAs mit der Bindung zunächst von MSL1 und MSL2 an den Eintrittsstellen, der dortigen Bildung des Komplexes und der darauf folgenden Ausbreitung. Eine nähere Beschreibung ist dem Text zu entnehmen. Die Abbildung wurde nach [123] modifiziert.

männlichen Zellen exprimiert wird, wird auch die Expression der übrigen Proteine des DCC stabilisiert. Für den weiteren Vorgang der Bildung und der Lokalisation des DCC am X-Chromosom ist die Beobachtung von Bedeutung, dass nicht das ganze X-Chromosom uniform durch den DCC abgedeckt wird. So wird in Immunfärbungen von polytenen Chromosomen der Speicheldrüse der *Drosophila* der Komplex in mehreren hundert, distinkten Banden des X-Chromosoms nachgewiesen, allerdings mit dazwischenliegenden Interbanden, in denen kein MSL-Protein nachgewiesen werden kann [110]. Mutiert man eines der Proteine des DCC, geht diese Lokalisation am X-Chromosom verloren. Bei Mutationen von MSL1 bzw. MSL2 geht jedoch jegliche Lokalisation am X-Chromosom verloren, während bei Mutationen von MOF, MLE oder MSL3 noch in ca. 50 Regionen, den so genannten Eintrittsstellen (*entry sites*), in der Immunfärbung von polytenen Chromosomen MSL1 und MSL2 detektierbar bleiben [96]. Diese Beobachtung führte zu dem Modell, dass diese ca. 50 Regionen, unter denen sich unter anderem die roX1- und roX2-Gene befinden [123], Stellen hoher Affinität für die Bindung, direkt oder indirekt, von MSL1 und MSL2 als eine Art Subkomplex des DCC darstellen. Nach erfolgter Bindung von MSL1 und MSL2, quasi als Ankerplatz, kann der gesamte Komplex rekrutiert werden, der nötig ist, um von diesen Eintrittsstellen das gesamte X-Chromosom zu überdecken (Abbildung 4). Der Mechanismus des Ausbreitens des DCC von diesen Eintrittsstellen *in cis* über das gesamte X-Chromosom wird als „*spreading*“ bezeichnet. Auch wenn dieses Modell auf Grund neuerer Daten und noch vieler offenen Fragen insbesondere über die Natur der Eintrittsstellen sowie die Eigenschaften der roX-RNA sicherlich noch modifiziert und erweitert werden muss, bleibt dennoch die interessante Tatsache bestehen, dass das roX-Gen auch transgen in autosomaler Position in der Lage ist, den DCC dort nicht nur zu rekrutieren, sondern auch eine Ausbreitung in benachbarte Chromosomenregionen initiieren kann [155].

1.2.2 MSL2 in zentraler Position

Wie schon angesprochen, besitzt MSL2 eine Schlüsselposition innerhalb des DCC. Zum einen hemmt SXL die Translation von MSL2 in weiblichen Zellen [16]. Zum anderen bindet MSL2 zusammen mit MSL1 an den Eintrittsstellen, wenn MLE, MOF oder MSL3 mutiert werden, während im Gegenzug die Mutation von MSL2 jegliche Bindung an das X-Chromosom verhindert [96]. Auf Grund dieser Befunde bot sich MSL2 als erstes Protein an, um es mit dem fluoreszierenden Marker GFP zu versehen und so ein Werkzeug

in der Hand zu haben, Lokalisation und Funktion von MSL2 *in vivo* untersuchen zu können.

MSL2 selbst ist ein Protein aus 773 Aminosäuren (siehe hierzu auch das Kapitel „Sequenzvergleich für MSL2“), welches ein Ring-Finger-Motiv in der Nähe des N-Terminus (AS 37-87) und eine Metallothionein-artige Domäne (AS 521-558) besitzt (Abbildung 5). Darüber hinaus existieren Regionen mit vorwiegend positiv geladenen Aminosäuren, direkt Richtung N-Terminus der Metallothionein-artigen Domäne gelegen, sowie Regionen mit vorwiegend negativ geladenen Aminosäuren [227].

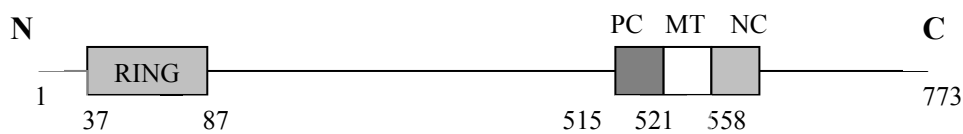


Abbildung 5 Schematische Struktur von MSL2. RING steht für die RING-Finger-Domäne, MT für die Metallothionein-artige Domäne, PC für eine Region von positiv geladenen und NC für eine Region von negativ geladenen Aminosäuren.

Über die Funktion der Motive von MSL2 ist viel spekuliert worden, aber wenig experimentell bestätigt. Beschrieben ist, dass der N-Terminus mit dem Ring-Finger-Motiv (AS 1-190) eine entscheidende Rolle für die direkte Wechselwirkung mit MSL1 und die Lokalisation von MSL2 am X-Chromosom spielt [45], was durch Mutationen in der Region des Ring-Fingers in einem *two-hybrid*-System gezeigt wurde. Auf Seiten von MSL1 ist ebenfalls der N-Terminus (AS 1-84) für die Lokalisation am X-Chromosom sowie die Aminosäuren 85-186 für die Wechselwirkung mit MSL2 verantwortlich [150;177].

Eine weitere Funktion von MSL2 besteht in der Stabilisierung von Proteinen des DCC. Während beim weiblichen Wildtyp kein MSL2 und MSL1 nur stark vermindert gegenüber dem männlichen Wildtyp nachweisbar sind, führt die ektopische Expression von MSL2 in transgenen Fliegenstämme zu einem Anstieg der MSL1-Konzentration und der Lokalisation von MSL1, MLE und MSL2 am X-Chromosom in weiblichen Fliegen [97]. Als Folge kam es hierbei zu einer signifikanten Entwicklungsverspätung und einer erhöhten Letalität von weiblichen Fliegen.

Diese vorliegenden Experimente führten zu der Annahme, dass MSL2 eine Schlüsselrolle innerhalb des DCC einnimmt. Jedoch ist in einer aktuellen Veröffentlichung die Frage aufgeworfen worden, ob die zygotische Transkription von MSL2 einen bereits existenten DCC nur komplimentiert [122].

1.2.3 Die Histon-Acetyl-Transferase MOF

Eine bekannte strukturelle Modifikation durch den DCC stellt die Histonmodifikation durch die Histon-Acetyl-Transferase MOF dar. Als eine der zwei Untereinheiten des DCC, wenn man von JIL1 absieht, deren enzymatische Wirkung bekannt ist, sind über die Struktur von MOF, seine Wechselwirkungen und seine Funktion detailliertere Informationen verfügbar als über MSL2. MOF ist ein Mitglied der MYST-Familie, 827 Aminosäuren lang und vermittelt die Acetylierung des Histonseitenarms von H4 am Lysin 16 als epigenetische Markierung [28;83]. Für die Acetyl-Transferase-Aktivität von MOF ist die enthaltene HAT(MYST)-Domäne (AS 592-695) verantwortlich, eine Domäne, die MOF mit etlichen anderen Histon-Acetyl-Transferasen, wie z.B. MOZ (ein Protein, welches bei der akuten myeloischen Leukämie involviert ist) teilt [75;83]. Es wurde gezeigt, dass diese Domäne zusammen mit dem Zink-Finger-Motiv (AS 575-592) ausreichend für die Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität ist [183] und eine Punktmutation (G691E) der vermutlich Acetyl-Coenzym bindenden Domäne (AS 675-695) diese verhindert [6]. Auf die Substratspezifität von MOF scheint das C₂HC-Zinkfinger-Motiv einen wesentlichen Einfluss zu haben, da Punktmutationen in diesem Bereich (Y572G und L578/Y580) die Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität sowie die Wechselwirkung mit dem Chromatin stören [7].

Während dieses Experiment die Art der Enzymaktivität beleuchten, bleibt noch offen, wie MOF über den DCC seine Lokalisation am X-Chromosom findet und wie die Enzymaktivität reguliert wird. Dass hierfür nicht alleine die Präsenz von MOF in den Zellen ausreicht, wird dadurch deutlich, dass MOF auch in weiblichen Zellen exprimiert wird, hier aber zu keiner selektiven Histon-Acetylierung von Lysin 16 an den X-Chromosomen führt [83]. Ein bedeutsamer Einfluss auf den Einbau in den DCC scheint hierbei der roX-RNA zuzukommen. So bindet MOF, wie auch MSL3 und MLE, RNA [76;123;156]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass MOF, ebenso wie auch MSL3 [32], nach RNase-Einwirkung seine Lokalisation am X-Chromosom verliert. Aus selbigem Experiment stammt im Übrigen auch die Vermutung, dass die Acetylierung von H4K16

einen raschen Umsatz erfährt, da sie bereits Minuten nach der RNase-Behandlung in einer Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen H4K16Ac nicht mehr am X-Chromosom nachgewiesen werden konnte [8]. Für die Wechselwirkung mit der RNA ist die Chromodomäne von MOF (AS395-450) verantwortlich, welche *in vitro* mit RNA wechselwirkt. Ebenfalls heben auch Punktmutationen innerhalb dieser Chromodomäne (W426G und Y416D) die Wechselwirkung mit RNA auf. Die Erkenntnis, dass die RNA bindende Eigenschaft von MOF nicht allein verantwortlich für den Einbau von MOF in den DCC und damit die Lokalisation am X-Chromosom sein kann, stammt aus der Tatsache, dass ein roX-RNA-Verlust teilweise durch Überexpression von MSL1 und MSL2 ausgeglichen werden kann und dann die verbleibenden Proteine des DCC einen Komplex bilden sowie - mit Ausnahme von MLE - am X-Chromosom lokalisieren können [141]. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit verschiedene mit dem Reporterprotein GFP versehene Mutationen von MOF auf ihre Lokalisation am X-Chromosom untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass das C₂HC-Zinkfinger-Motiv einen entscheidenden Einfluss auf diese Lokalisation hat.

1.2.4 Parallelen zur X-Inaktivierung beim Menschen

Obwohl die Dosiskompensation zwischen weiblichen (XX) und männlichen (XY) Zellen beim Menschen und der Fruchtfliege auf den ersten Blick völlig unterschiedlich voneinander zu sein scheint, lassen sich überraschenderweise doch einige gemeinsame Mechanismen entdecken, auch wenn sich der DCC in der *Drosophila* sicherlich nicht in allen Einzelheiten auf den Menschen übertragen lässt.

Neben einigen gemeinsamen und grundsätzlichen Eigenschaften der Dosiskompensation wie der Erkennung des X-Chromosoms, der geschlechtsabhängigen embryonalen Differenzierung sowie der Beibehaltung der Dosiskompensation über Zellgenerationen hinweg, ist besonders auffällig, dass auch in der X-Inaktivierung beim Menschen eine nichtkodierende RNA, die XIST-RNA, eine zentrale Rolle spielt. Und wie auch die roX-RNA als Eintrittsstelle Ausgangspunkt für die Ausbreitung über das gesamte X-Chromosom ist, nimmt die Initiierung der Inaktivierung des menschlichen X-Chromosoms ihren Anfang in der XIC (*X inactivation centre*)-Region, wo auch das XIST-Gen kodiert ist, und verläuft dann von hier aus bidirektional *in cis* über fast das gesamte X-Chromosom [30;43]. Allerdings scheint XIST vor allem in der Phase der Initiierung von Bedeutung zu

sein, und die X-Inaktivierung verläuft nur von der Xic-Region aus, während in der *Drosophila* außer den roX-Genen noch etliche andere Eintrittsstellen existieren.

In beiden Organismen ist die Dosiskompensation eng mit epigenetischen Modifikationen verbunden. Während jedoch bei der *Drosophila* eine Acetylierung am Histon H4 erfolgt, ist es beim Menschen die Methylierung sowohl von Histonen als auch von DNA [10]. Und während für methylierte Histone Bindungspartner, z.B. HP1 [168], bekannt sind, fehlen solche Liganden im Fall der Histon-Acetylierung von H4K16.

Weiterhin ist in der humanen Dosiskompensation kein Komplex bekannt, der ähnlich dem DCC in der *Drosophila* die X-Inaktivierung vermittelt. Auch wenn für MSL3 und MOF beim Menschen homologe Proteine mit konservierten Domänen (u. a. Chromodomäne) beschrieben sind [116;137], scheint es zur Zeit keinen Kandidaten für ein Analogon des DCC im Menschen zu geben, da einerseits keine homologen Proteine zu MSL1 und MSL2, die in die Dosiskompensation involviert zu sein scheinen, gefunden wurden und andererseits die Funktion der homologen Proteine zu MSL3 und MOF noch ungeklärt ist. Erstaunlicherweise wurde allerdings eine Verbindung zwischen BRCA1, einem Tumorsuppressor, welcher bei Brust- und Ovarialtumoren eine Rolle spielt, und der X-Inaktivierung gefunden [68]. So scheint BRCA1 mit XIST zu kolokalisieren und der Verlust von BRCA1 führt zu Defekten in der X-Inaktivierung. Interessanterweise besitzt BRCA1 genau wie MSL2 eine Ring-Finger-Domäne am N-terminalen Ende, welches ein häufiges Motiv von Ubiquitin-Ligasen ist [59]. Inwieweit jedoch die Funktion beider Proteine Parallelen aufweist, bleibt abzuwarten.

1.3 Dynamik des Zellkerns

Eine ganz andere Ebene der Regulation der Genexpression als die bisher besprochene betrifft die Architektur des Zellkerns und seine dynamischen Eigenschaften. Auch wenn klar ist, dass die Genexpression von ihrer Lokalisation im großen und kleinen Maßstab abhängt und die Topologie des Zellkerns insbesondere auf die Beibehaltung von Expressionsmustern in differenzierten Zellen Einfluss hat [42], sind gerade auf diesem Gebiet noch viele grundsätzliche Fragen ungeklärt, z.B. wie Proteine ihren Zielort finden oder wie Subkompartimente aufgebaut und beibehalten werden. Einen wesentlichen Fortschritt brachten allerdings im Verlauf des letzten Jahrzehnts technologische Weiterentwicklungen. Hier ist insbesondere die Möglichkeit der *in vivo* Markierung von Proteinen durch GFP (*green fluorescent protein*) und seine dynamische Untersuchung mit

Hilfe der konfokalen Mikroskopie zu nennen (s. a. das Kapitel „GFP und konfokale Mikroskopie“). Diese führte zu einer deutlichen Änderung des Verständnisses des Nucleus, welcher als relativ statische, dicht gepackte Entität angesehen wurde und sich jetzt als ein höchst dynamisches Gebilde darstellt [77;127].

1.3.1 Architektur des Zellkerns

Auf den ersten Blick scheint der Nucleus ein homogeneres Gebilde zu sein, als das Zytoplasma mit seinen verschiedenen Organellen, doch bei genauerer Betrachtung besteht auch der Nucleus aus vielen einzelnen Kompartimenten, die in fundamentalen Prozessen der Zelle wie Transkription, Spleißen, RNA-Synthese etc. ihre speziellen Aufgaben übernehmen. Im Gegensatz zu den meisten Untereinheiten des Zytoplasmas sind diese jedoch nicht durch eine Membran abgegrenzt. Als Hauptstruktur ist die DNA zuerst in Form von Chromatin in verschiedenen Chromosomen-Territorien während der Interphase

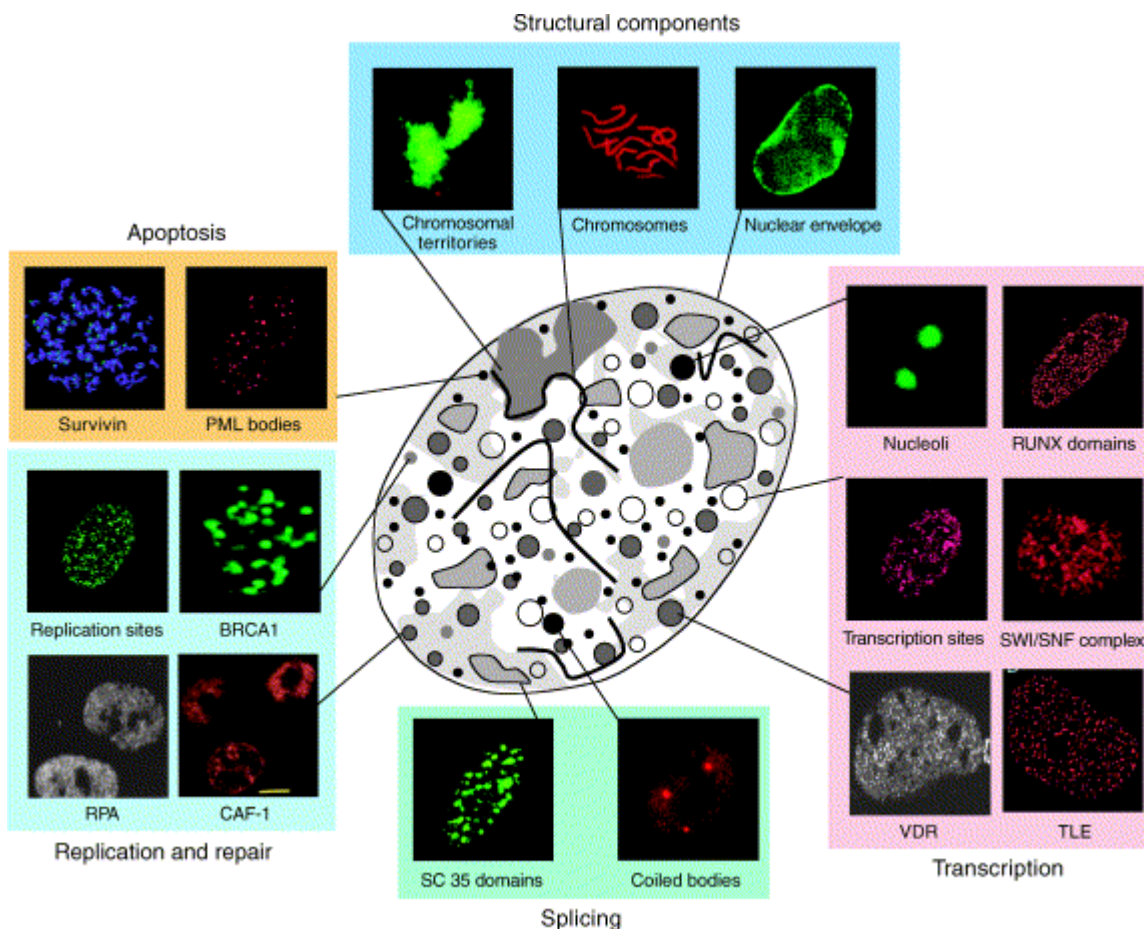


Abbildung 6 Die Abbildung zeigt verschiedene, größtenteils distinkte Subkompartimente des Nucleus schematisch und in Immunfluoreszenzen mit entsprechenden Antikörpern. Sie wurde [187] entnommen.

mit einer Präferenz der nicht überlappenden radialen Anordnung organisiert [47]. Diese Territorien sind während der Mitose als physikalische separate Untereinheiten oder als besonders markantes Beispiel des inaktiven X-Chromosoms in der Form des Barr-Körperchens zu sehen. Aber auch während der Interphase kann diese Trennung in verschiedene Chromosomen mittels FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)-Technik [208] oder durch Immunfluoreszenz mit für einzelne Chromosomen spezifischen Antikörpern, z.B. in der *Drosophila* gegen Proteine des DCC, sichtbar gemacht werden. Inwieweit diese Chromosomenanordnung innerhalb des Nucleus bestimmten Gesetzen gehorcht oder zufällig verläuft, wird weiter unten noch besprochen.

Neben der sowohl elektronen- als auch lichtmikroskopisch gut auszumachenden Substruktur des Nucleus ist der Nucleolus, der Ort der Ribosomen-Zusammenstellung, zu erwähnen [144]. Die Anzahl der Nucleoli innerhalb des Zellkerns variiert; bei Säugetierzellen sind es meist einige wenige, bei der in dieser Arbeit verwendeten *Drosophila*-Zelllinie SF4 ist es in der Regel einer. Weitere morphologisch gut beschriebene subnukleare Strukturen sind die Kompartimente der Spleißfaktoren [33], des Cajal-Körpers [67] oder der PML (*promyelotic leukemia*)-Körper [226], deren Funktionen jedoch noch nicht gänzlich geklärt sind. Interessant sind diese subnuklearen Strukturen, da sie mit spezifischen Proteinen verknüpft sind. Diese Proteine bilden damit innerhalb des Nucleus spezielle Kompartimente. Durch Fusionen dieser Proteine mit fluoreszierenden Markern in lebenden Zellen stehen sie Experimenten zur Verfügung, die Aussagen über die nukleare Architektur und ihre Dynamik liefern können. Bleiben diese Proteine statisch in den Kompartimenten gebunden, oder unterliegen sie einem raschen Austausch mit dem Nukleoplasma? Und, wenn sie einer raschen Austauschdynamik unterliegen, sind sie dann das Kompartiment definierende Proteine? In diese Kategorie fällt auch das in dieser Arbeit untersuchte Protein HP1 α , welches an Heterochromatin bindet und ebenfalls ein Kompartiment des Nucleus (in der *Drosophila* das Chromozentrum) bevorzugt.

Eine leicht andere, mehr funktionelle als morphologische Betonung nimmt die Einteilung des Kerns in Chromosomen-Territorien und Interchromatin-Kompartiment, welches wiederum aus morphologisch verschiedenen Kompartimenten bestehen kann, vor. Eine schöne Visualisierung erfährt diese Einteilung in einer HELA-Zelllinie, die das Histon H2B, fusioniert mit GFP, exprimiert und Regionen mit starker Fluoreszenz (Chromatin) und Regionen fast frei von Fluoreszenz, das Interchromatin-Kompartiment, welches an manchen Stellen einen Durchmesser einigen μm besitzt, zeigt [94]. Dies korrigiert auch die intuitive Vorstellung, dass der Zellkern von DNA und Chromatin weitestgehend ausgefüllt

ist. Auf Basis dieser Einteilung ist ein Modell entwickelt worden, nachdem das Interchromatin-Kompartiment für Proteinkomplexe zugänglich ist, und dort an das Interchromatin-Kompartiment angrenzende oder auf in das Interchromatin-Kompartiment hineinreichenden Chromatinschleifen liegende aktive Gene transkribiert werden können [46].

1.3.2 Dynamik nuklearer Proteine

Eine lange Zeit ungeklärte und immer noch nicht vollständig beantwortete Frage betrifft die Möglichkeit von nuklearen Proteinen, sich innerhalb des Zellkerns zu bewegen und ihren Zielort zu finden. Ist dieser Prozess aktiv und energieabhängig oder aber passiv und energieunabhängig? Für die zweite Hypothese ist die Bedingung, dass sich Proteine überhaupt frei per Diffusion innerhalb des Nucleus bewegen können, zwingend erforderlich. Dass dies in der Tat auch prinzipiell möglich ist, zeigte die Messung der Mobilität von Dextran, die das Volumen des durch Diffusion für Proteine nicht zugänglichen Bereichs des Nucleus auf weniger als 15% bestimmte [66]. Aber erst Experimente mit Photobleichen von mit GFP-Markern versehenen für den Zellkern unphysiologischen oder biologisch inaktiven Proteinen belegten, dass ihre Beweglichkeit innerhalb des Zellkerns gegenüber einer flüssigen Lösung nur um den Faktor 4 eingeschränkt ist [178]. Zusammen mit der Tatsache, dass auch für biologisch aktive Proteine eine hohe energieunabhängige Beweglichkeit innerhalb des Zellkerns gefunden wurde, kann geschlussfolgert werden, dass ein passiver, auf Diffusion basierender Prozess ausreichend ist, um Proteinen innerhalb des Nucleus an ihren Zielort zu bringen. Dies schließt natürlich nicht aus, dass es darüber hinaus noch aktive gerichtete Prozesse gibt, prinzipiell wäre dies aber nicht notwendig.

Auch wenn sich viele biologisch aktive Proteine erstaunlich schnell innerhalb des Nucleus bewegen, so sind sie doch langsamer als biologisch inaktive Proteine vergleichbarer Größe. Für diese Verlangsamung müssen, nachdem durch den Vergleich mit gleich großen Proteinen eine reine Einschränkung der Diffusion durch Kollisionen ausgeschlossen ist, die biologischen Eigenschaften des Proteins, wie Integration in einen größeren Makromolekül-Komplex, Wechselwirkung mit dem Chromatin oder der Kernmembran etc, verantwortlich sein.

Typ	Protein	D_{eff} bzw. $t_{1/2}$	Referenz
Nucleoplasma	EGFP	57 μ^2/s	[84]
	Topoisomerase II α & β	6-10 s (Nucleolus), 2-3 s (Nucleoplasma)	[199]
	Topoisomerase I	14,3 s (Nucleoplasma), 12,5 s (Nucleolus)	[39]
	ZAP-70	>1 μ^2/s (Nucleoplasma)	[182]
	Protein-Phosphatase	< 30 s (Nucleolus)	[202]
DNA-Reparatur	XRCC1, XPA, XPB	6-15 μ^2/s	[84]
	Ku70, Ku86	0,35 μ^2/s	[172]
	Rad-Proteine	7,5-15 μ^2/s	[57]
Proteine v. subnuklearen Kompartimenten	ASF/SF2	0,24 μ^2/s	[101;160]
	Nucleoläre Proteine	<0,16 μ^2/s (Nucleolus), 0,51-1,6 μ^2/s (Nucleopl.)	[36;160;185]
	PML, Sp100	Immobil über 15 Minuten	[26]
	HP1	4-100 s	[38;61]
Chromatin assoziiert	Histon H1	220-250 s	[106;128]
	Nucleosomale Histone	>2h	[98]
	HMG17	0,45 μ^2/s	[160]
Transkriptionsfaktoren	Stat1	ca. 50 μ^2/s	[107]
	Östrogen-Rezeptor	0,8-6s	[189]
	Glucocortocoid-Rez.	im Sekundenbereich	[120]
	SRC	ca. 10s	[189]
Kern-Poren	Nup98	1,2 s (Nucleoplasma), >12 s (Kern-Poren)	[74]
	POM121	20 h (Kern-Poren)	[50]
	Nup153	15 s	[50]
Kernmembran	Lamin B-Rezeptor	immobilisiert	[56]
	Emerin	0,1 μ^2/s	[147]
	HA-95	immobil über 15 Minuten	[118]
	Lamin A, B1	Immobil während der Interphase	[130]

Tabelle 1 Dynamik nuklearer Proteine in FRAP-Experimenten. Die Größen in der dritten Spalte geben entweder den effektiven Diffusionskoeffizient (D_{eff}) in μ^2/s oder die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) in s an. Die Zusammenstellung wurde aus [34] übernommen.

Somit bietet die Möglichkeit von Experimenten mit Photobleichen ein gutes Instrument, um von der Kinetik der Proteine auf die Art ihrer Wechselwirkung, soweit sie bekannt sind, zurück zuschließen.

Hiernach lassen sich die nuklearen Proteine von eher stabilen, immobilen Proteinen bis zu sehr mobilen Proteinen klassifizieren. Nicht überraschend gehören zur ersten Klasse von Proteinen die Histone, mit Ausnahme eines kleinen *Pools* von Histon H2B, des Histon-Oktamers, die als essentielle Bestandteile des Chromatins eine Art Fundament des Zellkerns darstellen [98]. Aber auch Proteine wie die RNA-Polymerase II [18] oder PCNA [186], die über eine Ringklemme eine besonders feste Assoziation zur DNA besitzen und als Basis für die Bindung weiterer Proteine und deren biologischer Funktion dienen,

gehören zu dieser Gruppe. All diese Proteine zeigen Austauschkinetiken mit einer Halbwertszeit von etlichen Minuten (RNA-Polymerase II) bis hin zu einigen Stunden (Histon H3). Der Großteil der bis dato untersuchten nuklearen Proteine zeigt allerdings ein deutlich mobileres Verhalten mit Austauschdynamiken von $T_{1/2}$ im Bereich von Sekunden bis hin zu wenigen Minuten. Hierunter sind Proteine, denen eine eher strukturelle Bedeutung zugeschrieben wird wie H1 [106;129], Chromatin-bindende Proteine wie HMG-17 [160], Spleißfaktoren wie SF2/ASF [160], Proteine von Steroid-Rezeptoren [120], aber auch das heterochromatinbindende HP1 [38;61] sowie etliche andere Proteine (für eine unvollständige Übersicht siehe Tabelle 1). Unter diesen Proteinen sind auch Proteine, die in spezifischen subnuklearen Kompartimenten lokalisiert sind. Zum Beispiel Fibrillarin, welches in den Nucleoli in den Prozess der rRNA-Synthese involviert ist [160], oder das noch zu besprechende HP1 (s. a. das Kapitel „Das Heterochromatin-Protein 1“).

Wie können Proteine, die über eine hohe Mobilität verfügen, morphologisch stabile Kompartimente wie z.B. den Nucleolus bilden? Am ehesten ist dies als ein permanenter Zu- und Abstrom von Proteinen, welche miteinander im dynamischen Gleichgewicht stehen, zu sehen, ähnlich einem Gebirgssee, der als morphologisch stabiles Gebilde erscheint, aber doch durch ein dynamisches Gleichgewicht von zu- und abfließendem

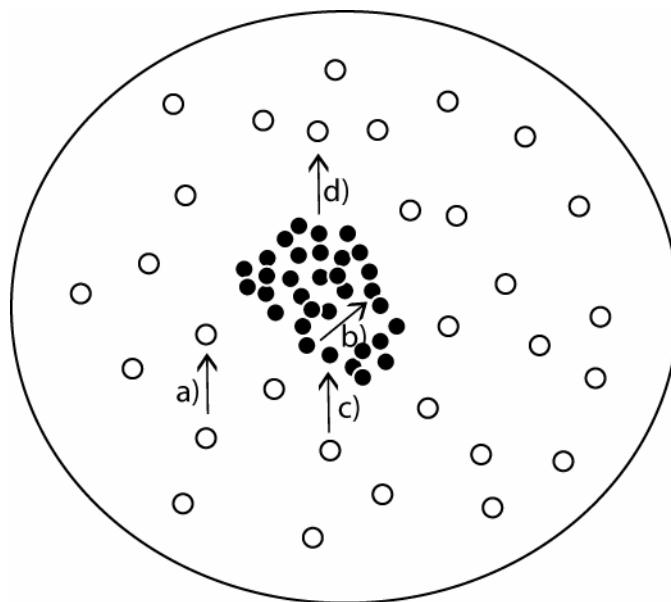


Abbildung 7 Bildung eines Kompartiments. Proteine werden beständig zwischen einem Kompartiment und dem Nucleoplasma ausgetauscht. Während eines bestimmten Zeitintervalls können im wesentlichen vier Vorgänge erfolgen: a) Proteine im Nucleoplasma (ungebunden) können dort bleiben, b) Proteine im Kompartiment (gebunden) bleiben dort gebunden oder wechseln auf einen anderen Bindungsplatz, c) Proteine aus dem Nucleoplasma können im Kompartiment gebunden werden, d) gebundene Proteine im Kompartiment können ins Nucleoplasma abdiffundieren. Die Vorgänge c) und d) entscheiden über die Bildung ($\sum c > \sum d$), die Beibehaltung ($\sum c = \sum d$) oder den Abbau ($\sum c < \sum d$) eines Kompartiments.

Wasser aufrecht erhalten wird, allerdings mit dem Unterschied, dass die abwandernden Proteine in der Zelle auch wieder dem *Pool* der zuwandernden Proteine zur Verfügung stehen (Abbildung 7).

Eine weithin akzeptierte Vorstellung sieht diese Kompartimentbildung im Rahmen eines generellen dynamischen *Stop-and-go*-Mechanismus [127]. Die Proteine diffundieren frei durch den Nucleus und finden stochastisch einen Bindungspartner im speziellen Kompartiment, welches auch der gesamte Nucleus sein kann, wo sie für kurze Zeit verweilen. In dieser Zeit können sie evtl. weitere Bindungspartner rekrutieren oder ihre enzymatische Wirkung entfalten und schließlich wieder abdiffundieren. Zu beachten ist hierbei, dass es für die erhöhte Affinität ein stabiles Signal geben muss, welches das Protein, das sich rasch bewegt, erkennt. Dies können zum einen natürlich Nukleotidsequenzen sein, denkbar sind aber auch Strukturproteine, wie sie z.B. in den Histonen bereits bekannt sind.

Ein Phänomen, welches im Rahmen dieses stochastischen, dynamischen Modells sicherlich gut erklärt ist, ist die Möglichkeit der Zelle, schnell auf externe Einflüsse reagieren zu können. Sobald eine bestimmte Fraktion eines Proteins modifiziert wird, erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein modifiziertes Protein seinen Reaktionspartner findet und damit gegebenenfalls zu einer unterschiedlichen Reaktion führt. Dies wäre, falls das Protein statisch an seinen Reaktionspartner gebunden wäre, ein deutlich langwierigerer Prozess, da zuerst das Protein von seiner Position gelöst werden müsste, modifiziert werden könnte und dann wieder seinem Reaktionspartner zugeführt werden müsste.

1.3.3 Das Heterochromatin-Protein1 (HP1)

Als ein besonders prominentes Beispiel für die überraschend hohe Dynamik nuklearer Proteine soll im Folgenden das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) besprochen werden, zumal in dieser Arbeit die Austauschdynamik, die erst kürzlich in Säugetierzellen beschrieben wurde [38;61], in *Drosophila*-Zellen bestätigt wurde und als Kontrollmodell für die dynamischen Untersuchungen von MSL2 dient.

HP1 ist ein während der Evolution hoch konserviertes Protein, wie sein Vorkommen in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* über die *Drosophila melanogaster* bis hin zu den Säugetieren zeigt [168]. Es kommt in allen Organismen in zumindest drei homologen Formen (HP1 α , HP1 β , HP1 γ) vor, von denen in der *Drosophila* zunächst HP1 α mit einer

bevorzugten Lokalisation am Chromozentrum nachgewiesen wurde [87]. HP1 wird bevorzugt in heterochromatischen Regionen nachgewiesen und mit Transkriptionsrepression in Verbindung gebracht. Allerdings zeigen die unterschiedlichen Homologe von HP1 auch unterschiedliche Lokalisationen innerhalb des Nucleus, welche auch Bindung in euchromatischen Regionen einschließen [139;184]. Dies könnte jedoch gut im Einklang mit der Funktion als Transkriptionssuppressor stehen, da auch im Euchromatin einzelne Gene blockiert sind.

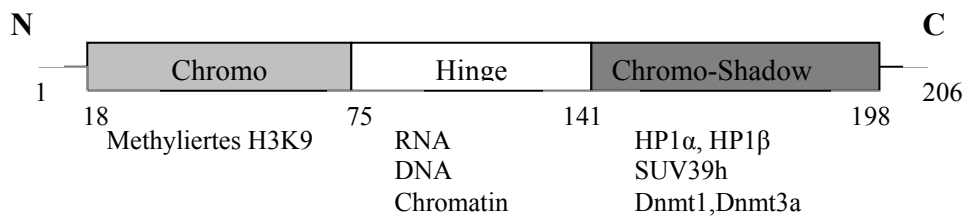


Abbildung 8 Schematische Struktur von HP1 α , unterhalb der Struktur sind Bindungspartner von HP1 α aufgeführt. Die Bindungen sind zum Großteil im Text besprochen, über die *Chromo-Shadow*-Domäne kann durch die Bindung an HP1 α , HP1 β eine Dimerisierung erfolgen, ebenso können auch die Methyltransferasen Dnmt1 und Dnmt3a gebunden werden. Die Abbildung orientiert sich an einer Abbildung in [113].

HP1 ist ein relativ kleines Protein mit ungefähr 200 Aminosäuren, je nach Homolog und Organismus etwas verschieden, HP1 α in der *Drosophila* z.B. mit 206 Aminosäuren, und zwei konservierten Domänen, der Chromodomäne am N-Terminus und der *Chromo-Shadow*-Domäne am C-Terminus, sowie einer dazwischen liegenden *Hinge*-Region, welche eine große Variation zwischen den Homologen von HP1 aufweist (Abbildung 8). Über seine Chromodomäne ist HP1 in der Lage, an Lysin 9 methyliertes, besonders trimethyliertes, Histon H3 zu binden [13;62], einer Modifikation, die z.B. durch SUV39h1 vermittelt wird, welches wieder als Bindungspartner von HP1 -vermutlich über die *Chromo-Shadow*-Domäne- auftritt [1;165]. Da methyliertes H3K9 jedoch auch in Zellregionen nachgewiesen wird, in denen HP1 nicht vorkommt, kann die Lokalisation nicht allein über diese Bindung durch die Chromodomäne vermittelt werden. Hier scheint zusätzlich die RNA bindende Eigenschaft von HP1 eine Rolle zu spielen, die anders als z.B. bei MOF nicht über die Chromodomäne, sondern über einen Teil der *Hinge*-Region vermittelt wird [114;133]. Die Variation dieser *Hinge*-Region, könnte zusammen mit der zusätzlichen DNA- und Chromatin bindenden Eigenschaft zwischen den Homologen damit auch den Grund für die spezifische Lokalisation der einzelnen Homologe liefern [184]. Insgesamt wirkt HP1 durch seine Assoziation mit Heterochromatin als einer besonders

hoch kondensierten, scheinbar schwer zugänglichen Region und seinen reichhaltigen Wechselwirkungen mit Proteinen (eine Auflistung der bekannten Wechselwirkungen findet man z.B. in [181]), RNA und DNA als ein relativ fest in seine Umgebung eingebundenes Protein. Umso erstaunlicher war daher die Erkenntnis, dass auch HP1 eine äußerst hohe Mobilität aufweist [38;61]. In den beiden genannten Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass in FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Experimenten mit HP1 die Fluoreszenz im gebleichten Areal innerhalb kurzer Zeit wiedergewonnen wurde, wobei die Halbwertszeit zwischen beiden Veröffentlichungen leicht differiert. Die Erholung erfolgt wie erwartet im Euchromatin schneller als im Heterochromatin, interessanterweise aber auch für eine Mutation im Bereich der *Chromo-Shadow*-Domäne, was nahe legt, dass auch die *Chromo-Shadow*-Domäne Einfluss auf die Lokalisation von HP1 und seine dortige Verankerung hat. Eine Veröffentlichung diesen Jahres berichtet darüber hinaus von einer langsamen Fraktion von HP1 (ca. 5-7%), die eventuell eine stabile Grundlage für die dynamische Formierung des Heterochromatins bilden könnte (s. a. Diskussion) [176]. Insgesamt weisen die Daten aber auf ein dynamisches Modell für HP1 und die Bildung des Kompartiments hin, wie es im vorigen Kapitel dargelegt wurde und zeigen, dass Heterochromatin sehr wohl zugänglich für regulatorische Proteine ist.

1.3.4 Positionierung von Chromosomen-Territorien

Chromosomen sind, wie schon angesprochen, auch in der Interphase radial in einzelnen, zum großen Teil nicht überlappenden Regionen angeordnet [46]. Diese Anordnung verläuft nicht zufällig, allerdings sind die Regeln, nach denen sie verläuft und welche Auswirkung sie auf die Genexpression haben, noch weitestgehend unverstanden [153]. Während der Interphase bleiben die Chromosomen-Territorien im Wesentlichen erhalten [228] und stabil, unterliegen aber innerhalb der Grenzbedingungen des Chromosomenterritoriums lokal der Brownschen Bewegung [40;82]. Neben der radialen Anordnung weisen die Chromosomen darüber hinaus noch die Tendenz auf, dass genreiche Abschnitte eher in der Mitte des Nucleus, genarme eher am Rande in der Nähe der Zellkernmembran zu liegen kommen [198]. Auch Präferenzen in der Anordnung einzelner Chromosomen zueinander sind beobachtet worden [154].

