

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Christian Beisel

aus Achern

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Identifizierung und Charakterisierung
von Histonmethyltransferasen
in *Drosophila melanogaster***

Gutachter: PD Dr. Frank Sauer

Prof. Dr. Renato Paro

Diese Arbeit wurde erstellt am ZMBH (Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg) der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg unter der Leitung von PD Dr. Frank Sauer.

An dieser Stelle möchte ich Frank für die Bereitstellung meines Themas und für seine Unterstützung danken.

Ein großes Dankeschön an Simona, Jochen und Thorsten für die gute Kameradschaft im Labor. Hier möchte ich auch die beiden Ex'ler „Jung“-Dung und Markus nicht vergessen.

Ich danke Axel Imhof aus dem Labor von P. Becker in München für seine Hilfestellung und Hediye Erdjument-Bromage aus dem Labor von P. Tempst in New York für die radioaktive Edman-Sequenzierung.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts bin ich Katja, Matthias und Rainer sehr dankbar.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die meine Ausbildung immer unterstützt haben.

Für Dich –

Es war schwer zu begreifen
- aber Du wirst immer hier sein.

1 EINLEITUNG	1
1.1 Chromatin	1
1.1.1 Die Chromatinstruktur ist dynamisch	3
1.2 Epigenetik, PcG, trxG und ASH1	4
1.3 ATP-abhängige Nukleosomen-Remodelling-Faktoren	7
1.3.1 Regulation der Nukleosomen-Remodelling-Faktoren	9
1.4 Histonmodifizierungen	10
1.4.1 Histonacetylierung	10
1.4.2 Histonphosphorylierung	11
1.4.3 Histonubiquitinierung	12
1.4.4 Histonmethylierung	12
1.4.4.1 Argininspezifische Methylierung	13
1.4.4.2 Lysinspezifische Methylierung	15
1.4.4.3 H3-K9-Methylierung, Heterochromatin-Silencing und euchromatische Transkriptionsrepression	17
1.4.4.4 Weitere lysinspezifische Methylierungen in Histonen	18
1.4.4.5 Lysin-Methylierung als epigenetische Markierung und der Histoncode	18
1.4.4.6 Zusammenspiel verschiedener Histonmodifizierungen	19
1.5 Ziele der Arbeit	20
2 ERGEBNISSE	22
2.1 Ansatz zur Detektion der HMT-Aktivität	22
2.2 Biochemische Identifizierung von HMTn	23
2.2.1 Test von embryonalem <i>Drosophila</i> -Kernextrakt auf HMT-Aktivität	23
2.2.2 Test des ersten chromatographischen Schrittes	24
2.2.3 Zusammenfassung der Reinigungen	26
2.2.4 Identifizierung der HMTn CG5358 und CG6554	27
2.2.4.1 Reinigung 1 - Erster Schritt: Heparin-Sepharose	27
2.2.4.2 Reinigung 1 - Zweiter Schritt: Source15Q	28
2.2.4.3 Reinigung 1 - Dritter Schritt: Hydroxylapatit	31
2.2.4.4 Reinigung 1 - Vierter Schritt: MiniQPE4.6/50-Anionentauschersäule	32
2.2.4.5 Reinigung 1 - Fünfter Schritt: UV-Quervernetzung von [³ H]-SAM	36
2.2.4.6 Reinigung 1 - Sechster Schritt: Massenspektrometrische Analyse und Identität der HMTn	37
2.2.4.7 Weitergehende Charakterisierung von CG5358 und CG6554	40
2.2.5 Identifizierung der HMT CG6563	43
2.2.5.1 Reinigung 2 - Erster Schritt: Startmaterial und Q-SepharoseHP	43
2.2.5.2 Reinigung 2 - Zweiter Schritt: Präzipitation mit anschließender Gelfiltration	44
2.2.5.3 Reinigung 2 - Dritter Schritt: Source15QPE4.6/100	46
2.2.5.4 Reinigung 2 - Vierter Schritt: Massenspektrometrische Analyse	49
2.2.6 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten HMTn CG5358, CG6554 und CG6563	51
2.2.6.1 Klonierung	51
2.2.6.2 Expression und HMT-Aktivität	52
2.2.6.3 Monomer oder Oligomer?	54
2.3 Identifizierung und Charakterisierung lysinspezifischer HMTn	56
2.3.1 Identifizierung der SET-Proteine	56
2.3.2 Klonierung, Expression und Reinigung	60
2.3.3 HMT-Aktivität von SU(VAR)3-9	62
2.3.4 HMT-Aktivität von CG4976	63
2.3.5 HMT-Aktivität von CG1716	64

2.3.6 HMT-Aktivität von ASH1	65
2.3.7 Zusammenfassung: SET-Domänen-Proteine	69
2.4 ASH1-HMT-abhängige Transkriptionsaktivierung	70
2.5 p55 und CG2051 (dHAT-1) binden K9-dimethyliertes Histon H3	76
3 DISKUSSION	79
3.1 CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1	79
3.1.1 Mögliche Funktionen von CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1	81
3.1.2 Biochemische Eigenschaften von CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1	82
3.1.3 Substratspezifität von CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1	84
3.2 CG6563/dPRMT3	85
3.3 Funktion der Proteindomänen der PRMTn	86
3.4 Lysinspezifische Histonmethyltransferasen	87
3.4.1 ASH1...	88
3.4.1.1 Histonmethylierung in der epigenetischen Genaktivierung	88
3.4.1.2 Funktion des ASH1-vermittelten Methylierungsmusters–Übersetzung des Histoncodes	90
3.4.2 ...und die anderen?	92
3.4.2.1 CG2995/dG9a	93
3.4.2.2 CG4976/dMES-4	93
3.4.2.3 TRR	94
3.4.2.4 CG12196	94
3.4.2.5 CG1716	95
3.5 Einige Schlussbemerkungen und Ausblicke	95
4 ABKÜRZUNGEN	100
5 MATERIAL UND METHODEN	101
5.1 Laborausstattung	101
5.2 Verbrauchsmaterial	102
5.3 Chemikalien, Enzyme, Proteine, Molekulargewichtsmarker	103
5.4 Antikörper und –Konjugate	104
5.5 Peptide	104
5.6 DNA	105
5.6.1 Oligonukleotide	105
5.6.1.1 Oligonukleotide für die <i>in vitro</i> -Mutagenese von <i>ash1</i>	105
5.6.1.2 Oligonukleotide für PCR-Klonierungen	105
5.6.1.3 Oligonukleotide zur PCR-Analyse der XChIPn	107
5.6.2 Plasmide	107
5.6.2.1 <i>E.coli</i> -Expression	107
5.6.2.2 <i>Sf9</i> -Expression	108
5.6.2.3 Klonierung und <i>in vitro</i> -Expression	109
5.7 Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	111

5.8 Fliegenstämme	111
5.9 Medien, Puffer und Stammlösungen	111
5.9.1 Antibiotika	111
5.9.2 Medien, Lösungen zur Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	112
5.9.3 Lösungen für SDS-PAGE	112
5.9.4 Lösungen für die Coomassie-Färbung	113
5.9.5 Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen	113
5.9.6 Lösungen für Western Blot	113
5.9.7 Häufig verwendete Stammlösungen/Puffer	114
5.10 Analyse und Manipulation von DNA (Standardmethoden)	114
5.10.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Hanahan (Hanahan, 1983)	114
5.10.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Inoue <i>et al.</i>	115
5.10.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	115
5.10.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	115
5.10.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	116
5.10.6 Restriktionsverdau von DNA	116
5.10.7 Agarosegelelektrophorese	116
5.10.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	116
5.10.9 Phenol/Chloroform-Extraktion	116
5.10.10 Ethanol-Präzipitation	117
5.10.11 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide	117
5.10.12 Ligation von DNA-Fragmenten	117
5.10.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	117
5.10.14 Gerichtete Mutagenese von DNA <i>in vitro</i>	118
5.11 Analyse von Proteinen (Standardmethoden)	118
5.11.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	118
5.11.2 Coomassie-Färbung	118
5.11.3 Silberfärbung	119
5.11.4 Immunologischer Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot)	119
5.11.4.1 Elektrotransfer von Proteinen	119
5.11.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen	120
5.11.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	121
5.11.6 TCA-Präzipitation von Proteinen	121
5.11.7 Radioaktive Edman-Sequenzierung	121
5.12 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine in bzw. aus <i>E. coli</i>	121
5.12.1 Polyhistidin(His ₁₀)-markierte Proteine	122
5.12.2 GST-markierte Proteine	122
5.12.3 Rekombinantes Histon H2A aus <i>Xenopus laevis</i>	123
5.13 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine in bzw. aus <i>Sf9</i>-Zellen	124
5.13.1 Amplifikation und Reamplifikation rekombinanter Baculoviren	124
5.13.2 Proteinexpression in <i>Sf9</i> -Zellen	124
5.13.3 Reinigung der Flag-markierten Proteine aus <i>Sf9</i> -Zellen	125
5.14 Präparation von Oligonukleosomen und Histonoktameren aus <i>Drosophila</i>-Embryonen	125
5.14.1 Sammeln von <i>Drosophila</i> -Embryonen	125
5.14.2 Dechorionisierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	125
5.14.3 Einfrieren dechorionisierter <i>Drosophila</i> -Embryonen	126
5.14.4 Präparation von Zellkernen aus <i>Drosophila</i> -Embryonen	126
5.14.5 Reinigung von Oligonukleosomen	126
5.14.6 Reinigung von Histonoktameren	127
5.15 Herstellung von Kernextrakt aus <i>Drosophila</i>-Embryonen	128
5.16 Chromatographische HMT-Reinigungen	128

5.17 Histonmethyltransferase(HMT)-Aktivitäts-Tests	129
5.18 UV-Quervernetzung von [³H]-SAM	130
5.19 “In-Gel-Assay“: HMT-Aktivitäts-Gel-Assay	130
5.20 Protein-Protein-Interaktionsexperimente	131
5.20.1 ASH1-TRX-Interaktion	131
5.20.2 Protein-Histontail-Interaktion	131
5.21 Chromatin-Immunpräzipitation (XChIP)	132
5.21.1 Präparation und Fixierung der Imaginalscheiben des dritten Beinpaars	132
5.21.2 Chromatin-Immunpräzipitation	132
5.21.3 Analyse der XChIPn durch PCR	133
6 LITERATUR	134
7 VERÖFFENTLICHUNG	149
8 ZUSAMMENFASSUNG	150

1 Einleitung

1.1 Chromatin

In eukaryotischen Zellen bildet die DNA des Zellkerns mit Histon- und Nichthistonproteinen einen Komplex den man als Chromatin bezeichnet. Das sich wiederholende Grundelement des Chromatins ist das Nukleosom, das aus einem Histon H3/H4-Tetramer, zwei Histon H2A/H2B-Heterodimeren und einem 146 Basenpaare umfassenden DNA-Doppelstrang besteht. Das im Zentrum liegende H3/H4-Tetramer setzt sich mit den flankierenden H2A/H2B-Heterodimeren zu einem Zylinder zusammen, der einen Durchmesser von 6,5 nm hat. Um dieses Oktamer ist die DNA in einer linksgängigen Helix 1,7 Mal herumgewunden (Abb. 1-1).

Jedes Histon hat eine zentrale globuläre Domäne, einen unterschiedlich stark ausgeprägten COOH-terminalen und einen stark basischen NH₂-terminalen Anteil. Über die globuläre Domäne, die vor allem aus Helices aufgebaut ist und etwa 75 % der Aminosäuresequenz ausmacht, werden sowohl Histon-Histon- als auch Histon-DNA-Interaktionen ausgebildet. Die verbleibenden terminalen Sequenzen, in denen die unterschiedlichsten posttranslationalen Modifizierungen vorzufinden sind (siehe Punkt 1.4 und Abb. 1-1), sind flexible, scheinbar unstrukturierte Domänen. Der NH₂-terminale Anteil wird auch allgemein als Histontail oder Tailregion bezeichnet. Die NH₂-Termini der Histone H3 und H4 sind die konserviertesten Sequenzen der phylogenetisch ohnehin schon hochkonservierten Proteine. Genetische Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, dass kleine Deletionen oder Punktmutationen in den Tailregionen zu einer Vielzahl von schwerwiegenden Defekten führen (Grunstein, 1997). Obwohl die Tailregionen aufgrund ihrer großen Flexibilität in der Kristallstruktur eines Nukleosoms nicht oder nur teilweise aufgelöst werden konnten (Luger *et al.*, 1997a; White *et al.*, 2001), lässt sich aufgrund experimenteller Daten vermuten, dass sie mit der DNA zwischen zwei Nukleosomen (Linker-DNA) assoziieren und außerdem Wechselwirkungen mit anderen Nukleosomen (internukleosomal) eingehen (Marmorstein, 2001; Horn und Peterson, 2002).

Im Durchschnitt befinden sich Nukleosomen entlang der DNA-Doppelstränge in Intervallen von etwa 160 (Hefe) bis über 200 (höhere Eukaryoten) Basenpaaren. *In vitro* bilden diese Nukleosomenreihen eine ausgestreckte 11 nm dicke perlenschnurartige Struktur oder

kondensieren zu einer kompakten Faser mit 30 nm Durchmesser (30 nm-Faser) (Abb. 1-1). *In vivo* werden diese Konformationen durch weitere Kondensierung und weiteres Aneinanderlagern der Fasern zu unterschiedlich komplexen Strukturen zusammengebaut. Aufgrund des Aussehens unter dem Mikroskop wird Chromatin in Heterochromatin und Euchromatin unterteilt. Im Heterochromatin findet man nur wenige transkribierte Gene. Es ist stark kondensiert und auch während der Interphase sichtbar. Das dekontensierte Euchromatin enthält dagegen die meisten aktiven Gene. *In vivo* assoziieren zum Teil strukturgebende Nucleohistonproteine und Linker-Histone mit den Nucleosomenreihen und bilden das eigentliche Chromatin. Als Linker-Histone werden Histonproteine mit geringerer evolutionärer Konservierung bezeichnet, wie H1 und seine Varianten, die an die Linker-DNA am Ein- und Ausgang eines Nucleosoms binden (Hayes und Hansen, 2001). Im Gegensatz zu früheren Vermutungen scheinen die Linker-Histone keinen direkten Einfluss auf den Kondensierungs- und Faltungsvorgang der Nucleosomenreihen zu haben (Carruthers und Hansen, 2000).

Einerseits sind die Tailregionen der nucleosomalen Histone essentiell für die Kondensierung der Nucleosomenreihen zu 30 nm-Fasern und für die Bildung höherer Strukturen durch das Aneinanderlagern dieser Fasern. Die Tailregionen binden bei diesem Vorgang benachbarte Nucleosomen innerhalb der eigenen und auch benachbarter 30 nm-Fasern. Das heißt, die Kondensierung ist eine intrinsische Eigenschaft der Nucleosomenreihen, bei der Linker-Histone keine Rolle spielen (Carruthers und Hansen, 2000). Andererseits konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Zugabe von H5, einer H1-Variante, zu Nucleosomenreihen, eine homogen kompakte Struktur entsteht, wohingehend in Abwesenheit von H5 eher eine Ansammlung unterschiedlicher Konformationen beobachtet wurde (Carruthers *et al.*, 1998). Dementsprechend scheint die Faltung von den Tailregionen und die Stabilisierung der entstandenen Strukturen von den Linker-Histonen auszugehen.

Die Komplexierung der DNA zu Chromatin kann DNA-abhängige Prozesse wie Transkription, Replikation oder Rekombination auf mehreren Ebenen reprimieren. 1) Bindungsstellen für DNA-bindende Proteine werden innerhalb nucleosomaler DNA durch ihre Bindung an das Histonoktamer verdeckt. So ist die Affinität der Proteine zu nucleosomaler DNA gegenüber ihrer Affinität zu nackter DNA um den Faktor 10^3 - 10^5 reduziert. 2) Durch die Komplexierung wird die DNA gekrümmt, was viele Proteine von der Bindung abhält. 3) Durch die Bildung übergeordneter Strukturen und deren Stabilisierung durch Linker-Histone und Nucleohistonproteine werden DNA-Bereiche in einem Zustand „eingefroren“, in dem be-

stimmte transaktivierende Faktoren und RNA-Polymerasen keinen Zugang zur DNA haben (Hayes und Hansen, 2001; Woodcock und Dimitrov, 2001; Struhl, 1999).

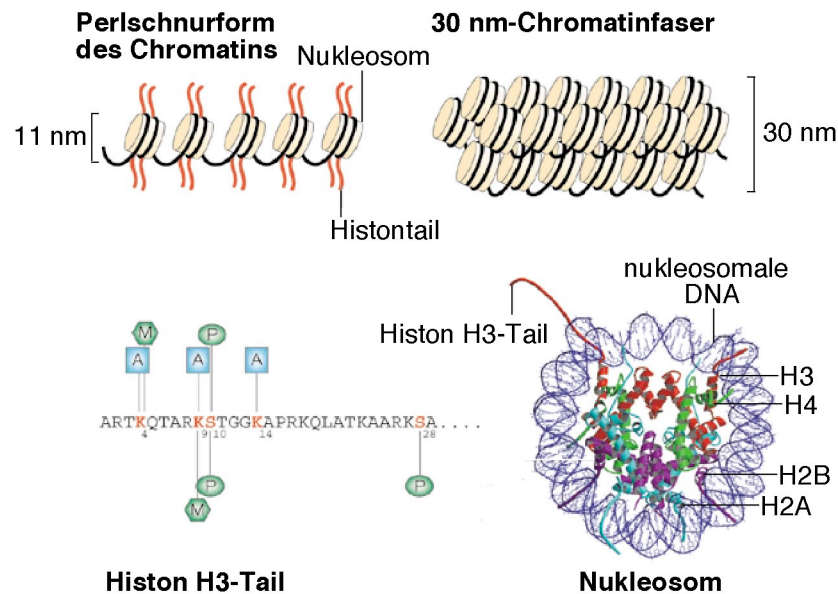


Abbildung 1-1. Strukturelemente des Chromatins. Oben sind Oktamere als gelbe Zylinder, DNA in schwarz und die Histontails in rot gezeichnet. Links ist eine 11 nm Nucleosomenreihe in Perlschnurform und rechts eine kondensierte 30 nm-Chromatinfaser schematisch dargestellt. Unten links, Histon H3-Tail aus Hefe mit Modifizierungen, die die Genaktivität beeinflussen. A, Acetyl-, P, Phosphat-, M, Methylrest. Die Modifizierungen, die oberhalb der Sequenz angegeben sind, wirken aktivierend auf Transkription, die unterhalb inhibierend. Unten rechts, gelöste Kristallstruktur eines Nucleosoms (Luger *et al.*, 1997a). DNA in blau. Rot, H3. Grün, H4. Türkis, H2A. Violett, H2B (verändert nach Marmorstein, 2001)

1.1.1 Die Chromatinstruktur ist dynamisch

Die Voraussetzung dafür, dass Chromatin nicht nur als Verpackung und zur Kondensierung des Genoms innerhalb des Zellkerns dient, sondern auch zur aktiven Regulation DNA-abhängiger Prozesse fähig sein kann, ist die dynamische Struktur des Nucleosoms. Nucleosomen sind keine strukturell inerten Einheiten, sondern können verschiedene Konformationen hinsichtlich der Assoziation und Dissoziation der DNA eingehen. So werden zum Beispiel Bindungsstellen für Proteine, die oftmals als unzugänglich innerhalb des Nucleosoms liegend erscheinen, in ausreichend schnellen Raten an der Außenseite exponiert, wodurch Proteine mit einer ausreichenden Wahrscheinlichkeit binden können (Anderson und Widom, 2000;

Polach *et al.*, 2000). Dieser „positive“ Prozess kann durch die Bildung übergeordneter Chromatinstrukturen und deren Stabilisierung durch Linker-Histone und Nichthistonproteine in Richtung der Repression verschoben werden. Außerdem wurden Mechanismen entwickelt, die diese Strukturen aktiv regulieren und beeinflussen können. ATP-abhängige, sogenannte Nukleosomen-Remodelling-Faktoren, verändern die Interaktion zwischen Histonen und DNA, sodass die nukleosomale DNA zugänglicher für interagierende Proteine wird oder die Nukleosomen gleichmäßig dicht aneinandergereiht werden (Peterson, 2002; Becker und Hörz, 2002; Narlikar *et al.*, 2002; Workman und Kingston, 1998). Durch die posttranslationale Modifizierung von Histonen, vor allem in ihren NH₂-terminalen Tailregionen, durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung werden zum einen auf der Chromatinfaser Erkennungs- und Bindungsstellen für regulatorische Proteine geschaffen, zum anderen die Chromatinstruktur direkt verändert (Turner, 2000; Strahl und Allis 2000; Marmorstein, 2001; Turner, 2002).

1.2 Epigenetik, PcG, trxG und ASH1

Die dynamische Regulation der Chromatinstruktur ist die Grundlage für die epigenetische Transkriptionsregulation. Mit Epigenetik umschreibt man die Mechanismen, die den Transkriptionszustand von Genen, der während der Entwicklungsphase einmal festgelegt wurde, unabhängig von der genetischen Information über viele Zellteilungen hinweg stabil halten. Der Transkriptionszustand eines Gens, sei er reprimiert oder aktiviert, wird über die Chromatinstruktur festgelegt. So ist ein Organismus in der Lage, ohne Veränderung der genetischen Information, in verschiedenen Zellen unterschiedliche Expressionsmuster aufrechtzuerhalten.

Das am besten charakterisierte epigenetische System umfasst die Proteine der Polycomb- (PcG) und der Trithorax-Gruppe (trxG), die von *Drosophila* bis zu den Säugetieren phylogenetisch konserviert sind und unter anderem die Expression homöotischer Gene steuern. Beide Proteingruppen scheinen in hochmolekularen Komplexen zu agieren (Tab. 1-1) und durch Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur die Expression bestimmter Gene stabil zu halten. Die PcG-Proteine reprimieren die Genexpression, während die Proteine der trxG aktivierend wirken (Simon und Tamkun, 2002).

Tabelle 1-1. Teilweise biochemisch charakterisierte PcG- und trxG-Komplexe aus *Drosophila*.

Komplex	PcG/trxG-Protein ^a	bekannte oder vermutete biochemische Aktivitäten des Komplexes
<i>PcG-Komplexe</i>		
PRC1	Polycomb (PC) Polyhomeotic (PH) Posterior sex combs (PSC)	Inhibiert Chromatin-Remodelling Reduziert Zugänglichkeit zur DNA? Interagiert mit generellen Transkriptionsfaktoren
ESC-E(Z)	ESC E(Z)	Histondeacetylase Histonmethyltransferase
<i>trxG-Komplexe</i>		
TAC1	TRX	Histonacetyltransferase
BRM	Brahma (BRM) Moirá (MOR) SNR1 OSA	ATP-abhängiges Chromatin-Remodelling

^aEs sind nur die PcG/trxG-Proteinuntereinheiten der Komplexe, die noch weitere Untereinheiten enthalten, eingetragen. (Verändert nach Simon und Tamkun, 2002)

Die meisten PcG-Proteine besitzen keine intrinsische DNA-Bindungsaktivität. Sie werden wahrscheinlich durch andere Proteine wie GAGA, Zeste oder Pleiohomeotic zu den PREs (Polycomb Response Elements) rekrutiert, von wo eine Heterochromatisierung spezifischer DNA-Bereiche und damit eine Inaktivierung der darin liegenden Gene ausgeht (Strutt *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998; Horard *et al.*, 2000). DNA-Bindungsstellen für trxG-Komplexe, die TREs (Trithorax Response Elements), scheinen in vielen Fällen mit PREs zu überlappen, wodurch man einen Einblick in die Koordination der antagonistischen Aktivitäten erhält (Tillib *et al.*, 1999). Eine inhibitorische Aktivität des PRC1- gegenüber des BRM-Komplexes konnte *in vitro* rekonstituiert werden (Punkt 1.3.1) (Shao *et al.*, 1999).

Die genauen Mechanismen, wie ein aktiver oder reprimierter Transkriptionszustand spezifischer Gene mitotisch stabil gehalten und damit über den Prozess der Replikation weitergegeben wird, sind nicht geklärt. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten jedoch, dass bei der Markierung epigenetisch regulierter Chromatinbereiche DNA-Methylierung und/oder Histonmodifizierungen eine Rolle spielen. So wurden auch unter den PcG/trxG-Komplexen

enzymatisch aktive Untereinheiten identifiziert, die Histone modifizieren können (Tab. 1.1 und Punkt 1.4).

In dieser Arbeit wurde *Drosophila*-ASH1 (Absent Small or Homeotic discs), ein epigenetischer Aktivator der trxB, als histonmodifizierendes Enzym charakterisiert (Punkt 2.3 und Punkt 2.4). Ursprünglich wurde *ash1* in einem Screen für Mutationen identifiziert, die die Entwicklung von Imaginalscheiben in Larven von *Drosophila* beeinträchtigen (Shearn *et al.*, 1987). Mutationen in *ash1* führen zu Transformationen von Arista zu Bein, erstem zu zweitem Bein, posteriorem zu anteriorem Flügel, drittem zu zweitem Bein, Haltere zu Flügel und Genitalien zu Bein oder Fühler (Shearn *et al.*, 1987). Die Transformation von drittem zu zweitem Bein resultiert aus dem Verlust der Expression des homöotischen Gens *Ultrabithorax* in den Imaginalscheiben des dritten Beinpaars (LaJeunesse und Shearn, 1995). Mutationen in *ash1* verstärken Mutationen in den trxB-Genen *brahma* (*brm*) und *trithorax* (*trx*), was eine Koexistenz der Proteine in multimeren Komplexen impliziert (Shearn, 1989; Tripoulas *et al.*, 1994). In einem aus *Drosophila*-Embryonen gereinigten BRAHMA-Komplex konnte jedoch kein ASH1 nachgewiesen werden (Papoulas *et al.*, 1998). ASH1 eluierte in einem separaten 2 MDa großen Komplex, der nicht näher charakterisiert wurde. Inwiefern *ash1* und *brahma* funktional interagieren, ist dementsprechend unbekannt. Dagegen kolokalisieren ASH1 und TRX in wenigstens 23 Banden auf Polytänchromosomen (Tripoulas *et al.*, 1996). Die Bindung von TRX an die Chromosomen scheint dabei ASH1-abhängig zu sein (Kuzin *et al.*, 1994). Zusätzlich konnte eine direkte Interaktion der beiden Proteine *in vitro* und eine Kolokalisation auf einem TRE innerhalb der *bxd*-Regulatorregion des *Ultrabithorax*-Promotors gezeigt werden (Rozovskaia *et al.*, 1999). Dass ASH1 aber nicht ausschließlich mit TRX zusammenarbeitet, lässt sich daran erkennen, dass ASH1 in etwa 100 zusätzlichen Banden auf Polytänchromosomen lokalisiert ist (Tripoulas *et al.*, 1996). So wurde in einem Screen, in dem nach Suppressoren eines *dCBP*-Phänotyps (*dCBP* codiert die Histonacetyltransferase CBP) gesucht wurde, *ash1* identifiziert, wohingehend *trx* nicht in der Lage war, den Phänotyp zu supprimieren (Bantignies *et al.*, 2000). ASH1 und CBP interagieren auch *in vitro* miteinander (Bantignies *et al.*, 2000). Trotz der bekannten Interaktionen waren die molekularen Mechanismen der ASH1-abhängigen epigenetischen Transaktivierung ungeklärt.

1.3 ATP-abhängige Nukleosomen-Remodelling-Faktoren

Die verschiedenen bisher identifizierten Nukleosomen-Remodelling-Faktoren werden aufgrund der Sequenzähnlichkeiten ihrer ATPase-Untereinheiten in drei Familien unterteilt, die SWI/SNF-, die ISWI- und die Mi-2-Familie (Tab. 1-2). Remodelling-Faktoren der SWI/SNF- und der ISWI-Familie wurden bisher in Hefe, *Drosophila* und Mensch identifiziert. SWI/SNF ist Bestandteil hochmolekularer Proteinkomplexe mit bisher acht bekannten Untereinheiten in *Drosophila* und über zehn Untereinheiten in Hefe und Mensch. Die ISWI-Komplexe enthalten dagegen nur zwei bis vier Proteine. Je ein Komplex der Mi-2-ATPase ist bisher in *Drosophila* und Mensch gefunden worden. Diese bestehen ebenfalls aus wenigstens acht Untereinheiten (Narlikar *et al.*, 2002).

Tabelle 1-2. ATP-abhängige Remodelling-Komplexe.

Organismus	SWI/SNF-Familie	ISWI-Familie	Mi-2-Familie
Hefe	SWI/SNF, RSC	ISW1, ISW2	
<i>Drosophila</i>	dSWI/SNF (BRM)	NURF, CHRAC, ACF	dNuRD
Mensch	hSWI/SNF	RSF, hACF/WCRF, hCHRAC	NuRD

Allen Remodelling-Komplexen ist gemeinsam, dass sie die Energie der ATP-Hydrolyse dazu nutzen, die zahlreichen schwachen Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen aufzubrechen, um eine Neuorganisation der Struktur zu erreichen. *In vitro* zeigen alle Komplexe Remodelling-Aktivität, was sich in ihrer Fähigkeit ausdrückt, zum Beispiel Histon-DNA-Interaktionen innerhalb von Nukleosomen aufzubrechen, Histonoktamere entlang eines DNA-Doppelstranges zu bewegen oder sie von einem DNA-Molekül auf ein anderes zu transferieren und nukleosomale DNA für Transkriptionsfaktoren oder Restriktionsenzyme zugänglich zu machen (Peterson, 2002).

Was sie dabei zum Teil unterscheidet, ist ihre Substratspezifität, das Endprodukt der Reaktion und der Mechanismus, wie sie die Struktur verändern. Nukleosomen ohne NH₂-terminale Tailregionen können zum Beispiel von hSWI/SNF, nicht aber von NURF remodelliert

werden, wobei die ATPase Untereinheit von SWI/SNF sowohl durch Nukleosomen als auch durch nackte DNA stimuliert werden kann, die von NURF aber signifikant besser durch Nukleosomen (Tsukiyama und Wu, 1995; Längst und Becker, 2001). Ein weiteres Beispiel ist die Positionierung eines Nukleosoms auf einem kurzen DNA-Fragment. dISWI positioniert das Nukleosom an den Rand des Fragments, während dMi-2 das Oktamer in die zentrale Position bewegt (Brehm *et al.*, 2000).

Wie diese Bewegungen von Oktameren, um die die DNA gewickelt ist, mechanistisch vor sich gehen, ist noch nicht vollständig geklärt. Bei ISWI-Komplexen deuten bisher alle Daten auf einen „Sliding“-Mechanismus hin, bei dem das Oktamer an der DNA entlanggleitet und diese sich gleichmäßig in eine Richtung um das Oktamer bewegt. Für diesen Mechanismus sind freie flankierende DNA-Bereiche notwendig. SWI/SNF-Komplexe scheinen dagegen die Konformation der Nukleosomen in die Richtung eines energiereichen Zwischenzustandes zu verändern, in der die DNA von ihrer „idealisierten“ Bindung an die Histone abweicht. Diese Struktur kann anschließend auf das ursprüngliche Energieniveau kollabieren, wodurch das Remodelling des Nukleosoms zufällig zur Exposition anderer DNA-Sequenzen führen kann (Narlikar *et al.*, 2002).

Nukleosomen sind nicht über das gesamte Chromatin gleich verteilt. Es gibt lokale Unterschiede. Manche Promotorregionen sind mit gleichmäßig dicht verteilten Nukleosomen besetzt, während andere dazwischen Lücken aufweisen. Auf solche unterschiedlichen Herausforderungen hin wurden verschiedene Remodelling-Faktoren entwickelt, die verschiedene Substrateigenschaften und Mechanismen des Remodellings zeigen. Müssen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in dicht gepackten Bereichen exponiert werden, können die Oktamere nicht durch „Sliding“ entfernt werden, da dafür keine freie DNA zur Verfügung steht. Hierfür wären SWI/SNF-Komplexe am besten geeignet, wie auch am Beispiel der Glucocorticoidrezeptor-abhängigen Transkription von dem Promotor des MMT(Mouse Mammary Tumor)-Virus aus gezeigt wurde (Deroo und Archer, 2001). Anders sieht es bei der Replikation aus, wonach neue Oktamere auf der DNA verteilt werden müssen und „Sliding“ der Mechanismus der Wahl sein könnte. In *Drosophila* wurde zum Beispiel eine Beteiligung von einem oder mehreren ISWI-Komplexen an der Etablierung der Struktur des X-Chromosoms von Männchen gezeigt (Deuring *et al.*, 2000).

1.3.1 Regulation der Nukleosomen-Remodelling-Faktoren

Aufgrund ihrer Fähigkeit Chromatinstrukturen zu verändern und dabei eine große Menge ATP zu hydrolysieren, muss die Aktivität der Nukleosomen-Remodelling-Faktoren *in vivo* streng reguliert werden, was durch verschiedene Mechanismen bewerkstelligt wird.

Durch Rekrutierung der Komplexe durch Transkriptionsfaktoren werden sie zu den entsprechenden Chromatinbereichen geführt, wo sie ihre Arbeit verrichten sollen. SWI/SNF wird in Hefe durch verschiedene Aktivatoren mit sauren Aktivierungsdomänen rekrutiert, humanes SWI/SNF durch Aktivatoren wie MyoD, Hitzeschockfaktoren oder verschiedene Steroidhormonrezeptoren. dNuRD wird in *Drosophila* von dem Repressor Hunchback rekrutiert (Peterson und Workman, 2000).

Ein weiterer Mechanismus ist die Inaktivierung der Komplexe durch Modifizierung oder durch Bindung inhibitorischer Proteine. Untereinheiten des humanen SWI/SNF werden zum Beispiel während der Mitose phosphoryliert, wodurch der Komplex von kondensierendem Chromatin dissoziiert (Sif *et al.*, 1998).

Auch Linker-Histone haben einen reprimierenden Einfluss auf das Chromatin-Remodelling, was vor allem mit SWI/SNF untersucht wurde. Einerseits inhibiert die Assoziation von Linker-Histonen an kondensierte Chromatinstrukturen die Bindung von Remodelling-Faktoren an die Chromatinfaser, andererseits inhibieren Linker-Histone an den von ihnen gebundenen Nukleosomen die katalytische Aktivität eines chromatingebundenen Remodelling-Faktors (Hill und Imbalzano, 2000; Horn *et al.*, 2002). Durch diese Funktionen der Linker-Histone können große Chromatinbereiche neutral gehalten oder inaktive Bereiche von einem benachbart liegenden aktiven Bereich, zu dem ein Remodelling-Faktor rekrutiert wurde, abgeschirmt werden.

Da mit Remodelling-Faktoren inaktivierte Chromatinbereiche aufgelockert und in transkriptionskompetente Strukturen überführt werden können, überrascht es nicht, dass Untereinheiten des *Drosophila*-SWI/SNF-Komplexes BRAHMA als trxG-Proteine identifiziert wurden (Tab. 1-1). So konnte auch *in vitro* gezeigt werden, dass aus *Drosophila*-Embryonen gereinigter PcG-Komplex PRC1 (Tab. 1-1) die Remodelling-Aktivität von SWI/SNF unterbindet (Shao *et al.*, 1999). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ein Modell aufstellen, nach dem PcG-Proteine nach Rekrutierung zu einem PRE den Zustand der Transkriptionsrepression durch Schutz des Chromatinbereiches vor Remodelling-Faktoren aufrechterhalten.

1.4 Histonmodifizierungen

(meine)

1.4.1 Histonacetylierung

Die reversible Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinen in den NH_2 -terminalen Tailregionen ist die am besten charakterisierte Histonmodifizierung (Kuo und Allis, 1998; Marmorstein und Roth, 2001; Eberharter und Becker, 2002). In Abb. 1-2 sind die bisher bekannten acetylierten Lysine aufgelistet. Bisher wurden zahlreiche Transkriptionsaktivatoren oder Koaktivatoren, wie zum Beispiel p300/CBP, PCAF, Gcn5p oder TAF_{II}250, als Histonacetyltransferasen (HATn) mit verschiedenen Substratspezifitäten identifiziert. Auch für die rückläufige Reaktion sind verschiedene enzymatische Aktivitäten, die Histondeacetylasen (HDACn), bekannt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte ein Zusammenhang von Histonacetylierung mit Aktivierung und von Histondeacetylierung mit Repression der Transkription festgestellt werden. Durch die Acetylierung wird die positive Ladung der ϵ -Aminogruppe neutralisiert und zugleich eine erhöhte Hydrophobizität erzeugt (Abb. 1-2). Dies hat zum einen einen negativen Einfluss auf die Histontail-DNA-Interaktion, zum anderen werden die internukleosomalen Wechselwirkungen, die durch die Tailregionen vermittelt werden, geschwächt. So kommt es durch Acetylierung zur Auflockerung der Chromatinstruktur und durch Deacetylierung zur Kondensierung des Chromatins.

