

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für
Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung von HP1 Isoformen in *Drosophila melanogaster*

Jochen Abel



München 2011

Dissertation eingereicht am: 28.04.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2011

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Becker

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Eick

3. Gutachter: Prof. Dr. T. Cremer

4. Gutachter: Prof. Dr. C. David

5. Gutachter: Prof. Dr. K. Jung

6. Gutachter: Prof. Dr. H. Leonhardt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Chromatin	1
1.2	Die Ausbildung höherer Chromatinstrukturen	2
1.3	Die Regulation der Chromatinfaltung	3
1.3.1	Die N-Termini der Histone	4
1.3.2	Histon Varianten	6
1.3.3	ATP abhängige Chromatin Remodeler	7
1.4	Heterochromatin und Euchromatin	7
1.5	HP1	9
1.5.1	Die Chromo-Domäne	11
1.5.2	Die Chromo-Shadow-Domäne	12
1.5.3	HP1, Su(var)3-9 und die Etablierung heterochromatischer Strukturen	12
1.5.4	Die Stabilisierung der HP1 Chromatin-Assoziation	14
1.5.4.1	Stabilisierung über die CSD	14
1.5.4.2	Stabilisierung über die Hinge	15
1.5.4.3	Die Regulation der HP1 Chromatin-Assoziation	15
1.5.5	HP1 Isoformen	16
1.5.5.1	HP1 Isoformen in Vertebraten	17
1.5.5.2	HP1 Isoformen in <i>Drosophila</i>	18
1.6	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	
2.1	Materialien	21
2.1.1	Plasmide	21
2.1.2	Oligonukleotide	23
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> Stämme	23
2.1.4	Zelllinien	23
2.1.5	Fliegenstämme	24
2.1.6	Antikörper	24
2.1.7	Enzyme und Kits	26
2.1.8	Chemikalien und Geräte	26
2.1.9	Antibiotika und Proteaseinhibitoren	28
2.1.10	Software	29
2.2	Medien	29
2.2.1	Medien für <i>E.coli</i>	29

2.2.1.1	Luria-Bertani (LB) medium	29
2.2.1.2	SOB medium	30
2.2.2	Medien für Schneider Zellen	30
2.3	Methoden	30
2.3.1	Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1.1	PCR für Klonierungen.....	30
2.3.1.2	Analytische PCR.....	31
2.3.1.3	Restriktionsverdau.....	31
2.3.1.4	PCR-Klonierungen.....	31
2.3.1.5	Klonierungen unter der Verwendung von Oligonuklotiden	32
2.3.1.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.3.1.7	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.	33
2.3.1.8	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> und Transformation	33
2.3.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	34
2.3.1.10	Mutagenese.....	34
2.3.1.11	Synthese doppelsträngiger RNA für RNAi.....	34
2.3.2	Expressions-Analysen	35
2.3.2.1	RNA-Isolierung aus SL2 Zellen	35
2.3.2.2	Genomweite Expressions-Analysen.....	35
2.3.2.3	cDNA Synthese	36
2.3.2.4	Primer und Amplikon Design (Realtime qPCR).....	36
2.3.2.5	Quantitative PCR ("Realtime-qPCR").....	36
2.3.2.6	Standardkurven	37
2.3.3	Zellkultur	38
2.3.3.1	Kultivierung und Passagierung.....	38
2.3.3.2	Cryokonservierung von Zellen.....	38
2.3.3.3	Transfektion von SL2 Zellen.....	38
2.3.3.4	RNAi in <i>Drosophila</i> SL2 Zellen.....	39
2.3.4	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	39
2.3.4.1	Anzucht und Haltung	39
2.3.4.2	Kreuzungen	40
2.3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.3.5.1	Kernextrakte	41
2.3.5.2	Ammoniumsulfatfällung	42
2.3.5.3	FLAG Immunpräzipitation aus Kernextrakten.....	42
2.3.5.4	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	42
2.3.5.5	GST-Pulldowns.....	43
2.3.5.6	<i>In vitro</i> Translation	44
2.3.5.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.3.5.8	Commassie Färbung	45

2.3.5.9	Massenspektrometrie	45
2.3.5.10	Western Blot	45
2.3.5.11	Herstellung von Kernextrakten aus <i>Drosophila</i> -Embryonen („TRAX“)	46
2.3.5.12	Co-Immunopräzipitation aus TRAX (0-12 h)	47
2.3.6	Immunfluoreszenz	48
2.3.6.1	Färbung polytärer Speicheldrüsenchromosomen aus <i>D. melanogaster</i>	48
2.3.6.2	Färbung von <i>D. melanogaster</i> SL2 Zellen	49
2.3.6.3	Analyse von Immunfärbungen	49
3	Ergebnisse	
3.1	HP1 Isoformen	50
3.1.1	HP1 isoformen binden H3K9 methylierte Peptide	50
3.1.2	Isolierung Isoform-spezifischer HP1 Proteinkomplexe	51
3.1.3	Generierung Isoform-spezifischer Antikörper	53
3.1.4	HP1b und HP1c interagieren mit Woc, Row und Ubiquilin <i>in vivo</i>	54
3.1.5	Charakterisierung der Isoform-spezifischen HP1 Interaktionen	56
3.2	Zelluläre Lokalisation von HP1 Isoformen	58
3.2.1	HP1c lokalisiert vorwiegend in euchromatische Bereiche	59
3.2.2	HP1c ist mit Interbanden assoziiert	59
3.2.3	Woc reguliert die Chromatin-Assoziation von HP1c	60
3.3	HP1c Expression wird durch einen negativen Feedback-Loop reguliert	62
3.3.1	Die HP1c Expression wird von Woc stimuliert	62
3.3.2	Die HP1c Expression wird durch einen autoregulatorischen Rückkopplungs- Mechanismus gesteuert	64
3.4	Genomweite Expressions-Analysen	65
3.4.1	Genomweite Expressionsanalysen	65
3.4.2	Identifizierung von Zielgenen für weitere Analysen	67
4	Diskussion	
4.1	Die H3K9 Methylierung und die Lokalisierung der HP1 Isoformen	70
4.2	Isolierung Isoform-spezifischer HP1 Komplexe	72
4.3	HP1b und HP1c interagieren mit identischen Co-Faktoren	73
4.4	Die Lokalisierung der HP1 Isoformen	75
4.5	Die Rolle von Isoform-spezifischen HP1 Komplexen bei der Genregulation	76
4.6	HP1c, HP1b und die Rolle bei der Genexpression	77
4.7	Aussichten	79
5	Zusammenfassung	
6	Abkürzungsverzeichnis	

7 Literaturverzeichnis

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide	95
8.1.1 Oligonukleotide für Klonierungen	95
8.1.2 Oligonukleotide für Realtime qPCR	96
8.1.3 Oligonukleotide für RT-PCRs.....	96
8.1.4 Oligonucleotide für RNAi Experimente	96
8.2 Publikationen.....	98
8.3 Erklärung.....	99
8.4 Lebenslauf	100

9 Danksagungen

1 Einleitung

1.1 Chromatin

Die grundlegende Verpackungseinheit von Chromatin ist das Nukleosom, welches sich aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt (Kornberg, 1974). Histone sind hochkonservierte Proteine und hinsichtlich der Struktur des Nukleosoms gibt es somit auch zwischen Hefen und Säugern kaum Unterschiede (Wolffe und Kurumizaka, 1998). Die 4 Histone, welche das Nukleosom bilden, sind kleine, basische Proteine, bestehend aus einer globulären Domäne sowie einem unstrukturiertem N-Terminus, der aus dem Histon-Oktamer („Nukleosomenkern“) ragt (Luger et al., 1997).

In einem Nukleosom winden sich ca. 147 bp der DNA 1,65 mal in Form einer linksgängigen Helix um das Histon-Oktamer und tragen somit zur Kompaktierung der DNA im Zellkern bei (Luger et al., 1997). Diese sich wiederholenden Einheiten sind durch kurze „Linker“-DNA Sequenzen variabler Länge (ca. 10-80 bp) voneinander getrennt (Felsenfeld und Groudine, 2003). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint diese repetitive Struktur bei niedrigen Salzkonzentrationen als flexible Kette aus Nukleosomen, die wie Perlen an einer Schnur aufgereiht sind („beads on a string“, Abbildung 1) (Bruce Alberts, 2004).

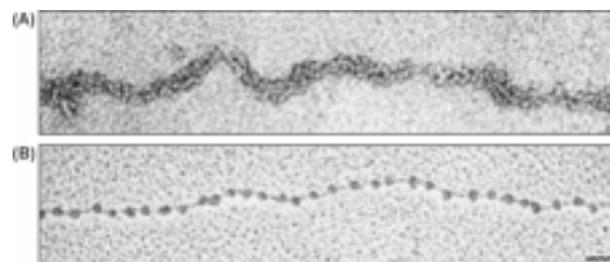


Abbildung 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Chromatin. (A) Aus einem Interphase-Kern isoliertes Chromatin erscheint im EM als 30 nm Faser. (B) Bei niedrigen Salzkonzentrationen kann diese Struktur weiter dekondensiert werden, so dass einzelne Nukleosomen sichtbar werden („beads on a string“) (Bruce Alberts, 2004). Größenmarker: 50 nm.

1.2 Die Ausbildung höherer Chromatinstrukturen

Diese "primäre" Chromatinstruktur (11 nm) ist mit einer hochkompakten, "sekundären" Struktur im Gleichgewicht (30 nm) (Abbildung 1), dessen Lage durch die Salzkonzentration, durch die Interaktionen der Nukleosomen untereinander, und auch durch die Interaktion mit verschiedensten Proteinfaktoren beeinflusst wird (Felsenfeld und Groudine, 2003).

Eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung dieser 30 nm Chromatinfasern kommt dabei u. a. dem fünften Histon, dem so genannten Linker-Histon H1, zu (Bednar et al., 1998). Dieses Histon bindet ca. 20 bp der Linker-DNA an jener Stelle, an der die DNA aus dem Nukleosom austritt (Tumbar und Belmont, 2001; Zhou et al., 1998). H1 kann dadurch die Lage der Linker-DNA und somit auch die

relative Position des nachfolgenden Nukleosoms modulieren. Deutlich wird der Einfluss von H1 auf die Chromatinstruktur nach Depletion von H1: Zum einen sind die Abstände zwischen den einzelnen Nukleosomen vergrößert, zum anderen sind die Chromatinfasern in diesen Zellen auch weniger kondensiert (Fan et al., 2005). Hinsichtlich der Struktur der 30 nm Chromatinfasern gibt es unterschiedliche Modelle, das Solenoid- sowie das ZigZag-Modell. Welches dieser Modelle die Situation in der Zelle am ehesten reflektiert ist nach wie vor umstritten. Allerdings gibt es Hinweise, dass alternative Strukturen der 30 nm Chromatinfasern existieren und dass diese durch die Linker-Histone und die Länge der Linker-DNA beeinflusst werden könnten (Robinson und Rhodes, 2006).

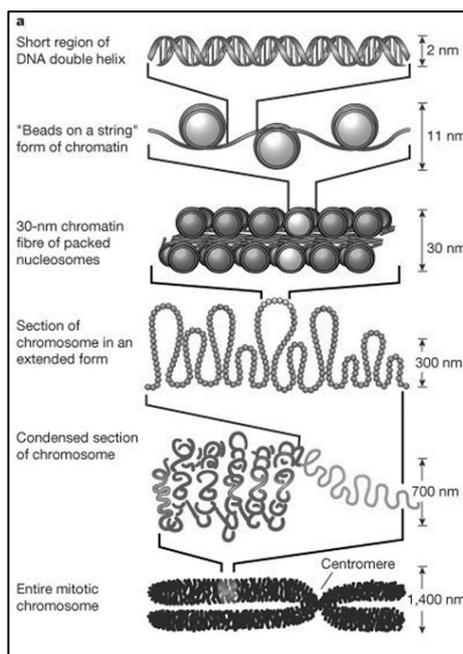


Abbildung 2 Die Organisation der DNA innerhalb bestimmter Chromatinstrukturen. Details werden im Text beschrieben (Felsenfeld und Groudine, 2003).

In vivo sind diese 30 nm Fasern mikroskopisch nicht aufzulösen (und somit sehr schwer zu detektieren), da diese in höheren „tertiären“ Chromatinstrukturen hochkondensiert vorliegen (Abbildung 2) (Tremethick, 2007). Die Mechanismen der Ausbildung dieser

höheren Chromatinstrukturen sind allerdings nicht sehr gut verstanden (Felsenfeld und Groudine, 2003).

Fluoreszenz *in situ* Hybridisations (FISH) Experimente legen nahe, dass Chromatin in großen Schlaufen angeordnet ist, so dass selbst Sequenzen, welche mehrere Mbp im

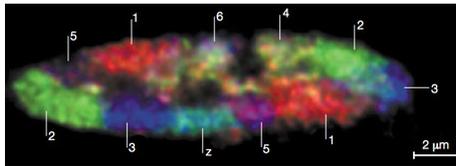


Abbildung 3 Chromosomen Territorien. Der optische Schnitt entlang der Mittelachse eines Fibroblasten-Zellkerns aus Hühnern zeigt, dass einzelne (Fluoreszenzmarkierte) Chromosomen spezifische Positionen innerhalb des Nukleoplasmas einnehmen (Cremer und Cremer, 2001).

linearen DNA-Molekül entfernt sind, an der Basis dieser Schlaufen in unmittelbarer räumliche Nachbarschaft gelangen können (Sachs et al., 1995; Zhao et al., 2006). Die Chromatinschlaufen werden dabei durch die Assoziation der Chromatinfasern mit einem Protein-Grundgerüst im Zellkern, der Kernmatrix, etabliert (Galante et al., 2007). Diese Assoziation erlaubt es der Zelle, Chromatin in strukturell und funktionell verschiedene Domänen zu organisieren (Abbildung 2).

Darüber hinaus konnte mit FISH auch gezeigt werden, dass Interphase Chromosomen nicht willkürlich im Nukleoplasma verteilt sind, sondern ganz spezifische Positionen im Zellkern einnehmen („Chromosome Territories“, Abbildung 3) und benachbarte Territorien nur wenig überlappen (Cremer und Cremer, 2001).

Chromosomen sind dabei keinesfalls starre, unveränderliche Strukturen, sondern zeichnen sich durch eine hohe Dynamik aus. So beobachtet man beispielsweise nach Induktion der Transkription die Re-Lokalisierung von Reportergenen von der Peripherie ins Innere des Kerns (Kosak und Groudine, 2004; Tumber und Belmont, 2001).

1.3 Die Regulation der Chromatinfaltung

Die Ausbildung hoch geordneter, höherer Chromatinstrukturen dient also nicht nur der Verpackung des genetischen Materials, sondern eröffnet der Zelle ferner eine Möglichkeit, den Zugang zur DNA zu kontrollieren. Diese regulatorischen Mechanismen lassen sich grob in drei Kategorien unterteilen: Posttranslationale Modifikationen von Histonen, den Einbau von Histonvarianten sowie ATP-abhängiges Chromatin Remodeling. Darüber hinaus können Chromatinstrukturen jedoch auch durch DNA-

Methylierung bzw. durch Bindung DNA-spezifischer Faktoren wie zum Beispiel CTCF oder SATB1 beeinflusst werden (Galante et al., 2007; Phillips und Corces, 2009). Neuere Studien zeigen zudem, dass die RNAi Maschinerie eine wichtige Rolle bei der Etablierung dicht gepackter Chromatinstrukturen einnimmt (Pal-Bhadra et al., 2004; Verdell et al., 2004).

1.3.1 Die N-Termini der Histone

Eine zentrale Bedeutung hinsichtlich der Regulation von Chromatinstrukturen kommt insbesondere den flexiblen, unstrukturierten N-Termini der Kernhistone zu, da diese durch eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen markiert werden können (Abbildung 4). Hierzu zählen u.a. die Methylierung von Lysin (mono-, di-, tri-Methylierungen) und Arginin, die Acetylierung und Ubiquitinierung von Lysinen, die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin, Deaminierungen, SUMOylierungen sowie ADP-Ribosylierungen (Kouzarides, 2007). Die Etablierung dieser Modifikationen ist von spezifischen Enzymen abhängig, die diese Markierungen entweder anfügen (u.a. Histonacetyltransferasen (HATs), Histonmethyltransferasen (HMTs), Kinasen) oder entfernen (u.a. Histondemethylasen (HDMs), Histondeacetylasen (HDACs)). Insgesamt sind inzwischen mehr als 60 verschiedene Histon-Modifikationen bekannt, deren Anzahl stetig steigt (Kouzarides, 2007). Die schier unendliche Anzahl an möglichen Kombinationen dieser Modifikationen verdeutlicht hierbei das enorme Potential hinsichtlich der Möglichkeiten zur Regulation bestimmter DNA-abhängiger Prozesse.

Histon-Modifikationen können über verschiedene Mechanismen die Chromatinstruktur modulieren: So können Histon-Modifikationen die Interaktionen zwischen benachbarten Nukleosomen beeinflussen (Shogren-Knaak et al., 2006), Proteine rekrutieren, die bei der Änderung der Chromatinstruktur behilflich sind (Jenuwein und Allis, 2001) oder aber auch die Assoziation mit der DNA und somit die Bindung DNA-spezifischer Faktoren regulieren (Lee et al., 1993).

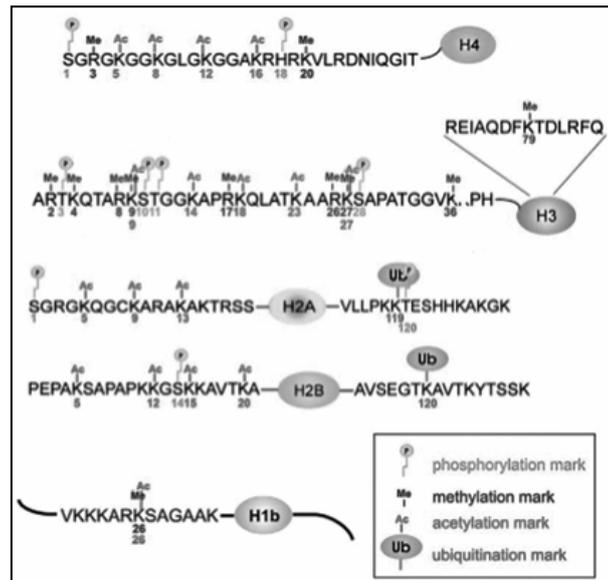


Abbildung 4 Histon-Modifikationen. Histone sind mit zahlreichen posttranslationalen Modifikationen versehen, u.a. mit Phosphorylierungen (P), Methylierungen (Me), Acetylierungen (Ac) oder auch mit Ubiquitin-Resten (Ub). (Margueron et al., 2005)

So konnte beispielsweise in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass zur Ausbildung von 30 nm Chromatinfasern ein Teil des N-Terminus von H4 nötig ist, der in diesen Strukturen mit dem Histon H2A des benachbarten Nukleosoms assoziiert ist. Acetylierung von H4 an K16 verhindert dabei die Ausbildung solcher Fasern *in vitro* (Shogren-Knaak et al., 2006), mutmaßlich aufgrund der geringeren Affinität des acetylierten H4 N-Terminus für Histon H2A. Interessanterweise korreliert diese Modifikation *in vivo* mit transkriptionell aktiven, offenen Chromatinstrukturen (Prestel et al., 2010).

In Abhängigkeit von der Kombination bestimmter Modifikationen können darüber hinaus bestimmte Proteine zu spezifischen Bereichen im Genom rekrutiert werden oder aber auch daran gehindert werden, eben jene Bereiche zu binden. Dieser „Histoncode“ (Jenuwein und Allis, 2001) wird somit durch Effektorproteine übersetzt (Abbildung 5). Zahlreiche dieser Proteine besitzen dabei enzymatische Aktivitäten, durch welche die Etablierung einer spezifischen Chromatinstruktur weiter beeinflusst werden kann. Die „Auslesung“ des Codes wird dabei über spezifische Proteindomänen vermittelt.

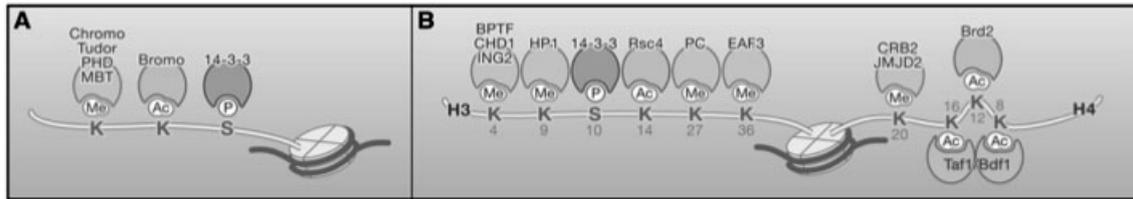


Abbildung 5 Effektorproteine erkennen und binden spezifische Histon-Modifikationen. (A) Domänen, welche zur Erkennung bestimmter Modifikationen benötigt werden. (B) Beispiele für Proteine, welche Modifikationen am H3 und H4 N-Terminus erkennen (Kouzarides, 2007).

Methylierungen werden beispielsweise von Chromo-, Tudor- oder auch von PHD-Domänen erkannt, Acetylierungen von Bromo-Domänen (Kouzarides, 2007).

Durch die Kombination bestimmter Histon-Modifikationen ist es also möglich sowohl lokal den Zugang zur DNA und somit unmittelbare DNA-abhängige Prozesse zu kontrollieren (wie zum Beispiel Transkription, Replikation, Reparatur), als auch die globale Chromatinstruktur durch die Etablierung bestimmter Chromatin-Domänen zu beeinflussen.

1.3.2 Histon Varianten

Chromatinstrukturen werden jedoch nicht nur über ein bestimmtes Muster an posttranslationalen Modifikationen definiert, sondern auch über den Einbau von Histon Varianten an spezifischen Stellen im Genom. Der Einbau kann Replikations-unabhängig erfolgen, indem kanonische Histone im Nucleosom ersetzt werden. Dieser Austausch führt zu einem dazu, dass bestehende posttranslationale Modifikationen „gelöscht“ werden können, zum anderen kann der Einbau von Histonvarianten aber auch direkte, fundamentale Konsequenzen auf die Struktur der Nucleosomen bzw. des Chromatins haben (Talbert und Henikoff, 2007). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Nucleosomen, welche die Centromer-spezifische Variante CenH3 (CID) enthalten, als Tetramere („Hemisom“) organisiert sind und die DNA in einer rechtsgängigen (anstatt einer linksgängigen) Helix um diesen Nucleosomenkern gewunden ist (Dalal et al., 2007). Diese Anordnung könnte die Ausbildung höherer Chromatinstrukturen verhindern und somit entscheidend für die centromerische Assoziation von Kinetochorproteinen während der Mitose sein.

1.3.3 ATP abhängige Chromatin Remodeler

Nukleosomen stellen, oft auch im Verbund mit Chromatin-assoziierten Faktoren, eine Barriere dar, die bei allen DNA-abhängigen Prozessen den Zugang zur DNA regulieren kann (Izban und Luse, 1992; Murr et al., 2006). Einen wichtigen Beitrag zur Überwindung (bzw. zum Aufbau) dieser Barrieren liefern dabei Chromatin Remodeling Komplexe. Diese Komplexe können ATP-abhängig DNA-Histon Kontakte aufzubrechen, um DNA auf der Oberfläche von Nukleosomen für Faktoren zugänglich zu machen, um Nukleosomen entlang der DNA zu verschieben („sliding“), um einzelne Histon-Dimere auszutauschen (zum Beispiel beim Einbau neuer Histonvarianten), oder auch um ganze Nukleosomen zu entfernen (Becker und Horz, 2002; Li et al., 2007).

1.4 Heterochromatin und Euchromatin

Interphasenchromosomen können morphologisch in Heterochromatin und Euchromatin unterteilt werden (Abbildung 6). Heterochromatin erscheint hierbei als Struktur, die unabhängig vom Zellzyklus dicht verpackt vorliegt und sich so grundlegend von euchromatischen Strukturen unterscheidet, die zwar im Rahmen der Mitose kondensieren, während der Interphase allerdings im Lichtmikroskop diffus vorliegen (Heitz, 1928).

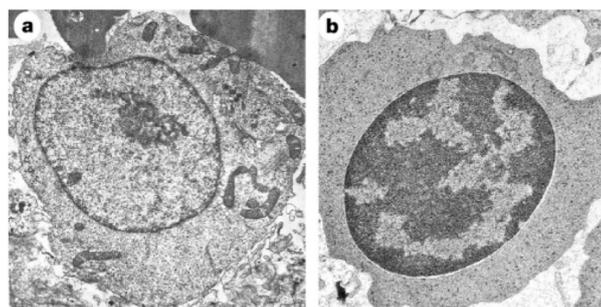


Abbildung 6 Heterochromatin und Euchromatin. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks. Das dicht gepackte Heterochromatin erscheint hierbei dunkler als euchromatische Strukturen. Während Proerythroblasten fast kein Heterochromatin enthalten (A), werden diese Strukturen in späten Erythroblasten sichtbar (B) (Francastel et al., 2000).

Heterochromatische Strukturen zeigen in nahezu allen Pflanzen und Tieren dieselben Eigenschaften; so wird Heterochromatin spät repliziert, es enthält relativ wenig Gene

und ist reich an repetitiven DNA-Sequenzen (Gatti und Pimpinelli, 1992; Weiler und Wakimoto, 1995).

Ein Schlüsselmerkmal dieser Chromatinstrukturen ist zudem die Fähigkeit, sich entlang einer Chromatinfaser auszubreiten („spreading“), so dass benachbarte Bereiche Sequenz-unabhängig dicht verpackt und somit auch transkriptionell still gelegt werden können (Bannister et al., 2001; Nakayama et al., 2001).

Darüber hinaus konnte aber auch gezeigt werden, dass heterochromatische Strukturen bei einer Vielzahl von weiteren zellulären Prozessen beteiligt sind, von der entwicklungsgesteuerten Organisation der Chromosomen im Zellkern bis hin zur Kontrolle der Chromosomensegregation während der Mitose (Grewal und Jia, 2007).

Neben morphologischen Unterschieden können Euchromatin und Heterochromatin auch anhand ihrer posttranslationalen Histon-Modifikationen differenziert werden. Histon-Methylierungen von H3K4, H3K36, H3K79 sowie Acetylierungen von H3 und H4 sind häufig mit transkriptionell aktiven, euchromatischen Domänen assoziiert. Heterochromatische Strukturen (sowie transkriptionell reprimierte Bereiche im Euchromatin) hingegen sind vorwiegend hypoacetyliert und enthalten insbesondere H3K9-, H3K27- sowie H4K20-methylierte Histone (Kwon und Workman, 2008)

In *Drosophila melanogaster* sind in einer typischen diploiden Zelle etwa 30-35% des Karyotyps heterochromatinisiert, darunter das komplette Y Chromosom sowie große Teile des 4. Chromosoms. Heterochromatin findet man darüber hinaus sowohl mit perizentrischen Regionen als auch mit Telomeren assoziiert (Gatti und Pimpinelli, 1992; Weiler und Wakimoto, 1995).

Gelangen euchromatische Gene durch chromosomale Rearrangements in unmittelbare Nachbarschaft heterochromatischer Bereiche, so werden diese durch das „Spreading“ des Heterochromatins in der Regel reprimiert. Als klassisches Beispiel für dieses als Positionseffekt Variegation (PEV) beschriebene Phänomen dient das *white* Gen, welches für die rote Augenpigmentierung in *Drosophila melanogaster* codiert. In *In(1)w^{m4}* Stämmen, in denen das *white* Gen durch eine Chromosomen-Inversion in die Nähe heterochromatischer Bereiche translokiert wurde, erscheinen die Augen aufgrund der variablen Expression des *white* Gens mosaikartig pigmentiert (Abbildung 7) (Muller, 1930).