Ob, und wenn wie, Chromosomen-Territorien über die Mitose hinweg an die nächste Zellgeneration weiter vermittelt werden, ist Gegenstand zweier Veröffentlichungen des letzten Jahres [69;214]. Hier wurden Chromosomen-Territorien mit Hilfe von

Photobleichen an Zelllinien, die fluoreszenzmarkierte Histonproteine exprimierten, eine zeitlang beobachtet. Da einzelne Chromosomen in diesem Versuchsaufbau nicht erkennbar sind, wurden bestimmte Regionen des Chromatins gebleicht und somit zwei unterscheidbare Klassen von Chromatin geschaffen. Eine Vermischung der gebleichten und ungebleichten Fraktion würde für Bewegungen der Chromosomen und eine Änderung der relativen Anordnung sprechen, das Gegenteil für deren Immobilität. Während Walter et al. auf Grund der beobachteten kleinen Unterschiede in den Tochterzellen und größeren Unterschieden in der Enkelgeneration auf eine Änderung der Chromosomenposition während der Mitose schließen, betonen Gerlich et al. aus dem Vergleich mit einem Computermodell, welches keinerlei Informationen über Chromosomenpositionierung berücksichtigt, die Beibehaltung der Chromosomen-Territorien über die Mitose hinweg. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied der Interpretationen bei durchaus ähnlichen Ergebnissen könnte das unterschiedliche Bezugssystem der Autoren liefern. Auf der einen Seite ein streng deterministisches, welches jede Abweichung hiervon als Beleg für eine Änderung auffasst (Walter et al.), sowie auf der anderen Seite ein rein stochastisches, welches jede darüber hinaus erhaltene Beibehaltung der Anordnung der Chromosomen-Territorien als Beleg für eine deterministische Komponente ansieht (Gerlich et al.). Da aber weder eine völlig zufällige Anordnung noch eine absolut erhaltene Anordnung beschrieben wird, scheint eine Erklärung mit einer gewissen Präferenz für eine bestimmte Anordnung, aber doch auch signifikanten Abweichungen hiervon, also ein probalistisches Modell geeignet, beide Ergebnisse zusammen zu bringen. Dies würde auch eine große Variabilität bei doch gemeinsamen Mustern innerhalb einer Zellpopulation erklären. Schwierigkeiten bei diesen Experimenten entstehen sowohl auf Grund eines fehlenden stabilen absoluten Fixpunktes innerhalb des Zellkerns als auch dadurch, dass nicht ein einzelnes Chromosom, sondern eine Mischung verschiedener Chromosomen-Territorien beobachtet wurde. Eine Möglichkeit, ein einzelnes Chromosom *in vivo* fluoreszent zu markieren, könnte hier der DCC liefern.

Basierend auf der Erkenntnis, dass gewisse Informationen über die Chromosomenanordnung über die Mitose zur nächsten Zellgeneration weitergegeben werden, wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, wie diese Informationsvermittlung erfolgen könnte [70]. Dies umfasst spezifische Wechselwirkungen zwischen Chromosomen, Wechselwirkungen zwischen Chromosomen und der Zellkernmembran oder auch spezifische Zeitpunkte der Segregation und die damit verbundene Positionierung entlang des Spindelapparates.

1.4 GFP und konfokale Mikroskopie

Die im vorigen Kapitel beschriebenen Erkenntnisse über die Architektur und Dynamik des Zellkerns wurden zu einem großen Teil aus Experimenten mit GFP markierten Proteinen und der damit verbundenen Möglichkeit, mittels Photobleichen dynamische Untersuchungen durchführen zu können, gewonnen. Da auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auf diesen Techniken beruhen, sollen hier nochmals die wesentlichen Eigenschaften von GFP sowie von FRAP- und FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*)-Experimenten zusammengefasst werden. Ergänzend werden auch die wesentlichen Prinzipien der konfokalen Mikroskopie vorgestellt, welche in FRAP- und FLIP-Experimenten eine breite Anwendung finden.

1.4.1 GFP als Fusionsprotein

GFP (*green fluorescent protein*) ist innerhalb des letzten Jahrzehnts zu einer der meistgebrauchten Werkzeuge in der Zellbiologie geworden. Es wurde in der Qualle *Aequorea* entdeckt [180] und hat die Eigenschaft, von Licht im ultravioletten bis blauen Bereich angeregt zu werden und in der Folge Licht im grünen Bereich zu emittieren [91]. Dass dieses Protein als Werkzeug eine so breite Anwendung erfährt, verdankt es der Tatsache, dass es als ektop exprimiertes Protein in anderen Organismen seine Fluoreszenz beibehält und auch behält, wenn es mit anderen Proteinen fusioniert wird. Das Protein liefert also selbst alle nötigen Informationen und ist nicht auf *Aequorea*-spezifische Enzyme angewiesen [86;163].

GFP besteht aus 238 Aminosäuren, von denen die Aminosäuren 65-67 das *Chromophor* bilden, welches für die Lichtanregung und -abstrahlung verantwortlich ist (Abbildung 9) [163]. Über Veränderung dieses *Chromophors* sind mittlerweile etliche GFP-Varianten mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsspektren eingeführt worden und somit auch Doppel- oder sogar Dreifachfärbungen möglich geworden. Das in dieser Arbeit verwendete EGFP hat dabei ein Erregungsmaximum von $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$ sowie ein Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{em}} = 507\text{-}511\text{nm}$. Andere bekannte Varianten emittieren im blauen (ECFP, EBFP) oder gelben (EYFP) Farbbereich (eine Übersicht findet man z.B. in [203]). Die verschiedenen Varianten sind unterschiedlich sensitiv gegenüber pH-Änderungen, sowohl im basischen als auch im sauren Bereich, z.B. ist die Effizienz von EGFP bei pH= 5.5 auf 50% reduziert [157]. Während die Veränderungen im basischen Bereich erst bei pH-Werten von 11-12 auftreten [27] (Werten, die im zellbiologischen

Kontext so gut wie nie auftreten) können die Veränderung im sauren Milieu, z.B. auch in Lysomen, Endosomen oder im Golgi-Apparat, durchaus eine Funktionseinbuße von GFP bewirken. Eine weitere Einschränkung der Verwendung erfährt GFP im anaeroben Bereich, da es während der Formation zwingend auf O₂ angewiesen ist [80]. Dagegen treten Modifikationen der Spektren bei Temperaturerhöhung erst ab 65°C auf und können so in den meisten zellbiologischen Experimenten vernachlässigt werden [203].

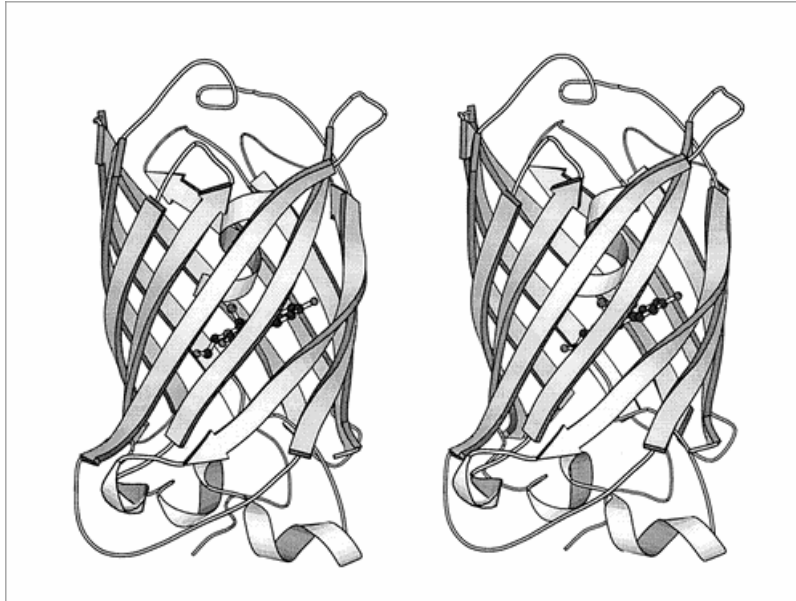


Abbildung 9 Die dreidimensionale Struktur von GFP. Es zeigt die Fassstruktur des Proteins, in dessen Inneren das *Chromophor*, welches hierdurch gut geschützt liegt, zu erkennen ist. Die Abbildung wurde [203] entnommen.

Die breiteste Anwendung erfährt GFP als Markerprotein, fusioniert an ein biologisch aktives Protein und folgender Expression in den interessierenden Zellen und Organismen. Diese Markierung macht es möglich, ein Protein auf seine subzelluläre Lokalisation, die Regulation seiner Expression oder auch sein Auftreten während der Entwicklung eines Organismus zu untersuchen. Auch wenn nicht alle Fusionen die biologisch aktive Funktion des zu untersuchenden Proteins intakt lassen, ist die Liste von erfolgreichen GFP-Fusionen, sowohl C- als auch N-terminal, mittlerweile lang und umfasst nahezu alle subzellulären, insbesondere auch subnuklearen Lokalisationen [203]. Diese Anwendung liegt auch der vorliegenden Arbeit zu Grunde, um die Lokalisation von Proteinen des DCC sowie ihren Mutanten *in vivo* zu untersuchen. Es sei noch erwähnt, dass -auch wenn GFP seine großen Vorteile in Experimenten mit lebenden Zellen hat- die GFP-Fluoreszenz auch

nach Fixierung mit Formaldehyd sichtbar bleibt und somit Immunfluoreszenz-Methoden zur Verfügung steht [35].

1.4.2 Photobleichen

Eine weitere Eigenschaft des GFP, das Photobleichen, ermöglicht es, auch die Dynamik von mit GFP markierten Proteinen zu untersuchen. Während eine normale Bildaufnahme mit niedriger Laserenergie im Idealfall GFP nur anregt und nicht bleicht, führt eine Bestrahlung mit hoher Intensität bei gleicher Wellenlänge zu einer irreversiblen Bleichung von GFP, also dem Verlust der Fluoreszenzeigenschaft [158;195]. Diese Bleich-Eigenschaft ist relativ resistent gegen Veränderungen der Zellumgebung [164] und verursacht im Gegenzug auch keine Schädigung von intrazellulären Strukturen, vor allem lässt es auch das markierte Protein biologisch aktiv [145]. Diese letzte Eigenschaft sollte man berücksichtigen, wenn man die Analysen der Kinetik von markierten Proteinen betrachtet, da die gebleichten Proteine, auch wenn sie in den Fluoreszenzaufnahmen nicht mehr zu sehen sind, weiterhin an den Austauschvorgängen innerhalb der Zelle teilnehmen. Und genau dieser Austausch zwischen der gebleichten und ungebleichten Fraktion eines Proteins kann man über die Zeit beobachten und daraus Rückschlüsse auf die kinetischen Eigenschaften wie den effektiven Diffusionskoeffizienten ziehen. Für diese Untersuchung stehen zwei Variationen an Experimenten, FRAP und FLIP, zur Verfügung, die unterschiedliche Arten von Informationen vermitteln und im Folgenden vorgestellt werden.

1.4.2.1 FRAP-Experimente

Während eines FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Experiments wird eine Fraktion einer fluoreszierenden Population irreversibel gebleicht. Anschließend kann die Wiederverteilung der fluoreszierenden Population über Zeit und Raum beobachtet werden, wobei meist insbesondere der Wiedergewinn im gebleichten Areal von Interesse ist (Abbildung 10). Zwei Aussagen können aus dieser Art des Experimentes abgeleitet werden [11]. Zum einen lässt sich aus der Zeit des Wiedergewinns der Fluoreszenz auf die Zeit des Austausches des Proteins im gebleichten Areal schließen und somit quantitativ ein so genannter effektiver Diffusionskoeffizient (D_{eff}) für das untersuchte Protein berechnen. Mit dem Terminus effektiver Diffusionskoeffizient wird berücksichtigt, dass die Änderungen der Verteilung

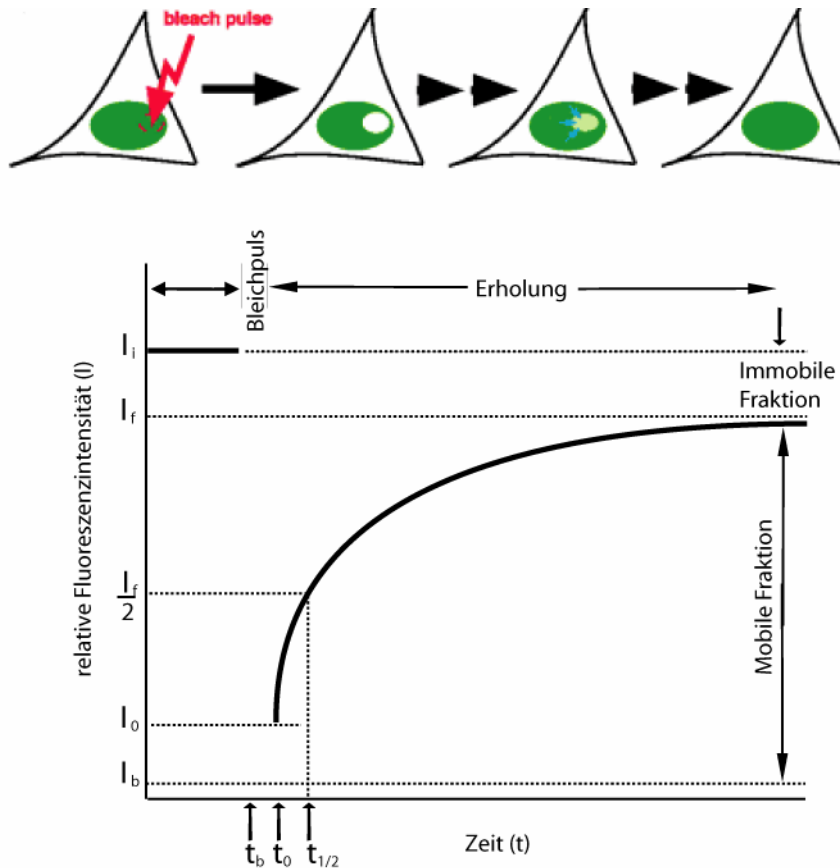


Abbildung 10 Quantitative Auswertung eines FRAP-Experiments. Die obere Anordnung zeigt einen typischen Versuchsaufbau für ein FRAP-Experiment. Aus der gemessenen Intensitäten im gebleichten Areal wird der untere Graph mit den relativen Intensitäten gegenüber der Zeit gewonnen. Der Bleichpuls findet zwischen t_b und t_0 statt, in diesem Zeitraum findet keine Messung der Intensität statt. I_f gibt die maximal wiedergewonnene Energie im gebleichten Areal an, I_b die minimale während des Bleichpulses. Aus der Differenz zwischen I_b und I_f lässt sich $I_f/2$ und daraus die Halbwertszeit $t_{1/2}$ berechnen. Die Abbildung wurde aus [127] und [218] zusammengestellt.

natürlich nicht nur über Diffusion zu Stande kommen, sondern auch die Art der Wechselwirkungen des Proteins mit anderen zellulären Strukturen beinhaltet. Theoretisch sind auch noch Expression und Abbau, sowie Import und Export des Proteins zu berücksichtigen, welche allerdings in einer Gleichgewichtssituation vernachlässigt werden können. Für die Berechnung von D_{eff} , welcher partielle Differentialgleichungen erster und zweiter Ordnung beinhaltet, sind verschiedene mathematische Modelle aufgestellt worden, die vor allem unterschiedliche Grenzbedingungen in Betracht ziehen und berücksichtigen müssen, dass den Datenaufnahmen in 2D eine komplexe dreidimensionale Topologie zu Grunde liegt (für eine Übersicht siehe z.B. [34]). Oft ist aber eine semiquantitative Aussage ausreichend, so dass eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ angegeben wird, welche die Zeit der Wiedererlangung der Hälfte der Intensität, die insgesamt wiedergewonnen wird, angibt. Dieses Endniveau an Intensität ist absolut jedoch immer niedriger als das Ausgangsniveau,

da durch das Bleichen ein Anteil der gesamten Fluoreszenz irreversibel zerstört wurde. Deshalb wird statt einer absoluten Intensität eine relative Intensität angegeben, die diesen Verlust und gegebenenfalls einen Bleicheffekt durch die Bildaufnahmen in Betracht zieht. Aus dem Vergleich der relativen Intensitäten im gebleichten Areal vor und nach dem Experiment kann die zweite Aussage eines FRAP-Experiments gewonnen werden. Denn falls das Endniveau unterhalb des Ausgangsniveaus liegt, lässt dies auf einen immobilen Anteil des untersuchten Proteins, der nicht mit seiner Umgebung ausgetauscht wird, sowie dessen Größe schließen.

Für eine optimale Datengewinnung sind noch einige praktische Vorgehensweisen zu erwägen. So sollte der Bleichpuls kurz mit höchstmöglicher Energie durchgeführt werden, um die Fluoreszenz im Bleichareal auf das Hintergrundniveau zu senken, aber auch noch keine Erholung innerhalb des Bleichpulses zu erhalten. Für eine Bestimmung der kürzestmöglichen Zeit eignet sich als Vorexperiment eine fixierte Zellpopulation, da hier während des Bleichpulses keine Erholung des Fluoreszenzsignals auftreten sollte. Eine zweite Vorüberlegung betrifft den Zeitabstand zwischen den Bildaufnahmen, welcher in einem Vorexperiment getestet werden sollte. Ist die Kinetik sehr schnell, sollten direkt nach dem Bleichpuls möglichst viele Aufnahmen gewonnen werden. Bei einer langsameren Kinetik dagegen kann hierauf verzichtet werden, um den Photobleicheffekt durch die Aufnahmen so niedrig wie möglich zu halten.

1.4.2.2 FLIP-Experimente

Ein FLIP(*fluorescence loss in photobleaching*)-Experiment ist eine zweite Möglichkeit, Dynamiken von Proteinen zu untersuchen. In einem FLIP-Experiment wird eine Region wiederholt gebleicht und der Verlust an Fluoreszenz in einer Region außerhalb des gebleichten Areals gemessen (Abbildung 11). Besonders geeignet ist ein FLIP-Experiment, um den Austausch zwischen verschiedenen Fraktionen des Proteins zu veranschaulichen [44], z.B. zwischen einer ungebundenen Fraktion im Nucleoplasma und einer gebundenen in einem subnuklearen Kompartiment oder auch zwischen zwei verschiedenen Organellen. Darüber hinaus kann ein FLIP-Experiment aber auch über den Anteil der Diffusion in der Dynamik eines Proteins nähere Auskunft geben. Hierzu kann in mehreren Regionen, unterschiedlich weit von der Bleichregion entfernt, der Verlust der Intensität gemessen werden und aus dem Intensitätsverlust gegenüber der Distanz geschlossen werden, ob

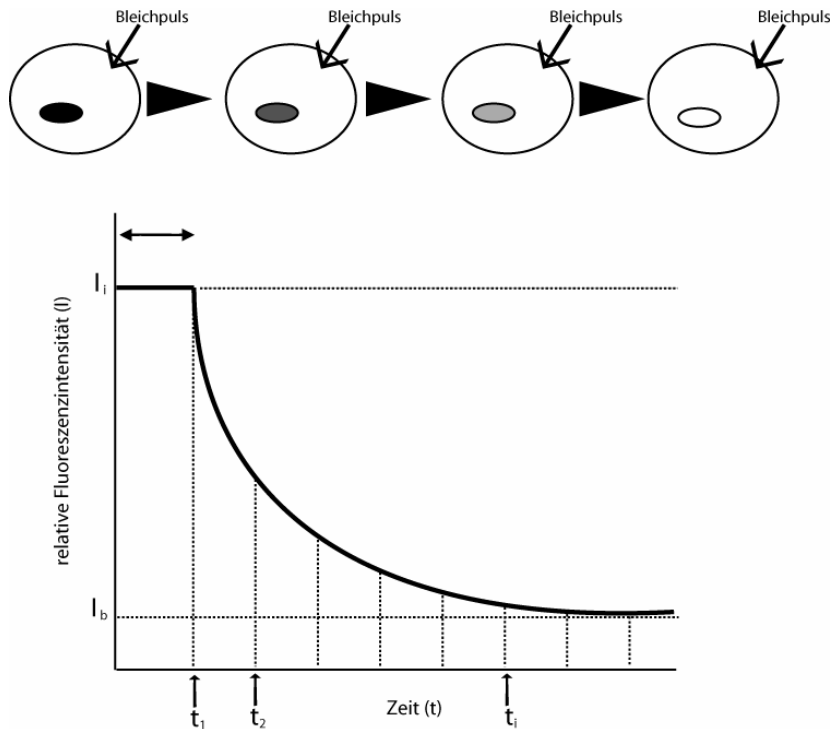


Abbildung 11 Typischer Aufbau eines FLIP-Experimentes. Zu den Zeiten $t_1, t_2, \dots, t_i, \dots$ erfolgt jeweils ein Bleichpuls in gleichmäßigen Zeitabständen und direkt vor dem nächsten Bleichpuls die Messung der Intensität im oben gekennzeichneten Areal, außerhalb der Bleichregion. Die gemessene Intensität ist unten über die Zeit aufgetragen. I_b gibt die Hintergrundintensität wieder, unter die kein weiteres Bleichen mehr möglich ist.

Diffusion einen signifikanten Anteil an der Dynamik eines Proteins hat oder vernachlässigt werden kann. Während FRAP-Experimente gut für schnelle Dynamiken geeignet sind, hat ein FLIP-Experiment den Vorteil eher bei langsamen Dynamiken, da die höchstmögliche Auflösung eines FLIP-Experiments vom Abstand zwischen zwei Bleichpulsen abhängt. Bei der praktischen Durchführung sollte, wenn der Austausch zwischen zwei verschiedenen Fraktionen eines Proteins untersucht wird, darauf geachtet werden, dass der Abstand zwischen Bleich- und Messareal möglichst groß gewählt wird. Als Referenzkurve eignet sich ein FLIP-Experiment, welches unter denselben Bedingungen an fixierten Zellen durchgeführt wird. Die idealen Bleichbedingungen sollten in einem Vorexperiment wieder empirisch bestimmt werden.

1.4.3 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ist ein wesentliches Werkzeug für viele biomedizinische Anwendungen und Bildgebungen. Der wesentliche Unterschied zur konventionell Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass zwei Linsen so arrangiert werden, dass sie auf

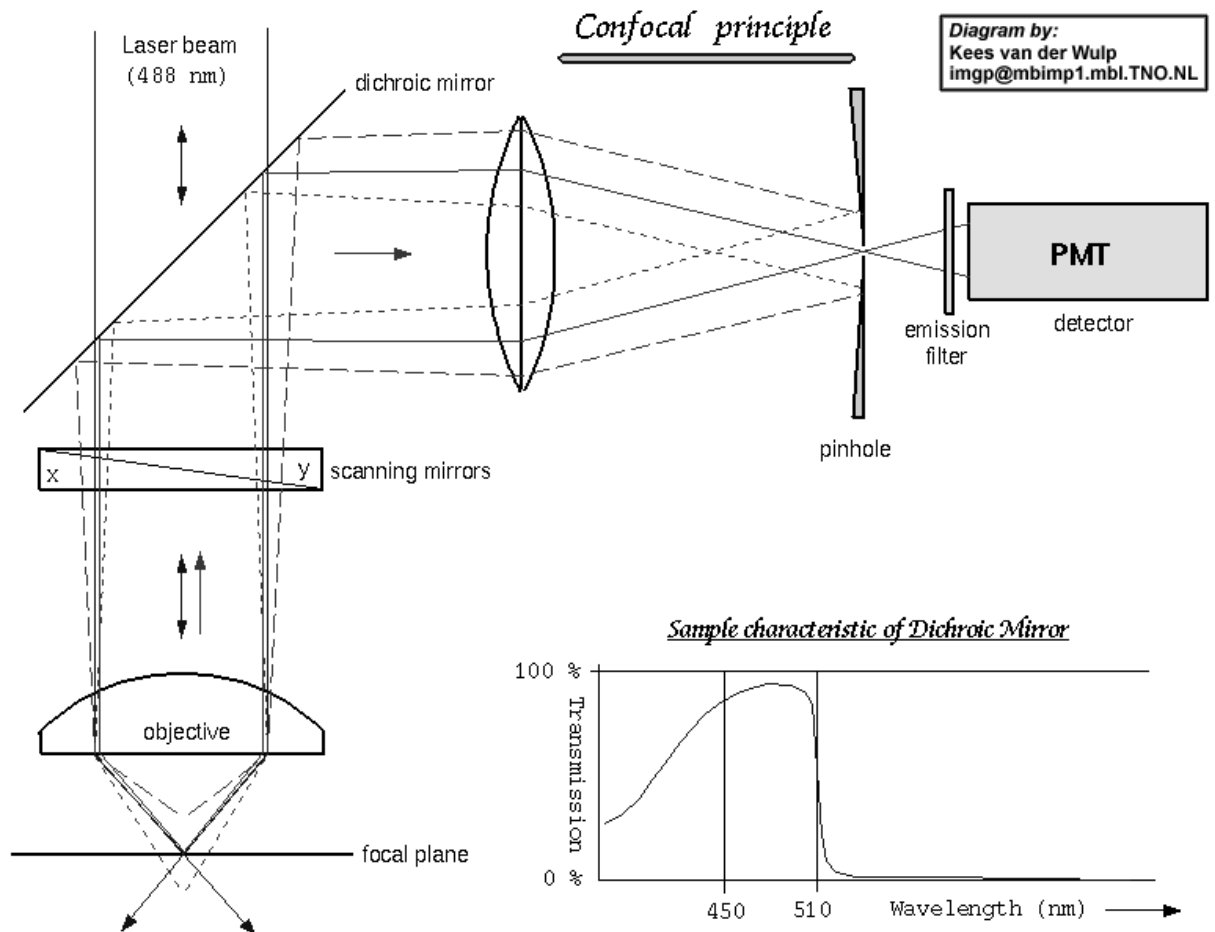


Abbildung 12 Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines konfokalen Mikroskop. Als optisch auffällige Änderung gegenüber dem konventionellen Mikroskop ist das „pin hole“ vor dem Detektor sichtbar. Mit den durchgezogenen Strahlen, blau und rot, ist der Lichtgang, der im Detektor aus der Fokusebene registriert wird, dargestellt. Gestrichelt ist der Verlauf von Lichtstrahlen, welche nicht aus der Fokusebene stammen, skizziert. Die Abbildung wurde von der Internetseite www.cs.ubc.ca/spider/ladic/images/kees.gif übernommen.

den selben Punkt fokussieren. Das Objekt wird über eine punktförmige Lichtquelle beleuchtet. Durch die Einbringung einer Blende vor dem Detektor, im Englischen „*pin hole*“, erreicht nur Licht aus der Brennebene den Detektor (Abbildung 12). Licht, welches von außerhalb der Brennebenen stammt, wird herausgefiltert und trägt nicht zur Bildgebung bei. Quelle, Objekt und „*pin hole*“ sind konfokal. Der Vorteil gegenüber den konventionellen Epifluoreszenzmikrosokopen besteht vor allem in der Verbesserung der axialen Auflösung, die es ermöglicht, optische Schnitte durch das Objekt zu legen. Dies erlaubt eine dreidimensionale Rekonstruktion des Untersuchungsgegenstands. Sie erfolgt durch Verschiebung des Objekts und der Gewinnung von Schichtaufnahmen an verschiedenen Z-Positionen. Die Schichtdicke hängt von dem Licht, welches noch von außerhalb der Brennebene einfällt, ab. Sie wird also durch die Öffnung des „*pin holes*“ bestimmt und ist nach unten durch die detektierbare Lichtmenge beschränkt. Der Vorteil in

der axialen Auflösung ist zweifach. So wird durch das konfokale Prinzip der Beitrag des außerhalb der Brennebene liegenden Volumens schwächer beleuchtet und der Großteil des emittierten Lichts verfehlt das „pin hole“. Dies ist insbesondere in der Untersuchung von lebenden Zellen, die mit GFP-fusionierten Proteinen versehen sind, von Bedeutung, da hierdurch der Hintergrund stark reduziert werden kann und Strukturen sichtbar macht, die in der konventionellen Mikroskopie nicht zu sehen sind.

Der zweite Vorteil resultiert nicht direkt aus dem konfokalen Prinzip, sondern aus der Verwendung eines Lasers als Lichtquelle. So wird zum einen durch monochromatisches Licht die chromatische Aberration vermindert. Zum zweiten ist es aber mit dem Laser vor allem möglich, selektiv die Fluoreszenz von GFP anzuregen oder bei der Verwendung von mehreren Wellenlängen, auch verschiedene Fluorophore gleichzeitig sichtbar zu machen. Und schließlich ermöglicht der Laser bei hohen Energien einer Wellenlänge, sich die in Kapitel 1.4.2 besprochene Eigenschaft des Photobleichens von GFP zu Nutze zu machen. Für eine Übersicht über die Prinzipien und Anwendungen der konfokalen Mikroskopie sei auf [149;221] verwiesen.

1.5 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine stabile *Drosophila*-Zelllinie zu etablieren, die MSL2 fusioniert mit GFP exprimiert. Hierdurch sollte ein Instrument geschaffen werden, um den DCC *in vivo* untersuchen zu können. Nachdem hierdurch ein definiertes Kompartiment innerhalb des Nukleus markiert war, bestand Interesse an der Dynamik von MSL2 als ein Beispiel für ein nukleares Protein, welches mit einem gewissen Kompartiment und epigenetischer Modifikation verbunden ist und inwieweit diese Dynamik Rückschlüsse auf den Aufbau und die Aufrechterhaltung des DCC zulässt.

2 Ergebnisse

2.1 Vorbemerkungen

2.1.1 Expression von GFP in *Drosophila*-Zelllinien

Da soweit kaum Daten von mit GFP verknüpften Proteinen, die in *Drosophila*-Zelllinien transfiziert wurden, vorliegen, waren zu Beginn der Arbeit Vorarbeiten notwendig, um zu testen, ob die Zellen exprimiertes GFP akzeptieren und ob in diesem Fall die Lichtausbeute durch das Mikroskop ausreichen würde, um Strukturen, insbesondere subnukleare Strukturen, sichtbar werden zu lassen. Hier schien insbesondere, die -im Vergleich zu humanen Zellen- kleine Zellgröße der Zelllinien mit 8-10 µm Durchmesser mit einem Nucleus von ca. 5 µm Durchmesser eine limitierende Rolle zu spielen. So wurde zunächst ein Plasmid transfiziert, welches für GFP allein kodiert und unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors HSP70 stand. Nach Transfektion konnte unter dem Mikroskop recht schnell (nach ca. 6 Stunden) ein GFP-Signal gesehen werden, welches in der gesamten Zelle, also sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma, lokalisiert war. Dieses Signal konnte bis zu 10 Tage nach transienter Transfektion nachgewiesen werden, ohne dass sich die Zellen im Wachstumsverhalten oder in der Morphologie von einer Kontrollzelllinie unterschieden hätten. Dies diente als erstes Indiz dafür, dass die *Drosophila*-Zelllinie GFP-Produkte exprimiert und toleriert.

2.1.2 Sequenzvergleich für MSL2

In der Literatur sind verschiedene Sequenzen für MSL2 beschrieben. Bei der Sequenzierung der im Labor vorliegenden MSL2-Klone zeigte sich, dass deren Sequenz mit keiner der beschriebenen Sequenzen übereinstimmte (für einen Sequenzvergleich siehe Abbildung 13). Dies war der Anlass für eine Reklonierung von MSL2. Mit Hilfe reverser Transkriptase und anschließender PCR wurde die Ausgangssequenz aus SF4-Zelllinien gewonnen. Die so gewonnene Sequenz entsprach der Sequenz aus der Genomdatenbank, so dass diese Nukleotidsequenz für unsere Plasmidkonstrukte verwendet wurde. Im Folgenden ist immer diese Sequenz gemeint, wenn von der MSL2-Sequenz die Rede ist. Die vollständige Sequenz ist im Anhang aufgeführt. Es sei darauf hingewiesen, dass die vorliegende Sequenz immerhin in sieben Aminosäuren sowie in

```

*****
roso_genome|gi|21711657|DSTQLAVLAAVEETVETSTQLTVLSTTVEETVETSTQLEVLTSAEEPNEISDQLANLQVEESDEALVEETVFEARGTSIPSEVVAEHMEEDQHLDVHTSQSPTQTEMEEAVEEHVATKTQLGHVQTELDAESLQKDFEDAKAAAEAKE
Our_new_cDNA_SF4|DSTQLAVLAAVEETVETSTQLTVLSTTVEETVETSTQLEVLTSAEEPNEISDQLANLQVEESDEALVEETVFEARGTSIPSEVVAEHMEEDQHLDVHTSQSPTQTEMEEAVEEHVATKTQLGHVQTELDAESLQKDFEDAKAAAEAKE
Bashaw|gi|1234897|DSTQLAVLAAVEETVETSTQLTVLSTTVEETVETSTQLEVLTSAEEPNEISDQLANLQVEESDEALVEETVFEARGTSIPSEVVAEHMEEDQHLDVHTSQSPTQTEMEEAVEEHVATKTQLGHVQTELDQDEEPLQKDFEDAKAAAEAKE
MSL2clone_in_plasmidlib|DSTQLAVLAAVEETVETSTQLTVLSTTVEETVETSTQLDVLTSAEEPNEISDQLANLQVEESDEALVEE----ARGTSIQSEVVAEHMEEDQHLDVHTSQSPIQAEEMEEAVEEHVATKTQLGHVQTELDQDEEPLQKDFEDAKAAAEAKE
Swissprot|gi|1709131|DSTQLAVLAAVEETVETSTQLTVLSTTVEETVETSTQLEVLTSAEEPNEISDQLANLQVEESDEALVEETLKTARGTSIPSEVVAEHMEEDQHLDVHTSQSPTQTEMEEAVEEHVATKTQLGHVQTELDQDEEPLQKDFEDAKAAAEAKE
Kelley|gi|994816|DSTQLAVLAAVEETVETSTQLTVLSTTVEETVETSTQLEVLTSAEEPNEISDQLANLQVEESDEALVEETLKTARGTSIPSEVVAEHMEEDQHLDVHTSQSPTQTEMEEAVEEHVATKTQLGHVQTELDQDEEPLQKDFEDAKAAAEAKE
Kuroda_95|gi|1079106|DSTQLAVLAAVEETVETSTQLTVLSTTVEETVETSTQLEVLTSAEEPNEISDQLANLQVEESDEALVEETLKTARGTSIPSEVVAEHMEEDQHLDVHTSQSPTQTEMEEAVEEHVATKTQLGHVQTELDQDEEPLQKDFEDAKAAAEAKE
ruler .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450

```



```

*****
roso_genome|gi|21711657|KEKDLHAISAELQKEDSDEPTLKRKRTRTLKASQAAKIEPVPSEVKTQVQSGKALRRIRGKDKKEKVKPPKPKCRCGISGSSNTL
Our_new_cDNA_SF4|KEKDLHAISAELQKEDSDEPTLKRKRTRTLKASQAAKIEPVPSEVKTQVQSGKALRRIRGKDKKEKVKPPKPKCRCGISGSSNTL
Bashaw|gi|1234897|KEKDLHAISAELQKEDSDEPALKRKRTRTLKASQAAKIEPVPSEVKTQVQSGKALRRIRGKDKKEKVKPPKPKCRCGISGSSNTL
MSL2clone_in_plasmidlib|KEKDLHAISAELQKEDSDEPALKRKRTRTLKASQAAKIEPVPSEVKTQVQSGKALRRIRGKDKKEKVKPPKPKCRCGISGSSNTL
Swissprot|gi|1709131|KEKDLHAISAELQKEDSDEPTLKRKRTRTLKASQAAKIEPVPSEVKTQVQSGKALRRIRGKDKKEKVKPPKPKCRCGISGSSNTL
Kelley|gi|994816|KEKDLHAISAELQKEDSDEPTLKRKRTRTLKASQAAKIEPVPSEVKTQVQSGKALRRIRGKDKKEKVKPPKPKCRCGISGSSNTL
Kuroda_95|gi|1079106|KEKDLHAISAELQKEDSDEPTLKRKRTRTLKASQAAKIEPVPSEVKTQVQSGKALRRIRGKDKKEKVKPPKPKCRCGISGSSNTL
ruler .....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....

```



Abbildung 13 Die Abbildung zeigt verschiedene Aminosäuresequenzen von MSL2, wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben wurde. Die Sequenz „Our_new_cDNA_SF4“ ist die mittels RT-PCR aus SF4-Zellen gewonnene MSL2-Sequenz und wurde in dieser Arbeit verwendet. Die zu Beginn benutzte Sequenz, die in der Plasmidbibliothek unseres Labors vorlag, ist die Sequenz „MSL2clone_in_plasmidlib“. Die übrigen Sequenzen sind in der Gen-Datenbank unter den angegebenen Nummern zu finden und in folgenden Arbeiten veröffentlicht: roso_genome in [2], Bashaw in [15], Swissprot in [97], Kelley in [97] und Kuroda_95 in [97].

mehreren zusätzlichen Nukleotiden von der Sequenz des im Labor vorliegenden Klons in der Plasmidbibliothek abweicht. Allerdings liegen die Aminosäureveränderungen nicht im Bereich bekannter Domänen und auch in den hier durchgeführten Experimenten zur Lokalisation von MSL2, die mit beiden codierenden Sequenzen durchgeführt wurden, ließ sich kein Unterschied zwischen den Produkten beider Sequenzen feststellen. Für die Abweichungen zwischen den beiden Sequenzen lassen sich zweierlei Erklärungen anfügen. So deutet die Vielzahl an unterschiedlich veröffentlichten Sequenzen durchaus in Richtung von existierenden Polymorphismen [97]. Da allerdings die vorgefundene Sequenz mit keiner der bislang veröffentlichten Sequenzen übereinstimmt, könnten auch bei der Klonierung Fehler unterlaufen sein, insbesondere in der PCR-Reaktion bei der Verwendung einer ungeeigneten Polymerase. Für die in dieser Arbeit klonierte Sequenz wurde die Pfu-Polymerase mit einer gegenüber der Taq-Polymerase verringerten Fehlerrate verwendet. Die hundertprozentige Übereinstimmung dieser Sequenz mit der in der Gen-Datenbank veröffentlichten Sequenz deutet auch hier auf eine fehlerfreie Amplifizierung hin.

2.1.3 Promotorenvergleich

Eine weitere Frage im Vorfeld der Experimente richtete sich nach einem geeigneten Promotor für die Expression von mit GFP fusioniertem MSL2. Ein geeigneter Promotor sollte eine möglichst geringe, aber detektierbare Expression des gewünschten Proteins zeigen, um so eine Fluoreszenz im gewünschten Territorium bei niedrigem Hintergrundsignal zu zeigen. Hierdurch wäre auch gewährleistet, dass das endogene MSL2 weiterhin seine Funktion ausüben könnte und nur zu einem kleinen Prozentsatz durch MSL2-GFP ersetzt würde, welches potenziell Funktionsdefizite gegenüber dem endogenen MSL2 besitzen könnte. Im Idealfall wäre hierdurch eventuell auch eine Clusterbildung innerhalb des Territoriums des X-Chromosoms, die einer gewissen Topologie der bekannten Eintrittsstellen entsprechen könnte, besser sichtbar. Aus in der Literatur [9;90;143] bekannten Vergleichsstudien für Promotoren in der S2-*Drosophila*-Zelllinie (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3) schien der Affenviruspromotor SV40, dessen Expressionsstärke ca. hundertfach niedriger als die des *Drosophila*-Promotors MTN ist [143], ein unter diesen Gesichtspunkten geeigneter Promotor zu sein. Darüber hinaus entschied ich mich als zweiten Promotor für das aus vielen Experimenten etablierte System

Promotor	Relative Proteinexpression	
	TPA	GP120
Mtn (CuSO ₄ 0.5mM)	1.3	1
α 1-Tubulin	0.37	0.19
Actin 5C distal	n.d.	0.93

Tabelle 2 Die Tabelle zeigt relative Proteinexpressionen für ausgewählte Promotoren für die beiden Reporterproteine TPA und GP120. Die Proteinexpression wurde mittels *Western-Blot*, die Anzahl der integrierten Plasmidkopien mittels *Southern-Blot* bestimmt und aus dem Quotient eine relative Proteinexpression bezogen auf GP120 unter dem Metallothioneinpromotor errechnet. n.d. = nicht detektierbar. Die Daten stammen aus [9].

Promotor	Proteinlevel	
	FKP2	GalK
Mtn	7	3
Copia 5'LTR	0.02	1.3
SV40 Early	n.d.	n.d.