Es muss zwischen der Acetylierung weiter Bereiche des Chromatins und der gezielten durch Rekrutierung gesteuerten Modifizierung von Promotor- und Enhancerelementen unterschieden werden (Eberharter und Becker, 2002).

Die Bedeutung der Histonacetylierung als epigenetische Markierung ganzer Chromosomendomänen wurde in Hefe nachgewiesen (Suka *et al.*, 2001). Weitere Beispiele sind die Acetylierung großer Bereiche innerhalb des ϵ -Globinlocus mit definierten Grenzen (Litt *et al.*, 2001) und die Modifizierung von Lysin 16 in Histon H4 (H4-K16) über das gesamte männliche X-Chromosom von *Drosophila* hinweg durch die HAT MOF („Males absent on the First“), was eine wichtige Rolle bei der Dosage Kompensation spielt (Akhtar und Becker, 2000). Die Markierung weiter Chromatinbereiche durch Acetylierung führt nicht unweigerlich zur Transkriptionsaktivierung der darin enthaltenen Gene. Sie dient eher dazu, diese Bereiche in einen transkriptionskompetenten Zustand zu versetzen, wodurch die DNA für

weitere transkriptionsaktivierende Proteine oder Remodelling-Faktoren zugänglicher gemacht wird.

Die gezielte Rekrutierung von HAT-Komplexen durch Transkriptionsaktivatoren sowie die Rekrutierung von HDAC-Komplexen durch Repressoren wurde anhand mehrerer Beispiele gezeigt. Der direkte Einfluss der Acetylierung auf die Transkriptionsaktivierung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Ein Mechanismus könnte die Rekrutierung oder die Stabilisierung der Bindung weiterer aktivierender Proteinkomplexe oder der generellen Transkriptionsmaschinerie durch ein definiertes Acetylierungsmuster sein. So wurde die Bindung der Bromodomänen von Gcn5, PCAF und TAF_{II}250 an acetylierte Histon H4-Tails identifiziert (Marmorstein, 2001).

1.4.2 Histonphosphorylierung

Die Phosphorylierung von Serin 10 in Histon H3 (H3-S10) spielt bei der Transkriptionsaktivierung eine Rolle. Bei der Induktion von *c-fos*, *c-myc* und *c-jun* durch die MAP-Kinase-Kaskade wird H3-S10 unter Beteiligung (eventuell auch direkt) der Rsk/Msk-Kinasefamilie phosphoryliert. Die H3-S10-Phosphorylierung hat *in vitro* einen direkten positiven Einfluss auf die Acetylierung von H3-K14 durch HATn der Gcn5/PCAF- und der CBP/p300-Familien, nicht aber auf die der MYST-Familie. Die Acetylierung des *c-fos*-Promotors durch Gcn5 nach H3-S10-Phosphorylierung wurde auch *in vivo* gezeigt (Cheung *et al.*, 2000a; Lo *et al.*, 2000). Bei der Hitzeschockantwort von *Drosophila* wird ebenfalls H3-S10-Phosphorylierung an aktivierten Genen beobachtet, aber keine Veränderung des Acetylierungsmusters (Nowak und Corces, 2000).

Neben der Transkriptionsaktivierung wird H3-S10 und Histon H1 auch bei der Chromosomenkondensierung während der Mitose phosphoryliert, das heißt, es liegt wohl auch eine Beteiligung an Transkriptionsrepressionsmechanismen vor.

Weitere bekannte Phosphorylierungsstellen in Histonen sind Serin 28 in H3 und die Serine 14 und 32 in H2B. Ihre Funktionen sind allerdings noch nicht bekannt. Kürzliche Untersuchungen der Kinase-Domänen des Transkriptionskoaktivators TAF_{II}250 von *Drosophila* zeigen eine Beteiligung des Proteins an der Phosphorylierung von *Drosophila* H2B an Serin 33 (entspricht H2B-S32 oder H2B-S36 von Säugern) (S. Kwoczyński, unveröffentlichte Er-

gebnisse). So könnte die Phosphorylierung an dieser Stelle bei der Transkriptionsaktivierung eine Rolle spielen.

Der Effekt der Phosphorylierung in den Histontails könnte dem der Acetylierung entsprechen. Durch die Einführung der negativen Ladung und der kovalenten Bindung einer großvolumigen Phosphatgruppe könnten internukleosomale Wechselwirkungen und die Bindung der Linker-DNA gestört und damit eine Auflockerung des Chromatins erzielt werden. Die Beteiligung der Phosphorylierung an so unterschiedlichen Prozessen wie Transkriptionsaktivierung und Chromosomenkondensierung spricht aber eher für einen Mechanismus, bei dem die Phosphorylierung eine Markierung für die Bindung weiterer regulatorischer Proteine darstellt. Entsprechende Proteindomänen, die phosphorylierte Histontails binden, wurden bisher jedoch nicht identifiziert (Cheung *et al.*, 2000b; Jenuwein und Allis, 2001).

1.4.3 Histonubiquitinierung

Im Gegensatz zu den anderen hier vorgestellten Histonmodifizierungen handelt es sich bei der Ubiquitinierung um eine geradezu dramatische Veränderung eines Histonproteins, da Ubiquitin selbst ein Protein mit 76 Aminosäuren ist.

Histon H1 wird in *Drosophila* von TAF_{II}250 ubiquitiniert, was eine transkriptionsaktivierende Wirkung im Embryo zu haben scheint (Pham und Sauer, 2000). Außerdem wurde in Hefe die Ubiquitinierung des im COOH-terminalen Bereich von H2B liegenden Lysin 123 durch Rad6 gezeigt, was eine darauffolgende Methylierung von H3-K4 und H3-K79 durch die Histonmethyltransferasen Set1 bzw. Dot1 nach sich zieht (Sun und Allis, 2002; Briggs *et al.*, 2002). Dieser Zusammenhang wird unter Punkt 1.4.4.6 näher erläutert.

1.4.4 Histonmethylierung

Bereits vor etwa 40 Jahren wurde entdeckt, dass Histone Methylgruppen tragen (Murray, 1964). In den 1970er und 1980er Jahren konnte ein Zusammenhang der Histonmethylierung mit der Heterochromatinbildung (Paik und Kim, 1971) und der Transkriptionsregulation während der Hitzeschockantwort in *Drosophila* (Camato und Tanguay, 1982) und der Embryo-

nalentwicklung von Seeigeln (Branno *et al.*, 1983) festgestellt werden. Aber erst kürzlich erschienene Arbeiten konnten eine direkte Beteiligung der Histonmethylierung und der dafür verantwortlichen Enzyme am Heterochromatin-Silencing (Repression der Transkription durch Heterochromatisierung) und der euchromatischen Genexpression zeigen (Zhang und Reinberg, 2001; Lachner und Jenuwein, 2002).

Ist Acetylierung die am besten charakterisierte, so ist Methylierung die in den letzten zwei Jahren am intensivsten untersuchte und auch scheinbar komplexeste der bekannten Histonmodifizierungen. Während die Acetylierung nur an Lysin erfolgt, werden neben diesen in Histonen auch Arginine methyliert. Ein weiterer Unterschied ist, dass bei der Methylierung von Lysinen die Ladung der ϵ -Aminogruppe erhalten bleibt und die kovalente Bindung von ein, zwei oder auch drei Methylgruppen möglich ist (Abb. 1-2). Im Folgenden wird zunächst auf die argininspezifische (Punkt 1.4.4.1) und anschließend auf die lysinspezifische Methylierung (Punkt 1.4.4.2) eingegangen.

1.4.4.1 Argininspezifische Methylierung

Die Methylierung von Arginin erfolgt an den Aminogruppen des Guanidinorestes durch Enzyme der Protein-Arginin-Methyltransferase(PRMT)-Familie (Abb. 1-2). In Säugern sind sechs PRMTn bekannt (PRMT1-3, PRMT4/CARM1, PRMT5/JBP1, PRMT6) und in *Saccharomyces cerevisiae* eine (Hmt1). Sie haben eine zentrale katalytische Domäne, in der S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor gebunden wird, und unterscheiden sich in ihren NH₂- und COOH-terminalen Regionen. Sie dimethylieren Arginin und werden aufgrund ihrer Fähigkeit, die zweite Methylgruppe asymmetrisch oder symmetrisch an den Guanidinorest zu binden, als Typ-I- bzw. Typ-II-Enzyme klassifiziert (Abb. 1-2).

Mit CARM1 („Coactivator associated arginine methyltransferase“) wurde 1999 zum ersten mal eine PRMT in Verbindung mit Transkriptionsaktivierung gebracht (Chen *et al.*, 1999). CARM1 wurde in einem Hefe-Two-Hybrid-Ansatz als GRIP1-interagierendes Protein identifiziert. GRIP1 ist ein Mitglied der p160-Hormonrezeptor(HR)-Koaktivatorfamilie. CARM1 methyliert *in vitro* Histon H3 an Arginin 2, 17, 26 (H3-R2, -R17, -R26) und möglicherweise an einem der vier Arginine zwischen Aminosäure 128 und 134 im COOH-terminalen Bereich (Schurter *et al.*, 2001). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Methylierung

ung von H3-R17 durch CARM1 für die HR-abhängige Transkriptionsaktivierung notwendig ist (Bauer *et al.*, 2002). Bei der HR-abhängigen Transkriptionsaktivierung wirkt CARM1 außerdem synergistisch mit den HATn p300 und P/CAF, mit β -catenin und PRMT1, die auch HR-Koaktivatoren binden kann (Koh *et al.*, 2001; Koh *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). *In vitro* ist CARM1 aktiver gegenüber H3-Tails, die zuvor mit p300 acetyliert wurden. CARM1 kann außerdem CBP und p300 methylieren, wodurch diese nicht mehr mit CREB (cAMP response element binding protein) interagieren können (Xu *et al.*, 2001; Chevillard-Briet *et al.*; 2002). CARM1 dient dementsprechend auch als molekularer Schalter zwischen cAMP- und HR-abhängigen Signaltransduktionswegen.

PRMT1 ist die prominenteste H4-R3-spezifische Histonmethyltransferase in Säugerzellen (Wang *et al.*, 2001a) und, wie oben bereits angedeutet, ebenfalls an der HR-abhängigen Transkriptionsaktivierung beteiligt. Die H4-Methylierung durch PRMT1 führt *in vitro* zu einer gesteigerten H4-Acetylierung durch p300 (Wang *et al.*, 2001a). Umgekehrt inhibiert die vorherige Acetylierung die Methylierung. PRMT1 ist weiterhin durch die Methylierung von STAT1, einem Transkriptionsfaktor, der bei der Interferonantwort eine Rolle spielt, an der Transkriptionsregulation beteiligt, wodurch die DNA-Bindung von STAT1 verstärkt wird (Mowen *et al.*, 2001).

Die anderen PRMT-Familienmitglieder scheinen ein anderes Substratspektrum und keine Histonmethyltransferase-Aktivität *in vivo* zu besitzen. Dies ist jedoch noch nicht endgültig auszuschließen (siehe Diskussion).

Zusammenfassend kann für die argininspezifische Histonmethylierung festgestellt werden, dass sie scheinbar eine spezialisierte Rolle in der transienten HR-abhängigen Transkriptionsaktivierung spielt und die PRMTn auch an anderen Prozessen wie der Aktivierung von CBP und STAT1 beteiligt sind (McBride und Silver, 2001; Zhang und Reinberg, 2001; Davie und Dent, 2002).

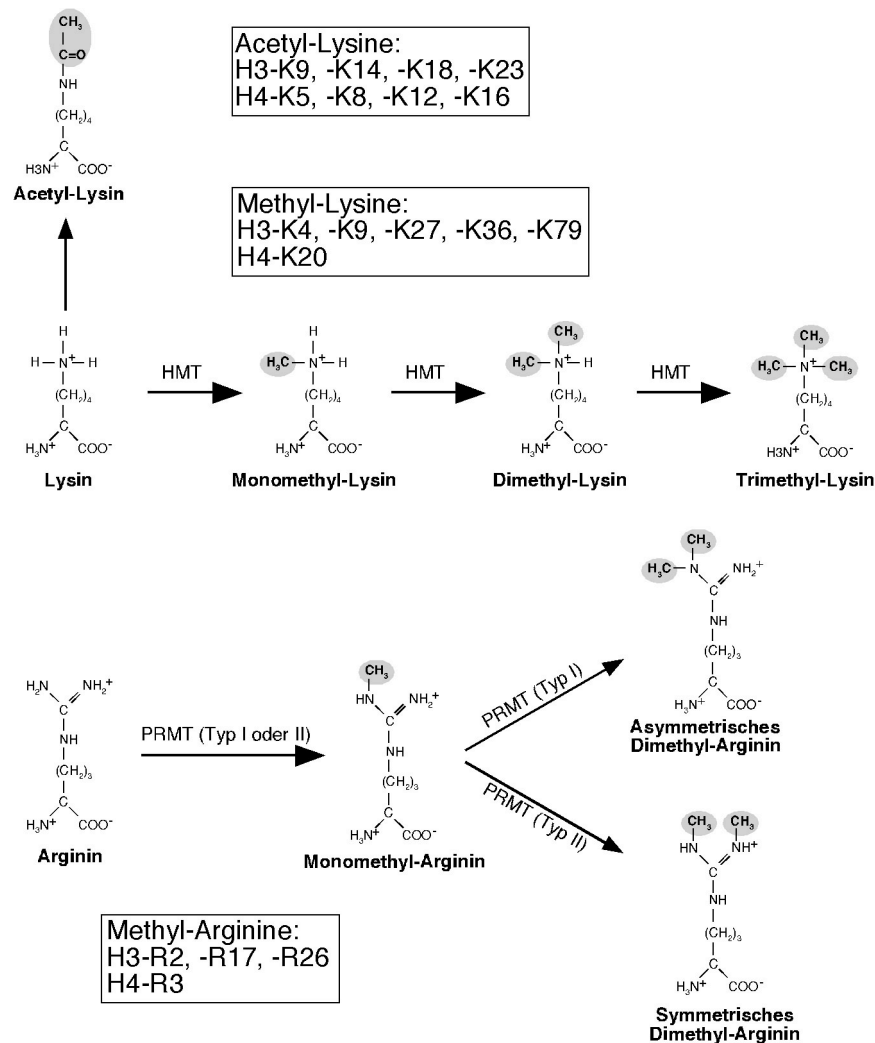


Abbildung 1-2. Bekannte Acetylierungs- und Methylierungsstellen und chemische Struktur der modifizierten Reste. Oben, Modifizierung von Lysinen durch Acetylierung und Methylierung. Es ist Mono-, Di- und Trimethylierung der ϵ -Aminogruppe möglich. In den Boxen sind die Lysin- und Argininreste angegeben, die in H3 und H4 durch Acetylierung und Methylierung modifiziert werden. Unten, Strukturen von methyliertem Arginin. Die Dimethylierung erfolgt durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTn) des Typs I asymmetrisch, durch PRMTn des Typs II symmetrisch. Acetyl- und Methylgruppen sind grau markiert.

1.4.4.2 Lysinspezifische Methylierung

Proteine der SU(VAR)3-9-Familie, SUV39H1 aus Mensch und seine Homologe aus Maus (Suv39h1) und aus *Schizosaccharomyces pombe* (Clr4), wurden als erste lysinspezifische Histonmethyltransferasen entdeckt (Rea *et al.*, 2000). Die Methyltransferase-Aktivität der Proteine ist spezifisch für Lysin 9 in H3 (H3-K9). Als katalytische Domäne wurde die phylo-

genetisch konservierte SET-Domäne mit NH₂- und COOH-terminal dazu benachbarten cysteinreichen Sequenzen identifiziert (Rea *et al.*, 2000).

Tabelle 1-3. Bereits publizierte Histonmethyltransferasen.

Histonmethyltransferase ^a	katalytische Domäne ^b	Spezifität	Publikation
<i>argininspezifische HMTn</i>			
<i>Mm</i> CARM1	PRMT	H3-R2, H3-R17, H3-R26	Cheng <i>et al.</i> , 1999 Schurter <i>et al.</i> , 2001
<i>Mm</i> PRMT1	PRMT	H4-R3	Strahl <i>et al.</i> , 2001
<i>lysinspezifische HMTn</i>			
<i>Hs</i> SUV39H1/ <i>Mm</i> Suv39h1	Cys-SET-Cys	H3-K9	Rea <i>et al.</i> , 2000
<i>Sp</i> Clr4	Cys-SET-Cys	H3-K9	Rea <i>et al.</i> , 2000
<i>Mm</i> Suv39h2	Cys-SET-Cys	H3-K9	O'Caroll <i>et al.</i> , 2000
<i>Sc</i> Set1	SET-Cys	H3-K4	Briggs <i>et al.</i> , 2001 Nagy <i>et al.</i> , 2001; Roguev <i>et al.</i> , 2001; Czermin <i>et al.</i> , 2001
<i>Dm</i> SU(VAR)3-9	Cys-SET-Cys	H3-K9	Tachibana <i>et al.</i> , 2001
<i>Hs</i> G9a	Cys-SET-Cys	H3-K9, H3-K27	Tamaru und Selker, 2001
<i>Nc</i> Dim-5	Cys-SET	H3-K9	Nishioka <i>et al.</i> , 2001
<i>Hs</i> Set7/Set9	SET	H3-K4	Wang <i>et al.</i> , 2001b;
<i>Hs</i> Eu-HMTase1	Cys-SET-Cys	H3-K9	Ogawa <i>et al.</i> , 2002
<i>Sc</i> Set2	Cys-SET-Cys	H3-K36	Strahl <i>et al.</i> , 2002
<i>At</i> KRYPTONITE	Cys-SET	H3-K9	Jackson <i>et al.</i> , 2002
<i>Sc</i> Dot1 ^c	PRMT	H3-K79	van Leeuwen <i>et al.</i> , 2002
<i>Hs/Dm</i> Set8/PR-Set7	SET	H4-K20	Fang <i>et al.</i> , 2002; Nishioka <i>et al.</i> , 2002
<i>Hs</i> ESET/SETDB1	Cys-SET-Cys	H3-K4, H3-K9	Schultz <i>et al.</i> , 2002; Lachner und Jenuwein, 2002
<i>Hs/Dm</i> E(Z)	Cys-SET	H3-K9, H3-K27	Czermin <i>et al.</i> , 2002; Kuzmichev <i>et al.</i> , 2002; Müller <i>et al.</i> , 2002
<i>Hs</i> ALL-1/MLL	SET-Cys	H3-K4	Milne <i>et al.</i> , 2002; Nakamura <i>et al.</i> , 2002

^a*At*, *Arabidopsis thaliana*. *Dm*, *Drosophila melanogaster*. *Hs*, *Homo sapiens*. *Mm*, *Mus musculus*. *Nc*, *Neurospora crassa*. *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*. *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe*. ^bCys; cysteinreiche Pre-/PostSET-Domäne. PRMT, für PRMTn charakteristische Domäne. ^cDot1 besitzt als einzige lysinspezifische HMT eine PRMT-Domäne.

Mittlerweile wurden durch chromatographische Reinigungen oder durch Homologiesuche mit der Aminosäuresequenz der SET-Domäne verschiedene weitere lysinspezifische Histonmethyltransferasen aus Säugern und Hefe gefunden, wobei sich herausstellte, dass allein die

SET-Domäne, ohne benachbarte cysteinreiche Sequenzen, für die katalytische Aktivität ausreichend. Eine Liste der bisher publizierten Histonmethyltransferasen ist in Tab. 1-3 einzusehen.

Namensgebend für die SU(VAR)3-9-Familie war das *Su(var)3-9*-Gen aus *Drosophila*. *Su(var)3-9* gehört zu der Gruppe der *Su(var)(Suppressor of variegation)*-Gene, die mit Heterochromatin-Silencing in Verbindung gebracht werden (Henikoff, 1996). Darunter findet man Gene für Histondeacetylasen oder für Proteine, die direkt mit Heterochromatin assoziiert sind, wie das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) oder SU(VAR)3-9 selbst. Interessanterweise ist auch das Gen einer S-Adenosylmethionin(SAM)-Synthetase darunter, die für die Synthese des Methylgruppendonors SAM notwendig ist (Larsson *et al.*, 1996).

1.4.4.3 H3-K9-Methylierung, Heterochromatin-Silencing und euchromatische Transkriptionsrepression

Methyliertes H3-K9 (H3-mK9) wurde bisher nur mit transkriptionsrepressorischen Mechanismen in Verbindung gebracht und gilt als Charakteristikum für Heterochromatin. In Polytänchromosomen von *Drosophila* findet man zum Beispiel H3-mK9 vorwiegend im heterochromatischen Chromozentrum. Dass SU(VAR)3-9-Proteine H3-K9 methylieren und wie HP1 mit Heterochromatinstrukturen assoziiert sind, führte zur Identifizierung der spezifischen Interaktion von HP1 mit K9-methylierten H3-Tails. Die enzymatische Aktivität von SUV39H1 in Säugerzellen und Clr4 in Hefe ist erforderlich, um HP1 zu Heterochromatinstrukturen zu rekrutieren, was wiederum für Heterochromatin-Silencing notwendig ist. Die gezeigte Interaktion von SU(VAR)3-9-Proteinen mit HP1 könnte zusätzlich eine Erklärung für die Ausbreitung und Etablierung von Heterochromatinbereichen sein.

Neben dem Heterochromatin-Silencing scheint die SU(VAR)3-9-vermittelte Methylierung von H3-K9 auch eine Rolle bei der euchromatischen Transkriptionsrepression zu spielen. Der SUV39H/HP1-Komplex wird durch den Tumorsuppressor Retinoblastoma (Rb) an verschiedene Promotoren wie den des Zellzyklus-regulierenden Gens *cyclin E* rekrutiert. Durch H3-mK9 wird HP1 gebunden und reprimiert die Transkription (Kouzarides, 2002; Grewal und Elgin, 2002; Richards und Elgin, 2002).

1.4.4.4 Weitere lysinspezifische Methylierungen in Histonen

Weitere Lysinreste, die in den Histonen methyliert werden können, sind in Histon H3 K4, K27, K36 und K79 und in H4 K20.

Der H3-K4-Methylierung wird momentan keine klare Position in der Transkriptionsregulation zugesprochen. In *Tetrahymena* wurde methyliertes H3-K4 in transkriptionsaktiven Makronuklei, nicht aber in inaktiven Mikronuklei nachgewiesen (Strahl *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* wird methyliertes H3-K4 assoziiert mit transkriptionsaktiven Genen gefunden (Bernstein *et al.*, 2002). Außerdem liegt die dafür verantwortliche Histonmethyltransferase Set1 in einem Komplex mit dem Homolog von ASH2 vor, einem Mitglied der trxG von epigenetischen Aktivatoren in *Drosophila* (Nagy *et al.*, 2002). Andererseits ist Set1 katalysierte H3-K4-Methylierung auch für die Repression von rDNA notwendig (Briggs *et al.*, 2001).

Kürzlich erschienene Arbeiten identifizierten mit E(Z) das erste PcG-Protein als Histonmethyltransferase (Czermin *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002). E(Z) methyliert sowohl H3-K9 als auch H3-27, wobei noch ungeklärt ist, welche Rolle die Methylierung von H3-K27 spielt (siehe Diskussion).

Methyliertes H4-K20 (H4-mK20) wurde von Nishioka *et al.* mit reprimierten kondensierten Chromatinstrukturen wie das Chromozentrum der *Drosophila*-Polytänchromosomen in Verbindung gebracht. Gleichzeitig zeigt das männliche *Drosophila*-X-Chromosom, dessen Genaktivität hochreguliert ist, eine geringe H4-K20-Methylierung (Nishioka *et al.*, 2002). Eine andere Studie von Fang *et al.* zeigt teilweise gegenteilige Ergebnisse. Hier ist H4-mK20 auch nicht mit aktiven Genen assoziiert, wird aber während des Zellzykluses reguliert, mit dem höchsten Level während der S-Phase und dem niedrigsten während der Mitose (Fang *et al.*, 2002).

Die Methylierung von H3-K79 wird im nächsten Kapitel angesprochen. H3-mK36 wurde in *S. cerevisiae* nachgewiesen und vermittelt scheinbar Transkriptionsrepression (Strahl *et al.*, 2002).

1.4.4.5 Lysin-Methylierung als epigenetische Markierung und der Histoncode

Anhand der Ergebnisse aus Untersuchungen am männlichen *Drosophila*-X-Chromosom mit Antikörpern, die spezifisch bestimmte methylierte Lysinreste in H4 erkennen, wurde vorge-

schlagen, dass Histontailmodifizierungen als Markierung dienen könnten, die von Nichthistonproteinen erkannt und gebunden werden (Turner *et al.*, 1992; Turner, 2002). So könnte die Struktur bestimmter Chromatinbereiche und damit die Aktivität darin liegender Gene über den Histonmodifizierungsstatus verändert werden. Dieser Vorschlag wurde in den darauffolgenden Jahren zur Histoncode-Hypothese weiterentwickelt, die besagt, dass 1) Histonmodifizierungen spezifische Bindungsstellen für chromatinassoziierte Proteine bilden und 2) sich die Modifizierungen gegenseitig beeinflussen können. (Turner, 1993; Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001; Turner, 2002). Unter diesen Voraussetzungen können Histonmodifizierungen als epigenetische Markierungen für die Aufrechterhaltung euchromatischer und heterochromatischer Strukturen dienen. Im speziellen wird die lysinspezifische Histonmethylierung als ideales Signal für die epigenetische Regulation angesehen, da sie sehr viel stabiler als Acetylierung und Phosphorylierung ist. Die Turnover-Rate für die Histonmethylgruppen ist sogar langsamer als die der Histone selber (Thomas *et al.*, 1975). So wurden auch mit SU(VAR)3-9 und E(Z) zwei Proteine als lysinspezifische Histonmethyltransferasen identifiziert, die an epigenetischen Repressionsmechanismen beteiligt sind.

1.4.4.6 Zusammenspiel verschiedener Histonmodifizierungen

Die Methylierung von H3-K4 und H3-K9 scheint teilweise komplementäre Funktionen zu haben. H3-mK4 findet man vor allem in transkriptionsaktiven und H3-mK9 in reprimierten Chromatinregionen. So ist auch die enzymatische Aktivität von SUV39H gegenüber K4-methyliertem H3-Peptid stark inhibiert (Rea *et al.*, 2000). Der NuRD-Komplex (Chromatin-Remodelling-Komplex mit Histondeacetylase-Untereinheiten) bindet ein H3-Peptid, das an K9 methyliert ist (Zegermann *et al.*, 2002). Die K4-Methylierung verhindert dagegen die Bindung. So kann aktivierendes H3-mK4 eine SUV39H-abhängige H3-K9-Methylierung und eine Chromatin-Remodelling/HDAC-Aktivität inhibieren, was womöglich zur Ausbildung von heterochromatischen Strukturen führen würde.

Weitere Beispiele für Proteine bzw. Proteindomänen, die durch Histonmodifizierungen an Chromatin rekrutiert werden, sind das weiter oben bereits genannte HP1, das über seine Chromodomäne H3-mK9 bindet, und die Bromodomänen von TAF_{II}250 und PCAF, die eine Bindung an acetylierte Histontails vermitteln (Marmorstein, 2001).

Das Zusammenspiel der verschiedenen Histonmodifizierungen wird auch durch die Identifizierung der Interaktionen von HDAC1 mit SU(VAR)3-9 in *Drosophila* und von der Histonacetyltransferase CBP mit einer nicht identifizierten Histonmethyltransferase dokumentiert. So haben auch die aktivierenden Modifizierungen phosphoryliertes H3-S10, acetyliertes H3-K9 und H3-K14 eine inhibierende Wirkung auf die H3-K9-Methylierung (und umgekehrt) (Turner, 2002).

Zwei kürzlich publizierte Arbeiten bringen auch die Histonubiquitinierung in Verbindung mit dem Histoncode (Sun und Allis, 2002; Briggs *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Ubiquitinierung von Lysin 123 in H2B durch Rad6 die Voraussetzung für die Methylierung von H3-K4 durch Set1 und von H3-K79 durch Dot1 ist, was zum Gen-Silencing führt (Dot1 besitzt als einzige bisher bekannte lysinspezifische Histonmethyltransferase keine SET-Domäne). Der Mechanismus, wie die Ubiquitinierung von H2B die Methylierung von H3 beeinflussen kann, ist nicht geklärt. Die Regulation der Modifizierung eines Histons durch die Modifizierung eines anderen wird als Trans-Histon-Regulation der Histonmodifizierung bezeichnet. Diese Art der Regulation bestätigt im Besonderen die zweite Vorhersage der Histoncode-Hypothese.

1.5 Ziele der Arbeit

Verschiedene Studien zeigten eine Beteiligung der Histonmethylierung an der eu- und heterochromatischen Transkriptionsregulation. Zu Beginn dieser Arbeit waren jedoch noch keine Enzyme, die für Histonmethylierung verantwortlich sind, identifiziert worden. Daher sollten zunächst über einen biochemischen Ansatz, bei dem die Histonmethyltransferase-Aktivität während der chromatographischen Fraktionierung von embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt als Ausgangsmaterial verfolgt wurde, Histonmethyltransferasen gereinigt und identifiziert werden.

Während dieser Arbeit wurden von anderen Gruppen mehrere Histonmethyltransferasen, insbesondere SET-Domänen-Proteine aus Säugern und Hefe, entdeckt und publiziert. Außerdem wurde vor allem eine Verbindung der lysinspezifischen Histonmethylierung mit Silencing-Mechanismen hergestellt. Daher wurde ein weiterer Schwerpunkt auf die Untersuchung von SET-Domänen-Proteinen in *Drosophila* gesetzt. Es sollten die betreffenden Proteine über eine Homologiesuche identifiziert und auf enzymatische Aktivität getestet werden. Weiterhin

sollte dann eine Fokussierung der Arbeit auf eine mögliche Beteiligung der Histonmethylierung an transkriptionsaktivierenden Mechanismen in *Drosophila* erfolgen.

In dieser Arbeit wird die Reinigung, Klonierung und teilweise biochemische Charakterisierung von drei argininspezifischen Methyltransferasen beschrieben, die den Säugerproteinen CARM1, PRMT1 und PRMT3 homolog sind.

Außerdem wird die Identifizierung und Klonierung der sieben in *Drosophila* vorkommenden Proteine mit der Domänenstruktur Cys-SET-Cys dargestellt. Es wird gezeigt, dass jedes dieser Proteine Histonmethyltransferase-Aktivität mit teilweise unterschiedlicher Substratspezifität besitzt.

Eines dieser Proteine ist der bekannte epigenetische Aktivator ASH1 aus der *trxG*. Mit ASH1 konnte anhand verschiedener experimenteller Ansätze zum ersten mal *in vitro* und *in vivo* eine Verbindung der Histonmethylierung mit epigenetischer Aktivierung hergestellt werden.

Überdies wurden mit p55/RbAp48, CG2051 (dHAT1), Polycomb und BRAHMA verschiedene Proteine identifiziert bzw. untersucht, deren Chromatinassoziation von bestimmten Histonmethylierungsmustern abhängig sein könnte.

Zusammenfassend legt diese Arbeit die Grundlagen für die Einbeziehung des Modellsystems *Drosophila melanogaster* in die Erforschung der Funktionen der Histonmethylierung, für ein besseres Verständnis der epigenetischen Aktivierung und für eine weitere Bestätigung der Existenz des Histoncodes.

2 Ergebnisse

In den letzten Jahren wurde die regulatorische Bedeutung der posttranslationalen Histonmodifikationen für DNA-abhängige Prozesse wie die Transkription erkannt. Im Gegensatz zu der großen Anzahl beschriebener Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen, war zu Beginn dieser Arbeit über die anderen Enzymsysteme, die für die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung der Histone zuständig sind, nichts bekannt. Um ein besseres Verständnis für die Funktion der Histonmodifikationen und ihr Zusammenspiel zu erhalten, sollte mit dieser Arbeit der Versuch unternommen werden, Histonmethyltransferasen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Zur Identifizierung von Histonmethyltransferasen (HMTn) in *Drosophila melanogaster*, wurde 1) ein biochemischer Ansatz gewählt, bei dem enzymatische Aktivitäten in embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt verfolgt wurden und 2) eine *in silico* Datenbanksuche innerhalb des sequenzierten *Drosophila*-Genoms mit der Aminosäuresequenz der SET-Domäne der HMT SUV39H1 durchgeführt, die Lysin 9-spezifische Methylierung des Histons H3 vermittelt. Die Ergebnisse beider Ansätze werden im folgenden getrennt unter den Punkten 2.2 und 2.3 beschrieben.

2.1 Ansatz zur Detektion der HMT-Aktivität

Zur Detektion von HMT-Aktivität in chromatographischen Fraktionen und in rekombinanten Proteinen wurden die in Abb. 2-1 schematisch dargestellten Methoden verwendet. Die zu testende Proteinprobe wurde dem experimentellen Ansatz entsprechend mit verschiedenen Histonsubstraten und Tritium(³H)-markiertem S-Adenosylmethionin ([³H]-SAM) als Methylgruppendonor inkubiert. Als Substrate dienten einzelne rekombinant hergestellte *Xenopus*-Histone, aus Rind isolierte Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 (Histonmix, Sigma), synthetische Peptide, deren Aminosäuresequenz der NH₂-terminalen Region der Histone entspricht, und aus *Drosophila*-Embryonen gereinigte Histonoktamere oder Oligonukleosomen. Nach Inkubation wurden die Reaktionen entweder qualitativ durch SDS-PAGE mit nachfol-

gender Coomassiefärbung und Fluorographie oder quantitativ durch Auszählen der inkorporierten tritiummarkierten Methylgruppen im Szintillationszähler analysiert.

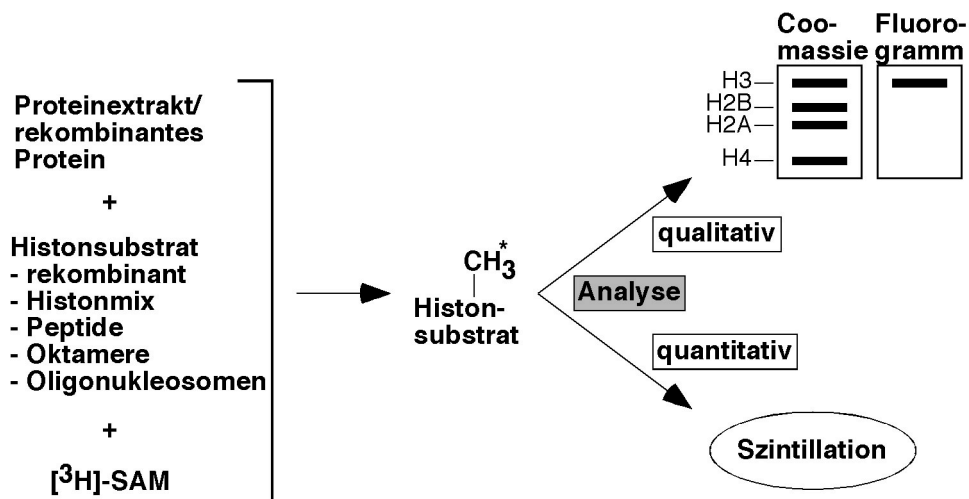


Abbildung 2-1. *In vitro*-Ansätze zur Detektion der HMT-Aktivität. Schematische Darstellung zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von identifizierten HMT-Aktivitäten. Beschreibung siehe Punkt 2.1.

2.2 Biochemische Identifizierung von HMTn

2.2.1 Test von embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt auf HMT-Aktivität

Als initiales Experiment wurde überprüft, ob embryonaler *Drosophila*-Kernextrakt, der nach Wampler *et al.* präpariert wurde, als Quelle zur Identifizierung von HMTn dienen kann (Wampler *et al.*, 1990). Aliquots zweier unabhängig voneinander präparierter Kernextrakte wurden mit aus *Drosophila* gereinigten Histonoktameren oder Oligonukleosomen in Anwesenheit von [³H]-SAM inkubiert und die markierten Histone durch Fluorographie detektiert (Abb. 2-2).