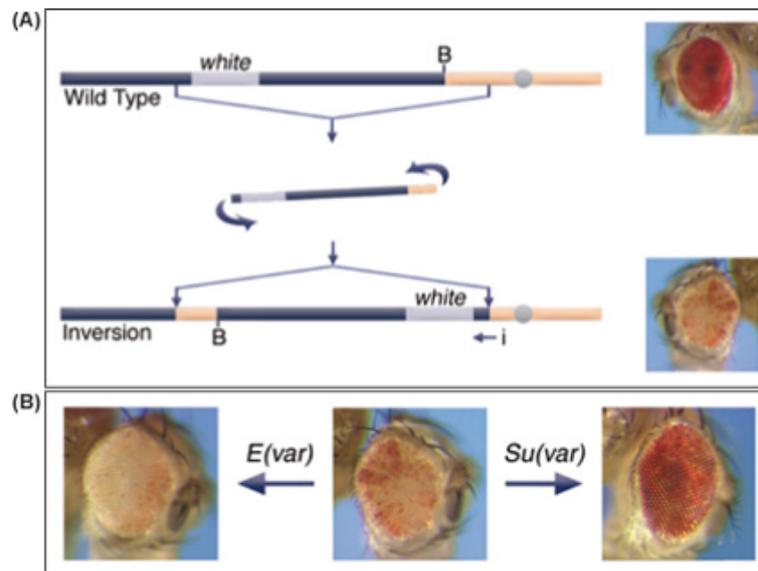


Abbildung 7 Positionseffekt Variegation (PEV). (A) Schematische Illustration der Chromosomen-Inversion in *Drosophila In(1)w^{m4}* Stämmen (siehe Text für Details). Perizentrisches Heterochromatin ist orange dargestellt, Euchromatin blau. (B) Die *In(1)w^{m4}* Stämme können dazu benutzt werden, jene Mutanten zu isolieren, welche die PEV entweder verstärken (*E(var)s*) oder aber unterdrücken (*Su(var)s*). (Allis et al., 2007)

Mit Hilfe dieses Systems konnten in genetischen Screens zahlreiche Faktoren identifiziert werden, welche die Etablierung heterochromatischer Strukturen fördern („Suppressor of Variegation“, *Su(var)s*) bzw. der Ausbildung dieser Strukturen entgegenstehen („Enhancer of Variegation“, *E(var)s*) (Schotta et al., 2003).

1.5 HP1

Eine der auf diese Weise identifizierten und am besten untersuchten strukturellen heterochromatischen Komponenten ist das evolutionär konservierte Heterochromatin Protein 1 (HP1) (James und Elgin, 1986). Einen Sonderfall stellt hierbei aber *Saccharomyces cerevisiae* dar; dort findet man anstelle von HP1 so genannte SIR (*silent information regulatory*) Proteine (Gasser und Cockell, 2001).

Zytologische Lokalisationsanalysen zeigten, dass HP1 zwar wie erwartet größtenteils mit perizentrischem Heterochromatin, mit dem überwiegend heterochromatischen 4. Chromosom sowie mit Telomeren assoziiert, darüber hinaus allerdings auch in zahlreichen euchromatischen Regionen detektiert werden kann (Abbildung 8A) (Fanti et al., 2003; James und Elgin, 1986).

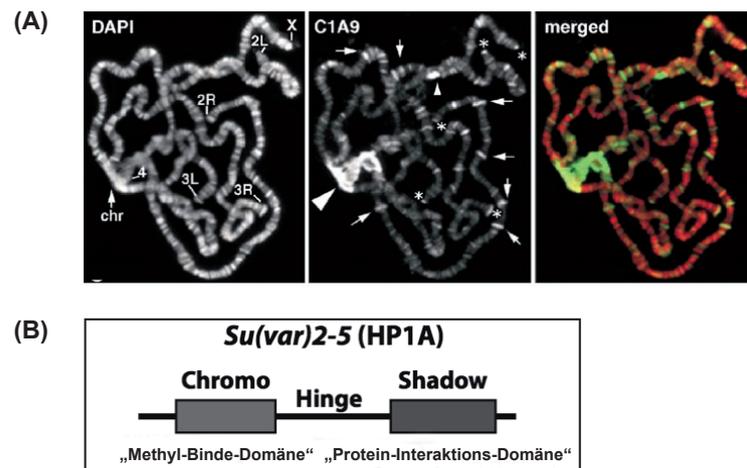


Abbildung 8 HP1 Lokalisationsanalysen. (A) Schematische Darstellung von HP1 (siehe Text). (B) HP1 Immunfärbungen von Polytäanchrosomen aus Wildtyp (*Ore-R*) *Drosophila* 3rd Instar Larven. HP1 ist insbesondere im Chromozentrum angereichert (großer Pfeil), lokalisiert aber auch mit Telomeren (*) und in euchromatischen Regionen (kleine Pfeile). Polytäanchrosomen wurden mit DAPI (rot) angefärbt, HP1 mit Hilfe des monoklonalen C1A9 Antikörpers visualisiert (Fanti et al., 2003)

Die bedeutende Rolle von HP1 bei der Etablierung heterochromatischer Strukturen wurde anfänglich dadurch deutlich, dass HP1 Mutationen im zuvor beschriebenen PEV System einen starken *Su(var)* Phänotyp zeigen (Eissenberg et al., 1990). Eine zusätzliche Kopie des für HP1 codierenden *Su(var)205* führt dabei zu einer Verstärkung des Heterochromatin-induzierten Stilllegens des *white* Reportergens, während die Verringerung der HP1 Gendosis dagegen eine verstärkte Expression des Reporters bewirkt.

Der Mechanismus, über den HP1 die Etablierung der dicht gepackten heterochromatischen Strukturen reguliert, konnte allerdings erst durch die Aufklärung der molekularen Eigenschaften der einzelnen Domänen des HP1 Proteins entschlüsselt werden.

Alle HP1 Proteine zeichnen sich durch zwei hochkonservierte Domänen aus, eine N-terminale Chromo-Domäne (CD) und eine C-terminale Chromo-Shadow-Domäne (CSD). Beide Domänen sind durch ein kurzen, flexiblen Linker-Bereich (Hinge) voneinander separiert (Abbildung 8B) (Aasland und Stewart, 1995).

1.5.1 Die Chromo-Domäne

Chromo (*Chromatin organization modifier*)-Domänen findet man über HP1 hinaus in zahlreichen Chromatin-assoziierten Proteinen wie zum Beispiel Polycomb, Chromatin Remodelern wie Mi2/CHD1, der Histon-Methyltransferase Su(var)3-9 oder auch in Komponenten des Dosage compensation complexes (DCC) in *Drosophila* (Eissenberg, 2001). Chromo-Domänen sind insbesondere hinsichtlich ihrer Funktion als „Methyl-Bindedomäne“ gut charakterisiert, wurden allerdings darüber hinaus auch als DNA- bzw. RNA-Interaktionsmodule beschrieben (Akhtar et al., 2000; Bouazoune et al., 2002; Piacentini et al., 2009).

Die CD von HP1 interagiert spezifisch mit H3K9 methylierten Histonen, dem Markenzeichen heterochromatischer Chromatin-Domänen (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Strukturanalysen zeigten, dass hierbei drei aromatische Reste der CD die H3K9 Methylierung über die Ausbildung einer hydrophoben Tasche binden (Jacobs und Khorasanizadeh, 2002; Nielsen et al., 2002). Die Spezifität der Bindung wird durch selektive Wechselwirkungen der HP1 CD mit Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft des H3 Methylierungsmotivs vermittelt. Jene Aminosäuren der CD, welche an der Bindung von H3K9 methylierten Histonen beteiligt sind, sind daher innerhalb der HP1 Familie hoch konserviert. So zeigen HP1 Mutanten, in welchen ein konservierter Valinrest (V26M in *Drosophila*) durch das größere Methionin ersetzt wurde, eine drastisch verminderte Affinität hinsichtlich H3K9 methylierter Histone (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001).

Neben der selektiven Bindung von methyliertem H3K9 konnte in Säugern gezeigt werden, dass ein nahezu identisches Motiv im Linker Histon H1.4 nach Methylierung von HP1 bzw. dessen CD gebunden wird (Daujat et al., 2005) und dass diese Methylierung für die Repression von Reportergenen von Bedeutung ist (Kuzmichev et al., 2004). Neuere Studien deuten ferner darauf hin, dass neben Histonen auch andere Chromatin-assoziierte Faktoren ähnliche Modifikationskassetten enthalten, welche methyliert und von HP1 oder anderen, noch zu identifizierenden Effektorproteinen, gebunden werden können (Sampath et al., 2007). Jene Prinzipien, welche für den Histoncode postuliert wurden, könnten somit auch eine Möglichkeit zur Regulation von Chromatin-assoziierten Faktoren im allgemeinen darstellen.

1.5.2 Die Chromo-Shadow-Domäne

Neben der N-terminalen CD findet man in sämtlichen HP1 Proteinen eine C-terminale CSD (Aasland und Stewart, 1995). Die CSD ähnelt zwar strukturell der CD, besitzt jedoch darüber hinaus jedoch auch einzigartige Struktur motive, welche die funktionelle Unterscheidung der beiden Domänen vermitteln. So wurde die CSD als jene Domäne beschrieben, welche zum einen die Dimerisierung von HP1 Molekülen, zum anderen aber auch über die Bindung eines PxVxL Pentapeptidmotivs die Interaktion mit zahlreichen Proteinfaktoren vermittelt, von Chromatin modifizierenden Enzymen über Transkriptionsfaktoren bis hin zu Chromatin Remodeling Komplexen (Brasher et al., 2000; Smothers und Henikoff, 2000; Thiru et al., 2004).

1.5.3 HP1, Su(var)3-9 und die Etablierung heterochromatischer Strukturen

Einer dieser Interaktionspartner von HP1 ist die H3K9 spezifische Histon-Methyltransferase (HMT) Su(var)3-9 (Schotta et al., 2002), welche, analog zu HP1, überwiegend mit perizentrischen Regionen, mit dem 4. Chromosom sowie mit Telomeren assoziiert ist (Greil et al., 2003; Schotta et al., 2002). Variationen der Su(var)3-9 Gen dosis im PEV System in *Drosophila* zeigen dabei wie HP1 einen starken Su(var)-Phänotyp – ein Befund der die Bedeutung von Histon-Modifikationen (bzw. von Su(var)3-9) für die Etablierung heterochromatischer Strukturen deutlich werden lässt (Schotta et al., 2002).

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein einfaches Modell generiert, welches die Aufrechterhaltung und zumindest auch teilweise die Funktion heterochromatischer Strukturen erklären kann (Abbildung 9B):

Hierbei verknüpft ein HP1 Dimer zwei H3K9 methylierte N-Termini räumlich benachbarter Nukleosomen miteinander und kann auf diese Weise zur Ausbildung kompakterer Chromatinstrukturen beitragen (Canzio et al., 2011). Dabei wird angenommen, dass diese Kompaktierung den Zugang zu DNA-Sequenzen für Komponenten der Transkriptionsmaschinerie einschränkt und somit zur Etablierung der transkriptionell inaktiven Chromatinstrukturen führt (Bannister et al., 2001; Lachner et

al., 2001). Über die Interaktion mit der CSD von HP1 wird ferner die HMT Su(var)3-9 rekrutiert, welche benachbarte Nucleosomen methyliert und auf diese Weise neue Bindestellen für HP1 generiert, so dass sich heterochromatischer Strukturen sequenzunabhängig entlang der Chromatinfaser ausbreiten können („spreading“).

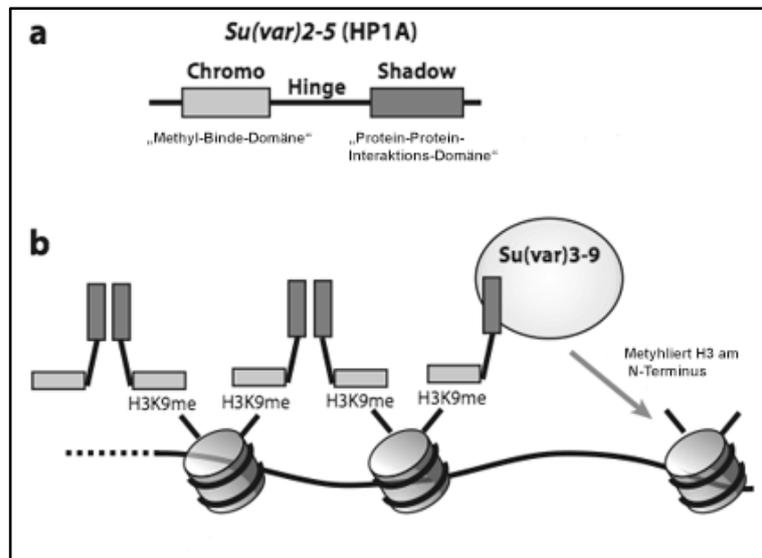


Abbildung 9 HP1 und dessen Rolle bei der Etablierung heterochromatischer Strukturen. (A) Schematische Darstellung von HP1. HP1 enthält zwei konservierte Domänen, die Chromo-Domäne (CD) und die Chromo-Shadow-Domäne (CSD), welche durch eine flexible Linker-Region (Hinge) getrennt sind. (B) Dieser modulare Aufbau führt zur Generierung eines einfachen Modells, welches die Etablierung heterochromatischer Strukturen darstellt (Details siehe Text).

Das Modell impliziert, dass Heterochromatin eine strukturell kompakte und statische Struktur darstellt. FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) Experimente konnten jedoch zeigen, dass heterochromatische Domänen im Zellkern zwar stabil positioniert sind, HP1 selbst dabei jedoch eine sehr hohe Mobilität zeigt und in einem ständigem Wettbewerb mit anderen Proteinfaktoren um die Bindestellen in diesen Domänen steht. Heterochromatin kann somit weitaus zugänglicher für Proteinfaktoren sein als ursprünglich angenommen (Cheutin et al., 2003; Festenstein et al., 2003). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte demonstriert werden, dass die durch Heterochromatin induzierte Repression von Reportergenen in *Drosophila* durch die Überexpression eines Transkriptions-Aktivators umgangen werden kann (Ahmad und Henikoff, 2001).

Die Regulation der Dynamik der HP1 Assoziation mit Chromatin stellt somit ein Mechanismus dar, über welchen der Erhalt bzw. die Etablierung höherer Chromatinstrukturen beeinflusst werden kann. Von zentraler Bedeutung in diesem

Zusammenhang ist hierbei, dass die Kinetik der HP1 Assoziation sowie auch die Ausbildung höherer Chromatinstrukturen u.a. durch die Methylierung von H3K9 moduliert werden kann (Cheutin et al., 2003). HP1 CD Mutanten, deren Affinität für H3K9 methylierte Nukleosomen deutlich verringert ist (siehe 1.5.1), zeigen demnach eine deutlich schwächere Assoziation mit perizentrischen, heterochromatischen Regionen. Die Mutanten sind hierbei auch nicht in der Lage perizentrische Reportergene in *Drosophila* zu reprimieren (Platero et al., 1995; Thiru et al., 2004).

1.5.4 Die Stabilisierung der HP1 Chromatin-Assoziation

Die relativ instabile Bindung zwischen der HP1 CD und H3K9 methylierten Histonen (Jacobs und Khorasanizadeh, 2002; Nielsen et al., 2002) suggeriert allerdings, dass die H3K9 Methylierung für sich alleine kein ausreichendes HP1 Rekrutierungssignal darstellen kann (Stewart et al., 2005). Um eine effiziente Chromatin-Assoziation von HP1 zu gewährleisten (bzw. um dessen Mobilität zu verringern), sind vielmehr noch weitere Faktoren nötig.

1.5.4.1 Stabilisierung über die CSD

So ist neben der CD und deren Fähigkeit zur Interaktion mit H3K9 methylierten Nukleosomen auch die dimerisierte CSD bzw. deren Funktion als Protein-Protein-Interaktionsdomäne für eine stabile Chromatin-Verankerung von HP1 außerordentlich wichtig. Dies wird u.a. dadurch deutlich, dass monomere HP1 Proteine trotz einer intakten CD (und der Fähigkeit zur Bindung H3K9 methylierter Nukleosomen) Lokalisationsdefekte zeigen und zusätzliche Proteinfaktoren benötigt werden, um HP1 effizient an *in vitro* methyliertes Chromatin zu binden (Eskeland et al., 2006; Thiru et al., 2004). Darüber hinaus führt die Mutation der HP1 CD, wie bereits zuvor beschrieben, zwar zu einer Destabilisierung der Assoziation von HP1 mit perizentrischem Heterochromatin, die Chromatin-Assoziation mit Telomeren und zahlreichen euchromatischen Regionen ist in diesem Fall jedoch nicht beeinträchtigt. Dies macht deutlich, dass die HP1 Rekrutierung in manchen Fällen sogar gänzlich unabhängig von H3K9 methylierten Nukleosomen erfolgen kann (Fanti et al., 1998).

Einen wichtigen Beitrag leisten in diesem Zusammenhang u.a. DNA-bindende Proteine. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass HP1 Gen-spezifisch über die CSD von Co-Repressoren wie KAP-1 oder das Retinoblastom-Protein rekrutiert werden kann (Nielsen et al., 2001b; Ryan et al., 1999). Eine analoge Funktion können neben diesen transkriptionellen Regulatoren auch HP1-Interaktionen ausfüllen, die wichtige Rollen bei der Replikation und DNA-Reparatur spielen. Ein Beispiel hierfür ist der Origin Erkennungskomplex (*Origin Recognition Complex, Orc*), welcher über dessen replikative Aufgabe hinaus auch eine Funktion bei der perizentrischen Lokalisation von HP1 übernimmt (Pak et al., 1997; Prasanth et al., 2004).

Neuere Studien legen zudem nahe, dass die Etablierung heterochromatischer Strukturen auch von Komponenten der RNAi Maschinerie abhängig ist. So interagiert HP1 über die CSD direkt mit PIWI, einem Mitglied der ARGONAUTE/PIWI Familie, welches seinerseits mit kurzen RNAs, so genannten piRNAs (*PIWI interacting RNAs*), assoziiert ist. Entsprechende Mutanten zeigen in *Drosophila* drastische HP1 Lokalisationsdefekte und sind darüber hinaus nicht in der Lage perizentrische Reportergene still zu legen (Brower-Toland et al., 2007; Deshpande et al., 2006; Pal-Bhadra et al., 2004)

1.5.4.2 Stabilisierung über die Hinge

Neben der CSD scheint aber auch der Linker-Bereich, welcher die CD und die CSD miteinander verbindet, für eine dauerhafte Assoziation von HP1 mit Heterochromatin und dessen korrekter Lokalisation von Bedeutung zu sein (Muchardt et al., 2002; Smothers und Henikoff, 2001). Der Mechanismus der Chromatin-Interaktion ist hierbei jedoch weitgehend unbekannt und unterscheidet sich zudem teilweise zwischen einzelnen Modellsystemen. Neben der Fähigkeit zur (offenbar unspezifischen) Interaktion mit RNA (Muchardt et al., 2002) und DNA (Perrini et al., 2004; Sugimoto et al., 1996; Zhao et al., 2000) bindet die Hinge auch Chromatin-assoziierte Proteine wie zum Beispiel Linker-Histone (Badugu et al., 2005; Nielsen et al., 2001a).

1.5.4.3 Die Regulation der HP1 Chromatin-Assoziation

Bereits in frühen Studien in *Drosophila* wurde erkannt, dass verschiedene Sub-Populationen von HP1 existieren, welche sich u.a. in ihrem Phosphorylierungsstatus

unterscheiden. Die während der frühen Embryonalentwicklung einsetzende Hyperphosphorylierung von HP1 korreliert dabei mit der Etablierung heterochromatischer Strukturen (Eissenberg et al., 1994; Zhao und Eissenberg, 1999).

HP1 wird jedoch nicht nur phosphoryliert, sondern ist darüber hinaus, ähnlich wie Histone, mit zahlreichen Modifikationen versehen (Methylierungen, Ubiquitinierungen, SUMOylierungen, Acetylierungen). Dieser von HP1 vermittelte „Sub-Code“ könnte die Interaktion von HP1 mit dessen Chromatin-assoziierten Bindungspartnern bzw. auch mit verschiedenen Histon-Modifikationen regulieren (Lomberk et al., 2006).

1.5.5 HP1 Isoformen

Die meisten Organismen enthalten neben dem bislang beschriebenen, vorwiegend heterochromatischen HP1 zusätzliche HP1-ähnliche Proteine, welche sich im Lauf der Evolution aus Genduplikationen entwickelt haben (Abbildung 10).

Sämtliche dieser Proteine der HP1-Familie zeigen demnach dieselbe Domänenarchitektur – sie besitzen jeweils eine CD sowie eine CSD, getrennt durch eine flexible Linker Region variabler Länge (Hayakawa et al., 2003; Smothers und Henikoff, 2001). Die evolutionäre Verwandtschaft suggeriert eine funktionelle Konservierung dieser HP1 Isoformen, allerdings deuten sowohl Lokalisationsanalysen als auch funktionelle Studien darauf hin, dass jede Isoform für sich spezifische Aufgaben übernimmt.

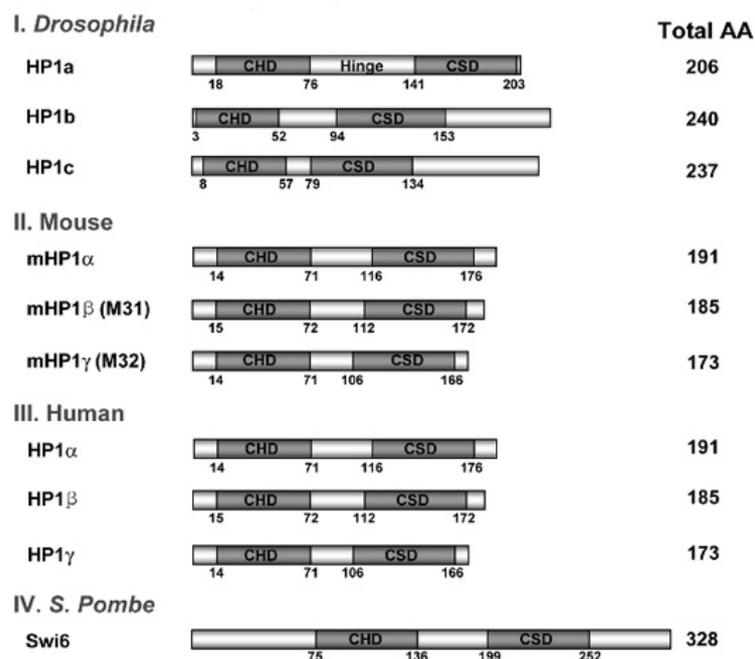


Abbildung 10 Schematische und maßstabgerechte Repräsentation von HP1 Proteinen in verschiedenen Modell-Organismen. Die Länge der einzelnen Proteine ist rechts aufgeführt. CHD: Chromo-Domäne. CSD: Chromo-Shadow-Domäne (Kwon und Workman, 2008).

1.5.5.1 HP1 Isoformen in Vertebraten

In Vertebraten wird dies unter anderem dadurch deutlich, dass die Lokalisation der drei HP1 Proteine (HP1 α , HP1 β und HP1 γ) Isoform-spezifisch und in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert werden kann (Fischle et al., 2005; Hayakawa et al., 2003). Während HP1 α vorwiegend mit perizentrischem Heterochromatin assoziiert ist, lokalisieren HP1 β und HP1 γ sowohl in hetero- als auch in euchromatischen Regionen (Minc et al., 1999). Die Rekrutierung von HP1 Molekülen zu spezifischen Stellen im Genom kann dabei durch Isoform-spezifische posttranslationale Modifikationen vermittelt werden. So definiert die Phosphorylierung von HP1 γ an Ser83 eine Sub-Population dieser Isoform, welche eine ausschließlich euchromatische Lokalisation zeigt (Lomberk et al., 2006). Darüber hinaus zeigen mehrere Studien, dass die drei HP1 Paraloge spezifische Interaktionen mit anderen Proteinfaktoren eingehen (Li et al., 2002).

Hinweise auf eine Spezialisierung kommen nicht nur durch die beobachteten Lokalisationsunterschiede, sondern auch durch spezifische Defekte im Fall des Verlustes einzelner Paraloge zum Ausdruck. So hat beispielsweise in humanen Zellen

lediglich der Verlust von HP1 γ , nicht aber der Verlust der beiden anderen Isoformen mitotische Defekte zur Folge (Serrano et al., 2009). Für mehrere Gene konnte zudem beobachtet werden, dass HP1 Isoformen bei deren transkriptionellen Regulation unterschiedliche Rollen übernehmen. Während im reprimierten Zustand (je nach System) HP1 α bzw. HP1 β mit den jeweiligen Promotoren assoziiert sind, wird HP1 γ nach Induktion vermehrt zu transkriptionell aktiven Bereichen rekrutiert (Mateescu et al., 2008; Smallwood et al., 2007; Vakoc et al., 2005).

1.5.5.2 HP1 Isoformen in *Drosophila melanogaster*

Mit der Sequenzierung des *Drosophila* Genoms wurden auch in diesem Organismus HP1 Paraloge entdeckt (Smothers und Henikoff, 2001). Neben den ubiquitär exprimierten HP1a, HP1b und HP1c wurden noch zwei weitere, Keimbahn-spezifische HP1 Isoformen gefunden (HP1d/*rhino* in Weibchen bzw. HP1e in Männchen) (Vermaak et al., 2005).

Im Gegensatz zum vorwiegend heterochromatischen HP1a lokalisiert HP1c in Kc Zellen ausschließlich in euchromatischen Regionen, während HP1b sowohl mit Heterochromatin als auch mit Euchromatin assoziiert ist (Greil et al., 2003; Smothers und Henikoff, 2001).

Phylogenetische Analysen offenbarten, dass sich (im Gegensatz zur Situation in Säugern) die einzelnen Isoformen in *Drosophila* nicht nur untereinander sehr deutlich unterscheiden, sondern darüber hinaus auch keine Orthologe der jeweiligen HP1 Isoformen der Säuger darstellen (Abbildung 11) (Smothers und Henikoff, 2001; Vermaak et al., 2005). Funktionelle Analysen in diesen Modellsystemen können somit nicht ohne weiteres auf *Drosophila* übertragen werden.