Tabelle 3 Die Tabelle zeigt unterschiedliche Expressionsstärken unter verschiedenen Promotoren für die Reporterproteine FKP2 und GalK. n.d. = nicht detektierbar. Die Daten stammen aus [90] und [143].

basierend auf dem Hitzeschockpromotor HSP70, der neben einer vorhandenen geringen basalen Expression auch den Vorteil der Möglichkeit zur Induktion durch Temperaturerhöhung besitzt. Nachdem sich in den Experimenten zeigte, dass eine zu geringe Expression, wie unter dem Affenviruspromotor SV40, kein detektierbares Fluoreszenzsignal ergab, dafür allerdings MSL2-GFP in der Lage schien, das endogene MSL2 zu ersetzen und zu supprimieren (siehe Ergebnisse weiter unten), wurde als dritter Promotor der *Drosophila*-Promotor MTN hinzu genommen. Der Promotor des Metallothionein-Gens ist ein gut untersuchter Promotor für die Expression von exogenen Proteinen in *Drosophila*-Zellkulturen [31]. Er zeigt bei relativ hohem Expressionsniveau gegenüber dem Hitzeschockpromotor HSP70 den Vorteil einer kontinuierlich abstufbaren Induktion durch unterschiedliche Konzentrationen von CuSO₄ über einen längeren Zeitraum hinweg.

2.2 Expression von MSL2-GFP in SF4-Zellen

2.2.1 MSL2-GFP wird schnell abgebaut

In einer stabilen Zelllinie von SF4-Zellen, transfiziert mit pEGFP-hsp-msl2, wurde 14 Tage nach Transfektion eine nur sehr niedrige Expression von MSL2-GFP nachgewiesen und hiermit im Einklang wurden auch in der Immunfluoreszenz nur sehr wenige Zellen, in denen MSL2-GFP im Territorium des X-Chromosoms lokalisiert, gefunden. Über eine Induktion durch Hitzeschock konnte jedoch ein starker Anstieg der Expression erzielt werden. Hierzu wurden die Zellen über 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde über zehn Stunden eine Zeitserie angefertigt, in der zum einen die Expression von MSL2-GFP in Gesamt-Zellextrakt mittels *Western-Blot* beobachtet wurde (Abbildung 14), zum andern zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MSL1 auf die Lokalisation von MSL2-GFP getestet wurden. Ausgehend von einem niedrigen Niveau war bereits direkt nach dem Hitzeschock ein Anstieg der Expression von MSL2-GFP festzustellen. Also wurde schon sofort nach Anstieg der Inkubationstemperatur während des Hitzeschocks MSL2-GFP vermehrt exprimiert. Das Maximum der Konzentration von MSL2-GFP wurde ca. zwei Stunden nach Ende des Hitzeschocks erreicht, wobei zu diesem Zeitpunkt die Konzentration des exogenen MSL2-GFP deutlich über der des endogenen MSL2 lag.

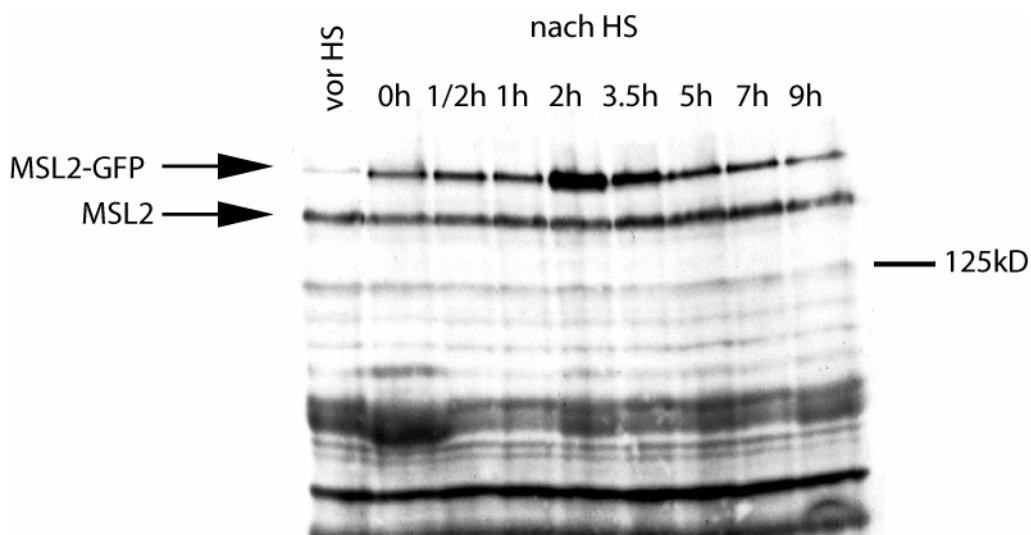


Abbildung 14 Expression von MSL2-GFP nach Hitzeschock in einer stabilen Zelllinie für hsp-msl2-gfp ca. zwei Wochen nach Transfektion. Die Zellen wurden bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert. Die Bahnen wurden jeweils mit 10 µg Protein von reinem Zellextrakt beladen und zeigen von links nach rechts den Zeitverlauf beginnend vor dem Hitzeschock bis zu neun Stunden nach dem Hitzeschock.

Anschließend fiel die Konzentration von MSL2-GFP jedoch kontinuierlich ab und hatte bereits neun Stunden nach dem Ende der Induktion ein Niveau erreicht, das vergleichbar mit dem Ausgangsniveau direkt nach dem Hitzeschock und gering höher als vor dem Hitzeschock war. Während des gesamten beobachteten Zeitraumes zeigte sich keine signifikante Reduktion von endogenem MSL2. Die Konzentration blieb stets konstant auf dem Ausgangsniveau, was dafür spricht, dass das exogen zugeführte MSL2-GFP innerhalb der beobachteten zehn Stunden nicht in der Lage war, das endogene MSL2 zu ersetzen, wie das zum Beispiel in der weiter unten besprochenen stabilen Zelllinie der Fall ist. Ob hierfür anstatt des kurzzeitigen Pulses, die Induktion durch einen Hitzeschock über 30 Minuten, eine langfristige Expression des exogenen MSL2-GFP auf einem bestimmten Niveau nötig ist, oder ob die Heterogenität der betrachteten Zellen, in denen einige Zellen eine massive Steigerung der Expression von MSL2-GFP zeigten, bei anderen dagegen auch nach Hitzeschock, überhaupt keine Fluoreszenz detektiert werden konnte, dafür verantwortlich sind, dass MSL2 nicht durch MSL2-GFP ersetzt wird, muss letztendlich offen bleiben. Allerdings spricht die Tatsache, dass auch 24 Stunden nach dem Hitzeschock nicht mehr Zellen gefunden werden, die ein fluoreszierendes X-Chromosom-Territorium zeigten, als vor dem Hitzeschock, eher für die erste These. Ansonsten sollten zumindest die Zellen, die eine deutliche Überexpression von MSL2-GFP zeigen, nach Abbau des überschüssigen MSL2-GFP noch eine Integration von MSL2-GFP in den DCC zeigen, welches sich unter anderem darin äußern sollte, dass sie am X-Chromosom lokalisieren. Ein weiteres Indiz, welches dafür spricht, dass es einer länger andauernden Expression des mit GFP fusioniertem MSL2-Proteins bedarf, stammt aus dem Verhalten nach transienter Transfektion. Hier kam es ebenfalls erst nach vier bis fünf Tagen zum Maximum des Prozentsatzes von Zellen, die eine Lokalisation im Territorium des X-Chromosoms zeigen. Darüber hinaus ist auffällig, wie rasch das überschüssige MSL2-GFP abgebaut wurde. Dass dies nicht an einem generellen Abbau von GFP-Produkten liegt, sieht man daran, dass die Zellen GFP, dessen Expression ebenfalls durch einen Hitzeschock induziert wurde, allein deutlich besser tolerierten und auch noch nach zwei bis drei Tagen eine deutlich gesteigerte Expression gegenüber Zellen ohne Induktion zeigten. Auch MOF-GFP und HP1 α -GFP scheinen die Zellen in hoher Konzentration besser zu akzeptieren.

2.2.2 Transiente Transfektion von hsp-msl2-gfp in SF4-Zellen

Nach transientscher Transfektion des Plasmids pEGFP-hsp-msl2 in SF4-Zellen konnte das Verhalten der Zellpopulation der Zellen in den folgenden zehn Tagen beobachtet werden. Innerhalb der ersten zwei Tage waren lediglich Zellen zu sehen, die eine extrem hohe Menge an MSL2-GFP exprimierten und ein entsprechend starkes fluoreszentes Signal zeigten. Dieses war vorwiegend im Nucleus zu finden, einige wenige Zellen zeigten auch eine Anreicherung im Zytoplasma. Insgesamt zeigten diese Zellen meist eine auffallende Morphologie, die Zellen wirkten leicht aufgebläht und das Zytoplasma wies eine deutlich heterogenere Struktur auf. Dies ließ darauf schließen, dass eine zu hohe Menge von MSL2-GFP von den Zellen nicht gut toleriert wird. Dies kann zum einen an der hohen Menge von MSL2-GFP selber liegen, natürlich könnte es aber auch eine Transfektionfolge sein, dass die Zellen, die besonders viel Effectene-DNA-Komplexe aufnehmen, eine reduzierte Vitalität besitzen. Umgekehrt könnte es auch sein, dass Zellen, die absterben, durch diesen Stress den Hitzeschockpromotor, von dem bekannt ist, dass er auf Stressfaktoren für die Zellen im Allgemeinen und nicht ausschließlich auf Temperatur reagiert, aktivieren und entsprechend mehr MSL2-GFP exprimiert wird. Hierzu würde auch passen, dass bei der Transfektion von pEGFP-sv40-msl2 praktisch kein fluoreszentes Signal zu finden war. Somit wäre das hohe Niveau von exprimierten MSL2-GFP nicht der Grund für das

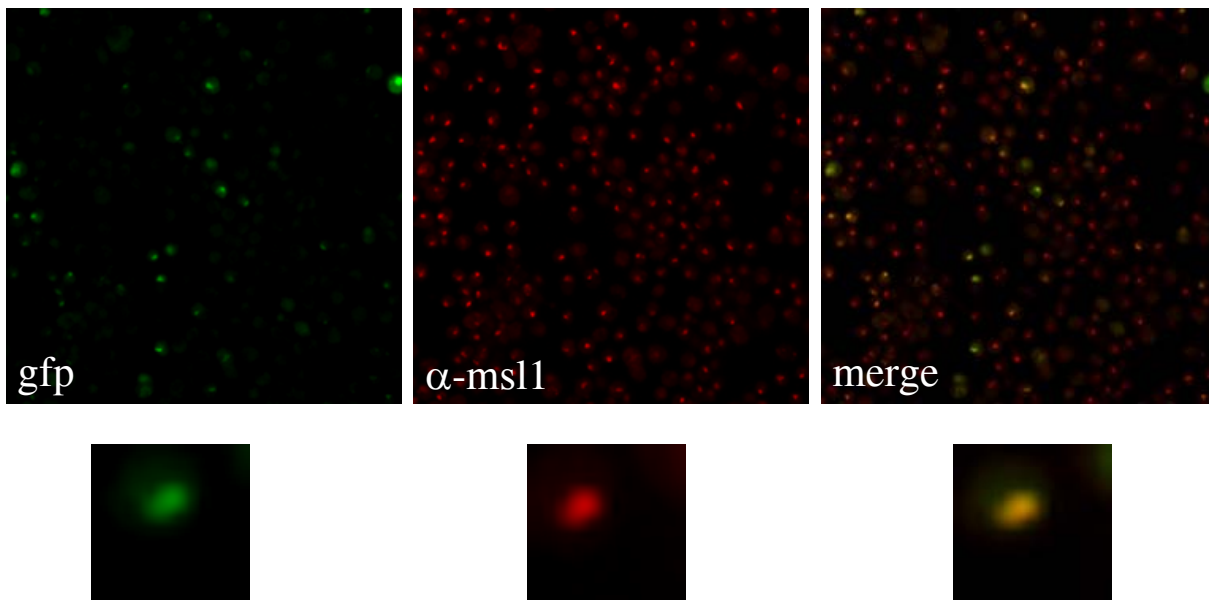


Abbildung 15 Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MSL1 einer transienten Transfektion von hsp-msl2-gfp. In der oberen Reihe ist eine Übersichtsaufnahme fünf Tage nach Transfektion zu sehen. Unten ist hiervon eine Zelle herausgefiltert und die Kolokalisation mit MSL1 gezeigt.

Absterben, sondern dessen Konsequenz. Innerhalb der ersten zwei Tage waren jedoch nahezu keine Zellen zu finden, die eine Lokalisation von MSL2-GFP im Territorium des X-Chromosoms aufwiesen. Erst nach drei bis vier Tagen begannen mehrere Zellen in der Immunfluoreszenz eine Kolokalisation von MSL2-GFP und MSL1 zu zeigen. Das Maximum lag um den vierten Tag herum, mit einer Lokalisation am X-Chromosom in 10-40% aller Zellen (Abbildung 15). Es konnten dann noch über mehrere Tage bis zum ca. achten Tag nach Transfektion abnehmend Zellen nachgewiesen werden, die diese Kolokalisation zeigten. Insgesamt erfolgte die Bindung von MSL2-GFP im Nucleus an das X-Chromosom selbst am Maximum in relativ wenigen Zellen und verglichen mit anderen Proteinen, z.B. MOF-GFP und HP1 α -GFP, später.

2.2.3 Induktion des Metallothioneinpromotors

Wie oben schon erwähnt, ist der MTN-Promotor ein gut etabliertes System für die Expression exogener Promotoren. Seine Expressionsstärke kann durch die Zugabe von Cadmium bzw. CuSO₄ auf das 30-100fache gesteigert werden [31]. Cadmium hat gegenüber CuSO₄ den Nachteil, dass es zusätzlich eine unerwünschte Hitzeschockreaktion der Zellen ausübt und bei niedrigerer Konzentration als CuSO₄ das Wachstum der Zellkultur hemmt, so dass in den Experimenten CuSO₄ verwendet wurde. Wie auch Bunch [31] wurde die Beobachtung gemacht, dass eine Induktion von bis zu 1mM CuSO₄ das Wachstumsverhalten von SF4-Zellen nicht wesentlich beeinflusste. Eine Induktion mit 0,5 mM CuSO₄, wie sie in der vorliegenden Arbeit in den meisten Fällen verwendet wurde, wurde von den Zellen mehrere Wochen toleriert. Bei einer Induktion mit Konzentrationen von 1.5mM oder höher kam es jedoch zu einer deutlichen Hemmung des Zellwachstums nach drei bis fünf Tagen.

2.2.4 Stabile Zelllinien für MSL2-GFP

Es wurden mehrere stabile Zelllinien generiert, die das MSL2-GFP-Fusionsprotein exprimierten, sowohl unter der Kontrolle des HSP-Promotors als auch unter der Kontrolle des MTN-Promotors. Nach einigen Wochen Selektion unter Geneticin wurde eine stabile Zelllinie unter der Kontrolle des HSP-Promotors erhalten, die recht homogen das gewünschte Protein auf basalem Niveau des Hitzeschockpromotors exprimiert (Abbildung 16 und Abbildung 17). Eine weitere Induktion durch Hitzeschock war nicht notwendig. In

dieser Zelllinie zeigte sich das fluoreszierende Protein fast ausschließlich im beschriebenen Territorium mit einem niedrigen Niveau im übrigen Nucleoplasma. Diese Zelllinie wurde im Weiteren für die dynamischen Untersuchungen verwendet.

Parallel wurde auch eine stabile Zelllinie für MSL2-GFP unter der Kontrolle des Metallthionin-Promotors etabliert. In den ersten zehn Tagen nach Transfektion waren Zellen zu finden, die ein Territorium aufwiesen, welches in der Immunfluoreszenz dem Territorium von MSL1 entsprach. Dies entsprach dem Verhalten nach transienter Transfektion und ist somit wohl auf die transiente Expression zurückzuführen. Anschließend waren fast keine Zellen mehr zu detektieren, die ein GFP-Signal aufwiesen.

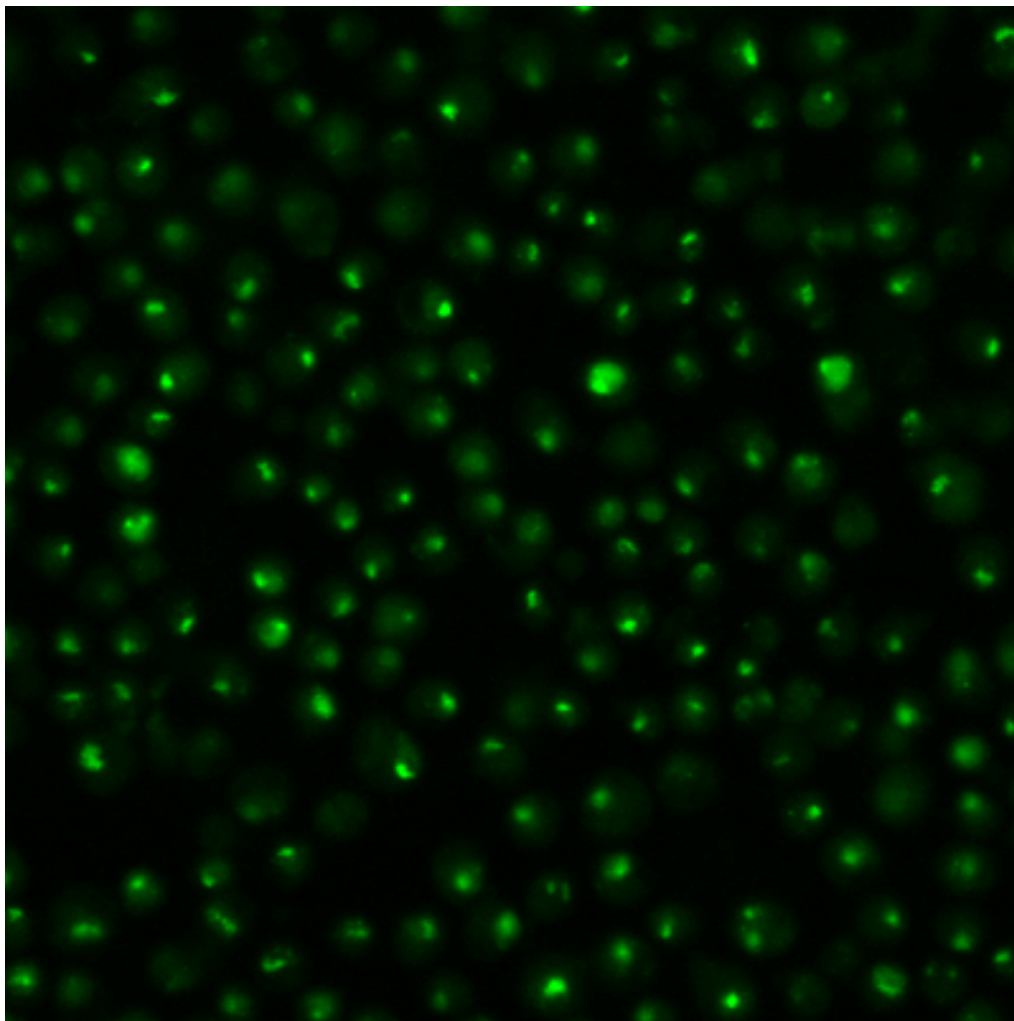


Abbildung 16 Übersichtsaufnahme des GFP-Signals von Zellen *in vivo* der stabilen Zelllinie für *hsp-msl2-gfp*. Der Großteil der Zellen zeigt ein Intensitätsmaximum im Nucleus. Auch in den Zellen, die hier kein Intensitätsmaximum zeigen, ist oft noch ein Maximum in einer anderen Bildebene zu finden.

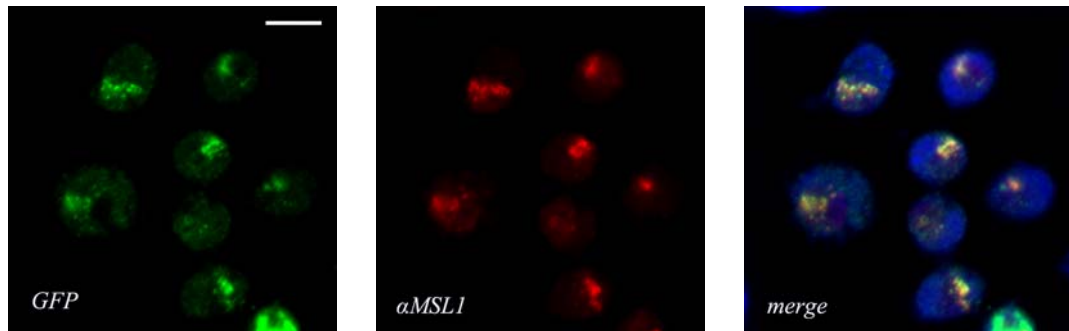


Abbildung 17 Stabile Zelllinie für hsp-msl2-gfp. Die Abbildung zeigt die Kolo­kalisierung von MSL2-GFP mit MSL1 in der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MSL1. Im rechten Bild sind die GFP und MSL1-Färbungen übereinander gelegt, Stellen gleicher Lokalisation erscheinen gelb. Die DNA (blau) wurde mit To-Pro 3 gegen gefärbt. Der Maßstab im linken Bild entspricht einer Länge von 5 µm.

Nach vier bis sechs Wochen Selektion unter Geneticin ohne Induktion durch CuSO_4 entwickelte sich eine Zelllinie, die basal keine oder nur eine sehr geringe Expression des fusionierten Proteins zeigte. Durch Induktion mit CuSO_4 konnte jedoch eine erneute Expression des Proteins MSL2-GFP angeregt werden, welches auch in einem signifikanten Prozentsatz zu einer Lokalisation im X-Territorium führte. Es wurden Konzentrationen zwischen 0,2 und 2mM verwendet (Abbildung 19). Diese Konzentrationen führten nach ca. drei Tagen zu einem sichtbaren Anstieg von Zellen, die eine Lokalisation von MSL2-GFP im Territorium des X-Chromosoms zeigten (Abbildung 18). Auch hier benötigten die Zellen also eine gewisse Zeit, bis sie MSL2-GFP an der korrekten Position am X-Chromosom integrierten. Je länger die Zellen selektiert wurden, desto niedriger konnte die Konzentrationen von CuSO_4 gewählt werden. Zuletzt wurde in der Regel mit einer Induktion von 0,5mM über vier Tage gearbeitet. Dieses Verhalten nach mehreren Wochen Selektion spricht wie auch im Falle der stabilen Zelllinie unter dem Hitzeschockpromotor für eine Selektion von zwei Richtungen. Zum einen hatten

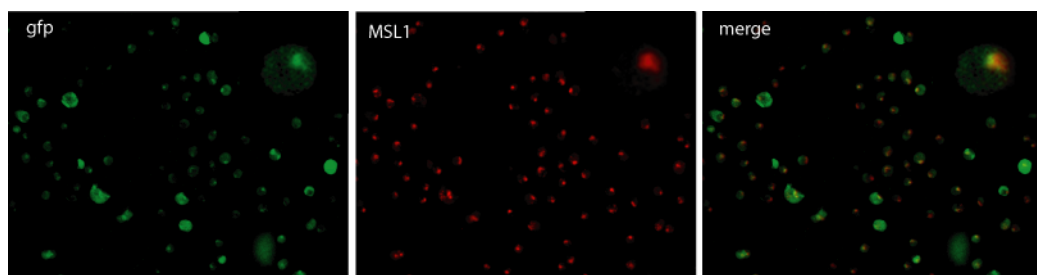


Abbildung 18 Die Abbildung zeigt eine Immunfluoreszenz der stabilen Zelllinie mtn-msl2-gfp nach drei Tagen Induktion mit 2mM CuSO_4 . In der rechten oberen Ecke jedes Bild ist eine einzelne Zelle vergrößert dargestellt.

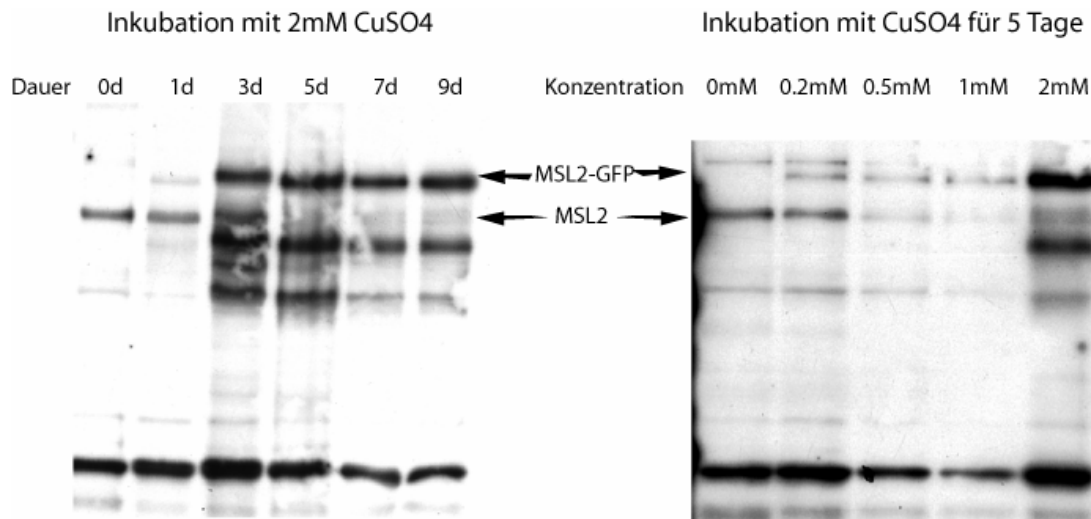


Abbildung 19 Verschiedene Induktionsbedingungen für die stabile Zelllinie von *mtn-msl2-gfp* ca. drei Monate nach Transfektion. Im linken Bild wurde die Konzentration von CuSO_4 konstant bei 2mM gehalten und die Expression von MSL2-GFP sowie MSL2 über neun Tage beobachtet. Ab dem dritten Tag wird MSL2-GFP verstärkt exprimiert und MSL2 supprimiert. Im rechten Bild wurden verschiedene Induktionsbedingungen (von 0mM bis zu 2 mM CuSO_4) über fünf Tage durchgeführt. Schon bei einer Konzentration von 0.2 mM wird MSL2-GFP exprimiert, bei 0.5 mM liegen MSL2-gfp und MSL2 in ungefähr gleicher Konzentration vor. Dieses Verhältnis verschiebt sich bei höheren Konzentrationen zu MSL2-GFP hin. Es wurden jeweils 10 μg Proteine aufgetragen, allerdings sind im rechten Bild in der dritten und vierten Bahn offensichtlich weniger Protein aufgetragen worden.

durch die Selektion mit Geneticin natürlich Zellen mit einer höheren Anzahl an integrierten Plasmiden einen Selektionsvorteil. Jedoch scheinen Zellen, die zu viele Kopien eingebaut und damit ein höheres Expressionsniveau über dem endogenen Niveau hatten, ebenfalls einen Selektionsnachteil zu haben. So wäre zu erklären, dass sich nach mehreren Wochen Selektion gute und relativ homogene stabile Zelllinien sowohl für den Metallothionein- als auch für den Hitzeschock-Promotor finden ließen.

2.2.5 Lokalisation von MSL2-GFP

Das Signal von MSL2-GFP stimmt mit der in der indirekten Immunfluoreszenz gefundenen Lokalisation von MSL1 perfekt überein. Das Territorium erstreckt sich außerhalb des Nucleolus innerhalb des Nucleus auf einem Volumen von ca. 12% des Nucleus der Zelle. Auch *in vivo* ist das GFP-Signal innerhalb dieses Territoriums klar lokalisierbar, nur vereinzelt sind außerhalb des Territoriums, aber innerhalb des Nucleus schwach fluoreszierende Punkte zu erkennen (Abbildung 20). Theoretisch könnten dies autosomale Stellen sein, die der DCC oder zumindest MSL2 erkennt. Von MLE und MOF ist bekannt, dass sie auch autosomal zu finden sind. Ebenfalls bekannt ist, dass der DCC

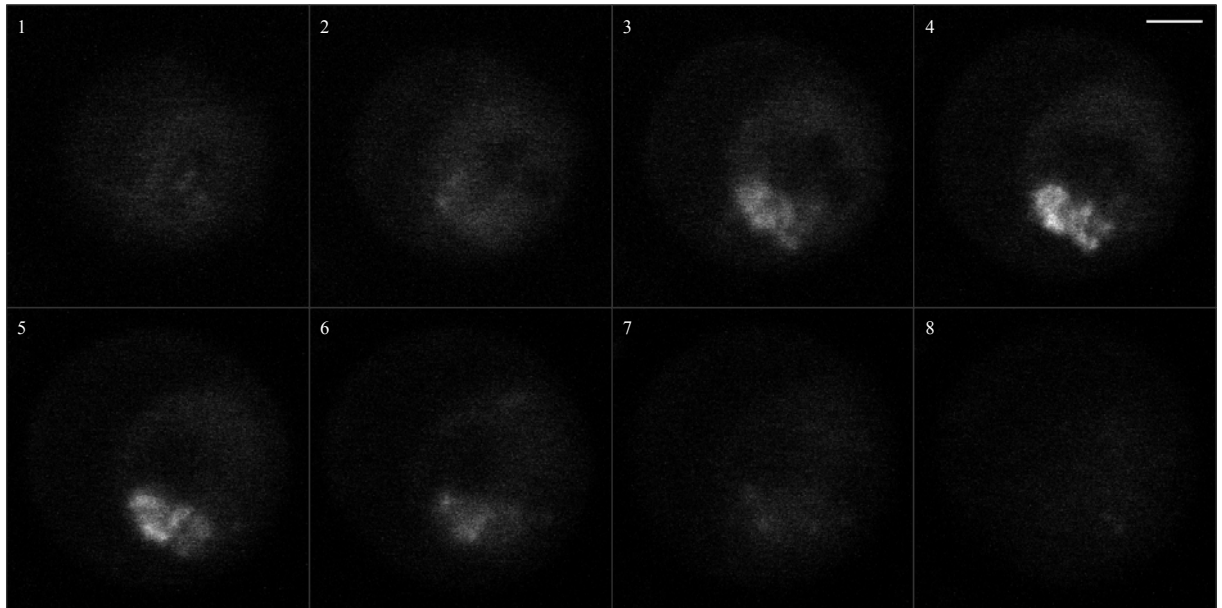


Abbildung 20 Lokalisation von MSL2-GFP *in vivo*. Die Abbildungen zeigen Schnitte im Abstand von $0,75\mu\text{m}$ durch eine Zelle der stabilen Zelllinie für *hsp-msl2-gfp*. In der Mitte des Zellkerns ist gut der Nucleolus, der keine Fluoreszenz zeigt, zu erkennen. Der Maßstab in Bild 4 entspricht $2\mu\text{m}$, so dass sich die Größe des Nucleus auf ca. $120\mu\text{m}^3$, des Nucleolus auf ca. $15\mu\text{m}^3$ und des X-Chromosoms ebenfalls auf ca. $15\mu\text{m}^3$ schätzen lassen.

bei Überexpression von MSL2 auch autosomal binden kann [45;51]. Allerdings kommt auch durchaus ein Artefakt in Frage, da eine solche autosomale Fluoreszenz zwar häufiger zu finden, aber nicht regelmäßig anzutreffen war. Wenn man mit konfokaler Mikroskopie dünne Schnitte durch das Territorium des GFP-Signals legte, zeigten sich deutliche lokale Intensitätsmaxima innerhalb des Territoriums (4-8/Zelle), die sowohl *in vivo* als auch in der Immunfluoreszenz zu sehen sind. Diese lokalen Maxima korrespondierten nicht mit Intensitätsmaxima in der DNA-Färbung, so dass man auf eine dichtere DNA-Struktur als Ursache für den Intensitätsanstieg des GFP-Signals schließen könnte. Nicht auszuschließen ist aber, dass eine bestimmte dreidimensionale Struktur des X-Chromosoms an seinen kompakteren Stellen auch einen Intensitätsanstieg verursacht. Eine andere Möglichkeit resultiert aus dem Wissen über Färbungen von polytenen Chromosomen, dass der DCC an einigen hundert diskreten Stellen des X-Chromosoms bindet [97]. Wie diese diskreten Positionen in der linearen Struktur von polytenen Chromosomen im dreidimensionalen Kontext der Zelle angeordnet sind, ist jedoch unklar. Es könnte also durchaus sein, dass sich in der Raumstruktur auf dem X-Chromosom lokale Häufungen dieser Bindungsstellen ergeben.

2.3 Funktionelle Aktivität von MSL2-GFP

Die Funktionalität von MSL2-GFP wurde durch mehrere komplementäre Ansätze überprüft.

2.3.1 MSL2-GFP ersetzt das endogene MSL2 *in vivo*

Schon die Tatsache, dass MSL2-GFP in der oben beschriebenen stabilen Zelllinie wie das endogene MSL2 und die übrigen Proteine des DCC vorwiegend im Territorium des X-Chromosoms im Zellkern lokalisiert ist, zeigt, dass MSL2-GFP in der Lage ist, seine Zielregion zu erkennen. Dass MSL2-GFP nicht nur „auch“ am X-Chromosom band,

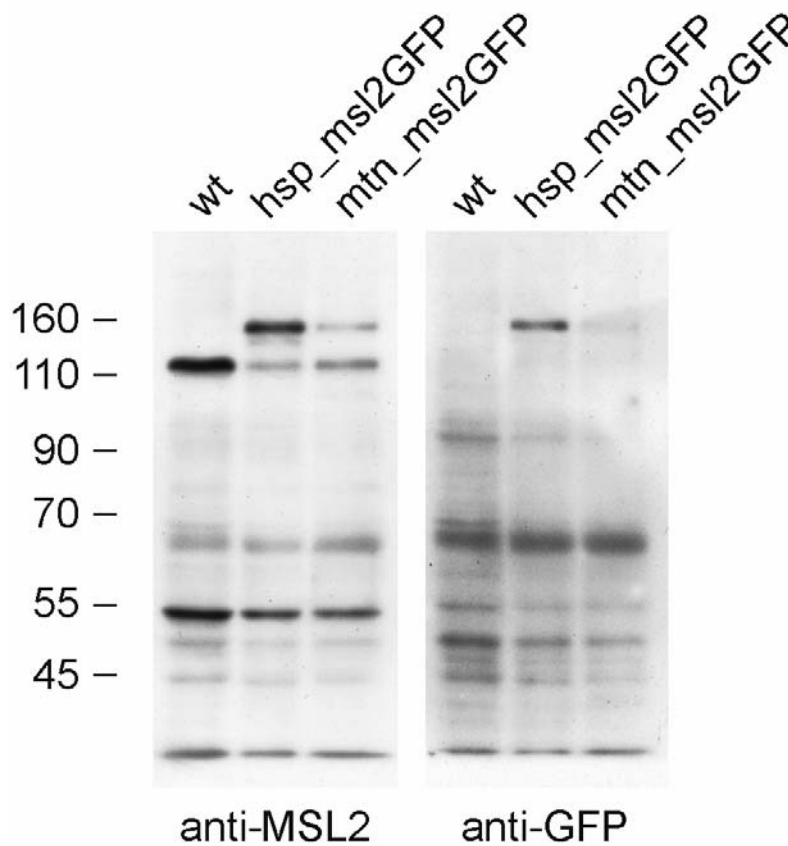


Abbildung 21 In den *Western-Blots* sieht man Proben von den zwei stabilen Zelllinien, einmal für hsp-msl2-gfp und einmal für mtn-msl2-gfp. Unter der Kontrolle des Hitzeschock-Promotors (s.a. Abbildung 16) ist das endogene MSL2 zu einem Großteil durch MSL2-GFP ersetzt, wobei die Gesamtkonzentration vergleichbar erscheint. Im Falle des Metallothionein-Promotors, dessen stabile Zelllinie ein deutlich heterogenes Erscheinungsbild zeigt, ist dieser Effekt merklich schwächer, allerdings ist auch hier das endogene MSL2 supprimiert. Im rechten Teil sind dieselben Proben mit Antikörpern gegen GFP inkubiert. In jeder Bahn wurden 10µg von Gesamt-Zellextrakt aufgetragen.

sondern hier auch das endogene MSL2 ersetzt, sieht man an der *Western-Blot*-Analyse von Gesamt-Zellextrakt der stabilen Zelllinie für MSL2-GFP unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors. In der stabilen Zelllinie war die Menge von endogenem MSL2 gegenüber der Wildtyp-Zelllinie deutlich reduziert (Abbildung 21). Das Niveau von MSL2 und MSL2-GFP insgesamt erschien allerdings vergleichbar mit dem Niveau von MSL2 alleine in der Wildtyp-Zelllinie. Auch in der stabilen Zelllinie für MSL2-GFP unter der Kontrolle des MTN-Promotors sah man diesen Effekt. Er war hier nicht so ausgeprägt wie in der Zelllinie mit dem HSP-Promotor, was aber auf Grund des mikroskopischen Bildes auch zu erwarten war. Denn diese Zelllinie war deutlich heterogener und zeigte einen niedrigeren Prozentsatz an Zellen, in denen MSL2-GFP im Territorium des X-Chromosoms lokalisiert war, als die MSL2-GFP-Zelllinie unter der Kontrolle des HSP-Promotors. Zusammenfassend scheint MSL2-GFP in der Lage zu sein, das endogene MSL2 zum großen Teil zu ersetzen. Darüber hinaus bleibt der interessante Sachverhalt, dass das Niveau von endogenem MSL2 durch exogenes MSL2, welches nicht unter Kontrolle des endogenen Promotors steht, supprimiert werden konnte. Dies spricht dafür, dass zum einen die Konzentration von MSL2 sehr stark reguliert wird und zum Zweiten diese Regulation auf Transkriptionsniveau ablaufen könnte (s. a. Diskussion). Zusätzlich zur Erniedrigung der Konzentration von endogenem MSL2 tritt noch der Fakt, dass die Zelllinie für MSL2-GFP über Monate in Kultur gehalten werden konnte, ohne dass sich augenfällige Veränderungen in dieser Zelllinie, z. B. in der Morphologie der Zellen, der Verdopplungszeit, des Wachstumsverhalten, etc., ergeben hätten. Somit scheint MSL2-GFP nicht nur das endogene MSL2 räumlich zu ersetzen, sondern auch dessen Funktionen, die für ein Fortbestehen der Zellen notwendig sind, zu übernehmen.