Die Kernextrakte enthalten mindestens drei unterschiedliche HMT-Aktivitäten, die spezifisch die Histone H3, H2B und H4 markieren können (Abb. 2-2). Bei längerer Expositionszeit des Films werden bei den Histonoktameren auch methyliertes H2B und H4 sichtbar (C. Bei-

sel, Daten nicht gezeigt). Qualitativ unterscheiden sich die Extrakte nicht. Nur quantitativ gibt es marginale Unterschiede (vergleiche Aktivitäten für freies H3), die jedoch für die weitere Bearbeitung vernachlässigbar waren. Daher konnten Kernextrakte unabhängiger Präparationen für die weiteren chromatographischen Reinigungsschritte vereint werden.

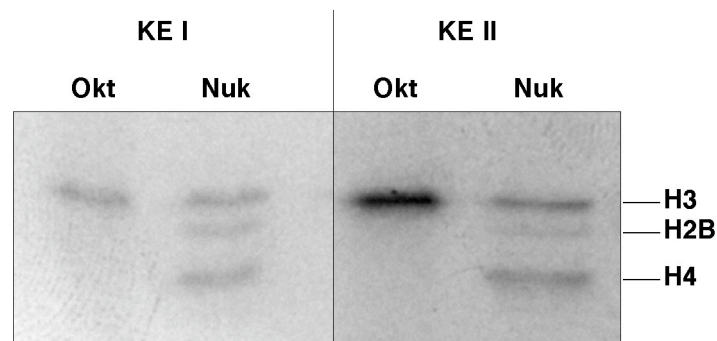


Abbildung 2-2. *Drosophila*-Kernextrakt enthält verschiedene HMT-Aktivitäten. Je 1,5 μ l Kernextrakt zweier verschiedener Kernextraktpräparationen (KE I und KE II) wurden mit 1 μ g Histonoktameren (Okt) oder Oligonukleosomen (Nuk) und 1 μ Ci [3 H]-SAM für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und die methylierten Histone durch Fluorographie sichtbar gemacht.

2.2.2 Test des ersten chromatographischen Schrittes

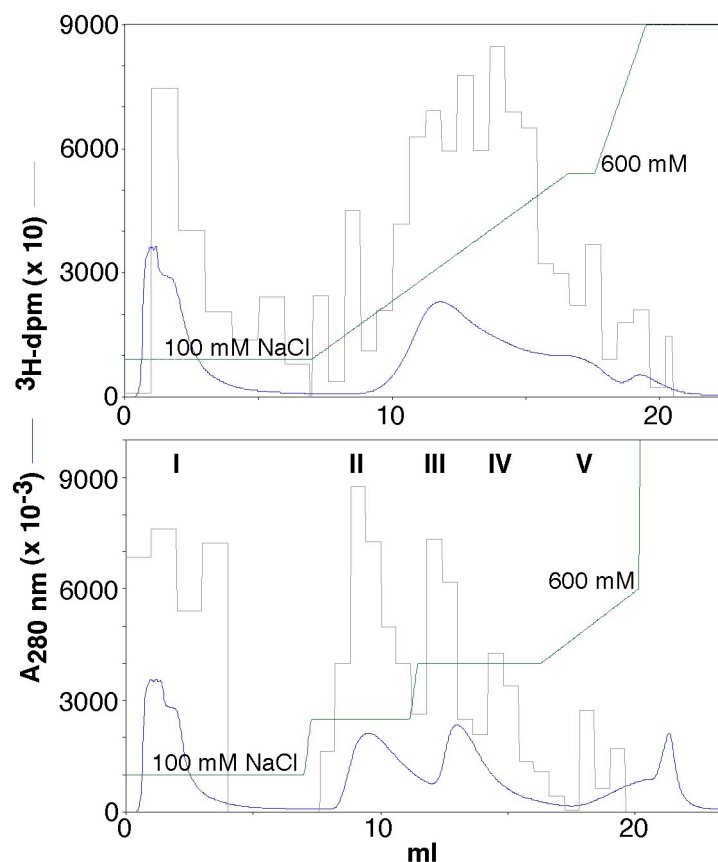
Als ersten Schritt für die chromatographische Reinigung wurde Heparin-Sepharose getestet. Heparin-Sepharose vereinigt zwei chromatographische Trennungsprinzipien. Einerseits dient Heparin als Affinitätsligand für Wachstumsfaktoren und DNA-assoziierte Proteine, andererseits wirkt es aufgrund seiner negativen Ladung als Kationentauscher. Dieses Material wurde gewählt, da es schon erfolgreich als initialer Säulenschritt bei der Fraktionierung von Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II aus embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt eingesetzt wurde (Wampler *et al.*, 1990). Es wurden 10-20 mg Kernextraktprotein auf eine 1ml HiTrap Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen und in einem linearen Salzgradienten von 100-600 mM NaCl eluiert (Abb. 2-3 oben). Während des gesamten Laufes wurden Fraktionen gesammelt, in denen anschließend die HMT-Aktivität nachgewiesen wurde. Man erkennt, dass sowohl in den Durchflussfraktionen als auch in den Eluaten HMT-Aktivität vorhanden ist.

Um die HMT-Aktivitätspeaks weiter aufzutrennen, wurde die Elution durch die Einführung eines zweistufigen Salzgradienten (240 mM und 400 mM NaCl) modifiziert (Abb. 2-3 unten). Durch diese Veränderung konnten zwei Proteinpeaks voneinander getrennt werden, in denen sich scheinbar unterschiedliche enzymatische Aktivitäten befinden. Insgesamt wurden fünf verschiedene Aktivitätspeaks nachgewiesen. Bei Peak IV könnte es sich auch um die Fortsetzung des Peaks III handeln, da beide bei 400 mM NaCl eluiert wurden und daher eine Trennung unwahrscheinlich ist.

Abbildung 2-3. Test zur Reinigung von HMTn mittels Heparin-Sepharose.

Eine 1 ml HiTrap Heparinsäule, die zuvor mit 10 % Puffer B (1 M NaCl, HEMG, pH 7,6, 10 mM β ME) in Puffer A (HEMG, pH 7,6, 10 mM β ME) äquilibriert wurde, wurde mit 10-20 mg Kernextraktprotein beladen. (Oben) Nach einem Waschschrift von 6 ml wurde mit einem linearen NaCl Gradienten über 10 ml auf 600 mM NaCl und anschließend mit einem steileren Gradienten über 2 ml auf 1 M NaCl eluiert. (Unten) Im zweiten Testlauf wurde nach dem Waschen erst mit einem Stufengradienten eluiert (5 ml 240 mM NaCl, 5 ml 400 mM NaCl), anschließend mit einem linearen Gradienten über 3 ml auf 600 mM NaCl, und nachfolgend mit 1 M NaCl nachgewaschen. Es wurden über den gesamten Lauf Fraktionen von 1 ml gesammelt und auf HMT-Aktivität hin getestet. 100 μ l der Fraktionen wurden mit 50 μ g Histonmix und 1 μ Ci $[^3\text{H}]$ -SAM für 30 min bei 30 °C inkubiert.

Die Proteine wurden mit TCA präzipitiert, zweimal mit 20 % TCA gewaschen und im Szintillationszähler auf inkorporiertes Tritium analysiert. Mit den römischen Zahlen I-V sind im unteren Diagramm voneinander getrennte Aktivitätspeaks gekennzeichnet. Absorption bei 280 nm in blau, HMT-Aktivität (^3H -dpm) in grau, NaCl-Gradient in grün.



2.2.3 Zusammenfassung der Reinigungen

In Abb. 2-4 werden die beiden in dieser Arbeit durchgeführten Reinigungsansätze zusammenfassend dargestellt, die zur Identifizierung von drei argininspezifischen Histonmethyltransferasen führten, CG5358, CG6554 und CG6563. Die einzelnen Schritte werden unter den nachfolgenden Punkten genauer erläutert.

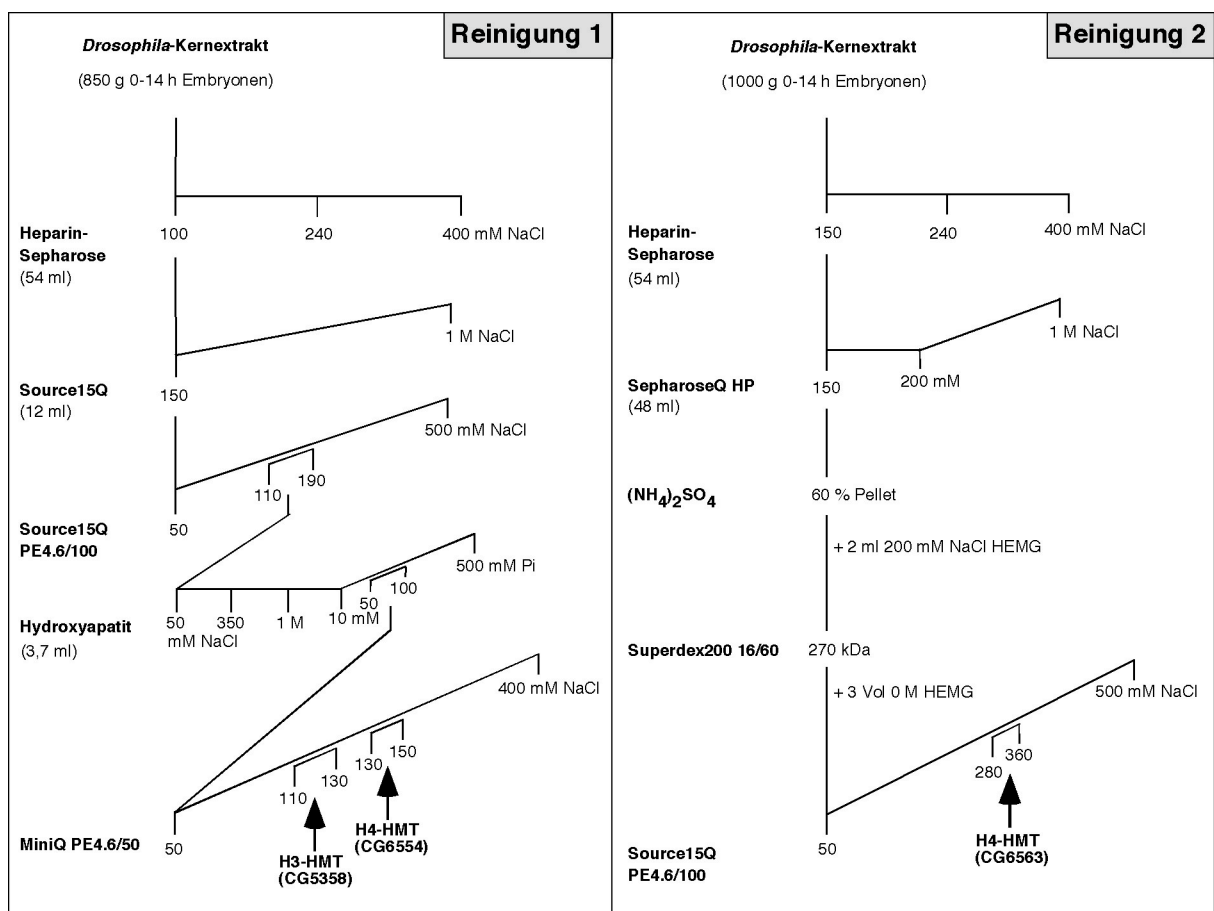


Abbildung 2-4. Zusammenfassende Darstellung der biochemischen Identifizierung von HMTn. Links sind die verwendeten Säulen und daneben die verwendeten Salzgradienten schematisch angegeben.

2.2.4 Identifizierung der HMTn CG5358 und CG6554

2.2.4.1 Reinigung 1 - Erster Schritt: Heparin-Sepharose

Da durch Heparin-Sepharose mit Hilfe eines Stufengradienten vier bis fünf HMT-Aktivitäten voneinander getrennt werden konnten (siehe 2.2.2), wurde diese Strategie als erster chromatographischer Schritt für die Identifizierung von HMTn angewendet. Eine 54 ml Heparin-Sepharose-Säule wurde mit Kernextrakt, gewonnen aus 500 g 0-14 h alten *Drosophila*-Embryonen, beladen und mit einem auf das Volumen der Säule angepassten Stufengradienten eluiert (Lauf 1, Abb. 2-5A). Um für die nächsten Reinigungsschritte mehr Proteinmaterial zur Verfügung zu haben, wurde anschließend ein weiterer Lauf mit Kernextrakt von 350 g 0-14 h alten *Drosophila*-Embryonen unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Lauf 2). Da Lauf 2 ein zum Lauf 1 vergleichbares Ergebnis lieferte, wird hier nur auf das Elutionsprofil des ersten Laufs eingegangen (Abb. 2-5A).

Wie im Testlauf mit der 1 ml HiTrap-Heparinsäule wurde der Kernextrakt hauptsächlich in drei Proteinpeaks getrennt, in denen sich verschiedene HMT-Aktivitäten befanden. Im Gegensatz zu dem Testlauf wurden jedoch keine HMT-Aktivitäten IV und V detektiert (Vergl. Abb. 2-3). Entweder handelte es sich bei IV, wie schon unter Punkt 2.2.2 beschrieben, um einen Ausläufer von III oder die große Heparinsäule kann diese aufgrund einer geringeren Auflösung nicht voneinander trennen. Das Fehlen von V kann auf geringfügige Unterschiede bei der Präparation der Kernextrakte zurückzuführen sein.

In Peak I, Durchfluss der Heparinsäule, sind sowohl H3- als auch H4-spezifische HMT-Aktivitäten vorhanden (Abb. 2-5B). In den Peaks II und III befinden sich H3-spezifische HMTn (Abb. 2-5B). Die drei Aktivitätspools I-III der beiden unabhängigen Heparinläufe unterschieden sich qualitativ nicht voneinander und konnten daher für die weiteren Reinigungsschritte vereint werden. Da sich in Peak I noch mindestens zwei unterschiedliche HMT-Aktivitäten befanden, wurde dieser Pool weiter aufgereinigt. Die anderen beiden Proteinfraktionen wurden für spätere Reinigungsansätze bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Proteine des Peaks I, die nicht an Heparin-Sepharose gebunden haben, sollten mit hoher Wahrscheinlichkeit Affinität zu einer Anionenauschermatrix zeigen. Aus diesem Grund wurde für den nächsten Reinigungsschritt eine 12 ml Source15Q-Säule verwendet.

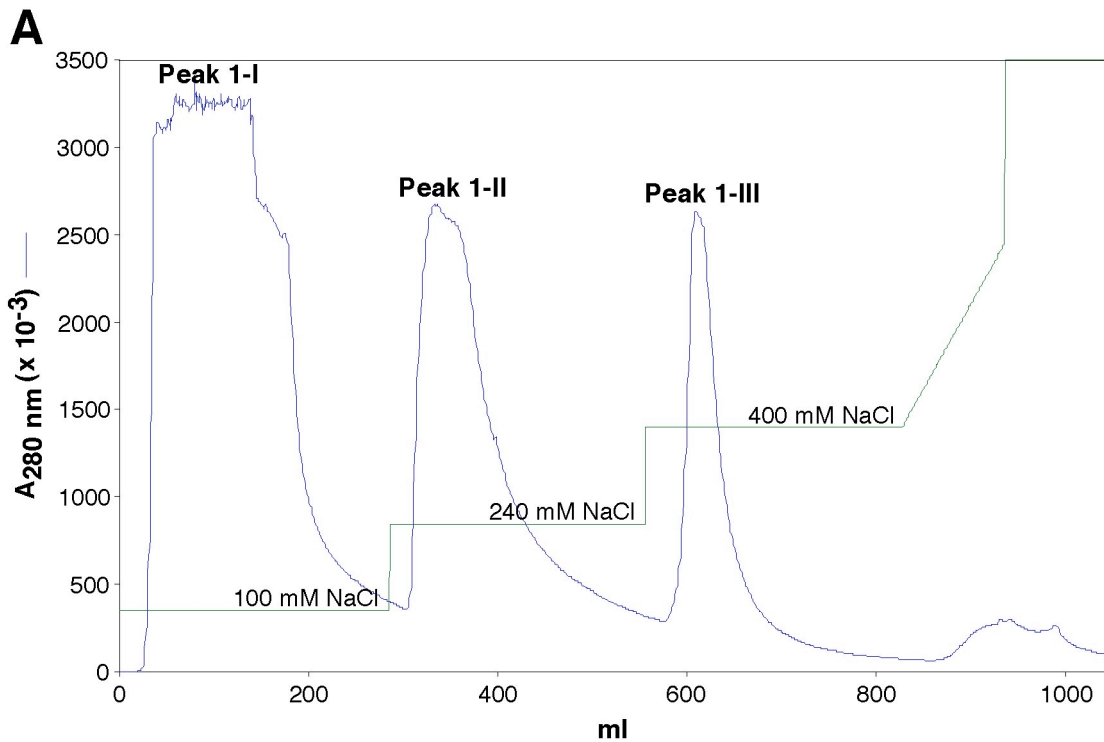
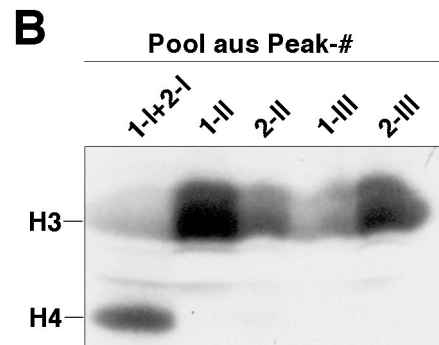


Abbildung 2-5. Initiale Identifizierung verschiedener HMT-Aktivitäten mit Heparin-Sepharose. Kernextrakt von 500 g 0-14 h alten *Drosophila*-Embryonen wurde auf eine 54 ml Heparin-Sepharose-Säule mit 26 mm Durchmesser aufgetragen (Lauf 1). Anschließend wurde ein weiterer Lauf mit Material von 350 g 0-14 h alten *Drosophila*-Embryonen durchgeführt (Lauf 2). (A) Elutionsprofil von Lauf 1. Die Säule wurde mit 10 % Puffer B (1 M NaCl, HEMG, 10 mM β ME, pH 7,6) in Puffer A (HEMG, 10 mM β ME, pH 7,6) äquilibriert. Die Elution erfolgte über einen Stufengradienten, 5 SV 240 mM NaCl, 5 SV 400 mM NaCl und einen linearen Gradienten über 3 SV auf 700 mM NaCl, bevor mit 1 M NaCl nachgewaschen wurde. Über den gesamten Lauf wurden Fraktionen von 10 ml gesammelt, die anschließend qualitativ auf HMT-Aktivität getestet wurden. Als Substrat wurde Histonmix verwendet. Je nach Aktivität wurden die Fraktionen vereint (Peaks I-III). (B) Fluorogramm der HMT-Aktivität der vereinten Fraktionen von Lauf 1 und Lauf 2. Peak I aus den Läufen 1 und 2 wurden bereits vereint. Absorption bei 280 nm in blau, NaCl-Gradient in grün. Die NaCl-Konzentrationen des Stufengradienten und die Bezeichnungen der vereinten Proteinpeaks sind angegeben.



2.2.4.2 Reinigung 1 - Zweiter Schritt: Source15Q

Der HMT-Aktivitätspeak I der Heparin-Sepharose umfaßt einen Gesamtproteingehalt von 46 μ g und eine Leitfähigkeit, die einer Konzentration von 150 mM NaCl entspricht. Die Proteinlösung wurde auf eine 12 ml Source15Q-Säule (Source15Q12) aufgetragen und über einen linearen Salzgradienten eluiert (Abb. 2-6). Etwa die Hälfte des Proteins fand sich als ungebundene Fraktion im Durchfluss wieder. Das gebundene Protein eluierte in drei Peaks

zwischen 200 und 500 mM NaCl, die HMT-Aktivität wurde in vier Peaks aufgetrennt. Drei der Aktivitäten eluierten zwischen 220 und 350 mM NaCl. Die weitaus größte Aktivität konnte in der Durchflussfraktion nachgewiesen werden. Daher wurde mit den Fraktionen #1-8 weitergearbeitet und diese zunächst in zwei Pools aufgeteilt, #1-3 und #4-8. Da die Leitfähigkeit der Proteinlösung, die auf die Source15Q12 geladen wurde, relativ hoch lag, wurden die beiden Pools mit Puffer A (HEMG, 10 mM \square ME) 1:3 verdünnt. Außerdem wurde der pH-Wert von 7,6 auf 8 erhöht. Dies sorgt für eine Deprotonierung der Proteine und erhöht damit ihre Affinität zum Anionentauschermaterial. Die Fraktionen #1-8 wurden in zwei Pools mit 8 bzw. 19,5 mg Proteingehalt aufgeteilt, damit die Ladekapazität von 10-25 \square ng der Source15QPE4.6/100 (1,7 ml Volumen), die als nächstes verwendet wurde, nicht überschritten wurde.

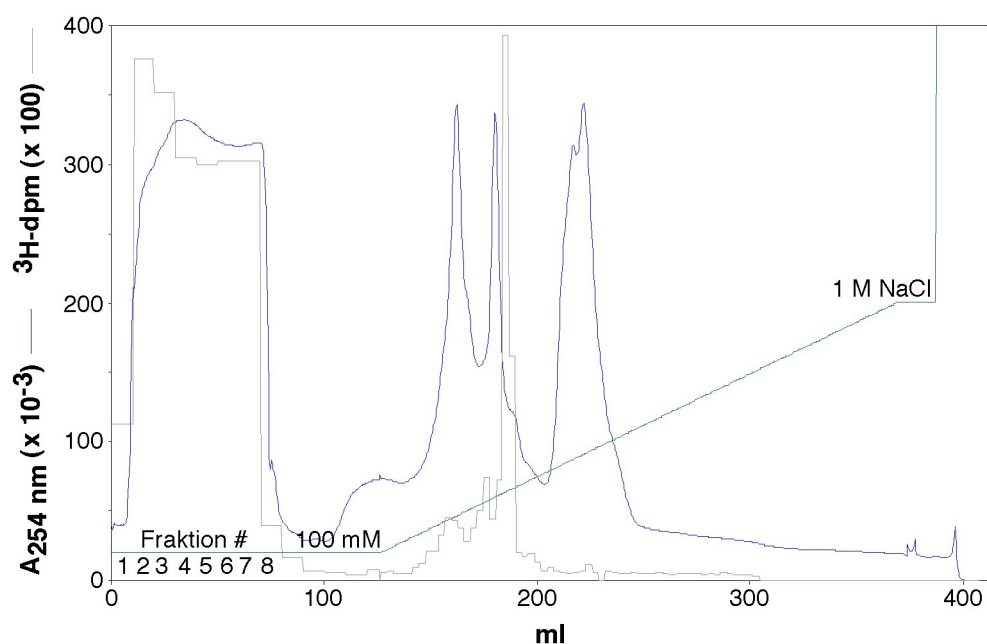


Abbildung 2-6. Fraktionierung der HMT-Aktivität mittels Anionentauscher. Die vereinten Proteinpeaks I aus Lauf 1 und 2 der Heparin-Sepharose wurden auf eine 12 ml Source15Q-Säule mit 16 mm Durchmesser aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 5 % Puffer B (2 M NaCl, HEMG, pH 7,6, 10 mM \square ME) in Puffer A (HEMG, pH 7,6, 10 mM \square ME) äquilibriert. Während des Auftrags der Probe und des Waschvorgangs wurden Fraktionen von 10 ml und während der Elution Fraktionen von 3 ml gesammelt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten über 20 SV auf 1 M NaCl. Mit je 100 μ l Aliquots der Fraktionen, 100 μ g Histonmix und 1 μ Ci [3 H]-SAM wurde die HMT-Aktivität, wie in Abb. 2-3 beschrieben, quantifiziert. Absorption bei 254 nm in blau, HMT-Aktivität (3 H-dpm) in grau, NaCl-Gradient in grün. Fraktionen #1-8 sind in das Diagramm eingetragen.

Beide Pools wurden unter den gleichen Bedingungen von der Säule eluiert (Abb. 2-7). Wie bei der Source15Q12-Säule wurde nur ein geringer Teil der Proteine (ca. 40%) an die Matrix gebunden. Durch die Änderung der Pufferbedingungen (geringere Leitfähigkeit, höherer pH) eluierten jedoch 80 % der HMT-Aktivität erst nach Erhöhung der Salzkonzentration. Eine Trennung verschiedener HMT-Aktivitäten war jedoch nicht zu erkennen, da die Proteine in dem sehr engen Bereich von 110-190 mM NaCl eluieren. 95 % dieser HMT-Aktivität sind in den Fraktionen #9-13 beider Läufe enthalten. Die Fraktionen wurden vereint und auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen.

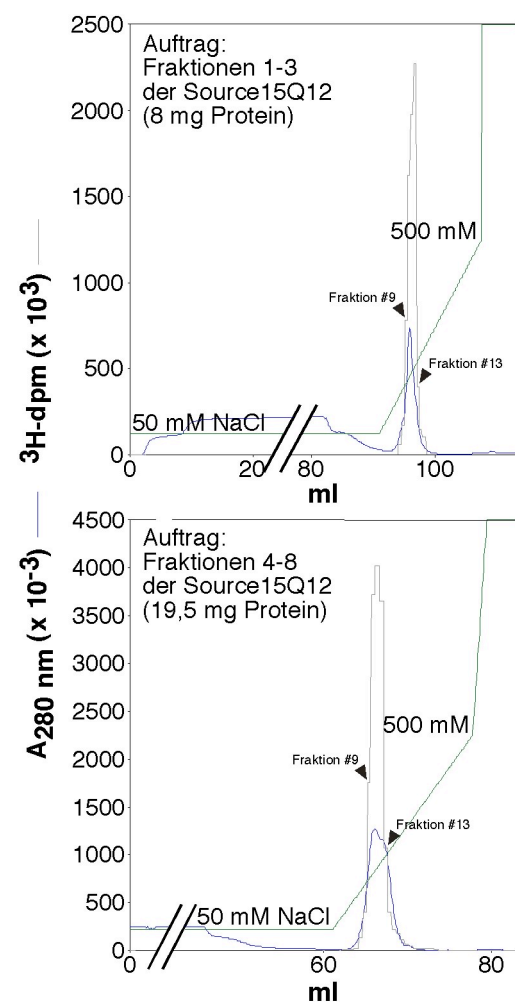


Abbildung 2-7. Reinigung des Niedrigsalz-HMT-Aktivitätspeaks mittels Source15QPE4.6/100 unter anderen Pufferbedingungen. Die Fraktionen #1-3 und #4-8 der Source15Q12 wurden vereint und mit Puffer A (HEMG, 10 mM β ME, pH 8) 1:3 verdünnt. Die Säule wurde mit 5 % Puffer B (1 M NaCl, HEMG, 10 mM β ME, pH 8) in Puffer A äquilibriert. Gebundene Proteine wurden durch einen linearen Gradienten über 10 SV auf 500 mM NaCl eluiert. Während der Elution wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Die HMT-Aktivität wurde mit Aliquots von 10 μ l, 50 μ g Histonmix und 1 μ Ci [³H]-SAM, wie in Abb. 2-3 beschrieben, quantifiziert. Redundante Bereiche der Elutionsprofile wurden ausgeschnitten. Die Fraktionen #9 und #13 sind in beiden Läufen mit Pfeilköpfen gekennzeichnet. Absorption bei 280 nm in blau, HMT-Aktivität (³H-dpm) in grau, NaCl-Gradient in grün.

2.2.4.3 Reinigung 1 - Dritter Schritt: Hydroxylapatit

Hydroxylapatit vermittelt auf unterschiedliche Arten die Bindung von Proteinen. Während einige Proteine über Erhöhung der Ionenstärke eluiert werden, sind die Interaktionen anderer dagegen resistent und werden erst bei Zugabe von Phosphationen abgelöst. Gegenüber dem Source15Q-Anionentauschermaterial verfügt Hydroxylapatit über eine geringere Proteinbindungskapazität, weshalb eine größere Säule (3,7 ml Volumen) verwendet werden mußte. Der Proteinpool wurde mit HEMG, 10 mM β ME, pH 7,8 auf 50 mM NaCl eingestellt und auf die Säule geladen. Nach Elution der Proteine durch einen zweistufigen NaCl-Gradienten (350 mM und 1 M), wurde die Säule auf 50 mM NaCl äquilibriert und mit einem linearen Natriumphosphat-Gradienten (50-500 mM) eluiert (Abb. 2-8A). Die HMT-Aktivität eluierte in einem Proteinpeak zwischen 50 und 100 mM Natriumphosphat, während rund 70% des geladenen Proteins entweder nicht gebunden hatten oder mittels NaCl eluiert wurden (Abb. 2-8B und Daten nicht gezeigt). Mittels qualitativem HMT-Assay konnten H3 und H4-spezifische HMTn nachgewiesen werden (Abb. 2-8C). Die H3-spezifische HMT-Aktivität eluierte von 50-80 mM und die H4-spezifische von 70-100 mM Natriumphosphat. Aliquots der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert, um die Intensität der Banden mit der der HMT-Aktivität vergleichen zu können (coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel nicht gezeigt). Da die Fraktionen jedoch noch zu unrein oder die enzymatisch aktiven Proteine zu wenig konzentriert vorlagen, war eine eindeutige Zuordnung der Aktivitäten zu bestimmten Proteinbanden nicht möglich.

Anhand der auf dem Fluorogramm gezeigten Aktivität wurden zwei HMT-Pools gebildet (Abb. 2-8C). Ein H3-spezifischer Pool, der die Fraktionen #41-49 und ein H4-spezifischer Pool der die Fraktionen #50-62 umfaßte. Beide Pools enthielten, bei einer Konzentration die unter 0,1 mg/ml lag, etwa 0,5 mg Protein. Aufgrund der geringen Konzentration wurden sie mit einer 1,75 M Saccharoselösung auf 0,25 M Saccharose eingestellt, um einem Ausfallen der Proteine entgegenzuwirken. Da aus dem letzten Reinigungsschritt mit Source15Q bekannt war, dass die HMT-Aktivitäten bei geringer Ionenstärke an einen Anionentauscher binden, wurden die beiden Pools über eine MiniQPE4.6/50 augetrennt.

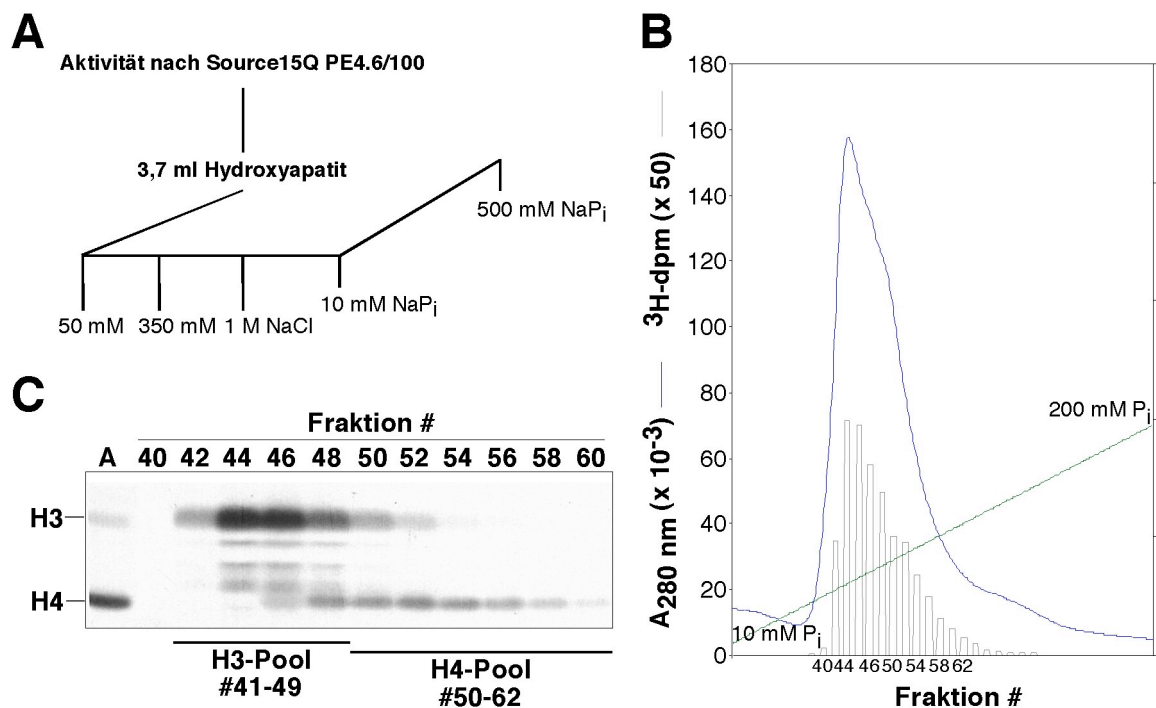


Abbildung 2-8. Auftrennung einer H3- und einer H4-spezifischen HMT-Aktivität mittels Hydroxylapatit. Der Proteinpool der Source15QPE4.6/100 wurde 1:3 mit Puffer A (HEMG, 10 mM \square ME, pH 7,8) verdünnt und auf die 3,7 ml Hydroxylapatit-Säule geladen. Die Säule wurde mit 5 % Puffer B (1 M NaCl, HEMG, 10 mM \square ME, pH 7,8) in Puffer A äquilibriert. (A) Schematische Darstellung der Hydroxylapatit-Fraktionierung. Die Elution erfolgte zuerst über einen zweistufigen NaCl-Gradienten, 350 mM und 1 M. Anschließend wurde die Säule mit 10 mM Natriumphosphat gewaschen und mit einem linearen Gradienten über 25 SV auf 500 mM Natriumphosphat eluiert. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. (B) Elutionsprofil der HMT-Aktivität. Die Proteine eluierten zwischen 50 und 100 mM Natriumphosphat (P_i). Von jeder zweiten Fraktion wurde die HMT-Aktivität quantitativ, wie in Abb. 2-3 beschrieben, bestimmt (15 μ l Fraktion, 50 μ g Histonmix, 1 μ Ci [³H]-SAM). Die Fraktionsnummern sind auf der X-Achse angegeben. Absorption bei 280 nm in blau, HMT-Aktivität (³H-dpm) in grau, Natriumphosphat-Gradient in grün. (C) Fluorogramm der HMT-Aktivitäten der Fraktionen #40-60. Qualitativer Nachweis der HMTn (15 μ l Fraktion, 50 μ g Histonmix, 1 μ Ci [³H]-SAM). Radioaktiv markierte Proteine wurde fluorographisch detektiert. A, Auftrag auf die Säule. Fraktionen #41-49 und #50-62 wurden zu einem H3- bzw. einem H4-spezifischen Pool vereint.

2.2.4.4 Reinigung 1 - Vierter Schritt: MiniQPE4.6/50-Anionentauschersäule

Mini-Beads vermitteln durch ihren geringen Durchmesser von nur 3 μ m die höchstmögliche chromatographische Trennschärfe und sind daher für einen der letzten Schritte innerhalb eines Reinigungsschemas bestens geeignet. Durch die hohe Trennschärfe können die Proteine hochkonzentriert eluiert werden. Der H3- und der H4-Pool wurden vor dem Laden auf die MiniQ über eine 5 ml Entsalzungssäule auf einen Puffer mit geringer Ionenstärke eingestellt (40 mM NaCl, 250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM \square ME, pH 8). Aus Punkt 2.2.4.2 (Abb. 2-

7) konnte abgeleitet werden, dass beide HMT-Aktivitäten in dem engen Bereich von 110-190 mM NaCl eluieren, weshalb zur Abtrennung von Proteinkontaminanten ein flacher Gradient über 18 SV auf 400 mM NaCl angelegt wurde. Bei den MiniQ-Läufen beider Pools entstanden mehrere Proteinabsorptionspeaks, was auf eine Trennung der Proteinbestandteile schließen ließ (Abb. 2-9A und Abb. 2-10A). Die enzymatisch aktiven Komponenten wurden wie erwartet an die Matrix gebunden und eluierten innerhalb des Gradienten.