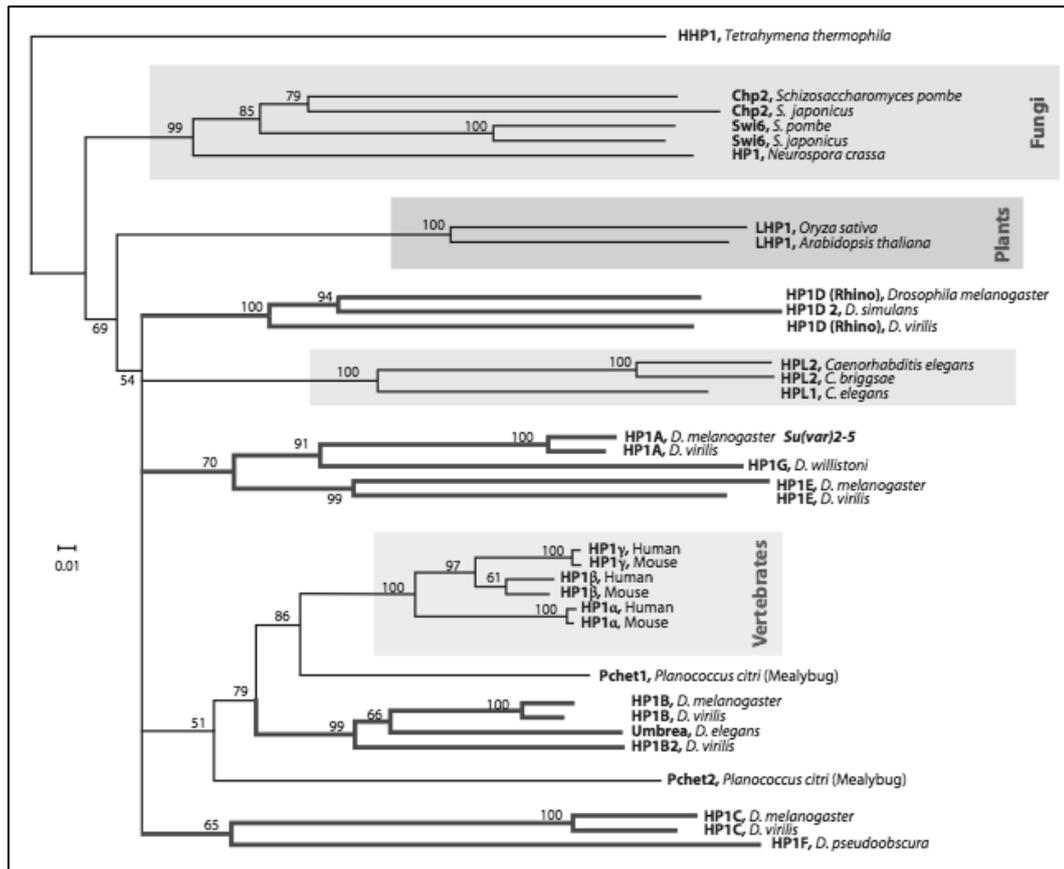


Abbildung 11 Evolutionäre Beziehungen von HP1 Proteinen. Ein phylogenetischer Baum wurde mit Hilfe eines Sequenzvergleichs der Chromo- sowie der Chromo-Shadow-Domänen erstellt (aufgrund des geringen Konservierungsgrades wurde die Hinge-Region hierbei nicht berücksichtigt). Einzelne Taxa sind grau unterlegt. Der Grad der Verwandtheit ist durch die Länge der einzelnen Äste wiedergegeben (Vermaak et al., 2005).

1.6 Ziel der Arbeit

Die beiden ubiquitär exprimierten HP1 Isoformen HP1b und HP1c sind, anders als das ausschließlich heterochromatische HP1a, kaum charakterisiert. So ist weder bekannt, wie die einzelnen Paraloge zu spezifischen Bereichen innerhalb des Genoms rekrutiert werden, noch sind diese Isoformen bislang funktionell näher beschrieben (Greil et al., 2003; Smothers und Henikoff, 2001).

Wie bereits in Abschnitt 1.5.4 ausgeführt, kann HP1a über multiple, teils redundante Mechanismen mit Chromatin assoziieren. Neben der CD als „Methyl-Binde-Domäne“ spielen hierbei aber auch die Hinge Region und insbesondere die CSD als Protein-Protein-Interaktionsdomäne eine wichtige Rolle. So wurde beispielsweise durch *in vitro*

Experimente gezeigt, dass eine effiziente Bindung von HP1a an H3K9 methyliertes Chromatin nur dann möglich ist, wenn gleichzeitig Heterochromatin-spezifische Faktoren wie zum Beispiel Su(var)3-9 und ACF1 zugegen sind. Beide Proteine interagieren mit HP1 über dessen CSD und sind dadurch in der Lage, die HP1 Bindung an methyliertes Chromatin zu stabilisieren. Mutationen in der HP1 CSD (W200A), welche die Interaktion mit Su(var)3-9 und ACF1 beeinträchtigen, führen somit zum Verlust der HP1a Assoziation mit methyliertem Chromatin (Eskeland et al., 2006).

Diese Beobachtung sowie die unterschiedliche Lokalisierung der beiden Isoformen ließ vermuten, dass HP1 Proteine u.a. durch Paralog-spezifische Interaktoren in bestimmte Bereiche des Genoms rekrutiert werden bzw. dort deren Bindung stabilisieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst Isoform-spezifische Interaktoren aus stabil transfizierten *Drosophila* SL2 Zellen zu isolieren, biochemisch zu charakterisieren und den Einfluss einzelner Interaktoren auf die Lokalisation der entsprechenden Paraloge *in vivo* zu analysieren. Diese Untersuchungen sollten des Weiteren als Basis für die funktionelle Charakterisierung der bis zu diesem Zeitpunkt nicht beschriebenen HP1 Isoformen HP1b und HP1c dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Plasmide

Name	Insert	Bemerkung	Tag	Quelle
pPacFLAG HP1a	HP1a	Expression in SL2 Zellen	FLAG	R. Eskeland
pPacFLAG HP1b	HP1b	Expression in SL2 Zellen	FLAG	
pPacFLAG HP1c	HP1c	Expression in SL2 Zellen	FLAG	R. Eskeland
pPacFLAG Row	Row	Expression in SL2 Zellen	FLAG	
pPacFLAG Woc	Woc	Expression in SL2 Zellen	FLAG	
pPacFLAG 3-3	Su(var)3-3	Expression in SL2 Zellen	FLAG	
pGEX4T-1		Expression in <i>E.coli</i>	GST	Invitrogen
pGEX4T-3		Expression in <i>E.coli</i>	GST	Invitrogen
pGEX4T3HP1b	HP1b	Expression in <i>E.coli</i>	GST	

pGEX4T1HP1c	HP1c	Expression <i>E.coli</i>	in GST	R. Eskeland
pGEX4T1UbqIn	Ubiquilin	Expression <i>E.coli</i>	in GST	
pETHA		<i>In vitro</i> TnT (T7)	HA	
pETHA HP1a	HP1a	<i>In vitro</i> TnT (T7)	HA	
pETHA HP1b	HP1b	<i>In vitro</i> TnT (T7)	HA	
pETHA HP1c	HP1c	<i>In vitro</i> TnT (T7)	HA	
pETFLAG		<i>In vitro</i> TnT (T7)	FLAG	
pETFLAG HP1a	HP1a	<i>In vitro</i> TnT (T7)	FLAG	
pETFLAG HP1b	HP1b	<i>In vitro</i> TnT (T7)	FLAG	
pETFLAG HP1c	HP1c	<i>In vitro</i> TnT (T7)	FLAG	
pFLC1 Row	Row			<i>Drosophila</i> Genomics Resource Center
pFLC1 Woc	Woc			<i>Drosophila</i> Genomics Resource Center
HP1bpOT2	HP1b			<i>Drosophila</i> Genomics Resource Center
dUbqInpOT2	Ubiquilin			<i>Drosophila</i> Genomics Resource Center
EGFP	GFP			T. Straub
pET15b		<i>In vitro</i> TnT (T7)	His	Novagen

pPuro	Puromycin-N-acetyltransferase	Selektionsplasmid SL2 Transfektion		I. Vetter
3-3 pZeo	Su(var)3-3			T. Rudolph

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die aufgeführten Plasmide im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

2.1.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins Operon bezogen und sind im Anhang aufgeführt.

2.1.3 *Escherichia coli* Stämme

DH5 α *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15
gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

BL21 Gold (DE3) pLysS B F- *dcm+* Hte *ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *gal* λ (DE3) [pLysS
Cam^r]^a *endA Tet*^r

2.1.4 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich *Drosophila* SL2 Zellen verwendet

Zelllinien	transfiziertes Plasmid	Selektionsmarker
SL2		
SL2 HP1aFLAG	pPacFLAG HP1a	Puromycin
SL2 HP1bFLAG	pPacFLAG HP1b	Puromycin
SL2 HP1cFLAG	pPacFLAG HP1c	Puromycin

2.1.5 Fliegenstämme

Genotyp	Bezugsquelle
<i>woc²⁵¹/TM6B</i>	G. Raffa
<i>woc^{B111}/TM6B</i>	G. Raffa
<i>woc²⁵¹/woc^{B111}</i>	G. Raffa
<i>hp1c/Tm3</i>	diese Arbeit
<i>w¹¹¹⁸; PBacHP1c^{f04929}/TM6B</i>	Bloomington, Stock 18819
<i>TM3/TM6B</i>	Bloomington, Stock

2.1.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind nachfolgend aufgeführt.

IF (Immunfluoreszenz), W (Western Blot), aff. ger. (affinitätsgereinigte Antikörper), polykl (polyklonale Antikörper).

Spezifität	Spezies, Subtyp, Klon, Anwendung	Quelle	Verd. (Anwendung)
Primärantikörper			
HP1a	Maus (C1A9)	S. Elgin	1:200 (IF)
HP1a	Kaninchen (polykl.)	S. Elgin	1:1000 (W)
HP1b	Ratte, IgG2a (8E4)	E. Kremmer	1:10 (W), un (IF)
HP1c	Ratte, IgG2a (2G2)	E. Kremmer	1:10 (W), un (IF)

Row	Kaninchen (polykl., aff.ger.)	PSL GmbH	1:100 (W)
Woc	Kaninchen (polykl.)	G. Raffa	1:1500 (W), 1:500 (IF)
FLAG	Maus (M2)	Sigma	1:5000 (W)
HA	Ratte (?)	E. Kremmer	1:100
Ubiquilin	Kaninchen (polykl.)	M. Guo	1:1000 (W)
GST	Ratte (6A9)	E. Kremmer	1:5 (W)
LEF	Ratte, IgG1	R. Rupp	1:10 (W)
Sekundärantikörper			
IgG Ratte	Ziege, Cy3 (IF)	Dianova	1:500 (IF)
IgG Maus	Ziege, Alexa488 (IF)	Dianova	1:300 (IF)
IgG Kaninchen	Esel, Alex488 (IF)	Invitrogen	1:500 (IF)
IgG Maus	Esel, iRDye 800 (W)	Biomol	1:5000 (W)
IgG Ratte	Esel, iRDye 800 (W)	Biomol	1:5000 (W)
IgG Kaninchen	Esel, iRDye 800 (W)	Biomol	1:5000 (W)
IgG Maus	Ziege, Alexa 680 (W)	Mobitec	1:5000 (W)

2.1.7 Enzyme und Kits

Kit	Hersteller
CIP	NEB
cDNA Sythesis Kit	Finnzyme
Effectene Transfektions Kit	Qiagen
Expand High Fidelity PCR System	Roche
Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid Midi/Mini Kits	Qiagen
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Taq Polymerase	NEB
T4 DNA Ligase	NEB
T7 Quick Coupled Transcr./Transl. System	Promega

2.1.8 Chemikalien und Geräte

Name	Hersteller
Ammoniumsulfat	Merck
ANTI-FLAG M2 Affinity Gel („Flag beads“)	SIGMA
APS	SIGMA
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Dialysemembranen (16 mm, MWCO:12-14 kd)	Spectrum Laboratories

DNA-Standards (100 bp/1 kb)	NEB
Douncer, versch. Größen	Fa. B. Braun
dNTPs	NEB
Ethidium Bromid	Roth
Fast SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems
Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare
iBlot® Dry Blotting System	Invitrogen
Microscope Axiovert 200M	Zeiss
Miracloth	Merck
Natriumhypochlorit-Lösung	Merck
Nitrocellulose Membran (porablot NCL)	Macherey-Nagel
Protein Marker IV	PEQLAB
RNase A	Roche
RNase freie DNaseI	Qiagen
Paraformaldehyd	SIGMA
Rotiphorese Gel 30	Roth
Roche LightCycler 480	Roche
Schneider's Medium	GIBCO
SDS-PAGE System	Invitrogen
Thermocycler Primus 96 plus	MWG Biotech
TEMED	Roth

Odyssey® Infrared Imaging System	Licor
Orange G	SIGMA
SDS	Serva
S ³⁵ Met/Cys-Mix (10 µCi/µl)	Hartmann Analytic
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	PEQLAB
TRIS	Amersham
Protein G Sepharose Fast Flow 4	Amersham
Yamoto Homogenisator LH-22	Yamoto
Zellkulturflaschen	Greiner

2.1.9 Antibiotika und Proteaseinhibitoren

Name	Konz. Stammlsg.	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	Roth
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	25 µg/ml	Roche
Kanamycin	10 mg/ml in H ₂ O	10 µg/ml	Sigma
Puromycin	10 mg/ml in H ₂ O	10 µg/ml	PAA
Aprotinin	1 mg/ml in H ₂ O	1 µg/ml	Gennaxon
Leupeptin	1 mg/ml in H ₂ O	1 µg/ml	Gennaxon
Pepstatin	0,7 mg/ml in EtOH	0,7 µg/ml	Gennaxon
PMSF	34 mg/ml in Isoprop.	34 µg/ml	Sigma

2.1.10 Software

Device	Software
MALDI-TOF	Voyager, Data explorer , Mascot
LC480 Light Cycler	Roche
Microsoft Office 2008	Microsoft
Creative Suite 4	Adobe
Integrated Genome Browser	Affymetrix

2.2 Medien

2.2.1 Medien für *E.coli*

2.2.1.1 Luria-Bertani (LB) Medium

1.0% (w/v) Bacto-Tryptone

1.0% (w/v) NaCl

0.5% (w/v) Bacto-Yeast extract

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf pH7 eingestellt. Das Medium wurde für 20min autoklaviert. Antibiotika wurde, falls nötig, nach dem Abkühlen zugegeben. Für die Herstellung von LB-Platten wurde das Medium mit 1,5% Agar versetzt.

2.2.1.2 SOB Medium

2% (w/v) Bacto-Tryptone

10 mM NaCl

0.5% (w/v) Bacto-Yeast extract

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf pH7 eingestellt. Das Medium wurde für 20min autoklaviert.

2.2.2 Medien für Schneider Zellen

Schneider's Medium (GIBCO) wurde mit 10% Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin versetzt. Zur Selektion auf Puromycin-resistente Zellen wurden zusätzlich 10 µg/ml Puromycin zugegeben.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1 PCR für Klonierungen

Für PCR-basierte Klonierungen wurde ausschließlich der „Expand High Fidelity“ Kit (Roche) verwendet, der die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer höheren Genauigkeit gegenüber der herkömmlich verwendeten Taq Polymerase gewährleistet. Beim Design der Primer wurden am 5'-Ende Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingefügt, so dass ein DNA-Fragment generiert wurde, das nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen direkt in den entsprechenden Zielvektor kloniert werden konnte.

Typischerweise wurden in jeder Reaktion 100-200 ng Template DNA, 200 nM dNTPs, sowie 500 nM eines jeden Primers verwendet. Um die Fehlerrate möglichst gering zu halten wurde die PCR mit lediglich 20 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	
Denaturierung	94	2 min	1 x
Denaturierung	94	1 min	} 20 x
Annealing	50	30	
Elongation	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	7 min	1 x

Die Reaktionsbedingungen wurden unter Berücksichtigung der Empfehlungen des Herstellers gewählt – sowohl das Temperaturprofil als auch die Zeiten wurden für jede PCR separat bestimmt. PCR-Produkte wurden über das PCR Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen zusammen mit dem Zielvektor verdaut.

2.3.1.2 Analytische PCR

Für Analytische PCR-Reaktionen wurde die Taq Polymerase (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Je nach Anwendung wurde die Reaktion mit 25 bis 35 Zyklen durchgeführt.

2.3.1.3 Restriktionsverdau

Die Reaktionsbedingungen für einen Restriktionsverdau wurden nach Angaben des Herstellers (NEB) gewählt. Für einen typischen Reaktionsansatz wurde 1 µg DNA für 2 h bei 37°C mit 10 U Enzym verdaut.

2.3.1.4 PCR-Klonierungen

Zielvektoren wurden nach Restriktionsverdau mit einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert (CIP, NEB), um eine intramolekulare Selbstligation zu verhindern. Sowohl das verdaute zu klonierende DNA-Fragment als auch der linearisierte,

dephosphorylierte Zielvektor wurden über ein präparatives Agarose-Gel aufgereinigt (2.3.1.6), um Primer-Dimere, PCR-Nebenprodukte (Insert) und die alkalische Phosphatase (Vektor) vor der Ligation zu entfernen.

Die DNA-Konzentration wurde zunächst photospektrometrisch bestimmt (2.3.1.7). Für die Ligation wurden 100 ng Vektor und ein 5 facher molarer Überschuss Insert zusammen mit der T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben inkubiert. 1/5 dieses Ansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E.coli* (DH5 α) verwendet (2.3.1.8). Der Erfolg der Klonierung wurde durch Plasmid-Minipreparationen und anschließende Restriktionsanalyse überprüft und gegebenenfalls sequenziert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

2.3.1.5 Klonierungen unter der Verwendung von Oligonukleotiden

Zur Klonierung kurzer DNA-Fragmente wurden komplementäre, am 5'-Ende phosphorylierte Oligonukleotide bestellt (ca. 35-60 bp), welche nach Hybridisierung, aneinander angelagert, direkt in Zielvektoren kloniert wurden. Beim Design der Oligonukleotide wurde darauf geachtet, dass diese nach der Anlagerung Überhänge bilden, die jenen Überhängen entsprechen, die beim Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen entstehen.

Für die Hybridisierung der Oligonukleotide wurden diese zunächst auf 1 pmol/ μ l in Annealing Puffer verdünnt (200 μ l Gesamtvolumen), für 5 min auf 95°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Auf diese Weise konstruierte doppelsträngige DNA-Fragmente wurden direkt (im 3-10fachen molaren Überschuss) mit entsprechend verdauten und dephosphorylierten Zielvektoren ligiert.

Annealing Puffer

10 mM TRIS

1 mM EDTA

50 mM NaCl

2.3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um DNA- bzw. RNA-Fragmente aufzutrennen, zu identifizieren oder auch um diese zu reinigen (präparative Agarose-Gelelektrophorese). Die Größenbestimmung sowie die Quantifizierung der Fragmente im Gel wurde durch das Anfärben mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) ermöglicht, welches eine direkte Detektion der DNA (bzw. RNA) unter UV-Licht erlaubt. Hierzu wurde als Referenz eine Standard-DNA-Leiter verwendet (100 bp bzw. 1 kbp Leitern, NEB).

Für präparative Gele wurden DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) isoliert und über einen Kit (QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers aufgereinigt.

1 xTBE

90 mM TRIS

90 mM Borsäure

2 mM EDTA

5 xProbenpuffer

50% (v/v) Glycerin

5 mM EDTA

0,3% (w/v) Orange G

2.3.1.7 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg DNA/ml (bzw. 40 µg RNA/ml). Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm wird verwendet, um die Reinheit der DNA zu ermitteln. Hohe Absorptionsraten bei 280 nm deuten auf Protein- oder Phenolkontaminationen hin. Bei reinen DNA-Proben liegt das Verhältnis bei ca.1,8, bei RNA sollte der Wert bei ungefähr 2 liegen (Sambrook et al., 2001).

2.3.1.8 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* und Transformation

Chemisch kompetente *E.coli* wurden nach der Methode von Inoue hergestellt (Sambrook et al., 2001). Die chemisch kompetenten Zellen wurden nach Standardmethoden transformiert (Sambrook et al., 2001). Auf diese Weise transformierte Zellen wurden auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert und 16-20 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden, je nach Menge der zu isolierenden DNA, Plasmid Maxi (bis zu 500 µg) oder Mini Kits (bis zu 40 µg) verwendet (Qiagen). Plasmid Mini Kits wurden hauptsächlich für analytische Präparationen im Rahmen von Klonierungen verwendet. Diese Präparationen wurden jedoch nicht, wie vom Hersteller empfohlen, über Säulen aufgereinigt, sondern sofort direkt aus dem Reaktionsansatz mit Isopropanol ausgefällt. Der Reinheitsgrad der auf diese Weise isolierten Plasmide erlaubt sowohl Restriktionsanalysen als auch Sequenzierungen.

2.3.1.10 Mutagenese

Punktmutationen und Deletionen wurden mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis-Kits (Stratagene) eingefügt. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt (8.1).

2.3.1.11 Synthese doppelsträngiger RNA für RNAi

Um die Expression bestimmter Gene in *Drosophila* SL2 Zellen zu vermindern, werden diese Zellen i.d.R. mit 400-540 Nukleotide langen dsRNAs transfiziert (Hammond et al., 2000), deren Sequenz mit jener des Zieltranskripts identisch ist. Um etwaige Off-Target Effekte zu reduzieren, wurden in allen Experimenten zwei dsRNA Konstrukte verwendet; eines richtete sich dabei gegen das 5'-Ende der codierenden Region des Zieltranskripts, ein weiteres gegen das 3'-Ende. Darüber hinaus wurden die Konstrukte mit Hilfe eines Programms (<http://dscheck.rnai.jp/>) entworfen, welches potentielle Off-Target-Effekte abschätzt und somit ein optimales Design der dsRNA Konstrukte erlaubt (Naito et al., 2005).

Beim Design der Primer zur PCR-Amplifikation der entsprechenden Zielsequenzen wurden jeweils am 5'-Ende T7 Promotor Elemente hinzugefügt (5'-TTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'). Zielsequenzen wurden mit Standard-PCR-Methoden amplifiziert. Zur *in vitro* Transkription wurde das T7 Ambion MEGAscript® Kit nach Herstellerangaben verwendet. Als Matrize dienten 8 µl des zuvor hergestellten, von T7 Promotoren flankierten, PCR-Produkts, welches über einen Zeitraum von 6 h

bei 37°C transkribiert wurde. dsRNA wurde in 100 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration photospektrometrisch bestimmt (2.3.1.7).

2.3.2 Expressions-Analysen

2.3.2.1 RNA-Isolierung aus SL2 Zellen

RNA aus SL2 Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Kleinere RNAs (>200 bp) gehen hierbei verloren, allerdings gewährleistet die gewählte Methode eine schnelle RNA Extraktion (und somit wenig Degradation) sowie eine hohe Reproduzierbarkeit hinsichtlich genomweiter Expressions-Analysen (pers. Kommunikation T.Straub).

Kontaminationen durch genomische DNA wurden durch einen DNase-Verdau auf der Säule eliminiert. Sowohl die Konzentration der RNA-Präparation als auch deren Reinheit wurden photospektrometrisch bestimmt (2.3.1.7). RNA Präparationen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.2.2 Genomweite Expressions-Analysen

Die gesamte zelluläre RNA wurde nach Affymetrix-Vorschrift markiert und auf Affymetrix GeneChip Drosophila Genome 2 Arrays hybridisiert (in Kollaboration mit Dietmar Martin, Genzentrum, LMU München). Die Analyse der Microarray-Daten wurde mit dem Statistikprogramm R (www.R-project.org) und den Erweiterungspaketen aus dem Bioconductorprojekt (www.bioconductor.org) durchgeführt (in Kollaboration mit Tobias Straub, Adolf-Butenandt-Institut, LMU München). Die Expressionswerte der Gene wurden nach Qualitätskontrolle mit der GCRMA-Prozedur unter Standardbedingungen (<http://pubs.amstat.org/doi/abs/10.1198/016214504000000683>) berechnet. Gene wurden mit limma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16646809>) auf differenzielle Expression getestet. Durch Bestimmung der lokalen False Discovery Rate (lfr) und Setzen eines Schwellenwerts von 0,2 wurden signifikant geänderte Gene detektiert.

2.3.2.3 cDNA Synthese

cDNA wurde mit Hilfe des cDNA Synthesis Kits (Finnzyme) nach Herstellerangaben in einem Volumen von 20 µl generiert. Als Ausgangsmaterial wurden hierfür 1 µg RNA verwendet, als Primer dienten Random Hexamers. Diese gewährleisten zum einen hohe Ausbeuten, zum anderen sind auch die 5'-Enden langer Transkripte im Gegensatz zur cDNA Synthese mit Oligo d(T) Primern nicht unterrepräsentiert.

Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz verwendet, der keine Reverse Transkriptase enthielt.

Jeweils 1/10 der Reaktionsansätze wurden zunächst mit konventionellen PCRs analysiert. Hierfür wurden jene Primer verwendet, die in den nachfolgenden qPCR Analysen zur Amplifikation des Referenz-Gens (der 140 kd Untereinheit der RNA Polymerase II) benötigt wurden.

Der restliche Reaktionsansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf 120 µl verdünnt.

2.3.2.4 Primer und Amplikon Design (Realtime qPCR)

Primer und Amplikons für Realtime qPCR-Analysen wurden mit Hilfe des Programms Primer3 gewählt (Rozen und Skaletsky, 2000). Um eine möglichst effiziente Amplifikation (bei gleichzeitig hoher Sensitivität) zu gewährleisten, wurden Amplikongrößen von 90-120 bp verwendet. Für Primer wurden ein GC-Gehalt von 45-55% sowie eine Schmelztemperatur (T_m) von 59°C-61°C festgelegt.

Sämtliche Primer wurden unter Verwendung von Standardkurven charakterisiert (2.3.2.6).

2.3.2.5 Quantitative PCR (Realtime qPCR)

Realtime qPCR-Analysen wurden mit einem Lightcycler der Firma Roche durchgeführt (LC480). Die verwendeten Primer-Paare (jeweils 100 µM) wurden gemeinsam jeweils 1:34 in Wasser verdünnt. Zur Detektion der PCR-Produkte während der Reaktion wurde SYBR Green I (Fast SYBR[®] Green, Applied Biosystems) eingesetzt. Im Anschluss an jede Reaktion wurde eine Schmelzkurven-Analyse angefügt, um den Ansatz hinsichtlich

der Bildung etwaiger nicht-spezifischer PCR-Produkte bzw. der Bildung von Primer-Dimeren zu kontrollieren.

Standardreaktionsansatz

SYBR Green Master Mix	7,5 µl
Primer Mix (1:34)	1,5 µl
H ₂ O	1 µl
Verdünnte cDNA	5 µl

Programm	Temperatur	Zeit	
Hitzeaktivierung	95°C	20 sek	
PCR	95°C	3 sek	} 45 x
	60°C	30 sek	

Für die Auswertung wurde die LightCycler480 Software (Version 1.5) verwendet. Die Expression bestimmter Transkripte wurde durch relative Quantifizierung („advanced relative quantification“) bestimmt, d.h. durch Vergleich der Expression des Zielgens mit jener eines Referenzgens. Als Referenz wurde ein Gen gewählt, dessen Transkript-Kopienzahl unter allen Versuchsbedingungen konstant bleibt (die 140kd Untereinheit der RNA Polymerase II, nachfolgend: RNA pol II 140). Die zuvor für jedes Primerpaar ermittelten Effizienzen wurden bei der Analyse berücksichtigt.

2.3.2.6 Standardkurven

Standardkurven wurden unter der Verwendung von cDNA Verdünnungsreihen generiert. Sie wurden dazu verwendet, um sowohl die Effizienz der verwendeten Primerpaare als auch den Konzentrationsbereich zu bestimmen, in welchem die Primerpaare eine lineare Amplifikation gewährleisten.

2.3.3 Zellkultur

2.3.3.1 Kultivierung und Passagierung

Drosophila SL2 Zellen wurden bei 26°C in Zellkulturflaschen (250 ml, Greiner) in Schneider's *Drosophila* Medium (GIBCO) kultiviert und alle 5-6 Tage 1:5 verdünnt. SL2 Zellen wurden alle 2 Monate verworfen und durch frisch aufgetaute, neuere Zellen ersetzt.