2.3.2 MSL2-GFP interagiert mit dem DCC *in vivo*

Die Frage, die sich anschließt, ist, ob MSL2-GFP nicht nur wie MSL2 lokalisiert, sondern ob es auch dieselben bekannten Wechselwirkungen mit den anderen Proteinen des DCC besitzt. Hierzu wurden sowohl mit der stabilen HSP-MSL2-GFP-Zelllinie als auch mit der Wildtyp SF4-Zelllinie Immunpräzipitationen durchgeführt. MSL2 bzw. MSL2-GFP wurden mit Antikörpern gegen MSL2 aus Gesamt-Zellextrakt immunpräzipitiert. Im so gewonnenen Überstand fanden sich MSL2 sowie zusätzlich in der stabilen

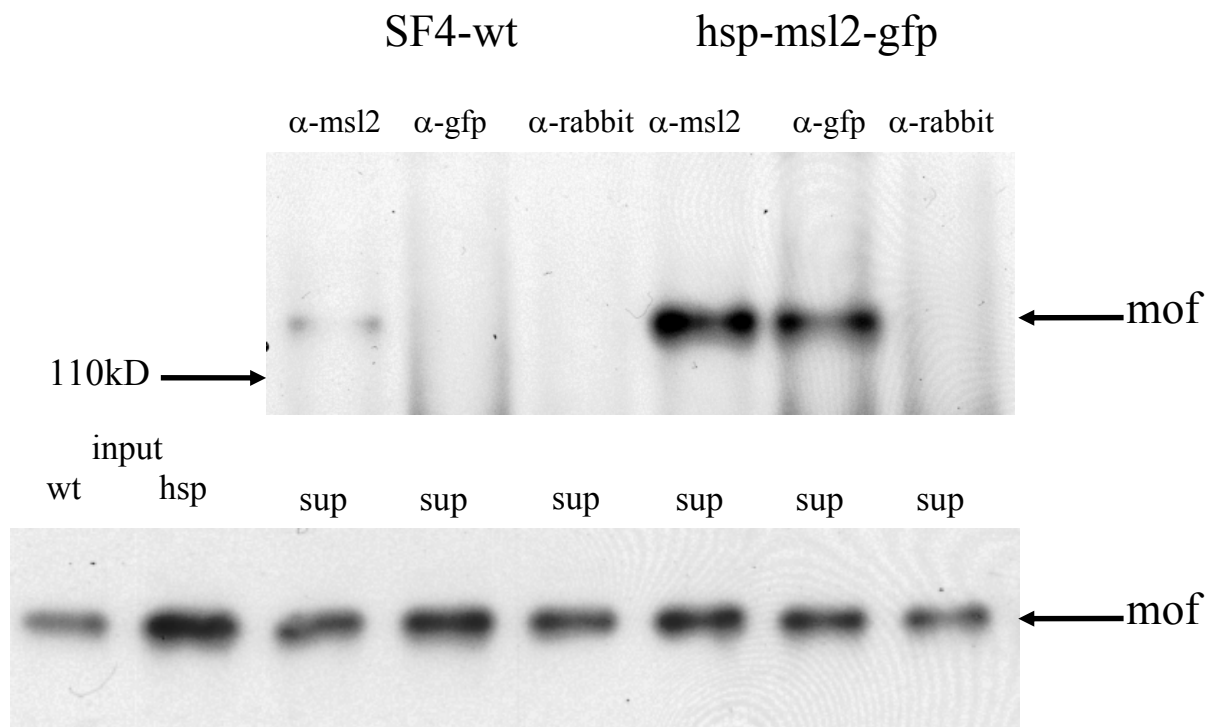


Abbildung 22 Immunpräzipitation von Gesamt-Zellextrakt von SF4-Wildtypzellen, sowie von der stabilen Zelllinie für hsp-msl2-gfp. MSL2 und MSL2-GFP wurden mit Antikörpern gegen MSL2, GFP sowie einem unspezifischen Antikörper (α -rabbit) immunpräzipitiert. Das obere Bild zeigt einen *Western-Blot* des Präzipitats mit Antikörpern gegen MOF. Unten sind der Input (10% des Materials, welches für die Immunpräzipitation verwendet wurde) sowie der Überschuss der verschiedenen Immunpräzipitationen aufgetragen.

Zelllinie MSL2-GFP, mit dem bekannten Übergewicht von MSL2-GFP gegenüber dem endogenen MSL2. Darüber hinaus konnten in beiden Überständen MSL1 sowie MOF nachgewiesen werden (Abbildung 22). Eine explizite Quantifizierung wurde nicht durchgeführt, aber tendenziell wurden MSL1 und MOF bei gleichem Input in der stabilen Zelllinie in größerem Umfang gefunden als in der Wildtyp-Zelllinie, zumindest aber in der gleichen Größenordnung. In der Kontrolle mit unspezifischen Antikörpern konnte keines der Dosiskompensations-Proteine nachgewiesen werden. Um sicherzugehen, dass das nachgewiesene MOF und MSL1 nicht nur über die Interaktion mit dem endogenen MSL2 nachzuweisen war, wurden die beiden Zellextrakte auch mit einem Antikörper gegen GFP immunpräzipitiert. Im Extrakt aus der Wildtyp-SF4-Zelllinie konnte keines der Proteine des DCC detektiert werden. Dagegen war für die stabile Zelllinie dasselbe Ergebnis wie für die Immunpräzipitation mit dem Antikörper gegen MSL2 zu verzeichnen, mit Ausnahme des Fehlens von endogenem MSL2. Auch die Effizienz war vergleichbar, was als indirektes Zeichen dafür gewertet werden kann, dass mit der Suppression des endogenen

MSL2 durch MSL2-GFP dieses auch in gleichem Maße die Funktion des endogenen MSL2 übernommen hat.

2.3.3 MSL2-GFP interagiert mit MSL1 *in vitro*

Wie aus früheren Arbeiten bekannt ist, interagiert MSL2 direkt mit MSL1. Dies konnte unter anderem durch gemeinsame Expression von Baculoviren für MSL1 und MSL2 in SF9-Zellen gezeigt werden. Für MSL2-GFP wurde eine rekombinante Baculovirus-DNA mit der kodierenden cDNA von *msl2-gfp* konstruiert. Diese wurde auf korrekte Expression durch Mikroskopie, unter welcher die Fluoreszenz im Zellkern der SF9-Zellen sichtbar wurde, und im *Western-Blot* mit MSL2-Antikörpern getestet (Daten nicht gezeigt). Das rekombinante MSL2-GFP sollte genau wie das rekombinante MSL2 allein in der Lage sein, mit dem rekombinanten MSL1 zu interagieren. Hierzu wurde MSL2-GFP zusammen mit MSL1 durch Koinfektion der entsprechenden Baculoviren-DNA in SF9-Zellen exprimiert. Die exprimierten Proteine wurden über mit anti-MSL2 bestückte Beads

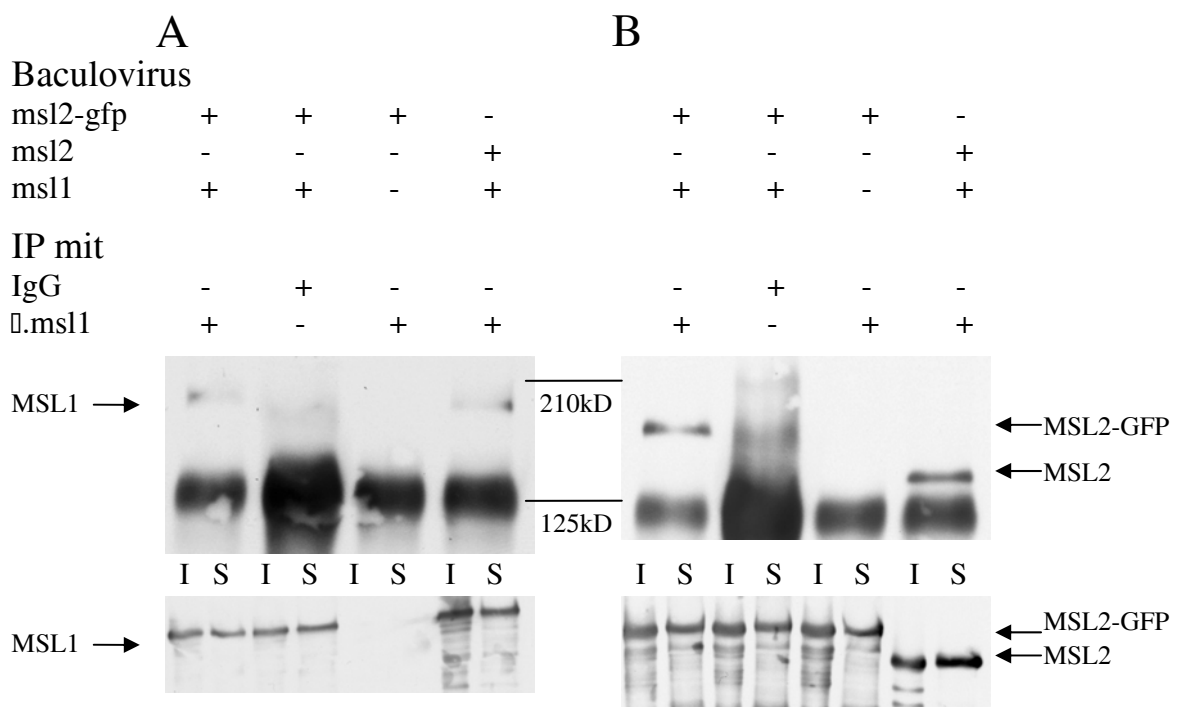


Abbildung 23 Immunpräzipitation von Gesamt-Zellextrakt von SF9-Zellen mit unterschiedlichen Expressionen von Baculoviren. In den linken beiden Bahnen sind MSL2-GFP und MSL1 gemeinsam exprimiert worden und der Zellextrakt einmal mit α -MSL1 sowie als Kontrolle mit einem unspezifischen Antikörper immunpräzipitiert worden. Daneben ist einmal MSL2-GFP alleine sowie als positive Kontrolle MSL2 mit MSL1 exprimiert und jeweils mit α -MSL1 immunpräzipitiert worden. Links (Abb. A) erfolgte dann der Nachweis mittels *Western-Blot* mit Antikörpern gegen MSL1, rechts (Abb. B) gegen MSL2. Unten sind die jeweiligen Inputs (I) und Überstände (S) aufgetragen.

gereinigt und anschließend in *Western-Blots* mit Antikörpern gegen MSL1 sowie MSL2 nachgewiesen. Als positive Kontrolle wurde MSL2 mit MSL1, als negative Kontrolle MSL1 bzw. MSL2-GFP allein exprimiert sowie -als eine zweite negative Kontrolle- die Koexpression von MSL1 und MSL2-GFP mit einem unspezifischen Antikörper gereinigt. In beiden Koinfektionen ließ sich MSL1 nach Reinigung mit anti-MSL2 nachweisen, in den negativen Kontrollen gelang dies wie erwartet nicht. Dies bestätigte somit das bekannte Resultat, dass MSL1 und MSL2 direkt miteinander interagieren, und zeigte, dass diese Wechselwirkung nicht durch die Fusion mit GFP am C-terminalen Ende von MSL2 gestört wird, dass also auch MSL1 und MSL2-GFP direkt miteinander interagieren (Abbildung 23).

2.3.4 MSL2-GFP stabilisiert MSL1 in KC-Zellen

Als weiteren Indikator dafür, dass sich MSL2-GFP funktionell wie MSL2 verhält, wurde MSL2 bzw. MSL2-GFP in die weibliche Zelllinie KC transfiziert. Hintergrund hierfür war die Beobachtung, dass in genetischen Experimenten an weiblichen Fliegen gezeigt wurde, dass transgen exprimiertes MSL2 die übrigen Proteine des DCC stabilisieren konnte [151]. In der vorliegenden KC-Zelllinie konnte in *Western-Blots* kein MSL2 nachgewiesen werden und nur geringe Mengen an MSL1. Darüber hinaus lagen auch die übrigen Proteine des DCC in deutlich niedrigerer Konzentration als in den Schneider-Zelllinien vor (Diskussion mit Violette Morales). Diese Beobachtungen stimmen mit denen an weiblichen Fliegen überein, dass die Expression von MSL2 in weiblichen Zellen vollständig unterdrückt ist und es in der Folge auch nicht zum Assemblieren des DCC und der Lokalisation am X-Chromosom kommt. Die Frage war nun, inwieweit es in der KC-Zelllinie durch eine Transfektion von für MSL2 bzw. MSL2-GFP kodierenden Plasmiden zu einer Stabilisierung der übrigen Proteine des DCC kommt und ob es zu einer Bildung des gesamten Komplexes kommt. Hierzu wurden die Plasmide *mtn-msl2-gfp* bzw. *mtn-msl2* transient in KC-Zellen transfiziert. In *Western-Blots* konnten die exogen zugeführten Proteine MSL2 bzw. MSL2-GFP nachgewiesen und ebenfalls eine deutliche Zunahme von MSL1 in den transfizierten Zellen gezeigt werden (Abbildung 24). Die Konzentration von MSL1 erreichte zwar nicht das Niveau von MSL1 in den SF4-Zellen, was aber angesichts der starken Heterogenität innerhalb der transfizierten Zellen auch nicht zu erwarten war. Auffällig war, dass für die Expression des exogenen MSL2 bzw. MSL2-GFP eine Induktion des MTN-Promotors mit CuSO_4 benötigt wurde, und dass bei basaler Expression

nahezu kein exogenes MSL2 bzw. MSL2-GFP nachgewiesen werden konnte. Dies unterscheidet sich von der Transfektion in SF4-Zellen, wo bei transienter Transfektion auch ohne Induktion MSL2-GFP zu sehen war, wenn auch in geringer Menge. Ob hierfür ein verstärkter Abbau in KC-Zellen oder eine Selektion gegen KC-Zellen, die das exogene Protein verstärkt exprimieren, verantwortlich ist, muss letztlich offen bleiben. Bei der Mikroskopie der transfizierten Zellen konnten die exogenen Proteine nicht in einem bestimmten Territorium des Zellkerns nachgewiesen werden, auch wenn in den transfizierten Zellen einige lokalisierte Punkte in der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MSL2 existierten, die in den nicht transfizierten KC-Zellen nicht zu finden waren. Diese Punkte waren vorwiegend randständig vom Zellkern zu detektieren, eventuell handelt es sich hierbei um durch Abbauprozesse inkomplette und funktionell inaktive MSL2- bzw. MSL2-GFP-Proteine. Es gelang leider nicht, eine stabile Zelllinie für MSL2 in KC-Zellen zu etablieren, so dass nicht geklärt werden konnte, ob es bei längerer Expression in einem bestimmten Niveau zu einer DCC-Formation kommen kann und ob dieser dann an den X-Chromosomen lokalisiert oder ob die KC-Zellen eine andauernde

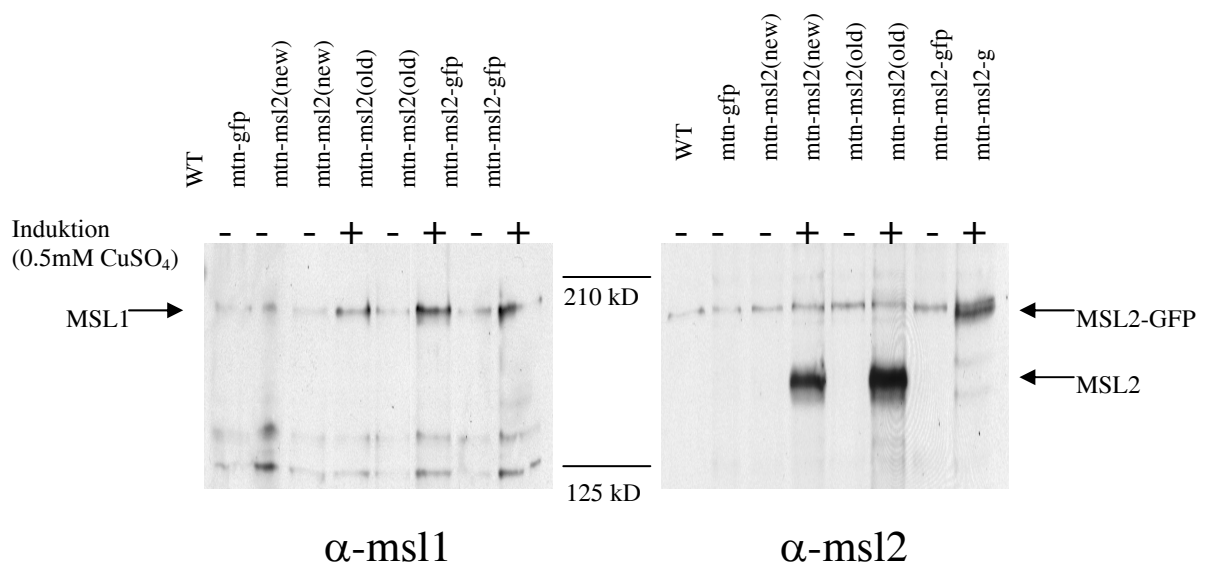


Abbildung 24 Nachweis von MSL1 bzw. MSL2 in KC-Zellen. Transiente Transfektionen in KC-Zellen von GFP allein, MSL2-GFP sowie von MSL2 unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors, mit und ohne Induktion durch CuSO₄, wurden nach fünf Tagen im *Western-Blot* auf die Expression von MSL1 bzw. MSL2 untersucht. Als Kontrolle ist der KC-Wildtyp mit aufgeführt. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamt-Zell-extrakte pro Bahn aufgetragen. Bei den KC-Zellen ist eine unspezifische Bande im *Western-Blot* bei Inkubation mit α -MSL2 zu sehen, die auf derselben Höhe wie MSL2-GFP läuft. „Old“ und „new“ bezieht sich auf die unterschiedlichen Sequenzen für MSL2. „Old“ steht für die im Labor in der Plasmidbibliothek vorliegende Sequenz, „new“ für die durch rT-PCR gewonnene Sequenz aus SF4-Zellen (s. a. das Kapitel „Sequenzvergleich für MSL2“).

MSL2-Zufuhr nicht verkraften würden. Der rasche Untergang der KC-Zelllinie bei Zugabe von Geneticin zur Selektion nach Transfektion könnte die zweite Vermutung stützen, allerdings reagierten KC-Zelllinien insgesamt sehr sensibel auf Transfektionen, so dass hier sicherlich noch der Bedarf weiterer Untersuchungen besteht. Für die funktionelle Aktivität von MSL2-GFP bleibt festzuhalten, dass MSL2-GFP genauso wie MSL2 in der Lage war, MSL1 in weiblichen KC-Zellen zu stabilisieren. Dies steht in Einklang mit früheren genetischen Arbeiten [151].

2.4 GFP-Fusionen von MSL1 und MOF

Nachdem im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, dass MSL2, mit GFP sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus verbunden, in einem spezifischen Territorium im Nucleus, welches dem X-Chromosom entspricht, lokalisiert und dass sich darüber hinaus MSL2-GFP auch funktionell wie das endogene MSL2 verhält, lag es nahe, auch andere Proteine des DCC mit dem fluoreszierenden Reportergen GFP zu verbinden. Zum einen wurde hierfür MSL1 als frühen Bindungspartner von MSL2, zum zweiten MOF als Vermittler der epigenetischen Markierung des X-Chromosoms, der Acetylierung von Lysin

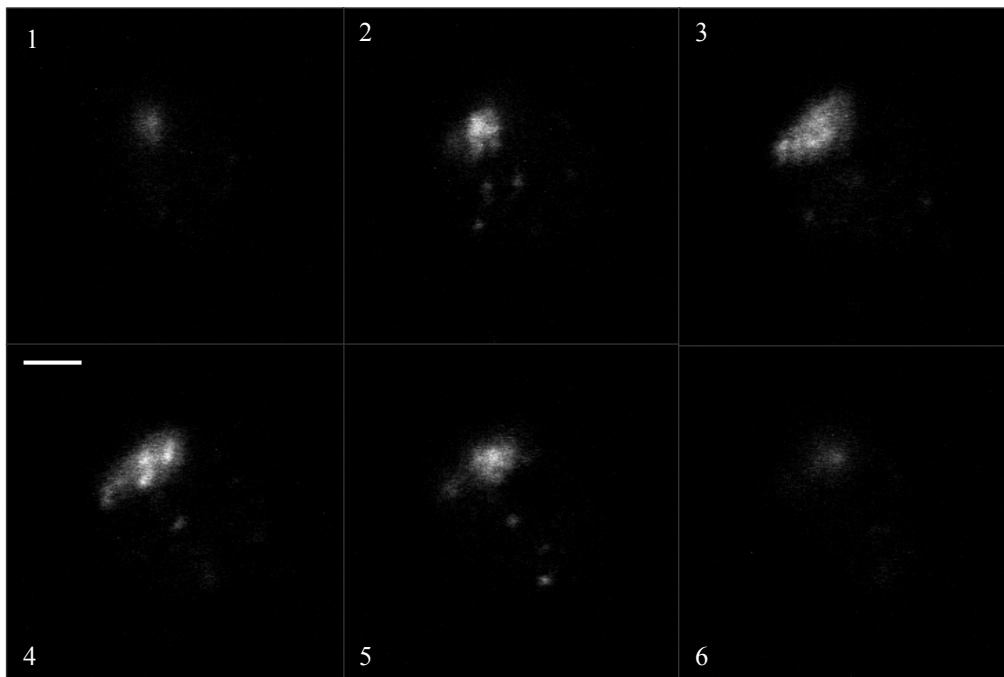


Abbildung 25 Lokalisation von MSL1-GFP *in vivo*. Die Bilder sind Schnitte in der z-Ebene im Abstand von 1 μm .

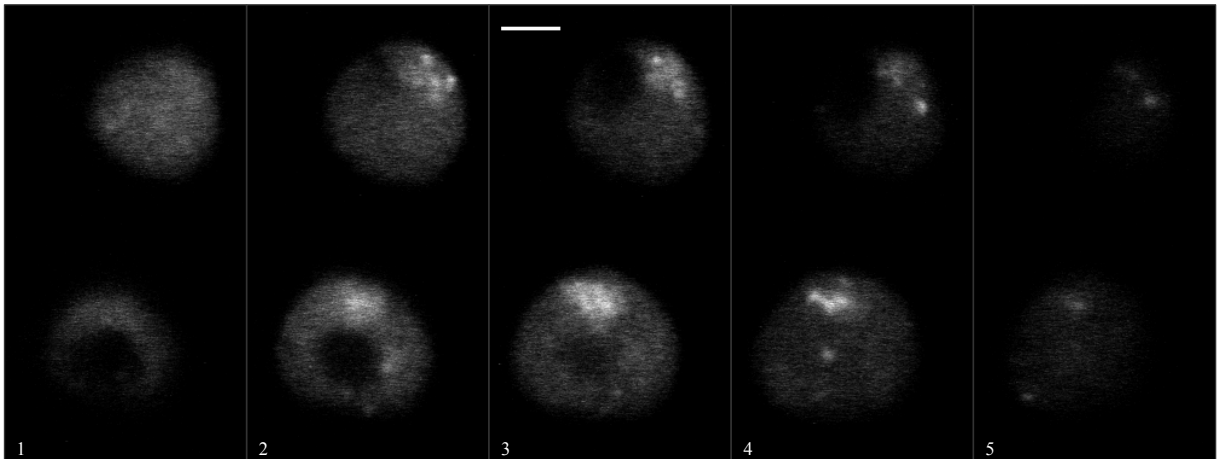


Abbildung 26 Lokalisation von MOF-GFP *in vivo*. Analog zu MSL2-GFPsieht man ein Intensitätsmaximum am X-Chromosom mit wenigen autosomalen Intensitätsanstiegen. Das Hintergrundniveau im Nucleoplasma ist allerdings deutlich höher als bei MSL2-GFP. Die Bilder zeigen Schnitte durch die Zellen im Abstand von 1 µm.

16 des Histons 4 gewählt. Ich klonierte für beide Proteine Plasmide, die GFP jeweils am C-Terminus enthielten und unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors HSP70 standen (s. a. das Kapitel „Material und Methoden“). Zunächst wurde MSL1-GFP betrachtet. Es zeigte in vielerlei Hinsicht ein ähnliches Verhalten wie für MSL2-GFP. Nach transienter Transfektion zeigte sich nach ca. vier Tagen ein Maximum an Zellen, die ein GFP-Signal im Territorium des X-Chromosoms aufwiesen (Abbildung 25). Ebenfalls in ähnlicher Prozentzahl wie bei MSL2-GFP, ca. 10-40% aller Zellen. In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine Übereinstimmung der Lokalisation mit Antikörpern gegen MSL2. Zellen, die transient mit pEGFP-hsp-mof transfiziert wurden, ergaben ebenfalls ein Verteilungsmuster des GFP-Signals, welches dem Verteilungsmuster des endogenen MOF entspricht, also eine bevorzugte Anreicherung am X-Chromosom (Abbildung 26). Dass diese Verteilung tatsächlich dem X-Chromosom entspricht, wurde in der Immunfluoreszenz durch Gegenfärbung von MSL1 getestet. Im Verhalten nach transienter Transfektion wiesen die Zellen allerdings ein leicht unterschiedliches Verhalten zu den mit pEGFP-hsp-msl1 oder pEGFP-hsp-msl2 transfizierten Zellen auf. So waren bereits 36 Stunden nach Transfektion einige Zellen mit GFP-Signal im Territorium des X-Chromosoms zu finden und das Maximum an Zellen, die dieses Verteilungsmuster besaßen, war bereits nach zwei bis drei Tagen erreicht. Ebenfalls schien das Hintergrundniveau von MOF-GFP im Nucleoplasma deutlich höher zu sein als für MSL2-GFP, was auf eine größere Toleranz der Zellen gegenüber MOF schließen lässt. Die Beobachtung, dass MOF deutlich häufiger ein höheres Hintergrundniveau von MOF-GFP im Nucleoplasma aufwies, ließ sich auch in einer stabilen Zelllinie nachweisen. Auch in Zellen dieser Zelllinie, die in der

konventionellen Mikroskopie ein GFP-Signal homogen im Nucleus aufzuweisen schienen, konnte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie bei klein gewählter Tiefe der Bildebene, also klein gewählter Lochblende, Zellen gefunden werden, die bei so gewählter Einstellung ein Verteilungsmuster mit einer stärkeren Intensität in einem wohl definiertem Bereich des Nucleus aufwiesen. Wenn man eine größere Dicke der Bildtiefe wählte, war dieses Signal bei starkem GFP-Hintergrund in diesen Zellen nicht abgrenzbar. Eine andere Möglichkeit die Affinität von MOF-GFP zum X-Chromosom auch bei insgesamt hohem Expressionsniveau nachzuweisen, bestand darin, das Nucleoplasma einem starken Bleichpuls auszusetzen. Falls die Bleichregion außerhalb des X-Chromosoms lag, zeigten etliche der Zellen, die vorher eine homogene Distribution von MOF-GFP im Nucleus aufwiesen, nach diesem Bleichpuls ein klar abgegrenztes Territorium. Solch ein Verhalten wurde im Falle von MSL2-GFP oder MSL1-GFP nie nachgewiesen.

2.5 Punktmutationen von MOF-GFP

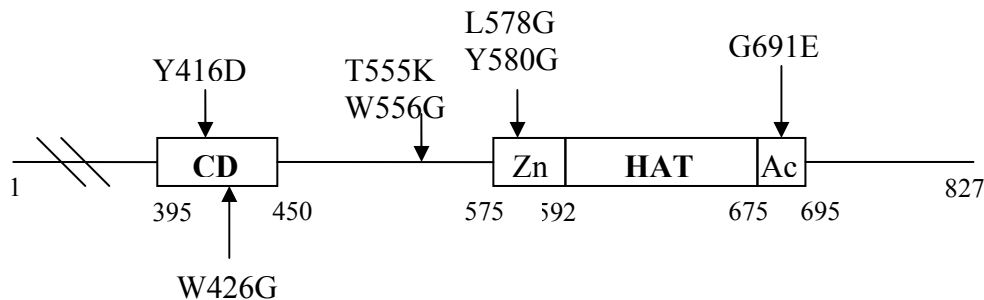


Abbildung 27 Die schematische Darstellung von MOF mit seinen bekannten Domänen zeigt die Lokalisation der verwendeten Mutationen. CD = Chromodomäne, Zn = Zink-Finger-Motiv, Ac = Bindungsdomäne für Acetyl-CoA als Teil der HAT-Domäne, HAT=Histon-Acetyl-Transferase-Domäne.

Nachdem für die Proteine MSL1, MSL2 und MOF des DCC nachgewiesen wurde, dass sie im Bereich des X-Chromosoms *in vivo* lokalisieren, stand ein Werkzeug zur Verfügung, den Einfluss verschiedener Manipulationen auf diese Lokalisation zu untersuchen und Einblick in den Aufbau des DCC und den Charakter der Affinität zum X-Chromosom zu gewinnen. Als Beispiel hierfür wurde MOF, als der Vermittler der epigenetischen Markierung, ausgewählt. Im Labor standen hierzu schon aus früheren Arbeiten verschiedene Punktmutationen von MOF zur Verfügung. Aus diesen Arbeiten war

bekannt, dass MOF über seine Chromodomäne mit roX-RNA interagiert und bei Behandlung von permeabilisierten Kernen mit RNase vom X-Chromosom dissoziiert [8]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass MOF über die CCHC Zinkfinger-Domäne, ein gemeinsames Motiv von Acetylasen aus der MYST-Familie, mit Histonen interagiert [7]. Hierzu existierten Punktmutationen, für die die genannten Interaktionen nicht gefunden wurden. In der Abbildung 24 sind die hier benutzten Punktmutationen und deren Lokalisation in der schematischen Darstellung von MOF mit seinen bekannten Domänen gezeigt. Außer den Punktmutationen, die in der Chromodomäne und im Zinkfinger-Motiv lagen, wurde noch eine Punktmutation der HAT-Domäne sowie eine Punktmutation, die zwischen der Chromodomäne und dem Zinkfinger liegt, untersucht. Die vorliegenden MOF-Derivate, die Punktmutationen trugen, wurden mit dem GFP-Protein fusioniert und unter die Kontrolle des Hitzeschockpromotors HSP70 gestellt (s. a. das Kapitel „Material und Methoden“). Die Plasmide wurden transient in SF4-Zellen transfiziert und die Zellen anschließend mittels Immunfluoreszenz auf die Lokalisation des GFP-Signals getestet (Abbildung 28). Überraschenderweise lokalisierten beide Punktmutanten, die eine Mutation im Bereich der Chromodomäne haben, Y416D-GFP und W426G-GFP, zwei bis drei Tage nach Transfektion immer noch bevorzugt am X-Chromosom, was darauf hindeutet, dass es außer der RNA-Interaktion noch weitere Faktoren geben muss, die zur spezifischen Lokalisation von MOF beitragen. Im Gegensatz zu den Mutationen der Chromodomäne konnte MOF L578G/Y580G-GFP, eine Doppelpunktmutation im Bereich des Zinkfingermotivs, niemals im Territorium des X-Chromosoms angereichert gefunden werden. Darüber hinaus konnte in einem Teil der transfizierten Zellen das GFP-Signal in größerer Intensität im Zytoplasma detektiert werden, was auf eine generelle intrazelluläre Mislokalisierung hinweisen könnte. Eine Punktmutation innerhalb der HAT-Domäne, MOF G691E-GFP, eine Mutante, die die Bindung von Acetyl-CoA verhindert, konnte dagegen wie erwartet wiederum im Bereich des X-Chromosoms lokalisiert werden, ebenso wie die weitere Mutante MOF T555K/W556G-GFP. Alle hier betrachteten Mutanten banden allerdings gegenüber dem MOF Wildtyp in einer niedrigeren Anzahl von Zellen an das X-Chromosom und waren dort auch über einen kürzeren Zeitraum nachweisbar. Dies war angesichts der bereits nachgewiesenen Funktionseinbußen von MOF, Bindung an Histone, RNA und Acetyl-CoA, durch die diversen Punktmutationen auch zu erwarten. Bemerkenswert bleibt, dass das Konstrukt MOF Y416D-GFP immer noch am X-Chromosom lokalisiert und damit die RNA-Bindung von MOF über die Chromodomäne

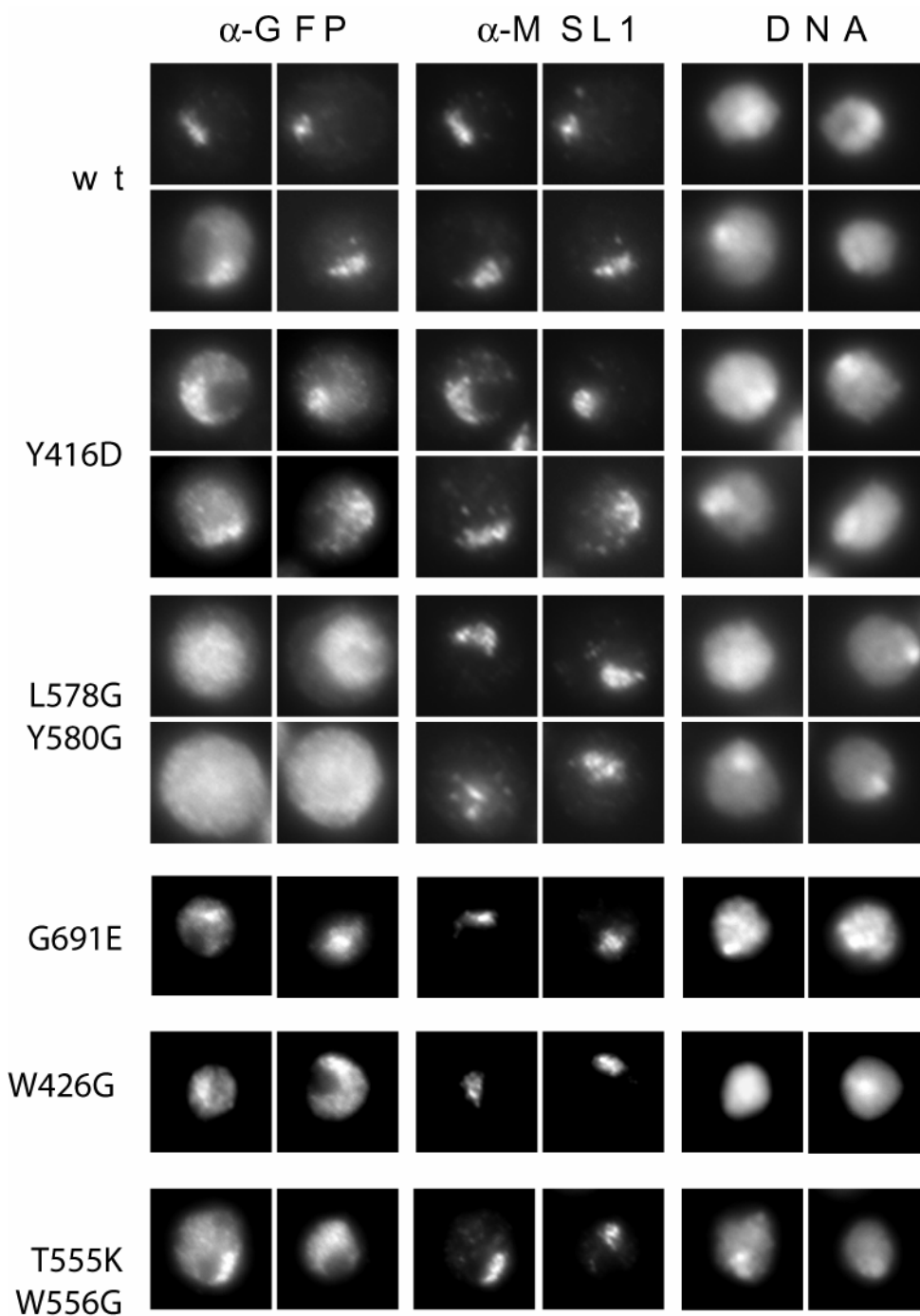


Abbildung 28 Transiente Transfektion in *Drosophila* SF4-Zellen von verschiedenen Punktmutanten von MOF. Das Fluoreszenzsignal der mit GFP verknüpften Proteine wurde mit der Position des X-Chromosoms durch Immunfluoreszenz mit α -MSL1 verglichen. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gegen gefärbt. Für die interessanten Mutationen des Zink-Fingers, der Chromodomäne sowie des Wildtyps wurden vier einzelne Zellen aus drei verschiedenen Experimenten gezeigt. Die übrigen Mutanten wurden mit zwei einzelnen Zellen aus zwei verschiedenen Experimenten ergänzt.

hierfür nicht die entscheidende Rolle spielt. Diese Tatsache unterstützt den Fund von V. Morales in unserem Labor, die eine starke direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen MOF und MSL1 über den C-Terminus von MSL1 gefunden hat [132]. Die Assoziation von MOF mit MSL1 erfolgt hierbei über die Zinkfingerdomäne von MOF. Genau die Doppel-Mutation (L578G/Y580G) innerhalb der Zinkfingerdomäne, die diese Interaktion *in vitro* reduziert, zeigt auch *in vivo* keine Lokalisation am X-Chromosom. Somit scheint die Zinkfingerdomäne über die direkte Protein-Protein-Wechselwirkung einen substantiellen Einfluss auf die korrekte Lokalisation am X-Chromosom zu haben.

2.6 Dynamische Untersuchungen

2.6.1 Mitose

Die Markierung des X-Chromosoms mit dem GFP-Signal von MSL2-GFP erlaubt es, die Dynamik und Stabilität des X-Chromosoms über einen längeren Zeitraum und über verschiedene Stadien des Zellzyklus zu beobachten. Hierzu wurden Zellen der stabilen Zelllinie von *hsp.msl2-gfp* in Kammern von LabTech ausgesät. Am nächsten Tag konnten diese direkt unter dem konfokalen Mikroskop *in vivo* beobachtet werden, indem in Abständen von 30 Sekunden bis zwei Minuten jeweils Aufnahmen der Zellkultur gemacht wurden. Ohne besondere Maßnahmen war hierdurch eine Beobachtung bei Raumtemperatur über vier bis fünf Stunden möglich. Darüber hinaus scheint die Erwärmung der Kammer durch die Laserenergie zunehmend an Einfluss zu gewinnen und die Zellen in ihrer Vitalität zu beeinträchtigen. Als zweites Problem tritt bei längerer Beobachtung zunehmend der Photobleicheffekt in den Vordergrund. Somit müssten bei längerer Beobachtung die Intervalle zwischen zwei Aufnahmen zunehmend verlängert werden, um den Photobleicheffekt, der im Wesentlichen von der Zahl der Aufnahmen abhängt, zu reduzieren. Das primäre Ziel war, eine Zellteilung mit gleichzeitiger Verfolgung des GFP-Signals zu beobachten. Bei einer durchschnittlichen Verdoppelung der SF4-Zellen alle 24-30 Stunden, erwartete man ca. drei bis vier Zellteilungen/Stunde/100 Zellen beobachten zu können. Die anfänglichen Probleme, diese Zellteilungen auch tatsächlich zu beobachten, erklärten sich erst im Nachhinein durch verschiedene Aspekte der Mitose von *Drosophila*-SF4-Zellen. Es erwies sich als vorteilhaft, die Zellen nicht zu dicht auszusäen, da hierdurch zwar die Wahrscheinlichkeit, eine Zellteilung im Blickfeld zu beobachten, stieg, aber aus Platzgründen die Zellteilung vorzugsweise senkrecht zur Bildebene und somit aus der Bildebene heraus erfolgte. Jedoch trat auch bei niedriger Zelldichte das Problem auf, dass sich die ohnehin nicht sehr adhärennten Zellen während der Zellteilung von ihrem Untergrund lösten und somit für Erschütterungen und Mediumbewegungen anfälliger waren. Die hierdurch resultierenden Bewegungen senkrecht zur Bildebene wurden durch mehrere Schnittaufnahmen im Abstand von 2-3 μm kompensiert. Als Nachteil dieses Vorgehens vervielfachte sich der Bleicheffekt, dem die Zellen ausgesetzt waren. Eine weitere Überraschung war die extrem kurze Dauer der Mitose von nur zwei bis drei Minuten und hierdurch die Erfordernis von kurzen Intervallen zwischen den einzelnen Aufnahmen, um die Mitose in möglichst vielen Einzelschritten verfolgen zu können. Hierdurch ergab sich noch einmal eine Steigerung des

Bleicheffekts und damit eine Restriktion der maximal möglichen Beobachtungsdauer. Eine Verdichtung des Chromatins in der Prophase, die es erlauben würde, Zellen vor ihrer Teilung zweifelsfrei herauszufiltern, war unter dem Mikroskop im Hellfeld auch retrospektiv nicht zu erkennen.