. Die H3- und die H4-spezifische HMT eluierten von 110-130 mM bzw. von 130-150 mM NaCl. Bei Vergleich der detektierten H3- und H4-spezifischen HMT-Aktivität mit silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgelen, können in den HMT-Aktivitätspeaks zwei Proteinbanden identifiziert werden, die mit den Aktivitäten koeluierten (Abb. 2-9 und Abb. 2-10). Im H3-Pool wurde ein Protein bei ca. 58 kDa als mögliche H3-spezifische HMT identifiziert. Dieses Protein wurde auch bei dem Lauf mit dem H4-Pool sichtbar, da durch die Fraktionen #50-52 der Hydroxylapatitsäule, die in diesen mit aufgenommen worden sind, ebensoviel H3- wie H4-spezifische HMT-Aktivität auf die Säule geladen wurde. Die Fraktionierung des H4-Pools zeigte ein Protein bei 42 kDa das gleiche Elutionsverhalten wie die H4-spezifische Aktivität. Die Konzentrierung der Proteine durch die MiniQ-Säule ist deutlich zu erkennen.

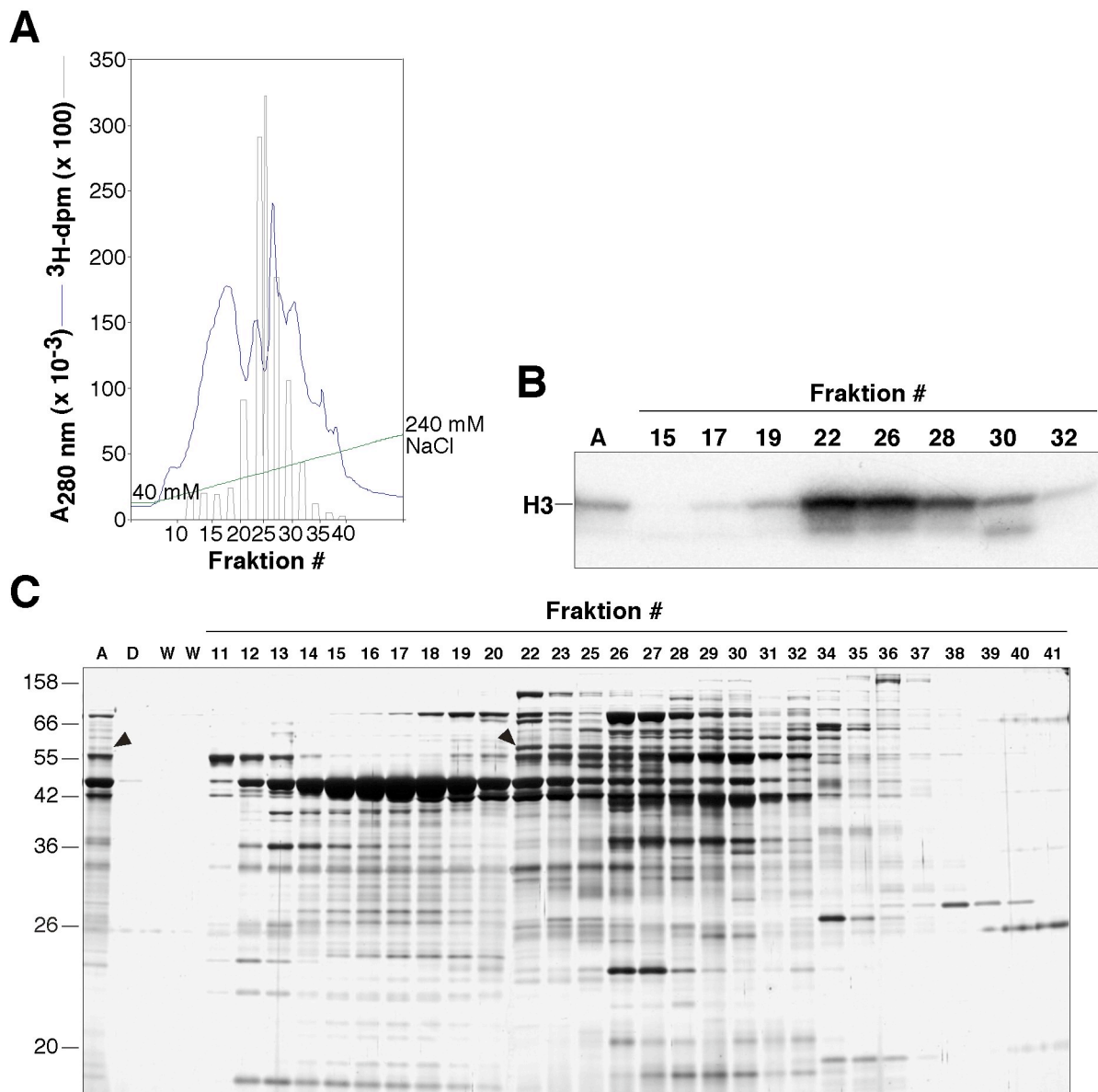


Abbildung 2-9. Die H3-spezifische HMT-Aktivität korreliert mit einem 58 kDa-Protein. Der H3-Pool der Hydroxylapatit-Säule (Abb. 2-8) wurde nach Pufferwechsel (40 mM NaCl, 250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM β ME, pH 8) über eine 5 ml Entsalzungssäule auf eine 0,8 ml MiniQPE4.6/50-Anionentauschersäule geladen. Die Säule wurde mit 4 % Puffer B (1 M NaCl, 250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM β ME, pH 8) in Puffer A (250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM β ME, pH 8) äquilibriert. (A) Ausschnitt des Elutionsprofils. Die Elution der Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten über 18 SV auf 400 mM NaCl, wobei Fraktionen von 0,2 ml gesammelt wurden. Die HMT-Aktivität wurde von jeder zweiten Fraktion, wie in Abb. 2-3 beschrieben, quantifiziert (10 μ l Fraktion, 50 μ g Histonmix, 1 μ Ci [^3H]-SAM) und in das Elutionsprofil eingetragen. Auf der x-Achse sind Fraktionsnummern angegeben. Absorption bei 280 nm in blau. NaCl-Gradient in grün. (B) Fluorogramm zur Bestimmung der Spezifität der HMT-Aktivität. Qualitative Bestimmung der HMT-Aktivität in den angegebenen Fraktionen (10 μ l Fraktion, 50 μ g Histonmix, 1 μ Ci [^3H]-SAM). Radioaktiv markierte Proteine wurden fluorographisch detektiert. (C) 15 μ l der angegebenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Silber gefärbt. Die Pfeilköpfe zeigen auf eine Proteinbande, die in Fraktionen mit H3-spezifischer HMT-Aktivität vorhanden ist. A, Auftrag auf die Säule. D, Durchfluss. W, Aliquot des Wasch-Schrittes vor der Elution. Links, relatives Molekulargewicht in kDa.

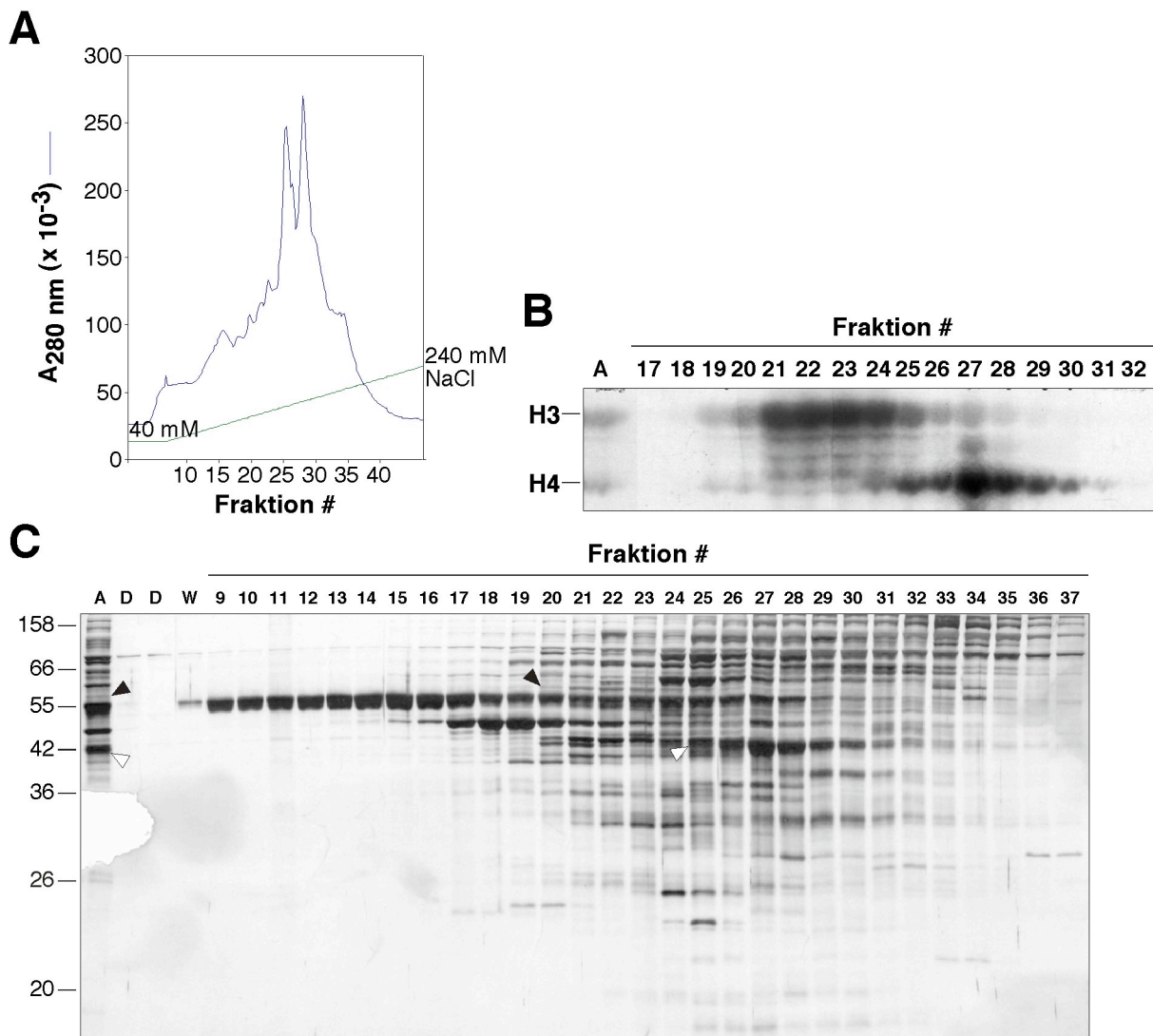


Abbildung 2-10. Die H4-spezifische HMT-Aktivität korreliert mit einem 42 kDa-Protein. Der H4-Pool der Hydroxylapatit-Säule (Abb. 2-8) wurde nach Pufferwechsel (40 mM NaCl, 250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM \square ME, pH 8) über eine 5 ml Entsalzungssäule auf eine 0,8 ml MiniQPE4.6/50-Anionentauschersäule geladen. Die Säule wurde mit 4 % Puffer B (1 M NaCl, 250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM \square ME, pH 8) in Puffer A (250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM \square ME, pH 8) äquilibriert. (A) Ausschnitt des Elutionsprofils. Die Elution der Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten über 18 SV auf 400 mM NaCl, wobei Fraktionen von 0,2 ml gesammelt wurden. Auf der x-Achse sind Fraktionsnummern angegeben. Absorption bei 280 nm in blau, HMT-Aktivität ($^3\text{H-dpm}$) in grau, NaCl-Gradient in grün. (B) Fluorogramm zur Bestimmung der Spezifität der HMT-Aktivität. Qualitative Bestimmung der HMT-Aktivität in den angegebenen Fraktionen (10 μl Fraktion, 50 μg Histonmix, 1 μCi [^3H]-SAM). Radioaktiv markierte Proteine wurden fluorographisch detektiert. (C) Silbergefärbte SDS-Polyacrylamidgel. 15 μl der angegebenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Silber gefärbt. Die weißen Pfeilköpfe zeigen auf eine Proteinbande, die in Fraktionen mit H4-spezifischer und die schwarzen Pfeilköpfe auf eine Proteinbande, die in Fraktionen mit H3-spezifischer HMT-Aktivität vorhanden ist. A, Auftrag auf die Säule. D, Durchfluss. W, Aliquot des Wasch-Schrittes vor der Elution. Links, relatives Molekulargewicht in kDa.

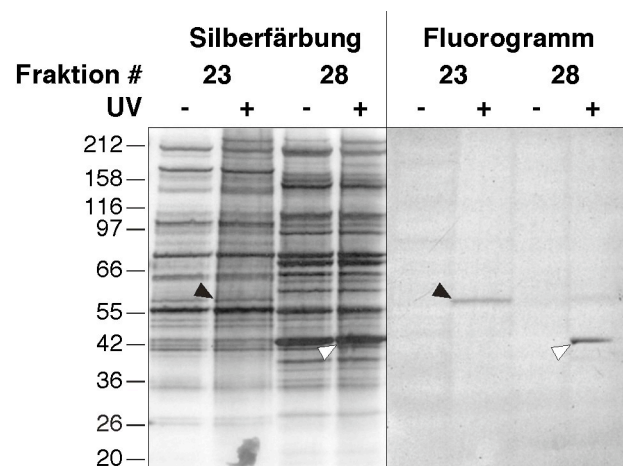
2.2.4.5 Reinigung 1 - Fünfter Schritt: UV-Quervernetzung von [³H]-SAM

Durch die Fraktionierung über die MiniQPE4.6/50 wurden zwei Proteinbanden ausgemacht, die das gleiche Elutionsverhalten wie die HMT-Aktivitäten aufwiesen. Es konnte jedoch noch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Proteinen um die verantwortlichen HMTn handelte. Um nachzuweisen, dass die Proteine HMT-Aktivität besitzen, wurde ein UV-Quervernetzungsexperiment durchgeführt

Als Kofaktor muss SAM eine transiente Wechselwirkung mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms eingehen. Da der Adenosylanteil durch UV-Bestrahlung eine kovalente Bindung zu Proteinen ausbildet, kann man sich dies unter Verwendung von radioaktiv markiertem SAM zur Identifikation von SAM-bindenden Proteinen zunutze machen (Pollack *et al.*, 1999).

Je zwei Aliquots der Fraktionen #23 und #28 des zweiten MiniQ-Laufes, die H3- bzw. H4-spezifische HMT-Aktivität aufwiesen (Abb. 2-10), wurden mit [³H]-SAM inkubiert. Einer der Ansätze wurde mit UV-Licht bestrahlt, während der andere als Kontrolle diente. Nach der Bestrahlung wurden die Proteine der Ansätze durch SDS-PAGE getrennt und mit Silber gefärbt. Die Proteine, die mit dem radioaktiv markierten SAM quervernetzt wurden, wurden fluorographisch nachgewiesen (Abb. 2-11).

Abbildung 2-11. Nachweis von putativen HMTn mittels UV-Quervernetzung von [³H]-SAM. Je zwei 15 µl Aliquots der Fraktionen #23 und #28 des zweiten MiniQ-Laufes (Abb. 2-10) wurden für 5 min bei RT mit 4 µCi [³H]-SAM inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Je eine Probe beider Fraktionen wurde auf Eis mit UV-Licht im Stratalinker (Stratagene) bestrahlt (+). Die anderen beiden nicht mit UV-Licht bestrahlten Proben dienten als Kontrolle (-). Nach Zugabe von 4x Proteingelprobenpuffer und Aufkochen wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Silber gefärbt und anschließend 7 Tage gegen einem Röntgenfilm exponiert. Die Pfeilköpfe zeigen auf die Banden, die nach Überlagerung des Films mit dem silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel als SAM-bindende Proteine identifiziert werden konnten. Schwarzer Pfeilkopf, 58 kDa-Bande. Weißer Pfeilkopf, 42 kDa-Bande. Links, relatives Molekulargewicht in kDa.



Auf dem Fluorogramm konnte jeweils ein Protein von 58 kDa und ein Protein mit 42 kDa nachgewiesen werden. Das relative Molekulargewicht der Proteine entspricht dem der in Punkt 2.2.4.4 identifizierten Proteine. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Proteinen um die enzymatisch aktiven, SAM-abhängigen HMTn handelte, die während der Fraktionierung anhand ihrer Aktivität verfolgt wurden.

2.2.4.6 Reinigung 1 - Sechster Schritt: Massenspektrometrische Analyse und Identität der HMTn

Aliquots der für die Quervernetzung verwendeten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit colloidalem Coomassie (Novex) gefärbt. Die dem 42 kDa- und dem 58 kDa-Protein entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau und Elution der Peptide aus dem Gel massenspektrometrisch analysiert (Proteinanalytik DKFZ). Die Datenbankanalyse der erhaltenen Peptid-Massen-Fingerabdrücke ergab für das 42 kDa-Protein CG6554 mit einem exakten Molekulargewicht von 42,79 kDa und einem pI von 5,0. Das 58 kDa-Protein wurde als CG5358 identifiziert, mit einem exakten Molekulargewicht von 59,71 und einem pI von 5,7. Der Name der Proteine weist darauf hin, dass die dazugehörigen Gene durch das *Drosophila*-Genomprojekt von Celera Genomics identifiziert und in die Datenbank gestellt wurden. Mit CG gekennzeichnete Gene sind zum größten Teil nicht charakterisiert.

Die Massen der Proteine, die anhand ihrer Aminosäuresequenz errechnet wurden, stimmen mit dem SDS-PAGE-Laufverhalten der analysierten Banden überein. Auch die pI-Werte passen zu der Elutionsweise der Proteine auf einem Anionentauscher. Ein höherer pI führt zu einer früheren Elution aufgrund der positiveren Ladung des Proteins.

Um einen Hinweis auf die Funktion der Proteine CG5358 und CG6554 zu erhalten und um herauszufinden, ob es sich tatsächlich um die katalytisch aktiven Komponenten der HMT-Aktivitäten handelte, wurde per WU-Blast2 der Universität Washington (<http://blast.wustl.edu>) eine Homologiesuche mit den Aminosäuresequenzen von CG5358 und CG6554 durchgeführt. Anschließend wurde ein ClustalW-Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) mit dem jeweils besten Treffer der Suche erstellt, um weitere Informationen über die Homologie der Proteine zu erhalten (Abb. 2-12 und Abb. 2-13).

Beide Analysen ergaben eine deutliche Homologie der identifizierten Proteine mit der Arginin-Methyltransferase-Familie. CG5358 besitzt zum einen eine hohe Homologie zum humanen Protein „Similar to Coactivator-associated Arginine-Methyltransferase-1“ und zum anderen zum Protein „Coactivator-associated Arginine-Methyltransferase-1“ (CARM1) aus Maus. Das erstgenannte Protein ist durch eine Deletion im COOH-terminalen Bereich um 23 Aminosäuren kürzer als CARM1 (Daten nicht gezeigt). Ansonsten sind die Proteine identisch. CARM1 ist eine H3-spezifische Arginin-HMT (siehe Einleitung) und wurde für das ClustalW-Alignment herangezogen. CG5358 ist um 78 Aminosäuren kürzer als CARM1. Zwischen den Sequenzen besteht eine 50 %ige Identität, wobei es sich bei 30 % der verbleibenden 50 % um konservative Aminosäure-Austausche handelt. Im mittleren Bereich der Proteine, in dem sich auch die PRMT-Domäne befindet, die für argininspezifische Methyltransferasen charakteristisch ist, liegt eine rund 69 %ige Identität vor. Aufgrund dieser hohen Sequenzähnlichkeit kann CG5358 als *Drosophila*-Homolog von CARM1 und damit als H3-spezifische HMT bezeichnet werden. Nur im COOH-terminalen Bereich unterscheiden sich die Sequenzen von CG5358 und CARM1 deutlich, was aus dem Längenunterschied der Proteine resultiert.

Die WU-Blast2-Homologiesuche mit CG6554 ergab, dass dieses Protein hohe Homologie zur Protein-Arginin-Methyltransferase-1 (PRMT1) aus Maus, Mensch und Ratte aufweist. Mit der Aminosäuresequenz von Maus-PRMT1 wurde dann ein ClustalW-Alignment durchgeführt. Beide Proteine sind mit 5 Aminosäuren Unterschied nahezu gleich lang. Sie sind zu 62 % identisch und weitere 50 % der verbleibenden 38 % sind konservative Austausche. Die Ähnlichkeit erstreckt sich nahezu gleichmäßig über die gesamte Sequenz. Auch diese Proteine tragen eine PRMT-Domäne. Da PRMT1 und CG6554 H4 methylieren und hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass CG6554 das *Drosophila*-Homolog von PRMT1 ist.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N		
SWALL:Q9VH48	Q9VH48	CG5358	protein.	2765	1.8e-287	1
SWALL:AAH36974	AAH36974		Similar to coactivator-associated...	1421	4.8e-145	1
SWALL:Q9WVG6	Q9WVG6		Protein arginine methyltransferase.	1407	1.5e-143	1
SWALL:Q9FI68	Q9FI68		Arginine methyltransferase-like protein.	664	4.6e-91	2
SWALL:BAC15990	BAC15990		Hypothetical protein.	881	7.5e-91	2
SWALL:Q9M906	Q9M906		Putative arginine methyltransferase.	903	3.8e-90	1

CG5358	MSSLRPEEARKLATAASVSP-----LSNCQFCGVVISSIADQKLEFTNKYKGSCTLL	53
mCARM1	MAAAAATAVPGAGSAGVAGPGGAGPCATVSVFPGARLLTIGDANGEIQRHAEQQALRLE	60
	*:: . . * :*.:* : . * * . : :*. * : : : * *	
CG5358	CSYDSQGVVLRVVSDDDRSHVLKEYMIAADTDAAQMGRRSYAVSLDADNLVLRFASEQDQ	113
mCARM1	VRAGPDAAGIALYSHED--VCVFKCSVSRETECSRVRGQSFIIITLGCNSVLIQFATPHDF	118
 : : *.:* : *	
CG5358	QLFRKVVENVK-HLRPKSVFSQRTEESSASQYFQFYGYLSQQQNMMQDYVRTSTYQRAIL	172
mCARM1	CSFYNILKTCRGTLSRVFSERTEESSAVQYFQFYGYLSQQQNMMQDYVRTGTYQRAIL	178
	* : : : : . : * : *	
CG5358	GNAVDFQDKIVLDVVGAGSGILSFFAVQAGAAKVYAEASNMAQYAQOLVESNNVQHKISV	232
mCARM1	QNHTDFKDKIVLDVVGCGSGILSFFAAQAGARKIYAVEASTMAQHAEVLVKSNNLTDRIIV	238
	* . * : *	
CG5358	IPGKIEEIELPEKVDVVIIESEPMGYMLYNERMLETYLHARKWLKPOGKMYPTHGDLHIAPF	292
mCARM1	IPGKVEEVLPEQVDIIIESEPMGYMLFNERMLESYLHAKKYLKPSGNMFPTIGDVHLAPF	298
	***:*. : *	
CG5358	SDESLYSEQYNKANFWYQSAFHGVDLTLHKEGMKEYFRQPIVDTFDIRICMAKSVRHVC	352
mCARM1	TDEQLYMEQFTKANFRYQPSFHGVDLSALRGAADVDFRQPVVDTFDIRILMAKSVKYTV	358
	:*. * * : *	
CG5358	DFLNDKEDDLHLISIPLEFHILQTGICHGLAFWFDVEFSGSSQNVWLSTSPAPTPLTHWYQ	412
mCARM1	NFLEAKEGDLHRIEIPFKFHMLHSGLVHGLAFWFDVAFIGSIMTVWLSTAPTEPLTHWYQ	418
	:* : * . * * * . * : *	
CG5358	VRCLLPMPPIFIKQGQTLTGRVLLLEANRRQSYDVTIDLHIEGTLISSNTLDLKNPYFRYT	472
mCARM1	VRCLFQSPPLFAKAGDTLSGTCLLIANKRQSYDISIVAQVDQTSKSSNLLDLKNPFFRYT	478
	***: * : * * * : : : : * * * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *	
CG5358	GAPVQAPPGTSTQSPSEQYWTQVDTQ-----GSRNSSSMLNGGISVN-----	514
mCARM1	GTTPSPPPGSHYTSPSENMWNVTGTYNLSSGVAVAGMPTAYDLSSVIAGGSSVGHNNLIP	538
	*: . . * : : : : * : : : * . . * : : : : : : : : : : : : : : : : : *	
CG5358	-----GIGEG-----MD	521
mCARM1	LANTGIVNHTSRMGSIMSTGIVQSSGAQGGGSSSAHYAVNNQFTMGGPAISMASPM	598
	* * : *	
CG5358	ITHGLMHPH- 530	
mCARM1	IPNTMHYGS 608	
	* . . * *	

Abbildung 2-12. CG5358 ist das Homolog der „Coactivator-associated-Arginine-Methyltransferase-1“ (CARM1). Mit der Aminosäuresequenz von CG5358 wurde eine WU-Blast2 Homologiesuche durchgeführt. Die besten sechs Treffer sind oben dargestellt, wobei an Nummer 1 CG5358 selbst steht. Unten wurde mit den Sequenzen von CG5358 und CARM1 aus Maus, das oben fett dargestellt ist, ein ClustalW-Alignment durchgeführt. Der schwarz unterlegte Bereich kennzeichnet die PRMT-Domäne. *, identische Aminosäure. Doppelpunkt (:), konservativer Austausch. Punkt (.), semi-konservativer Austausch. Rechts, Nummerierung der Aminosäuren.

tion dahingehend untersucht, ob sie in Komplexen oder als Monomere vorliegen. Unter Punkt 2.2.6 wird ihre Klonierung und die Reinigung und nähere Charakterisierung der rekombinanten Proteine beschrieben, nach der mit letzter Sicherheit gesagt werden kann, ob die identifizierten Proteine CG5358 und CG6554 die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten aufweisen.

Zur Analyse des Molekulargewichtes der möglichen HMT-aktiven Komplexe, in denen CG5358 und CG6554 mit hoher Wahrscheinlichkeit die katalytisch aktiven Proteine darstellen, wurden zunächst drei Pools aus den Fraktionen der beiden MiniQ-Läufe gebildet. Die Fraktionen #22-25 des ersten (Abb. 2-9) und #21-24 (Abb. 2-10) des zweiten Laufes bildeten zwei unabhängige Pools für die darin identische H3-spezifische Aktivität und die Fraktionen #27-30 des zweiten Laufes (Abb. 2-10) wurden zum H4-spezifischen Pool vereint. Die drei Pools wurden über eine analytische Superdex200-Gelfiltrationssäule aufgetrennt und fraktioniert. Anschließend wurde ermittelt, in welchen Fraktionen die entsprechende HMT-Aktivität vorlag, um durch Vergleich mit einem zuvor durchgeführten Eichlauf mit einem Proteinstandard auf das Molekulargewicht des aktiven Komplexes zu schließen. In Abb. 2-14 und Abb. 2-15 sind die Gelfiltrationsergebnisse des H3- bzw. des H4-spezifischen Pools aus dem zweiten MiniQ-Lauf dargestellt. Die Daten mit dem anderen H3- Pool sind nicht gezeigt, da sie mit denen in Abb. 2-14 übereinstimmen.

In beiden Fällen eluiert die HMT-Aktivität bei einem beträchtlich größeren Molekulargewicht als das der vermutlich katalytischen Komponenten. Es wurde jeweils nur ein Aktivitätspeak detektiert, im Fall der H3-spezifischen HMT bei ca. 480 kDa (Abb. 2-14) und im Fall der H4-spezifischen bei ca. 330 kDa (Abb. 2-15). Im Bereich der monomeren Einheiten sind keine HMT-Aktivitäten zu erkennen (In Abb. 2-14 nicht gezeigt).

In Abb. 2-14B ist eindeutig die Übereinstimmung der H3-spezifischen Aktivität mit der Bandenintensität von CG5358 zu erkennen, was ein weiteres Indiz für die Funktion des Proteins als die katalytische Einheit ist. Desweiteren werden zwei vermeintlich koeluierende Proteine bei 60 kDa und 140 kDa detektiert. Die 140 kDa-Bande wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (Proteinanalytik DKFZ). Die Analyse ergab CG4752, ein bisher in *Drosophila* nicht charakterisiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 138 kDa. Es ist das Homolog der 5-Oxo-L-Prolinase der Ratte, ein Enzym, das die ATP-abhängige Reaktion von 5-Oxo-L-Prolin zu L-Glutaminsäure katalysiert und als Oligomer wirkt. Aufgrund seiner Funktion kann CG4752 nicht in Beziehung mit CG5358 und der

HMT-Aktivität gesetzt werden und bildet mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen funktionalen Komplex mit diesem. Bei näherer Betrachtung des 60 kDa Proteins kann eine Diskrepanz seines Elutionspeaks mit dem von CG5358 ausgemacht werden. Während CG5358 seinen Peak in Fraktion #8 hat, ist die 60 kDa Bande in Fraktion #9 am stärksten. Dieses Protein wurde daher nicht analysiert.

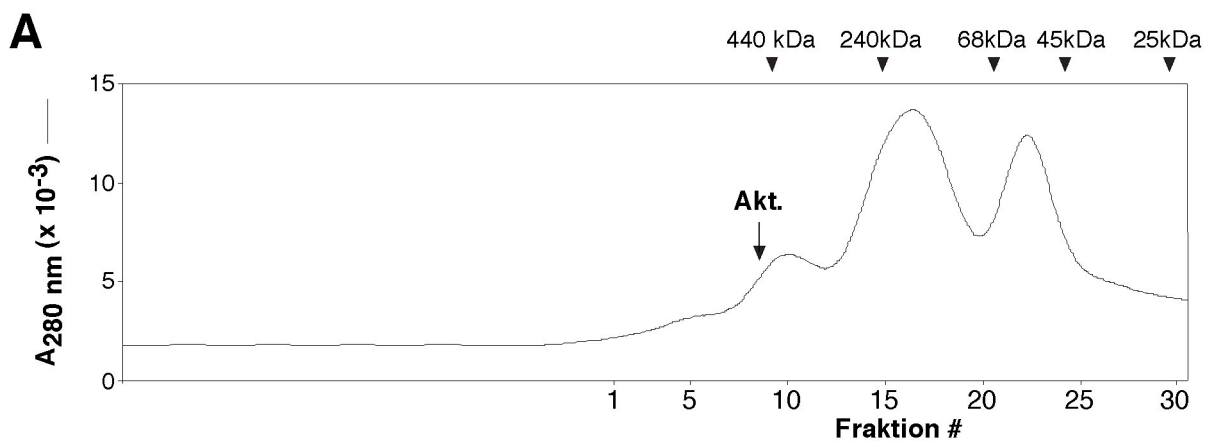
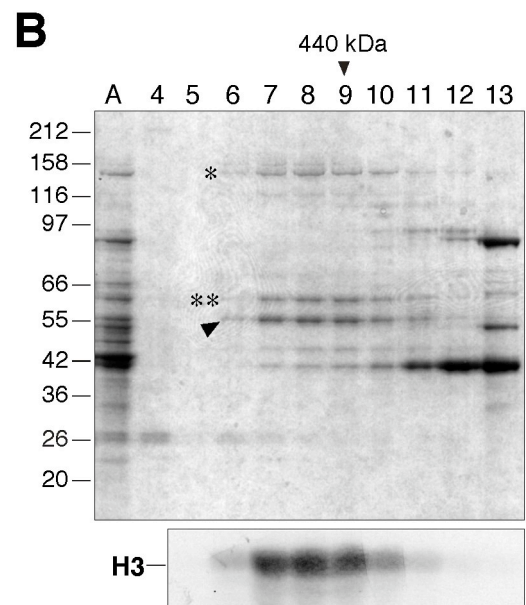


Abbildung 2-14. Die H3-spezifische HMT-Aktivität ist Bestandteil eines 450-500 kDa-Komplexes. Die Fraktionen #21-24 des zweiten MiniQ-Laufes wurden vereint. 450 μ l davon wurden auf eine analytische Superdex200HR10/30 geladen, die zuvor mit 200 mM NaCl, 250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM β ME, pH 8 äquilibriert wurde. Die Fraktionsgröße betrug 0,3 ml. (A) Elutionsprofil (Absorption bei 280 nm) des Laufes. Oben sind die Molekulargewichte des Proteinstandards und unten die Fraktionsnummern angegeben. Der HMT-Aktivitätspeak (Akt.) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Oben, ein mit colloidalem Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. 50 μ l der Fraktionen #4-13 wurden mit TCA-gefällt und auf das Gel geladen. CG5358 ist mit einem Pfeilkopf markiert. * markiert ein koelulierendes, ** ein fast koelulierendes Protein. A, Auftrag auf die Säule. Links, relatives Molekulargewicht in kDa. Unten, Fluorogramm des HMT-Aktivitätstests der Fraktionen in Gegenwart von Histonmix.



Inwiefern CG6554 und CG5358 tatsächlich die für die HMT-Aktivität verantwortlichen Enzyme sind und ob sie als homooligomere oder als heterooligomere Komplexe, deren andere Untereinheiten nicht detektiert werden konnten, katalytisch wirken, wird anhand der Analyse der rekombinanten in *E. coli* produzierten Proteine unter Punkt 2.2.6 deutlich.

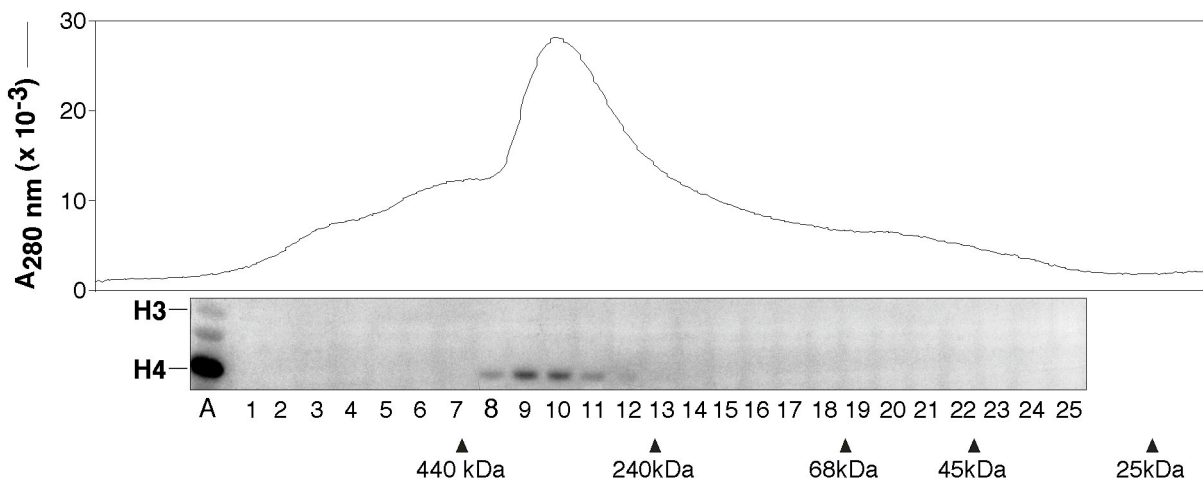


Abbildung 2-15. Die H4-spezifische HMT-Aktivität ist Bestandteil eines 330 kDa-Komplexes. Die Fraktionen #27-30 (siehe Abb. 2-10) des zweiten MiniQ-Laufes wurden vereint. 400 μ l davon wurden auf eine analytische Superdex200HR10/30 geladen, die zuvor mit 200 mM NaCl, 250 mM Saccharose, HEMG, 10 mM β ME, pH 8 äquilibriert wurde. Die Fraktionsgröße betrug 0,3 ml. Oben ist die Absorption bei 280 nm während des Laufes gezeigt. Darunter ist ein Fluorogramm dargestellt, bei dem die Fraktionen #1-25 und der Auftrag auf die Säule, A, auf HMT-Aktivität getestet wurden. Als Substrat diente Histonmix. Das Elutionsprofil des Proteinstandards ist unten angegeben.

2.2.5 Identifizierung der HMT CG6563

2.2.5.1 Reinigung 2 - Erster Schritt: Startmaterial und Q-SepharoseHP

Für eine andere Arbeit wurde Kernextrakt aus 1000 g 0-14 h alten *Drosophila*-Embryonen über eine Heparin-Matrix fraktioniert. Der Durchfluss dieser Fraktionierung zeigte, wie von der ersten Reinigung erwartet (Abb. 2-5), HMT-Aktivität für H3 und H4. Es wurde mit diesem Material eine neue Reinigung gestartet, um nach weiteren darin enthaltenen HMTn zu suchen. Der Proteingehalt der Lösung lag mit 1,5 g etwa 30fach über dem der ersten Reinigung. Daher musste die nächste Säule eine hohe Bindungskapazität besitzen. Die einzige in dieser Größe vorhandene, war wieder eine Anionenaustauschersäule, eine Q-SepharoseHP-XK26/9 mit 48 ml Volumen. Die Lösung, die eine Leitfähigkeit von 150 μ M NaCl besaß, wurde auf die Säule geladen und das gebundene Protein mit ansteigender NaCl-Konzentration eluiert (Abb. 2-16). Da die Säule mit 100 mM NaCl äquilibriert wurde, kam es am Ende des Durchflusses zu einem Leitfähigkeitsanstieg, der durch einen Gelfiltrationseffekt der großvolumigen Säule und der höheren Salzkonzentration der aufgetragenen Lösung resultierte.