2.3.3.2 Cryokonservierung von Zellen

Drosophila SL2 Zellen können in einem Gemisch aus 10% DMSO, 60% FCS und 30% Schneider's Medium über längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

$2-3 \times 10^6$ Zellen wurden hierfür in Cryo-Röhrchen (Roth) zunächst für 1 h bei -20°C, anschließend ÜN bei -80°C langsam abgekühlt und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Wiederverwendung der Zellen wurden diese in einem warmen Wasserbad aufgetaut, mit 30 ml Schneider's Medium gewaschen und in Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt.

2.3.3.3 Transfektion von SL2 Zellen

Alle Transfektionen wurden in 6-Loch-Platten nach Herstellerangaben durchgeführt (Effectene Transfection Kit, Qiagen). 2×10^6 SL2 Zellen wurden am Tag vor der Transfektion ausgesät und mit 2 µg DNA transfiziert. Für die Herstellung stabiler Zelllinien wurde zusätzlich ein Plasmid im Verhältnis 1:10 co-transfiziert, welches eine Antibiotika-Resistenz vermittelt (Puromycin). Die auf diese Weise transfizierten Zellen wurden zunächst in Schneider's Medium bei 26°C kultiviert, nach 48 Stunden wurde diesem Medium Puromycin (10 µg/ml) zugesetzt. Die Selektion auf Puromycin-resistente Zellen nahm in etwa 3 Wochen in Anspruch. In dieser Zeit wurde das Medium mehrmals ausgetauscht.

Zellen	DNA	EC-Puffer	Enhancer	Effectene	Volumen
2×10^6	2 μg	300 μl	16 μl	50 μl	3 ml

2.3.3.4 RNAi in *Drosophila* SL2 Zellen

Logarithmisch wachsende *Drosophila* SL2 Zellen wurden bei 300 x g für 3 min sedimentiert, um das Serum enthaltende Medium zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in Schneider's Medium (ohne Serum) auf $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ verdünnt und 0,8 ml dieser Zellsuspension in 6-Loch-Platten ausgesät. 10 μg dsRNA (2.3.1.11) wurden in 200 μl Schneider's Medium (ohne Serum) verdünnt und langsam zu den bereits ausgesäten Zellen pipettiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der dsRNA zu gewährleisten, wurden die Zellen für 10 min leicht geschüttelt (RT) und anschließend bei 26°C inkubiert (50 min). Nach der Zugabe von 2 ml Serum enthaltenden Mediums wurden die Zellen für 3 Tage bei 26°C kultiviert, dann zusammen mit 7 ml Schneider's Medium in 10 cm Zellkulturschalen überführt und für weitere 4 Tage bei 26°C kultiviert.

Nach insgesamt 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und mit PBS gewaschen. Für Western Blot Analysen wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen verwendet, RNA für Expressions-Analysen wurde aus $2,5-5,0 \times 10^6$ Zellen isoliert.

2.3.4 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

2.3.4.1 Anzucht und Haltung

Die Anzucht von *Drosophila melanogaster* erfolgte in Plastikröhrchen mit Standardmedium.

Stammlinien wurden bei RT gehalten und einmal pro Woche in neue Gefäße umgesetzt. Für die Präparation von Polytäanchromosomen aus Speicheldrüsen wurden die Fliegen bei 18°C kultiviert und alle 3 Tage in neue Gefäße überführt.

Zur Sammlung befruchteter Eier wurden die Fliegen auf Apfelsaftagarplatten zusammen mit etwas Hefepaste (750 ml Wasser, 4,2 ml Propionsäure, 450 g Trockenhefe) kultiviert.

Standardmedium (10 l) Apfelsaftplatten (200 Platten)

800 g Malzin	5 l Apfelsaft
213 g Rübensirup	0,75 l Zuckersirup
80 g Agar	500 g Agar
143 g Trockenhefe	420 ml Nipagin (10% in 70% Ethanol)
100 g Sojamehl	11,5 l Wasser
800 g Maismehl	
63 ml Propionsäure	
ad 10 l Wasser	

2.3.4.2 Kreuzungen

Um Jungfrauen für Kreuzungen zu erhalten, wurden die Fliegenbehältnisse am Abend von sämtlichen adulten Fliegen befreit und die sich entwickelnden Kulturen bei 18°C ÜN gehalten. Am Morgen wurden diese für eine Stunde bei 25°C kultiviert; die bis zu diesem Zeitpunkt geschlüpften adulten, weiblichen Fliegen wurden abgesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei 18°C gehalten. Da sich Weibchen die ersten 10-12 h nach dem Schlüpfen nicht paaren, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei sämtlichen ÜN geschlüpften Weibchen um Jungfrauen handelt. Stärker pigmentierte, ältere Weibchen wurden zur Sicherheit verworfen. Für Kreuzungen wurden i.d.R. 5 Jungfrauen sowie 8-10 Männchen verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *hp1c/Tm3* Fliegen generiert. Hierzu wurden männliche Fliegen des Genotyps $w^{1118}; PBac\{WH\}HP1c^{f04929}/TM6B$ mit weiblichen Fliegen des Genotyps *TM3/TM6B* gekreuzt.

2.3.5 Proteinbiochemische Methoden

2.3.5.1 Kernextrakte

Kernextrakte wurden aus logarithmisch wachsenden SL2 Zellen gewonnen – i.d.R. wurden hierfür mind. 3×10^9 -Zellen verwendet, die über einen Zeitraum von 4-5 Wochen expandiert wurden.

Nach der Ernte der Zellen (3000 g, 15 min, 4°C) wurden diese zweimal in kaltem PBS gewaschen, das Zellvolumen (PCV) bestimmt (bei 3×10^9 -Zellen ca. 4 ml) und in 3 PCV hypotonem Puffer A aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Dounce Homogenisators homogenisiert. Zur Stabilisierung der Kerne wurde die Salzkonzentration mit 1/10 Vol. Puffer B erhöht. Zytoplasmatische Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (8000 g, 15 min, 4°C) und das Kernpellet in 2 PCVs Puffer AB resuspendiert (1/10 Vol. Puffer B in Puffer A). Kernproteine wurden mit 400 mM NH_4SO_4 extrahiert (20 min, 4°C, Drehrad) und anschließend durch Ultrazentrifugation (40000 g, 1,5 h, 4°C) von DNA und Kernmembranen abgetrennt. Die solubilisierten Kernproteine wurden mit Ammoniumsulfat gefällt (0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /ml Kernextrakt), in 0,25 PCV Puffer C resuspendiert und dialysiert (2 x 2 h, 4°C). Die Proteinkonzentration wurde photospektrometrisch bestimmt, in der Regel lag diese bei ca. 10-20 mg/ml. Ausgefällene Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (17500 g, 15 min, 4°C), der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Alle Puffer enthielten die Proteaseinhibitoren Pepstatin, Leupeptin, Aprotinin und PMSF.

Buffer A	BufferB	Buffer C
1 mM Hepes pH 7,6	50 mM Hepes pH 7,6	25 mM Hepes pH 7,6
15 mM KCl	1 M KCl	150 mM KCl
2 mM MgCl_2	30 mM MgCl_2	12,5 mM MgCl_2
0,1 mM EDTA	0,1 mM EDTA	0,1 mM EDTA
1 mM DTT	1 mM DTT	10% Glycerin 1 mM DTT

2.3.5.2 Ammoniumsulfatfällung

Proteine aus Kernextrakten wurden zunächst durch Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert. Hierzu wurden 0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro ml Kernextrakt langsam, über einen Zeitraum von 5 min zugegeben. Um Proteine möglichst quantitativ auszufällen, wurde der Ansatz weitere 20 min gerührt.

2.3.5.3 FLAG Immunpräzipitation aus Kernextrakten

Für FLAG Immunpräzipitationen wurden mit Puffer C äquibrierte FLAG-beads (SIGMA) mit Kernextrakten gemischt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Typischerweise wurden 200 µl Kernextrakt (aus ca. 6×10^8 Zellen unter den gegebenen Bedingungen) sowie 25 µl FLAG-beads pro Ansatz verwendet

Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch mehrere Waschschriffe entfernt (3 x Puffer BC300, 2 x ATP-Wash Puffer, 1 x Puffer BC150; jeweils mit 0,5 ml für 5 min). Spezifisch gebundene Proteine wurden anschließend 2 h mit FLAG Peptid eluiert (0,5 mg/ml in Puffer BC150).

Alle Puffer enthielten die Proteaseinhibitoren Pepstatin, Leupeptin, Aprotinin und PMSF.

BC1000 Puffer	BC0 Puffer	ATP-Wash
25 mM Hepes pH 7,6	25 mM Hepes pH 7,6	25 mM Hepes pH 7,6
1 M KCl	1 mM MgCl_2	150 mM KCl
1 mM MgCl_2	0,1 mM EDTA	10 mM MgCl_2
0,1 mM EDTA	0,5 mM EGTA	0,3 mM ATP
0,5 mM EGTA		

2.3.5.4 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* BL21 Gold (DE3) pLysS exprimiert (2.1.3). Die mit den entsprechenden Plasmiden (i.d.R. pGEX-Vektoren) transformierten Zellen wurden zunächst in einem Gesamtvolumen von 500 ml bis zu einer OD von 0,6 bei 37°C kultiviert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde anschließend durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h wurden die Zellen geerntet (5000 g, 15 min,

4°C), in 10 ml CB200 aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, aufgetaut und durch Sonifizierung auf Eis aufgeschlossen (4 x 30 sek, 50% Amplitude, Branson Sonifier). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (17500 g, 30 min, 4°C).

Zur Isolierung der GST-Fusionsproteine wurde der Überstand mit Glutathion Sepharose 4B beads (GE Healthcare, voräquilibriert in CB200) gemischt und für 1 h bei 4°C inkubiert (Drehrad). Die Menge der eingesetzten Glutathion Sepharose beads wurde hierbei durch die Menge an aufzureinigendem Protein vorgegeben (Kapazität ca. 10 mg/ml). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch stringente Waschschrte entfernt (2 x CB1000, 2 x CB500, 1 x CB200; jeweils für 5 min). GST-Fusionsproteine wurden mit reduziertem Glutathion eluiert (Elutionspuffer). Expression und Reinigung der Proteine wurde durch SDS-PAGE kontrolliert.

Alle Puffer enthielten die Proteaseinhibitoren Pepstatin, Leupeptin, Aprotinin und PMSF.

CB1000	CB0	Elutionspuffer
20 mM TRIS pH 8	20 mM TRIS pH8	200 mM TRIS pH 8
1 M NaCl	0,5 mM EDTA	200 mM NaCl
0,5 mM EDTA		40 mM reduziertes Glutathion

2.3.5.5 GST-Pulldowns

Für GST-Pulldowns wurden ca. 10 µg GST-Fusionsproteine an Glutathion Sepharose 4B beads gebunden (20 µl) und gewaschen (2.3.5.4). *In vitro* translatierte, S³⁵-markierte Proteine (2.3.5.6) wurden in Pulldown Puffer verdünnt und in einem Gesamtvolumen von 200 µl für 1 h zusammen mit den beads bei 4°C inkubiert (Drehrad). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch mehrere Waschschrte entfernt (4 x CB200, jeweils mit 0,5 ml und für 5 min). Gebundene Proteine wurden durch Erhitzen in Lämmli Puffer eluiert, über SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

Pulldown Puffer

125 µg/ml BSA

25 µg/ml Ethidiumbromid

in CB150

2.3.5.6 *In vitro* Translation

In vitro translatierte Proteine wurden mit Hilfe des TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) hergestellt. Die entsprechenden Gene wurden hierzu in Plasmide kloniert, die eine Expression unter der Kontrolle des T7 Promotors erlauben. Für einen Reaktionsansatz (50 µl) wurden 2 µg zirkuläre Plasmid-DNA sowie 10 µCi eines S³⁵ markiertes Methionin/Cystein Mix verwendet.

2.3.5.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Denaturierende SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE) wurde zur Auftrennung von komplexen Proteingemischen verwendet (Laemmli, 1970). Proteine wurden anschließend entweder angefärbt oder aber auf Nitrocellulose-Membranen transferiert, um spezifische Proteine mit Hilfe von Antikörpern detektieren zu können.

Separation gel (10%)	Stacking gel (5%)	SDS Running buffer
2,4 ml H ₂ O	1,525 ml H ₂ O	25 mM TRIS
2,0 ml Rotiphorese	340 µl Rotiphorese	190 mM Glycin
1,5 ml 1,5 M TRIS pH 8,8	125 µl 1M TRIS pH 6,8	0,1% (w/v) SDS
30 µl SDS 20% (w/v)	10 µl SDS 20% (w/v)	
30 µl APS 20% (w/v)	10 µl APS	
3 µl TEMED	2 µl TEMED	

4 x Lämmli

200 mM TRIS pH 6,8

8% (w/v) SDS

40% (v/v) Glycerin

0.2% (w/v) Bromphenol Blau

4.2% (v/v) β-Mercaptoethanol

2.3.5.8 Commassie Färbung

SDS-PAA Gele wurden für 20 min fixiert und gefärbt (Färbelösung). Gele wurden anschließend mit Entfärbelösung entfärbt.

Für massenspektrometrische Analysen wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel mit Hilfe eines sauberen Skalpell aus geschnitten und bis zur weiteren Analyse bei 4°C in H₂O gelagert.

Färbelösung

50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (G-250)

Entfärbelösung

10% Essigsäure

2.3.5.9 Massenspektrometrie

Alle massenspektrometrischen Analysen wurden durch das Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) der LMU München durchgeführt

2.3.5.10 Western Blot

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bevorzugt eine Dry Blot Methode verwendet (Sambrook et al., 2001). Dieses iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen) erlaubt einen effizienten und reproduzierbaren Transfer von kleinen und mittelgroßen Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen innerhalb von 7 Minuten.

Da sich der Transfer größerer Proteine (>170kd, zum Beispiel. Woc, Row) bei Verwendung dieses Systems als schwierig erwies, wurde in diesen Fällen ein Wet Blot System (Sambrook et al., 2001) verwendet. Proteine wurden über 1,5 h bei 100 V und 4°C auf Nitrocellulose-Membranen transferiert.

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen zunächst für 30 min in 5% Milchpulver (in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert, um nicht-spezifische Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert (2 h bei RT oder ÜN bei 4°C). Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch Waschen entfernt (3 x in PBST, jeweils für

5 min) und die Membran mit einem fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper inkubiert (30 min, RT). Nicht gebundener Zweitantikörper wurde wiederum durch Waschen entfernt (3 x in PBST, jeweils für 10 min). Auf diese Weise fluoreszenzmarkierte Proteine wurden mit Hilfe des Odyssey Imaging Systems (Li-Cor) detektiert und gegebenenfalls quantifiziert.

Western Blot Puffer (Wet Blot)

25 mM TRIS

192 mM Glycin

0,02% (w/v) SDS

15% (v/v) Methanol

2.3.5.11 Herstellung von Kernextrakten aus *Drosophila*-Embryonen („TRAX“)

Zur Herstellung von Kernextrakten aus *Drosophila melanogaster* Embryonen wurden zunächst *Drosophila* Embryonen auf speziellen Nährplatten mit etwas Hefepaste über einen Zeitraum von 12 Stunden in Käfigen mit jeweils ca. 200.000 adulten Fliegen gesammelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese Platten bei 4°C gelagert – die Embryonen entwickeln sich bei dieser Temperatur nicht weiter. Embryonen wurden über ein Siebssystem mit kaltem Leitungswasser von Verunreinigungen befreit und in ein Becherglas überführt. Überschüssiges Wasser wurde abgekippt, das Volumen der abgesunkenen Embryonen abgeschätzt und mit ca. 2 Vol. des Embryo Wasch Puffers aufgefüllt. Durch Zugabe von 60 ml Natriumhypochlorid pro 200 ml Embryo-Suspension wurde die Chorionhülle der Embryonen unter ständigem Rühren entfernt. Je nach Alter des verwendeten Hypochlorids nahm dies mindestens 2,5min, höchstens aber 3,5min in Anspruch. Zur Entfernung des Natriumhypochlorids wurden die Embryonen unter Verwendung des Siebsystems mit kaltem Leitungswasser intensiv gewaschen (ca. 5-10 min), mit Embryo Wasch Puffer (ca. 2 Vol.) in ein Becherglas überführt und auf Eis sedimentiert. Überschüssiger Puffer (inklusive der abgelösten Chorionhüllen) wurde entfernt und das Verfahren unter der Verwendung einer 0,7% NaCl-Lösung 2 mal wiederholt. Die gewaschenen, dechorionierten Embryonen wurden über einen Büchnertrichter getrocknet, in 6 ml kaltem Nul Puffer pro Gramm Embryos aufgenommen und mit Hilfe eines Yamoto Homogenisators bei 4°C aufgeschlossen (6 x, 1500 rpm). Das Lysat wurde durch zwei Lagen Miracloth filtriert und abzentrifugiert

(7000 g, 15 min, 4°C). Das Kernpellet wurde vorsichtig in kaltem Puffer Null resuspendiert, ohne dabei den Dotter aufzunehmen. Kernproteine wurden anschließend mit 400 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7,9) für 20 min extrahiert (Drehrad) und der Extrakt durch Ultrazentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt (90000 g, 1,5 h, 4°C). Die Kernproteine wurden mit Ammoniumsulfat ausgefällt (0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /ml Extrakt), in 0,2 ml HEMG40 Puffer pro g Embryonen resuspendiert und anschließend gegen HEMG40 Puffer (2 x), dann gegen HEMG100 Puffer dialysiert (3 x). Ausgefällene Proteine wurde durch Zentrifugation abgetrennt (17500 g, 15 min, 4°C), der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Nul Puffer	Null Puffer	HEMG Puffer
15 mM Hepes pH 7,6	15 mM Hepes pH 7,6	25 mM Hepes pH 7,6
10 mM NaCl	110 mM NaCl	40 mM NaCl (bzw 100 mM)
5 mM MgCl_2	5 mM MgCl_2	12,5 mM MgCl_2
0,1 mM EDTA	0,1 mM EDTA	0,1 mM EDTA
0,5 mM EGTA	1 mM DTT	10% Glycerin
350 mM Sucrose		1 mM DTT
1 mM DTT		

Embryo Waschpuffer

0,7% (w/v) NaCl

0,05% (v/v) Triton X-100

2.3.5.12 Co-Immunopräzipitation aus TRAX (0-12 h)

Der Kernextrakt aus frühen *Drosophila* Embryonen wurde zunächst mit der verwendeten Matrix für 1 h bei 4°C vorinkubiert (20 µl/200 µl TRAX), um Proteine zu entfernen, die nicht-spezifisch an die Matrix binden. Als Matrix wurde i.d.R. Protein G Sepharose verwendet, welche im Gegensatz zu Protein A Sepharose eine Immunpräzipitation von monoklonalen Ratten-Antikörpern erlaubt und darüber hinaus

auch eine starke Affinität hinsichtlich der anderen in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zeigt.

Die verwendeten Antikörper wurden zunächst an die Matrix (25 µl) gebunden (1 h, 4°C, Drehrad), gewaschen (3 x in CB200, jeweils für 5 min und mit 0,5 ml) und mit 30-100 µl TRAX inkubiert (1 h, 4°C). Nicht-spezifisch gebundene Proteine wurden wie zuvor beschrieben durch Waschen entfernt, spezifische Immunkomplexe durch Aufkochen in Lämmli Puffer eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Western Blots analysiert.

2.3.6 Immunfluoreszenz

2.3.6.1 Färbung polytärer Speicheldrüsenchromosomen aus *D. melanogaster*

Speicheldrüsen aus *Drosophila melanogaster* Larven (3rd Instar) wurden in 0,7% NaCl isoliert (maximal 2 min) und für 8 min bei RT mit 45% Essigsäure und 1,85% Paraformaldehyd (in PBS) fixiert (in 30 µl auf 24 x 24 mm Deckgläsern). Das Deckglas wurde mit Hilfe eines poly-L-Lysin behandelten Objektträgers aufgenommen, umgedreht und die Kerne durch sanftes Tippen mit der Spitze eines Bleistifts aufgebrochen. Die polytären Speicheldrüsenchromosomen wurden anschließend mit Hilfe des Bleistifts sowie durch vorsichtiges Drehen des Deckglases gespreitet. Der Erfolg der Präparation wurde im Phasen-Kontrast-Mikroskop überprüft (Lavrov et al., 2004). Erfolgreiche Präparationen wurden mit dem Deckglas nach unten auf mehreren Lagen Whatman-Papier gelegt und leicht angepresst, um überschüssige Fixierlösung zu entfernen. Die Lage des Deckglases auf dem Objektträger wurde mit einem Diamantstift markiert, die Präparation in flüssigen Stickstoff getaucht und das Deckglas mit Hilfe einer Rasierklinge entfernt. Die präparierten Chromosomen wurden bis zur weiteren Verwendung in PBS auf Eis gelagert.

Polytänpräparationen wurden zunächst 10 min bei RT in PBS + 1% Triton X-100 inkubiert, kurz in PBS gewaschen und für 30 min bei RT in PBS + 5% Milchpulver geblockt. Präparate wurden mit den entsprechend verdünnten Primärantikörpern überschichtet (20 µl), mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt und ÜN bei 4°C in Feuchtkammern inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen

entfernt (3 x 5 min bei RT). Präparate wurden mit den entsprechenden, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern für 1 h bei RT inkubiert und gewaschen (3 x 5 min in PBS). DNA wurde durch Inkubation mit DAPI (0,5 µg/ml in PBS, 4 min, RT) angefärbt, überschüssiges DAPI durch Waschen in PBS entfernt (2 x 5 min) und die Präparate schließlich in einer Lösung aus 1,5% n-Propylgallat in 40% Glycerin eingebettet und bei 4°C gelagert.

2.3.6.2 Färbung von *D. melanogaster* SL2 Zellen

Ca. 1×10^6 SL2 Zellen in 200 µl Schneider's Medium wurden auf runden Deckgläsern (15 mm x 15 mm) ausgesät und für 2 h bei 26°C in 6-Loch-Platten inkubiert. Die adherierten Zellen wurden kurz in PBS gewaschen, auf Eis mit 2% Paraformaldehyd (in PBS) für 7,5 min fixiert und mit 0,25% Triton X 100 (in PBS + 1% Paraformaldehyd) auf Eis für 7,5 min permeabilisiert. Die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 2% BSA und 5% Standard Eselserum (in PBS) für 1 h bei RT abgesättigt. Die Zellen wurden mit 30 µl Primärantikörper überschichtet, mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt und ÜN bei 4°C inkubiert. Um ein Austrocknen der Präparationen zu verhindern, wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt (3 x 5 min in PBS bei RT). Präparate wurden mit den entsprechenden, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern für 1 h bei RT inkubiert und gewaschen (3 x 5 min in PBS). DNA wurde durch Inkubation mit DAPI (0,5 µg/ml in PBS, 4 min, RT) angefärbt, überschüssiges DAPI durch Waschen in PBS entfernt (2 x 5 min) und die Präparate in einer Lösung aus 1,5% n-Propylgallat in 40% Glycerin eingebettet und bei 4°C gelagert.

2.3.6.3 Analyse von Immunfärbungen

Immunfärbungen wurden mit Hilfe eines Axiovert200M Mikroskops (Zeiss) analysiert, welches an ein ProGres C14 CCD Kamerasystem (Jenoptik) gekoppelt ist. Aufgenommene Bilder wurden mit Adobe Photoshop und Adobe Illustrator (CS4, Adobe Systems) bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 HP1 Isoformen

In vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass eine effiziente Bindung von HP1a an *in vitro* methyliertes Chromatin nur im Zusammenspiel mit weiteren Proteinfaktoren wie ACF1 und Su(var)3-9 möglich ist (Eskeland et al., 2006).

Aufgrund der offensichtlichen Lokalisationsunterschiede zwischen den einzelnen HP1 Isoformen in *Drosophila* Kc Zellen (Greil et al., 2003; Smothers und Henikoff, 2001) war somit die Vermutung naheliegend, dass verschiedene HP1 Isoformen durch spezifische Interaktoren zu bestimmten Stellen im Genom dirigiert werden können.

3.1.1 HP1 isoformen binden H3K9 methylierte Peptide

Da H3K9 methylierte Histone sowie HP1a insbesondere in heterochromatischen Regionen angereichert sind (Fanti et al., 2003; Greil et al., 2003), wurde zunächst jedoch überprüft, ob die observierten Unterschiede hinsichtlich der Lokalisierung der

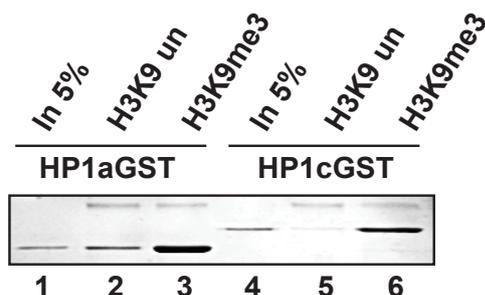


Abbildung 12 HP1 Isoformen binden H3K9 trimethylierte Peptide. Rekombinante HP1 Isoformen wurden mit biotinylierten H3 Peptiden (AA 1-21) inkubiert, welche entweder unmodifiziert (H3K9 un) oder aber an Lys9 tri-methyliert waren (H3K9 me3). Spezifische Protein-Peptid Komplexe wurden isoliert und durch SDS-PAGE analysiert.

einzelnen HP1 Proteine eventuell auch auf Unterschieden in der Bindung von H3K9 methylierten Histonen beruhen könnten.

Peptide Pulldown Experimente mit rekombinanten GST-Fusionsproteinen zeigten allerdings, dass H3K9 methylierte Peptide sowohl von HP1a als auch von HP1c stärker gebunden werden als von nicht modifizierten Kontrollpeptiden (Abbildung 12, vgl. Spur 2 und 5 mit Spur 3 und 6). Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die Erkennung von H3K9 Methylierungen *per se* kein Rekrutierungssignal

für die eine oder andere Isoform sein kann, so dass die Lokalisation der verschiedenen HP1 Proteine von weiteren Faktoren abhängig sein muss.

3.1.2 Isolierung Isoform-spezifischer HP1 Proteinkomplexe

Um jene Proteinfaktoren zu identifizieren, welche für die Rekrutierung von HP1b und HP1c von entscheidender Bedeutung sind, wurden zunächst stabile *Drosophila* Schneider Zelllinien generiert, welche die verschiedenen, mit einem FLAG-Tag versehenen HP1 Isoformen unter der Kontrolle eines Actin5c Promotors exprimieren.

Die Expression der Transgene wurde durch Western Blotting überprüft (nicht gezeigt). Isoform-spezifische Komplexe wurden durch FLAG Immunpräzipitation aus Kernextrakten der stabil transfizierten Zelllinien isoliert und massenspektrometrisch (LC-MS/MS, MALDI-TOF) analysiert (Abbildung 13). Zusammen mit HP1a konnte eine Vielzahl von Proteinen gereinigt werden, welche teilweise auch bereits als Interaktoren dieser Isoform in der Literatur beschrieben sind (so zum Beispiel die Histon-Methyl-Transferase Su(var)3-9). Erste biochemische Analysen machten deutlich, dass HP1a dabei in mehreren Sub-Komplexen vorliegt (nicht gezeigt).

Der Fokus dieser Arbeit wurde jedoch zunächst auf die Charakterisierung von HP1b und HP1c gerichtet. Für beide Paraloge wurden überraschenderweise exakt dieselben Interaktoren isoliert, Woc, Row und Ubiquilin (Abbildung 13). Diese Faktoren konnten weder in FLAG-HP1a Immunpräzipitationen, noch in Kontroll-Immunpräzipitationen aus Kernextrakten nicht transfizierter Zellen nachgewiesen werden.