Bei den beobachteten Mitosen war in den Minuten vor der Mitose das GFP-Signal konstant in einem wohl definierten Territorium zu beobachten, es kam hierbei zu keinen auffälligen Änderungen in der Morphologie der Zellen oder des fluoreszierenden Territoriums. Das GFP-Signal war dann während der Metaphase in der Äquatorialebene der Zelle nachweisbar. Ob die Größe des Territoriums hierbei gegenüber der Interphase kleiner war, konnte auf Grund des fehlenden Relativbezuges des Zellkerns und der Kompromisse in der dreidimensionalen Darstellung kaum quantifiziert werden. Tendenziell wirkte das GFP-

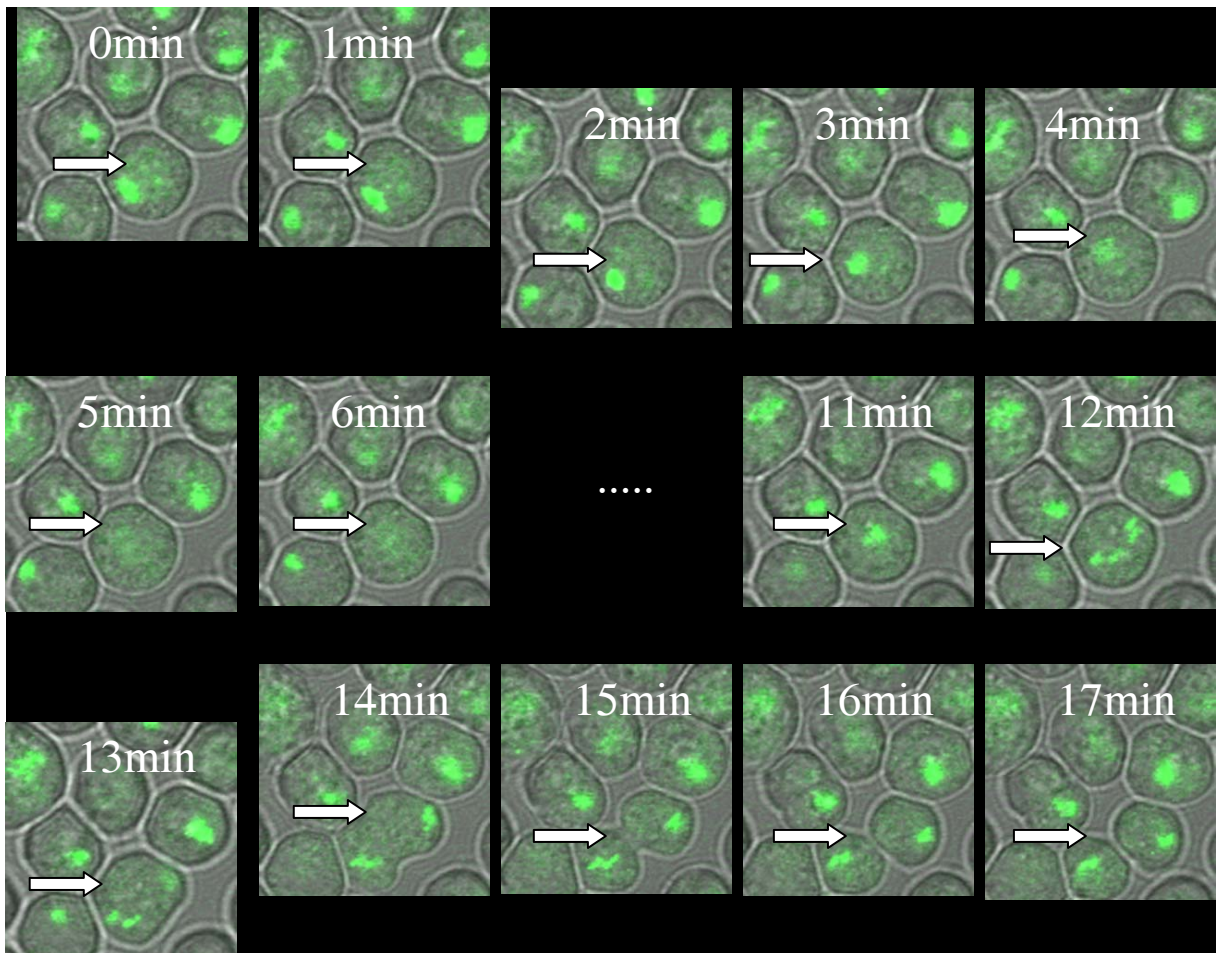


Abbildung 29 Mitose bei stabiler Zelllinie für *hsp-msl2-gfp*. Die Bilderfolge zeigt im Abstand von einer Minute die Mitose einer Zelle, die von der Prophase bis zur abgeschlossenen Zellteilung maximal vier Minuten dauert. Die nach oben bzw. unten eingerückten Bilder signalisieren eine Veränderung der Bildebene, die Bildebene der weiter unten stehenden Aufnahmen ist 2 μm weiter vom Boden der LabTech-Kammer entfernt. Das GFP-Signal ist hier mit der Hellfeldaufnahme überlagert worden.

Signal während dieser Phase etwas kompakter. Anschließend zog sich das Territorium des GFP-Signals in die Länge und trennte sich schließlich in zwei getrennt wahrnehmbare GFP-Signale, die zu den entgegengesetzten Polen der Zelle wanderten. Dies entspricht der Trennung der Chromatiden und ihrer anschließenden Wanderung zu den entgegengesetzten Polen der Zelle während der Anaphase. Anschließend kam es zum Wiederaufbau der Kern-Hülle in der Telophase und schließlich zur Trennung der Zelle in der Mitte zwischen beiden GFP-Territorien. Eine Größenzunahme des GFP-Signals in seiner Ausdehnung während dieser Phase war allenfalls diskret wahrnehmbar. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass das GFP-Signal während der gesamten Mitose am X-Chromosom lokalisiert blieb. Es kommt also zu keiner Dissoziation vom X-

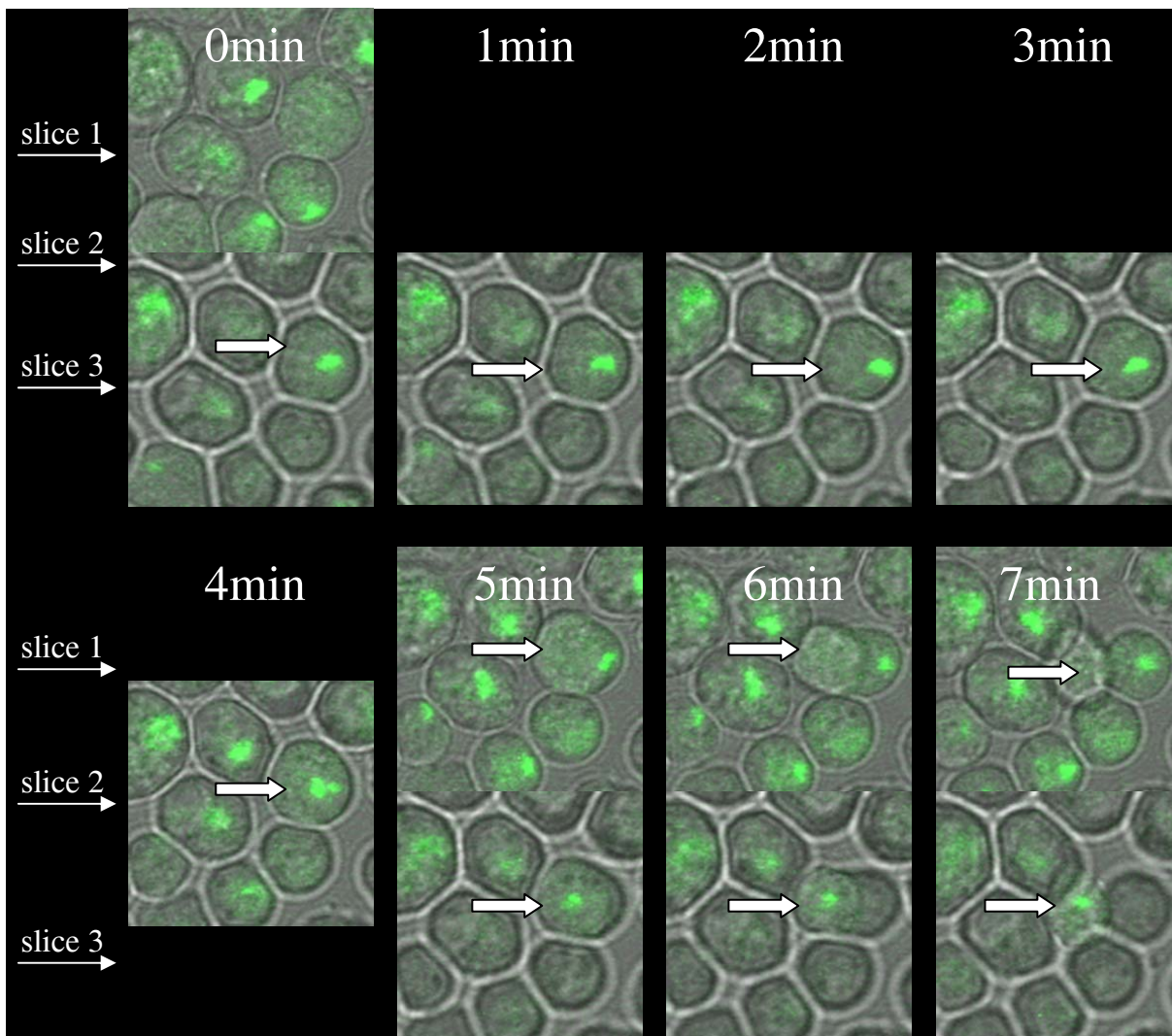


Abbildung 30 Mitose in der stabilen Zelllinie für hsp-msl2-gfp. Wie in der vorherigen Abbildung sind hier drei verschiedene Bildebenen im Abstand von je 2 μm dargestellt. Die am weitesten unten stehende ist die am weitesten entfernte vom Boden der LabTech-Kammer. Die Zellteilung erfolgt hier fast senkrecht zur Beobachtungsebene. Es sind wieder gleichzeitig das GFP-Signal und das Hellfeld dargestellt.

Chromosom zu einem bestimmten Zeitpunkt der Zellteilung. Da über MSL2 als Teil des DCC eine epigenetische Modifikation, die Acetylierung des Histons 4 am Lysin 16, vermittelt wird, ist die permanente Assoziation während der Zellteilung eines Proteins mit einem bestimmten Teil der DNA ein Beispiel wie epigenetische Information von Zell- zu Zellgeneration weitergegeben werden könnte.

2.6.2 HP1 α als Kontrollsystem

HP1 α bindet in *Drosophila*-Zellen, wie in der Einführung schon beschrieben, in heterochromatinreichen Regionen, welche das Chromozentrum bilden [87;184]. Dies wurde für die in dieser Arbeit verwendete SF4-Zelllinie durch Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen Antikörper gegen HP1 α , der uns freundlicherweise von S. Henikoff zu Verfügung gestellt wurde, verifiziert. Die Immunfluoreszenz von Kernen in der Interphase ergab einen auf eine einzige relativ große Region beschränkten Signalintensitätsanstieg mit einzelnen lokalen Intensitätsmaxima um den Nucleolus gruppiert, wie es schon für mehrere *Drosophila*- Zelllinien beobachtet

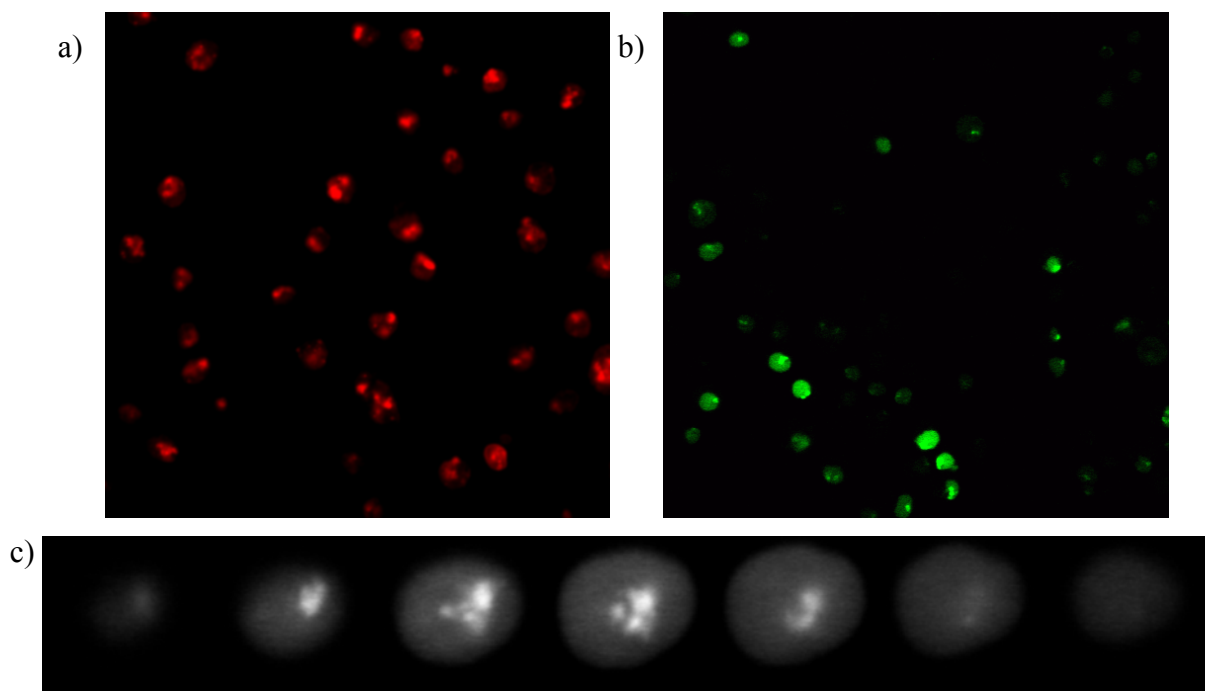


Abbildung 31 Lokalisation von HP1 α in der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen HP1 α (a) sowie von HP1 α -GFP *in vivo* in einer stabilen Zelllinie fünf Wochen nach Transfektion (b). Unten ist die Lokalisation von HP1 α -GFP in einer einzelnen lebenden Zelle zu sehen. Die Bilder entsprechen Ebenen im Abstand von 0,75 μm .

wurde [161;209]. Dieses Muster fand sich in nahezu allen Interphasenkernen, womit eine hohe Reproduzierbarkeit, wie sie für die folgenden dynamischen Untersuchungen nötig ist, gegeben war (Abbildung 31a).

Das Fusionsplasmid HP1 α -GFP, welches uns von S. Henikoff zur Verfügung gestellt wurde, exprimiert in KC-Zellen HP1 α -GFP mit einer bevorzugten Lokalisation am heterochromatinreichen Chromozentrum [184]. Dieses Plasmid wurde zunächst transient in SF4-Zellen transfiziert. Ein bis zwei Tage nach Transfektion zeigte sich eine Anreicherung des GFP-Signals in der heterochromatinreichen Region, welche durch Gegenfärbung mit dem Antikörper gegen HP1 α als die Region des Chromozentrums verifiziert wurde. Dass sich HP1 α -GFP in Säugetierzellen wie endogenes HP1 α verhält, wurde durch Bindungsassays mit an Lysin 9 methylierten Histon-H3-Peptiden [38], durch die Bildung von Homo- und Heterodimeren mit endogenem HP1 α -Isoformen [139] und in einem „*in vivo*“-Inversionsassay [99] gezeigt. Für uns war an diesem Punkt von entscheidender Bedeutung, dass HP1 α -GFP dieselbe Lokalisation wie HP1 α zeigt und dadurch eine subnukleare Struktur entsteht, die Kinetikexperimenten zugänglich ist. Vor diesem Hintergrund wurde eine stabile Zelllinie unter Selektion mit Geneticin etabliert, welche HP1 α -GFP kontinuierlich unter der Kontrolle des Hitzeschock-Promotors exprimiert. HP1 α -GFP lokalisierte wie aus den transienten Transfektionen erwartet in einer intensitätsreichen subnuklearen Struktur vor einem diffusen schwächeren GFP-Hintergrundsignal im übrigen Nucleoplasma (Abbildung 31b,c). Der Nucleolus blieb hierbei, wie auch schon bei der transienten Transfektion und in der Immunfluoreszenz, ausgespart. Ca. 30-40% aller Zellen zeigten ohne Induktion durch Hitzeschock die beschriebene GFP-Anreicherung, allerdings bei stark heterogenen Hintergrundintensitäten. Um die Bindungseigenschaften von HP1 α zu untersuchen, wurden an dieser HP1 α -GFP exprimierenden, stabilen Zelllinie FRAP-Experimente durchgeführt. In der stabilen SF4-Zelllinie wurde ein Teil des im Chromozentrums lokalisierten HP1 α -GFP gebleicht und die Wiederzunahme des GFP-Signals über die Zeit beobachtet. In der beobachteten Ebene des Zellkerns betrug der räumliche Anteil des gebleichten Areals etwa ein Drittel der intensitätsreichen Region des Chromozentrums (Abbildung 32). Wie auch in den Experimenten mit Säugetierzellen beobachtete man einen raschen Wiederanstieg der Fluoreszenzintensität in der gebleichten Region. Innerhalb von zehn Sekunden war das relative Niveau der Intensität im Heterochromatin im Verhältnis zur Intensität im Nucleoplasma wieder nahezu auf dem Ausgangsniveau vor dem Bleichpuls. Innerhalb der ersten Sekunde wurden hierbei schon 75% der ursprünglichen Intensität wiedergewonnen

(Abbildung 33). Dies war jedoch noch deutlich langsamer als die Erholungskurve für GFP alleine, dessen Wiederanstieg schon bei der ersten Bildaufnahme nach dem Bleichpuls im Nucleus komplett war und dessen Kinetik auf Grund seiner Schnelligkeit mit der gegebenen Hard- und Software nicht weiter aufgelöst werden konnte. Somit spiegelt die im Verhältnis zu GFP langsamere Kinetik eine Einschränkung der freien Diffusion von HP1 α -GFP wieder, die wahrscheinlich auf die Bindung von HP1 α -GFP an das Chromatin zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse standen in Einklang mit den Ergebnissen, die für die Dynamik von HP1 α in Säugetierzellen gewonnen wurden [38;61]. Bei der Untersuchung der Dynamik von HP1 α -Proteinen in Zellen von Säugetieren durch FRAP-Experimente zeigte sich erst kürzlich ein unerwartet rascher Austausch von HP1 α -Proteinen im Heterochromatin [38;61]. Ein Wiederanstieg der Fluoreszenzintensität auf 85% des

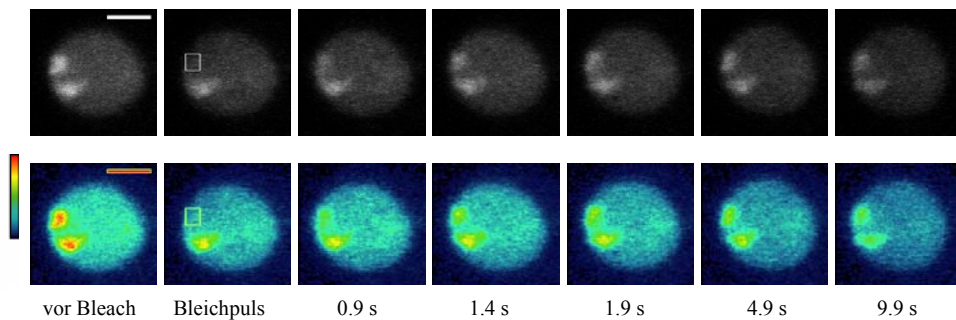


Abbildung 32 FRAP-Experiment von HP1 α -GFP. Nach einer Aufnahme vor dem Bleichpuls wurde ein Teil des Chromozentrums gebleicht und im Abstand von einer halben Sekunde Aufnahmen gewonnen. Der Maßstab entspricht 3 μm . Zur Verdeutlichung und besseren Auswertung wurden die Originalaufnahmen (obere Reihe) nochmals in Pseudofarben dargestellt.

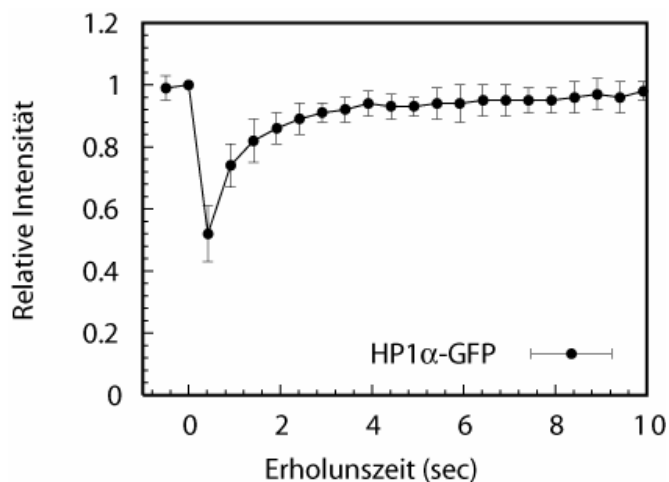


Abbildung 33 Quantitative Analyse von 13 FRAP-Experimenten (s.a. Abbildung 32) an einer stabilen Zelllinie für HP1 α -GFP. Aufgetragen ist die relative Intensität im gebleichten Areal gegenüber der Zeit.

Ausgangswertes erfolgte hierbei innerhalb von zehn Sekunden. Diese Daten bestätigten, dass unser System schnelle Bindungsdynamiken aufzulösen vermag. Darüber hinaus lieferte uns HP1 α -GFP ein gutes Kontrollsystem für die weiter unten zu besprechende Dynamik von MSL2, die deutlich langsamer verläuft.

Die durch FRAP erhaltenen Resultate wurden noch durch weitere FLIP-Experimente bestätigt. Die Zellen wurden in einer Region des Nucleoplasma außerhalb des Chromozentrums wiederholt im Abstand von 15 Sekunden gebleicht. Jeder Bleichschritt bestand aus fünf einzelnen Pulsen bei einer Laserenergie von 22,5 mW. Der Intensitätsverlauf des GFP-Signals wurde sowohl im Chromozentrum als auch im Nucleoplasma außerhalb des Chromozentrums beobachtet (Abbildung 34). In beiden Regionen wurde eine kontinuierliche, beinahe identische Abnahme des GFP-Signals beobachtet. Nach ca. 400 Sekunden, was 20 ausgeführten Bleichschritten entsprach, war das Niveau nahe Null, wie es bei einem schnellen Austausch zwischen gebundenem HP1 α -GFP im Chromozentrum und frei diffusiblen HP1 α -GFP im Nucleoplasma zu erwarten war (Abbildung 35). Auf den ersten Blick überraschend scheint die Tatsache, dass die Intensität sowohl im Nucleoplasma als auch im Chromozentrum fast identisch sank, obwohl es sich theoretisch einmal um das Signal von frei diffusiblem HP1 α -GFP und das andere Mal um das Signal von gebundenem HP1 α -GFP handelt. Die Erklärung findet sich im Versuchsablauf, in welchem erst 15 Sekunden nach jedem Bleichschritt die Bildaufnahme erfolgte. Wie aus den FRAP-Experimenten bereits bekannt war, erholte sich die Intensität im Chromozentrum allerdings schon nach zehn Sekunden komplett. Das heißt nach 15 Sekunden hatte sich bereits ein neues Gleichgewicht zwischen Nucleoplasma und Chromozentrum ausgebildet, welches dieselben relativen Intensitäten bei allerdings reduziertem Gesamtpool an HP1 α -GFP zeigte. Hierdurch bestätigte sich indirekt die rasche Austauschdynamik von HP1 α -GFP am Chromozentrum auch in den FLIP-Experimenten durch den Verlauf der beiden Intensitätskurven im Nucleoplasma und Chromozentrum.

Als Kontrolle wurden die FLIP-Experimente auch an fixierten HP1 α -GFP exprimierenden Zellen durchgeführt (Abbildung 35). Es wurden dieselben Bleichschritte (alle 15 Sekunden fünf Iterationen bei 22,5mW) wie bei den lebenden Zellen ausgeführt. Die fixierten Zellen zeigten wie erwartet einen deutlich geringeren Abfall der Intensität, der auch nicht den Verlauf einer Hyperbel aufwies, sondern ein annähernd konstanten Abfall entsprach. Nach 400 Sekunden, was wiederum 20 Bleichschritten entsprach, betrug die Endintensität ca. 70-80% der Ausgangsintensität, wobei der Abfall im Chromozentrum tendenziell etwas stärker ausfiel. Im Idealfall wäre an fixierten Zellen natürlich überhaupt kein

Intensitätsverlust zu erwarten. Für den hier auftretenden Intensitätsabfall, welcher den gesamten Zellkern betrifft, sind zwei Hauptfaktoren verantwortlich, die in der Natur des betrachteten Systems liegen. Zum einen ist durch die geringe Größe des Zellkerns (ein Durchmesser von ca. $5\mu\text{m}$) nicht zu vermeiden, dass die gebleichte Region in unmittelbarer Nähe zum Chromozentrum liegt. Auch bei optimaler Justierung des Zeiss LSM 510 Meta Systems ist es nicht zu umgehen, dass ein geringer Bleicheffekt, mit der Entfernung von der Bleichregion abnehmend, auch außerhalb der definierten Bleichregion auftritt. Dies beobachtete man an fixierten Zellen, die GFP alleine exprimierten, sowie an einer stabilen Zelllinie für H3-GFP (Daten nicht gezeigt). Insbesondere spielte dies eine Rolle, wenn, wie in unserem Fall, die Intensität des Fluoreszenzsignals insgesamt sehr gering war. Der

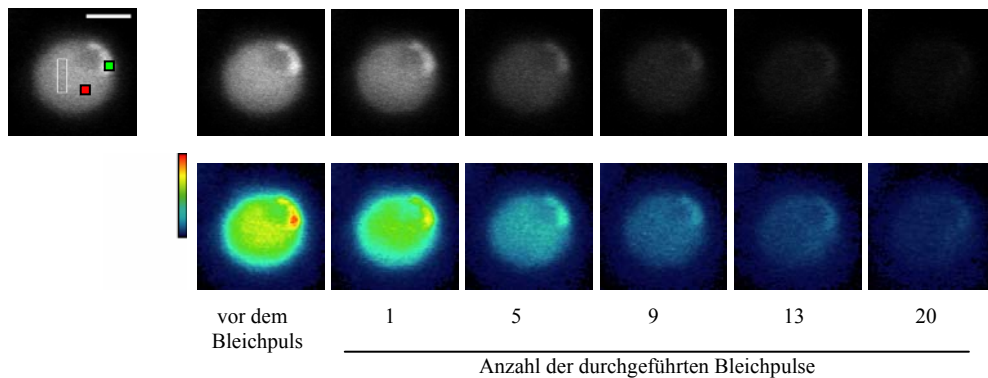


Abbildung 34 FLIP-Experiment an einer stabilen Zelllinie, die HP1 α -GFP exprimiert. Im linken oberen Bild ist der Versuchsaufbau dargestellt. Es wurden wiederholte Bleichpulse im Nucleoplasma der Zelle ausgeführt (weißes Rechteck). Dann wurde die Intensität im Verlauf der Zeit sowohl im Chromozentrum (grünes Quadrat) als auch im Nucleoplasma (rotes Quadrat) gemessen.

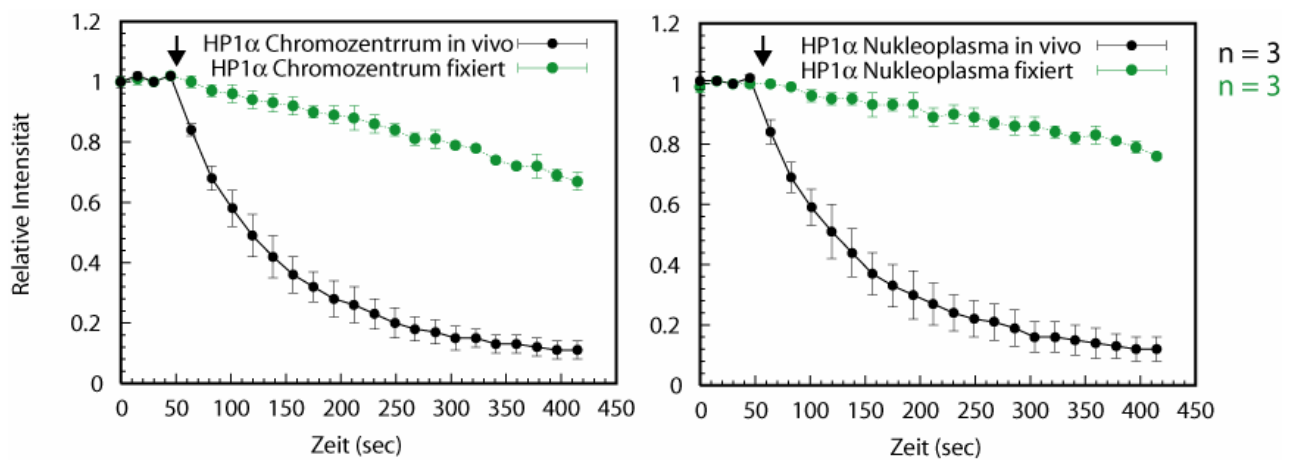


Abbildung 35 Quantitative Analyse der Flip-Experimente von HP1 α -GFP sowohl an lebenden (schwarze Kurve) als auch an fixierten (grüne Kurve) Zellen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

zweite Einflussfaktor, der zur Abnahme der Gesamtintensität auch in fixierten Zellen führte, ist der schon besprochene Bleicheffekt durch die Bildaufnahme. Bei den hier durchgeführten wiederholten Bildaufnahmen führte dies zu einer konstanten Abnahme der Gesamtintensität, wie sie in der Tat auch zu beobachten war. Auch der etwas höhere Abfall im Chromozentrum ließe sich hierdurch erklären, da die Funktion des Intensitätsverlust in Abhängigkeit der Ausgangsintensität keinen streng linearen Verlauf zeigt, sondern für höhere Ausgangswerte einen prozentual höheren Abfall als für niedrigere Ausgangswerte bedingt. Zusammenfassend lässt sich durch die geringe Ausdehnung des Zellkerns und die vorhandenen niedrigen Fluoreszenzintensitäten, die zu einer notwendig größeren Verstärkung führten, die vorhandene Abnahme des Fluoreszenzsignals auch an fixierten Zellen erklären.

2.6.3 Dynamik von MSL2

Nachdem mit der stabilen Zelllinie für HP1 α -GFP ein System etabliert war, mit welchem eine rasche Kinetik aufgedeckt werden konnte, wurde die Austauschkinetik von MSL2 im Nucleus ebenfalls mit Hilfe von FRAP- und FLIP-Experimenten untersucht. Als Untersuchungsobjekt stand uns hierfür die oben beschriebene stabile Zelllinie, die MSL2-GFP unter der Kontrolle des Hitzeschock-Promotors HSP70 exprimiert und in einem Großteil der Zellen im Territorium des X-Chromosoms ein Intensitätsmaximum aufwies, zur Verfügung. Jeweils ein Teil des X-Chromosom-Signals wurde gebleicht und der Intensitätsverlauf im gebleichten Areal im Laufe der Zeit beobachtet. Bei der Lokalisation des Bleichareals wurde darauf geachtet, dass die gebleichte Region zentral und nicht lateral im Territorium des X-Chromosoms gelegen war. So konnte man zumindest über zwei benachbarte fluoreszierende Regionen feststellen, dass sich der Zellkern während des Experimentes nicht zu stark bewegte oder das X-Chromosom aus der Beobachtungsebene herausrotierte. Dies war insbesondere von Bedeutung, da ein Großteil der Zellen über den Beobachtungszeitraum von 20 Minuten genau dies tat und somit für eine quantitative Analyse nicht zur Verfügung stand. Die Bewegung des Zellkerns stellte also eine nicht zu vernachlässigende Störgröße dar. Hätte man nur eine lateral gelegene Hälfte des X-Chromosoms gebleicht, hätte man am Ende der Versuchsreihe nicht sagen können, ob der ausbleibende Fluoreszenzanstieg auf einer fehlenden Austauschkinetik beruht oder ob sich das X-Chromosom so gedreht hat, dass das gebleichte Areal außerhalb der beobachteten Ebene zu liegen kam. Nachteilig an der starken Eigenbewegung der Zellen war sicherlich,

dass hierdurch eine gewisse Selektion in Richtung sich schwächer bewegender Zellen erfolgte, die in die quantitative Auswertung einfließen. Dies erklärt auch die relativ geringe Anzahl an Zellen, die in die quantitative Analyse einfließen. Für die FRAP-Experimente waren dies elf Zellen aus unabhängigen Experimenten, für die FLIP-Experiment neun. Allerdings war auch in den übrigen Zellen, die sich oft erst nach Minuten so stark bewegten, dass sie für die quantitative Analyse unbrauchbar wurden, mit Schnitten durch mehrere Ebenen qualitativ dasselbe Verhalten reproduzierbar.

Der Bleichpuls in den FRAP-Experimenten bestand wiederum aus fünf Iterationen mit einer Laserenergie von 22,5 mW. Anschließend wurde direkt nach dem Bleichpuls sowie

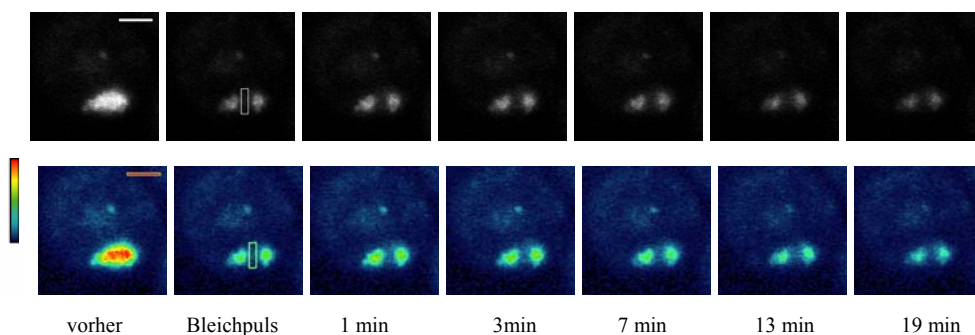


Abbildung 36 FRAP-Experiment an MSL2-GFP exprimierenden Zellen. Nach einer Aufnahme vor dem Bleichpuls wurde ein kleiner Bezirk des X-Chromosoms (weißes Rechteck) gebleicht und anschließend im Minutentakt Aufnahmen genommen. Die Originalaufnahmen in der oberen Reihe wurden unter anderem zur besseren Bewertung auch in Pseudofarben in der unteren Reihe dargestellt. Der Maßstab entspricht 3 μm .

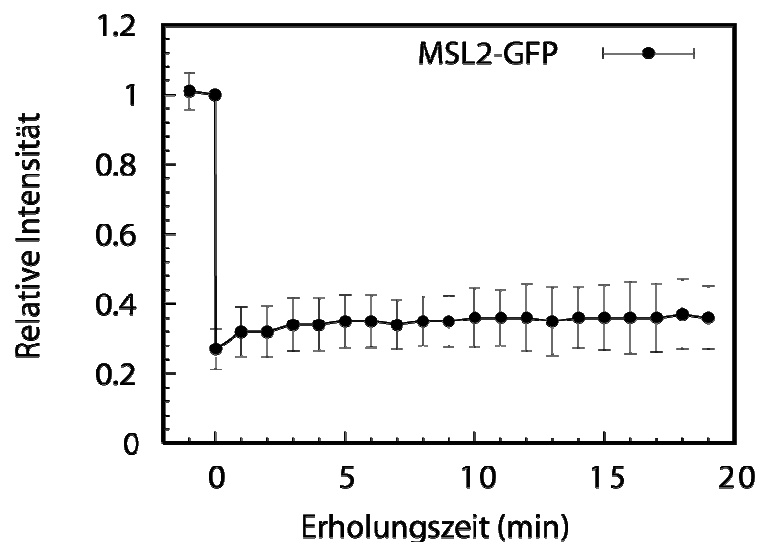


Abbildung 37 Quantitative Analyse von elf unabhängigen FRAP-Experimenten von MSL2-GFP. Die relative Intensität der Fluoreszenz wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Messpunkte sind jeweils mit ihren Standardfehlern eingezeichnet.

jede weitere Minute eine Aufnahme durchgeführt. Direkt nach dem Bleichpuls war nahezu keine Fluoreszenzintensität im gebleichten Areal mehr feststellbar.

Eine geringe Restintensität entsprach der Intensität des Nucleoplasmas und spiegelt damit den Anteil des freien, wahrscheinlich ungebundenen Pool von MSL2-GFP, der natürlich auch im Bereich des X-Chromosoms vorliegt und sich über freie Diffusion rasch wieder einem Gleichgewicht nähert, wider. Überraschenderweise ließ sich bis zu 19 Minuten nach dem Bleichpuls keine nennenswerte Änderung der MSL2-GFP-Verteilung feststellen (Abbildung 36 und Abbildung 37). Dies bedeutet, dass kein oder ein nur sehr geringer Anteil des MSL2-GFPs vom kleinen *Pool* des Nucleoplasmas oder des Proteins von der benachbarten nicht gebleichten Region des X-Chromosoms mit dem gebleichten MSL2-GFP innerhalb des beobachteten Zeitrahmens ausgetauscht wurde. Dabei spricht das Fehlen von intrachromosomalen Austausch gegen eine kontinuierliche Ausbreitung während der Interphase. Es könnte sein, dass dieser Prozess der Ausbreitung nur zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zellzyklus oder nur während der initialen Zusammenstellung des Komplexes auftritt (s.a. das Kapitel „Diskussion“).

Dieser nur sehr geringe Austausch von MSL2 innerhalb des Zellkerns kontrastiert stark zu dem oben beschriebenen schnellen Austausch von HP1 α . Um das Ergebnis zu bestätigen, insbesondere den fehlenden Austausch des MSL2-GFP zwischen Nucleoplasma und X-Chromosom, wurden auch hier FLIP-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde wiederum eine Region im Nucleoplasma außerhalb des X-Chromosoms mit fünf Iterationen bei 22,5 mW gebleicht und jeweils direkt vor dem Bleichpuls eine Aufnahme durchgeführt. Die Experimente ergaben keinen signifikanten Intensitätsverlust im Bereich des X-Chromosoms und bestätigten somit die Ergebnisse einer stabilen Assoziation von MSL2 mit dem X-Chromosom aus den FRAP-Experimenten (Abbildung 38). Der gesamte Verlust von ca. 20% der Intensität deckte sich mit dem Ergebnis von mit Formaldehyd fixierten Zellen und ist bereits im letzten Kapitel besprochen worden (Abbildung 39). Die Messung der Intensität im Nucleoplasma außerhalb des X-Chromosoms ergab, dass der hier vorhandene kleine Anteil von MSL2-GFP deutlich mobiler war. Die Annahme, dass es sich hierbei um überschüssiges, freies, nicht an Chromatin gebundenes MSL2-GFP handelt, liegt auf Grund des offensichtlichen Kontrastes zur stabilen Fraktion im Bereich des X-Chromosoms nahe. Es sind in der Literatur zwar auch einige autosomale Bindungsstellen von MSL2 beschrieben [96], aber es erscheint auf Grund ihrer geringen Anzahl eher unwahrscheinlich, dass diese für die mobile Fraktion verantwortlich sind.

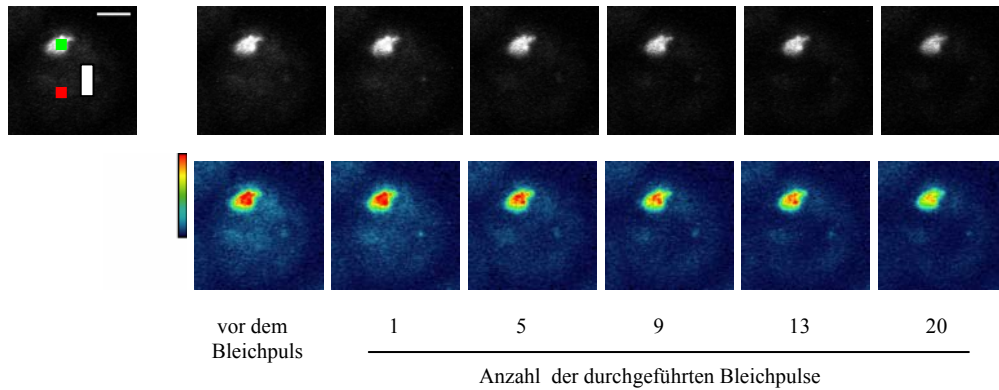


Abbildung 38 FLIP-Experimente von MSL2-GFP exprimierenden Zellen. Die Zellen wurden wiederholt im Nucleoplasma (weißes Rechteck im linken oberen Bild) gebleicht und jeweils 15 Sekunden später gescannt. Die Intensität wurde jeweils im Nucleoplasma (rotes Quadrat) sowie im Territorium des X-Chromosoms (grünes Quadrat) gemessen.