Dadurch wurde im hinteren Bereich des Durchflusses, Fraktion #14-16, eine H4-spezifische HMT-Aktivität eluiert, die in den vorangehenden Fraktionen noch nicht detektiert wurde (Abb. 2-16). Weitere HMT-Aktivitäten wurden während der regulär angelegten NaCl-Gradienten voneinander getrennt, die jedoch nicht weiter bearbeitet wurden.

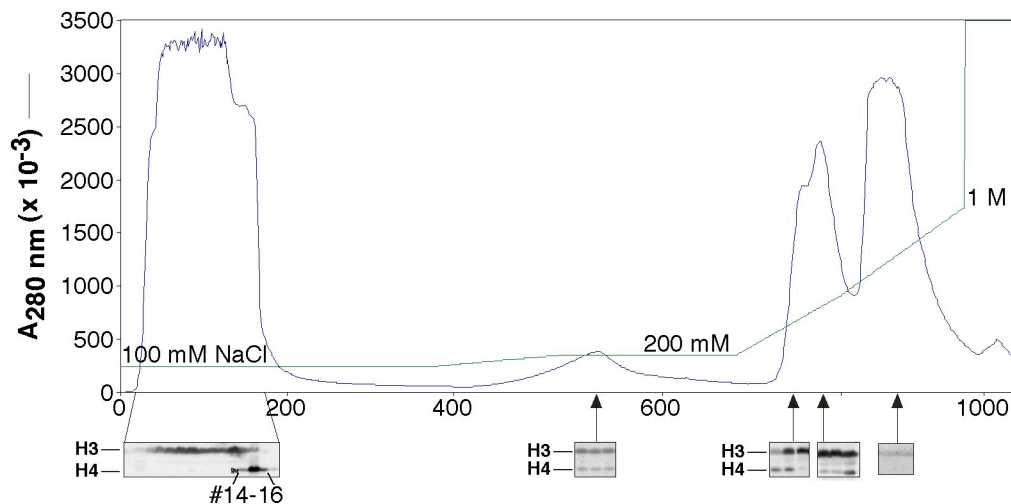


Abbildung 2-16. Identifizierung von HMT-Aktivitäten mittels Anionenaustauschchromatographie. Der Durchfluss einer Heparin-Säule, die mit Kernextrakt aus 1000 g alten 0-14 h *Drosophila*-Embryonen beladen wurde, wurde auf eine 48 ml Q-SepharoseHP-XK26/9-Säule aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 5 % Puffer B (200 mM HEMG, 10 mM β ME, pH 7,6) in Puffer A (HEMG, 10 mM β ME, pH 7,6) äquilibriert. Gebundenes Protein wurde durch ansteigende Puffer B-Konzentration eluiert. Während des Durchflusses wurden Fraktionen von 10 ml und während der Elution Fraktionen von 4 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurde die HMT-Aktivität gegenüber Histonmix qualitativ mittels HMT-Assay detektiert. Ausschnitte der Fluorogramme sind für die verschiedenen voneinander getrennten Aktivitäten unter dem Elutionsprofil abgebildet. Fraktionen #14-16 sind angegeben. Absorption bei 280 nm in blau, NaCl-Gradient in grün.

2.2.5.2 Reinigung 2 - Zweiter Schritt: Präzipitation mit anschließender Gelfiltration

Die Fraktionen #14-16 wurden vereint, was ein Volumen von 30 ml ergab. Da als nächster Schritt eine Gelfiltration mit einer 120 ml-Superdex200 16/60 durchgeführt werden sollte, musste zuerst das Volumen der Pools verringert werden. Die Lösung wurde auf eine 60 %ige Ammoniumsulfatsättigung eingestellt, wodurch die Proteine gefällt wurden. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml 0,2 M NaCl, HEMG, 10 mM β ME, pH 7,6 wieder aufgenommen – Endvolumen 2,8 ml. Die Proteinmenge entsprach

78 µg. Die Lösung wurde auf die Superdex200 16/60 geladen und die gesammelten 2 ml Fraktionen qualitativ mittels Fluorographie auf HMT-Aktivität getestet (Abb. 2-17).

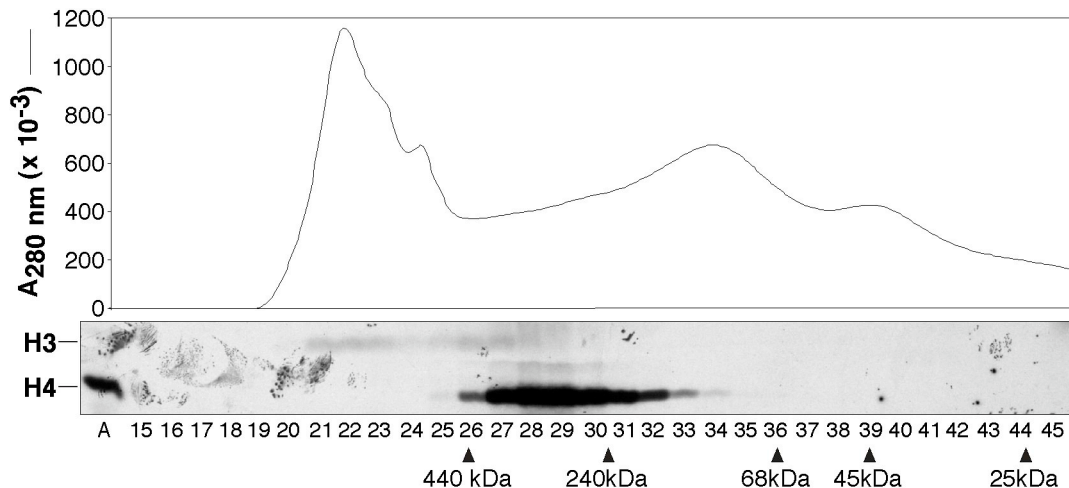


Abbildung 2-17. Der H4-spezifische HMT-Aktivitäts-Peak eluiert bei etwa 300-350 kDa. Die Fraktionen #14-16 des Q-Sepharose-Laufes wurden vereint. Der Pool wurde mit 60 % Ammoniumsulfat gefällt, das Pellet in 2 ml des Gelfiltrationslaufpuffers (200 mM NaCl, HEMG, 10 mM β ME, pH 7,6) wieder aufgenommen und auf eine Superdex200 16/60 geladen. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml. Oben ist die Absorption bei 280 nm während des Laufes gezeigt. Darunter ist ein Fluorogramm von HMT-Aktivitätstests der Fraktionen #15-45 und des Auftragsmaterials, A. Als Substrat diente Histonmix. Das Elutionsprofil des Proteinstandards ist unter den Fraktionsnummern angegeben.

Der Peak der dominanten H4-spezifischen HMT-Aktivität, die auf die Säule geladen wurde, eluierte bei etwa 300-350 kDa, wobei sie aber über einen breiten Bereich zwischen 440 kDa und ca. 80 kDa schmiert. Die sehr viel schwächer vorhandene H3-spezifische HMT-Aktivität wurde in zwei Peaks aufgetrennt. Der eine verlief von Fraktion #21-23 und schmierte in den zweiten, der zwischen 440-240 kDa lag.

Aufgrund des Elutionsverhaltens der H4-spezifischen Aktivität auf dem Anionentauscher und der präparativen Gelfiltrationssäule konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um CG6554 handelte. Um dies herauszufinden, wurde die identifizierte HMT-Aktivität analog zu CG6554 auf einer Source15QPE4.6/100-Säule aufgetrennt (vergleiche Punkt 2.2.4.2). Falls die HMT-Aktivitäten die gleichen sein sollten, sollten sie auf dieser Säule ein identisches Elutionsverhalten zeigen.

2.2.5.3 Reinigung 2 - Dritter Schritt: Source15QPE4.6/100

Die Fraktionen #26-32 der Superdex200 wurden vereint und anschließend mit 3 Volumen Puffer A (HEMG, 10 mM \square ME, pH 8) verdünnt, um die Salzkonzentration auf 50 mM NaCl zu erniedrigen und den pH zu erhöhen.

Der Pool hatte einen Proteingehalt von 9 mg. Die gesamte Lösung wurde auf die Source15QPE4.6/100 geladen und gebundene Proteine durch Erhöhung der NaCl-Konzentration über 10 SV auf 500 mM eluiert.

Wie in der ersten Reinigung (Abb. 2-7) eluierte der Großteil sowohl des gebundenen Proteins als auch der HMT-Aktivität zwischen 110 und 190 mM NaCl (Abb. 2-18). Anhand des mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgels der gesammelten Fraktionen erkennt man die Konzentration des Proteins in diesem Bereich (Abb. 2-18). Gegenüber der Superdex200 wurde auch die H3-spezifische Aktivität stark konzentriert und ist auf dem Fluorogramm deutlich sichtbar. Ihr Peak eluierte direkt vor der stärkeren H4-spezifischen Aktivität. Das gleiche Bild wurde bei der Anionentauschersäule MiniQPE4.6/50 in Abb. 2-10 erhalten. Es konnte hier also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beiden HMT-Aktivitäten um CG5358 und CG6554 handelt. Mit diesen Fraktionen wurde daher nicht mehr weitergearbeitet.

Bei längerer Expositionszeit des Films wurde eine weitere H4-spezifische Aktivität in den Fraktionen #17-24 detektiert (Abb. 2-19). Da die Proteinkonzentration in den Fraktionen gering war und das für HMT-Aktivität verantwortliche Enzym schon recht sauber vorliegen konnte, wurde wie bei der ersten Reinigung durch UV-Quervernetzung von [3 H]-SAM versucht, ein SAM-bindendes Protein in diesen Fraktionen zu identifizieren. Dieser Versuch scheiterte jedoch. Es wurde keine Bande auf dem Fluorogramm detektiert (Daten nicht gezeigt). Zur Identifizierung eines histonacetylierenden Enzyms wurde der sogenannte „In-Gel-Assay“ entwickelt (Brownell und Allis, 1995), bei dem man eine enzymatische Aktivität direkt mit einer Proteinbande in einem SDS-Polyacrylamidgel korrelieren kann. Da es sich bei der Histonmethylierung um einen chemisch vergleichbaren Prozess zur Histonacetylierung handelt, wurde diese Methode zur Identifizierung von HMTn modifiziert.

Der erste Schritt war die Inkorporation von HMT-Substrat in ein SDS-Polyacrylamidgel. Es wurden Gele verwendet, in deren Trenngel 0,5 mg/ml Histone (Histonmix) oder 0,7 mg/ml NH_2 -terminales Histon H4-Peptid (Aminosäuren 1-24) eingebettet wurden. 15 μ l der Fraktion #21 wurden mit Proteingelprobenpuffer versetzt, aber nicht gekocht, um eine spätere Renatu-

rierung des Proteins zu gewährleisten, und dann auf die Gele geladen. Nach der Elektrophorese wurde zunächst das SDS aus den Gelen gewaschen.

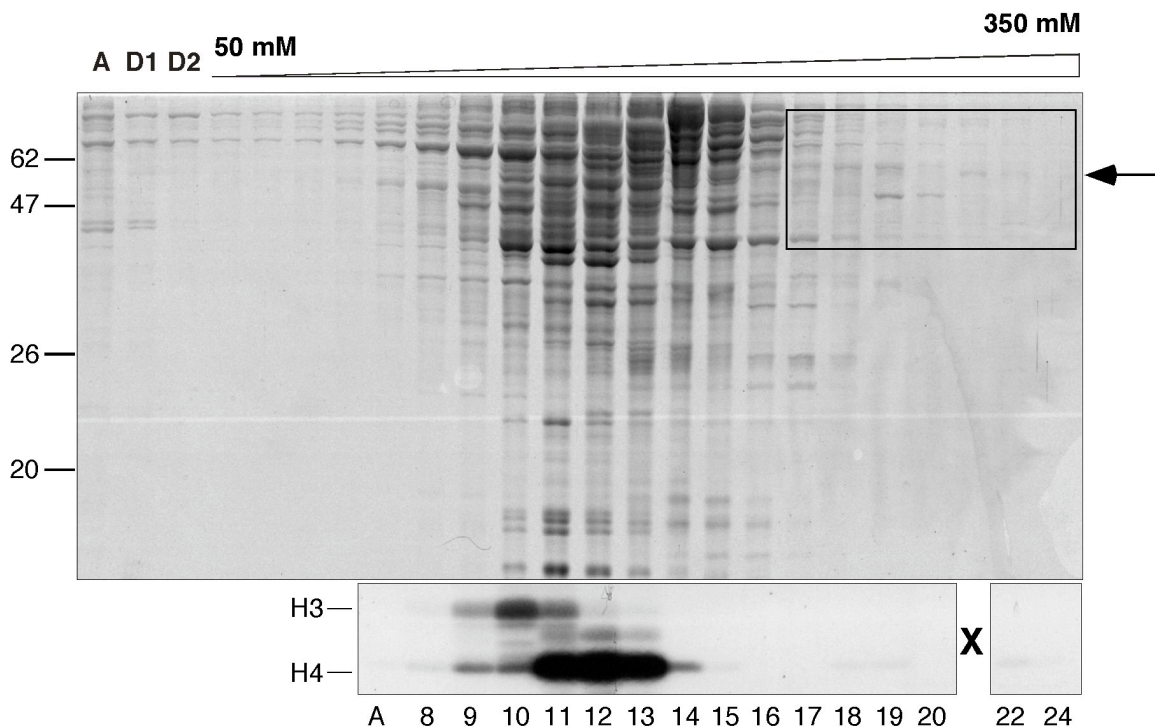


Abbildung 2-18. Fraktionierung und Detektion von drei HMT-Aktivitäten durch Anionenaustauschchromatographie. Die Fraktionen #26-32 der Superdex200 wurden vereint und mit Puffer A (HEMG, 10 mM β ME, pH 8) 1:4 verdünnt. Die Säule wurde mit 5 % Puffer B (1 M NaCl, HEMG, 10 mM β ME, pH 8) in Puffer A äquilibriert. Gebundene Proteine wurden durch einen linearen Gradienten über 10 SV auf 500 mM NaCl eluiert. Oben, Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Während der Elution wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. 15 μ l der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Unten, Fluorogramm von HMT-Aktivitätstests der gekennzeichneten Fraktionen. Die HMT-Aktivität wurde mit Aliquots von 10 μ l, 50 μ g Histonmix und 1 μ Ci [3 H]-SAM qualitativ durch Fluorographie bestimmt. Der NaCl-Gradient von 50-350 mM ist eingezeichnet. A, Auftrag auf die Säule. D1, D2, Aliquots aus dem Anfangs- bzw. Endbereich des Durchflusses. Fraktionsnummern sind unter dem Fluorogramm angegeben. Links, relatives Molekulargewicht in kDa. Der Pfeil markiert eine Proteinbande, die mit einer H4-spezifischen HMT-Aktivität koeluiert (siehe Abb. 2-19). Der umrahmte Bereich innerhalb des SDS-Polyacrylamidgels ist in Abb. 2-19 vergrößert dargestellt.

Anschließend wurden die Proteine durch Inkubation der Gele in Guanidiniumhydrochlorid denaturiert, um sie danach durch Inkubation in HMT-Puffer wieder zu renaturieren. Durch den Denaturierungs-/Renaturierungsschritt wurde bei der Histonacetyltransferase mehr Aktivitätsausbeute erzielt als ohne. Daher wurde dieser Schritt hier auch angewendet. Nach der Renaturierung erfolgte die HMT-Reaktion durch Zugabe von [3 H]-SAM. Überschüssige Ra-

dioaktivität wurde gewaschen, die Gele mit „Amplify“ behandelt, getrocknet und für 4 Wochen gegen einen Röntgenfilm bei -80°C exponiert. Auf den Fluorogrammen von beiden Gelen ist eine einzelne Bande bei etwa 60 kDa zu sehen (Abb. 19D und Daten nicht gezeigt). Diese Bande weist auf ein Protein von 60 kDa hin, das Histonsubstrat mit radioaktiv markiertem SAM methyliert hat. Durch Vergleich des „In-Gel-Assay“-Ergebnisses mit dem coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel und dem HMT-Aktivitätsprofil der Fraktionen #17-24 (Abb. 19) erkennt man eine Bande auf der gleichen Höhe, deren Intensität mit der H4-spezifischen HMT-Aktivität korreliert. Dieses Protein war dementsprechend ein Kandidat für die H4-spezifische HMT.

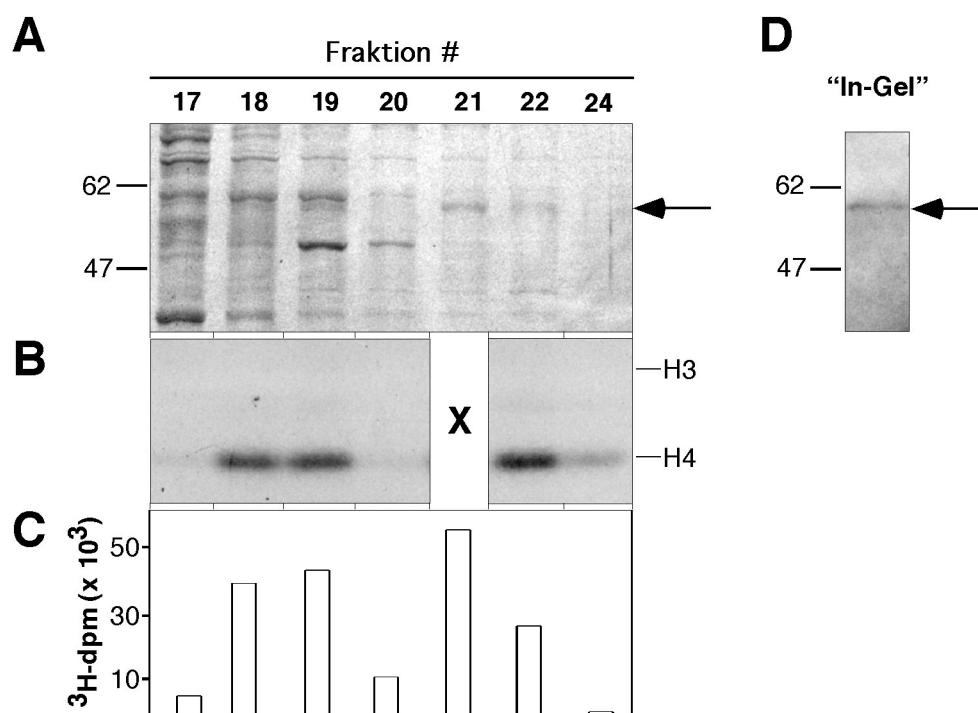


Abbildung 2-19. Nachweis einer 60 kDa H4-spezifischen HMT im „In-Gel-Assay.“ (A) Vergrößerung des umrahmten Ausschnittes des SDS-Polyacrylamidgels aus Abb. 2-18. Fraktionsnummern sind angegeben. Der Pfeil markiert eine Proteinbande, die mit der H4-spezifischen HMT-Aktivität koeluierte und im „In-Gel-Assay“ (D) detektiert wurde. (B) Fluorogramm von HMT-Aktivitätstests der angegebenen Fraktionen wie in Abb. 2-18, nur mit längerer Expositionszeit. Rechts, Markierung der Histone H3 und H4. (C) Quantifizierung der HMT-Aktivität der Fraktionen mittels Szintillationszähler, wie in Abb. 2-3 beschrieben ($10 \mu\text{l}$ Fraktion, $50 \mu\text{g}$ Histonmix und $1 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]\text{-SAM}$). (D) Fluorogramm des „In-Gel-Assays“. Für den „In-Gel-Assay“ wurden $15 \mu\text{l}$ der Fraktion #21 auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen, in dem $0,5 \text{ mg/ml}$ Histonmix inkorporiert waren. Der Pfeil markiert die detektierte Proteinbande. (A), (D) Links, relatives Molekulargewicht in kDa.

2.2.5.4 Reinigung 2 - Vierter Schritt: Massenspektrometrische Analyse

Ein Aliquot der Fraktion #21 wurde durch SDS-PAGE getrennt und mit colloidalem Coomassie (Novex) gefärbt. Die Bande wurde ausgeschnitten, das Protein tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert (Proteinanalytik DKFZ). Als Ergebnis wurde eindeutig das Protein CG6563 identifiziert. Es hat ein errechnetes Molekulargewicht von 58,9 kDa und einen pI von 4,6, was die im Vergleich zu den beiden anderen identifizierten Proteinen spätere Elution von einem Anionentauscher erklärt. Auch hier handelt es sich um ein noch nicht charakterisiertes Protein, dessen Sequenz über das *Drosophila*-Celera-Genomprojekt in die Datenbank eingespeist wurde (Adams *et al.*, 2000). Es wurde wiederum eine computergestützte WU-Blast2-Homologiesuche mit anschließendem ClustalW-Alignment des besten Treffers durchgeführt, um näheres über die Struktur und Funktion des Proteins zu erfahren (Abb. 2-20).

Die Datenbanksuche ergab eine hohe Homologie von CG6563 zu Protein-Arginin-Methyltransferase-3 (PRMT3) aus Mensch, Maus und Ratte. Die höchste Homologie zeigt sich bei dem humanen Protein, mit dem ein ClustalW-Alignment durchgeführt wurde. Beide Proteine zeigen über den gesamten Bereich und insbesondere in der PRMT-Domäne, die das Charakteristikum der Arginin-Methyltransferasen ist, eine hohe Ähnlichkeit. Die im COOH-terminalen Bereich von PRMT3 liegende C2H2-Zinkfingerdomäne und das Konsensussequenzmotiv für Tyrosinphosphorylierung sind in CG6563 auch vorhanden. In der PRMT-Domäne liegt eine 47 %ige Identität bei zusätzlichen 24 % konservativen Aminosäure-Austauschen vor. CG6563 ist somit das *Drosophila*-Homolog zu PRMT3. PRMT3 ist als argininspezifische Methyltransferase bekannt, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (Zhang und Reinberg, 2001).

		High	Smallest	Sum	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	Probability	P(N)	
SWALL:Q9VFB3	Q9VFB3	CG6563 protein (LD34544P).	2698	2.3e-280	1
SWALL:ANM3_HUMAN	O60678	Protein arginine N-methyltransferase...	952	2.4e-95	1
SWALL:ANM3_RAT	O70467	Protein arginine N-methyltransferase...	928	8.5e-93	1
SWALL:Q8WUV3	Q8WUV3	Hypothetical protein (Fragment).	888	1.5e-88	1
SWALL:ANM3_MOUSE	Q922H1	Protein arginine N-methyltransferase...	794	1.3e-78	1
SWALL:Q9C7D0	Q9C7D0	Arginine N-methyltransferase 3, putat...	550	3.5e-66	2

CG6563	MKDTEVNDNNTTEEEPVKEAPEVPANSSSDEDEYDDIDDDDEPMDGDELTTCLFCTETSA	60
hPRMT3	-----DEPELSD--SGDEAAWEDEDDADLPH--GKQQTCLFCNRLFT	39
	: **: . * . ** : * : * * * * * * : . : * . * * * * . . :	
CG6563	NISVAIDHLDARHKVNLSQLQRKFEMDQYSFYIKLINYIRAKKISAEQLLSAEHPL-WQDE	119
hPRMT3	SAEETFSSHCKSEHQFNIDSMVHKHGLEFYGYIKLINFIRLKNPTVEYMNISIYNPVPWEKE	99
	. . : : * . . : * : * : : * . : : * . * * * * : * * : : * : * : * : * : *	
CG6563	KYLQPG-EYEPWLCYDYEVLKT-----DGAPTQPSVLELQORIAEQSQ----LLQQ	165
hPRMT3	EYLPVLEDDLLLQFDVEDLYEPVSVPFSPYNGLSENTSVVEKLLKHEARALSAEAALAR	159
	: * : * * * : * : * * * * * * : * . . : * * : * : : : * : * :	
CG6563	ANEDMERMRNDYKALLQKVHADGEPKGSQSVPRNNVCLDNEYFKSYAHFGIHHHEMLSDK	225
hPRMT3	AREDLQMKQFAQDFVMHTDVR--TCSSSTSVIADLQEDGVIYFSSYGHYGIHEEMLKDK	218
	* . * * : : : : : : : : : : . . * . . . : * . * * . * . * : * * . * * * . * * *	
CG6563	VRTSTYRASLLQNEAVVRGKTVLDVGCCTGILSIFASKAGAARVVGDNSDIVYTAMDI I	285
hPRMT3	IRTESYRDFIYQNPFIKDKVVLVGVGCCTGILSMFAAKAGAKKVLGVDQSEILYQAMDII	278
	: * . : * * : * * : : . : * . *	
CG6563	RKNKVEN-VELIKGRLEDTDLPETKYDIIISEWMGYFLLYESMLDSIIYARENHLNPNGI	344
hPRMT3	RLNKLEDTITLIKGKIEEVHLPVEKVDVIISEWMGYFLLFESMLDSVLYAKNKYLAKGGS	338
	* * * : * : * * * : * : * . . *	
CG6563	ILPSRCTLSLLGYGDDTLYADEVEFWSNVYEVDMSDLRKQSIIEEPLMQVDAEFMLTEPE	404
hPRMT3	VYPDICTISLVAVSDVNKHADRIAFWDDVYGFKMSCMKKAVIPEAVVEVLDPKTLISEPC	398
	: * . * * : * : . * . : * : * : * * : * * . * * : * * : * * : * * : * * * * *	
CG6563	QIANFDIMTVDMNYPNFTHQFSKVTKPGRLSAFVGYFETLFLPSP--VMFSTSPSATP	462
hPRMT3	GIKHIDCHTTSISDLEFSSDFTLKITRSMCTAIAGYFDIYFEKNCHNRVVFSTGPOSTK	458
	* : * * * : * : * : * * : * . . : * : * * * : * * . * : * * * . * : *	
CG6563	THWKQTVFFIENPOVVKEGDVICGKITSRRHKEDVRGLSVDIEVFGKHKHYNVV	516
hPRMT3	THWKQTVFLLEKPFVSKAGEALKGKVTVHKNKKDPRSLTVTLTLNNSOTYGLQ	512
	* * * * * : * : * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	

Abbildung 2-20. CG6563 ist das Homolog der Protein-Arginin-Methyltransferase-3 (PRMT3). Mit der Aminosäuresequenz von CG6563 wurde eine WU-Blast2-Homologiesuche durchgeführt. Die besten sechs Treffer sind oben dargestellt, wobei an Nummer 1 CG6563 selbst steht. Unten wurde mit den Sequenzen von CG6563 und PRMT3 aus Mensch, das oben fett dargestellt ist, ein ClustalW-Alignment durchgeführt. Der schwarz unterlegte Bereich kennzeichnet die PRMT-Domäne. Hellgrau mit schwarzer Schrift, C2H2-Zinkfinger-Domäne. Dunkelgrau mit weißer Schrift, Tyrosinkinasekonsensussequenz. *, identische Aminosäure. Doppelpunkt (:), konservativer Austausch. Punkt (.), semi-konservativer Austausch. Rechts, Nummerierung der Aminosäuren.

2.2.6 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten HMTn CG5358, CG6554 und CG6563

2.2.6.1 Klonierung

Um experimentell zu bestätigen, dass die drei identifizierten Proteine tatsächlich für die entsprechende HMT-Aktivität verantwortlich sind, sollten sie kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Für die Klonierung wurde in der Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) nach cDNAs gesucht und die entsprechenden Klone von Research Genetics, Huntsville, USA bestellt (Tab. 2-2).

Tabelle 2-2. cDNA-Klone der identifizierten Proteine.

Gen	cDNA-Klon
<i>cg5358</i>	LD30574
<i>cg6554</i>	LD38136
<i>cg6563</i>	LD34544

Die cDNAs wurden mit spezifischen Primern für das 3'- und 5'-Ende amplifiziert, wobei für die darauffolgende Insertion der cDNAs in pBluescript und bakterielle Expressionsvektoren flankierende Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden. Die Ergebnisse der PCR-Ansätze sind in Abb. 2-21 schematisch dargestellt.



Abbildung 2-21. Schematische Darstellung der PCR-Produkte. Die mit den Primern eingeführten Restriktionsschnittstellen an den 5'- und 3'-Enden sind angegeben.

2.2.6.2 Expression und HMT-Aktivität

Für die Expression in *E. coli* wurden die Vektoren pet19b (Stratagene) und pGEX2TKN (Sauer *et al.*, 1995) verwendet. Die cDNAs wurden in die Expressionskassetten der Vektoren inseriert. Dies ermöglicht es, Fusionsproteine zu exprimieren, die sich aus NH₂-terminal fusioniertem Polyhis (His₁₀; pet19b) oder GST (pGEX2TKN) und den HMTn zusammensetzen.

Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Bei den GST-markierten Proteinen war die Expressionsrate nicht zufrieden stellend, wohingehend die His₁₀-markierten Proteine in ausreichender Menge produziert wurden (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher nur mit den His₁₀-markierten Proteinen weitergearbeitet. Die Proteine waren nach Aufschlss der Zellen in der löslichen Fraktion und wurden in nativem Zustand durch einen einfachen Reinigungsschritt über Nickel-Affinitätschromatographie isoliert. Die Reinheit der Proteine lag zwischen 70-95%, was zur Bestimmung ihrer HMT-Aktivität ausreichte.

Die gereinigten Proteine wurden mit verschiedenen Histonsubstraten und radioaktiv markiertem SAM inkubiert und ihre enzymatische Aktivität fluorographisch und quantitativ bestimmt (Abb. 2-22 und Abb. 2-23). CG5358 zeigte gegenüber rekombinantem H3 die höchste Aktivität. H3 in Oktameren wurde dagegen sehr viel geringer methyliert, oligonukleosomale Histone überhaupt nicht. Alle drei HMTn vermögen nicht, oligonukleosomale Histone zu methylieren. Offensichtlich verhindert die komplexierte DNA die Erkennung des Substrat-Histons oder die enzymatische Reaktion an sich. Im Gegensatz zu CG5358 methylierten CG6554 und CG6563 ihr Zielhiston H4 auch in Oktameren. Außerdem zeigten sie eine höhere Substratvariabilität. Beide konnten freies H2A ebenso effektiv markieren wie freies H4. Wenn aber alle Histone gemeinsam angeboten wurden, wurde H4 vorgezogen. CG6563 methylierte zusätzlich rekombinantes H3 signifikant.

Dieses Ergebnis überrascht, da Vertebratenenzyme Histone im Kontext von Chromatin methylieren, um die Transkription zu aktivieren (Strahl *et al.*, 2001). Vorausgesetzt, dass die identifizierten Proteine (zumindest CG5358 und CG6554) wie ihre Säugerhomologe bei diesem Prozess eine Rolle spielen, sollten sie in der Lage sein, Oligonukleosomen als Substrat zu erkennen und zu methylieren (siehe auch Diskussion). Die drei Proteine liefen in Gelfiltrationsläufen nicht als Monomer sondern bei höherem Molekulargewicht in Komplexen (Abb. 2-14, Abb. 2-15 und Abb. 2-17). So kann es möglich sein, dass weitere Komponenten der Komplexe für die Erkennung und Bindung von Nukleosomen zuständig sind. Bei einem Test verschiedener Fraktionen fortgeschrittener Reinigungsschritte, in denen diese

Komponenten noch vorliegen sollten, wurde jedoch bei keinem der drei Proteine HMT-Aktivität gegenüber Oligonukleosomen festgestellt (C. Beisel, Daten nicht gezeigt).

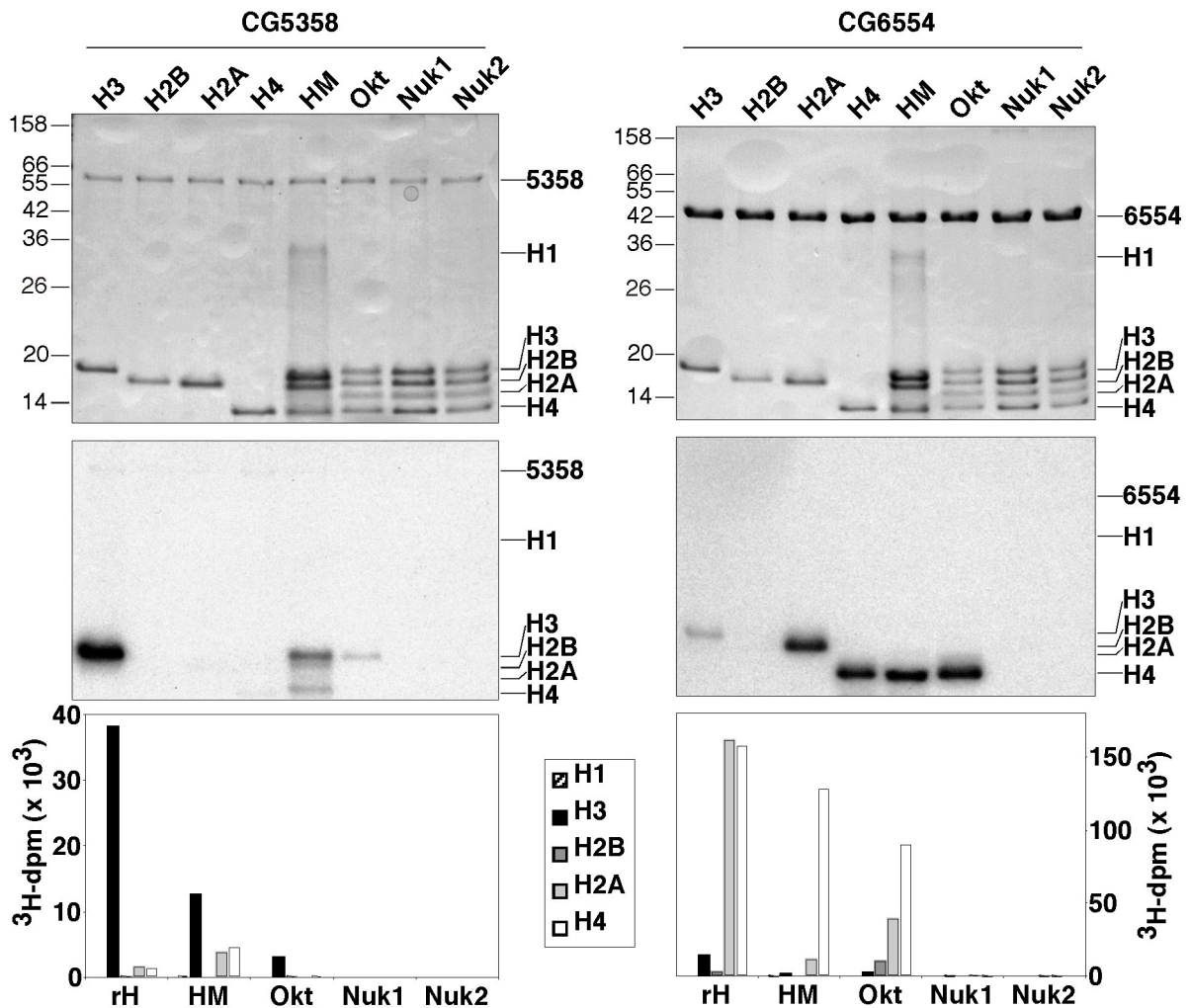
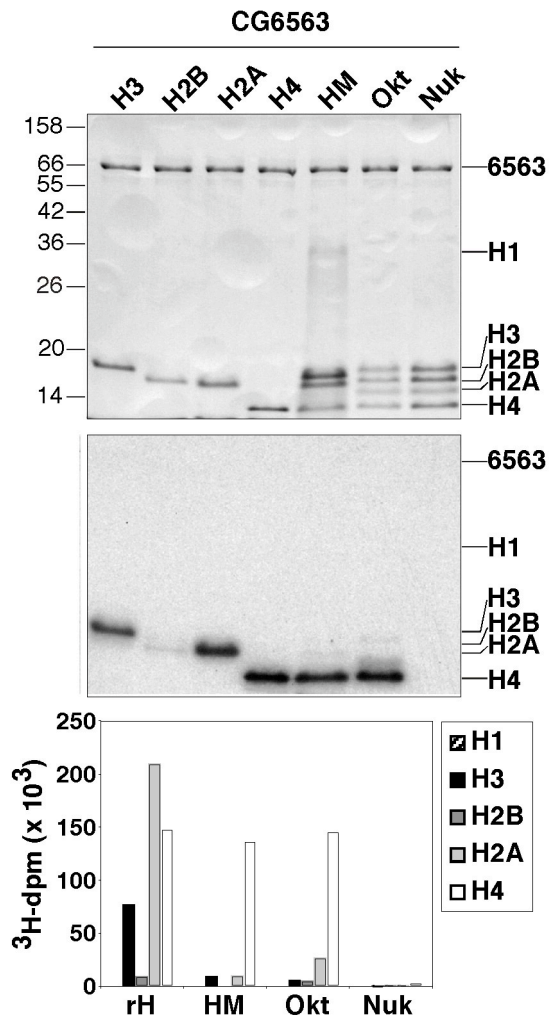


Abbildung 2-22. Charakterisierung der HMT-Aktivität von rekombinantem CG5358 und CG6554. Die Proteine wurden mit je 1 μg verschiedener Histonsubstrate (einzelne rekombinante Histone (rH) H3, H2B, H2A, oder H4, Histonmix (HM), aus *Drosophila* isolierte Histon-Oktamere (Okt) und zwei verschiedene Präparationen von Oligonukleosomen (Nuk1, Nuk2)) und 1 μCi [^3H]-SAM für 1 h bei 30°C inkubiert. Die HMT-Aktivität wurde fluorographisch und quantitativ bestimmt. Oben, Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgele der HMT-Aktivitätstests. Mitte, Fluorogramme. Unten, Quantifizierung der inkorporierten ^3H -markierten Methylgruppen. Für die Quantifizierung wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf PVDF-Membran transferiert und mit Coomassie angefärbt. Die Histonbanden wurden ausgeschnitten und die Aktivität im Szintillationszähler bestimmt. Links der Gele, relatives Molekulargewicht in kDa. Rechts, Markierung der Proteine.