Woc (*without children*) ist ein essentielles Zn-Finger Protein, welches eine wichtige Rolle beim Schutz von Telomeren einnimmt (Raffa et al., 2005). Darüber hinaus stimuliert Woc die Ecdyson-Biosynthese während der frühen Embryonalentwicklung; woc Mutanten zeigen deutlich verminderte Ecdyson-Spiegel und sterben somit während des 3rd Instar Larven-Stadiums. Durch die Co-Lokalisation von Woc mit der RNA Polymerase II während der frühen Phase der Transkription wurde daher gemutmaßt, dass Woc als Transkriptionsaktivator fungiert (Raffa et al., 2005; Warren et al., 2001; Wismar et al., 2000).

Studien in Säugersystemen konnten zudem die Woc Orthologe ZNF198, ZNF260 und ZNF261 mit der transkriptionellen Regulation bestimmter Gene in Verbindung bringen. So assoziieren ZNF198 und ZNF261 mit dem transkriptionellen Co-Repressor-Komplex LCH (LSD1-CoREST-HDAC1) (Gocke und Yu, 2008). Für ZNF198 konnte zudem eine Interaktion mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym hRad6 gezeigt werden, einem Faktor, der zusammen mit der Ubiquitin-Ligase Bre1 H2B ubiquitinieren kann und somit bei der Initiation der Transkription bzw. bei der Transkriptions-Elongation beteiligt zu sein scheint (Fleming et al., 2008; Kim und Roeder, 2009; Xiao et al., 2005)

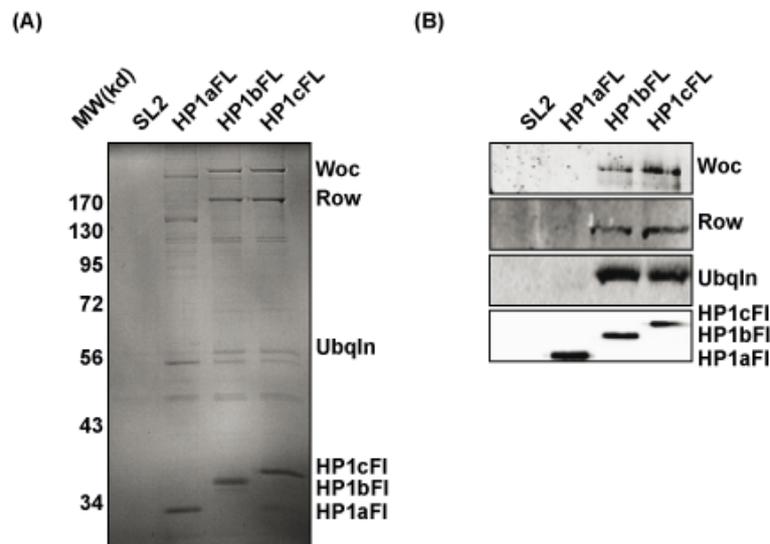


Abbildung 13 Isolierung Isoform-spezifischer Komplexe aus Kernextrakten. Affinitäts-Reinigung mit anti-FLAG Antikörpern aus Kernextrakten von nicht-transfizierten SL2 Zellen bzw. von SL2 Zellen, welche stabil mit einem Expressionsvektor für HP1a, HP1b oder HP1c transfiziert wurden. Die einzelnen Komplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel. Proteinbanden wurden durch MALDI-TOF identifiziert bzw. über (B) Western Blotting nachgewiesen.

Mitglieder der Ubiquilin-Familie zeigen eine partielle Homologie zu Ubiquitin (Mah et al., 2000). Der Ubiquitin-ähnliche (*Ubiquitin-like*, UBL) N-Terminus bindet nicht-kovalent an Ubiquitin-Interaktions-Motive (UIMs), u.a. in Untereinheiten des Proteasoms (Walters et al., 2002). Die C-terminale Ubiquitin-assoziierte (*Ubiquitin associated*, UBA) Domäne interagiert zudem mit oligo-ubiquitinierten Substraten (Raasi und Wolf, 2007) und mehrere Untersuchungen legen daher nahe, dass Ubiquiline eine Funktion als „Shuttle-Faktoren“ übernehmen könnten, welche ubiquitinierte Substrate zum Proteasom dirigieren (Chen und Madura, 2002; Ko et al., 2004).

Der HP1c/HP1b-Interaktor Row (*relative of woc*) zeigt keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen. Die Domänen-Struktur sowie deren Organisation deutet jedoch auf eine transkriptionelle Rolle hin; wie Woc enthält auch Row mehrere Zn-Finger sowie zwei AT-Hooks – ein Motiv, welches in zahlreichen DNA-bindenden Proteinen identifiziert werden konnte (Aravind und Landsman, 1998). Die C-terminale Domäne ist zudem durch einen Glutaminreichen Abschnitt gekennzeichnet und ähnelt somit den Transaktivierungsdomänen einiger Transkriptionsfaktoren (Triezenberg, 1995).

3.1.3 Generierung Isoform-spezifischer Antikörper

Um Funktion und Lokalisation der Komplexe analysieren zu können, wurden Isoform-spezifische, monoklonale Ratten-Antikörper (in Kollaboration mit E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München) generiert. Für die Immunisierung wurden mit einem GST-Tag versehene, rekombinante HP1 Proteine verwendet.

Primärüberstände wurden zunächst in Western Blots, Immunpräzipitationen und in Immunfluoreszenz-Experimenten getestet. Die besten Klone wurden stabilisiert und erneut überprüft. Sowohl für HP1c als auch für HP1b konnten auf diese Weise Antikörper generiert werden, welche die jeweiligen Isoformen spezifisch erkennen (Abbildung 14).

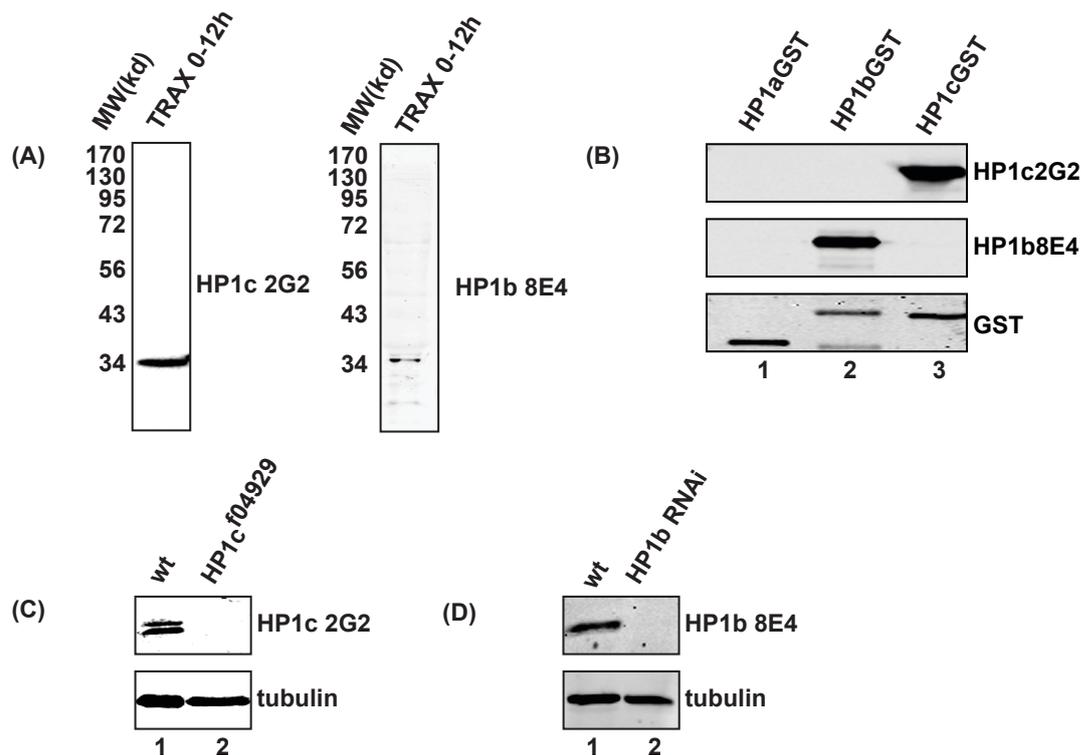


Abbildung 14 Generierung Isoform-spezifischer Antikörper. Western Blot Analysen unter Verwendung von (A) embryonalen Kernextrakten aus *Drosophila* (0-12 h, TRAX) und (B) rekombinanten, mit einem GST-Tag versehenen HP1 Isoformen. (C) HP1c Western Blot Analysen unter Verwendung von Zellextrakten aus Wildtyp Fliegen (Spur 1) bzw. Zellextrakten aus HP1c Mutanten Fliegen (Spur 2). (D) HP1b Western Blot Analysen unter Verwendung von Zellextrakten aus Wildtyp SL2 Zellen (Spur 1) bzw. aus Zellen, in welchen HP1b durch RNAi depletiert wurde (Spur 2). Tubulin diente in (C) und (D) jeweils als Ladekontrolle.

3.1.4 HP1b und HP1c interagieren mit Woc, Row und Ubiquilin *in vivo*

HP1b und HP1c spezifische Komplexe wurden aus einem System isoliert, in welchem eine Komponente des Komplexes (die jeweilige HP1 Isoform) überexprimiert wurde. Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Interaktionen lediglich dem artifiziellen System geschuldet sind, wurden die endogenen HP1 Isoformen aus embryonalen Kernextrakten unter Verwendung der Isoform-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Dadurch konnte in Western Blots gezeigt werden, dass sowohl Woc, Row und Ubiquilin *in vivo* mit HP1b und HP1c assoziiert sind. Darüber hinaus werden HP1b und HP1c co-präzipitiert, wohingegen HP1a weder in HP1b- noch in HP1c-spezifischen Komplexen vorhanden ist (Abbildung 15).

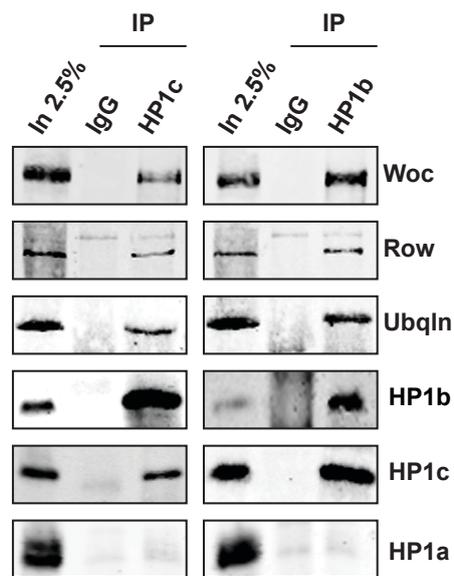


Abbildung 15 HP1b and HP1c assoziieren mit Woc, Row und Ubiquilin *in vivo*. Immunpräzipitationen (IP) aus Kernextrakten von *Drosophila* Embryonen (0-12 h, TRAX) unter Verwendung Isoform-spezifischer Antikörper. Co-präzipitierte Proteine wurden durch Western Blotting detektiert. Als Kontrolle wurden Antikörper des gleichen Isotyps verwendet (IgG). Input (In).

Für die Interaktion von murinem HP1b mit CAF1 und TIF1 β konnte gezeigt werden, dass hierzu die Dimerisierung der Chromo-Shadow-Domäne notwendig ist (Brasher et al., 2000; Thiru et al., 2004). Die Beobachtung, dass HP1b als auch HP1c mit identischen Faktoren interagieren und gleichzeitig co-präzipitiert werden können, legte daher den Schluss nahe, dass HP1 Isoformen möglicherweise als Heterodimere vorliegen könnten. Um diese Hypothese zu testen, wurden die einzelnen, mit unterschiedlichen Affinitätsmarkern versehenen HP1 Isoformen zunächst in einem *in vitro* System co-translatiert, auch um zu verhindern, dass die Ausbildung stabiler Homodimere mit der Bildung von Heterodimeren interferiert (Thiru et al., 2004). Jeweils eine dieser Isoformen wurde immunpräzipitiert und durch Western Blotting hinsichtlich der Co-Präzipitation der jeweils anderen Isoform analysiert. Hierbei konnten jedoch weder Heterodimere noch Homodimere der HP1 Isoformen detektiert werden (**Error! Reference source not found.**).

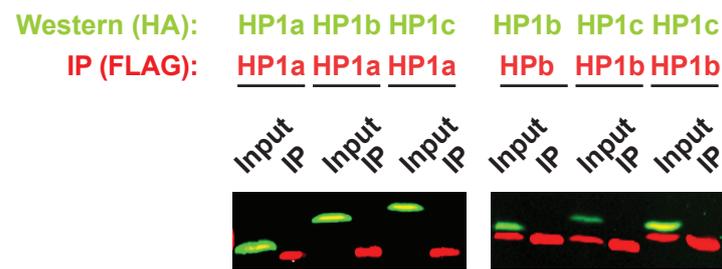


Abbildung 16 Co-Immunpräzipitationen mit verschiedenen HP1 Isoformen. Mit einem HA- bzw. FLAG-Tag versehene HP1 Isoformen wurden *in vitro* co-translatiert. HP1 Proteine wurden durch FLAG Immunpräzipitation isoliert (rot markiert). Assoziierte HP1 Isoformen wurden durch Western Blotting mit Hilfe eines anti-HA Antikörpers detektiert (grün markiert).

3.1.5 Charakterisierung der Isoform-spezifischen Interaktionen

Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten der Komplexe und den HP1 Isoformen wurden anschließend separat in GST Pulldown Experimenten analysiert.

Während für die bereits zuvor als HP1a Interaktoren beschriebenen ACF1 und Su(var)3-9 tatsächlich eine Isoform-spezifische Interaktion nachgewiesen werden konnte, wurde für *in vitro* translatiertes Row hingegen eine direkte, spezifische Interaktion mit HP1c gezeigt. Für Woc konnte eine solche Interaktion selbst dann nicht beobachtet werden, nachdem es mit Row co-translatiert wurde (Abbildung 17). Für *in vitro* translatiertes Ubiquilin konnte keine spezifische Interaktion mit einer der HP1 Isoformen demonstriert werden (nicht gezeigt).

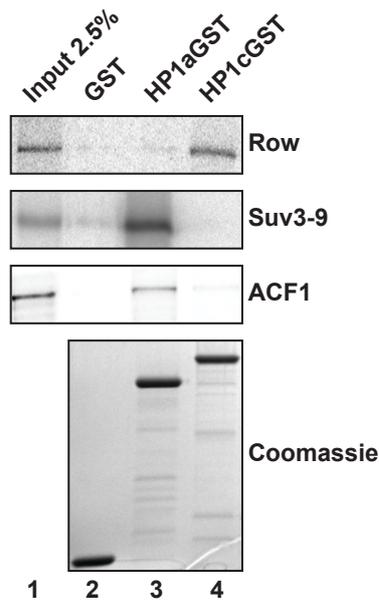


Abbildung 17 Isoform-spezifische Interaktionen von HP1 Proteinen. *In vitro* GST Pulldown Experimente mit GST (Spur 2), GST-HP1a (Spur 3) oder GST-HP1c (Spur 4) sowie *in vitro* translatiertem Row, Su(var)3-9 oder ACF1 (2.5% des eingesetzten Materials ist in Spur 1 gezeigt). Um zu kontrollieren, dass ähnliche Mengen rekombinanter Proteine verwendet wurden, wurde das SDS-Gel mit Coomassie gefärbt (untere Abbildung).

Um einen detaillierteren Einblick hinsichtlich des molekularen Aufbau der Isoform-spezifischen Komplexe zu bekommen, wurde zunächst die Interaktion von HP1c mit Woc näher untersucht.

Wie bereits einleitend erwähnt, sind sowohl die Chromo- als auch die Chromo-Shadow-Domäne in HP1 Isoformen hoch konserviert, mit Ausnahme jenes C-terminalen Bereiches in der Chromo-Shadow-Domäne, welcher für die HP1a-spezifische Interaktion mit zahlreichen Proteinfaktoren wie zum Beispiel Su(var)3-9 und ACF1 entscheidend ist (Brasher et al., 2000; Eskeland et al., 2006). Um zu überprüfen, ob dieser Bereich auch die HP1c-spezifische Interaktion mit Woc vermittelt, wurde eine entsprechende HP1c Mutante in SL2 Zelllinien exprimiert, deren C-terminaler Bereich in der Chromo-Shadow-Domäne durch jenen der HP1a Isoform ersetzt wurde. FLAG Reinigungen aus Kernextrakten dieser Zelllinien zeigten jedoch, dass zumindest die Interaktion von HP1c mit Woc hierdurch nicht beeinträchtigt wird (Abbildung 18A, HP1cEERLSW).

Auch die Mutation bzw. Deletion weiterer Bereiche in HP1c (Abbildung 18A) auf der einen, als auch HP1b (Abbildung 18B) auf der anderen Seite konnten keinen Aufschluss im Hinblick auf die Interaktion der beiden Isoformen mit Woc geben.

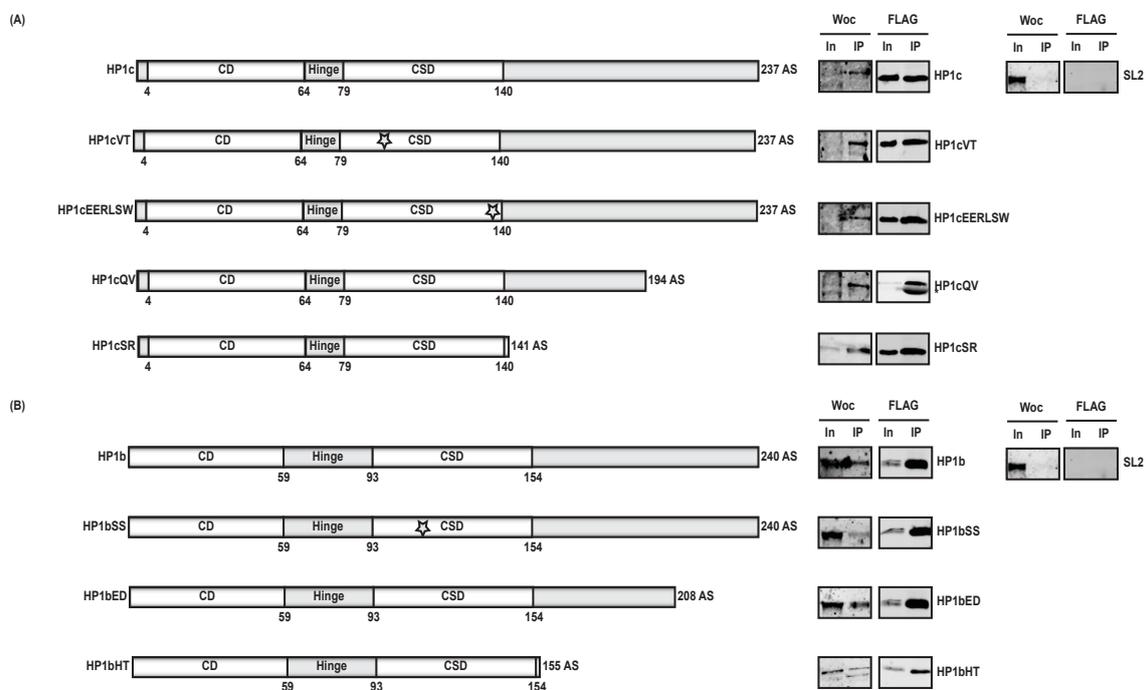


Abbildung 18 Kartierung der Interaktionsdomänen von HP1c und HP1b. Mit einem FLAG Tag versehene (A) HP1c bzw. (B) HP1b Mutanten wurden in *Drosophila* SL2 Zellen exprimiert und durch FLAG Reinigung aus Kernextrakten dieser Zelllinien isoliert. Die Interaktion dieser Mutanten mit Woc sowie die Effizienz der Immunpräzipitation wurde durch Western Blotting analysiert. Als Kontrolle wurde eine FLAG Reinigung aus nicht transfizierten SL2 Kernextrakten analysiert (rechts).

3.2 Zelluläre Lokalisation von HP1 Isoformen

Wie bereits diskutiert, ist eine effiziente Bindung von HP1a an H3K9 methyliertes Chromatin von zusätzlichen, HP1a-spezifischen Proteinfaktoren wie ACF1 und Su(var)3-9 abhängig. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde daher analysiert, inwiefern die zuvor identifizierten Interaktoren von HP1b und HP1c deren zelluläre Verteilung beeinflussen. Da zum Zeitpunkt dieser Analysen keine Antikörper gegen Ubiquilin und Row verfügbar waren, wurden die Untersuchungen daher zunächst auf Woc und HP1c beschränkt.

3.2.1 HP1c lokalisiert vorwiegend in euchromatischen Bereichen

Unter Verwendung des zuvor generierten, hochspezifischen Antikörpers (3.1.3) konnte gezeigt werden, dass HP1c in *Drosophila* SL2 Zellkernen vorwiegend in euchromatischen Bereichen lokalisiert. Dichter gepackte, heterochromatische Chromatinstrukturen (mit starker DAPI Färbung) sind dagegen von einer HP1c Färbung ausgenommen (Abbildung 19).

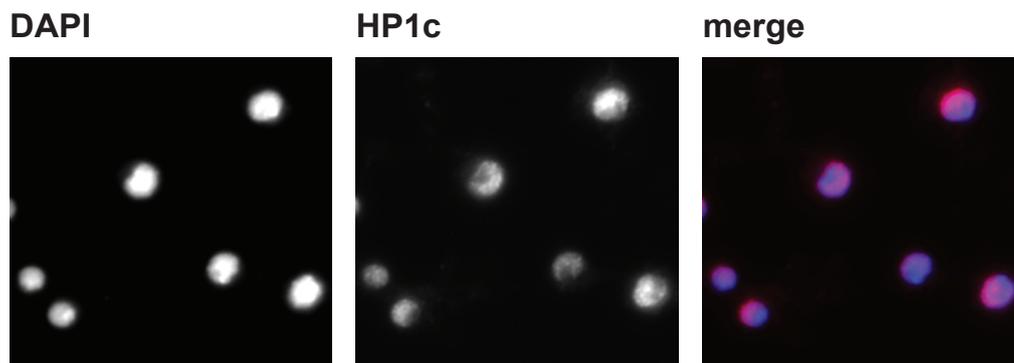


Abbildung 19 HP1c zeigt eine euchromatische Lokalisation in SL2 Zellen. HP1c Immunfärbungen von *Drosophila* SL2 Zellen. DNA wurde mit DAPI angefärbt. Im zusammengefügtten Bild (merge) ist die DAPI Färbung blau, die HP1c Färbung rot dargestellt.

3.2.2 HP1c ist mit Interbanden assoziiert

Um eine detaillierte Analyse der Lokalisation von HP1c vornehmen zu können, wurden Polytänochrosomen aus Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster* 3rd Instar Larven präpariert. Immunfärbungen mit HP1c-Antikörpern zeigte, dass HP1c v.a. in Interbanden lokalisiert, also jenen Bereichen, welche generell als Regionen aktiver Transkription angesehen werden (Gersh, 1975). Im Gegensatz hierzu ist, wie bereits einleitend beschrieben, HP1a v.a. in dicht gepackten, heterochromatischen Chromatinstrukturen (wie den zentromerischen Regionen) angereichert (Abbildung 20).

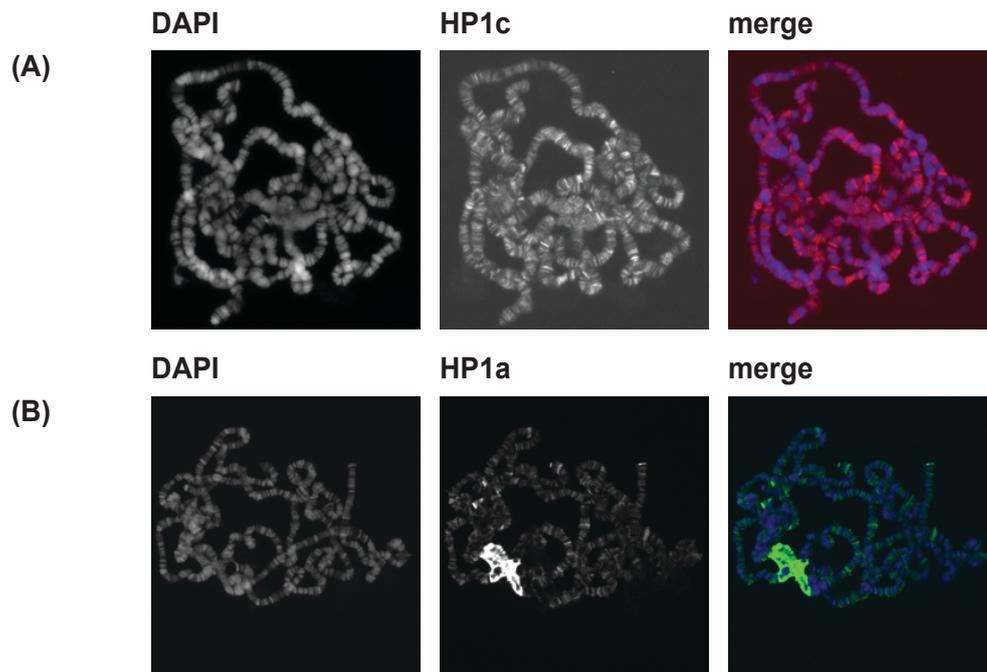


Abbildung 20 HP1c ist mit Euchromatin assoziiert. HP1c (A) und HP1a (B) Immunfärbungen von Polytäanchrosomen aus *Drosophila* 3rd Instar Larven. DNA wurde mit DAPI angefärbt. In den zusammengefügtten Bildern (merge) ist die DNA-Färbung in blau, die HP1a Färbung in grün sowie die HP1c Färbung in rot dargestellt.

3.2.3 Woc reguliert die Chromatin-Assoziation von HP1c

Wie bereits zuvor im Rahmen einer funktionellen Analyse gezeigt, lokalisiert auch der HP1c-spezifische Interaktor Woc bevorzugt in Interbanden (Raffa et al., 2005). Eine Co-Immunfärbung von Polytäanchrosomen aus *Drosophila melanogaster* Larven mit Antikörpern gegen HP1c und Woc zeigte schließlich, dass die Bindestellen für beide Proteine zu großen Teilen identisch sind (Abbildung 21). Dies deutete darauf hin, dass sowohl Woc als auch HP1c in einem gemeinsamen Chromatin-gebundenen Komplex vorliegen.