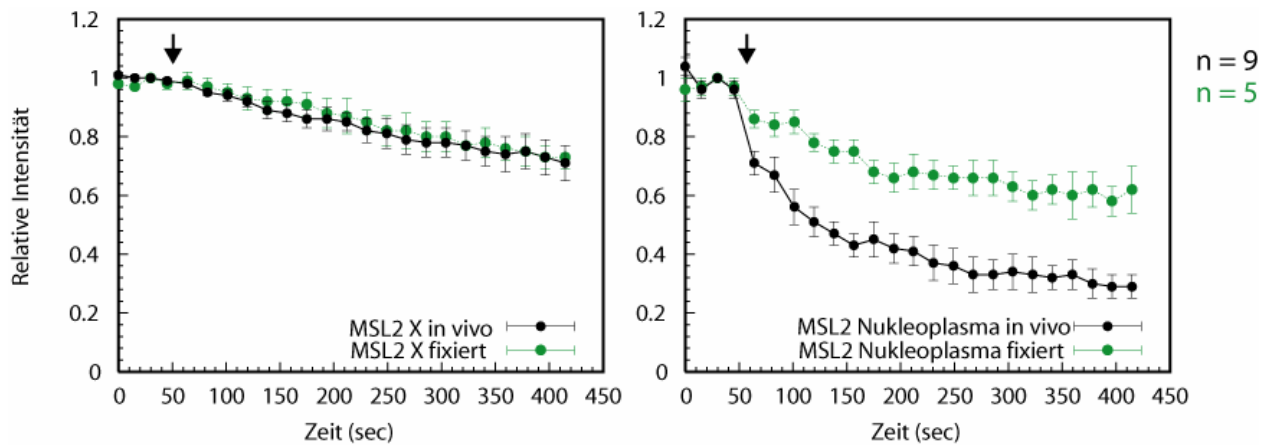


Abbildung 39 Quantitative Analyse der n unabhängigen Flip-Experimente von MSL2-GFP sowohl an lebenden (schwarze Kurve) als auch an fixierten (grüne Kurve) Zellen. Im linken Graphen ist die relative Intensität im X-Chromosom aufgetragen, im rechten Graphen die Kinetik im Nucleoplasma. Die Messpunkte sind mit ihrem Standardfehler als relative Intensität gegen die Zeit aufgetragen.

Allerdings könnten sie dazu beitragen, dass der gesamte Intensitätsabfall im Nucleoplasma etwas geringer ausfällt als der Verlust an Intensität im Nucleoplasma der HP1 α -GFP exprimierenden Zellen (auf ca. 25% versus 10%), so dass es im Nucleoplasma neben einer mobilen, nicht gebundenen Fraktion noch eine stabile, gebundene Fraktion an autosomalen Bindungsstellen geben könnte. Diese Überlegung bleibt allerdings höchst spekulativ und lässt sich durch die vorliegenden Experimente nicht weiter untermauern. Eine weitere Limitation in der Interpretation der Experimente könnte durch die äußerst geringe Gesamtintensität von MSL2-GFP im Nucleoplasma entstehen, die auf die bereits besprochene strikte Regulierung von MSL2 zurückzuführen und auch im Vergleich zu den HP1 α -GFP exprimierenden Zelle nochmals deutlich niedriger ist. Weil auf Grund der sehr

niedrigen Gesamtintensität die Verstärkung sehr hoch gewählt werden musste, spielten kleinste Bewegungen der Zelle sowie das Hintergrundrauschen verstärkt eine wichtige Rolle, da kleine Änderungen schon zu großen Ausschlägen führen können, wie es sich auch in der Kurve des Intensitätsverlaufs im Nucleoplasma niederschlägt.

3 Diskussion

3.1 Mit GFP fusionierte MSL-Proteine lokalisieren am X-Chromosom

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GFP-fusionierte Proteine erfolgreich in SF4-Zellen exprimiert werden können (Kapitel 2.1). Im Falle von drei Proteinen des DCC (MSL1, MSL2 sowie MOF) wurde nachgewiesen, dass auch ihre GFP-Fusionen eine Lokalisation am X-Chromosom zeigen (Kapitel 2.2.5 und 2.4). Allein die Tatsache der korrekten Lokalisation eröffnet die Möglichkeit, diese fusionierten Proteine für Experimente in transienter Transfektion bzgl. dieser Eigenschaft zu nutzen. So können z. B. Mutationen oder Deletionen der MSL-Proteine an GFP gebunden werden und auf ihre Lokalisation hin untersucht werden. Dies geschah in dieser Arbeit am Beispiel von MOF (Kapitel 2.5). Einschränkend wirkt hierbei allerdings die Tatsache, dass bei transienter Transfektion unter verschiedenen Bedingungen und Beobachtungszeitpunkten in maximal 40% aller Zellen eine Lokalisation am X-Chromosom gefunden werden konnte. Diese Quote ermöglicht es durchaus, klar zu unterscheiden, ob eine Lokalisation erfolgt oder komplett verhindert wird. Schwieriger fällt es, einen quantitativen Effekt auf die Zahl der Zellen, die eine Lokalisation zeigen, zu bestimmen. Dies ist z. B. denkbar, wenn eine Mutante nach wie vor die Bindungseigenschaften besitzt, um am X-Chromosom zu lokalisieren, es aber durch einen andersweitigen Funktionsverlust zu einer Selektion gegen diese Zellen kommt. Die niedrige Anzahl an Zellen, die ein Fluoreszenzsignal am X-Chromosom zeigen, ist keine Folge der Transfektionseffizienz. Dies sieht man daran, dass nach Transfektion des Plasmids pEGF-hsp, welches für GFP alleine kodiert, nahezu 100% aller Zellen, wenn auch bei stark unterschiedlicher Intensität, innerhalb der ersten zwei Tage ein fluoreszentes Signal innerhalb der gesamten Zelle zeigen. Die Ursachen für den niedrigen Prozentsatz liegen also eher in der Natur der MSL-Proteine (s. a. Diskussion Kapitel 3.2).

Da bei transienter Transfektion nur eine begrenzte Aussage über die funktionelle Integration des fusionierten Proteins getroffen werden kann und auch vorübergehende Faktoren einen Einfluss haben können, wurden stabile Zelllinien für die genannten Proteine etabliert (Kapitel 2.2.4 und 2.4). Im Falle von MSL2 wurden hierbei Zelllinien sowohl unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors als auch unter Kontrolle des MTN-Promotors untersucht (Kapitel 2.2.4). Die Tatsache, dass die stabilen Zelllinien über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden konnten, ohne dass sich signifikante Veränderungen hinsichtlich Morphologie, Größe des X-Chromosoms oder

Generationenzeit gegenüber einer Wildtyp-Zelllinie feststellen ließen, spricht dafür, dass MSL2-GFP zumindest keinen negativen Einfluss auf die Funktion des DCC hatte. Es zeigt sich darüber hinaus, dass das fusionierte Protein genau wie das endogene MSL2 *in vitro* mit MSL1 wechselwirkt (Kapitel 2.3.3), in einer weiblichen Zelllinie MSL1 stabilisiert (Kapitel 2.3.4) sowie über GFP-Antikörper MOF immunpräzipitiert werden kann (Kapitel 2.3.2). Somit scheint MSL2 durch die GFP-Fusion nicht in seiner Funktion eingeschränkt zu sein und das endogene MSL2 durch MSL2-GFP ersetzbar, was für die weiteren dynamischen Untersuchungen von zentraler Bedeutung ist. Theoretisch bliebe die Möglichkeit, dass ein Fehlen von MSL2 oder dessen Ersetzen durch ein nicht voll funktionsfähiges Ersatzprodukt nicht letal für die männliche SF4-Zelllinie ist. Somit wäre zwar die Lokalisation am X-Chromosom sichtbar und MSL2-GFP hätte ähnliche Wechselwirkungen wie MSL2, aber der DCC käme seiner Aufgabe der Dosiskompensation nicht in vollem Umfang nach. Auch wenn dieser Einwand angesichts gleichzeitiger Lokalisation von MSL2-GFP am X-Chromosom und der Acetylierung von H4K16 bei deutlich reduziertem Niveau von endogenem MSL2 (s. a. Diskussion Kapitel 3.2) unwahrscheinlich erscheint, beseitigt ein Experiment von M. Prestel in unserem Labor auch diesen Zweifel. Hierbei wurde eine Fliegenlinie etabliert, die transgen MSL2 fusioniert mit VenusYFP unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors exprimiert. Dieses Fusionsprodukt war in der Lage, eine MSL2-Nullmutante [21], die eine Mutation im RING-Finger-Motiv trägt, zu komplementieren und zeigt sowohl eine Lokalisation am X-Chromosom als auch eine deutlich gesteigerte männliche Überlebensrate.

Für die Erzeugung einer homogenen stabilen Zelllinie waren mehrere Wochen Selektion unter Geneticin nötig. Im Falle von MSL2 unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors ergab sich hierbei eine Zelllinie, in der über 90% aller Zellen eine Fluoreszenz am X-Chromosom auf vergleichbarem Intensitätsniveau zeigten (Kapitel 2.2.4). Mit dieser Zelllinie steht somit ein Werkzeug zur Verfügung, das die Beobachtung eines Markerproteins des DCC unter manipulativen Experimenten an der lebenden Zelle ermöglicht. Denkbar wären hier z. B. RNAi (*RNA interference*)-Experimente gegen MSL-Proteine oder ISWI und deren Auswirkungen auf die Lokalisation am X-Chromosom oder die Größe des X-Chromosoms.

Weiterhin ist durch diese stabile Zelllinie auch ein einziges Chromosom selektiv in der lebenden Zelle markiert und kann somit über den Zellzyklus verfolgt werden (Kapitel 2.6.1). Im Hinblick auf die Frage, wie sich Chromosomen-Territorien über den Zellzyklus und insbesondere nach der Mitose anordnen (s. Kapitel 1.3.4), eröffnet sich die

Möglichkeit, einen zweiten Fixpunkt mit einem andersfarbigen fluoreszierenden Protein zu markieren und die relative Positionierung beider Territorien zu beobachten. Denkbar wäre hier z. B. das Protein HP1 α als Marker für Heterochromatin, POF (*painting of forth*) als Markerprotein für das vierte Chromosom [102] oder aber auch Histone, die sich selektiv bleichen ließen und damit einen Bezugspunkt bilden würden.

3.2 Expressionsniveau von MSL2

Die Translation von MSL2 wird in weiblichen Zellen durch die Expression von SXL gehemmt [16]. In der Folge sind auch das Expressionsniveau zumindest von MSL1 und MSL2 stark herunter reguliert. Durch eine ektope Expression von MSL2 kann jedoch MSL1 sowohl in genetischen Experimenten [97] als auch in der weiblichen *Drosophila*-Zelllinie KC (Kapitel 2.3.4) stabilisiert werden. Aber auch in männlichen Zellen scheint das Expressionsniveau von MSL2 streng reguliert zu werden. In der stabilen Zelllinie für hsp-msl2-gfp ist die Menge von endogenem MSL2 deutlich reduziert, während das Gesamtniveau von MSL2-GFP und endogenem MSL2 vergleichbar mit dem MSL2-Niveau in einer Wildtyp-Zelllinie ist (Kapitel 2.3.1). Dies spricht zum einen für den Ersatz von endogenem MSL2 durch MSL2-GFP, wirft auf der anderen Seite aber die Frage auf, auf welcher Ebene die Expression von MSL2 gehemmt wird. Zum einen könnte das endogene MSL2, durch einen Promotor, der auf die Menge des vorhandenen MSL2 reagiert, auf Transkriptionsniveau supprimiert werden („*feed back regulation*“). Als Alternative könnten MSL2 und MSL2-GFP in einer Konkurrenzsituation um freie Bindungsplätze stehen, wobei überschüssiges MSL2 von der Zelle direkt abgebaut wird. Somit wäre die Reduktion des endogenen MSL2-Niveaus nicht auf eine supprimierte Transkription oder Translation zurück zu führen, sondern auf einen vermehrten Abbau von nicht benötigtem MSL2. Für diese zweite Möglichkeit spricht auch die Tatsache, dass durch einen halbstündigen Hitzeschock einer MSL2-GFP exprimierenden stabilen Zelllinie innerhalb der folgenden zwei Stunden die Expression von MSL2-GFP stark anstieg. Im Anschluss sank diese jedoch rasch wieder und lag nach wenigen Stunden schon wieder auf dem Ausgangsniveau (Kapitel 2.2.1). In diesem Verhalten unterscheidet sich MSL2 auch deutlich von MOF-GFP oder GFP allein, welche erst über Tage abgebaut werden. Hier ist der rasche Abbau von MSL2-GFP sichtbar. Ob dies für das endogene MSL2 ebenfalls zutrifft, ist durch die vorliegenden Experimente nicht restlos zu klären. Zwei hier nicht durchgeführte Experimente könnten zu diesem Punkt noch weiteren Aufschluss geben.

Zum einen wäre dies die Bestimmung des mRNA-Levels für MSL2 in der stabilen Zelllinie für *hsp-msl2-gfp*, zum anderen die Wiederholung des Hitzeschockexperiments mit einer stabile Zelllinie, die zusätzlich MSL2 unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors exprimiert.

Auch für die Integration von MSL2-GFP in den DCC und für die Lokalisation am X-Chromosom ist ein bestimmtes Expressionsniveau erforderlich. So war von den getesteten Promotoren die Expression durch den SV40-Promotor nicht ausreichend, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal zu erzielen. Sowohl unter dem Hitzeschockpromotor als auch dem Metallothionein-Promotor konnte in transienter Transfektion eine Lokalisation am X-Chromosom beobachtet werden (Kapitel 2.2.2). Hierbei kam es jedoch zu keiner messbaren Repression des endogenen MSL2 (Daten nicht gezeigt), was zum einen an dem sehr heterogenen Expressionsniveau zwischen den einzelnen Zellen, zum anderen auch an dem insgesamt nur begrenzten Prozentsatz aller Zellen, der eine Lokalisation am X-Chromosom zeigt, liegen mag. In den stabilen Zellen reichte das basale Niveau des MTN-Promotors nicht aus, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal am X-Chromosom aufzuweisen. Beim Hitzeschockpromotor dagegen, wenn auch erst nach etlichen Wochen Selektion, war auf basalem Niveau eine Integration von MSL2-GFP in den DCC zu beobachten (Kapitel 2.2.4). Interessanterweise ist im Falle des Hitzeschockpromotors durch eine Induktion mittels eines 30-minütigen Hitzeschocks wie schon erwähnt eine Steigerung der MSL2-GFP-Expression zu sehen. Dies hat jedoch keine Auswirkungen auf die Integration von MSL2-GFP am X-Chromosom. Dagegen kann über eine Induktion des Metallothionein-Promotors durch CuSO_4 über drei Tage sowohl eine Steigerung der Expression als auch der Integration erfolgen (Kapitel 2.2.4). Somit scheint neben einer bestimmten Mindestexpression von MSL2-GFP eine gewisse Dauer der Expression von entscheidender Bedeutung zu sein, was angesichts des schnellen Abbaus von MSL2-GFP auch nahe liegt, allerdings noch nicht vollständig erklärt wird, da direkt im Anschluss an die Expression unter Hitzeschock keine Integration erfolgt. Dies ist ein erster Hinweis auf die geringe Austauschkinetik von MSL2 (s. a. Diskussion Kapitel 3.5). Auf der anderen Seite scheint ein zu hohes Niveau an exprimierten MSL2-GFP von den Zellen nicht gut toleriert zu werden. So sind in den ersten Tagen nach der Transfektion sehr stark fluoreszente Zellen zu finden, die in der Folgezeit verschwinden (Kapitel 2.2.2). Ebenso sind bei längerer Induktion des MTN-Promotors mit CuSO_4 zu Beginn viele sehr stark exprimierende Zellen zu sehen, die sich nach einigen Tagen deutlich reduzieren.

3.3 Integration von MOF in den DCC

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass MOF in der Lage ist, Transkription *in vitro* unabhängig von der Lokalisation am X-Chromosom zu aktivieren [6]. Hierdurch kommt der korrekten Zielsteuerung von MOF eine entscheidende Bedeutung zu, um ausschließlich H4K16 am X-Chromosom zu acetylieren und damit zur zweifachen Expressionssteigerung beizutragen. Die Assoziation von MOF mit dem X-Chromosom geht, ebenso wie die von MLE und MSL3, unter der Behandlung mit RNase verloren [8;32;169]. Dies, verbunden mit der Tatsache, dass die Chromodomäne von MOF für die Wechselwirkung mit RNA *in vivo* von Bedeutung war [8], führte zu der Vermutung, dass die Assoziation von MOF mit dem X-Chromosom zu einem großen Teil über seine RNA-Wechselwirkung vermittelt wird. In dieser Arbeit konnte dies nicht bestätigt werden. Die in der Chromodomäne mutierten MOF-Derivate Y416D und W426G, die in der Arbeit von Akhtar et al. [8] die Wechselwirkung mit der RNA verhinderten, wurden mit dem Reporter-gen GFP fusioniert und zeigten nach transienter Transfektion immer noch eine bevorzugte Lokalisation am X-Chromosom (Kapitel 2.5). Die Wechselwirkung von MOF mit der RNA ist also nicht allein für die Steuerung von MOF an das X-Chromosom verantwortlich. Das dies auch nicht unbedingt zu erwarten war, unterstreicht die Arbeit von Oh et al. [141], in welcher gezeigt wurde, dass das Fehlen der beiden roX-RNAs potentiell durch die Überexpression von MSL1 und MSL2 überwunden werden kann. Hierdurch gelangte die Aufmerksamkeit wieder mehr auf mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen, die für die Lokalisation am X-Chromosom verantwortlich sein könnten. Die MOF-Doppelmutante L578G/Y580G, die zwei Punktmutationen im Bereich der Zink-Finger-Domäne trägt, wurde, fusioniert mit GFP, nach transienter Transfektion niemals am X-Chromosom angereichert gefunden (Abbildung 28). Zusammen mit der Beobachtung von V. Morales in unserem Labor, dass MOF über diese Zink-Finger-Domäne mit MSL1 wechselwirkt [132], führt dies zu der Schlussfolgerung, dass für die Assoziation von MOF mit dem X-Chromosom der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen MOF und MSL1 eine entscheidende Bedeutung zukommt. Interessanterweise bindet MSL1 an MOF über eine konservierte Region, der so genannten PEHE-Region, die erst kürzlich identifiziert wurde [115], und legt damit bei bekannten MOF-Homologen in Hefen und beim Mensch [54;152] einen allgemeinen Mechanismus der Steuerung von MOF an seinen Wirkungsort nahe [132].

Darüber hinaus zeigt genau die Mutante, die die korrekte Inkorporation von MOF am X-Chromosom verhindert, eine reduzierte Acetylierung von Histonen [6]. Hierzu passt die

Beobachtung von V. Morales, dass die Enzymaktivität von MOF durch die Anwesenheit von MSL1 und MSL3 reguliert wird[132]. Entscheidend könnte hierbei die Tatsache sein, dass MSL3 und MOF an benachbarte Regionen von MSL1 binden. Auch scheint der Zink-Finger für die Substratbindung entscheidend zu sein.

Es wurden in dieser Arbeit zwei weitere MOF-Mutanten durch GFP-Fusionen auf ihre Lokalisation am X-Chromosom hin untersucht. Die MOF-Mutante T555K/W556G, eine Doppelmutation außerhalb beschriebener Domänen, zeigte hierbei wie erwartet keine signifikante Abweichung vom MOF-Wildtyp. Interessant ist dagegen, dass auch die MOF-Mutante G691E, eine Mutation in der HAT-Domäne, die die Wechselwirkung mit Acetyl-CoA verhindert, *in vivo* am X-Chromosom lokalisiert. Zwar muss offen bleiben, ob diese Lokalisation, wie es tatsächlich scheint, quantitativ seltener als für den MOF-Wildtyp erfolgt (s. a. Diskussion Kapitel 3.1), aber offensichtlich verhindert der Verlust der HAT-Aktivität nicht generell das „spreading“ des Komplexes über das X-Chromosom. Dies wäre auf Grund des Befundes an Polytän-Chromsomen, in welchen MSL1 und MSL2 bei Mutation von MOF nur noch an ca. 50 Eintrittsstellen bindet, eventuell zu erwarten gewesen. Inwieweit hierfür allerdings wirklich das mit GFP fusionierte MOF-Derivat oder das natürlich ebenfalls vorhandene endogene MOF verantwortlich ist, bleibt weiteren Experimenten vorbehalten. Entscheidende Bedeutung kommt hierbei der Austauschkinetik von MOF zu. Sollte MOF wie auch MSL2 stabil am X-Chromosom sein, dann hätte der Komplex auch nach Verlust zur Histonacetylierung die Fähigkeit, sich am X-Chromosom auszubreiten. Bei einer schnelleren Austauschkinetik ist dagegen denkbar, dass die Ausbreitung über Komplexe mit endogenem MOF verläuft und anschließend frei werdende Bindungsplätze stochastisch auch mit den MOF-Mutanten aufgefüllt werden.

3.4 Schnelle Dynamik von HP1 α

Um für die dynamischen Untersuchungen von MSL2 ein Vergleichssystem zu besitzen, wurde für HP1 α -GFP ebenfalls eine stabile Zelllinie etabliert. HP1 α erschien als Markerprotein für Heterochromatin vergleichbar mit MSL2 in der Hinsicht, dass es ebenfalls in einem bestimmten Kompartiment des Nucleus akkumuliert, welches stabil über Zellgenerationen hinweg weitergegeben wird. Im Laufe der Arbeit erschienen dann zwei Arbeiten, die von der sehr schnellen Austauschdynamik von HP1 α berichteten [38;61]. Somit war HP1 α auch insofern eine gute Referenz für unser System, als dass in

unserem System eine schnelle Dynamik detektierbar ist und sich klar von einer langsameren Dynamik unterscheidet.

Heterochromatin mit seinem Strukturprotein HP1 α schien auf Grund der Repression der Transkription und seiner dicht gepackten Chromatinstruktur als relativ starres, rigides Kompartiment innerhalb des Nukleus. Umso erstaunlicher war daher die Erkenntnis der erwähnten Arbeiten des letzten Jahres, dass HP1 α eine äußerst hohe Austauschkinetik zwischen dem freien *Pool* und der an das Heterochromatin gebundenen Fraktion zeigt [38;61]. Diese Eigenschaft von HP1 α in Säugetierzellen bestätigt die vorliegende Arbeit auch für *Drosophila*-Zellen (Kapitel 2.6.2). Die in FRAP-Experimenten gemessene Halbwertszeit im Bereich von ca. 0,6 Sekunden liegt in derselben Größenordnung, evtl. geringfügig schneller, wie die in den Säugetierzellen. In Hinblick auf die wiedergewonnene Gesamtintensität gab es in den beiden genannten Arbeiten einen Unterschied. Während Cheutin et al. eine komplette Wiedererlangung der Anfangsintensität sowohl im Euchromatin als auch im Heterochromatin beobachteten, deuten die Daten von Festenstein et al. lediglich auf eine 90%ige Wiedererlangung im Euchromatin sowie eine 70%ige im Heterochromatin hin. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen eher die erste Beobachtung, in der innerhalb der ersten zehn Sekunden eine nahezu 100%ige Wiedererlangung des Ausgangsniveaus erreicht wird. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass doch eine kleine Fraktion von HP1 α stabil gebunden bleibt [176;192]. Dies wäre insofern von entscheidender Bedeutung, als diese stabile Fraktion ein Fundament für die Ausbreitung des Heterochromatins bilden könnte. Hierfür käme auch ein anderer stabiler Faktor wie z. B. das an K9 methylierte Histon H3 in Frage. Insgesamt beruht die Bildung des Heterochromatins, welches sich morphologisch als ein stabiles Kompartiment des Nukleus darstellt, auf Proteinebene dennoch auf einer raschen, dauerhaft anhaltenden Erneuerung, zumindest eines seiner Hauptbestandteile, dem Heterochromatin-Protein HP1 α . Ob es allerdings noch einen stabilen Proteinbestandteil des Heterochromatins oder evtl. auch eine kleine stabile Fraktion von HP1 α gibt, die der raschen Kinetik zu Grunde liegt, ist hiermit natürlich nicht geklärt. Zumindest zeigt es sich aber, dass das Heterochromatin trotz seiner dichten Packung regulatorischen Proteinen zugänglich ist.

Suv39h1 ist in der Lage, H3K9 zu methylieren. HP1 α bindet sowohl methyliertes H3K9 als auch Suv39h1 [113]. Basierend auf dieser Erkenntnis liegt die Idee nahe, dass von einer Initiationsstelle aus Heterochromatin über eine selbstrückkoppelnde Schleife propagiert werden kann. Dies wird noch durch ein positives Feedback von Histon- und DNA-

Methylierung unterstützt [197]. Zusammen mit der raschen Dynamik von HP1 α sowie der Assoziation von HP1 α an CAF1 (*chromatin assembly factor 1*), welcher während DNA-Replikation und –Reparaturen in Histon-Positionierung involviert ist [136], bietet dies einen Rahmen für die Informationsweitergabe über die DNA-Replikation, ohne dass HP1 α gezielt von einem Bindungsplatz gelöst und an einen anderen gebracht werden müsste [113]. Ein interessanter Seitenaspekt ist auch die Tatsache, dass diese zahlreichen Wechselwirkungen von HP1 α seine Dynamik nicht wesentlich einschränken.

Darüber hinaus bietet die rasche Dissoziation von HP1 α vom Heterochromatin einen eleganten Mechanismus für die Regulation von Chromatin-Zuständen [38]. Falls HP1 α von methyliertem H3K9 dissoziiert, kann der freiwerdende Bindungsplatz natürlich neben HP1 α auch von anderen, potentiellen Bindungsfaktoren besetzt werden. Somit entscheidet allein die relative Konzentration verschiedener Proteine und ihre Bindungsaffinität stochastisch, wie sich der Chromatin-Zustand verändert. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass Suppression eines Gens durch „*position effect variegation*“ über die reine Expression eines Aktivators überwunden werden kann [3].

3.5 Stabile Assoziation von MSL2 mit dem X-Chromosom

Nachdem ein Großteil von untersuchten nuklearen Proteinen eine äußerst hohe Dynamik zeigten (Kapitel 1.3.2), stellt sich die Frage, wie stabile Genexpressionsmuster über mehrere Zellgenerationen beibehalten werden können. Hierbei legen die Beobachtungen von HP1 α als Markerprotein für das Heterochromatin mit einer bestimmten Chromatinstruktur und entsprechender epigenetischer Markierung nahe, dass dieses Gedächtnis ebenfalls höchst dynamisch aufrecht erhalten werden kann. Dabei muss offen bleiben (s. a. Diskussion 3.4), ob HP1 α wirklich das entscheidende Protein für die Bildung des Heterochromatins ist. Aber selbst wenn die Informationsweitergabe des Heterochromatins ausschließlich über eine dynamische Stabilisierung mit den impliziten Vorteilen für die Erklärung von regulatorischen Steuerungsmöglichkeiten verläuft, bleibt die Frage, ob es sich hierbei um ein universelles Verfahren für die Weitergabe epigenetischer Informationen handelt.

Das in dieser Arbeit verwendete Modellsystem der Dosiskompensation in der *Drosophila* und das dazu gehörige Protein MSL2 teilt gewisse Aspekte mit dem Protein HP1 α . So ist auch der DCC mit einem streng bestimmten Kompartiment und einer entsprechenden Histon-Modifikationen, dem acetylierten H4K16, verknüpft. Dieses Kompartiment in der

männlichen Fliege wird früh während der Entwicklung durch die Stilllegung von SXL und die Expression von MSL2 festgelegt [41] und im Folgenden über Zellgenerationen hinweg beibehalten. Und wie HP1 α ist auch MSL2 über Protein-Protein-Wechselwirkungen in einen Protein-RNA-Komplex eingebunden, in dessen Rahmen auch die Acetylierung von H4K16 erfolgt. Anders als bei HP1 α ist aber unbekannt, wie MSL2, zusammen mit MSL1, an das Chromatin assoziiert ist. Trotz gewisser grundsätzlicher Ähnlichkeit, bei im Detail natürlich unterschiedlicher Struktur und Funktion, unterscheidet sich die Dynamik von MSL2 grundsätzlich von der von HP1 α . MSL2 wird über längere Zeiträume praktisch nicht ausgetauscht. Es erfolgt weder ein Austausch zwischen der an das X-Chromosom gebundenen und der im Nukleoplasma ungebundenen Fraktion noch innerhalb der am X-Chromosom gebundenen Fraktion (Kapitel 2.6.3). Dieses Verhalten wurde in FRAP- und FLIP-Experimenten bestätigt, lässt sich aber auch indirekt durch das Verhalten von SF4-Zellen nach transienter Transfektion mit hsp(mtn)-msl2-gfp untermauern. Denn anders als für GFP allein oder HP1 α -GFP zeigten die Zellen nicht nach ein bis zwei Tagen, sondern erst nach vier bis fünf Tagen ein Maximum an Zellen, die die korrekte Lokalisation am X-Chromosom aufweisen (Kapitel 2.2.2). Dies könnte dafür sprechen, dass erst einige Replikationen benötigt werden, damit MSL2-GFP in einer detektierbaren Menge am X-Chromosom in den DCC eingebaut wird. Auf jeden Fall scheint kein kontinuierlicher Austausch von gebundenem MSL2 mit der freien Fraktion zu erfolgen. Hierfür spricht auch, dass es nach einem kurzen Hitzeschock einer stabilen Zelllinie für hsp-msl2-gfp zwar einen starken Expressionsanstieg von MSL2-GFP gibt, es aber zu keiner Integration in den DCC innerhalb einiger Stunden kommt (Kapitel 2.2.1). Ebenso muss auch die stabile Zelllinie für mtn-msl2-gfp bis zur Inkorporation von MSL2-GFP einige Tage mit CuSO₄ inkubiert werden (Kapitel 2.2.4).

Hier schließt sich die Frage an, an welcher Stelle des Zellzyklus MSL2 ausgetauscht oder ergänzt wird. Gibt es einen speziellen Zeitpunkt, an dem MSL2 und hiermit evtl. der gesamte DCC dissoziiert und es damit die Möglichkeit gibt, durch ein bis dahin ungebundenes MSL2 ersetzt zu werden? Oder verläuft die Austauschkinetik zwar kontinuierlich, aber so langsam, dass innerhalb des hier beobachteten Zeitraums (im FRAP-Experiment 20 Minuten) keine nennenswerte Erholung des Fluoreszenzsignals erfolgt? Gegen das zweite Szenario spricht neben der Tatsache, dass in einzelnen Zellen auch über einen längeren Zeitraum kein Austausch gesehen wurde (Daten nicht gezeigt und nicht quantifiziert), dass bei einem insgesamt recht kurzen Zellzyklus von ca. 20 Stunden auch innerhalb von 20 Minuten ein geringer Austausch festgestellt werden sollte,

wenn der gesamte *Pool* an MSL2-Proteinen zumindest einmal während des Zellzyklus ausgetauscht werden sollte.

Während der Mitose bleibt MSL2 mit dem X-Chromosom assoziiert (Kapitel 2.6.1). Dies spricht nicht unbedingt für einen fehlenden Austausch von MSL2 während dieses Zeitraumes, siehe z. B. die Dynamik von HP1 α , allerdings erscheint es auch eher unwahrscheinlich angesichts der Stabilität während des übrigen Zellzyklus, dass genau hier ein rascher Austausch erfolgt, wobei das Kompartiment des X-Chromosoms fest erhalten bleibt. Über das Verhalten von MSL2 während der Replikation kann mit den Daten in dieser Arbeit nur spekuliert werden. So ist denkbar, dass MSL2, evtl. mit MSL1 oder dem gesamten DCC zusammen, sofort nach der Replikation wieder an das X-Chromosom integriert wird, z. B. über einen semikonservativen Mechanismus, wie er für die DNA-Methylierung beschrieben oder für den Histon-Code postuliert wurde. Oder aber, dass MSL2 komplett vom X-Chromosom dissoziiert und anschließend über „spreading“ ausgehend von den Eintrittsstellen wieder an das X-Chromosom assoziiert. Hierfür wird von entscheidender Bedeutung sein, die Domänen des X-Chromosoms, an die der DCC bindet, sowie die Art der Bindung genauer zu charakterisieren [73]. Das Fehlen von intrachromosomalem Austausch von MSL2 spricht aber zumindest gegen ein permanentes „spreading“ des DCC während des Zellzyklus.

Insgesamt zeigt MSL2 eine Stabilität wie sie bislang nur für wenige nukleare Proteine beschrieben wurde. Diese waren entweder wie z. B. die Histone fest in die Architektur des Chromatins eingebunden [98] oder übernahmen wie z. B. PCNA für einen gewissen Zeitraum eine bestimmte Funktion an einem definierten Ort [186]. Durch die Assoziation mit dem X-Chromosom bekommt MSL2 hierdurch den Charakter eines festen Strukturproteins und wird damit zum Kandidaten für eine stabile Plattform, die den DCC rekrutiert und schließlich zur funktionell bedeutenden Histon-Acetylierung führt.

In RNA-Interferenz(RNAi)-Experimenten mit SL2-Zellen, die Tobias Straub in unserem Labor durchführte, fand sich, dass bei der Ausschaltung von MSL2, MOF oder MSL3 nach sechs Tagen weder eines der drei Proteine noch eine Acetylierung von H4K16 in der Immunfluoreszenz am X-Chromosom mehr gefunden werden konnte. Wie auch bei transienter Transfektion ist die Wirkung der RNAi erst nach einigen Tagen zu beobachten, was als Zeichen für einen längeren Austausch gewertet werden kann, der sich erst über mehrere Zellgenerationen bemerkbar macht. Zum zweiten ist interessant, dass auch MSL2 nach der Ausschaltung von MOF vom X-Chromosom dissoziiert. Dies könnte durchaus in Einklang mit den Experimenten an polytenen Chromosomen stehen, wo nach der

Ausschaltung von MOF MSL2 nur noch an ca. 50 Eintrittsstellen nachweisbar blieb [96]. Diese wären bei der geringen Größe von SL2-Zellen in der Immunfluoreszenz wahrscheinlich nicht detektierbar, so dass offen bleiben muss, ob MSL2 überhaupt nicht mehr am X-Chromosom lokalisiert oder nur noch an einigen diskreten Stellen. Zumindest wird MOF aber zur Ausbreitung von MSL2 über das gesamte X-Chromosom benötigt.

Die Acetylierung von H4K16 hat im Gegensatz zu MSL2 einen äußerst raschen Austausch [8]. Von Interesse wird daher sein, was für eine Dynamik MOF zeigen wird. Ob die Acetylierung auf der Assoziation von MOF mit dem DCC beruht und MOF anschließend wieder dissoziiert oder ob MOF ebenfalls stabil im DCC am X-Chromosom lokalisiert und hierbei eine permanente HAT-Aktivität aufweist.

Insgesamt deuten die hier präsentierten Daten auf eine Assoziation des DCC am X-Chromosom hin, die auf einer äußerst stabilen Lokalisation von MSL2 beruhen.

4 Zusammenfassung

Die Dosiskompensation in der *Drosophila melanogaster* ist ein markantes Beispiel für eine epigenetische Regulierung der Genexpression eines subnuklearen Kompartiments. Ein Komplex (DCC) aus Proteinen und nichtkodierender RNA bindet hierbei spezifisch an das männliche X-Chromosom und führt durch eine zweifache Hypertranskription der X-chromosomalen Gene zu einem Expressionsausgleich zwischen männlichen und weiblichen Zellen. Um die Dynamik dieser Proteine und ihrer Lokalisation *in vivo* untersuchen zu können, fehlten zu Beginn dieser Arbeit entsprechende GFP-Fusionsproteine.

In dieser Arbeit wurden Promotoren und Bedingungen untersucht, unter welchen GFP-Fusionsplasmide in *Drosophila*-Zelllinien exprimiert werden können. Für drei mit GFP fusionierte Proteine des DCC sowie für HP1 α -GFP wurden stabile SF4-Zelllinien etabliert. In jedem dieser Fälle zeigte sich, dass die fusionierten Proteine wie die endogenen Proteine im entsprechenden subnuklearen Kompartiment lokalisieren. Durch diese stabile Zelllinien standen Werkzeuge zur Verfügung, um den DCC *in vivo* untersuchen zu können. Weiterhin ist durch die Zelllinien für die DCC-Proteine ein einzelnes Chromosom *in vivo* selektiv markiert.

Die Funktionalität des fusionierten Schlüsselproteins des DCC, MSL2, wurde durch mehrere komplementäre Ansätze bestätigt. MSL2-GFP konnte das endogene MSL2 *in vivo* ersetzen, interagiert mit MSL1 und MOF wie das endogene MSL2 und konnte MSL1 in weiblichen Zellen stabilisieren.

Für MOF, die Histon-Acetyl-Transferase des DCC, wurden verschiedene Derivate mit Punktmutationen in seinen beschriebenen Domänen auf die korrekte Lokalisation am X-Chromosom getestet. Es zeigte sich überraschend, dass die Zink-Finger-Domäne entscheidend für die korrekte Integration in den DCC am X-Chromosom ist, während Mutationen der HAT- oder Chromodomäne die Lokalisation nicht beeinflussten.

Die Dynamik von HP1 α und MSL2 wurde mit Hilfe der Photobleich-Technik untersucht. Hierbei bestätigten sich für HP1 α die aus Säugetierzellen bekannten schnellen Austauschdynamiken, mit einer Rekonstitution des fluoreszenten heterochromatischen Kompartiments innerhalb weniger Sekunden. Im auffälligen Kontrast hierzu zeigte sich für MSL2 eine außergewöhnlich stabile Assoziation mit dem X-Chromosom, wo sich über einen längeren Zeitraum weder ein Austausch zwischen Nukleoplasma und X-Chromosom noch ein Austausch innerhalb des X-Chromosoms detektieren lässt. Dies spricht gegen

einen kontinuierlichen Austauschprozess des DCC während der Interphase mit direkten Implikationen auf die Funktion des DCC und seiner Ausbreitung am X-Chromosom. Darüber hinaus ist MSL2 ein Beispiel dafür, dass für die Beibehaltung eines funktionalen subnuklearen Kompartiments ein dynamischer Austauschprozess kein universelles Prinzip darstellt, sondern auch durchaus molekulare Interaktionen von ausgesprochener Stabilität beinhalten kann.

5 Methoden

5.1 Manipulation von Nukleinsäuren

5.1.1 Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese für analytische und präparative Zwecke wurde in der Regel mit 1% Agarosegelen (Agarose von SeaKerm Agarose, Marine Colloids Inc. Rockland, Main, USA) durchgeführt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA, 108g Tris, 55g Borsäure, 40ml Na₂EDTA, ad 1l H₂O) verwendet. Das Agarosegel enthielt 2,5µg/50ml Ethidiumbromid.

Für die Gewinnung von DNA-Fragmenten wurde das QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen verwendet und die Reinigung entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

5.1.2 Klonierungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten und im Folgenden beschriebenen Plasmide und Primer sind im Anhang mit Karte und wichtigsten Restriktionsenzymen aufgeführt. Der richtige Einbau der Fragmente wurde durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsnukleasen und in der Regel durch Sequenzierung des Übergangs verifiziert.

5.1.2.1 Konstruktion von pEGFP-hsp-msl2 und pEGFP-sv40-msl2

Als Ausgangsvektor für die Konstruktion eines Plasmids für MSL2, am C-Terminus mit GFP fusioniert, unter der Kontrolle des Promotors HSP70 bzw. SV40 wurde der Vektor pEGFP-1 von der Firma Clontech verwendet. Der Vektor wurde mit der Restriktionsnuklease EcoR1 innerhalb der multiplen Klonierungsstelle des Vektors linearisiert. Der Hitzeschockpromotor HSP70 wurde aus dem genomischen Klon 122X14 [119], welcher einen Teil des HSP70 Lokus umschließt, mit Hilfe der Restriktionsnukleasen XbaI und XmnI ausgeschnitten. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms wurden die Einzelstränge des Vektors sowie des Fragments aufgefüllt und anschließend ligiert. Für den SV40-Promotor extrahierte ich aus dem Vektor pSV40-ZEO (Invitrogen) den Promotor mit BclI, dessen Überhang wiederum durch das Klenow-Fragment unter Zugabe von Nukleotiden aufgefüllt wurde, und XhoI. Dieses Fragment wurde mit pEGFP-

1 (Clontech) ligiert, welches mit HindIII linearisiert, an den überhängenden Einzelsträngen durch das Klenow-Enzym geglättet und mit XhoI nachgespalten wurde. Die so entstandenen pEGFP-sv40 und pEGFP-hsp, die auch als Kontrollen für die Expression von GFP allein dienten, wurden mit KpnI und AgeI aufgeschnitten. MSL2 cDNA wurde mittels RT-PCR (siehe dort) aus RNA von der *Drosophila* SF4-Zelllinie gewonnen. Die PCR Primer waren mit Restriktionsstellen für AgeI bzw. KpnI versehen und an der AgeI-Stelle so gewählt, dass der Übergang von MSL2 zu GFP das richtige Leseraster gewährleistet. Dieses PCR-Produkt wurde mit KpnI und AgeI gespalten und mit pEGFP-sv40 bzw. pEGFP-hsp ligiert.