Abbildung 2-23. Charakterisierung der HMT-Aktivität von rekombinatem CG6563. CG6563 wurde mit verschiedenen Histonsubstraten (einzelne rekombinante Histone (rH) H3, H2B, H2A, oder H4, Histonmix (HM), aus *Drosophila* isolierte Histon-Oktamere (Okt) und Oligonukleosomen (Nuk)) und 1 μCi [^3H]-SAM für 1 h bei 30°C inkubiert. Die HMT-Aktivität wurde fluorographisch und quantitativ bestimmt. Oben, Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Reaktionen. Mitte, Fluorogramm. Unten, Quantifizierung der inkorporierten ^3H -markierten Methylgruppen. Für die Quantifizierung wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf PVDF-Membran transferiert und mit Coomassie angefärbt. Die Histonbanden wurden ausgeschnitten und die Aktivität im Szintillationszähler bestimmt. Links des Gels, relatives Molekulargewicht in kDa. Rechts, Markierung der Proteine.



2.2.6.3 Monomer oder Oligomer?

Um herauszufinden, ob die rekombinanten Proteine als Monomere oder als Oligomere vorliegen, wurden Aliquots der gereinigten Proteine über eine analytische Gelfiltration aufgetrennt. In Übereinstimmung zu ihrer Identifizierung eluierten die drei Enzyme in oligomeren Komplexen, die ein weit höheres Molekulargewicht besitzen als die Monomere (Abb. 2-24). CG5358 eluierte bei etwa 420 kDa, CG6554 bei etwa 320 kDa und CG6563 bei etwa 300 kDa. Mit Ausnahme von CG5358 stimmen die Werte mit den früheren Beobachtungen überein. Aufgrund der Molekulargewichte der Proteine errechnet sich für CG6554 (43 kDa) ein oktameres und für CG6563 (60 kDa) ein pentamerer Komplex. Bei CG5358 erhält man bei Vergleich des Elutionsverhaltens des rekombinanten mit dem des gereinigten Proteins eine Diskrepanz von etwa 60 kDa. So läuft das rekombinante Proteine auf der Höhe eines hepta-

meren Homo-Oligomers während die früheren Ergebnisse auf ein Oktamer oder ein Heptamer mit zusätzlicher heterologen Untereinheit schließen lässt.

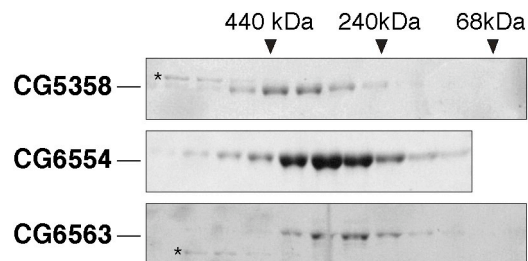


Abbildung 2-24. Die rekombinanten Proteine bilden homooligomere Komplexe. Aliquots der gereinigten Proteine wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend auf die analytische Gelfiltrationssäule Superdex200HR10/30 geladen. Die Säule wurde zuvor mit dem Laufpuffer (20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 0,25 mM EDTA, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, pH 7,9) äquilibriert. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Aliquots der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Oben ist das Elutionsprofil eines Gelfiltrationsstandards angegeben. * weist auf die Position von mitgereinigten Proteinkontaminanten hin.

2.3 Identifizierung und Charakterisierung lysinspezifischer HMTn

2.3.1 Identifizierung der SET-Proteine

Mit SUV39H1 (Mensch), Suv39h1 (Maus) und Clr4 (*S. pombe*) wurden von Rea *et. al.* drei Proteine der SU(VAR)3-9-Familie als HMTn identifiziert, die Histon H3 an Lysin 9 methylieren (Rea *et. al.*, 2000). Als katalytische Domäne wurde die SET-Domäne und flankierende cysteinreiche Regionen (Cys) identifiziert.

Durch eine Homologiesuche innerhalb des sequenzierten *Drosophila*-Genoms sollten weitere potentielle HMTn mit diesem Cys-SET-Cys-Sequenzmotiv identifiziert werden. Im Gegensatz zu der evolutionär konservierten SET-Domäne stellten die benachbarten cysteinreichen Regionen bis dahin noch uncharakterisierte Sequenzabschnitte dar. Daher wurde zunächst allein mit der Aminosäuresequenz der SET-Domäne von SUV39H1 eine Blast-Suche durchgeführt. Diese Suche ergab 18 *Drosophila*-Proteine (C. Beisel, Daten nicht gezeigt), deren Sequenzen anschließend visuell auf das Vorhandensein der cysteinreichen Regionen hin überprüft wurden. Durch diese Auslese wurden außer dem SUV39H1-Homologen SU(VAR)3-9 sechs weitere Proteine mit den gegebenen Charakteristika gefunden (Abb. 2-25 und Abb. 2-26).

Rea *et al.* konnten in ihrer Arbeit durch gezielte Deletionen und Punktmutationen innerhalb der SET-Domäne zwei Sequenzmotive identifizieren, die eine entscheidende Rolle für die HMT-Aktivität spielen. Veränderten sie das erste Histidin innerhalb des Motivs H□□NHSC (□: hydrophobe Aminosäure) zu einem Arginin, fanden sie eine erhöhte enzymatische Aktivität des Proteins. Interessanterweise tragen bis auf SU(VAR)3-9 alle gefundenen SET-Domänen-Proteine ein Arginin an dieser Stelle (Abb. 2-25). Die Sequenz NHSC, innerhalb derer die Mutationen H→K, H→L oder C→A zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität führten, ist bei allen hier identifizierten Proteinen vorhanden. Das zweite Sequenzmotiv, GEEL, dessen Deletion ebenfalls einen Verlust der HMT-Aktivität bewirkte, ist in allen SET-Domänen zumindest teilweise vorhanden.

	SET	PostSET
SUV39H1	311-DAAYYGNISHFVNHSCDPN-(25)-IRAGEELTFDY-(34)-CKCGTESCRKYL- 412	
SU(VAR)3-9	548-DAANYGNISHFINHSCDPN-(25)-IKAGEELSFYD-(20)-CRGGRDNCRKVLF- 635	
CG2995	1510-DANYYGNTVTRFFNHSCPEP-(25)-IDAGEEICFDY-(14)-CRCLTTTCKYASQ-1591	
CG12196	1182-DAKTTGNLGRYFNHSCSPN-(25)-IRSGTELTWNY-(13)-CQCAGPNCRLRLL-1262	
CG4976	1300-DAGPKGNLARFMNHSCPEP-(21)-IPVNSELTFNY-(12)-CFCGAKRCSGEIG-1375	
ASH1	1446-DGQRMGSDCRFVNHSCPEP-(21)-IEEGEELTYDY-(12)-CRCNTPQCRGVIG-1521	
CG1716	1477-DATSKGNISRYINHSCDPN-(21)-IQPGEEITFDY-(11)-CYCEAANCRGWIG-1551	
TRR	2229-DATLSGGLARYINHSCNPN-(21)-IYRGEELSYDY-(12)-CACGAPNCRKWMN-2304	
Consensus/60%	D-----R--NHSC-PN-(xx)-I--GEEL---Y-(xx)-C-CG---CRG-L-	

Abbildung 2-25. Sequenzanalyse von SUV39H1 und den identifizierten *Drosophila*-Proteinen. Dargestellt ist ein multiples Sequenzalignment aus dem COOH-terminalen Bereich der SET-Domäne und dem COOH-terminal benachbarten Cystein-Sequenzmotiv (PostSET-Domäne). Die nach Rea *et al.* (Rea *et al.*, 2000) für die HMT-Aktivität entscheidenden Sequenzmotive sind blau markiert (Erläuterungen hierzu siehe Text). Die Consensus(60 %)-Sequenz gibt an, welche Aminosäuren in 60 % aller SET- oder PostSET-Domänen vorkommen. Die entsprechenden Aminosäuren sind markiert. Links und rechts sind die Aminosäurepositionen innerhalb der Proteine angegeben.

Parallel zu dieser Arbeit wurden durch das SMART-Projekt (<http://smart.embl-heidelberg.de>, Schultz *et al.*, 1998) die beiden cysteinreichen Regionen auf Sequenzebene näher charakterisiert und in die SMART-Datenbank aufgenommen. Das COOH-terminale Sequenzmotiv, das außer den drei in einem bestimmten Abstand zueinanderliegenden Cysteinen weitere konservierte Aminosäuren enthält und insgesamt 17 Reste umfasst, wurde als PostSET-Domäne bezeichnet. Die in dieser Arbeit visuell identifizierten NH₂-terminalen cysteinreichen Regionen wurden allgemein als PreSET-Domäne bezeichnet und in zwei verschiedene Domänen aufgeteilt, deren Gemeinsamkeit das Vorhandensein von sieben hochkonservierten Cysteinen ist (Daten nicht gezeigt). SU(VAR)3-9, CG2995 und CG12196 tragen die etwa 100 Aminosäuren umfassende PreSET-Domäne, während CG4976, ASH1 und CG1716 die etwa halb so große AWS-(Associated With SET domains)-Domäne tragen (Abb. 2-26). Im Gegensatz hierzu wird der visuell identifizierten NH₂-terminalen cyteinreichen Region des Proteins Trithorax related (TRR) durch SMART keine der beiden Domänen zugeordnet. Hier befinden sich die gefundenen Cysteine innerhalb der FYRN-Domäne und in der von SMART nicht annotierten NH₂-terminal dazu gelegenen Region (Abb. 2-26).

Anhand der Bezeichnung der Proteine erkennt man, dass die Mehrzahl noch nicht näher charakterisiert war und dass deren Sequenz erst durch das Celera-Genomprojekt entschlüsselt wurde. ASH1 (Absent, Small or Homeotic discs 1) zählt zu der Gruppe der Trithorax-Proteine (trxG) und spielt bei der epigenetischen Genaktivierung eine Rolle (Shearn *et al.*, 1987; Shearn, 1989). Näheres zu dem Protein wird unter Punkt 2.4 erläutert. TRR, dessen Funktion

noch nicht näher charakterisiert ist, wurde als TRX-Homolog identifiziert (Sedkov *et al.*, 1999).

Zusätzlich zur SET-Domäne enthält jedes der Proteine mindestens eine weitere Domäne, die das jeweilige Protein mit Transkriptionsregulation oder chromatinabhängigen Prozessen in Zusammenhang bringt (Abb. 2-26). Ein Beispiel ist die MBD-Domäne („Methyl-CpG Binding Domain“) von CG12196, die das Protein als mögliches Bindeglied zwischen DNA- und Histon-Methylierung ausweist.

Aufgrund der aus der Domänenstruktur und, insofern bekannt, aufgrund der aus den genetischen und funktionalen Daten dieser potentiellen HMTn naheliegenden Beteiligung an genregulatorischen Prozessen, sollten die entsprechenden cDNAs kloniert, in *Sf9*-Zellen exprimiert und die identifizierten Cys-SET-Cys-Proteine auf HMT-Aktivität getestet werden.

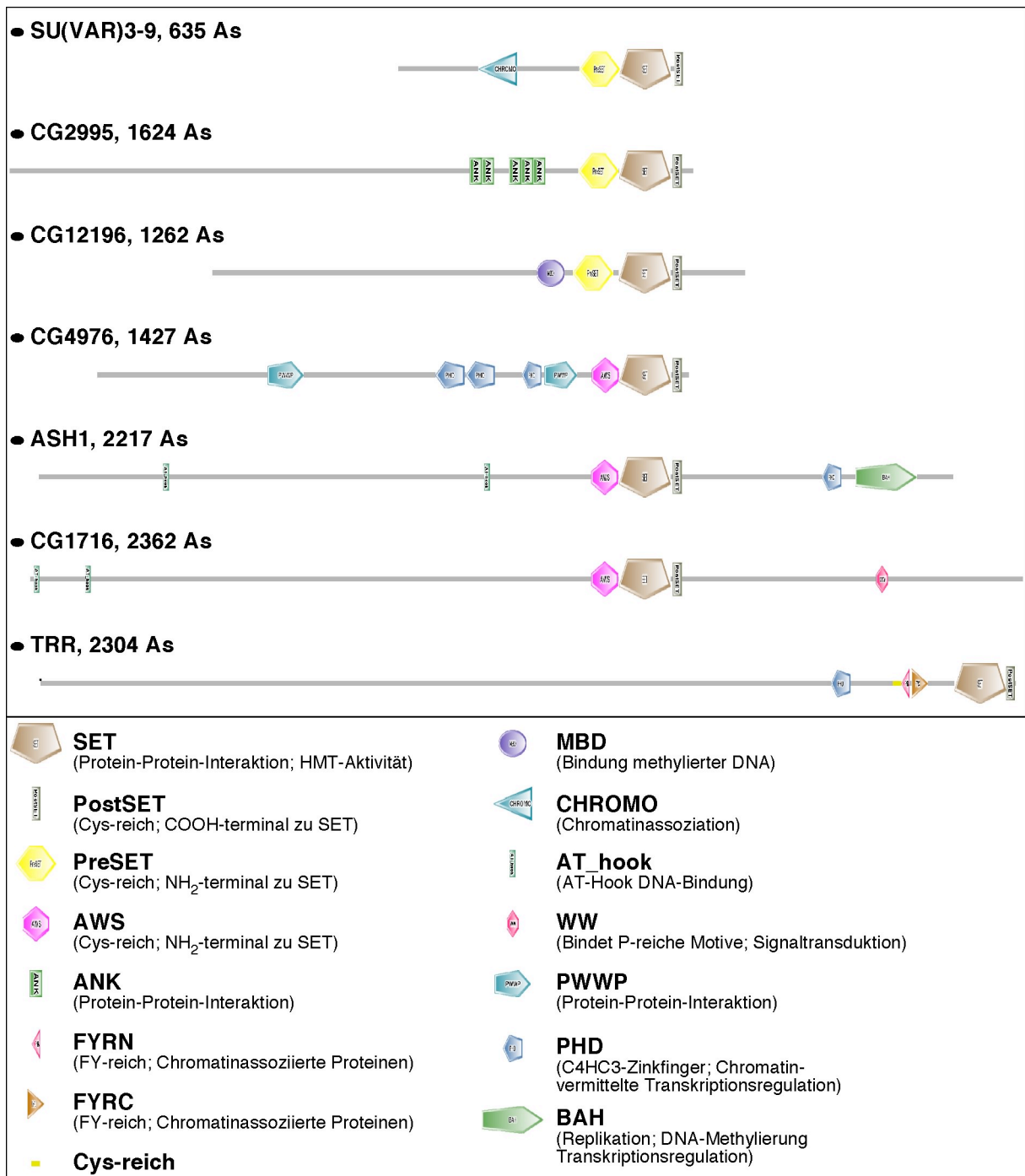


Abbildung 2-26. Schematische Darstellung von *Drosophila*-Cys-SET-Cys-Proteinen. Oben, Hinter dem Namen ist die Länge der Proteine in Aminosäuren (As) angegeben. Die Domänensymbole sind, bis auf die als Cys-reich bezeichnete Sequenz in TRR, der SMART-Datenbank (<http://smart.embl-heidelberg.de>) entnommen. Unten, Namen und Symbole der Proteindomänen. Charakteristika oder Funktionen der Domänen oder der Proteine, die diese Domänen tragen, sind angegeben.

2.3.2 Klonierung, Expression und Reinigung

Da bis auf SU(VAR)3-9 alle Proteine mit 1200-2400 Aminosäureresten sehr groß sind und daher eine geringe Expressionsrate der Volllängen-Produkte erwartet werden konnte, wurden zum Teil kleinere Fragmente kloniert, die die entscheidenden Domänen enthalten. Die cDNAs wurden über PCR aus RT-DNA, die durch reverse Transkription von embryonaler RNA gewonnen wurde, amplifiziert, wobei Restriktionsschnittstellen für die weitere Klonierung an das 5'- und 3'-Ende hinzugefügt wurden. Die hergestellten Konstrukte sind in Abb. 2-27 dargestellt.

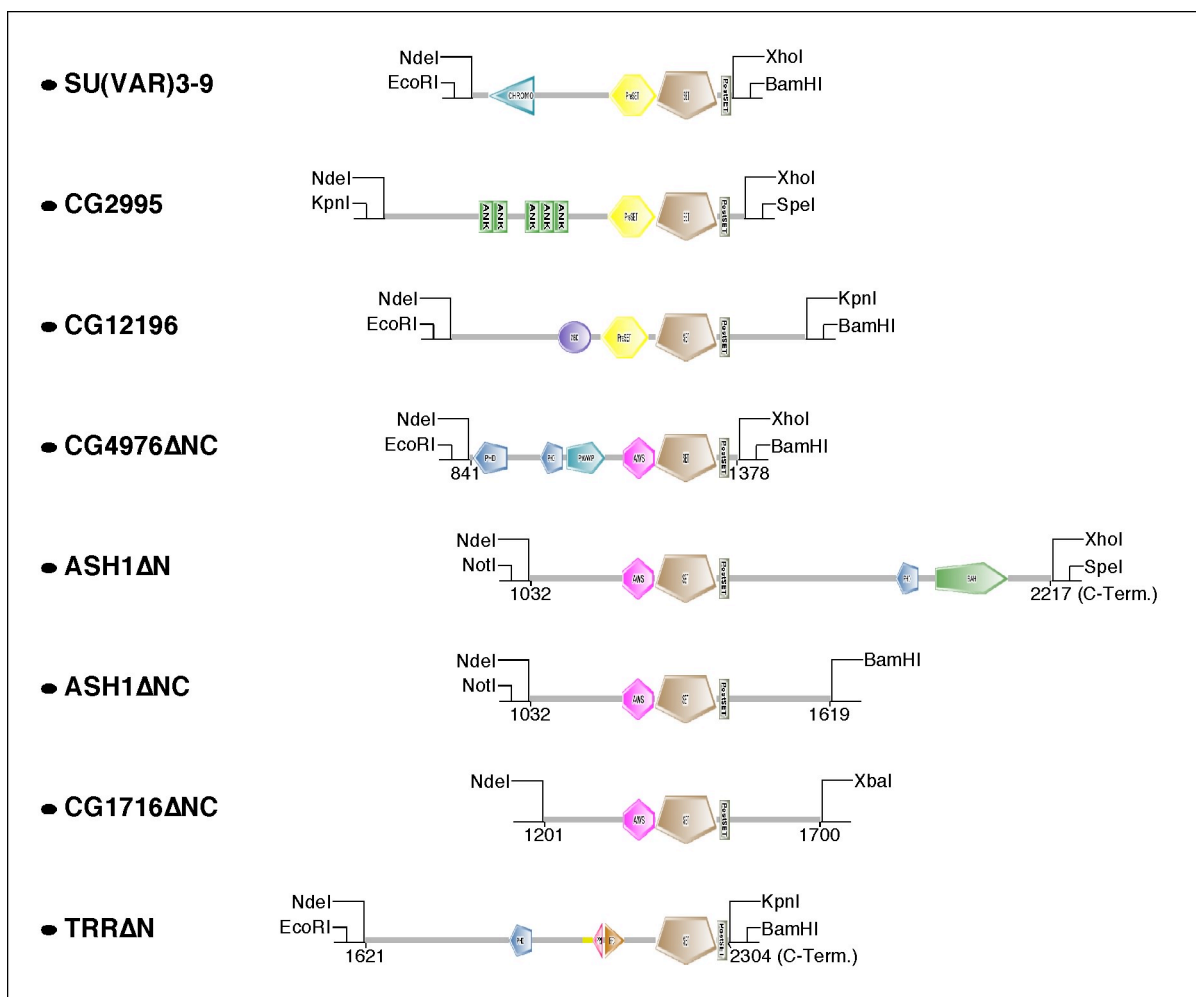


Abbildung 2-27. Schematische Darstellung der zu exprimierenden HMTn. Die mit der PCR an die cDNAs angefügten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Die Volllängen-Produkte von SU(VAR)3-9, CG2995 und CG12196 sind den anderen gegenüber verkürzt dargestellt. Die Domänenanordnung entspricht der aus Abb. 2-26. Bei den Nicht-Volllängen-Konstrukten sind die Aminosäurepositionen des Anfangs und des Endes angegeben.

Für SU(VAR)3-9, CG2995 und CG12196 wurden die Vollängenprodukte amplifiziert. SU(VAR)3-9 wurde in pBluescript und CG12196 und CG2995 in pCRIITopo kloniert. ASH1 und TRR wurden als NH₂-terminale Deletionen gewonnen (ASH1ΔN, TRRΔN), während bei CG4976 und CG1716 sowohl auf den NH₂- als auch auf den COOH-Terminus verzichtet wurde (CG4976ΔNC, CG1716ΔNC). ASH1ΔN und TRRΔN wurden in pBluescript inseriert. Aus dem pBluescriptASH1ΔN-Klon wurde ein weiteres kleineres Fragment, ASH1ΔNC, mit PCR hergestellt (Abb. 2-27). CG4976ΔNC und CG1716ΔNC wurden direkt in einen Expressionsvektor inseriert. Für die Produktion der anderen Proteine wurden, bis auf SU(VAR)3-9, alle Konstrukte in pVLFlag kloniert, einem Vektor, mit dem rekombinante Baculoviren für die Expression in *Sf9*-Zellen produziert werden. Durch Insertion in pVLFlag werden die Proteine NH₂-terminal mit der Sequenz des Flag-Epitops fusioniert (Flag-markiert). Vollängen-SU(VAR)3-9 wurde in *E. coli* mit pet19b exprimiert, der das Protein NH₂-terminal mit einem Polyhistidinschwanz markiert (His₁₀-markiert).

Alle Proteine wurden über einen einmaligen Affinitätsschritt gereinigt, die Flag-markierten Proteine durch an Agarose-gekoppelte spezifische M2-Antikörper (M2-Agarose, Sigma), der gegen das Flag-Epitop gerichtet ist und His₁₀-markiertes SU(VAR)3-9 durch Ni²⁺-beladene „Chelating-Sepharose“ (Amersham). Coomassiegefärbte SDS-Polyacrylamidgele der gereinigten Proteine sind in Abb. 2-28 gezeigt. Auf dem mit HisSU(VAR)3-9 beladenen SDS-Polyacrylamidgel sind noch zwei weitere Banden zu sehen, bei denen es sich um Translationsabbruchprodukte der Expression handelt. Während die Präparationen von CG1716ΔNC und CG4976ΔNC sehr sauber sind, zeigen die Reinigungen der ASH1-Derivate auf den ersten Blick keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Bei den scheinbaren Kontaminanten handelt es sich jedoch um Translationsabbrüche, da die Banden auch mit einem M2-Antikörper erkannt werden.

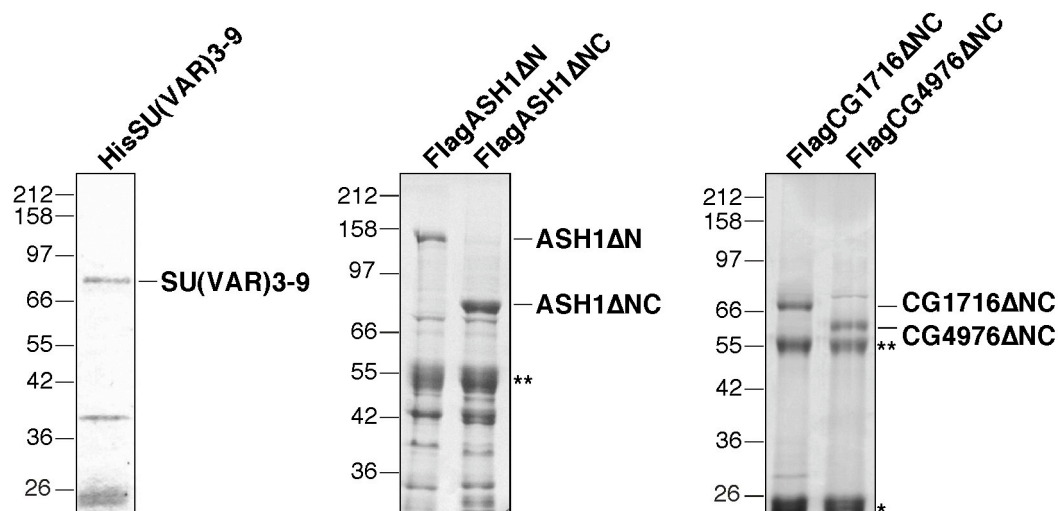


Abbildung 2-28. Expression und Reinigung von SET-Domänen-Proteinen. HisSU(VAR)3-9 wurde mit pet19b in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung des nativen Proteins erfolgte über Ni²⁺-Affinitätschromatographie mit „Chelating-Sepharose“. Die Flag-markierten Proteine wurden aus dem *Sf9*-Zellextrakt an M2-Agarose immobilisiert und intensiv mit 0,5 M NaCl, HEMG, pH 7,6 gewaschen. Die M2-Agarose wurde direkt mit Proteingelprobenpuffer versetzt, aufgekocht und die Lösung auf das SDS-Polyacrylamidgel geladen. **, schwere Antikörperkette. *, leichte Antikörperkette. Die Banden der rekombinanten Proteine sind markiert. Links, relatives Molekulargewicht in kDa.

2.3.3 HMT-Aktivität von SU(VAR)3-9

Für die Säuger- und Hefe-Homologe von SU(VAR)3-9 wurde, wie oben schon beschrieben, eine HMT-Aktivität gegenüber Histon H3 festgestellt (Rea *et al.*, 2000). Im Folgenden sollte herausgefunden werden, ob auch das rekombinante *Drosophila*-Protein diese Aktivität aufweist. Das gereinigte Protein wurde mit verschiedenen Histonsubstraten und [³H]-SAM inkubiert und die Reaktionen anschließend durch Fluorographie analysiert (Abb. 2-29).

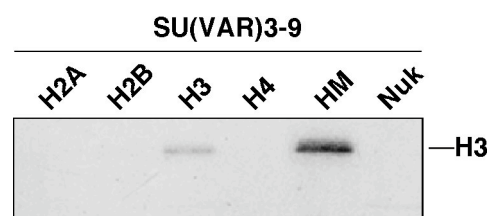


Abbildung 2-29. Drosophila-SU(VAR)3-9 methyliert Histon H3. Fluorogramm von HMT-Aktivitätstests. Je 1 μg Einzelhistone von Roche (H2A, H2B, H3, H4), Histonmix (HM) oder Oligonukleosomen (Nuk) wurden mit 1 μg HisSU(VAR)3-9 und 1 μCi [³H]-SAM in HMT-Puffer für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und radioaktiv markierte Proteine fluorographisch detektiert. Histon H3 ist markiert.

Wie erwartet, methyliert *Drosophila* SU(VAR)3-9 wie seine Homologe Histon H3. Auffällig ist, dass in Oligonukleosomen komplexiertes H3 nicht methyliert wird.

2.3.4 HMT-Aktivität von CG4976

Flag-markiertes CG4976 Δ NC wurde immobilisiert an der M2-Agarose direkt nach der Reinigung aus dem *Sf9*-Zellextrakt für die HMT-Reaktionen verwendet. Die Ergebnisse der Reaktionen, in denen wiederum verschiedene Histonsubstrate verwendet wurden, zeigen, dass auch CG4976 eine HMT ist (Abb. 2-30). Das Protein methyliert rekombinantes H3 und in geringem Ausmaß H4. Auch bei den aus *Drosophila* gereinigten Histonoktameren und dem Histongemisch aus Rind werden beide Histone markiert. Bei Quantifizierung der Signale ergibt sich für deren Stärke bei den Oktameren ein Verhältnis H3:H4 von etwa 6:1. Erst durch Quantifizierung der Signale ist zu erkennen, dass auch in Oligonukleosomen komplexierte Histone als Substrat für CG4976 dienen (Abb. 2-30C).

Auf dem Fluorogramm ist dagegen keine Bande zu sehen. Auf der Höhe von FlagCG4976 Δ NC wird eine schwache Bande detektiert, was auf eine Automethylierung des Proteins hinweist.

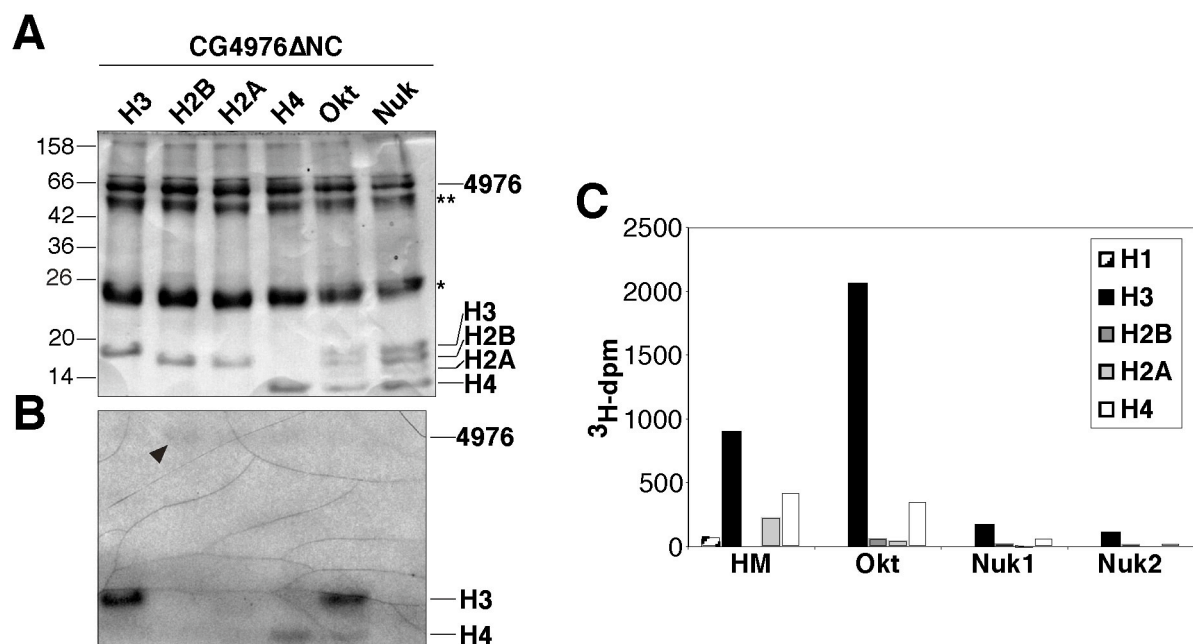


Abbildung 2-30. Charakterisierung der HMT-Aktivität von CG4976. Flag-markiertes CG4976 Δ NC wurde mit Hilfe von M2-Agarose aus *Sf9*-Zellen isoliert, die mit rekombinantem Baculovirus infiziert waren. Pro Reaktion wurden 20 μ l der Proteinmatrix (1-2 μ g immobilisiertes Protein) mit 1 μ g rekombinanten Histonen (H3, H2B, H2A, H4), Histonoktameren (Okt) oder Oligonukleosomen (Nuk) und 1 μ Ci [3 H]-SAM in HMT-Puffer für 1 h bei 30 °C inkubiert. (A) Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der HMT-Aktivitätstests. Links, relatives Molekulargewicht in kDa. Die Histonbanden und FlagCG4976 Δ NC sind markiert. **, schwere Antikörperkette. *, leichte Antikörperkette. (B) Fluorogramm der HMT-Aktivitätstests. Automethyliertes FlagCG4976 Δ NC (Pfeilkopf) und H3, H4 sind markiert. (C) Quantifizierung der inkorporierten 3 H-markierten Methylgruppen mittels Szintillationszähler wie in Abb. 2-23 beschrieben.. HM, Histonmix. Nuk1, Nuk2, zwei verschiedene Oligonukleosomenpräparationen.

2.3.5 HMT-Aktivität von CG1716

Im Gegensatz zu CG4976 zeigt das Flag-markierte CG1716-Konstrukt eine starke enzymatische HMT-Aktivität gegenüber Oligonukleosomen, wobei Histon H3 methyliert wird (Abb. 2-31). Zur Kontrolle wurden Oligonukleosomen aus zwei verschiedenen Präparationen verwendet, die auch ohne FlagCG1716 Δ NC mit [3 H]-SAM inkubiert wurden, hier aber keine Aktivität einer möglichen Proteinkontaminanten zeigen. Desweiteren wird H3 signifikant im Histonmix und in den Oktameren methyliert, während freies rekombinantes H3 auf dem Fluorogramm nicht detektiert wird. Bei der Quantifizierung erhält man für das rekombinante Histon einen Wert von 800 dpm während beim Histonmix, bei den Oktameren und Oligonukleosomen Werte von 11000 bis 116000 dpm gemessen werden. Bei den starken Banden unterhalb von H3 auf dem Fluorogramm handelt es sich wohl um ein Artefakt, das während der Fluorographie entstand, denn bei der Quantifizierung konnten diese nicht bestätigt werden. Auf der Höhe des Flag-markierten CG1716 Δ NC-Proteins ist auf dem Fluorogramm kein Automethylierungssignal zu erkennen.