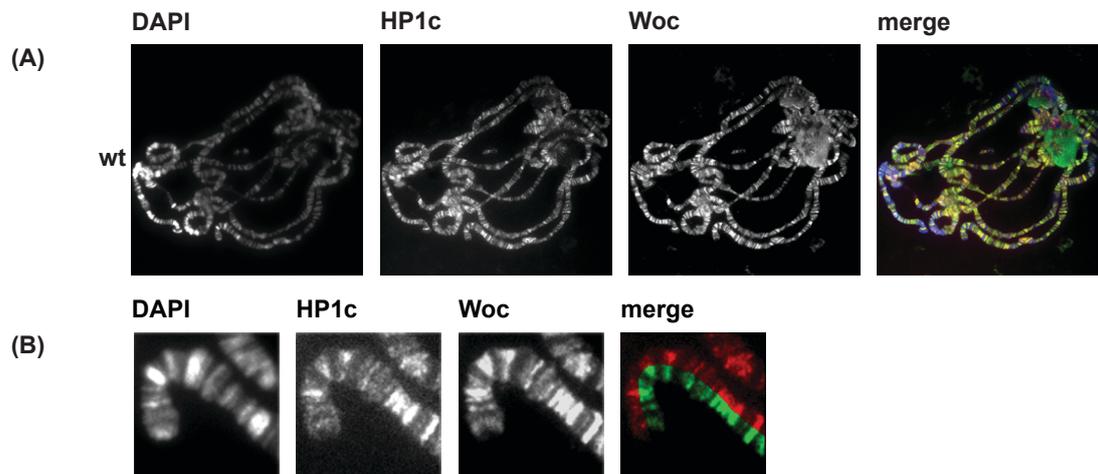


Abbildung 21 HP1c und Woc co-lokalisieren auf Polytänchromosomen. (A) HP1c und Woc Immunfärbungen von Polytänchromosomen aus *Drosophila* 3rd Instar Larven (Wildtyp, wt). DNA wurde mit DAPI angefärbt. In den zusammengeführten Bildern (merge) ist die DNA-Färbung in blau, die HP1c Färbung in grün sowie die Woc Färbung in rot dargestellt. (B) Eine Detailaufnahme aus den in (A) gezeigten Polytänpräparationen. Die Generierung eines geteilten Bildes verdeutlicht die nahezu perfekte Co-Lokalisation von Woc (rot) und HP1c (grün).

Um zu überprüfen, inwieweit Interaktionspartner wie Woc die Chromatin-Assoziation von HP1c beeinflussen, wurden zunächst Polytänchromosomen aus transheterozygoten *woc* Mutanten (*woc*²⁵¹/*woc*^{B111}) präpariert. 3rd Instar Larven dieser Mutanten sind gegenüber Wildtyp Larven kleiner, die isolierten Polytänchromosomen erscheinen aufgebläht. Dennoch lassen sich diese Präparationen mit Antikörpern wie zum Beispiel dem heterochromatischen Markerprotein HP2 anfärben. HP1c konnte in diesem genetischen Hintergrund jedoch nicht detektiert werden, was darauf hindeutete, dass zumindest Woc für die Rekrutierung von HP1c bzw. dessen Assoziation mit Chromatin von entscheidender Bedeutung ist (Abbildung 22A). Umgekehrt hat das Fehlen von HP1c keinen Einfluss auf die Chromatin-Assoziation von Woc, wie durch Immunfärbungen von Polytänchromosomen gezeigt werden konnte, welche aus 3rd Instar Larven homozygoter *hp1c* Mutanten präpariert wurden (Abbildung 22B).

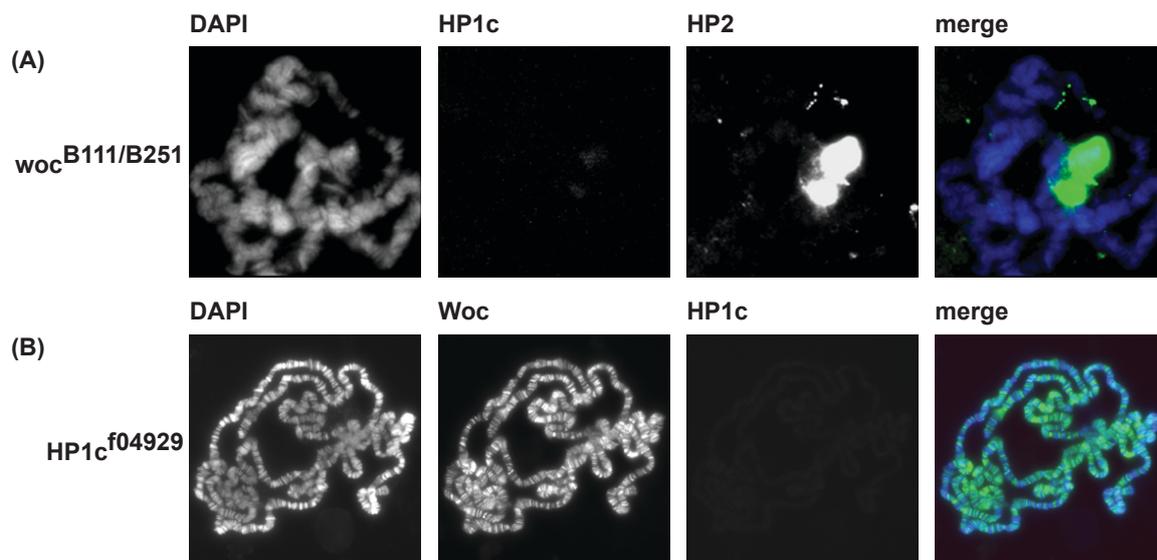


Abbildung 22 Die HP1c Assoziation mit Chromatin ist von Woc abhängig. (A) Immunfärbung von Polytänchromosomen aus *woc* Larven unter Verwendung von Antikörpern gegen HP1c und HP2 (Kontrolle, grün im zusammengeführten Bild). DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). (B) Woc (grün im zusammengeführten Bild) und HP1c Immunfärbung von Polytänchromosomen aus *hp1c* Larven. DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau).

3.3 Die Regulation der HP1c Expression

3.3.1 Die HP1c Expression wird von Woc stimuliert

HP1c Expressions-Analysen ergaben allerdings, dass HP1c Proteinmengen in *woc* Mutanten reduziert sind, so dass die verminderte Chromatin-Assoziation von HP1c in diesem genetischen Hintergrund nur teilweise mit einem Rekrutierungsdefekt zu erklären ist. Auf Transkript-Ebene wird dieser Effekt noch deutlicher; in transheterozygoten *woc*^{B111/251} Larven können HP1c Transkripte überhaupt nicht mehr, in transheterozygoten *woc*^{B111/964} Larven nur in sehr geringen Mengen detektiert werden (Abbildung 23).

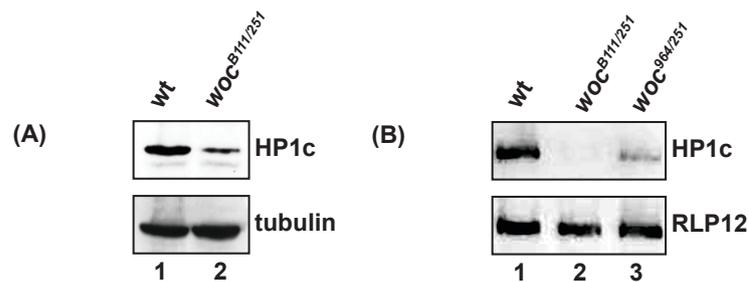


Abbildung 23 HP1c Level werden durch Woc auf Protein- und Transkript-Ebene moduliert. (A) Western Blot mit Zellextrakten aus Wildtyp (wt) oder *woc* *Drosophila* 3rd Instar Laven. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B) RT-PCR-Analyse mit RNA aus *Drosophila* 3rd Instar Laven. Die HP1c Expressions-Analyse wurde mit Wildtyp (wt) Larven (Spur 1) sowie zwei transheterozygoten *woc* Mutanten Larven durchgeführt (Spur 2-3). Transkripte des ribosomalen Proteins RLP12 dienen als Ladekontrolle.

RNAi Experimente in *Drosophila* SL2 Zellen konnten diese Beobachtungen bestätigen: Depletion von Woc in diesen Zellen führte zu einer klaren Reduktion von HP1c auf Proteinebene, allerdings nur dann, wenn die HP1c-Expression unter der Kontrolle des endogenen Promotors steht. So hatte die Depletion von Woc keinen Einfluss auf die Expression von FLAG-HP1c, welches von einem Aktin Promotor aus transkribiert wird. Dieser Befund legt nahe, dass die verminderte HP1c Expression auf einen direkten Einfluss von Woc auf den endogenen HP1c Promotor zurückzuführen ist (Abbildung 24, vgl. Spur 3 und Spur 6).

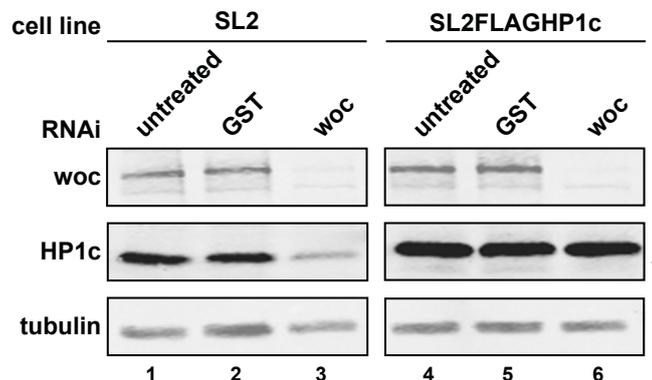


Abbildung 24 Direkte Regulation des HP1c Promotors durch Woc. Western Blot mit Zellextrakten aus *Drosophila* SL2 Zellen nach Woc Depletion in nicht transfizierten SL2 Zellen (links) sowie in Zellen, welche mit einem Expressionsvektor für FLAG-HP1c transfiziert wurden (rechts). Die HP1c Expression in diesen Zellen steht hierbei unter der Kontrolle eines Aktin Promotors. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Endogenes HP1c ist mit einem Sternchen markiert.

3.3.2 Die HP1c Expression wird durch einen autoregulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus gesteuert

Expression von exogenem FLAG-HP1c führte zudem zu einer dramatischen Reduktion des endogenen HP1c Pools. Diese Reduktion konnte sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkript-Ebene beobachtet werden. Die Expression von HP1c ist somit nicht nur von Woc abhängig, sondern wird zur selben Zeit auch über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus („Feedback-Loop“) durch die Konzentration an HP1c moduliert (Abbildung 25).

Woc ist somit nicht nur ein Interaktionspartner von HP1c, sondern reguliert darüber hinaus auch dessen Expression.

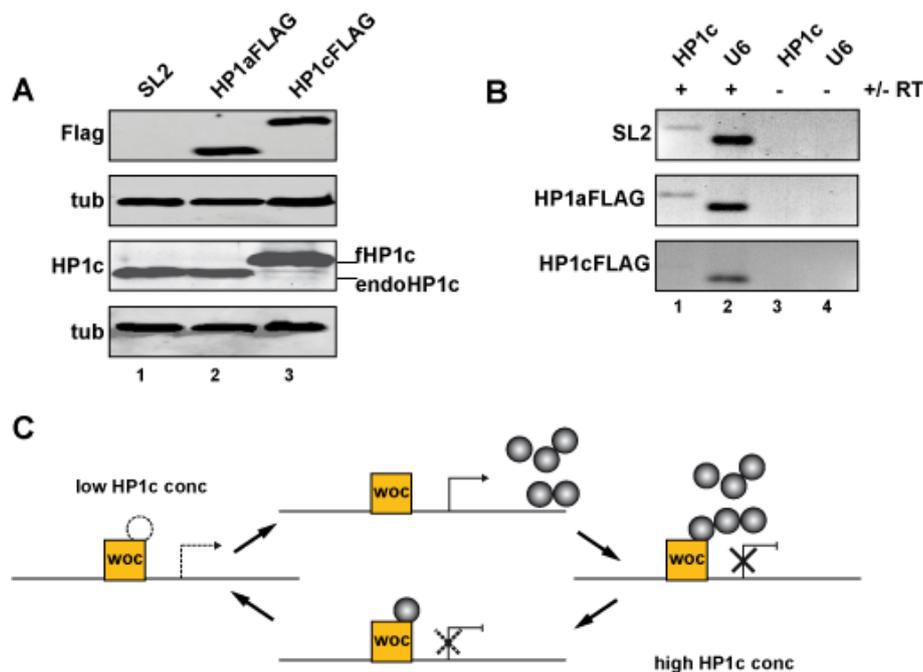


Abbildung 25 Die Expression von HP1c wird durch einen autoregulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus gesteuert. (A) Western Blot Analysen mit Zellextrakten aus *Drosophila* SL2 Zellen, die stabil mit einem Expressionskonstrukt für FLAG-HP1a bzw. FLAG-HP1c transfiziert sind. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte SL2 Zellen analysiert. Endogene HP1c Level wurden unter Verwendung eines spezifischen HP1c Antikörpers bestimmt. Als Kontrolle wurde die Expression der mit einem FLAG Tag versehenen HP1 Isoformen überprüft. Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) RT-PCR-Analysen unter der Verwendung eines Primer-Paars, welches lediglich endogene, nicht aber die exogenen Transkripte amplifiziert. Die RNA für diese Analysen wurde aus Zellen isoliert, welche mit den Expressionsplasmiden für FLAG-HP1a sowie FLAG-HP1c stabil transfiziert sind. Darüber hinaus wurde RNA verwendet, welche aus nicht-transfizierten Zellen isoliert wurde. Als Kontrolle wurde eine konstant exprimierte, nicht-codierende RNA (U6) amplifiziert. Zur Detektion genomischer Kontaminationen wurde jeweils ein Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase in die Analyse mit aufgenommen (-RT). (C) Modell des autoregulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus, über welchen die HP1c Konzentration innerhalb der Zelle stabil gehalten werden kann (siehe auch Diskussion).

3.4 Genomweite Expressions-Analysen

Diese Experimente legten nahe, dass HP1 Isoformen (sowie deren assoziierte Proteine) auch auf globaler Ebene die Expression bestimmter Gene steuern. Zur Identifizierung dieser Zielgene wurden daher zunächst differentielle Genexpressions-Analysen nach Depletion von HP1b bzw. HP1c in *Drosophila* SL2 Zellen durchgeführt.

Um potentielle Off-Target Effekte sowie unspezifische Effekte zu minimieren, wurden für die Depletion von HP1b und HP1c jeweils zwei verschiedene doppelsträngige RNA Konstrukte verwendet. Als Referenz dienten Zellen, welche mit artfremder, doppelsträngiger RNA transfiziert wurden (GST und GFP). Sowohl HP1b- als auch HP1c-Proteinlevel waren hierbei nach 7 Tagen signifikant reduziert (Abbildung 26). Parallel hierzu wurde RNA aus diesen Zellen isoliert, um durch cDNA Microarray Analysen genomweite transkriptionelle Effekte nach Depletion der einzelnen HP1 Isoformen zu untersuchen.

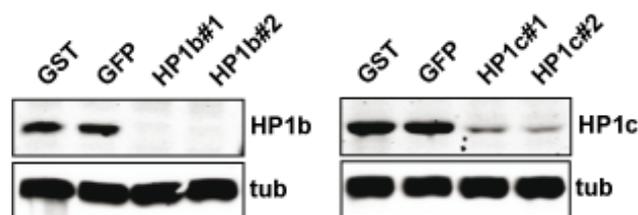


Abbildung 26 HP1b und HP1c RNAi in *Drosophila* SL2 Zellen. SL2 Zellen wurden jeweils mit zwei Gen-spezifischen, doppelsträngigen RNA Konstrukten transfiziert (Spur 3-4 für HP1b, Spur 7-8 für HP1c). Kontroll-Zellen wurden mit artfremder, doppelsträngiger RNA behandelt. Die Expression der HP1 Isoformen wurde nach 7 Tagen unter Verwendung der angegebenen Antikörper durch Western Blotting analysiert.

3.4.1 Genomweite Expressions-Analysen

Die beobachteten Effekte erwiesen sich als relativ gering (max 2-4fach nach Depletion von HP1b bzw HP1c), so dass insgesamt lediglich 60 Gene identifiziert werden konnten, die nach Depletion von HP1b signifikant dereguliert ($\text{lfdr} < 0,2$) werden (28 hoch reguliert/32 nach unten reguliert). Für HP1c wurden 26 differentiell exprimierte Gene gefunden (7/19). 13 dieser Gene werden dabei sowohl von HP1b als auch von HP1c reguliert (4/9) (Abbildung 27A). Die differentiell exprimierten Gene konnten keinen bestimmten funktionellen Kategorien (Gene Ontology (GO)-Analysen) zugeordnet werden.

Diese Darstellung ist jedoch nicht repräsentativ für alle Gene, da lediglich jene Gene als „Responder“ klassifiziert werden, welche über ein bestimmtes Signifikanzniveau hinaus dereguliert werden. Der Anteil der durch HP1b und HP1c co-regulierten Gene könnte demnach unterschätzt werden. Tatsächlich zeigt sich bei Betrachtung der gesamten Population aller aktiven Gene, dass die nach HP1b- bzw. HP1c-Depletion deregulierten Gene in einem hohen Maße korrelieren ($r=0,72$) (Abbildung 27B). Diese Analyse macht ferner deutlich, dass die Expression einiger Gene spezifisch von HP1b und unabhängig von HP1c moduliert werden kann.

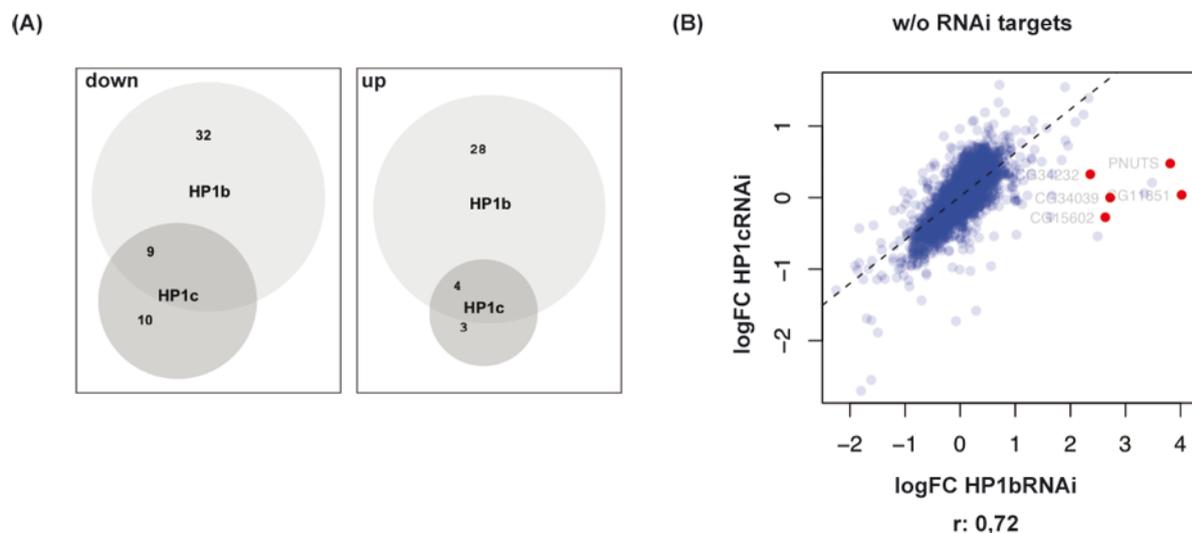


Abbildung 27 HP1b und HP1c als Transkriptionsregulatoren. (A) Venn Diagramm mit jenen Genen, welche nach Depletion von HP1b bzw. HP1c eine statistisch signifikante ($\text{fdr} < 0,2$) verminderte bzw. erhöhte Expression zeigen. Co-regulierte Gene sind durch die Schnittmengen in den Diagrammen dargestellt. (B) Scatterplot der Genexpressionsänderung aller aktiven Gene nach HP1b bzw. HP1c Depletion. In rot dargestellt sind jene Gene, welche keine Korrelation in den beiden RNAi Experimenten zeigen.

Die Depletion einzelner HP1 Isoformen hatte dabei keinen Einfluss auf die Expression der anderen HP1 Varianten, so dass die beobachteten Effekte als spezifisch für die jeweilige Isoform erachtet werden können. Konstitutiv exprimierte Gene (GAPDH, Lamin, Tubulin) wurden durch die Depletion nicht beeinflusst, des weiteren ist kein systematischer Effekt auf die Expression aller Gene („mean signal“) zu beobachten (Abbildung 28).

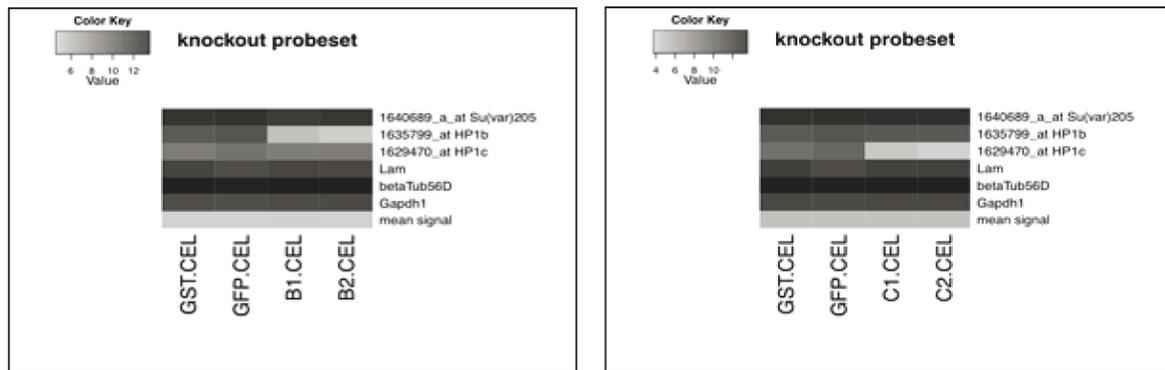


Abbildung 28 Qualitätskontrollen des Microarray-Datensets nach Depletion von HP1b bzw. HP1c. Der Graustufencode (jeweils links oben) reflektiert die Expressionsstärke verschiedener Gene (HP1a (Su(var)205), HP1b, HP1c) unter verschiedenen Bedingungen. GST und GFP: Kontrollexperimente. C1/C2: nach Depletion von HP1c. B1/B2: nach Depletion von HP1b. Zur Qualitätskontrolle wurde zudem die Expression verschiedener Haushaltsgene wie Lamin (Lam), Tubulin (betaTub56D) sowie GAPDH (Gapdh1) analysiert. Mean signal: Durchschnittsignal aller Gene des Microarrays.

3.4.2 Identifizierung von Zielgenen für weitere Analysen

Um die cDNA Microarray Daten zu verifizieren, wurde zunächst jenes Set an Genen separat durch qPCR analysiert, welches nach RNAi von HP1b und HP1c die größten Veränderungen hinsichtlich deren Expression zeigte (siehe Anhang).

Für diese ersten qPCR-Analysen wurde lediglich die differentielle Expression des Gensets nach Depletion von HP1c untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass die zuvor im Microarray beobachteten Expressionsänderungen auch tendenziell durch qPCR detektiert werden können. Lediglich in einem von neun Fällen konnte die zuvor beobachtete differentielle Expression nach Depletion von HP1c nicht beobachtet werden (Abbildung 29).

Um den tatsächlichen Beitrag der einzelnen Interaktoren von HP1b und HP1c auf die transkriptionelle Regulation zu untersuchen, wurden lediglich jene Gene analysiert, deren differentielle Expression sich in den initialen qPCR-Experimenten zum einen als robust erwies und zum anderen durch qPCR leicht zu detektieren war.

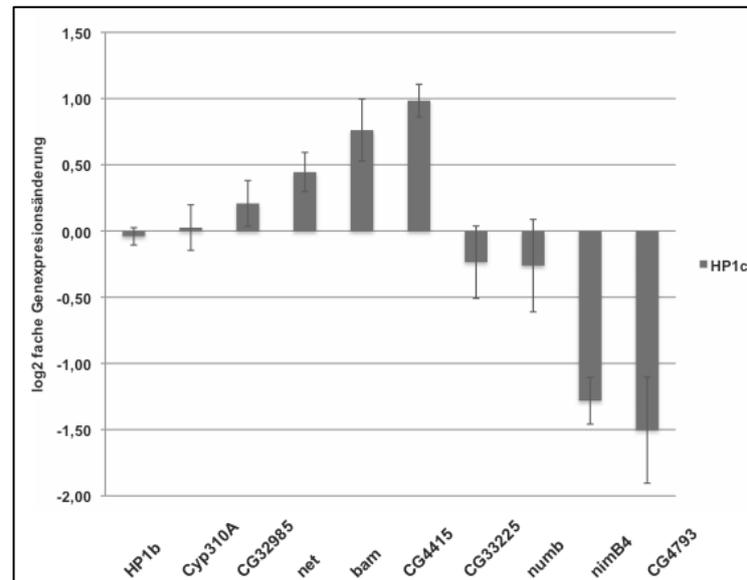


Abbildung 29 Identifizierung robust differentiell exprimierter Gene nach HP1c Depletion. qPCR-Expressions-Analysen von ausgewählten Zielgenen nach Depletion von HP1c in *Drosophila* SL2 Zellen. Die Änderung der Genexpression (FC, „fold change“) ist logarithmisch (log₂) dargestellt.

Für diese Analysen wurden neben HP1b und HP1c auch Woc, Row und Ubiquilin zunächst separat durch RNAi depletiert (Abbildung 30) und die differentielle Expression der Zielgene durch qPCR untersucht. Hierbei zeigte sich, dass HP1b, HP1c, Row und Woc die Genexpression der untersuchten Zielgene co-regulieren. Auch für Ubiquilin konnte diese gemeinsame Regulation von Zielgenen in drei von vier Fällen beobachtet werden. Synergistische Effekte durch eine gemeinsame Depletion von HP1b und HP1c konnten jedoch nicht gezeigt werden (Abbildung 31).

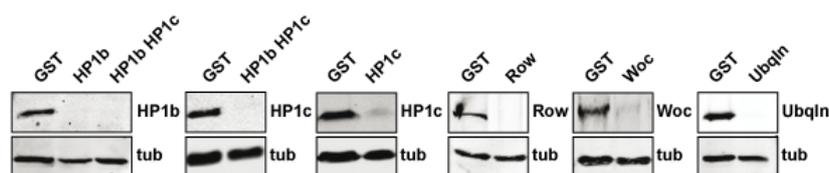


Abbildung 30 RNAi in *Drosophila* SL2 Zellen. SL2 Zellen wurden jeweils mit zwei Gen-spezifischen, doppelsträngigen RNA Konstrukten transfiziert. Kontrollzellen wurden mit artfremder, doppelsträngiger RNA behandelt (GST und GFP). Die Expression der HP1 Isoformen wurde nach 7 Tagen unter Verwendung der angegebenen Antikörper durch Western Blotting analysiert.