5.1.2.2 Konstruktion von mtn-msl2-gfp

Um MSL2 mit dem Reporter gen GFP am C-Terminus unter die Kontrolle des induzierbaren Metallothionein-Promotors (MTN) zu stellen, wurde als Ausgangsplasmid das Plasmid pRM-HA3-ms2-1 [31] benutzt, welches den Promotor MTN enthält, sowie das zuvor konstruierte Plasmid pEGFP-hsp-msl2. pEGFP-hsp-msl2 wurde mit den Restriktionsnukleasen HpaI, SalI sowie StuI gespalten und das Fragment aus dem Agarosegel extrahiert, welches die DNA-Sequenz für msl2-gfp enthielt. Die zusätzliche Spaltung mit StuI war hierbei notwendig, um bei der Extraktion klar abgrenzbare Fragmente zu erhalten. Anschließend wurde das Fragment in das Plasmid pRM-HA3-ms2-1, welches ebenfalls mit HpaI und SalI gespalten wurde, hineinligiert.

5.1.2.3 Konstruktion von pEGFP-C1-hsp-msl2 und pEGFP-C1-sv40-msl2

Um das fluoreszierende Reporter gen GFP auch am N-Terminus von MSL2 beobachten zu können, ging die vorliegende Arbeit für die Konstruktion der entsprechenden Plasmide vom Vektor pEGFP-C1 (Firma Clontech) aus. Zunächst wurde die multiple Klonierungsstelle des Vektors genutzt, welche sich am C-terminalen Ende der GFP-Sequenz befindet, um mit Hilfe der Restriktionsnukleasen KpnI und SmaI den Vektor aufzuschneiden und hierin das MSL2-Fragment zu ligieren. Das MSL2-Fragment wurde diesmal über eine PCR mit den bekannten Primern, die eine Schnittstelle für KpnI bzw. AgeI besitzen, aus dem Plasmid PBB-HB-MSL2 (Plasmidbibliothek des Labors, geklont von G. Mengus) gewonnen. Das PCR-Produkt wurde mit KpnI und AgeI verdaut und an

der AgeI-Schnittstelle geglättet. Beim Übergang von der GFP- zur MSL2-Sequenz blieb das Leseraster erhalten. In einem zweiten Schritt musste im so gewonnenen Plasmid pEGFP-C1-msl2 noch der im Ausgangsvektor enthaltenen Promotor CMV ausgetauscht werden. Dies geschah, indem mit Hilfe von AfeI und AgeI der CMV-Promotor ausgeschnitten wurde. Aus pEGFP-sv40 bzw. pEGFP-hsp wurde mit AseI, dessen überhängender Einzelstrang komplementär ergänzt wurde, und AgeI der Promotor SV40 bzw. HSP70 extrahiert und in pEGFP-C1-msl2 hineinligiert.

5.1.2.4 Konstruktion von pEGFP-hsp-msl1 und pEGFP-hsp-mof

Für die Konstruktion von Plasmiden, die MOF bzw. MSL1 unter die Kontrolle des HSP70-Promotors stellen und das fluoreszierende Gen GFP am C-Terminus enthalten, wurden Primer für MOF und MSL1 konstruiert, die am N-Terminus wiederum eine KpnI-Schnittstelle sowie am C-Terminus eine AgeI-Schnittstellen besitzen (s. a. Anhang). Die PCR benutzte für MOF das Plasmid mof-myb2 (Plasmidbibliothek des Labors, geklont von A. Akhtar) als Ursprung sowie für MSL1 pBB-HisB-MSL1 (Plasmidbibliothek des Labors, geklont von G. Mengus). Die PCR-Produkte wurden jeweils mit KpnI und AgeI gespalten und in pEGFP-hsp-msl2, aus welchem ebenfalls mit AgeI und KpnI die MSL2-Sequenz herausgeschnitten wurde, hineinligiert. Die PCR-Primer waren so gewählt, dass das Leseraster berücksichtigt wurde.

5.1.2.5 Konstruktion der Plasmide mit MOF-Punktmutationen

Die Plasmide für die mit GFP fusionierten MOF-Punktmutationen wurden von Irene Vetter kloniert. Hierbei wurde aus den im Labor vorliegenden Plasmiden mit den MOF-Punktmutationen Y416D, L578G/Y580G, T555k/W556G, W426G sowie G691E jeweils mittels BamHI und MroI ein Fragment ausgeschnitten, welches die Punktmutationen enthielt (Aminosäuren 210-712 der MOF-Sequenz). Dieses Fragment wurde in den Wildtyp-Vektor pEGFP-hsp-mof hineinligiert, wo es das entsprechende Fragment des Wildtypes ersetzt, welches mit denselben Restriktionsnukleasen entfernt worden war.

5.1.2.6 Konstruktion von pFastBac-msl2-gfp

Für die Expression von MSL2-Proteinen, am C-Terminal verknüpft mit dem fluoreszierenden Reportergen GFP, wurde zur Konstruktion von rekombinanten Baculoviren das „*Bac-to-bac*“-Expressionssystem (Invitrogen) benutzt. Hierzu wurde die cDNA-Sequenz für MSL2-GFP im pFastBac-Vektor benötigt. Dem im Labor vorliegenden pFastBac-msl2-Plasmid wurde mittels der Restriktionsnukleasen SpeI und NotI ein Teil der C-terminalen Sequenz von MSL2 herausgeschnitten und durch dieselbe Sequenz, verbunden mit der GFP-Sequenz, welche aus pEGFP-hsp-msl2 mit Hilfe derselben Enzyme gewonnen worden war, ersetzt.

5.1.3 RT-PCR

Für die cDNA-Gewinnung wurde die reverse Transkription mit der SuperScript RNase H-Reverse Transkriptase der Firma Invitrogen durchgeführt. 5 µg RNA-Extrakt wurden mit 1 µl des gewünschten Primers (Konzentration 500 µg/ml), 1 µl von 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und mit sterilem, destiliertem Wasser auf 12 µl aufgefüllt, für fünf Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend für fünf Minuten direkt auf Eis gegeben. Nach kurzer Zentrifugation wurden 4 µl 5x First-Strand-Puffer (Firma Invitrogen), 2 µl 0.1 M DTT sowie 1 µl RNaseOUT Rekombinant Ribonuclease Inhibitor (40 Units/µl) hinzugefügt und bei 42°C zwei Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase SuperScriptII (1 µl = 200 Units) hinzugegeben, durch Pipettieren gemischt und für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C beendet.

Die so gewonnene cDNA wurde durch PCR amplifiziert. In einem 50 µl-Ansatz waren enthalten: 2 µl cDNA aus der obigen Synthesereaktion, 5 µl 10xPCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 µl von 10 mM dNTP-Mix, je 10 µl (entspricht 10 pmol) der beiden Amplifikationsprimer, 21,5 µl destilliertes H₂O sowie 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (Konz. 5 U/l). Die PCR wurde in einer PCR-Maschine von MWG über 25 Zyklen (Denaturierung: 30 Sekunden bei 95°C, Hybridisierung 30 Sekunden bei 60°C, Synthese eine Minute bei 72°C) durchgeführt. Anschließend wurde das gewonnene DNA-Produkt komplett sequenziert.

5.1.4 Sequenzierung

Für die Sequenzierung der Plasmidklone wurde ein Ansatz aus 2 µl Sequenase-Puffer (Firma Amersham Bioscience), 3 µl (≈ 500 ng) Plasmid-DNA, 1 µl ($=2,5$ pmol) Primer-DNA, 2 µl Sequenase (Firma Amersham Bioscience) und 12 µl H₂O gebildet. Je 4,5 µl dieses Ansatzes wurde in vier Reaktionsgefäße gegeben und mit je 2 µl dNTP-Mix und 0,5 µl ddNTP (wobei hier das N für je eines der vier Nukleotide steht) aufgefüllt. Für die Sequenase-Reaktion wurden 40 Zyklen (Denaturierung: 30 Sekunden bei 95°C, Hybridisierung: 30 Sekunden bei 55°C, Synthese 90 Sekunden bei 72°C) in der PCR-Maschine durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µl StopSolution der Firma Amersham Bioscience und fünfminütiger Inkubation bei 72°C gestoppt und sofort wieder auf Eis gegeben. Die Auftrennung der synthetisierten Einzelstrangfragmente erfolgte in 6%igen Acrylamidgelen unter der Zugabe von 1/1000 Volumen TEMED sowie 1/1000 Volumen 40%igem APS (Ammoniumpersulfat) bei 40 W. Es wurden 4 µl jeder Probe geladen. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer (s. oben) verwendet. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel für 2h auf Filterpapier in Vakuum getrocknet. Zur Analyse wurde ein Kodak Bio Max Film über Nacht bei -18°C belichtet.

5.2 Manipulation von Proteinen

5.2.1 Baculovirus-Expression

Für die Expression des gewünschten Proteins in mit Baculovirus infizierten Zellen wurden zunächst $1 \cdot 10^6$ SF9-Zellen/Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät und sich ca. 15 Minuten setzen lassen. In der Zwischenzeit wurden zwei Mixe, die zuvor angefertigt wurden (Mix A: 175 ng Baculovirus-DNA, 1,5 µg Plasmid-DNA, 33 µl serumfreies SF900 II-Medium, Mix B: 10 µl Lipofectin, 23 µl serumfreies SF900 II-Medium), gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit serumfreiem Medium mehrmals gewaschen. Oben genannte Mischung aus dem Mix A und B wurde zusammen mit 440 µl serumfreiem Medium zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 15 Stunden unter leichten Schaukelbewegungen bei Raumtemperatur gehalten. Nach erneutem Waschen wurden 2 ml jetzt mit Serum versetztem SF900 II-Medium hinzugegeben und die Zellen für fünf Tage bei 27°C inkubiert. Nach Zentrifugation (fünf Minuten, 1000 U/min) wurde der Überstand abgenommen. Durch diese Erstinfektion war der Virustiter noch relativ niedrig, so dass eine erneute Amplifikation erfolgte. Es wurden

ca. $8 \cdot 10^6$ SF9-Zellen in einer Petrischale von 10 cm Durchmesser ausgesät, 15 Minuten absetzen lassen und 2,5 ml sowie 1 ml des Überstandes der Erstinfektion zugegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur auf der Wippe mit langsamen Schaukelbewegungen wurden 10 ml SF900 II-Medium zugegeben und bei 27°C für fünf Tage inkubiert. Erneutes Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes folgten. Hieran anschließend konnte ein Ansatz gewählt werden, um die Expression des gewünschten Proteins zu testen. Bei positivem Befund wurde das Virus erneut reamplifiziert ($12 \cdot 10^6$ SF9-Zellen, 15 cm Petrischale, 50 µl des Überstandes, fünf Tage Inkubation), womit das Virus zur weiteren Verwendung zur Verfügung stand.

5.2.2 Western-Blots

Die Präparation des Zellproteins erfolgte durch Extraktion mit RIPA-Puffer (s. a. das Kapitel „Zellextrakt“). Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt [29]. Die Proteinproben werden für zehn Minuten bei 70°C in 1x Laemmli (10x Laemmli: 1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 0,2% Bromphenol blau, mit HCl auf pH 6,8), 10% Glycerol und 25 mM DTT denaturiert, abgekühlt und mit 1 µl DTT (1 M) versehen. Jeweils gleiche Mengen an Protein (zwischen 10-20 µg) wurden in einem 4,5%igem Sammelgel (für 5 ml: 750µl PAA (30%), 1,5 ml Stack-Puffer (0.5 M Tris-HCl, 0.1% SDS, ad 100 ml ddH₂O, auf pH 6.8 mit HCl), 3 µl Temed, 7,5 µl APS(40%), ad 5 ml H₂O) zusammengeführt und anschließend in einem 7,5%igem Laufgel (für 10 ml: 2,5 ml PAA(30%), 2,5 ml Separation-Puffer (1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.4% SDS, ad 300 ml ddH₂O, auf pH 8.8 mit HCl), 6 µl Temed, 15 µl APS(40%), ad 10 ml H₂O) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe der Proteine für ein bis zwei Stunden bei konstantem Stromfluss von 20 mA/Gel in einem Laufpuffer aus 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS.

Das Gel wurde im *semi-dry*-Verfahren in einem *Semi-Dry-Blotter* (Fa. BioRad) auf eine Hybond-P PVDF-Membran der Firma Amersham Bioscience transferiert. Von der Anode zur Kathode hin wurde dabei ein Stapel aus zwei Lagen Filterpapier, in Puffer A1 (0,3 M Tris, 20%MeOH) vorequiliert, einer Lage in Puffer A2 (25 mM Tris, 20% MeOH), der Membran ebenfalls in Puffer A2 vorequiliert, dem Gel im Puffer K (70 mM CAPS, pH 10,5, 10% MeOH), sowie weiteren vier Lagen in Puffer K errichtet. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² für ca. 90 Minuten.

Die Membran wurde für 60 Minuten in PBS unter Zusatz von 0,05% Tween und 5% Magermilchpulver bei leichten Bewegungen auf einem Schüttler für 60 Minuten geblockt, dann zweimal kurz in PBS/Tween gewaschen. Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran mit ca. 5ml der Blocklösung und dem gewünschten Antikörper blasenfrei eingeschweißt und über Nacht bei leichter Bewegung auf einer Wippe bei 4°C inkubiert. Der ungebundene Antikörper wurde in einem 15-minütigen und 2 5-minütigen Waschschritten in PBS/Tween entfernt. Der sekundäre Antikörper, in der Regel Anti-Hase-IgG Antikörper der Firma Dianova, wurde in einem Totalvolumen von 10 ml verdünnt (Verdünnung 1:10.000) und die Membran für eine Stunde auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein 15-minütiger und vier fünfminütige Waschschrritte. Der Nachweis der Immunfärbung geschah mit Hilfe des Systems ECL der Firma Amersham Pharmacia Biotech entsprechend den Herstellerangaben. Abschließend wurde ein Fuji-Super-RX-Film je nach Intensität des Signals für 1-20 Minuten exponiert.

5.2.3 Immunpräzipitation

Ca. $3 \cdot 10^8$ SF4-Zellen wurden in 400µl Extraktionspuffer (Endkonzentrationen: Hapes, pH7,6 30mM, KCl 250mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 1mM, NP40 0,01%, DTT 1mM, sowie Protease-Inhibitoren) resuspendiert, 45 Minuten auf Eis gestellt, bei 4°C 15 Minuten mit 15000U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteindichte bestimmt. Je 130µl wurden für vier Stunden mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. 40µl resuspendierte *Beads* (Firma Pharmacia Biotech) wurden in 1ml Extraktionspuffer ohne DTT mit 20µl BSA für zehn Minuten equilibriert und anschließend mit den Proben und 300µl Extraktionspuffer ohne DTT über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Die Präzipitate wurden dreimal im selben Puffer für je 15 Minuten gewaschen. Schließlich wurden die *Beads* in 50 µl Probenpuffer bei 90°C denaturiert und der Überstand mit den Proteinen durch *Western-Blot* analysiert.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Zelllinien

Die in der Arbeit vorwiegend benutzte Zelllinie *Drosophila* SF4 wurde uns von D. Arndt-Jovin (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Sie wurde als diploide Zelllinie in ihrem Labor aus der *Drosophila* S2 Schneider-

Zelllinie gewonnen und ist männlich. Die KC Zelllinie ist eine embryonale *Drosophila*-Zelllinie von weiblichen Pheno- und Genotyp.

Alle Zellen wurden in Schneider *Drosophila* Medium (Invitrogen), welches mit Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml), Glutamin (10%) und mit 10% fetalem Kalbserum ergänzt wurde, gehalten. Eine Ausnahme bildete hierbei die KC-Zelllinie, wo zum Teil auf den Zusatz von Kalbserum verzichtet wurde, da hierdurch die ansonsten suspendierten Zellen deutlich adhärenter wurden und so für Immunfluoreszenzverfahren zur Verfügung standen. Die Zellen wurden bei 26°C im Inkubator gehalten, tolerierten aber auch längere Temperaturabweichungen erstaunlich gut, z. B. zeigten die Zellen bei Temperaturen von 30°C zur Induktion des Hitzeschockpromotors über mehrere Zellzyklen keine Wachstumseinschränkung. Bei der Dauer eines Zellzyklus von ca. 24-30 Stunden wurden die Zellen alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:10 in neues Medium transferiert.

Für die Baculo-Virus-Expression wurden Schmetterling-Zellen (SF9) verwendet.

5.3.2 Transiente Transfektion und stabile Zelllinien

Transfektionen wurden mit Hilfe der Effectene Transfection Reagenz (Qiagen) durchgeführt. Für transiente Transfektionen wurden $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen in einer 6-Lochplatte ausgesät und am folgenden Tag mit 0,4 µg Plasmid-DNA entsprechend dem Handbuch von Qiagen transfiziert. Die Zellen wurden zwischen 24 Stunden und sechs Tagen bei 26°C gehalten und anschließend weiterverwendet. Für stabile Transfektionen wurden am Tag vor der Transfektion ca. $4 \cdot 10^6$ Zellen in einer Petrischale mit 10cm Durchmesser ausgesät. Die Transfektion wurde wieder entsprechend dem Handbuch mit 1,8 µg Plasmid-DNA und der Co-Transfektion von 0,2 µg des Plasmids pUCHsNeo [188], welches für eine Neomycin/Geneticin-Resistenz codiert, durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 1:5 gesplittet und 1 mg/ml Geneticin hinzugegeben. Nach zwei bis drei Wochen wurde die Konzentration von Geneticin auf 0,5 mg/ml gesenkt. Alle in dieser Arbeit beschriebenen stabilen Zelllinien wurden mit Geneticin selektiert. Auch wenn hierdurch eine effiziente Selektion möglich ist, könnte eine Selektion mit Hygromycin eine raschere und effizientere Selektion ergeben. Zumindest wurden in den ersten Tagen nach der Selektion mit Hygromycin eine deutlich raschere Abnahme der Zellzahl und eine höhere Anzahl positiver Zellen beobachtet. Dies gilt für eine Konzentration von 0,5 mg/ml Hygromycin. Über einen längeren Zeitraum wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Beobachtungen mit Hygromycin durchgeführt.

5.3.3 Einfrieren von Zelllinien

Für das Aufbewahren von Zelllinien wurden die Zellen in 1 ml des entsprechenden Mediums versetzt mit 10% fetalem Kalbsserum und 10% DMSO resuspendiert. Anschließend wurden sie schrittweise abgekühlt und ca. eine Stunde auf Eis gestellt. Danach wurden sie eine Stunde bei -20°C und schließlich über Nacht bei -70°C inkubiert. Die Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

5.3.4 Zellextrakt

Für den Nachweis von Proteinen mittels *Western-Blot* wurden die Zellen mit RIPA-Puffer extrahiert. Der RIPA-Puffer bestand aus 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Deoxycholat, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT sowie einem Mix aus Protease-Inhibitoren (PMSF, Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin). Für einen Gesamt-Zellextrakt für die weitere Analyse mittels Immunpräzipitation wurden die Zellen mit einem Lyse-Puffer (50 mM HEPES pH 7.6, 300 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.1% NP40, 1 mM DTT, Protease-Inhibitoren: PMSF, Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin) suspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie mit Pulsen von 15 Sekunden bei 20-25%iger Amplitude sonifiziert (Branson digital sonifier model 250-D) und für 30 Minuten bei 4°C mit 14.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die Zellextrakte wurden jeweils entweder direkt verwendet oder zur späteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

5.3.5 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz von SF4 Zellen wurden $0.5-1 \times 10^6$ Zellen auf einem Deckglas innerhalb eines hydrophoben Ringes von ca. 1,5 cm Durchmesser ausgesät. Die Zellen wurden anschließend in einer feuchten Box für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur gehalten. Für eine längere oder Übernachts-Inkubation wurden die Deckgläser in 4-well-Platten gegeben, nach einer Stunde 5 ml Medium hinzugefügt und mit Parafilm verschlossen. Vor Verwendung wurde das überstehende Medium abgezogen und die Deckgläser kurz in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2%iger Paraformaldehyd-Lösung auf Eis für 7,5 Minuten fixiert. Dann, wiederum auf Eis, für 7,5 Minuten in 1% PFA, 0,25% Triton, PBS (*phosphate buffered saline*) permeabilisiert. Nach

zweimaligem kurzem Waschen in PBS wurden die Zellen in 2%BSA, 5% Ziegen-Serum, PBS (ca. 130 μ l) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 1 Stunde geblockt. Die Blocklösung wurde abgezogen und anschließend mit dem ersten Antikörper (entsprechend in Blocklösung verdünnt, z.B. für anti-msl1 1:600) für eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden zweimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (wieder entsprechend in Blocklösung verdünnt, z.B. für Cy3-anti-Hase 1:1500) für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen (zweimal für fünf Minuten in PBS) wurde die DNA mit Hoechst 33258 (1 μ g/ μ l) oder für die konfokale Mikroskopie mit DRAQ5 (Verdünnung 1:1000) oder TO-PRO3 (Verdünnung 1:1000) für fünf Minuten in PBS gegengefärbt. Für die Betrachtung unter dem Mikroskop wurden auf die Zellen ca. 30 μ l Mounting-Lösung (1,5% N-Propyl-Gallat, 60%Glycerol, PBS) gegeben und anschließend mit einem Objektträger verschlossen.

5.3.6 Mikroskope

Für Betrachten der Zellkultur *in vivo* wurde ein Lichtmikroskop der Firma Zeiss verwendet, mit dem es auch möglich war, durch Zuschalten einer UV-Lampe das fluoreszente Signal von GFP zu beobachten. Allerdings war selbst bei absoluter Abdunkelung die Lichtausbeute relativ gering, so dass nur Zellen, die ein extrem hohes Niveau an GFP-Proteinen exprimierten, gesehen werden konnten. So konnte hiermit nur ein erster Test vorgenommen werden, ob das gewünschte Protein überhaupt exprimiert wurde. Subnukleare Lokalisation konnte hiermit nicht nachgewiesen werden.

Mit einem Zeiss Axiophot-Mikroskop wurden Zellen mit Immunfluoreszenz bei 1200facher Vergrößerung beobachtet und mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen Retiga-CCDKamera (Qimaging, Burnaby, Kanada) Bilder aufgenommen. Die verwendeten sekundären Antikörper gaben bei kurzer Belichtungszeit ein gutes Signal, für das originäre GFP-Signal waren, je nach Expressionsstärke und Lokalisation, Belichtungszeiten von einigen Sekunden bis zu zwei Minuten nötig. Die langen Belichtungszeiten führten natürlich zu einem entsprechenden Anstieg des Hintergrundrauschens.

Für *in vivo*-Aufnahmen und dynamische Untersuchungen wurde das konfokale Mikroskopsystem Zeiss LSM510 Meta verwendet. Dies wurde ebenfalls für Immunfluoreszenzen bei gewünschter schmaler Bildebene sowie für 3D-Rekonstruktionen benutzt. Alle Bilder wurden bei Umgebungstemperatur gewonnen. Die FLIP- und FRAP-Analysen wurden mit einem 63x Planapochromat Ölimmersionsobjektiv (Numerische

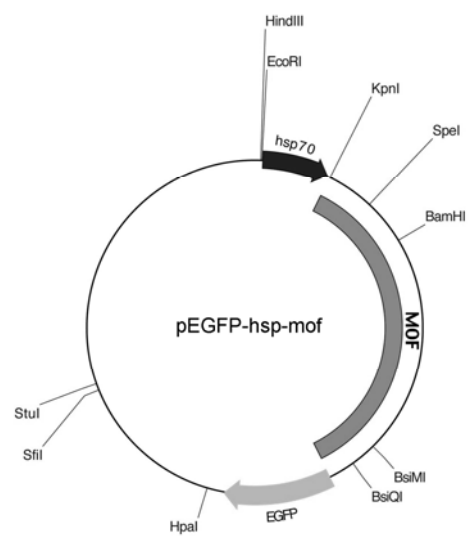
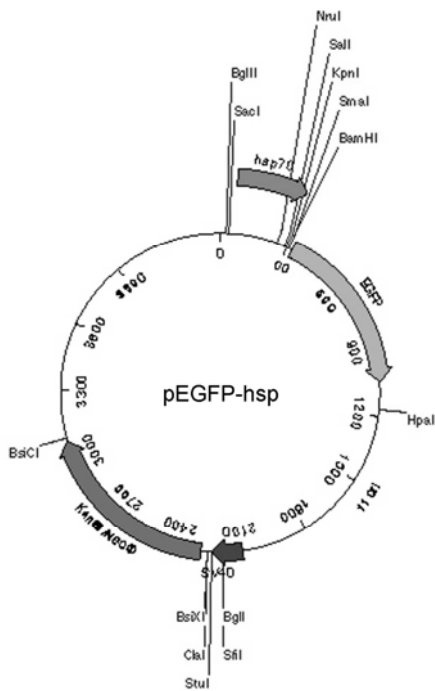
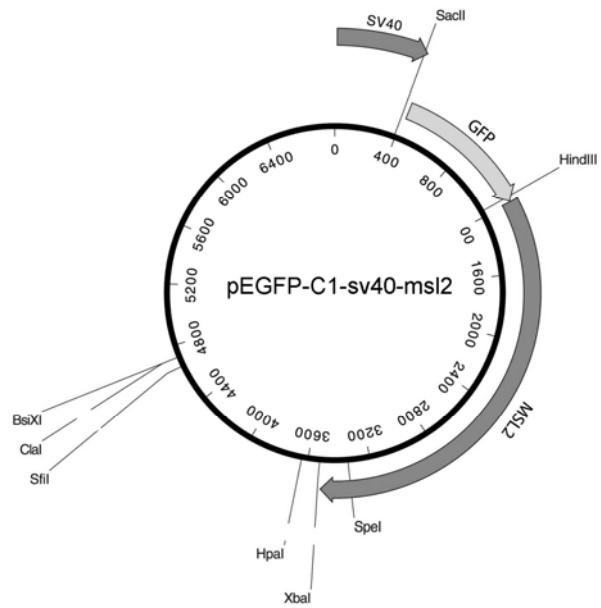
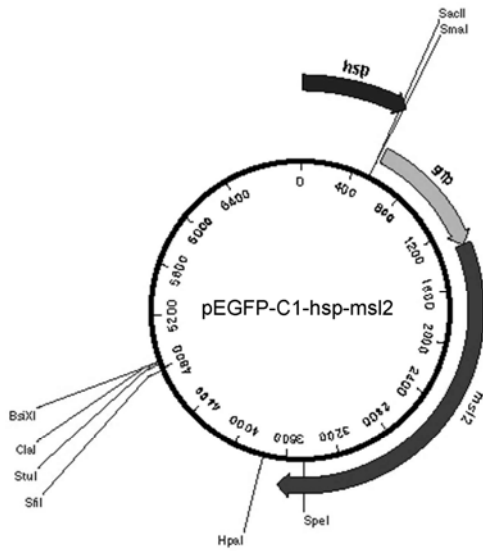
Apertur 1.4) durchgeführt, detailliertere Aufnahmen mit einem 100x Planapochromat Ölimmersionsobjektiv (Numerische Apertur 1.4), Übersichtsaufnahmen mit einem 40x Planapochromat Ölimmersionsobjektiv (Numerische Apertur 1.4). Die Energie des Lasers war für die Aufnahmen möglichst niedrig gehalten, um unerwünschte Bleich-Effekte so zu minimieren. Typischerweise lagen sie zwischen 1 und 2mW, was immer noch einen Photobleicheffekt während der Aufnahmen verursachte, so dass idealerweise eine noch kleinere Energie gewählt werden sollte [55]. Für noch kleinere Energien war die Intensität des GFP-Signals jedoch nicht ausreichend. Als Ausgleich für die geringe Energie wurde die Verstärkung der emittierten Strahlung relativ hoch gewählt und lag typischerweise im Bereich von 800-850, so hoch, dass Rauscheffekte noch nicht störend wirkten. Der Zoomfaktor des Mikroskops wurde tendenziell niedriger gewählt, da der auftretende Photobleicheffekt proportional zum Quadrat des Zoomfaktors ansteigt. Also wurde in der Regel eine 63fache an Stelle der 100fachen Vergrößerung gewählt. Ein weiterer Kompromiss musste in der Länge der Dauer der Belichtung gefunden werden, da hier ebenfalls eine zu lange Belichtung zu starken Bleich-Effekten führte. So wurde die Belichtungszeit pro Pixel so niedrig, wie es für die Intensität des Signals möglich war, gehalten. Indirekt wurde diese auch durch die eingestellte Mittelung, und damit die Qualität der Auflösung, beeinflusst. Für immunfixierte Zellen für das Signal der sekundären Antikörper wurde in der Regel der Faktor 8 gewählt, für das GFP-Signal der Faktor 2 oder 4, für das GFP-Signal in den FLIP- und FRAP-Messreihen der Faktor 2. Für die Bleichpulse bei den FLIP- und FRAP-Experimenten wurden bei einer Energie von 22,5mW in fünf Schritten durchgeführt. Die Quantifizierung der Daten erfolgte mit Image J. Die Berechnung erfolgte für die FLIP- und FRAP-Experimente etwas anders. Im Falle der FRAP-Experimente wurde die Intensität im Bleichareal gemessen und zur Gesamtintensität der Zelle zum jeweiligen Zeitpunkt in Relation gesetzt. Bei den FLIP-Experimenten wurde jeweils in den gezeigten Arealen, einmal im Nukleoplasma und einmal in der Region des Fluoreszenzmaximums, die Gesamtintensität bestimmt und in Relation zu der Gesamtintensität einer benachbarten Zelle gesetzt, um den Bleacheffekt durch die Aufnahme zu eliminieren. Die gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel weiterverarbeitet.

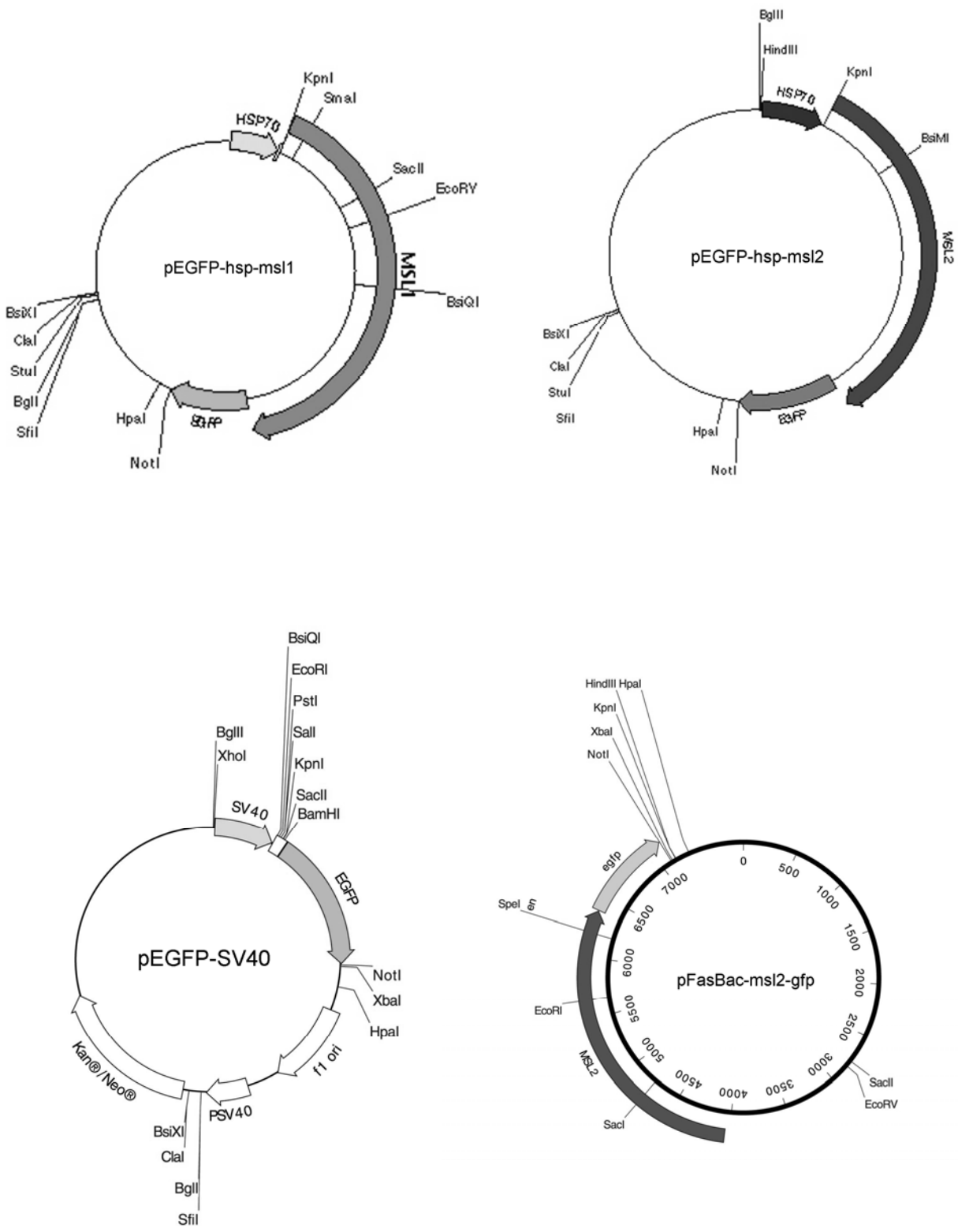
Die gezeigten Bilder wurden mit Adobe Photoshop 7 sowie Adobe Illustrator 10 weiter bearbeitet.

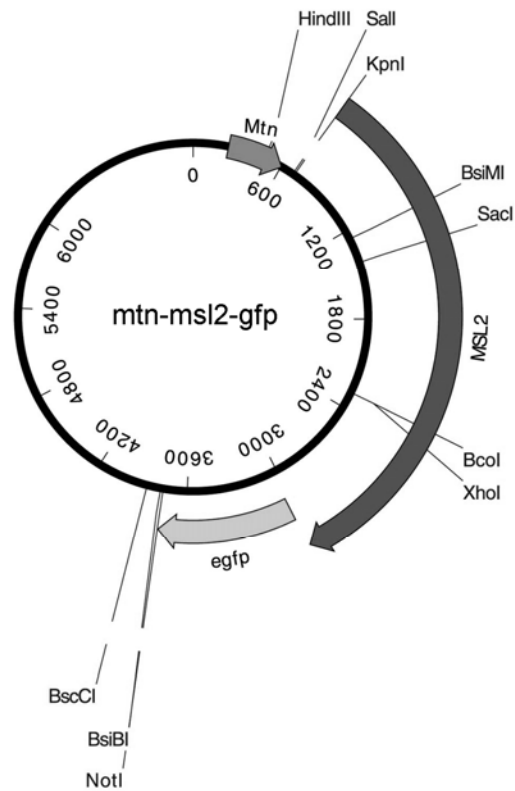
6 Anhang

6.1 Plasmide

Im Folgenden Kapitel sind schematische Karten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit einigen ausgewählten Restriktionsenzymen dargestellt. Die Konstruktion der Plasmide findet sich in Kapitel 5.1.2.