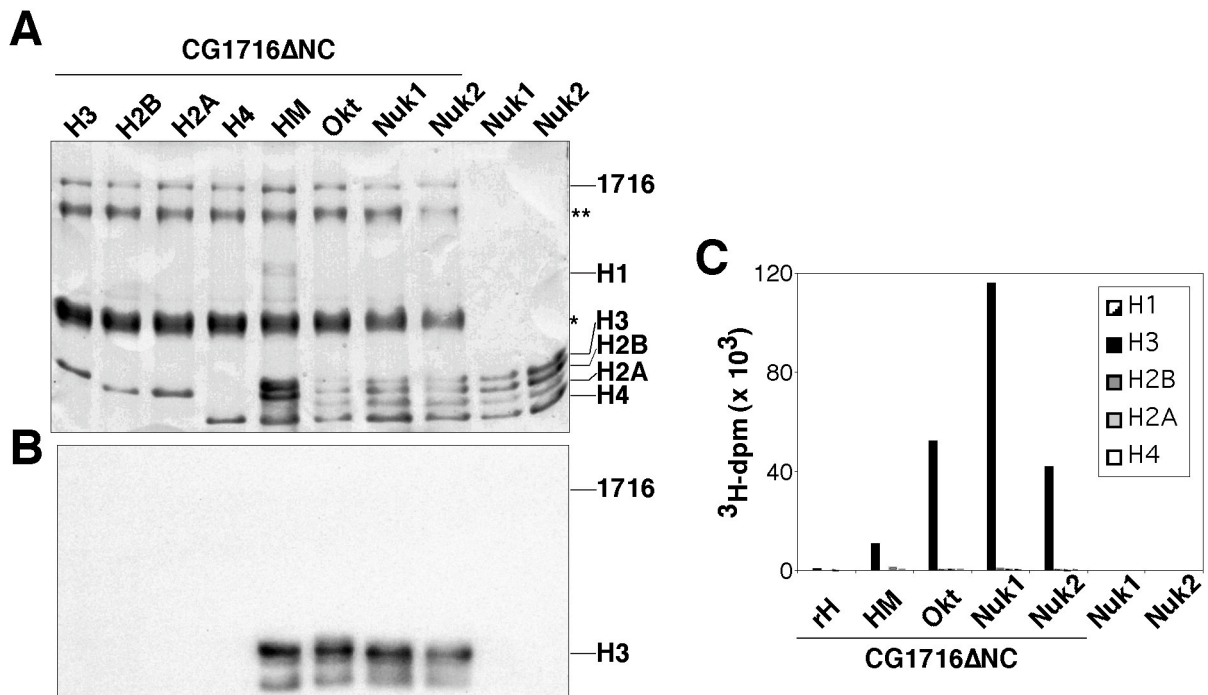


Abbildung 2-31. Charakterisierung der HMT-Aktivität von CG1716. Flag-markiertes CG1716ΔNC wurde mit Hilfe von M2-Agarose aus *Sf9*-Zellen isoliert, die mit rekombinarem Baculovirus infiziert waren. Pro Reaktion wurden 10 μl der Proteinmatrix (0,5-1 μg immobilisiertes Protein) mit 1 μg rekombinanten Histonen (H3, H2B, H2A, H4), Histonmix (HM), Histonoktameren (Okt) oder zwei verschiedene Präparationen von Oligonukleosomen (Nuk1, Nuk2) und 1 μCi [^3H]-SAM in HMT-Puffer für 1 h bei 30 °C inkubiert. (A) Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der HMT-Aktivitätstests. Die Histonbanden und FlagCG1716ΔNC sind markiert. **, schwere Antikörperkette. *, leichte Antikörperkette. (B) Fluorogramm der HMT-Aktivitätstests. H3, H4 sind markiert. (C) Quantifizierung der inkorporierten ^3H -markierten Methylgruppen mittels Szintillationszähler wie in Abb. 2-23 beschrieben.

2.3.6 HMT-Aktivität von ASH1

Für ASH1 wurden zwei verschiedene Derivate hergestellt (ASH1ΔN, ASH1ΔNC), die sich in der Länge unterscheiden, aber beide die zu untersuchenden Domänen tragen (Abb. 2-27). Beide zeigen HMT-Aktivität gegenüber H3 und eine verminderte Aktivität gegenüber H4, wie es auch bei CG4976 der Fall ist. Die Ergebnisse für ASH1ΔNC sind in Abb. 2-32 dargestellt, für Ash1ΔN in Abb. 2-34. ASH1 methyliert die Histone sowohl als einzelne, rekombinante Proteine, als auch in *Drosophila*-Oktameren und Oligonukleosomen. Desweiteren zeigen die ASH1-Konstrukte Automethylierungsaktivität (Abb. 2-32B und Abb. 2-33B).

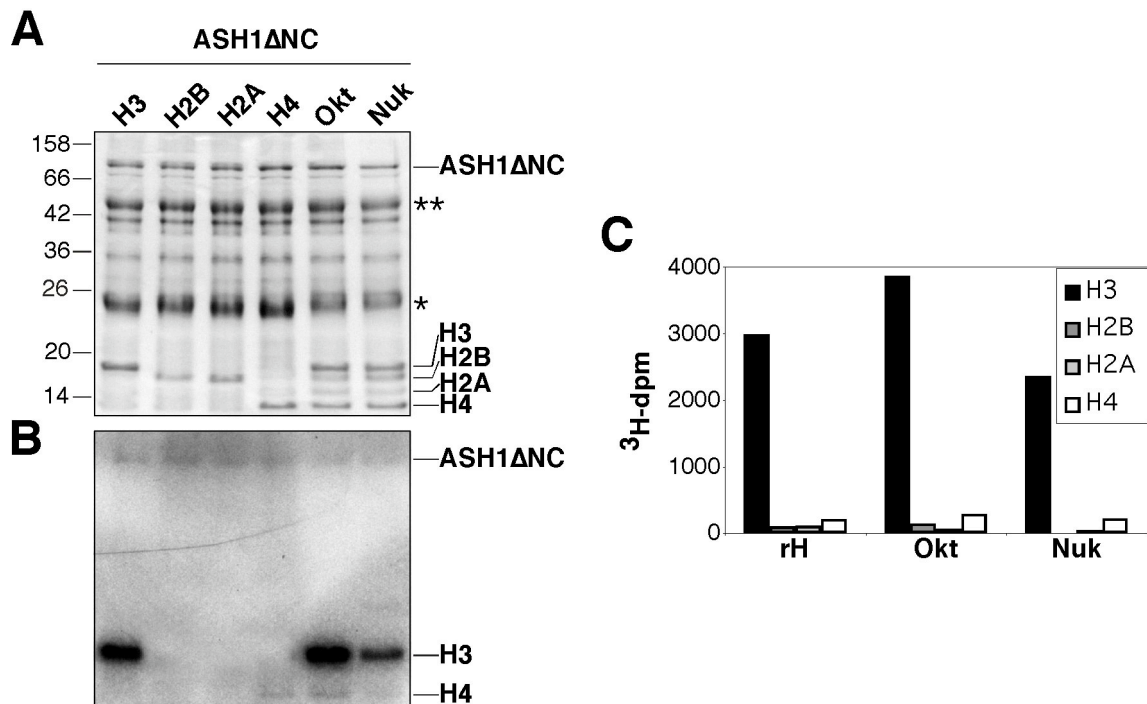


Abbildung 2-32. ASH1 methyliert H3 und H4. Flag-markiertes ASH1ΔNC wurde mit Hilfe von M2-Agarose aus *Sf9*-Zellen isoliert, die mit rekombinantem Baculovirus infiziert waren. Pro Reaktion wurden 10 μl der Proteinmatrix (0,5-1 μg immobilisiertes Protein) mit 1 μg rekombinanten Histonen (H3, H2B, H2A, H4), Histonoktameren (Okt) oder Oligonukleosomen (Nuk) und 1 μCi [³H]-SAM in HMT-Puffer für 1 h bei 30 °C inkubiert. (A) Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der HMT-Aktivitätstests. Die Histonbanden und FlagCASH1ΔNC sind markiert. **, schwere Antikörperkette. *, leichte Antikörperkette. (B) Fluorogramm der HMT-Aktivitätstests. Automethyliertes FlagASH1ΔNC und H3, H4 sind markiert. (C) Quantifizierung der inkorporierten ³H-markierten Methylgruppen mittels Szintillationszähler wie in Abb. 2-23 beschrieben.

Um herauszufinden welche Aminosäurereste ASH1 methyliert, wurde radioaktiv markiertes H3 und H4 nach der Edman-Methode NH₂-terminal abgebaut (Midwest Analytical, Inc., St. Louis) und die einzelnen Aminosäurefraktionen im Szintillationszähler analysiert. Die Auswertung ergab für H3 eine radioaktive Markierung der Lysine an Position 4 und 9 (K4, K9) (Abb. 2-33A). Das K4-Signal ist schwächer als das von K9, aber signifikant, da es sich klar vom Hintergrundsignal der ersten drei Aminosäuren abhebt und in den Fraktionen 5-8 höhere Werte gezählt werden als vor K4. Dieses typische Muster zeigt sich auch bei K9, da die Abspaltung der Aminosäuren beim Edman-Abbau nicht hundertprozentig abläuft und dadurch Radioaktivität in die nächsten Fraktionen verschleppt wird.

Um dieses Ergebnis zu unterstützen, wurden mit ASH1ΔN HMT-Reaktionen mit synthetisch hergestellten Peptiden durchgeführt, die aus den NH₂-terminalen Aminosäuren 1-20 von H3 aufgebaut waren, wobei ein Peptid der ursprünglichen Wildtyp-H3-Sequenz entsprach

(H3-wt) und bei den beiden anderen K4 oder K9 durch Leucin ersetzt wurde (H3-K4L bzw. H3-K9L) (Abb. 2-33C). Die Reaktionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie analysiert (Abb. 2-33B). ASH1 Δ N methylierte das H3-wt-Peptid. Die Aktivität gegenüber H3-K4L war schwächer und bei H3-K9L wurde nur ein sehr schwaches Signal detektiert. Dieses Ergebnis spiegelt das des radioaktiven Edman-Abbaus wider, in dem auch eine stärkere Aktivität gegenüber K9 gemessen wurde.

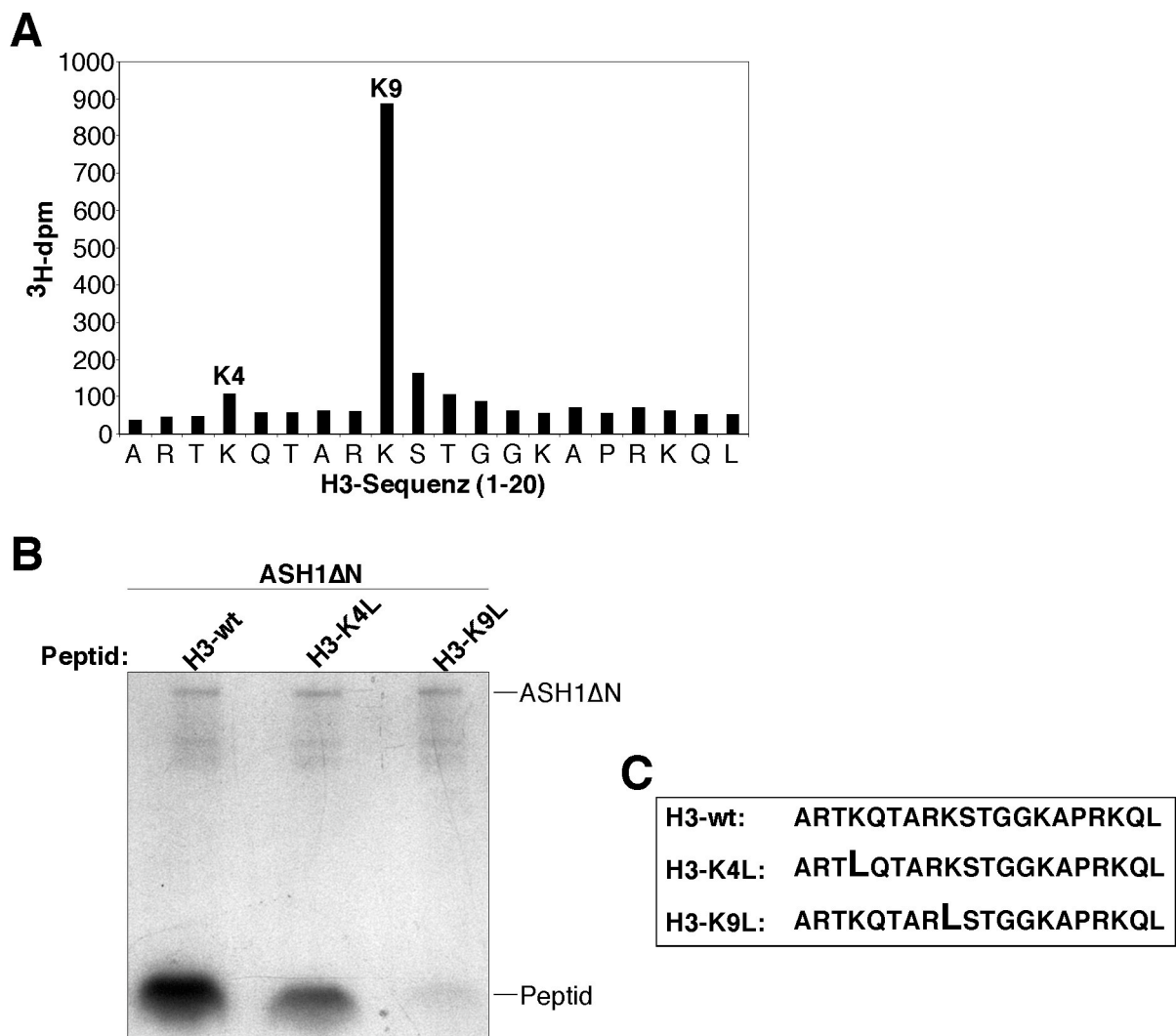


Abbildung 2-33. ASH1 methyliert K4 und K9 in Histon H3. Radioaktiv markiertes Histon H3 wurde nach SDS-PAGE auf PVDF-Membran transferiert, mit Coomassie gefärbt und ausgeschnitten. Das auf der Membran immobilisierte Protein wurde bei Midwest Analytical einem Edman-Abbau unterzogen. Die Aminosäurefraktionen wurden im Szintillationszähler analysiert und deren Aktivität in (A) über der NH₂-terminalen Aminosäuresequenz von H3 aufgetragen. (B) Fluorogramm von HMT-Reaktionen mit FlagASH1 Δ N und den in (C) angegebenen Peptiden. Je 5 μ g der Peptide wurden mit 10 μ l M2-Agarose mit immobilisiertem FlagASH1 Δ N (0,5-1 μ g) und 5 μ Ci [³H]-SAM in HMT-Puffer für 3 h bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden auf einem 16 %-Tricin-Gel (Invitrogen) getrennt und durch Fluorographie analysiert.

Für Histon H4 wurde durch den radioaktiven Edman-Abbau kein aussagekräftiges Ergebnis generiert. H4 ist NH₂-terminal acetyliert und somit für den Edman-Abbau blockiert. Daher wurde die Acetylgruppe zuvor abgespalten (Sobel *et al.*, 1994; Axel Imhof, persönliche Mitteilung). Aufgrund der geringen Markierung von H4 und der geringen Abspaltungseffizienz der Acetylgruppen konnten mittels der Szintillationsmessung jedoch keine radioaktiven Aminosäuren in den Edman-Fractionen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bekannte Methylierungsstellen von H4 *in vivo* sind Arginin an Position 3 (R3) und K20. Um die Methylierungsstelle von ASH1 in H4 zu identifizieren, wurde parallel zu dieser Arbeit ein Antikörper verwendet, der dimethyliertes H4-K20 erkennt (Beisel *et al.*, 2002). Western-Blot-Untersuchungen zeigen, dass dieser Antikörper das von ASH1 methylierte H4 erkennt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass ASH1 H3-K4, H3-K9 und H4-K20 methylieren kann.

2.3.7 Zusammenfassung: SET-Domänen-Proteine

In Tab. 2-3 werden alle Ergebnisse bezüglich der HMT-Aktivität der unter Punkt 2.3.1 identifizierten *Drosophila*-SET-Domänen-Proteine zusammengefasst. Die klonierten Konstrukte von CG12196 und TRR wurden in einer Masters-Arbeit exprimiert und auf HMT-Aktivität getestet (Mora-Bermúdez, 2002). Die Daten sind in Tab. 2-3 aufgenommen.

Tabelle 2-3. Zusammenfassung der HMT-Aktivitäten der SET-Domänen-Proteine

SET-Protein	SMART-Domänen ^a	rH	HM	HMT-Spezifität ^b		Aa
				Okt	Nuk	
SU(VAR)3-9	Pre-SET-Post	H3	H3	nd	-	H3-K9 ^c
CG2995 ^d	Pre-SET-Post	nd	nd	nd	nd	nd
CG12196 ^e	Pre-SET-Post	nd	H3	H3	H3 ^f	H3-K9
CG4976	AWS-SET-Post	H3, H4	H3, H4	H3,H4	H3 ^f ,H4 ^f	nd
CG1716	AWS-SET-Post	-	H3	H3	H3	nd
ASH1	AWS-SET-Post	H3, H4	H3 ^g , H4 ^g	H3, H4	H3, H4	H3-K4/9 H4-K20 ^h
TRR ^e	SET-Post	nd	H3	H3	H3 ^f	H3-K4

^aPre, PreSET. Post, PostSET. AWS, Associated with SET domains. ^brH, rekombinante Histone. HM, Histonmix (Sigma). Okt, aus *Drosophila*-Embryonen gereinigte Histonoktamere. Nuk, aus *Drosophila*-Embryonen gereinigte Oligonukleosomen. Aa, Methylierte Aminosäure. ^cCzermin *et al.*, 2001. ^dCG2995 wurde nicht weiter bearbeitet. Aufgrund der Domänenstruktur handelt es sich um das Homolog der HMT G9a (Mensch) (C. Beisel, Daten nicht gezeigt). G9a methyliert H3-K9 und H3K27 (Tachibana *et al.*, 2001). ^eHMT-Aktivität wurde in einer Masters-Arbeit (Mora-Bermúdez, 2002) bestimmt. ^fMethylierungssignal sehr gering. Es wurde nur durch Quantifizierung und nicht über Fluorographie detektiert. ^gDaten nicht gezeigt. ^hBeisel *et al.*, 2002. -, keine Aktivität detektiert. nd, Reaktion nicht durchgeführt.

2.4 ASH1-HMT-abhängige Transkriptionsaktivierung

Mit ASH1 wurde ein Protein der Trithorax-Gruppe (trxG) als HMT identifiziert (Shearn *et al.*, 1987; Shearn, 1989). Mutationen in *ash1* führen zu homöotischen Transformationen in verschiedenen Imaginalscheiben der *Drosophila*-Larve. ASH1 wirkt als Aktivator epigenetisch regulierter Transkription. Da im Gegensatz zur epigenetischen Repression über die Funktion von lysinspezifischer Histonmethylierung bei der epigenetischen Transaktivierung noch nichts bekannt war, wurde untersucht, ob ASH1-vermittelte Histonmethylierung an epigenetischer Transkriptionsaktivierung beteiligt ist.

Die Allele *ash1¹⁰* und *ash1²¹* tragen Punktmutationen im Bereich der SET- bzw. der AWS-Domäne, die in hemizygoter Ausprägung im Puppenstadium lethal sind oder als Doppelheterozygote mit *trithorax*- oder *brahma*-Nullallelen zu homöotischen Transformationen führen (Tripoulas *et al.*, 1996). Das Allel *ash1¹⁰* trägt den Aminosäureaustausch N1458I innerhalb des hochkonservierten und für die HMT-Aktivität von SUV39H1 notwendigen Motivs NHSC der SET-Domäne (Rea *et al.*, 2000), *ash1²¹* trägt einen Austausch einer ebenfalls hochkonservierten Aminosäure in der AWS-Domäne, E1357K (Abb. 2-34).

Um herauszufinden, ob diese Allele die HMT-Aktivität von ASH1 beeinflussen, wurden die Mutationen durch gerichtete Mutagenese in ASH1 Δ N eingeführt und die mutanten Proteine, ASH1¹⁰ Δ N und ASH1²¹ Δ N, in *Sf9*-Zellen exprimiert. Ferner wurde eine dritte Mutante, ASH1-H1459K- Δ N, exprimiert, die den Aminosäureaustausch H1459K trägt, der in SUV39H1 zu einer Verminderung der HMT-Aktivität führt (Rea *et al.*, 2000).

ASH1 Δ N methyliert, wie das zuvor in Abb. 2-32 gezeigte kleinere Konstrukt ASH1 Δ NC, H3 und zu einem geringeren Ausmaß H4 sowohl in rekombinanter Form als auch in Histonoktameren und in Oligonukleosomen komplexiert (Abb. 2-34). Die HMT-Aktivität der mutanten Proteine wurde mit Oligonukleosomen getestet. ASH1¹⁰ Δ N zeigt eine etwa um 35 % und ASH1-H1459K- Δ N eine um 85 % verminderte Aktivität (Abb. 2-34, ASH1²¹ Δ N siehe Beisel *et al.*, 2002).

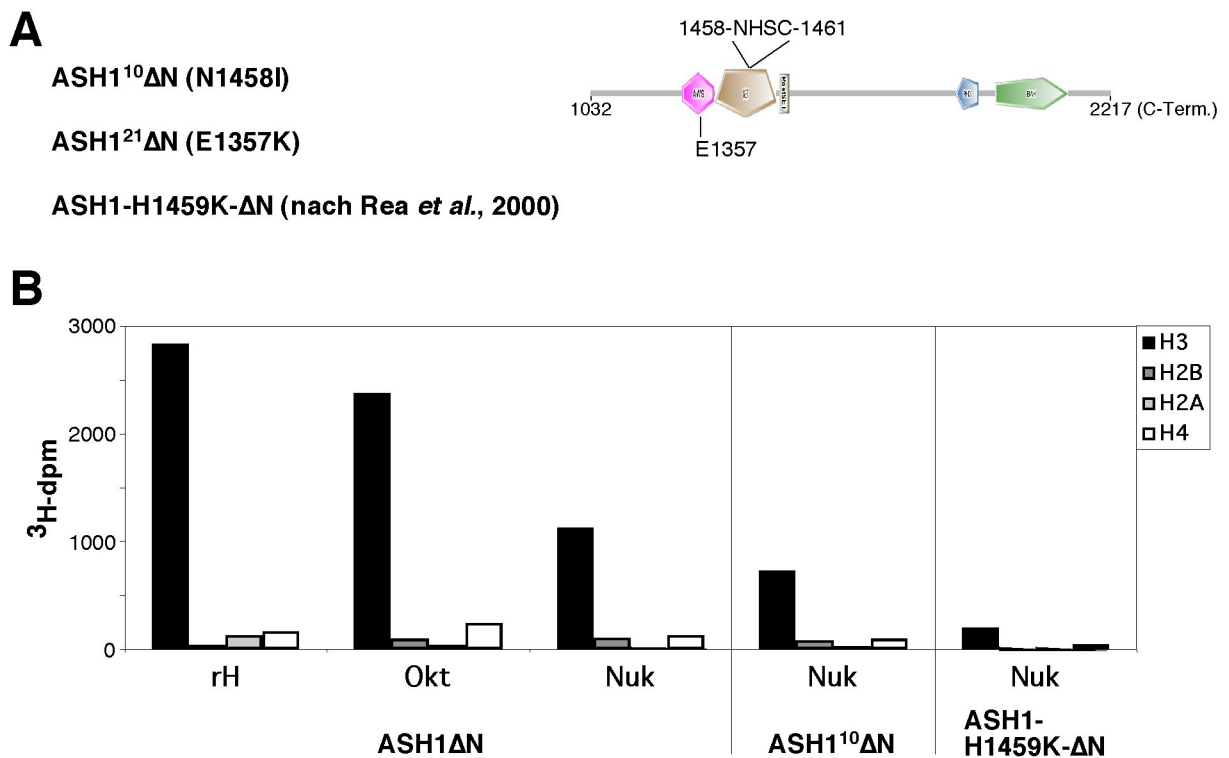


Abbildung 2-34. Mutationen in der SET-Domäne beeinflussen die HMT-Aktivität von ASH1. (A) Schematische Darstellung von ASH1ΔNC und der Position der Mutationen. E1357 liegt in der AWS-Domäne, die beiden anderen Austausche innerhalb des hochkonservierten NHSC-Motivs der SET-Domäne. Die Nummern geben die Aminosäurepositionen innerhalb des ASH1-Volllängen-Proteins an. (C) Darstellung von HMT-Aktivitätstests mit ASH1ΔN, ASH1¹⁰ΔN und ASH1-H1459K-ΔN. Die Proteine wurden als Flag-markierte Fusionen in *Sf9*-Zellen exprimiert und mit M2-Agarose aus dem Zellextrakt affinitätsgereinigt. Die immobilisierten Proteine wurden direkt nach der Reinigung für die HMT-Reaktionen eingesetzt. Für jede Reaktion wurden 10 μl mit Protein gesättigte Matrix, 1 μCi [³H]-SAM und je 1 μg folgender Histonsubstrate eingesetzt: rekombinante einzelne Histone (rH) H3, H2B, H2A, oder H4, Histonoktamere (Okt) oder Oligonukleosomen (Nuk). Die Reaktionen wurden für 1 h bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt, auf PVDF-Membran transferiert, mit Coomassie gefärbt und die ausgeschnittenen Histonbanden in einem Szintillationszähler ausgewertet.

Die Inaktivierung der Proteine kann einerseits aus einer spezifischen Störung innerhalb des katalytischen Zentrums resultieren, andererseits könnten die Aminosäureaustausche auch zu einer veränderten Struktur und damit zu einem globalen Funktionsverlust des Proteins geführt haben. Die Frage nach der strukturellen Integrität der ASH1ΔN-Konstrukte sollte über die Interaktion mit einem bekannten Interaktionspartner beantwortet werden. Rozovskaia *et al.* identifizierten Trithorax (TRX) als ASH1-interagierendes Protein und grenzten die Interaktionsdomänen der beiden Proteine auf die SET-Domänen ein (Rozovskaia *et al.*, 1999).

Die Interaktion wurde mit einem in *E.coli* exprimierten TRX-Derivat (Aminosäuren 3389-3759), das die SET-Domäne enthält und NH₂-terminal mit GST fusioniert ist (GST-TRX) und in Gegenwart von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatierten ASH1ΔN-Proteinen durch-

geführt. Sowohl ASH1 Δ N-Wildtyp als auch die Mutanten interagieren mit GST-TRX, woraus geschlossen werden konnte, dass die Mutationen nicht zu einem globalen Funktionsverlust der Proteine führen (Abb. 2-35 und Beisel *et al.*, 2002).

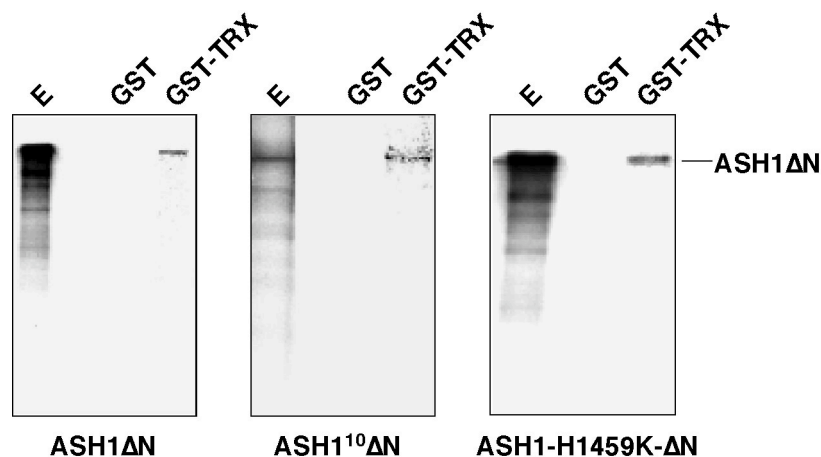


Abbildung 2-35. Die ASH1-Mutanten interagieren mit TRX. GST-TRX(3389-3759) und GST wurden in *E. coli* exprimiert und mit GSH-Sepharose aus dem Extrakt affinitätsgereinigt. Je 1 μ g von GST-TRX und 2 μ g von GST wurden direkt für die Interaktionsansätze verwendet. Die *ash1* Δ N-Konstrukte wurden in pT \square Stop kloniert und mit dem „TNT T7 coupled transcription-translation reticulocyte lysate system“ (Promega) in Anwesenheit von 35 S-Methionin *in vitro* exprimiert. Aus diesen Ansätzen wurden 5 μ l in 500 μ l Bindungspuffer (20 mM Tris, pH 8, 0,2 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,2 mM PMSF) gelöst und die GSH-Sepharose mit den immobilisierten Proteinen zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde anschließend dreimal mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen und in Proteingelprobenpuffer gekocht. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit anschließender Fluorographie detektiert. E, 1 % der eingesetzten *in vitro*-Translationsreaktion.

ASH1 und TRX erhalten während der Entwicklung von *Drosophila* die Expression verschiedener homöotischer Gene aufrecht. Eines dieser epigenetisch regulierten Gene ist *Ubx*, in dessen *bxd* cis-regulatorischer Region sich drei TRX Response Elemente (TREs) befinden (Chang *et al.*, 1995; Tillib *et al.*, 1999). Die drei TREs wurden in einem 4kb-Konstrukt zur Kontrolle der Expression eines *mini-white*-Reportergens kloniert (Tillib *et al.*, 1999). ASH1 und TRX kolokalisieren an den TREs und führen zur Aktivierung des Reportergens, was an der Augenfarbe von *Drosophila* abgelesen werden kann (Rozovskaia *et al.*, 1999). Dieser *bxd-mini-white*-Reporter (N18-15) wurde verwendet, um einen möglichen Einfluss der ASH1-HMT-Aktivität auf die Transkriptionsaktivierung *in vivo* aufzudecken.

In N18-15/wt-Fliegen führt das Transgen zu einer dunkel-orangen Farbe in den Augen (Abb. 2-36). Bei *ash1* 10 - und *ash1* 21 -heterozygoten Reporterfliegen ist die Augenfarbe jedoch

reduziert, was auf eine geringere Expression des *mini-white*-Gens zurückzuführen ist. Aufgrund der reduzierten HMT-Aktivität der mutanten Proteine *in vitro*, lässt sich eine mögliche Beteiligung der SET-Domäne und somit ASH1-abhängiger Histonmethylierung an der Transkriptionsaktivierung ableiten.

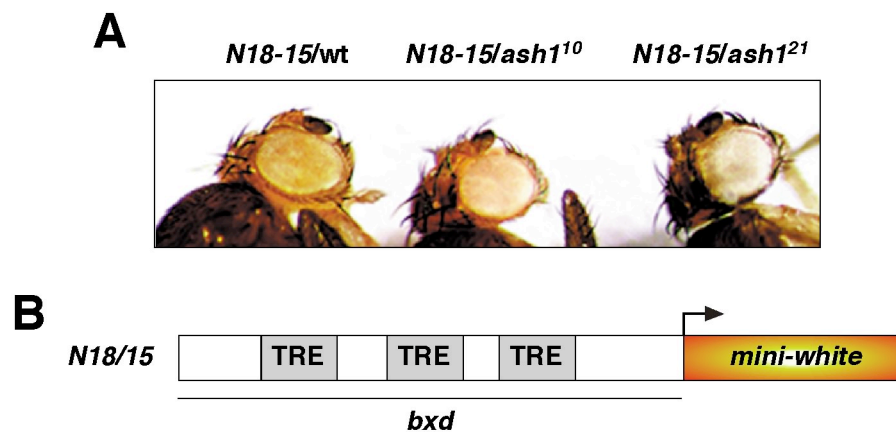


Abbildung 2-36. Effekt der *ash1¹⁰*- und *ash1²¹*-Mutation in heterozygoten Fliegen auf die Expression des *mini-white*-Gens. (A) Fotografierte Augen von Wildtyp-*Drosophila* mit *N18-15* (*N18-15/wt*), und heterozygoten *ash1¹⁰/+* und *ash1²¹/+*-*Drosophila* (*N18-15/ash1¹⁰* und *N18-15/ash1²¹*). (B) Schematische Darstellung des 4kb umfassenden *bxd-mini-white*-Reporterkonstrukts. Ein Fragment der *bxd*-Kontrollregion, das drei TREs enthält, ist mit einem *mini-white*-Gen fusioniert.

Um einen besseren Zugang zu der möglichen HMT-abhängigen Transkriptionsaktivierung von ASH1 zu bekommen, wurde eine stabile *Drosophila*-Schneider-Zelllinie (S2-Zellen) etabliert, die ein stabil integriertes *cat*-Reporter-gen fusioniert mit fünf Bindungsstellen für den Hefe-Transkriptionsaktivator Gal4 und „Core-Promotor“ trägt (Reporterkonstrukt *BCAT5*) (Beisel *et al.*, 2002). Bei Transfektion dieser Zellen mit einem Plasmid, das ein Fusionsprotein, bestehend aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4-DBD) und ASH1 Δ N, exprimiert, wurde die Expression des Reportergens etwa 20-fach aktiviert (Beisel *et al.*, 2002). Bei Fusionsproteinen von Gal4-DBD mit ASH1¹⁰ Δ N und ASH1²¹ Δ N wurde jedoch keine Aktivierung festgestellt (Beisel *et al.*, 2002). Entsprechende Ergebnisse wurden bei der Expression des endogenen *Ubx*-Gens der S2-Zellen beobachtet. *Ubx* liegt in S2-Zellen normalerweise inaktiv vor (Orlando und Paro, 1993). Durch die Transfektion des Expressionsplasmids mit Gal4-DBD-ASH1 Δ N wurde eine Transkription von *Ubx* durch RT-PCR nachgewiesen, mit den

Mutanten jedoch nicht (Beisel *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die mögliche Beteiligung der HMT-Aktivität von ASH1 an seiner Transkriptionsaktivierung.

Um einen direkten Einblick auf den Methylierungsstatus der Histone in den cis-regulatorischen Bereichen der durch ASH1 aktivierten Gene zu erhalten, wurden Immunpräzipitationen von quervernetztem Chromatin (XChIP) durchgeführt. Neben den stabilen S2-Zellen wurden für diese Experimente auch *Drosophila*-Imaginalscheiben des dritten Beinpaars aus dem dritten Larvenstadium verwendet, in denen die Expression des *Ubx*-Gens von *ash1* abhängig ist (LaJeunesse und Shearn, 1995). Auf diese Weise sollten Erkenntnisse über die Rolle der HMT-Aktivität von ASH1 *in vivo* an einem endogenen ASH1-Zielgen gewonnen werden.

Quervernetztes Chromatin wurde sowohl aus Gal4-DBD-ASH1 Δ N- und Gal4-DBD-ASH1¹⁰ Δ N-exprimierenden stabilen S2-Zellen als auch aus präparierten Imaginalscheiben isoliert und mit Antikörpern, die dimethyliertes H3-K4, H3-K9 oder H4-K20 erkennen, präzipitiert. Nach der Reinigung der DNA von den Proteinen wurde die Anwesenheit der Promotor/Enhancer-Sequenzen des *BCAT5*-Reporters und des *Ubx*-Gens in der präzipitierten DNA durch PCR analysiert. Mit allen drei Antikörpern wurden die entsprechenden Sequenzen in den durch ASH1 aktivierten Zuständen detektiert (Abb. 2-37). In der stabilen S2-Zelllinie zeigt sich bei dem Reporterkonstrukt und bei dem endogenen *Ubx*-Promotor das gleiche Bild. Die Expression von Gal4-DBD-ASH1 Δ N führt gegenüber der des mutanten Proteins zur Erhöhung des Methylierungsstatus der Histone in den cis-regulatorischen Sequenzen (Abb. 2-37A). Auch in den Imaginalscheiben ist die *Ubx*-Promotorregion an H3-K4, H3-K9 und H4-K20 methyliert (Abb. 2-37B).

Ein bekannter Mechanismus, durch den Histonmethylierung in eine reprimierte Chromatindomäne übersetzt wird, ist die Bindung des Heterochromatin-Protein 1 (HP1) an methyliertes Lysin 9 in H3 durch seine Chromodomäne (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Wie HP1 besitzt auch Polycomb (PC) eine Chromodomäne (Paro und Hogness, 1991), was eine Bindung des Proteins an methylierte Histontails impliziert. Tatsächlich bindet PC *in vitro* K9-methyliertes H3-Peptid, während K4-methyliertes H3-Peptid nicht gebunden wird (Beisel *et al.*, 2002). Da ASH1 als epigenetischer Aktivator als Antagonist von HP1 und PC betrachtet werden kann, sollte untersucht werden, ob die Methylierung durch ASH1 zu einer Dissoziation der beiden Proteine von cis-regulatorischen Sequenzen und damit zu einem Umschalten des Zielgens von einem reprimierten in einen aktivierten Zustand führen könnte, oder ob die beiden Proteine auch mit aktiven Genen assoziiert sein können.

Mit spezifischen Antikörpern gegen HP1 und PC wurden XChIPn durchgeführt. Wie zu erwarten war, wurde in den Imaginalscheiben weder HP1 noch PC am *Ubx*-Promotor detektiert (Abb. 2-37B). Auch in den stabilen S2-Zellen erkennt man bei Expression von Gal4(DBD)-ASH1 Δ N eine Reduktion von HP1 und PC, sowohl bei *BCAT5* als auch am endogenen *Ubx*-Promotor (Abb. 2-37A). Bei Expression von Gal4(DBD)-ASH1¹⁰ Δ N waren die beiden Proteine jedoch noch gebunden.