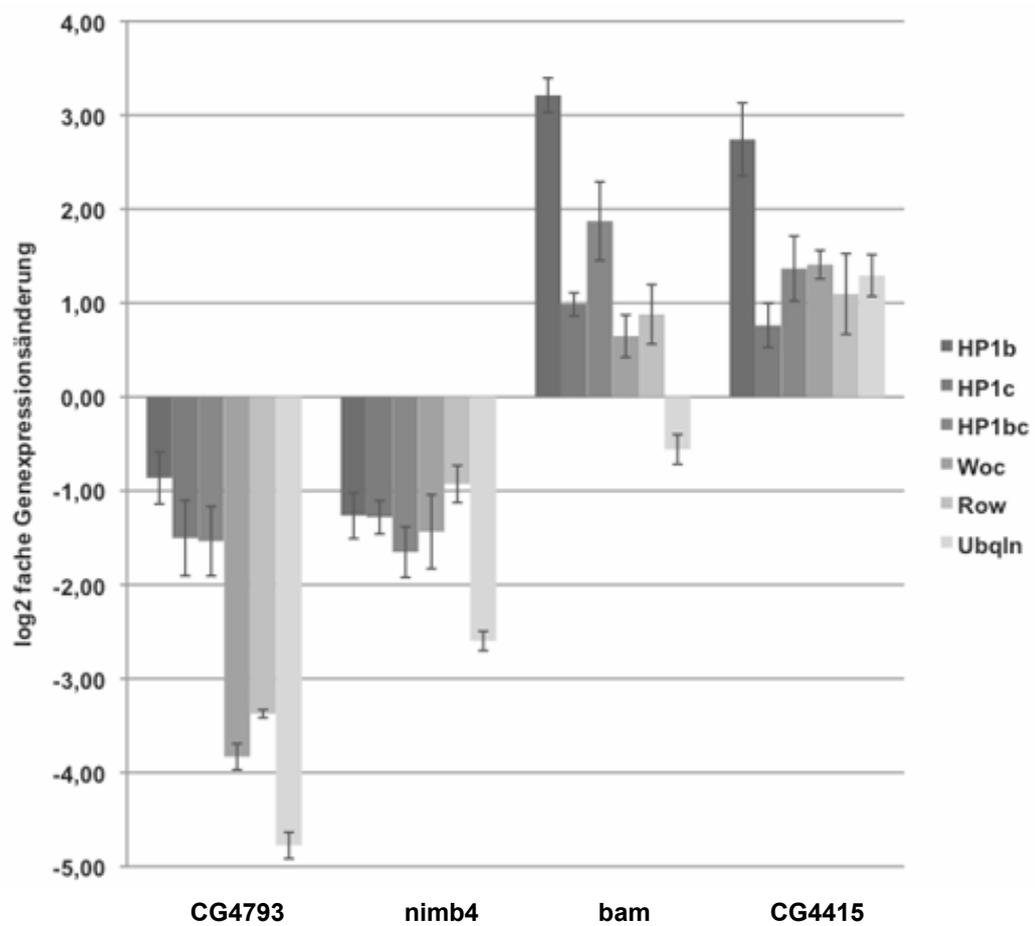


Abbildung 31 HP1b, HP1c, Row, Woc und Ubiquilin regulieren ein gemeinsames Genexpressionsprogramm. qPCR-Expressions-Analysen nach separater Depletion von HP1b, HP1c, Woc, Row und Ubiquilin bzw nach gemeinsamer Depletion von HP1b und HP1c (HP1bc) in *Drosophila* SL2 Zellen. Die Änderung der Genexpression (FC, „fold change“) ist logarithmisch (log₂) dargestellt.

4 Diskussion

Heterochromatin Protein 1 (HP1) ist als strukturelle Komponente des dicht gepackten, transkriptionell inaktiven Heterochromatins relativ gut beschrieben (Fanti und Pimpinelli, 2008; Vermaak et al., 2005). Darüber hinaus findet man allerdings in den meisten Eukaryoten mindestens zwei weitere, strukturell ähnliche HP1 Isoformen, welche sich hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation teilweise deutlich unterscheiden (Minc et al., 1999; Smothers und Henikoff, 2001). Wie diese Isoformen in spezifische Bereiche im Genom rekrutiert werden und welche Aufgaben diese dort übernehmen, ist weitgehend unbekannt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten nun darauf hin, dass Isoform-spezifische Interaktoren zur korrekten Lokalisation der einzelnen HP1 Paraloge in *Drosophila melanogaster* nötig sind. Über die biochemische und funktionelle Charakterisierung Isoform-spezifischer HP1 Komplexe konnte zudem gezeigt werden, dass diese Komplexe ein gemeinsames Genexpressionsprogramm steuern. Interessanterweise werden die Mengen der euchromatischen Isoform HP1c in der Zelle über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus strikt reguliert. Im Falle eines Überschusses des euchromatischen HP1c könnte somit eine Fehl-Lokalisation in heterochromatische Bereiche und damit eine empfindliche Störung der Chromatinstruktur verhindert werden.

4.1 Die H3K9 Methylierung und die Lokalisierung der HP1 Isoformen

Sämtliche Mitglieder der HP1 Familie zeichnen sich durch zwei hochkonservierte Domänen aus, eine N-terminale CD sowie eine C-terminale CSD (Aasland und Stewart, 1995). Trotz des ähnlichen strukturellen Aufbaus konnten Lokalisationsanalysen in *Drosophila melanogaster* zeigen, dass die einzelnen Paraloge mit unterschiedlichen Bereichen des Genoms assoziiert sind. Im Gegensatz zum vorwiegend heterochromatischen HP1a konnte für HP1c eine ausschließlich euchromatische

Lokalisation demonstriert werden. HP1b ist dagegen mit beiden Chromatinstrukturen assoziiert (Brower-Toland et al., 2007; Smothers und Henikoff, 2001).

Peptid Pulldown Experimente im Rahmen dieser Arbeit machen deutlich, dass *in vitro* sämtliche HP1 Isoformen über die CD an H3K9 methylierte Peptide binden können (Abbildung 12). Dies ist insofern nicht überraschend, als dass jene Aminosäuren, welche die selektive Bindung der H3K9 Methylierung vermitteln, in sämtlichen Isoformen konserviert sind (Jacobs und Khorasanizadeh, 2002; Nielsen et al., 2002) Gleichzeitig wird jedoch lediglich HP1a, nicht aber HP1c, in heterochromatische, H3K9 methylierte Regionen rekrutiert. Die H3K9 Methylierung *per se* kann somit kein Rekrutierungssignal für die eine oder andere HP1 Isoform darstellen.

In diesem Zusammenhang ist es allerdings wichtig zu betonen, dass auch die stabile, heterochromatische Lokalisation von HP1a nicht ausschließlich von dessen CD bzw. der Interaktion mit H3K9 methyliertem Chromatin determiniert wird, sondern vielmehr auch von der CSD sowie der Hinge Region beeinflusst ist (Platero et al., 1995; Powers und Eisenberg, 1993; Smothers und Henikoff, 2001). Tatsächlich ist die Interaktion von HP1a mit H3K9 methylierten Peptiden zwar sehr spezifisch, mit einer Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich ist diese aber auch relativ schwach (Jacobs und Khorasanizadeh, 2002; Nielsen et al., 2002). Kinetische Analysen in unterschiedlichen Systemen deuten zudem darauf hin, dass HP1a hochdynamisch mit heterochromatischen Regionen assoziiert ist und dass dessen effiziente Rekrutierung in jene Bereiche lediglich im Zusammenspiel mit zusätzlichen Faktoren möglich ist (Cheutin et al., 2003; Festenstein et al., 2003; Li et al., 2007).

So scheint in Säugern die Interaktion der Hinge mit einer bis dato nicht identifizierten RNA-Komponente entscheidend zur heterochromatischen Lokalisation von HP1a beizutragen (Maison et al., 2002; Muchardt et al., 2002).

Auch aus Untersuchungen in *S. pombe* ist offensichtlich, dass RNA bei der Rekrutierung von HP1 zu spezifischen Stellen innerhalb des Genoms eine wichtige Rolle zukommt – die Lokalisation des HP1 Orthologs Swi6 ist beispielsweise von der Synthese kurzer, doppelsträngiger RNA Moleküle abhängig (Verdel et al., 2004; Volpe et al., 2002).

Mehrere Studien suggerieren darüber hinaus, dass neben einer RNA Komponente auch Proteinfaktoren HP1a zu spezifischen Stellen innerhalb des Genoms dirigieren können. So ist beispielsweise in *in vitro* Experimenten *Drosophila* HP1a nur mit Hilfe zusätzlicher Proteinfaktoren wie ACF1 und Su(var)3-9 in der Lage, H3K9 methyliertes Chromatin effizient zu binden. Mutationen in der HP1 CSD (W200A), welche die Interaktion mit Su(var)3-9 und ACF1 beeinträchtigen, führen folgerichtig zum Verlust der HP1a-Assoziation mit methyliertem Chromatin (Eskeland et al., 2006).

4.2 Isolierung Isoform-spezifischer HP1 Komplexe

Durch den Austausch einzelner Domänen zwischen den unterschiedlichen HP1 Isoformen konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass auch die euchromatische Lokalisation von HP1c über die CSD, also über die Protein-Protein-Interaktionsdomäne, vermittelt wird (im Gegensatz zu HP1a allerdings nicht über die Hinge) (Smothers und Henikoff, 2001). Die Vermutung lag somit nahe, dass die verschiedenen HP1 Isoformen durch spezifische Interaktoren zu bestimmten Stellen im Genom rekrutiert werden und dabei auch funktionelle Unterschiede vermitteln.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Isoform-spezifische Komplexe aus Kernextrakten von stabil transfizierten *Drosophila* SL2 Zellen isoliert und massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 13). Auf diese Weise konnten für HP1a eine Vielzahl an Interaktionspartnern identifiziert werden, u.a. mit ACF1 und Su(var)3-9 auch jene Faktoren, mit deren Hilfe HP1a an H3K9 methyliertem Chromatin stabilisiert werden kann. Zahlreiche Studien konnten in den letzten Jahren zeigen, dass HP1a zwar vorwiegend, aber nicht ausschließlich in heterochromatischen Regionen lokalisiert und zudem mit zahlreichen zellulären Prozessen in Verbindung gebracht wird, von der transkriptionellen Regulation (Lechner et al., 2000; Nielsen et al., 2001b; Ryan et al., 1999) über eine Rolle bei der Kernorganisation (Kourmouli et al., 2000) bis hin zu einer replikativen Funktion (Quivy et al., 2008). Die große Anzahl an Interaktoren spiegelt dabei das breite Spektrum an Funktionen wider, an welchen HP1a innerhalb der Zelle beteiligt ist (Li et al., 2007). Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch auf die Paraloge HP1b und HP1c beschränkt.

4.3 HP1b und HP1c interagieren mit identischen Co-Faktoren

Überraschenderweise konnten für HP1b und HP1c mit Woc, Row und Ubiquilin identische Co-Faktoren gereinigt werden (Abbildung 13). Diese Beobachtung deckt sich teilweise mit jenen einer ähnlichen Studie, welche ebenfalls Woc und Row als HP1c Interaktoren identifizieren konnten (Font-Burgada et al., 2008). Unter Verwendung der generierten Paralog-spezifischen Antikörper konnte in Co-Immunpräzipitationen die Spezifität der Interaktionen *in vivo* bestätigt werden (Abbildung 15).

Sowohl Row als auch Woc zeigen anhand ihrer Domänen-Struktur und -Organisation eine Ähnlichkeit zu DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (Abbildung 32) – beide enthalten mehrere Zink-Finger Domänen, Sequenzspezifische DNA-Binde-Domänen (AT-Hooks) und Row zeichnet sich darüber hinaus durch einen Glutaminreichen C-Terminus aus, wie er häufig in Transaktivierungsdomänen einiger Transkriptionsfaktoren zu finden ist (Triezenberg, 1995).

Weder ACF1 noch Su(var)3-9 sind in den isolierten Komplexen mit HP1b bzw. HP1c assoziiert. Dies wird auch in Pulldown Experimenten mit *in vitro* translatiertem ACF1 und Su(var)3-9 deutlich, die eine selektive Interaktion dieser Proteine mit HP1a, nicht

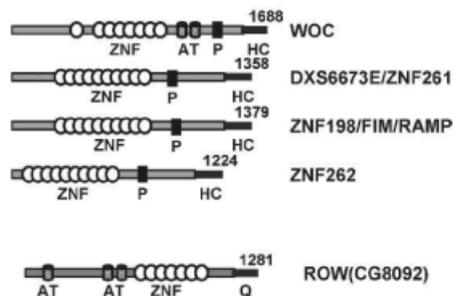


Abbildung 32 Schematische Darstellung von Woc, Row und den humanen Woc Homologen DXS6673E/ZNF261, ZNF198/FIM/RAMP und ZNF262. Zink Finger (ZNF), AT-Hooks (T), Prolin-reiche Abschnitte (P) sind gekennzeichnet (Adaptiert nach Font-Burgada et al., 2008).

aber mit HP1c zeigen (Abbildung 17). Umgekehrt bindet *in vitro* translatiertes Row spezifisch an HP1c, nicht aber an HP1a. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die zuvor beschriebene euchromatische Lokalisation dieser Paraloge in der Tat über deren spezifische DNA-bindende Co-Faktoren Row bzw. Woc vermittelt werden kann. Eine Interaktion von Woc konnte allerdings selbst nach Co-Translation mit Row weder für HP1a noch für HP1c detektiert werden. Dies ist unter Umständen darauf zurückzuführen, dass Woc zusätzliche Faktoren zu Row für die selektive

Bindung an HP1c benötigt. So wurde beispielsweise die Rolle von Ubiquilin in diesem Zusammenhang nicht getestet. In Säugern konnte darüber hinaus für HP1 γ gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen die selektive Assoziation mit

HP1 Paraloge vermittelt werden. Die Interaktion scheint dabei allerdings nicht von PxVxL Motiven vermittelt zu werden, da jene Reste, welche zur Erkennung dieses Pentapeptid-Motivs nötig sind, teilweise in HP1c nicht konserviert sind (zum Beispiel Y194, W200). Die Beobachtung, dass sämtliche der untersuchten CSD Mutanten in der Lage sind mit Woc zu interagieren (Abbildung 18), könnten darauf zurück zu führen sein, dass Woc unabhängig von dessen PxVxL Motiv (1536PHVL1540) mit multiplen Regionen in der CSD interagiert.

4.4 Die Lokalisierung der HP1 Isoformen

Immunlokalisationsexperimente in *Drosophila* SL2 Zellen konnten die zuvor beobachtete, euchromatische HP1c Lokalisation bestätigen (Greil et al., 2003; Smothers und Henikoff, 2001). Detailliertere Analysen ergaben, dass HP1c mit hunderten von Interbanden in Polytänchromosomen assoziiert ist (Abbildung 20). Diese Regionen sind als transkriptionell aktive Bereiche beschrieben (Gersh, 1975; Zhimulev et al., 2004) und unterscheiden sich somit deutlich von HP1a (oder auch HP2), welches vorwiegend in perizentrische, heterochromatische Strukturen rekrutiert wird (James und Elgin, 1986).

Co-Lokalisationsexperimente konnten zeigen, dass sowohl HP1c als auch die zuvor isolierten Isoform-spezifischen Interaktoren Woc und Row nahezu identische Bindestellen aufweisen und dass diese somit zusammen einen Chromatin-assoziierten Komplex ausbilden (Abbildung 21, Font-Burgada et al., 2008).

Analog zur HP1a-Rekrutierung durch die spezifischen Interaktoren ACF1 und Su(var)3-9 wird auch die Chromatin-Assoziation von HP1c durch dessen Interaktion mit Woc und Row reguliert. So zeigen transheterozygote *woc* Mutanten (*woc*²⁵¹/*woc*^{B111}) eine drastisch verminderte Chromatin-Rekrutierung von HP1c und damit denselben Effekt, der auch in *row*^{RNAi} Fliegen beobachtet werden kann (Abbildung 22, Font-Burgada et al., 2008). Die Rekrutierung von Woc und Row erfolgt dabei unabhängig von HP1c, mutmaßlich über die Erkennung Sequenz-spezifischer Elemente durch Woc und/oder Row. Genomweite Lokalisationsanalysen über DamID konnten ein Konsensus DNA-Motiv identifizieren, welches mit der Bindung von HP1c, nicht aber mit der Bindung von HP1a korreliert (Baumann et al., 2003; Greil et al., 2003). Die palindrome Natur dieser

Sequenz (ACATATGT) suggeriert zudem, dass die DNA-bindenden Faktoren als Dimere binden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die konservierten MYM Zink-Finger die Dimerisierung des humanen Woc Homologs ZNF198 vermitteln (Baumann et al., 2003). Woc könnte somit über die Erkennung spezifischer Sequenzen einen entscheidenden Beitrag zur Lokalisation von HP1b bzw. HP1c leisten.

Die strikte Notwendigkeit von spezifischen Proteinfaktoren für die Lokalisation von HP1c macht deutlich, dass, anders als bei der heterochromatischen Assoziation von HP1a, die H3K9 Methylierung von Nukleosomen eine untergeordnete Rolle bei der Rekrutierung von HP1c spielt. Dies wird auch dadurch offensichtlich, dass die CSD alleine und unabhängig von der CD die euchromatische Lokalisation von HP1c vermitteln kann (Smothers und Henikoff, 2001). Da die im Rahmen dieser Arbeit generierten HP1b Antikörper in Immunlokalisationsanalysen keinerlei Reaktivität zeigten, wurden die Lokalisationsanalysen auf HP1c beschränkt.

4.5 Die Rolle von Isoform-spezifischen HP1 Komplexen bei der Genregulation

Die Lokalisationsanalysen machten darüber hinaus auch deutlich, dass bei Abwesenheit von Woc die HP1c Proteinlevel reduziert sind. RT-PCR-Analysen konnten dabei demonstrieren, dass HP1c sowohl durch HP1c selbst als auch durch Woc transkriptionell reguliert wird. Woc stimuliert hierbei die Expression, während HP1c seine eigene Produktion über einen negativen „Feedback-Loop“ drosseln kann (Abbildung 34).

Dieser Rückkopplungs-Mechanismus könnte gewährleisten, dass sich die HP1c Spiegel in der Zelle innerhalb eines eng abgesteckten Rahmens bewegen.

Die Störung dieses Mechanismus könnte u.a. mit der Ausbildung heterochromatischer Strukturen interferieren. Ähnliches konnte zuvor schon in *S. pombe* beobachtet werden, wo eine Störung des Gleichgewichts zwischen den HP1 Proteinen Swi6 und Chp2 die Etablierung perizentrischen Heterochromatins entscheidend beeinflusst (Sadaie et al., 2008). Die Bedeutung der strikten Kontrolle der Expressionslevel der einzelnen HP1 Isoformen wird in diesem Zusammenhang auch dadurch deutlich, dass HP1c in

Drosophila nach dessen Überexpression auch in heterochromatische Regionen rekrutiert werden kann (Font-Burgada et al., 2008).

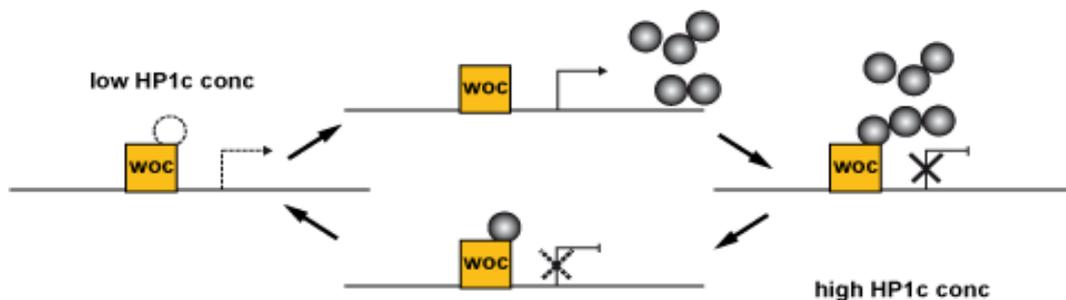


Abbildung 34 Autoregulatorischer Feedback Loop zur Regulation der HP1c Expression. Bei einer geringen HP1c Konzentration in der Zelle stimuliert Woc dessen Expression (oben). HP1c kann in höheren Konzentration zugleich seine eigene Produktion über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus drosseln (unten).

Leider war es nicht möglich, das Anti-woc Antiserum für ChIP Experimente zu verwenden, um eine direkte Bindung von Woc in der HP1c Promotor-Region zu zeigen. Allerdings deuten mehrere Beobachtungen darauf hin, dass die Regulation des HP1c Promotors offensichtlich über eine direkte Assoziation des HP1c/Woc-Komplexes erfolgen muss. So wurde bereits zuvor in Dam-ID Experimenten eine Bindung von HP1c im Bereich des HP1c Gens gezeigt (Greil et al., 2003). In Übereinstimmung hiermit enthält die HP1c Promotor Region eben jenes DNA-Konsensusmotiv, welches die Interaktion mit Woc und somit auch die Interaktion mit HP1c vermitteln könnte (siehe oben). Darüber hinaus wird lediglich die Expression von HP1c unter der Kontrolle seines endogenen Promotors von Woc beeinflusst, während dies bei der Expression von einem exogenen Promotor aus nicht der Fall ist (Abbildung 24).

4.6 HP1c, HP1b und die Rolle bei der Genexpression

Weder HP1b noch HP1c wurden bislang funktionell charakterisiert. Die Assoziation mit aktiven Chromatin-Domänen sowie die Interaktion dieser HP1 Paraloge mit mutmaßlichen Transkriptionsfaktoren wie Woc und Row suggerierten eine genomweite transkriptionelle Funktion, welche mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten

differentiellen Genexpressions-Analysen auch tatsächlich bestätigt werden konnte. Zeitgleich mit dieser Studie konnte in einer weiteren Untersuchung demonstriert werden, dass HP1c seine transkriptionelle Funktion insbesondere im Kontext des sich entwickelnden Nervensystems ausübt (Font-Burgada et al., 2008).

Die Zuordnung der differentiell exprimierten Gene zu bestimmten funktionellen Kategorien (Gene Ontology (GO)-Analysen) konnte unter Verwendung des hier generierten Datensatzes allerdings nicht bestätigt werden. Die Diskrepanz könnte dabei auf die Verwendung unterschiedlicher Systeme zurückzuführen sein. Während Font-Burgada und Kollegen die differentielle Genexpression in einem multizellulären Organismus (*Drosophila* Embryonen) untersuchten, wurde in dieser Arbeit die Änderung der Genexpression in *Drosophila* Zellen embryonalen Ursprungs verfolgt (SL2 Zellen).

Die dabei beobachteten Änderungen der Genexpression erwiesen sich als relativ gering (max. 2-4fach nach Depletion von HP1b bzw HP1c), so dass nur relativ wenige Gene (60 für HP1b, 26 für HP1c, von insgesamt 6253 aktiven Genen) über ein bestimmtes Signifikanzniveau hinaus dereguliert und somit statistisch als „Responder“ definiert wurden. Diese Analysen implizieren zwar, dass HP1b und HP1c ein gemeinsames Set an Genen regulieren, dass es jedoch auch mehrere Loci gibt, welche unter der separaten Kontrolle der einen oder anderen HP1 Isoform zu stehen scheinen. Der tatsächliche Anteil der gemeinsam regulierten Gene wird hierbei jedoch unterschätzt, da die Klassifikation der Gene in „Responder“ und „Nicht-Responder“ besonders die stark regulierten Gene beinhaltet, zugleich aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch schwächere transkriptionelle Effekte eine gewisse biologische Relevanz haben.

Betrachtet man nämlich die Transkriptionsänderungen aller aktiven Gene, so wird deutlich, dass diese Änderungen nach Depletion von HP1b und HP1c tatsächlich in hohem Maße korrelieren ($r=0,72$) (Abbildung 27B). Ein Großteil der Gene zeigt hierbei eine schwache, aber konsistente Deregulierung. Interessanterweise konnten für HP1b Gene identifiziert werden, deren Expression unabhängig von HP1c moduliert werden kann. Lokalisationsanalysen legen in diesem Zusammenhang nahe, dass dies zum Teil auf eine heterochromatische HP1b Sub-Population zurück zu führen sein könnte,

welche unabhängig von Woc und Row rekrutiert wird und HP1b-spezifische Funktionen vermittelt.

Die Korrelationsanalysen der Expressionsänderungen nach Depletion von HP1b und HP1c, die Interaktion mit identischen Proteinfaktoren sowie die teilweise überlappende Lokalisation suggerieren ein kooperatives Verhalten der beiden HP1 Isoformen. Dass dies nicht immer der Fall sein muss, wurde allerdings dadurch offensichtlich, dass HP1b und HP1c an ausgewählten, von ihnen gemeinsam regulierten Zielgenen auch nicht synergistisch wirken können und teilweise spezifische, nicht-redundante Funktionen zu übernehmen scheinen. Die Beobachtung, dass HP1 Isoformen separate Aufgaben innerhalb der Zelle verantworten, spiegelt sich zudem auch in vorläufigen Untersuchungen mit *hp1c* Mutanten wider, welche darauf hin deuten, dass der Verlust von HP1c zur Sterilität führt und somit nicht von HP1b alleine kompensiert werden kann (nicht gezeigt). Interessanterweise konnte im Rahmen der Expressions-Analysen auch gezeigt werden, dass die gemeinsame transkriptionelle Regulation durch HP1b und HP1c auch durch die spezifischen Interaktoren Row, Woc und Ubiquilin in einer ähnlichen Art und Weise moduliert werden kann. Die beobachteten Effekte könnten hierbei zum Teil auf die zuvor beschriebenen Rekrutierungsdefekte von HP1b und HP1c in Abwesenheit von Woc oder Row zurückzuführen sein.

4.7 Aussichten

Der molekulare Mechanismus, über welchen die Regulation der Genexpression durch HP1b und HP1c gesteuert wird, ist dabei jedoch nicht bekannt.

Die Isoform-spezifischen Komplexe scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Rekrutierung der RNA Polymerase II zu nehmen, da sich deren Lokalisation auch in Abwesenheit von Woc (und somit auch in Abwesenheit von HP1c bzw. HP1b) unverändert zeigt (Raffa et al., 2005). Co-Lokalisationsstudien suggerieren allerdings, dass HP1b bzw. HP1c sowie deren Interaktionspartner insbesondere im Promotorbereich (mit H3K4me3 bzw. RNAPol IIa) und während der frühen Phase der Elongation mit der RNA Polymerase II (Ser5P RNAP II) assoziieren (Font-Burgada et al., 2008; Raffa et al., 2005). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass das humane Woc Ortholog ZNF198 mit dem Ubiquitin-

konjugierenden Enzym Rad6 interagiert, einem Faktor, der zusammen mit der Ubiquitin-Ligase Bre1 über die H2B Ubiquitinierung bei der Initiation der Transkription bzw. bei der Transkriptions-Elongation beteiligt zu sein scheint (Fleming et al., 2008; Kim und Roeder, 2009; Xiao et al., 2005).

Eine besondere Rolle bei der Regulation dieser Prozesse könnte auch dem Isoform-spezifischen Interaktor Ubiquilin zukommen. Mitglieder der Ubiquilin Familie sind als Ubiquitin-Rezeptoren beschrieben, welche mit ihrer C-terminalen Ubiquitin-assoziierten (*Ubiquitin associated*, UBA) Domäne ubiquitinierte Substrate binden (Ko et al., 2004), gleichzeitig über eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (*Ubiquitin like domain*, UBL) nicht-kovalent mit regulatorischen Untereinheiten des Proteasoms interagieren (Abbildung 35) und somit eine wichtige Funktion bei der Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) übernehmen können (Kleijnen et al., 2000; Matiuhin et al., 2008)

Dies könnte insofern von Bedeutung sein, als die Stabilität vieler Transkriptionsfaktoren (bzw. Co-Faktoren) über deren Ubiquitinierung bzw. das UPS System reguliert wird

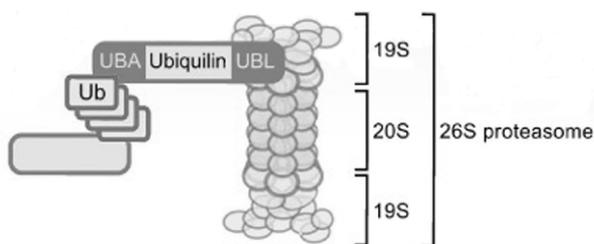


Abbildung 35 Ubiquiline regulieren das Ubiquitin-Proteasom-System. Ubiquilin interagiert sowohl mit der regulatorischen Untereinheit des Proteasoms (über die UBL Domäne) als auch mit ubiquitinierten Substraten (über die UBA Domäne). (Madsen et al., 2007)

Genen rekrutiert (Gonzalez et al., 2002). Diese molekularen Chaperone stimulieren hierbei die Destabilisierung von Aktivator-Promotor-Komplexen – während zugleich die Verweildauer der Aktivatoren am Promotor über die Mono-Ubiquitinierung der Aktivatoren reguliert wird (Archer et al., 2008; Ferdous et al., 2007; Freeman und Yamamoto, 2002).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Assoziation von HP1b bzw. HP1c Komplexen mit Promotoren eventuell über Ubiquilin gesteuert werden könnte; entweder durch die Regulation der Rekrutierung der proteasomalen ATPasen selbst, oder aber

(Kim et al., 2003; Muratani und Tansey, 2003; Reid et al., 2003; Salghetti et al., 2001). Neuere Studien deuten jedoch auch auf eine alternative, nicht-proteolytische Funktion des Proteasoms hinsichtlich der Transkriptionsregulation hin. So werden lediglich die ATPasen der regulatorischen Untereinheit des Proteasoms, nicht aber jene des katalytischen Kerns, zu transkribierten

durch die Bindung und Stabilisierung einer potentiellen Mono-Ubiquitinierung der Transkriptionsaktivatoren Woc und/oder Row. In jedem Fall würde dies der Zelle die Möglichkeit eröffnen, die durch HP1b sowie HP1c regulierten Zielgene bei Bedarf sehr rasch an, aber auch sehr schnell wieder abschalten zu können.