6.2 Sequenzen

6.2.1 Sequenz von MSL2

```

                                     30                               60
ATGCCCCAGACGGCATACTTGAAGGTGACACGCATCGCGATGCGCTCCGCTTCGAATCTT
M A Q T A Y L K V T R I A M R S A S N L

                                     90                               120
TCCAAACGGCGGGTGGAGGAGCTGAACTCCGGGCTCGGCGAGCTACGGCAGCTGCTGTCT
S K R R V E E L N S G L G E L R Q L L S

                                     150                              180
TGCGTGGTCTGCTGCCAGCTGCTGGTGGATCCCTACTCGCCCAAGGGCAAGCGGTGCCAG
C V V C C Q L L V D P Y S P K G K R C Q

                                     210                              240
CACAACGTGTGCCGGCTGTGTCTGCGCGGTAAGAAGCATCTGTTTCCCAGCTGCACCCAG
H N V C R L C L R G K K H L F P S C T Q

                                     270                              300
TGCGAGGGTTGCTCCGACTTCAAGACCTACGAGGAGAACCGTATGATGGCCGCCAGCTA
C E G C S D F K T Y E E N R M M A A Q L

                                     330                              360
CTGTGCTACAAGACGCTGTGCGTCCACCTGCTCCACTCGGCATTATTTGGTGAGCTGGCC
L C Y K T L C V H L L H S A L F G E L A

```

390 420
GGGATGCGGCCCCAGGTGGCCAGGGAGCTGGTGCCTCGCATCAAGCTGCCTCCCAAACCC
G M R P Q V A R E L V P R I K L P P K T

450 480
ACACAGGAGTTCATTTCGCGAGGGCTCAAACATCTCCGACACTTTTGACATCTTTCTGCC
T Q E F I R E G S N I S D T F D I F L P

510 540
CAGCCGGATTTGCCGTTCTCAAGGACATGCCACATCGCTGCCCGCAGAGACGCCGCCT
Q P D L P F L K D M P T S L P A E T P P

570 600
ACGTCGGCGGTCACGACTCCGGAAGTGCCTATGATCACCACCTCAACATCAGCGACATT
T S A V T T P E L P Y D H H L N I S D I

630 660
GAGGCGGAGGCGGCGGCCACAGCGGAGCAGGGTCACTTCTCGCCGCTTCCCCTGCTGCC
E A E A A A T A E Q G H F S P L P L L P

690 720
ACAGGATCTCGCATGGGCATGCTCTCTCACGCCGGCAAATAGTCATTGCCACCGAGAGC
T G S R M G M L S H A G Q I V I A T E S

750 780
TCGGAGTCGGGCTTCATGGACCAAGCGTGGACGGATCAGGTAGACCTGTCTGGCACGGTT
S E S G F M D Q A W T D Q V D L S G T V

810 840
TCGGTGTCCAAATACACAAATAGCGGCAACAACCTTTGCTGTCTCCTACGTGATGCCCACT
S V S K Y T N S G N N F A V S Y V M P T

870 900
TCTGCGACCACGAAGTTCGATCCACAGGAAGTGCAAATCGGCCAGGTGGTGCAAATGGCG
S A T T K F D P Q E L Q I G Q V V Q M A

930 960
GACTCCACTCAGTTGGCTGTGCTGGCTGCCGTTGAGGAGACCGTCGAGACGTCCACACAG
D S T Q L A V L A A V E E T V E T S T Q

990 1020
TTGACTGTGCTCTCCACCACCGTTGAAGAGACCGTTGAAACATCCACGCAGCTAGAAGTG
L T V L S T T V E E T V E T S T Q L E V

1050 1080
CTTACCTCCGCTGAGGAACCCAACGAAATCTCTGATCAATTGGCTAATCTGCAAGTTGAG
L T S A E E P N E I S D Q L A N L Q V E

1110 1140
GAATCTGATGAGGCTCTGGTTGAAGAGACCGTTGAAGAGGCCGAAGGGACCTCAATCCCG
E S D E A L V E E T V E E A E G T S I P

1170 1200
TCAGAGGTTGTAGCTGAGCACATGGAGGAGGATCAACACTTGGATGTGCACACTTCACAG
S E V V A E H M E E D Q H L D V H T S Q

1230 1260
TCACCTACACAAACCGAAATGGAGGAAGCAGTGGAGGAGCATGTTGCCACAAAAACACAA
S P T Q T E M E E A V E E H V A T K T Q

1290 1320
TTGGGTCATGTGCAAACAGAATTGCAGGATGCGGAGTCGTTGCAGAAAGATTTTGAGGAC
L G H V Q T E L Q D A E S L Q K D F E D

1350 1380
GCAAAGGCAGCGGCTGAAGAGGCGAAGGAGAAGGAGAAGGACCTGCACGCAATCAGTGCT
A K A A A E E A K E K E K D L H A I S A

1410 1440
GAGCTGCAGAAGGAGGACAGTGACGAGCCAACTTAAGCGAAAGAGAACCCGTACTCTC
E L Q K E D S D E P T L K R K R T R T L

1470 1500
AAAGCGTCACAAGCTGCCAAAATTGAGCCTGTACCGTCTGAGGTCAAGACTAAAGTGCAA
K A S Q A A K I E P V P S E V K T K V Q

1530 1560
TCTGGAAAGGGCGCTCTTCGCAGGATTCGGGGCAAGGACAAGGAGGAAAAGGTGAAGCCT
S G K G A L R R I R G K D K E E K V K P

1590 1620
CCGAAGCCGAAGTGCCGCTGCGGTATCTCCGGCTCGAGCAATACCCTCACCACCTGCCGG
P K P K C R C G I S G S S N T L T T C R

1650 1680
AATTCCTGATGTCCTTGCTACAAGAGTTACAACAGCTGTGCCGGGTGTCATTGCGTGTGC
N S R C P C Y K S Y N S C A G C H C V C

1710 1740
TGCAAGAATCCGCACAAGGAGGACTACGTTGAAAGTGATGAGGACGATGATTTGGAGGAT
C K N P H K E D Y V E S D E D D D L E D

1770 1800
TTCGAAATGCCGAAGGACGTTCCAGAGCCGATGACTCAGTCGGAGGAGCCGGTGGTAGCT
F E M P K D V P E P M T Q S E E P V V A

1830 1860
GAGCCTAGGCAGGAGGAGAACAGTATGGCGCCGCCAGACTCTTCTGCCCCATAAGCCTA
E P R Q E E N S M A P P D S S A P I S L

1890 1920
GTGCCGCTAAATAATTTGCAGCAATCCCAGCATCCTTTGGTGCTTGTTTCAGAATGAGAAA
V P L N N L Q Q S Q H P L V L V Q N E K

1950 1980
GGCGAGTACCAGGGCTTCAATATCTTCCAGGGCAGCAAGCCCCTTGATCCGGTCACCGTT
G E Y Q G F N I F Q G S K P L D P V T V

2010 2040
GGCTTCACTATTCGTGTCCAGCTGCAGCACACCGATGGCTTCGGTTCCTTCCCCAGTAT
G F T I R V Q L Q H T D G F G S L P Q Y

20702100

GCTTATATAATGCCAACAATTGACCCGCCGAATCCACCAGCTCCATCACTTTTCGCCACCA
 A Y I M P T I D P P N P P A P S L S P P

21302160

CCGCCTCCTGCTCCTGACAGGGAAGTCATCGAGCCACCGGCCAAGAAATTCAGGACCAGT
 P P P A P D R E V I E P P A K K F R T S

21902220

CGAACACGCCGAGGAAGGGCCAACCTTCTCGGCCCTCGACACGGTGGATGAGCTTGTCAGT
 R T R R G R A N F S A L D T V D E L V S

22502280

GGCGGATCCAGGAGCAATTCTGCCGCTGGCGACAGATCATCGGCCACTGACAATGCCCAT
 G G S R S N S A A G D R S S A T D N A H

2310

TCACTGTTTCGAGGAGATCATGTCTGGGCTCGGATGACTTGCCACCGGTCGGGATC
 S L F E E I M S G S D D L P P V G I

6.2.2 Primer

Folgende Primer wurde in dieser Arbeit für Sequenzierungen und Konierungen benutzt:

Primer	Sequenz
msl22422.rv	TCT CAT TCT GAA CAA GCA CC
MSL2.fw	CGC GGT ACC ATG GCC CAG ACG GCA
MSL2.rv	CCC GAC CGG TGG CAA GTC ATC CGA GCC CGA
KpnEGFP.fw	GGG GTA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AG
KpnEGFP.rv	CCG GTA CCC TTG TAC AGC TCG TCC ATG CC
EGFP-C	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G
EGFP-N	CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G
gfpmsl2_821.fw	CGA ATC TTT CCA AAC GGC GG
gfpmsl2_1037.rv	TAG GTC TTG AAG TCG GAG CAA CCC
msl1_170.rv	TGT CCT CCA CGA CCA TTG
msl1.fw	CGC GGT ACC ATG GAC AAG CGA TTC AAG TGG
msl1.rv	CCC GAC CGG TGG ACG ATT CTT CTG GCG CTT GC
mof.fw	CGC GGT ACC ATG TCT GAA GCG GAG CT
mof.rv	CCC GAC CGG TGC GCC GGA ATT TCC CGG A
mtn.fw	CCC GGG CCC AAT ACG CAA ACC GCC TCT C
msl21483.rv	TGG TGG AGA GCA CAG TCA AC
msl22059.rv	CAC CTT TTC CTC CTT GTC C
msl22422.rv	TCT CAT TCT GAA CAA GCA CC
msl2984.rv	GGG CAG AAA GAT GTC AAA AG

Für die Reklonierung von MSL2 wurde für die reverse Transkriptase der Primer msl22422.rv verwendet. Die anschließende PCR wurde mit den Primern msl22422.rv sowie MSL2.fw durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

1. Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh PB, Reuter G, Jenuwein T: **Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31.** *EMBO J.* 1999, **18**:1923-1938.
2. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, et al: **The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.** *Science* 2000, **287**:2185-2195.
3. Ahmad K, Henikoff S: **Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*.** *Cell* 2001, **104**:839-847.
4. Akhtar A: **Dosage compensation: an intertwined world of RNA and chromatin remodelling.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2003, **13**:161-169.
5. Akhtar A, Becker PB: **Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*.** *Mol.Cell* 2000, **5**:367-375.
6. Akhtar A, Becker PB: **Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*.** *Mol.Cell* 2000, **5**:367-375.
7. Akhtar A, Becker PB: **The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition.** *EMBO Rep.* 2001, **2**:113-118.
8. Akhtar A, Zink D, Becker PB: **Chromodomains are protein-RNA interaction modules.** *Nature* 2000, **407**:405-409.
9. Angelichio ML, Beck JA, Johansen H, Ivey-Hoyle M: **Comparison of several promoters and polyadenylation signals for use in heterologous gene expression in cultured *Drosophila* cells.** *Nucleic Acids Res.* 1991, **19**:5037-5043.
10. Avner P, Heard E: **X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation.** *Nat.Rev.Genet.* 2001, **2**:59-67.
11. Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW: **Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics.** *Biophys.J.* 1976, **16**:1055-1069.
12. Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T: **Histone methylation: dynamic or static?** *Cell* 2002, **109**:801-806.
13. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T: **Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain.** *Nature* 2001, **410**:120-124.
14. Bartolomei MS, Tilghman SM: **Genomic imprinting in mammals.** *Annu.Rev.Genet.* 1997, **31**:493-525.
15. Bashaw GJ, Baker BS: **The *msl-2* dosage compensation gene of *Drosophila* encodes a putative DNA-binding protein whose expression is sex specifically regulated by *Sex-lethal*.** *Development* 1995, **121**:3245-3258.
16. Bashaw GJ, Baker BS: **Dosage compensation and chromatin structure in *Drosophila*.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1996, **6**:496-501.
17. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP: **Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia.** *Adv.Cancer Res.* 1998, **72**:141-196.

18. Becker M, Baumann C, John S, Walker DA, Vigneron M, McNally JG, Hager GL: **Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells.** *EMBO Rep.* 2002, **3**:1188-1194.
19. Becker PB, Horz W: **ATP-dependent nucleosome remodeling.** *Annu.Rev.Biochem.* 2002, **71**:247-273.
20. Belote JM, Lucchesi JC: **Control of X chromosome transcription by the maleless gene in Drosophila.** *Nature* 1980, **285**:573-575.
21. Belote JM, Lucchesi JC: **Male-specific lethal mutations of Drosophila melanogaster.** *Genetics* 1980, **96**:165-186.
22. Berger SL: **Histone modifications in transcriptional regulation.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2002, **12**:142-148.
23. Bernardis A, Hariharan IK: **Of flies and men--studying human disease in Drosophila.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2001, **11**:274-278.
24. Bird A: **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** *Genes Dev.* 2002, **16**:6-21.
25. Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS, Wang W, Kashanchi F, Shiekhattar R: **BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer.** *Cell* 2000, **102**:257-265.
26. Boisvert FM, Kruhlak MJ, Box AK, Hendzel MJ, Bazett-Jones DP: **The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body.** *J.Cell Biol.* 2001, **152**:1099-1106.
27. Bokman SH, Ward WW: **Renaturation of Aequorea gree-fluorescent protein.** *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1981, **101**:1372-1380.
28. Bone JR, Lavender J, Richman R, Palmer MJ, Turner BM, Kuroda MI: **Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in Drosophila.** *Genes Dev.* 1994, **8**:96-104.
29. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal.Biochem.* 1976, **72**:248-254.
30. Brockdorff N: **X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RNA.** *Trends Genet.* 2002, **18**:352-358.
31. Bunch TA, Grinblat Y, Goldstein LS: **Characterization and use of the Drosophila metallothionein promoter in cultured Drosophila melanogaster cells.** *Nucleic Acids Res.* 1988, **16**:1043-1061.
32. Buscaino A, Kocher T, Kind JH, Holz H, Taipale M, Wagner K, Wilm M, Akhtar A: **MOF-regulated acetylation of MSL-3 in the Drosophila dosage compensation complex.** *Mol.Cell* 2003, **11**:1265-1277.
33. Caceres JF, Misteli T, Sreaton GR, Spector DL, Krainer AR: **Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity.** *J.Cell Biol.* 1997, **138**:225-238.
34. Carrero G, McDonald D, Crawford E, de Vries G, Hendzel MJ: **Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins.** *Methods* 2003, **29**:14-28.
35. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* 1994, **263**:802-805.
36. Chen D, Huang S: **Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells.** *J.Cell Biol.* 2001, **153**:169-176.

37. Cheng SW, Davies KP, Yung E, Beltran RJ, Yu J, Kalpana GV: **c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function.** *Nat.Genet.* 1999, **22**:102-105.
38. Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T: **Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding.** *Science* 2003, **299**:721-725.
39. Christensen MO, Barthelme HU, Feineis S, Knudsen BR, Andersen AH, Boege F, Mielke C: **Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerase I.** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:15661-15665.
40. Chubb JR, Boyle S, Perry P, Bickmore WA: **Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells.** *Curr.Biol.* 2002, **12**:439-445.
41. Cline TW, Meyer BJ: **Vive la difference: males vs females in flies vs worms.** *Annu.Rev.Genet.* 1996, **30**:637-702.
42. Cockell M, Gasser SM: **Nuclear compartments and gene regulation.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1999, **9**:199-205.
43. Cohen DE, Lee JT: **X-chromosome inactivation and the search for chromosome-wide silencers.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2002, **12**:219-224.
44. Cole NB, Smith CL, Sciaky N, Terasaki M, Edidin M, Lippincott-Schwartz J: **Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells.** *Science* 1996, **273**:797-801.
45. Copps K, Richman R, Lyman LM, Chang KA, Rampersad-Ammons J, Kuroda MI: **Complex formation by the Drosophila MSL proteins: role of the MSL2 RING finger in protein complex assembly.** *EMBO J.* 1998, **17**:5409-5417.
46. Cremer T, Cremer C: **Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells.** *Nat.Rev.Genet.* 2001, **2**:292-301.
47. Cremer T, Kreth G, Koester H, Fink RH, Heintzmann R, Cremer M, Solovei I, Zink D, Cremer C: **Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture.** *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 2000, **10**:179-212.
48. Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T: **Histone deimination antagonizes arginine methylation.** *Cell* 2004, **118**:545-553.
49. Czermin B, Schotta G, Hulsman BB, Brehm A, Becker PB, Reuter G, Imhof A: **Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila.** *EMBO Rep.* 2001, **2**:915-919.
50. Daigle N, Beaudouin J, Hartnell L, Imreh G, Hallberg E, Lippincott-Schwartz J, Ellenberg J: **Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells.** *J.Cell Biol.* 2001, **154**:71-84.
51. Demakova OV, Kotlikova IV, Gordadze PR, Alekseyenko AA, Kuroda MI, Zhimulev IF: **The MSL complex levels are critical for its correct targeting to the chromosomes in Drosophila melanogaster.** *Chromosoma* 2003, **112**:103-115.
52. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM: **Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain.** *Nature* 1999, **399**:491-496.
53. Dhordain P, Lin RJ, Quief S, Lantoine D, Kerckaert JP, Evans RM, Albagli O: **The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression.** *Nucleic Acids Res.* 1998, **26**:4645-4651.
54. Eisen A, Utley RT, Nourani A, Allard S, Schmidt P, Lane WS, Lucchesi JC, Cote J: **The yeast NuA4 and Drosophila MSL complexes contain homologous**

- subunits important for transcription regulation. *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:3484-3491.**
55. Ellenberg J, Lippincott-Schwartz J: **Dynamics and mobility of nuclear envelope proteins in interphase and mitotic cells revealed by green fluorescent protein chimeras.** *Methods* 1999, **19**:362-372.
56. Ellenberg J, Siggia ED, Moreira JE, Smith CL, Presley JF, Worman HJ, Lippincott-Schwartz J: **Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis.** *J.Cell Biol.* 1997, **138**:1193-1206.
57. Essers J, Houtsmuller AB, van Veelen L, Paulusma C, Nigg AL, Pastink A, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Kanaar R: **Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage.** *EMBO J.* 2002, **21**:2030-2037.
58. Fang J, Feng Q, Ketel CS, Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Simon JA, Zhang Y: **Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase.** *Curr.Biol.* 2002, **12**:1086-1099.
59. Fang S, Lorick KL, Jensen JP, Weissman AM: **RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer.** *Semin.Cancer Biol.* 2003, **13**:5-14.
60. Feinberg AP: **DNA methylation, genomic imprinting and cancer.** *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000, **249**:87-99.
61. Festenstein R, Pagakis SN, Hiragami K, Lyon D, Verreault A, Sekkali B, Kioussis D: **Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells.** *Science* 2003, **299**:719-721.
62. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S: **Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains.** *Genes Dev.* 2003, **17**:1870-1881.
63. Flaus A, Owen-Hughes T: **Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2001, **11**:148-154.
64. Fletcher TM, Hansen JC: **The nucleosomal array: structure/function relationships.** *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 1996, **6**:149-188.
65. Franke A, Baker BS: **The rox1 and rox2 RNAs are essential components of the compensasome, which mediates dosage compensation in Drosophila.** *Mol.Cell* 1999, **4**:117-122.
66. Fushimi K, Verkman AS: **Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry.** *J.Cell Biol.* 1991, **112**:719-725.
67. Gall JG: **Cajal bodies: the first 100 years.** *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 2000, **16**:273-300.
68. Ganesan S, Silver DP, Greenberg RA, Avni D, Drapkin R, Miron A, Mok SC, Randrianarison V, Brodie S, Salstrom J, Rasmussen TP, Klimke A, Marrese C, Marahrens Y, Deng CX, Feunteun J, Livingston DM: **BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome.** *Cell* 2002, **111**:393-405.
69. Gerlich D, Beaudouin J, Kalbfuss B, Daigle N, Eils R, Ellenberg J: **Global chromosome positions are transmitted through mitosis in mammalian cells.** *Cell* 2003, **112**:751-764.
70. Gerlich D, Ellenberg J: **Dynamics of chromosome positioning during the cell cycle.** *Curr.Opin.Cell Biol.* 2003, **15**:664-671.

71. Germond JE, Hirt B, Oudet P, Gross-Bellark M, Chambon P: **Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1975, **72**:1843-1847.
72. Giles RH, Peters DJ, Breuning MH: **Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease.** *Trends Genet.* 1998, **14**:178-183.
73. Gilfillan GD, Dahlsveen IK, Becker PB: **Lifting a chromosome: dosage compensation in *Drosophila melanogaster*.** *FEBS Lett.* 2004, **567**:8-14.
74. Griffis ER, Altan N, Lippincott-Schwartz J, Powers MA: **Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics.** *Mol.Biol.Cell* 2002, **13**:1282-1297.
75. Gu W, Szauter P, Lucchesi JC: **Targeting of MOF, a putative histone acetyl transferase, to the X chromosome of *Drosophila melanogaster*.** *Dev.Genet.* 1998, **22**:56-64.
76. Gu W, Wei X, Pannuti A, Lucchesi JC: **Targeting the chromatin-remodeling MSL complex of *Drosophila* to its sites of action on the X chromosome requires both acetyl transferase and ATPase activities.** *EMBO J.* 2000, **19**:5202-5211.
77. Hager GL, Elbi C, Becker M: **Protein dynamics in the nuclear compartment.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2002, **12**:137-141.
78. Hansen JC: **Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions.** *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 2002, **31**:361-392.
79. Hayes JJ, Hansen JC: **Nucleosomes and the chromatin fiber.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2001, **11**:124-129.
80. Heim R, Prasher DC, Tsien RY: **Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994, **91**:12501-12504.
81. Helfand SL, Rogina B: **Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*.** *Annu.Rev.Genet.* 2003, **37**:329-348.
82. Heun P, Laroche T, Shimada K, Furrer P, Gasser SM: **Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus.** *Science* 2001, **294**:2181-2186.
83. Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Pannuti A, Lucchesi JC: **mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*.** *EMBO J.* 1997, **16**:2054-2060.
84. Houtsmuller AB, Rademakers S, Nigg AL, Hoogstraten D, Hoeijmakers JH, Vermeulen W: **Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells.** *Science* 1999, **284**:958-961.
85. Imhof A: **Histone modifications: an assembly line for active chromatin?** *Curr.Biol.* 2003, **13**:R22-R24.
86. Inouye S, Tsuji FI: **Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein.** *FEBS Lett.* 1994, **341**:277-280.
87. James TC, Elgin SC: **Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene.** *Mol.Cell Biol.* 1986, **6**:3862-3872.
88. Jenuwein T, Allis CD: **Translating the histone code.** *Science* 2001, **293**:1074-1080.
89. Jin Y, Wang Y, Johansen J, Johansen KM: **JIL-1, a chromosomal kinase implicated in regulation of chromatin structure, associates with the male**

- specific lethal (MSL) dosage compensation complex. *J.Cell Biol.* 2000, **149**:1005-1010.**
90. Johansen H, van der SA, Sweet R, Otto E, Maroni G, Rosenberg M: **Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibitory oncogene product in Drosophila Schneider cells.** *Genes Dev.* 1989, **3**:882-889.
 91. JOHNSON FH, SHIMOMURA O, SAIGA Y: **Action of cyanide on Cypridina luciferin.** *J.Cell Comp Physiol* 1962, **59**:265-272.
 92. Jones PA, Baylin SB: **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** *Nat.Rev.Genet.* 2002, **3**:415-428.
 93. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP: **Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.** *Nat.Genet.* 1998, **19**:187-191.
 94. Kanda T, Sullivan KF, Wahl GM: **Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells.** *Curr.Biol.* 1998, **8**:377-385.
 95. Kelley RL, Kuroda MI: **Noncoding RNA genes in dosage compensation and imprinting.** *Cell* 2000, **103**:9-12.
 96. Kelley RL, Meller VH, Gordadze PR, Roman G, Davis RL, Kuroda MI: **Epigenetic spreading of the Drosophila dosage compensation complex from roX RNA genes into flanking chromatin.** *Cell* 1999, **98**:513-522.
 97. Kelley RL, Solovyeva I, Lyman LM, Richman R, Solovyev V, Kuroda MI: **Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in Drosophila.** *Cell* 1995, **81**:867-877.
 98. Kimura H, Cook PR: **Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B.** *J.Cell Biol.* 2001, **153**:1341-1353.
 99. Kirschmann DA, Lininger RA, Gardner LM, Seftor EA, Odero VA, Ainsztein AM, Earnshaw WC, Wallrath LL, Hendrix MJ: **Down-regulation of HP1H α expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer.** *Cancer Res.* 2000, **60**:3359-3363.
 100. Knippers R: **Molekulare Genetik.** 2001.
 101. Kruhlak MJ, Lever MA, Fischle W, Verdin E, Bazett-Jones DP, Hendzel MJ: **Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments.** *J.Cell Biol.* 2000, **150**:41-51.
 102. Larsson J, Svensson MJ, Stenberg P, Makitalo M: **Painting of fourth in genus Drosophila suggests autosome-specific gene regulation.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, **101**:9728-9733.
 103. Lawrence PA, Morata G: **Developmental biology. Lighting up Drosophila.** *Nature* 1992, **356**:107-108.
 104. Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP: **A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA.** *Cell* 1993, **72**:73-84.
 105. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH: **A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei.** *Cell* 1992, **71**:865-873.
 106. Lever MA, Th'ng JP, Sun X, Hendzel MJ: **Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells.** *Nature* 2000, **408**:873-876.
 107. Lillemeier BF, Koster M, Kerr IM: **STAT1 from the cell membrane to the DNA.** *EMBO J.* 2001, **20**:2508-2517.

108. Lucchesi JC: **Dosage compensation in *Drosophila* and the "complex" world of transcriptional regulation.** *Bioessays* 1996, **18**:541-547.
109. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**:251-260.
110. Lyman LM, Copps K, Rastelli L, Kelley RL, Kuroda MI: ***Drosophila* male-specific lethal-2 protein: structure/function analysis and dependence on MSL-1 for chromosome association.** *Genetics* 1997, **147**:1743-1753.
111. LYON MF: **Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.).** *Naturwissenschaften* 1961, **190**:372-373.
112. Mahlknecht U, Hoelzer D: **Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease.** *Mol.Med.* 2000, **6**:623-644.
113. Maison C, Almouzni G: **HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2004, **5**:296-304.
114. Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, Lachner M, Jenuwein T, Almouzni G: **Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component.** *Nat.Genet.* 2002, **30**:329-334.
115. Marin I: **Evolution of chromatin-remodeling complexes: comparative genomics reveals the ancient origin of "novel" compensasome genes.** *J.Mol.Evol.* 2003, **56**:527-539.
116. Marin I, Baker BS: **Origin and evolution of the regulatory gene male-specific lethal-3.** *Mol.Biol.Evol.* 2000, **17**:1240-1250.
117. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK: **Histone deacetylases and cancer: causes and therapies.** *Nat.Rev.Cancer* 2001, **1**:194-202.
118. Martins SB, Eide T, Steen RL, Jahnsen T, Skalhegg BS, Collas P: **HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics.** *J.Cell Sci.* 2000, **113 Pt 21**:3703-3713.
119. Mason PJ, Torok I, Kiss I, Karch F, Udvardy A: **Evolutionary implications of a complex pattern of DNA sequence homology extending far upstream of the hsp70 genes at loci 87A7 and 87C1 in *Drosophila melanogaster*.** *J.Mol.Biol.* 1982, **156**:21-35.
120. McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL: **The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells.** *Science* 2000, **287**:1262-1265.
121. Meehan RR, Lewis JD, Bird AP: **Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA.** *Nucleic Acids Res.* 1992, **20**:5085-5092.
122. Meller VH: **Initiation of dosage compensation in *Drosophila* embryos depends on expression of the roX RNAs.** *Mech.Dev.* 2003, **120**:759-767.
123. Meller VH, Gordadze PR, Park Y, Chu X, Stuckenholz C, Kelley RL, Kuroda MI: **Ordered assembly of roX RNAs into MSL complexes on the dosage-compensated X chromosome in *Drosophila*.** *Curr.Biol.* 2000, **10**:136-143.
124. Meller VH, Rattner BP: **The roX genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex.** *EMBO J.* 2002, **21**:1084-1091.
125. Meller VH, Wu KH, Roman G, Kuroda MI, Davis RL: **roX1 RNA paints the X chromosome of male *Drosophila* and is regulated by the dosage compensation system.** *Cell* 1997, **88**:445-457.

126. Meyer BJ, Casson LP: **Caenorhabditis elegans compensates for the difference in X chromosome dosage between the sexes by regulating transcript levels.** *Cell* 1986, **47**:871-881.
127. Misteli T: **Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression.** *Science* 2001, **291**:843-847.
128. Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT: **Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells.** *Nature* 2000, **408**:877-881.
129. Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT: **Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells.** *Nature* 2000, **408**:877-881.
130. Moir RD, Yoon M, Khuon S, Goldman RD: **Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells.** *J. Cell Biol.* 2000, **151**:1155-1168.
131. Moore T, Haig D: **Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war.** *Trends Genet.* 1991, **7**:45-49.
132. Morales V, Straub T, Neumann MF, Mengus G, Akhtar A, Becker PB: **Functional integration of the histone acetyltransferase MOF into the dosage compensation complex.** *EMBO J.* 2004, **23**:2258-2268.
133. Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M: **Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha.** *EMBO Rep.* 2002, **3**:975-981.
134. Mukherjee AS, Beermann W: **Synthesis of ribonucleic acid by the X-chromosomes of Drosophila melanogaster and the problem of dosage compensation.** *Nature* 1965, **207**:785-786.
135. Murata T, Kurokawa R, Kronen A, Tatsumi K, Ishii M, Taki T, Masuno M, Ohashi H, Yanagisawa M, Rosenfeld MG, Glass CK, Hayashi Y: **Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome.** *Hum.Mol.Genet.* 2001, **10**:1071-1076.
136. Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B: **Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins.** *Mol.Cell* 1999, **4**:529-540.
137. Neal KC, Pannuti A, Smith ER, Lucchesi JC: **A new human member of the MYST family of histone acetyl transferases with high sequence similarity to Drosophila MOF.** *Biochim.Biophys.Acta* 2000, **1490**:170-174.
138. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A: **MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex.** *Nat.Genet.* 1999, **23**:58-61.
139. Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R: **Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins.** *Mol.Cell* 2001, **7**:729-739.
140. Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D: **Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation.** *Genes Dev.* 2002, **16**:479-489.
141. Oh H, Park Y, Kuroda MI: **Local spreading of MSL complexes from roX genes on the Drosophila X chromosome.** *Genes Dev.* 2003, **17**:1334-1339.
142. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: **DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.** *Cell* 1999, **99**:247-257.

143. Olsen MK, Rockenbach SK, Fischer HD, Hoogerheide JG, Tomich CS: **Stable production of an analog of human tissue plasminogen activator from cultured *Drosophila* cells.** *Cytotechnology* 1992, **10**:157-167.
144. Olson MO, Dunder M, Szebeni A: **The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities.** *Trends Cell Biol.* 2000, **10**:189-196.
145. Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ: **Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.** *Science* 1996, **273**:1392-1395.
146. Orphanides G, Reinberg D: **A unified theory of gene expression.** *Cell* 2002, **108**:439-451.
147. Ostlund C, Ellenberg J, Hallberg E, Lippincott-Schwartz J, Worman HJ: **Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein.** *J.Cell Sci.* 1999, **112 (Pt 11)**:1709-1719.
148. Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P, Travers AA: **The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase *gcn5p*.** *EMBO J.* 2000, **19**:6141-6149.
149. Paddock SW: **Principles and practices of laser scanning confocal microscopy.** *Mol.Biotechnol.* 2000, **16**:127-149.
150. Palmer MJ, Mergner VA, Richman R, Manning JE, Kuroda MI, Lucchesi JC: **The male-specific lethal-one (*msh-1*) gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel protein that associates with the X chromosome in males.** *Genetics* 1993, **134**:545-557.
151. Palmer MJ, Richman R, Richter L, Kuroda MI: **Sex-specific regulation of the male-specific lethal-1 dosage compensation gene in *Drosophila*.** *Genes Dev.* 1994, **8**:698-706.
152. Pannuti A, Lucchesi JC: **Recycling to remodel: evolution of dosage-compensation complexes.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2000, **10**:644-650.
153. Parada L, Misteli T: **Chromosome positioning in the interphase nucleus.** *Trends Cell Biol.* 2002, **12**:425-432.
154. Parada LA, McQueen PG, Munson PJ, Misteli T: **Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells.** *Curr.Biol.* 2002, **12**:1692-1697.
155. Park Y, Kelley RL, Oh H, Kuroda MI, Meller VH: **Extent of chromatin spreading determined by roX RNA recruitment of MSL proteins.** *Science* 2002, **298**:1620-1623.
156. Park Y, Mengus G, Bai X, Kageyama Y, Meller VH, Becker PB, Kuroda MI: **Sequence-specific targeting of *Drosophila* roX genes by the MSL dosage compensation complex.** *Mol.Cell* 2003, **11**:977-986.
157. Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW: **Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy.** *Biophys.J.* 1997, **73**:2782-2790.
158. Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW: **Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy.** *Biophys.J.* 1997, **73**:2782-2790.
159. Penalva LO, Sanchez L: **RNA binding protein sex-lethal (*Sxl*) and control of *Drosophila* sex determination and dosage compensation.** *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2003, **67**:343-59, table.
160. Phair RD, Misteli T: **High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus.** *Nature* 2000, **404**:604-609.

161. Powers JA, Eissenberg JC: **Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding.** *J. Cell Biol.* 1993, **120**:291-299.
162. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ: **Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.** *J. Biol. Chem.* 1999, **274**:33002-33010.
163. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ: **Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein.** *Gene* 1992, **111**:229-233.
164. Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J: **ER-to-Golgi transport visualized in living cells.** *Nature* 1997, **389**:81-85.
165. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T: **Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases.** *Nature* 2000, **406**:593-599.
166. Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E: **A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster.** *Genome Res.* 2001, **11**:1114-1125.
167. Rice JC, Nishioka K, Sarma K, Steward R, Reinberg D, Allis CD: **Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes.** *Genes Dev.* 2002, **16**:2225-2230.
168. Richards EJ, Elgin SC: **Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects.** *Cell* 2002, **108**:489-500.
169. Richter L, Bone JR, Kuroda MI: **RNA-dependent association of the Drosophila maleless protein with the male X chromosome.** *Genes Cells* 1996, **1**:325-336.
170. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA: **The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.** *Nucleic Acids Res.* 1999, **27**:2291-2298.
171. Robertson KD, Wolffe AP: **DNA methylation in health and disease.** *Nat. Rev. Genet.* 2000, **1**:11-19.
172. Rodgers W, Jordan SJ, Capra JD: **Transient association of Ku with nuclear substrates characterized using fluorescence photobleaching.** *J. Immunol.* 2002, **168**:2348-2355.
173. Roth SY, Denu JM, Allis CD: **Histone acetyltransferases.** *Annu. Rev. Biochem.* 2001, **70**:81-120.
174. Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, et al.: **Comparative genomics of the eukaryotes.** *Science* 2000, **287**:2204-2215.
175. Saitoh S, Wada T: **Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome.** *Am. J. Hum. Genet.* 2000, **66**:1958-1962.
176. Schmiedeberg L, Weissbart K, Diekmann S, Meyer Zu HG, Hemmerich P: **High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells.** *Mol. Biol. Cell* 2004, **15**:2819-2833.
177. Scott MJ, Pan LL, Cleland SB, Knox AL, Heinrich J: **MSL1 plays a central role in assembly of the MSL complex, essential for dosage compensation in Drosophila.** *EMBO J.* 2000, **19**:144-155.
178. Seksek O, Biwersi J, Verkman AS: **Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus.** *J. Cell Biol.* 1997, **138**:131-142.

179. Shastry BS, Honda BM, Roeder RG: **Altered levels of a 5 S gene-specific transcription factor (TFIIIA) during oogenesis and embryonic development of *Xenopus laevis*.** *J.Biol.Chem.* 1984, **259**:11373-11382.
180. SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y: **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.** *J.Cell Comp Physiol* 1962, **59**:223-239.
181. Singh PB, Georgatos SD: **HP1: facts, open questions, and speculation.** *J.Struct.Biol.* 2002, **140**:10-16.
182. Sloan-Lancaster J, Presley J, Ellenberg J, Yamazaki T, Lippincott-Schwartz J, Samelson LE: **ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta): fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation.** *J.Cell Biol.* 1998, **143**:613-624.
183. Smith ER, Pannuti A, Gu W, Steurnagel A, Cook RG, Allis CD, Lucchesi JC: **The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation.** *Mol.Cell Biol.* 2000, **20**:312-318.
184. Smothers JF, Henikoff S: **The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins.** *Mol.Cell Biol.* 2001, **21**:2555-2569.
185. Snaar S, Wiesmeijer K, Jochemsen AG, Tanke HJ, Dirks RW: **Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells.** *J.Cell Biol.* 2000, **151**:653-662.
186. Sporbert A, Gahl A, Ankerhold R, Leonhardt H, Cardoso MC: **DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters.** *Mol.Cell* 2002, **10**:1355-1365.
187. Stein GS, Zaidi SK, Braastad CD, Montecino M, van Wijnen AJ, Choi JY, Stein JL, Lian JB, Javed A: **Functional architecture of the nucleus: organizing the regulatory machinery for gene expression, replication and repair.** *Trends Cell Biol.* 2003, **13**:584-592.
188. Steller H, Pirrotta V: **A transposable P vector that confers selectable G418 resistance to *Drosophila* Larvae.** *EMBO J.* 1985, **4**:167-171.
189. Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, Mancini MA: **FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent.** *Nat.Cell Biol.* 2001, **3**:15-23.
190. Sterner DE, Berger SL: **Acetylation of histones and transcription-related factors.** *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2000, **64**:435-459.
191. Strahl BD, Allis CD: **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 2000, **403**:41-45.
192. Straub T: **Heterochromatin dynamics.** *PLoS.Biol.* 2003, **1**:E14.
193. Straub T, Becker PB: **Chromatinstruktur und Krebsentstehung.** *Forum, Das offizielle Magazin der Deutschen Krebsgesellschaft e.V.* 2003.
194. Stuckenholz C, Kageyama Y, Kuroda MI: **Guilt by association: non-coding RNAs, chromosome-specific proteins and dosage compensation in *Drosophila*.** *Trends Genet.* 1999, **15**:454-458.
195. Swaminathan R, Hoang CP, Verkman AS: **Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion.** *Biophys.J.* 1997, **72**:1900-1907.
196. Takai D, Jones PA: **Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002, **99**:3740-3745.

197. Tamaru H, Zhang X, McMillen D, Singh PB, Nakayama J, Grewal SI, Allis CD, Cheng X, Selker EU: **Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa***. *Nat.Genet.* 2003, **34**:75-79.
198. Tanabe H, Muller S, Neusser M, von Hase J, Calcagno E, Cremer M, Solovei I, Cremer C, Cremer T: **Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates**. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002, **99**:4424-4429.
199. Tavormina PA, Come MG, Hudson JR, Mo YY, Beck WT, Gorbsky GJ: **Rapid exchange of mammalian topoisomerase II alpha at kinetochores and chromosome arms in mitosis**. *J.Cell Biol.* 2002, **158**:23-29.
200. Tickoo S, Russell S: ***Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening**. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2002, **2**:555-560.
201. Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, Harel-Bellan A: **Histone acetylation and disease**. *Cell Mol.Life Sci.* 2001, **58**:728-736.
202. Trinkle-Mulcahy L, Sleeman JE, Lamond AI: **Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells**. *J.Cell Sci.* 2001, **114**:4219-4228.
203. Tsien RY: **The green fluorescent protein**. *Annu.Rev.Biochem.* 1998, **67**:509-544.
204. Turner BM: **Cellular memory and the histone code**. *Cell* 2002, **111**:285-291.
205. Uenoyama T, Uchida S, Fukunaga A, Oishi K: **Studies on the sex-specific lethals of *Drosophila melanogaster*. IV. Gynandromorph analysis of three male-specific lethals, *mle*, *msl-2(27)* and *mle(3)132***. *Genetics* 1982, **102**:223-231.
206. Urnov FD, Wolffe AP: **Above and within the genome: epigenetics past and present**. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2001, **6**:153-167.
207. Urnov FD, Yee J, Sachs L, Collingwood TN, Bauer A, Beug H, Shi YB, Wolffe AP: **Targeting of N-CoR and histone deacetylase 3 by the oncoprotein v-erbA yields a chromatin infrastructure-dependent transcriptional repression pathway**. *EMBO J.* 2000, **19**:4074-4090.
208. van der PM: **Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century**. *Eur.J.Histochem.* 2000, **44**:7-42.
209. van Steensel B, Henikoff S: **Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase**. *Nat.Biotechnol.* 2000, **18**:424-428.
210. Vaquero A, Loyola A, Reinberg D: **The constantly changing face of chromatin**. *Sci.Aging Knowledge Environ.* 2003, **2003**:RE4.
211. Varga-Weisz P: **ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions**. *Oncogene* 2001, **20**:3076-3085.
212. Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O: **Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer**. *Nature* 1998, **394**:203-206.
213. Wade PA, Geron A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP: **Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation**. *Nat.Genet.* 1999, **23**:62-66.
214. Walter J, Schermelleh L, Cremer M, Tashiro S, Cremer T: **Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages**. *J.Cell Biol.* 2003, **160**:685-697.
215. Wang J, Sauntharajah Y, Redner RL, Liu JM: **Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells**. *Cancer Res.* 1999, **59**:2766-2769.

216. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA: **Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination.** *Science* 2004, **306**:279-283.
217. Wang Y, Zhang W, Jin Y, Johansen J, Johansen KM: **The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in Drosophila.** *Cell* 2001, **105**:433-443.
218. White J, Stelzer E: **Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells.** *Trends Cell Biol.* 1999, **9**:61-65.
219. Wolffe AP: **Histone H1.** *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 1997, **29**:1463-1466.
220. Workman JL, Kingston RE: **Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation.** *Annu.Rev.Biochem.* 1998, **67**:545-579.
221. Wright SJ, Wright DJ: **Introduction to confocal microscopy.** *Methods Cell Biol.* 2002, **70**:1-85.
222. Zeng L, Zhou MM: **Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain.** *FEBS Lett.* 2002, **513**:124-128.
223. Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC: **Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF.** *Cell* 2000, **101**:79-89.
224. Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D: **The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities.** *Cell* 1998, **95**:279-289.
225. Zhang Y, Reinberg D: **Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails.** *Genes Dev.* 2001, **15**:2343-2360.
226. Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP: **The transcriptional role of PML and the nuclear body.** *Nat.Cell Biol.* 2000, **2**:E85-E90.
227. Zhou S, Yang Y, Scott MJ, Pannuti A, Fehr KC, Eisen A, Koonin EV, Fouts DL, Wrightsman R, Manning JE, .: **Male-specific lethal 2, a dosage compensation gene of Drosophila, undergoes sex-specific regulation and encodes a protein with a RING finger and a metallothionein-like cysteine cluster.** *EMBO J.* 1995, **14**:2884-2895.
228. Zink D, Bornfleth H, Visser A, Cremer C, Cremer T: **Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories.** *Exp.Cell Res.* 1999, **247**:176-188.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname: Neumann
Vorname: Martin Friedrich
Geburtsort: Hannover
Geburtsdatum: 12. März 1973

Schulbildung

08/1979 – 07/1983 Grundschule Büren
08/1983 – 06/1992 Kardinal-von-Galen-Gymnasium Mettingen
Juni 1992 Abitur am Kardinal-von-Galen-Gymnasium

Hochschulbildung

10/1992 – 10/1996 Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Februar 1995 Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
01/1997 – 12/1997 Diplomarbeit „Projektorenzugang zum Quantensuperraum“
am Lehrstuhl für mathematische Physik bei Prof. Dr. J.Wess
Januar 1998 Diplom Physik
04/1998 – 04/2000 Studium der Humanmedizin an der LMU München
April 2000 Ärztliche Vorprüfung
04/2000 – 04/2004 Studium der Humanmedizin an der TU München
April 2004 Ärztliche Prüfung

Promotion

seit 09/2001 Promotion am Butenandt-Institut der med. Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl Prof.
Dr. P.B. Becker

9 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. Peter Becker für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit in exzellenter wissenschaftlicher Atmosphäre und seine stets aktive und gesprächsbereite Begleitung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Tobias Straub, der mir von Grund auf die Geheimnisse der Molekularbiologie näher brachte und die gesamte Doktorarbeit mit viel Geduld und ständiger Diskussionsbereitschaft betreute. Ohne ihn wäre diese Doktorarbeit sicherlich nicht denkbar.

Annalisa Izzo, Irene Vetter, Violette Morales, Daisy Schwarzlose sowie Roger Ferreira danke ich dafür, dass ich mich in „unserem“ Labor sehr wohl gefühlt habe und es neben vielen Hilfen, Diskussionen und guter Zusammenarbeit auch immer etwas zum Lachen gab.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls Becker sei Dank für unzählige Hilfeleistungen, unkomplizierte Bereitstellung von Materialien und Geräten, Diskussionsfreude und vor allem für die Schaffung einer Atmosphäre, in der es Spaß gemacht hat, diese Arbeit anzufertigen.

Bei Dr. Christoph Kaether vom Lehrstuhl Prof. Haass bedanke ich mich für die freundliche Einführung und die stete Hilfe bei der Benutzung des konfokalen Mikroskops.

Meinen Schwestern Barbara und Steffi danke ich für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung meiner Ausbildung.

Vielen Dank!