5 Zusammenfassung

Eine der am besten untersuchten strukturellen heterochromatischen Komponenten ist das evolutionär konservierte Heterochromatin Protein 1 (HP1) (James und Elgin, 1986). Die meisten Organismen enthalten darüber hinaus zusätzliche HP1-ähnliche Proteine, welche sich im Lauf der Evolution aus Genduplikationen entwickelt haben. So findet man in *Drosophila melanogaster* neben dem vorwiegend heterochromatischen HP1a noch zwei weitere, ubiquitär exprimierte HP1 Isoformen (HP1b und HP1c), die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation deutlich von HP1a unterscheiden. HP1c wird dabei ausschließlich in euchromatischen Regionen detektiert, während HP1b sowohl mit Heterochromatin als auch mit Euchromatin assoziiert ist (Greil et al., 2003; Smothers und Henikoff, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst jene Mechanismen aufgeklärt werden, welche zur unterschiedlichen Verteilung der einzelnen HP1 Paraloge beitragen. Vorangegangene Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass für eine effiziente Rekrutierung von HP1a neben H3K9 methylierten Nukleosomen auch weitere heterochromatische Proteine wie zum Beispiel ACF1 und Su(var)3-9 erforderlich sind.

Um nun jene Faktoren zu identifizieren, welche zur Lokalisation von HP1b und HP1c beitragen, wurden Isoform-spezifische Komplexe aus *Drosophila* SL2 Zellen isoliert. Dabei wurde deutlich, dass HP1b und HP1c zusammen mit den Zn-Finger Proteinen *Woc* (*without children*) und *Row* (*relative of woc*) sowie mit Ubiquilin einen nahezu identischen Komplex bilden. Im Gegensatz hierzu konnte parallel gezeigt werden, dass HP1a mit einer Vielzahl an verschiedenen Proteinen assoziiert ist, nicht jedoch mit den HP1b/c-spezifischen Interaktoren. Die in Zellkultur beobachteten Interaktionen wurden mit Hilfe von *in vitro* Pull Down Experimenten und immunohistochemischen Methoden verifiziert. Durch die Analyse der HP1c Lokalisation in *woc* Mutanten konnte schließlich gezeigt werden, dass die euchromatische Rekrutierung von HP1c tatsächlich von dessen spezifischen Interaktoren moduliert werden kann.

Darüber hinaus wurde auch deutlich, dass die Feinjustierung der HP1c Konzentration in der Zelle über einen autoregulatorischen Feedback-Loop erfolgt, und dass auch hierbei die HP1c-spezifischen Interaktoren eine wichtige Rolle einnehmen.

Aufgrund der Assoziation mit aktiven Chromatin-Domänen sowie der Interaktion mit den mutmaßlichen Transkriptionsfaktoren Woc und Row lag die Vermutung nahe, dass HP1b und HP1c genomweit die Expression bestimmter Gene regulieren. Dies konnte durch differentielle Genexpressions-Analysen in *Drosophila* SL2 Zellen auch tatsächlich bestätigt werden. Die dabei beobachteten Änderungen der Genexpression erwiesen sich jedoch als relativ schwach. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsänderungen aller aktiven Gene nach Depletion von HP1b und HP1c in einem hohen Maße ($r=0,72$) korrelieren, so dass daraus auf eine Co-Regulation bestimmter Zielgene durch die beiden HP1 Paraloge geschlossen werden kann. Die separate Expressions-Analyse ausgewählter Zielgene durch quantitative RT-PCR konnte ferner demonstrieren, dass bei der Co-Regulation dieser Zielgene auch die Interaktionspartner Woc, Row und Ubiquilin involviert sind.

Diese Befunde können nun in weiteren Experimenten dazu dienen, die molekularen Mechanismen der Regulation der Genexpression durch HP1b und HP1c detailliert zu untersuchen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	doppelsträngige RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced“-GFP
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GFP	grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
HP1	Heterochromatin Protein 1
IF	Immunofluoreszenz
Ig	Immunglobulin

IP	Immunopräzipitation
kbp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
KE	Kernextrakt
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
M	milli
mA	Milliampere
min.	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
nm	Nanometer
ORC	„origin recognition complex“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative PCR
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Verd.	Verdünnung
Vol.	Volumen
WT	Wild Typ
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro

7 Literaturverzeichnis

- Aasland, R., and Stewart, A.F. (1995). The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res* 23, 3168-3173.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2001). Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 104, 839-847.
- Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P.B. (2000). Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* 407, 405-409.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., and Reinberg, D. (2007). *Epigenetics*.
- Aravind, L., and Landsman, D. (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 26, 4413-4421.
- Archer, C.T., Delahodde, A., Gonzalez, F., *et al.* (2008). Activation domain-dependent monoubiquitylation of Gal4 protein is essential for promoter binding in vivo. *J Biol Chem* 283, 12614-12623.
- Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P.B., *et al.* (2005). Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma* 113, 370-384.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., *et al.* (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.
- Baumann, H., Kunapuli, P., Tracy, E., *et al.* (2003). The oncogenic fusion protein-tyrosine kinase ZNF198/fibroblast growth factor receptor-1 has signaling function comparable with interleukin-6 cytokine receptors. *J Biol Chem* 278, 16198-16208.
- Becker, P.B., and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 247-273.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., *et al.* (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14173-14178.
- Bouazoune, K., Mitterweger, A., Langst, G., *et al.* (2002). The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *EMBO J* 21, 2430-2440.
- Brasher, S.V., Smith, B.O., Fogh, R.H., *et al.* (2000). The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J* 19, 1587-1597.
- Brower-Toland, B., Findley, S.D., Jiang, L., *et al.* (2007). *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev* 21, 2300-2311.
- Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter (2004). *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition edn.
- Canzio, D., Chang, E.Y., Shankar, S., *et al.* (2011). Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Mol Cell* 41, 67-81.

- Chen, L., and Madura, K. (2002). Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol* 22, 4902-4913.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., *et al.* (2003). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299, 721-725.
- Cowieson, N.P., Partridge, J.F., Allshire, R.C., *et al.* (2000). Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol* 10, 517-525.
- Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2, 292-301.
- Dalal, Y., Wang, H., Lindsay, S., *et al.* (2007). Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 5, e218.
- Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., *et al.* (2005). HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J Biol Chem* 280, 38090-38095.
- Deshpande, G., Calhoun, G., and Schedl, P. (2006). The *Drosophila* fragile X protein dFMR1 is required during early embryogenesis for pole cell formation and rapid nuclear division cycles. *Genetics* 174, 1287-1298.
- Eissenberg, J.C. (2001). Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene* 275, 19-29.
- Eissenberg, J.C., Ge, Y.W., and Hartnett, T. (1994). Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem* 269, 21315-21321.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., *et al.* (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9923-9927.
- Eskeland, R., Eberharter, A., and Imhof, A. (2006). HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol* 27, 453-465.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., *et al.* (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123, 1199-1212.
- Fanti, L., Berloco, M., Piacentini, L., *et al.* (2003). Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica* 117, 135-147.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., *et al.* (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* 2, 527-538.
- Fanti, L., and Pimpinelli, S. (2008). HP1: a functionally multifaceted protein. *Curr Opin Genet Dev* 18, 169-174.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Ferdous, A., Sikder, D., Gillette, T., *et al.* (2007). The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. *Genes Dev* 21, 112-123.

- Festenstein, R., Pagakis, S.N., Hiragami, K., *et al.* (2003). Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* 299, 719-721.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., *et al.* (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116-1122.
- Fleming, A.B., Kao, C.F., Hillyer, C., *et al.* (2008). H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell* 31, 57-66.
- Font-Burgada, J., Rossell, D., Auer, H., *et al.* (2008). Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev* 22, 3007-3023.
- Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I., *et al.* (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 137-143.
- Freeman, B.C., and Yamamoto, K.R. (2002). Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* 296, 2232-2235.
- Galande, S., Purbey, P.K., Notani, D., *et al.* (2007). The third dimension of gene regulation: organization of dynamic chromatin loopscape by SATB1. *Curr Opin Genet Dev* 17, 408-414.
- Gasser, S.M., and Cockell, M.M. (2001). The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 279 1-16.
- Gatti, M., and Pimpinelli, S. (1992). Functional elements in Drosophila melanogaster heterochromatin. *Annu Rev Genet* 26, 239-275.
- Gersh, E.S. (1975). Sites of gene activity and of inactive genes in polytene chromosomes of diptera. *J Theor Biol* 50, 413-428.
- Gocke, C.B., and Yu, H. (2008). ZNF198 stabilizes the LSD1-CoREST-HDAC1 complex on chromatin through its MYM-type zinc fingers. *PLoS One* 3, e3255.
- Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T., *et al.* (2002). Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* 296, 548-550.
- Greil, F., van der Kraan, I., Delrow, J., *et al.* (2003). Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes Dev* 17, 2825-2838.
- Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35-46.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., *et al.* (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hayakawa, T., Haraguchi, T., Masumoto, H., *et al.* (2003). Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J Cell Sci* 116, 3327-3338.
- Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik*, 762–818.
- Huang, D.W., Fanti, L., Pak, D.T., *et al.* (1998). Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of Drosophila heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol* 142, 307-318.
- Izban, M.G., and Luse, D.S. (1992). Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J Biol Chem* 267, 13647-13655.

- Jacobs, S.A., and Khorasanizadeh, S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* 295, 2080-2083.
- James, T.C., and Elgin, S.C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* 6, 3862-3872.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Kim, J., and Roeder, R.G. (2009). Direct Bre1-Paf1 complex interactions and RING finger-independent Bre1-Rad6 interactions mediate histone H2B ubiquitylation in yeast. *J Biol Chem* 284, 20582-20592.
- Kim, S.Y., Herbst, A., Tworkowski, K.A., *et al.* (2003). Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell* 11, 1177-1188.
- Kleijnen, M.F., Shih, A.H., Zhou, P., *et al.* (2000). The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell* 6, 409-419.
- Ko, H.S., Uehara, T., Tsuruma, K., *et al.* (2004). Ubiquilin interacts with ubiquitylated proteins and proteasome through its ubiquitin-associated and ubiquitin-like domains. *FEBS Lett* 566, 110-114.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kosak, S.T., and Groudine, M. (2004). Gene order and dynamic domains. *Science* 306, 644-647.
- Kourmouli, N., Theodoropoulos, P.A., Dialynas, G., *et al.* (2000). Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J* 19, 6558-6568.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., *et al.* (2004). Different EZH2-containing complexes target methylated histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 14, 183-193.
- Kwon, S.H., and Workman, J.L. (2008). The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol Cells* 26, 217-227.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., *et al.* (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lavrov, S., Dejardin, J., and Cavalli, G. (2004). Combined immunostaining and FISH analysis of polytene chromosomes. *Methods Mol Biol* 247, 289-303.
- Lechner, M.S., Begg, G.E., Speicher, D.W., *et al.* (2000). Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol* 20, 6449-6465.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., *et al.* (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.

- Li, Y., Kirschmann, D.A., and Wallrath, L.L. (2002). Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc Natl Acad Sci U S A* *99 Suppl 4*, 16462-16469.
- Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M.E., *et al.* (2006). Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* *8*, 407-415.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., *et al.* (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- Madsen, L., Schulze, A., Seeger, M., *et al.* (2007). Ubiquitin domain proteins in disease. *BMC Biochem* *8 Suppl 1*, S1.
- Mah, A.L., Perry, G., Smith, M.A., *et al.* (2000). Identification of ubiquilin, a novel presenilin interactor that increases presenilin protein accumulation. *J Cell Biol* *151*, 847-862.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H., *et al.* (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* *30*, 329-334.
- Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* *15*, 163-176.
- Mateescu, B., Bourachot, B., Rachez, C., *et al.* (2008). Regulation of an inducible promoter by an HP1beta-HP1gamma switch. *EMBO Rep* *9*, 267-272.
- Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Ziv, I., *et al.* (2008). Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Mol Cell* *32*, 415-425.
- Minc, E., Allory, Y., Worman, H.J., *et al.* (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* *108*, 220-234.
- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J.S., *et al.* (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep* *3*, 975-981.
- Muller, H. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet*, 299-334.
- Muratani, M., and Tansey, W.P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 192-201.
- Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., *et al.* (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* *8*, 91-99.
- Naito, Y., Yamada, T., Matsumiya, T., *et al.* (2005). dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Res* *33*, W589-591.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., *et al.* (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* *292*, 110-113.
- Nielsen, A.L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J.A., *et al.* (2001a). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* *7*, 729-739.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., *et al.* (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* *416*, 103-107.

- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., *et al.* (2001b). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**, 561-565.
- Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., *et al.* (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* **91**, 311-323.
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B.A., Gandhi, S.G., *et al.* (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* **303**, 669-672.
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., *et al.* (2004). HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell* **15**, 467-476.
- Phillips, J.E., and Corces, V.G. (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**, 1194-1211.
- Piacentini, L., Fanti, L., Negri, R., *et al.* (2009). Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in *Drosophila*. *PLoS Genet* **5**, e1000670.
- Platero, J.S., Hartnett, T., and Eissenberg, J.C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J* **14**, 3977-3986.
- Powers, J.A., and Eissenberg, J.C. (1993). Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding. *J Cell Biol* **120**, 291-299.
- Prasanth, S.G., Prasanth, K.V., Siddiqui, K., *et al.* (2004). Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *EMBO J* **23**, 2651-2663.
- Prestel, M., Feller, C., Straub, T., *et al.* (2010). The activation potential of MOF is constrained for dosage compensation. *Mol Cell* **38**, 815-826.
- Quivy, J.P., Gerard, A., Cook, A.J., *et al.* (2008). The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 972-979.
- Raasi, S., and Wolf, D.H. (2007). Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 780-791.
- Raffa, G.D., Cenci, G., Siriaco, G., *et al.* (2005). The putative *Drosophila* transcription factor woc is required to prevent telomeric fusions. *Mol Cell* **20**, 821-831.
- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., *et al.* (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* **11**, 695-707.
- Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 336-343.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.
- Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., *et al.* (1999). KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* **19**, 4366-4378.

- Sachs, R.K., van den Engh, G., Trask, B., *et al.* (1995). A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 2710-2714.
- Sadaie, M., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., *et al.* (2008). Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol Cell Biol* *28*, 6973-6988.
- Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., *et al.* (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* *293*, 1651-1653.
- Sambrook, P., MacCallum, P., and Russell, R. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition edn.
- Sampath, S.C., Marazzi, I., Yap, K.L., *et al.* (2007). Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly. *Mol Cell* *27*, 596-608.
- Schotta, G., Ebert, A., Dorn, R., *et al.* (2003). Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* *14*, 67-75.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., *et al.* (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* *21*, 1121-1131.
- Serrano, A., Rodriguez-Corsino, M., and Losada, A. (2009). Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins do not drive pericentromeric cohesin enrichment in human cells. *PLoS One* *4*, e5118.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., *et al.* (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* *311*, 844-847.
- Smallwood, A., Esteve, P.O., Pradhan, S., *et al.* (2007). Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* *21*, 1169-1178.
- Smothers, J.F., and Henikoff, S. (2000). The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol* *10*, 27-30.
- Smothers, J.F., and Henikoff, S. (2001). The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol* *21*, 2555-2569.
- Stewart, M.D., Li, J., and Wong, J. (2005). Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol* *25*, 2525-2538.
- Sugimoto, K., Yamada, T., Muro, Y., *et al.* (1996). Human homolog of *Drosophila* heterochromatin-associated protein 1 (HP1) is a DNA-binding protein which possesses a DNA-binding motif with weak similarity to that of human centromere protein C (CENP-C). *J Biochem* *120*, 153-159.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2007). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 264-275.
- Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H.R., *et al.* (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J* *23*, 489-499.
- Tremethick, D.J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* *128*, 651-654.
- Triebenberg, S.J. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev* *5*, 190-196.

- Tumbar, T., and Belmont, A.S. (2001). Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator. *Nat Cell Biol* 3, 134-139.
- Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchock, B.A., *et al.* (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 19, 381-391.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., *et al.* (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672-676.
- Vermaak, D., Henikoff, S., and Malik, H.S. (2005). Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet* 1, 96-108.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., *et al.* (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-1837.
- Walters, K.J., Kleijnen, M.F., Goh, A.M., *et al.* (2002). Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry* 41, 1767-1777.
- Warren, J.T., Wismar, J., Subrahmanyam, B., *et al.* (2001). Woc (without children) gene control of ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* 181, 1-14.
- Weiler, K.S., and Wakimoto, B.T. (1995). Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 29, 577-605.
- Wismar, J., Habtemichael, N., Warren, J.T., *et al.* (2000). The mutation without children (*rgl*) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 226, 1-17.
- Wolffe, A.P., and Kurumizaka, H. (1998). The nucleosome: a powerful regulator of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61, 379-422.
- Xiao, T., Kao, C.F., Krogan, N.J., *et al.* (2005). Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 25, 637-651.
- Zhao, T., and Eissenberg, J.C. (1999). Phosphorylation of heterochromatin protein 1 by casein kinase II is required for efficient heterochromatin binding in *Drosophila*. *J Biol Chem* 274, 15095-15100.
- Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C.D., *et al.* (2000). Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem* 275, 28332-28338.
- Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjolinder, M., *et al.* (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 38, 1341-1347.
- Zhimulev, I.F., Belyaeva, E.S., Semeshin, V.F., *et al.* (2004). Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. *Int Rev Cytol* 241, 203-275.
- Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., *et al.* (1998). Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395, 402-405.

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide

8.1.1 Oligonukleotide für Klonierungen

HP1b NotI pPacFI	5'- CCGCGGCCGCCATGGCCGAATTCTCAGTG -3'
HP1b Xho pPacFI	5'- CCCTCGAGCTAGTCATCCGCATCCGGCTG -3'
HP1b Sall fw	5'- CCGGGTCGACATGGCCGAATTCTCAGTG -3'
HP1b NotI rev	5'- CGTCGCGGCCGCGTCATCCGCATCCGGCTG -3'
pGEXT1 UbqIn fw	5'- CGCGAATTCATGGCGGAAGGCGGCAGC -3'
pGEXT1 UbqIn rev	5'- CGCCTCGAGTAACTCAAGGACAACTG -3'
pPacFI rowNot5	5'- ATTGCGGCCGCTATGACGCGGTAACGAGAAG -3'
pPacFI rowBam3	5'- TACGGATCCTTCATTGCGGATGGTGATGGTG-3'
pPacFI wocKpn5	5'- CATGGTACCATGGAGGAGATATCCAGTTTG -3'
pPacFI wocKpn3	5'- GATGGTACCTTAAGTCGTTAGTAGCGCTATG -3'
pPacFI UbqInNot5	5'- CAAGCGGCCGCTATGGCGGAAGGCGGCAGC -3'
pPacFI UbqInBam3	5'- ATCGGATCCTTAACTCAAGGACAACTGGTTG -3'
3-3 FW	5'- CGGGGTACCATGAAACCCACCCAGTTC -3'
3-3 REV	5'- CGGGAGCTCTTACTGTAGCTCCGTAGA -3'
FlagNde fw	5'- AACATATGGACTACAAGGACGACGATG -3'
HP1aXho rev	5'- AGCTCGAGTTAATCTTCATTATCAGAGTAC -3'
HP1bXho rev	5'- AACTCGAGCTAGTCATCCGCATCCG -3'
HP1cXho rev	5'- AGCTCGAGTTATTGATTTTCCGCCATGG -3'
HANde fw	5'- AACATATGTATCCTTATGACGTGCCTG -3'
Xba Kozak Strep Kpn up	5'- [Phos]CTAGAGCCACCATGGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGTAC -3'
Xba Kozak Strep Kpn low	5'- [Phos]CTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCCATGGTGGCT -3'
Xba Kozak HA Kpn up	5'- [Phos]CTAGAGCCACCATGGACTATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCCAGCCTG GGAGGACCTGGTAC -3'
Xba Kozak Ha Kpn low	5'- [Phos]CAGGTCCTCCCAGGCTGGCATAGTCAGGCACGTCATAAGGATAGTCCAT GGTGGCT -3'
Kozak FLAG mcs low	5'- [Phos]GATCCTCGAGCTCGCGGCCGCGGTACCCTTGTATCGTCGTCCTTGTAG TCCATGGTGGT -3'
Kozak FLAG mcs up	5'- [Phos]CTAGAGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGTACCGCGGC CGCGAGCTCGAG -3'

8.1.2 Oligonukleotide für Realtime qPCR

CG4793_fw	5'- AATTGTATCCAAGCGGAAGC -3'
CG4793_rev	5'- TATAGCGATCGAGTGGAGCA -3'
nimB4_fw	5'- TTGTGCTCAACTACCGCAAC -3'
nimB4_rev	5'- CGTCCAGCTCGTATCCCTTA -3'
bam_fw	5'- ATGACCGAAAGCCACAAGTC -3'
bam_rev	5'- ACAGATCCTCCGCACTGATT -3'
33225_fw	5'- GAATGAACCCAGCACCATT -3'
33225_rev	5'- GCTGGGATGCATCGATATTC -3'
4415_fw	5'- AGATCTGCGTGGAGGACACT -3'
4415_rev	5'- TTCCATCCTCGTTACCTTGC -3'
net_fw	5'- ATTCGGCAGTTGTCCTAACG -3'
net_rev	5'- TATGTGCCGGATTAGGCATT -3'
HP1b_fw	5'- ACAAAGAAACGCCTGTCCAC -3'
HP1b_rev	5'- CTTCTGCTCCTCGGTATCGT -3'
numb_fw	5'- GACAATGACCTTCGACACGA -3'
numb_rev	5'- CATCTACGCTCCGCTCATTT -3'
Cyp310a1_fw	5'- ATTTGGAATTGGATGCGAAC
Cyp310a1_rev	5'- CAGCCCATCCTTTGTGTGTA
CG32985_fw	5'- GGATTGGTGGAGGATACCAA
CG32985_rev	5'- TGAGCAGCTTCGACTTTCTG

8.1.3 Oligonukleotide für RT-PCR

U6 fw	5'- TTCTTGCTTCGGCAGAACATATAC -3'
U6 rev	5'- GATTTTTCGTGTCATCCTTGC -3'
HP1c 5'UTR fw	5'- AAACGGTCACACTGGCACTA -3'
HP1c CR rev	5'- GTAATGCGCTTGTCCATGAT -3'

8.1.4 Oligonucleotide für RNAi Experimente

Uqln RNAi1 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCTGGTTGCACAAAAGTTTCG -3'
Uqln RNAi1 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATCGTCTGGCGCAGCAG -3'
Uqln RNAi2 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACGGCGCGGTTCCAGGAGC -3'
Uqln RNAi2 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCGCAGCTGCTCCATGC -3'
HP1c 1 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACTTCGTGGTGGAGCGCATC-3'
HP1c 1 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGATCGCACTTGGGTTTCTTCTCG -3'
HP1c 2 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATCCAGAAGCTGCGCGGCTAC-3'
HP1c 2 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAGGTGCCATCTTCTGGAAATAGTC -3'
HP1b 1 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAATAACAAAATTCGCAGTTGGAATAAC -3'
HP1b 1 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGACGAAGTTGGCTATCAGGTCTGGACAG -3'
HP1b 2 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCCGTCAATTTGGGATCATCCGGTG -3'
HP1b 2 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTCACTACTCTCGTCCGGCTTG -3'

ROW 1 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCTCAAATTGGGAATTTATTCGGATG -3'
ROW 1 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGGCTCAAGAATGGCCTGGAATC
ROW 2 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCACCGCCAAAGATTCGCAC -3'
ROW 2 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCAACATGTCGGAGCTCTGATC -3'
Woc RNAi fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGACGTGTCAAAGCTGAAGCTCTCC -3'
Woc RNAi rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCTCCGTCTGGGTGGCGCAA -3'
WOC 2 fw	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACGGTGGAGGAGGCAGAGACG -3'
WOC 2 rev	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAGCAGCATCTCCACCCTCAC -3'

8.2 Publikationen

Abel, J, Schares, G, Orzeszko, K, Gasser, RB, and Ellis, JT (2006). Hammondia isolated from dogs and foxes are genetically distinct. Parasitology 132, 187-192.

Abel J, Eskeland R, Raffa GD, Kremmer E, Imhof A. (2009). Drosophila HP1c is regulated by an auto-regulatory feedback loop through its binding partner Woc. PLoS ONE. 2009;4(4):e5089. Epub 2009 Apr 7

8.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Charakterisierung von HP1 Isoformen in *Drosophila melanogaster*“

von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

München, im April 2011

Jochen Abel

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jochen Abel
Geburtsdatum	28.12.1977
Geburtsort	Heilbronn
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

2006-heute	Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, AG Prof. Dr. Axel Imhof Promotion „Biochemische und funktionelle Charakterisierung von HP1 Isoformen in <i>Drosophila melanogaster</i> “
2005-2006	Lehrstuhl für Biochemie III, Universität Regensburg, AG Dr. Joachim Griesenbeck Diplomarbeit „Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsaktivators Pho4p aus <i>S.cerevisiae</i> bei definierten Chromatintransitionen an Zielpromotoren“
2000-2006	Universität Regensburg Studium der Biochemie (Diplom)

1998 Agrarwissenschaftliches Gymnasium Öhringen

Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1998-1999 Klinisch-Chemisches Institut, Katharinenhospital
Stuttgart

9 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. Imhof für seine stetige Unterstützung, Motivation und für die Förderung meiner Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich auch herzlich bei Prof. Dr. P. Becker für zahlreiche Ratschläge und nicht zuletzt für die tollen Arbeitsbedingungen am Lehrstuhl bedanken.

Meinem *Thesis Advisory Committee* (Dr. C. Chioda, Dr. A. Hochheimer, Prof. Dr. G. Schotta) danke ich für die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen rund um mein Projekt.

Danke an Dr. Ragnhild Eskeland, ohne die meine Arbeit an diesem Projekt nicht möglich gewesen wäre. Danke an das Pimpinelli-Labor sowie v.a. Viola für die schöne Zeit in Rom! Ein besonderer Dank gebührt dem Rest des HP1 Teams, Andi und Irene, für deren phantastische Unterstützung.

Dr. Tobias Straub danke ich für seine stete Unterstützung in sämtlichen Bereichen und die großartigen und inspirierenden Diskussionen in dessen Büro.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen, insbesondere bei jenen des „Imhof-Labors“, für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft sowie für den Spaß bei der Arbeit.

Der größte Dank gebührt jedoch Lu und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich diese Arbeit nicht hätte anfertigen können.