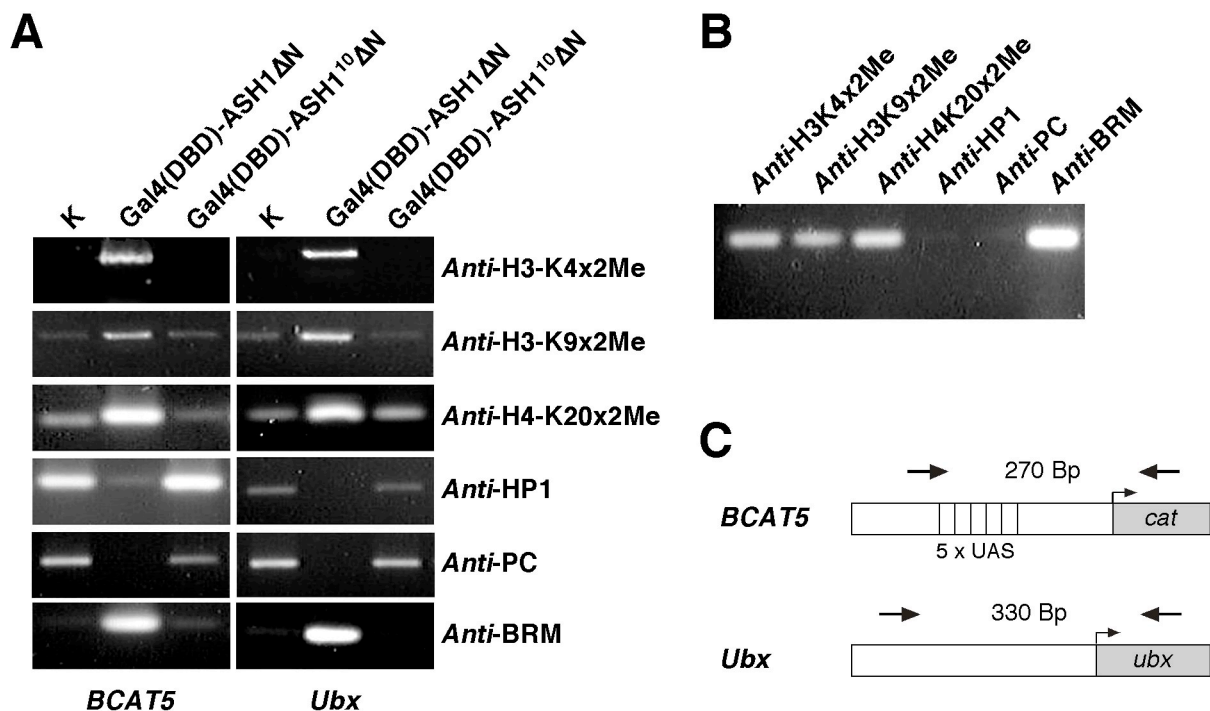


Abbildung 2-37. XChIPn zur Korrelation ASH1-abhängiger Histonmethylierung mit Transkriptionsaktivierung. (A) Mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele von PCR-Fragmenten. Quervernetztes Chromatin wurde aus S2-Zellen, die das *BCAT5*-Reporterkonstrukt stabil integriert haben und in denen die oben angegebenen Fusionsproteine exprimiert wurden, isoliert und mit den rechts angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert. K, Kontrolle mit exprimiertem TAF_{II}110. Die Enhancer/Promotor-Region von *BCAT5* (links) und die Promotor-Region von *Ubx* (rechts) wurden durch PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. (B) XChIPn wie in (A). Quervernetztes Chromatin wurde aus Imaginalscheiben des dritten Beinpaars aus Larven des dritten Larvenstadiums isoliert. Die oben angegebenen Antikörper wurden verwendet und die *Ubx*-Promotor-Region durch PCR amplifiziert. (C) Schematische Darstellung der amplifizierten Fragmente in *BCAT5* und *Ubx*. Die Position der Primer ist mit Pfeilen und die Länge der Amplifikate in Basenpaaren (Bp) angegeben.

Neben der Dissoziation oder Blockierung von reprimierenden Proteinen wäre auch eine Rekrutierung oder Stabilisierung von aktivierenden Proteinkomplexen durch ein bestimmtes Histonmethylierungsmuster denkbar. Die trxG-Proteine BRAHMA (BRM) und MOIRA

(MOR), die *Drosophila*-Homologe von Untereinheiten der SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexe aus Hefe und Mensch (Becker und Hörz, 2002), wurden in *in vitro*-Interaktionsexperimenten mit K4/9-methylierten H3-Peptiden aus embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt rekrutiert, während mit den einzelmethylierten Peptiden an K4 oder K9 eine reduzierte Bindung festgestellt wurde (Beisel *et al.*, 2002). Da beide Proteine Untereinheiten des gleichen oligomeren Komplexes sind, ist eine Bindung des gesamten Komplexes wahrscheinlicher als die Bindung der einzelnen Proteine. Mit Antikörpern gegen BRM und MOR wurden daraufhin XChIPn durchgeführt. Die Experimente zeigten, dass beide Proteine in Zellkultur und in Imaginalscheiben mit den ASH1-aktivierten Enhancer/Promotoren interagieren, während sie im nichtaktivierten Zustand eine geringere Bindungsaffinität aufweisen (Abb. 2-37 und Beisel *et al.*, 2002).

2.5 p55 und CG2051 (dHAT-1) binden K9-dimethyliertes Histon H3

Wie oben beschrieben, können Histonmodifizierungen zur Stabilisierung oder Reduktion der Bindungsaffinität von Proteinen zu Chromatin beitragen. Mit einem *in vitro*-Interaktionsexperiment sollten weitere Proteine identifiziert werden, deren Bindung an Histone durch Methylierung der NH₂-terminalen H3-Sequenz reguliert werden könnte. Es wurden Peptide verwendet, die aus den NH₂-terminalen 19 Aminosäuren von H3 bestehen und verschiedene Methylierungsmuster trugen: nicht methyliert (wt), dimethyliert an K4 (K4x2Me), dimethyliert an K9 (K9x2Me) oder dimethyliert an K4 und K9 (K4/9x2Me) (Abb. 2-38A). Die Peptide wurden über die COOH-terminale Thiolgruppe eines angefügten Cysteins spezifisch an eine thiolreaktive Agarosematrix (Sulfolink Coupling Gel, Pierce) gebunden.

Die bereits identifizierte Bindung der HP1-Chromodomäne an K9-methyliertem H3 konnte mit diesem System rekonstituiert werden (Abb. 2-38B). Das in *E. coli* exprimierte GST-HP1-Chromodomänen-Fusionsprotein bindet an K9x2Me und K4/9x2Me. Bei K4x2Me und wt konnte keine Bindung detektiert werden.

Zur Identifizierung neuer Proteine wurden die immobilisierten Peptide mit embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Erhöhung der Salzkonzentration eluiert und durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Es wurden zwei Proteinbanden bei 55 kDa und 42 kDa detektiert, die durch wt und K9x2Me rekrutiert wurden, durch K4x2Me und K4/9x2Me aber nicht. Es scheint sich hier also um

Proteine zu handeln, deren Interaktion mit H3 durch Dimethylierung an K4 gestört wurde (Abb. 2-38C). Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau durch Massenspektrometrie analysiert (Zentrale Einheit Biomolekulare Chemie, ZMBH). Das 55 kDa-Protein wurde als p55-Untereinheit des „Chromatin-Assembly-Factor-1“-Komplexes (CAF-1) identifiziert und ist ein Homolog des RbAp48-Proteins (p48) aus Säugern (Tyler *et al.*, 1996). Das 42 kDa-Protein wurde als CG2051 ausgegeben und ist ein bisher nicht charakterisiertes Protein. Die Blast-Homologiesuche mit anschließendem ClustalW-Alignment identifiziert CG2051 als Homolog der Histonacetyltransferase-1 (HAT-1) aus Huhn (C. Beisel, Daten nicht gezeigt). Neben CAF-1 ist p48/p55 in verschiedenen anderen Komplexen, die in Chromatin-abhängigen Regulationsprozessen eine Rolle spielen, involviert, wie CAC („Chromatin Assembly Complex“; Verreault, *et al.*, 1996) oder NuRD („Nucleosome Remodeling and Deacetylase Repressor Complex“; Xue *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Für NuRD wurde kürzlich das gleiche Bindungsverhalten an methylierte H3-Peptide gezeigt, wie hier mit p55 und CG2051 (Zegerman *et al.*, 2002). Welche Untereinheit von NuRD die regulierte Interaktion ausbildet wurde jedoch nicht gezeigt. Außerdem wurde in dem Experiment aus Abb. 2-37C keine weitere Untereinheit des NuRD-Komplexes detektiert. Da die Assoziation von p48/p55 mit Histon H4 bekannt war (Verreault *et al.*, 1996), sollte in einem weiterführenden Experiment eine durch Histonmethylierung regulierte direkte Interaktion mit der NH₂-terminalen H3-Sequenz überprüft werden.

Es wurden *in vitro*-Interaktionsexperimente mit den an Agarose immobilisierten H3-Peptiden und p48/p55 durchgeführt, das in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* exprimiert wurde. Das Ergebnis gleicht dem initialen Ansatz, der mit Kernextrakt durchgeführt wurde (Abb. 2-37D). Zur Bestätigung der Spezifität der Interaktion von p48/p55 mit K9-methyliertem H3-Peptid wurden die Experimente in Anwesenheit von löslichen Peptiden zur Konkurrenz der Bindung durchgeführt. Hier zeigt sich eine erfolgreiche Konkurrenz bei Verwendung von löslichem K9x2Me aber keine Konkurrenz bei K4x2Me und K4/9x2Me.

HAT-1 bildet mit p46, einem p48/p55-Homolog, einen heterodimeren Komplex, der bei der Acetylierung neusynthetisierter Core-Histone eine Rolle spielt (Verreault *et al.*, 1998). Da für Hühner HAT-1 und p48/p55 auch eine Interaktion nachgewiesen wurde, kann man davon ausgehen, dass auch *Drosophila* p48/p55 und CG2051 einen Komplex bilden (Ahmad *et al.*, 2001). Da für p48/p55 eine Interaktion mit nicht- und K9-methyliertem H3-Peptid nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion von CG2051 an die Peptide über die Bindung an p55 vermittelt wurde.

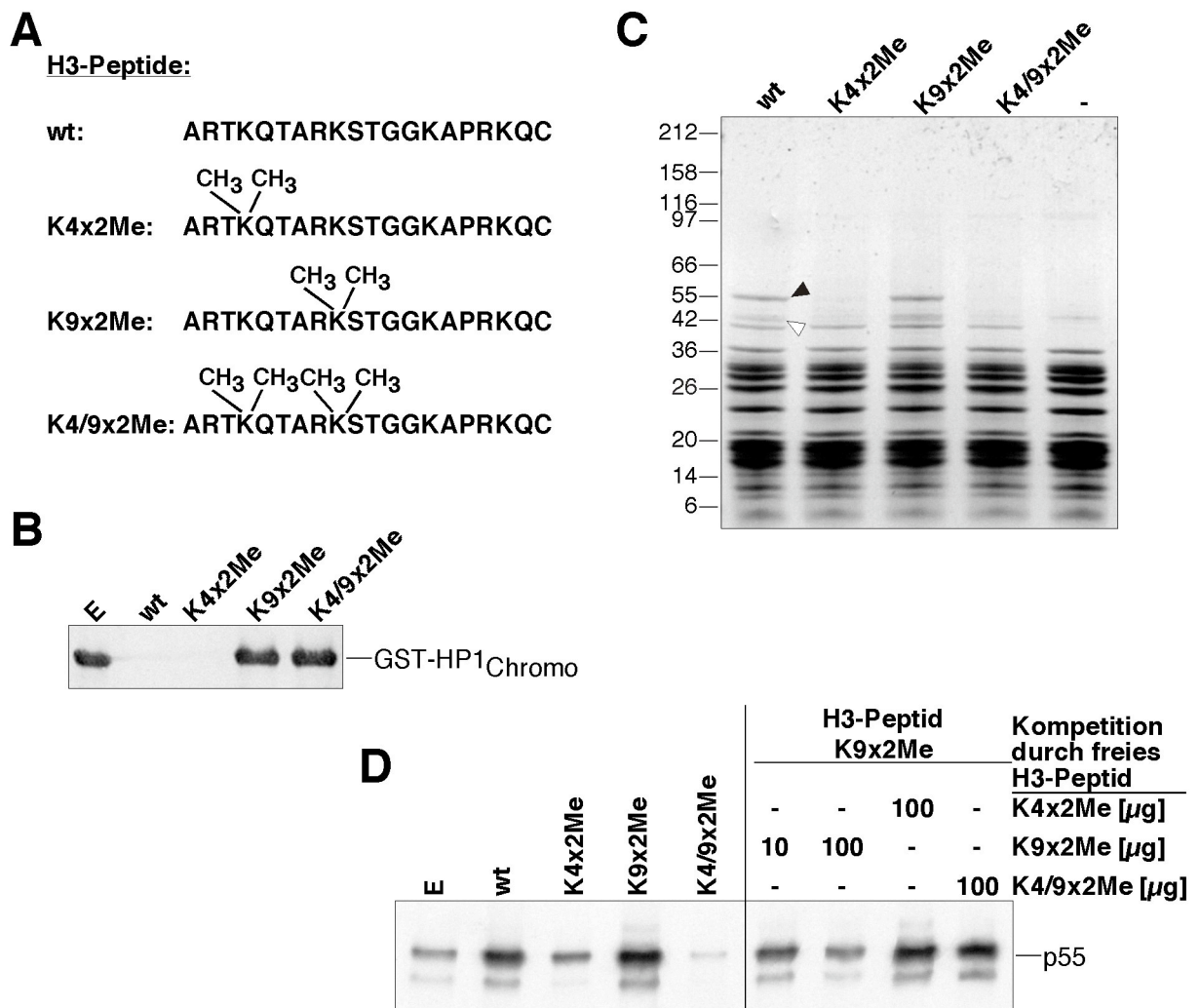


Abbildung 2-38. p55 und CG2051 (dHAT-1) binden K9-dimethylierte und nicht-methylierte Histon H3-Tails. (A) Sequenz der verwendeten H3-Peptide. Die Methylgruppen (CH₃) sind eingezeichnet. Die Peptide wurde über das COOH-terminale Cystein thiol-spezifisch an eine thiolreaktive Agarosematrix (Pierce) kovalent gekoppelt. (B) GSt-HP1_{Chromo} interagiert mit K9x2Me und K4/9x2Me. 10 μl der Peptid-Agarosematrix wurden mit je 2 μg GST-HP1-Chromodänenfusionsprotein, das in *E. coli* exprimiert wurde, in 500 μl 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM βME, pH 7,8 für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix mit dem gleichen Puffer gewaschen und die Proteine durch Zugabe von Proteingelprobenpuffer und Aufkochen eluiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot analysiert. Das Fusionsprotein wurde mit einem Antikörper gegen GST detektiert. E, 10 % des eingesetzten Fusionsproteins. Die Position von GST-HP1_{Chromo} ist markiert. (C) 100 μl der Peptid-Agarosematrix wurden mit 1 ml embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt, der zuvor in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8 1:2 verdünnt wurde, für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach intensivem Waschen mit 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8 in Mobicol-Säulen (Mobitec) wurden die Proteine mit 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,8 eluiert. Die Proteine wurden mit TCA gefällt und ein Viertel davon durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Die beiden mit Pfeilköpfen markierten Banden wurden massenspektrometrisch als p55 (schwarzer Pfeilkopf) und CG2051 (weißer Pfeilkopf) identifiziert. -, Ansatz mit leerer, Cystein-blockierter Agarosematrix. Links, relatives Molekulargewicht in kDa. (D) Fluorogramm. Versuchsansatz von Protein-Protein-Interaktionsexperimenten wie in (B) jedoch mit *in vitro*-exprimiertem ³⁵S-markiertem p55. Das Fluorogramm ist gezeigt. Rechts, Fluorogramm von Protein-Protein-Interaktionsexperimenten wie in (B) jedoch in An- oder Abwesenheit der gekennzeichneten Peptide. Mengen sind in μg angegeben. Die Position von p55 ist markiert.

3 Diskussion

Die Verpackung der DNA mit Histonen galt lange Zeit als statisches Gerüst, das dem Raummanagement innerhalb des Zellkerns dient und sich nur negativ auf Transkriptionsvorgänge auswirken kann. In den letzten Jahren hat sich dieses Bild jedoch deutlich geändert. Mittlerweile wird dem Chromatin eine direkte und essentielle Einflussnahme auf die Kontrolle der Genexpression zugeschrieben (Wolffe und Guschin, 2000). Insbesondere Histonmodifizierungen scheinen eine Schlüsselrolle bei der Markierung von aktiven und inaktiven Chromatinbereichen einzunehmen, was durch die Formulierung der Histoncode-Hypothese zum Ausdruck gebracht werden sollte. Zunächst stand die Histonacetylierung im Mittelpunkt der Forschung und es wurde früh erkannt, dass Acetylierung mit Transkriptionsaktivierung und Deacetylierung mit Repression korreliert werden kann (Grunstein, 1997). Seit der Identifizierung der ersten kernlokalisierten Histonacetyltransferase wurde eine Vielzahl dieser Enzyme gefunden, die vor allem als Untereinheiten von Koaktivatorkomplexen fungieren (Brownell *et al.*, 1996; Marmorstein, 2001; Berger, 2002). Auch der Histonmethylierung wurde eine, wenn auch undefinierte, Rolle in der Transkriptionsregulation zugesprochen (Annunziato *et al.*, 1995; Desrosiers und Tanguay, 1985). Obwohl seit langem bekannt war, dass Histonproteine *in vivo* methylierte Aminosäuren enthalten, wurde erst vor kurzem damit begonnen, Enzyme, die diese Modifizierung katalysieren, zu identifizieren und ihre Funktion zu charakterisieren (Zhang und Reinberg, 2001).

3.1 CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1

Zu Beginn dieser Arbeit war noch keine Histonmethyltransferase bekannt, weshalb versucht werden sollte, solche Enzyme chromatographisch zu reinigen und zu identifizieren.

Die Voraussetzung für Proteine, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind, ist ihre Lokalisation im Zellkern, weshalb für die Reinigung Proteinextrakt aus Zellkernen verwendet wurde. Die Wahl fiel auf Kernextrakt aus *Drosophila*-Embryonen, der für die *in vitro*-Transkription als hochaktiv charakterisiert wurde und in zahlreichen Beispielen als Ausgangsmaterial für chromatographische Reinigungen von Transkriptionsfaktoren und

Chromatin-Remodelling Komplexen diente (Wampler *et al.*, 1990; Sandaltzopoulos *et al.*, 1999).

Tatsächlich wurde in dem Kernextrakt Histonmethyltransferase-Aktivität detektiert. Konsistent mit früher publizierten Experimenten mit *Drosophila*-Zellen wurden die Histone H3, H2B und H4 methyliert. Die Methylierung von H3 und H4 ist mittlerweile etabliert und die methylierten Arginine und Lysine innerhalb der Proteine sind bekannt. Welche Reste in H2B methyliert werden, ist dagegen ungeklärt. In einer Studie ist die ungewöhnliche Methylierung des NH₂-terminalen Prolins von H2B beschrieben worden, was bisher jedoch unbestätigt blieb (Desrosiers und Tanguay, 1988). Mittlerweile wird allgemein angenommen, dass in Histonen nur Arginine und Lysine methyliert werden (Zhang und Reinberg, 2001).

Durch chromatographische Fraktionierung des Kernextraktes sollte versucht werden, die verschiedenen Histonmethyltransferase-Aktivitäten voneinander zu trennen und die verantwortlichen Enzyme zu identifizieren. Die enzymatische Aktivität der Fraktionen wurde dabei sowohl qualitativ durch Fluorographie als auch quantitativ mit Hilfe eines Szintillationszählers getestet.

Mit dem ersten Fraktionierungsschritt durch eine Heparin-Sepharose-Säule konnten drei Proteinpeaks mit verschiedenen Histonmethyltransferase-Aktivitäten identifiziert werden. Im Durchfluss der Säule befand sich H3- und H4-spezifische Aktivität und in den beiden anderen Proteinpeaks, die durch Erhöhung der Salzkonzentration eluiert wurden, jeweils H3-spezifische. Die H2B-spezifische Aktivität wurde nach Heparin-Chromatographie nicht mehr detektiert, was entweder auf ein instabiles Enzym zurückgeführt werden kann oder darauf, dass sie in einem der Aktivitätspeaks, mit denen nicht mehr weitergearbeitet wurde, zu verdünnt vorlag.

Durch Fraktionierung des Durchflusses über vier weitere Säulen konnten die H3- und die H4-spezifischen Aktivitäten voneinander getrennt und mit jeweils einer Proteinbande mit relativem Molekulargewicht von 58 bzw. 42 kDa auf einem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel korreliert werden. Dass für die H3- und die H4-Methylierung tatsächlich jeweils nur ein Enzym verantwortlich war, konnte zusätzlich durch UV-Quervernetzungsexperimente bestätigt werden, wobei nur die putativen Histonmethyltransferasen radioaktiv markierten Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) binden. Durch massenspektrometrische Analyse der Proteine wurde die H3-spezifische Histonmethyltransferase als CG5358 und die H4-spezifische als CG6554 identifiziert. Da sie noch keinen anderen Namen hatten, konnte davon ausgegangen werden, dass sie noch nicht näher charakterisiert waren. Mit CG gekennzeichnete

Proteine wurden durch das *Drosophila*-Genomprojekt von Celera Genomics in die öffentlich zugänglichen Datenbanken eingespeist (Adams *et al.*, 2000). Die Homologiesuche mit den Aminosäuresequenzen von CG5358 und CG6554 identifizierte die Proteine eindeutig als Homologe der Säugerproteine CARM1 bzw. PRMT1 und damit als Mitglieder der Protein-Arginin-Methyltransferase(PRMT)-Familie.

3.1.1 Mögliche Funktionen von CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1

Die Histonmethyltransferasen CARM1 und PRMT1 agieren als Kofaktoren für Hormonrezeptor(HR)-abhängige Transkriptionsaktivierung. Aufgrund der großen Homologie der Proteine und der gleichen Substratspezifität, CG5358/dCARM1 methyliert wie CARM1 H3 und CG6554/dPRMT1 methyliert wie PRMT1 H4, kann davon ausgegangen werden, dass sie auch in *Drosophila* bei HR-abhängiger Transkriptionsregulation eine Rolle spielen.

Hormonrezeptoren, die auch unter dem Namen Steroidrezeptor-Superfamilie zusammengefasst werden, finden sich auch in *Drosophila* (Segraves, 1991). Einige Beispiele hierfür sind der Ecdysonrezeptor (EcR), Tailless, Fushi Tarazu Factor 1 (FTZ-F1), Dissatisfaction oder auch das Protein Knirps, das eine kernrezeptorähnliche DNA-Bindungsdomäne aufweist, dem aber die Domäne für die Ligandenbindung fehlt (Nauber *et al.*, 1988). Die hier aufgeführten Proteine spielen in zum Teil unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Drosophila* eine Rolle. Im frühen *Drosophila*-Embryo regulieren die Segmentierungsgene *knirps* und *tailless* die Körpermusterbildung (Pankratz und Jäckle, 1993). FTZ-F1 wurde ursprünglich als Aktivator des Paarreglers *fushi tarazu (ftz)* identifiziert (Ueda *et al.*, 1990). CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1 wurden aus Kernextrakt von 0-14 h alten Embryonen isoliert. Außerdem zeigen *in situ*-Färbungen von 0-12 h alten Embryonen eine über den gesamten Zeitraum gleichmäßig starke und ubiquitäre Transkription der Gene (C. Beisel, Daten nicht gezeigt). Das heißt, hinsichtlich der zeitlichen Expression der Histonmethyltransferasen könnten sie sowohl bei den Knirps- und Tailless- als auch bei den FTZ-F1-abhängigen Regulationsmechanismen beteiligt sein.

EcR und Dissatisfaction werden in späteren Entwicklungsstadien exprimiert. EcR bindet das Steroidhormon Ecdyson, das die Metamorphose der Larve zur adulten Fliege steuert. Dissatisfaction ist in einem bestimmten Gehirnbereich von Larven, Puppen und Adulten exprimiert und ist an der Steuerung des Sexualverhaltens der Fliege beteiligt (Koelle *et al.*, 1991;

Finley *et al.*, 1998). Welche Rolle die identifizierten Histonmethyltransferasen in diesen späteren Regulationsvorgängen spielen, muss in zukünftigen Untersuchungen festgestellt werden.

CARM1 und PRMT1 sind über Interaktion mit Koaktivatoren der p160-Familie (GRIP1, SRC-1, ACTR) an der HR-abhängigen Transkriptionsaktivierung beteiligt. Die Koaktivatoren interagieren über ein konserviertes LXXLL-Motiv (L, Leucin; X kann irgendeine andere Aminosäure sein) mit HRn (Torchia *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte auch eine Interaktion von Ftz mit FTZ-F1 nachgewiesen werden, die ebenfalls über ein LXXLL-Motiv in Ftz vermittelt wird und damit der HR-Koaktivator-Interaktion ähnelt (Suzuki *et al.*, 2001). Einerseits wird durch die Interaktion der beiden Proteine die Bindung von Ftz an seine DNA-Zielsequenzen verstärkt (Yu *et al.*, 1997). Andererseits könnte zusätzlich eine Bindung einer PRMT an Ftz induziert werden, die dann bei der Ftz-abhängigen Transkriptionsaktivierung beteiligt sein könnte oder eine PRMT wird über Ftz für weitere FTZ-F1-abhängige Regulationsmechanismen rekrutiert.

Desweiteren sind CARM1 und PRMT1 über die Methylierung der KIX-Domäne von CBP bzw. des Arginin an Position 31 in STAT1 an der Transkriptionsregulation beteiligt. Beide Proteine liegen auch in *Drosophila* vor und die entsprechenden Motive sind denen der Säugerproteine homolog (C. Beisel, Daten nicht gezeigt). Dementsprechend könnten auch *Drosophila*-CBP und *Drosophila*-STAT Substrate für CG5358/dCARM1 bzw. CG6554/dPRMT1 sein.

3.1.2 Biochemische Eigenschaften von CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1

Gelfiltrationsläufe mit Fraktionen, in denen CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1 identifiziert wurden, weisen daraufhin, dass die Proteine in oligomeren Komplexen von etwa 480 kDa bzw. 330 kDa vorliegen. Mit den rekombinanten His₁₀-markierten Proteinen wurden diese Gelfiltrationsläufe wiederholt.

Rekombinantes CG6554/dPRMT1 eluierte bei einem Molekulargewicht von 320 kDa, was mit dem Ergebnis des endogenen Proteins korreliert. Bei einem errechneten Molekulargewicht von etwa 43 kDa lässt sich daraus schließen, dass CG6554/dPRMT1 einen homooktameren Komplex bilden könnte. Diese Daten sind teilweise konsistent mit dem Ergebnis, dass PRMT1 aus Ratte (40,5 kDa, rPRMT1) in Zellextrakt ebenfalls bei rund 320 kDa eluiert (Tang *et al.*, 1998). Außerdem ist aus Kristallstrukturuntersuchungen von HMT1, dem

PRMT1-Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae*, und PRMT3 bekannt, dass PRMTn Dimere bilden müssen, um enzymatisch aktiv zu sein (Weiss *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Die Struktur von HMT1 zeigt, dass sich die Dimere zu höheren homooligomeren Komplexen, in diesem Fall zu Hexameren, zusammenlagern können. Diese hexameren Strukturen wurden ebenfalls in Gelfiltrationsläufen mit HMT1 und rekombinatem humanen PRMT1 (hPRMT1) nachgewiesen (Weiss *et al.*, 2000). Diese scheinbar hexameren Komplexe von hPRMT1 stehen im Widerspruch zu den beobachteten scheinbar oktameren Komplexen von dPRMT1 und rPRMT1. Da die Aminosäuresequenzen von hPRMT1 und rPRMT1 zu 96 % und die von hPRMT1 und CG6554/dPRMT1 nur zu 64 % identisch sind, überraschen die Ergebnisse. Sie sind eventuell dahingehend zu erklären, dass einerseits mit rekombinatem hPRMT1 gearbeitet, andererseits aber rPRMT1 in Zellextrakten untersucht wurde. So könnte rPRMT1 als Hexamer vorliegen und zusätzlich mit einem oder mehreren anderen Proteinen aus dem Zellextrakt komplexiert sein, wodurch das höhere Molekulargewicht resultiert. Gleichermäßen könnte es sich mit dem *Drosophila*-Protein verhalten. Da hier das rekombinante Protein jedoch das gleiche Elutionsverhalten wie das endogene zeigt, wäre das ungewöhnlich. Es sei denn, dass das rekombinante Protein aufgrund des Polyhistidin-fusionsanteils, dessen Molekulargewicht jedoch nur 3 kDa beträgt, ein aberantes Elutionsverhalten zeigt. Um eine endgültige Antwort darauf zu erhalten, ob die PRMT1-Proteine aus den verschiedenen Organismen in verschiedenen oligomeren Zuständen vorliegen, müsste man sie mit der gleichen Gelfiltrationssäule als nichtmarkierte rekombinante Proteine oder zumindest mit dem gleichen Fusionsanteil untersuchen.

Das rekombinante CG5358/dCARM1 eluiert bei 420 kDa, das heißt 60 kDa unterhalb des endogenen Proteins in der Fraktion. Bisher wurde nur in „Pulldown“-Experimenten gezeigt, dass CARM1-CARM1-Interaktionen existieren (Teyssier *et al.*, 2002). Der oligomere Zustand eines CARM1-Proteins wurde hier jedoch zum ersten Mal bestimmt, sodass Vergleichsdaten fehlen. Da PRMTn nur als Dimere (oder Oligomere der Dimere) aktiv sein können, wäre ein heptamerer Komplex, wie er durch den Gelfiltrationslauf des rekombinanten Proteins vorgeschlagen werden würde, sehr fraglich - zudem dieser Komplex auch als aktiv getestet wurde. Da auf dem mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel des Gelfiltrationsexperimentes, das mit der Fraktion durchgeführt wurde, kein möglicherweise assoziiertes Protein in stöchiometrischen Mengen detektiert werden konnte, ist ein oktamerer Komplex wahrscheinlicher.

3.1.3 Substratspezifität von CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1

Bei der Histonmethyltransferase-Aktivität der beiden rekombinanten Proteine ist auffällig, dass sie nicht gegen Oligonukleosomen gerichtet ist, sondern nur DNA-freie Histone methyliert werden. Auch ein Test der gereinigten Proteine zeigte keine Methylierung von Oligonukleosomen, was für eine fehlende Modifizierung innerhalb der rekombinanten Proteine gesprochen hätte. Dies könnte bedeuten, dass CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1 auch *in vivo* keine in Chromatin komplexierten Histone methylieren, sondern nur „freie“ Histone, die dann erst in HR-abhängige Gensequenzen eingebaut werden. Da die HR-abhängige Transkriptionsaktivierung jedoch eine schnelle Antwort auf extrazelluläre Signale darstellt, ist dieser eher langsame Prozess unwahrscheinlich. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Histon-PRMTn nur solche Chromatinbereiche methylieren können, die durch andere Histonmodifizierungen in einem transkriptionskompetenten, „geöffneten“ Zustand gehalten werden. Zellkulturexperimente mit einem stabil integrierten CARM1-abhängigen Reportergen unterstützen diese Annahme (Ma *et al.*, 2002). Im Promotorbereich des Reportergens wurde im nichtinduzierten Zustand eine Methylierung von Lysin 4 in H3 beobachtet, die der CARM1-vermittelten argininspezifischen Histonmethylierung vorausgeht (Ma *et al.*, 2002). Desweiteren könnte die Rekrutierung von CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1 durch andere Proteine, wie zum Beispiel den vorgestellten Hormonrezeptoren und ihren Koaktivatoren, notwendig sein. Ob bei diesen Prozessen die identifizierten hocholigomeren Komplexe als ganzes eine Rolle spielen oder zuvor zu aktiven Dimeren dissoziieren, wird noch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die beobachtete Methylierung des rekombinanten H2A durch CG6554/dPRMT1 kann mit dem gleichen NH₂-terminalen Motiv in H4 und H2A, in dem das Substrat-Arginin eingebettet ist, erklärt werden (NH₂-SGR \mathbf{G} K...) und wird auch bei Säuger-PRMT1 beobachtet (Chen *et al.*, 1999). In Gegenwart aller Histone wird jedoch nur H4 durch die PRMT1-Proteine methyliert, was dafür spricht, dass es das eigentliche Substrat der Histonmethyltransferasen ist.

3.2 CG6563/dPRMT3

In Reinigung 2 sollte untersucht werden, ob in dem Durchfluss der Heparinsäule, dem ersten Fraktionierungsschritt des Kernextraktes, noch weitere Histonmethyltransferasen vorliegen. In einem gegenüber der Reinigung 1 abgeänderten Reinigungsschema konnte mit dem letzten Säulenschritt eine sehr schwache H4-spezifische Aktivität von den bereits in Reinigung 1 identifizierten Histonmethyltransferasen getrennt werden. Da eine UV-Quervernetzung mit radioaktivem SAM fehlschlug, wurde hier zum ersten Mal der „In-Gel-Assay“ zur Identifizierung einer Histonmethyltransferase angewendet (Brownell und Allis, 1995). Mit dem „In-Gel-Assay“ konnte eine Proteinbande bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 60 kDa detektiert werden, deren Intensität auch auf dem mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel mit der bestimmten Histonmethyltransferase-Aktivität korrelierte. Die massenspektrometrische und anschließende computergestützte Sequenzanalyse identifizierte wiederum ein PRMT-Homolog, CG6563/dPRMT3, das in *Drosophila* noch nicht charakterisiert war. Wie seine Vertebraten-Homologen besitzt CG6563/dPRMT3, neben der für PRMTn charakteristischen etwa 310 Aminosäuren umfassenden katalytischen Region, eine C2H2-Zinkfingerdomäne und ein tyrosinspezifisches Kinasemotiv (Zhang *et al.*, 2000). Die genaue Funktion der Zinkfingerdomäne, die sowohl an Protein-Protein- als auch an Protein-DNA-Interaktionen beteiligt sein kann, und der Tyrosinkinase-Konsensus-Sequenz ist nicht bekannt.

Wie CG6554/dPRMT1 methyliert rekombinantes CG6563/dPRMT3 auch rekombinantes Histon H2A. Gegenüber rekombinatem H3 ist auch eine schwächere Aktivität zu detektieren. Werden dem Enzym jedoch alle Histone gleichzeitig angeboten, wird nur H4 methyliert, was für eine spezifische Enzym-Substrat-Reaktion spricht.

Wie oben bereits erwähnt, deutet die gelöste Kristallstruktur von PRMT3 auf eine Dimerisierung des Proteins hin (Zhang *et al.*, 2000). Gelfiltrationsstudien des für die Kristallisierung verwendeten PRMT3-Fragments bestätigen dies. In Zellextrakt von Ratten wird PRMT3 (rPRMT3) dagegen vorwiegend als Monomer detektiert, woraus geschlossen wurde, dass ein Gleichgewicht zwischen der monomeren und der dimeren Form vorliegt (Tang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Mit rekombinatem CG6563/dPRMT3 wurden dagegen weder Dimere noch Monomere nachgewiesen, sondern nur oligomere Komplexe von etwa 300 kDa. Auch das endogene Protein der partiell gereinigten Fraktionen eluiert bei diesem Molekulargewicht

von der Gelfiltrationssäule, was den höheren Komplexierungszustand des *Drosophila*-Proteins gegenüber dem der Säugerproteine bestätigt.

Substrate von PRMT3 wurden bisher noch nicht beschrieben, wobei aber mit rPRMT3 gezeigt werden konnte, dass es *in vitro* das Poly(A)-bindende Protein II (PABP2) methylieren kann (Smith *et al.*, 1999). Ein funktionaler Zusammenhang konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. So ist die hier durchgeführte Arbeit die erste, die PRMT3 mit Histonmethylierung in Verbindung bringt. Gegen die Funktion als Histonmethyltransferase spricht, dass PRMT3 aus Säugern im Gegensatz zu PRMT1 und CARM1 vorwiegend oder ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert wurde (Tang *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 2002). Andererseits könnte die kontrollierte Translokation in den Zellkern, bei der zum Beispiel Phosphorylierung des Proteins in der COOH-terminal gelegenen Tyrosinkinase-Konsensus-Sequenz eine Rolle spielen könnte, ein Regulationsmechanismus der enzymatischen Aktivität des Proteins sein. Hierfür spricht auch, dass CG6563/dPRMT3 aus Kernextrakt gereinigt wurde, was mit einem ausschließlich cytoplasmatisch lokalisierten Protein nicht möglich wäre, insofern eine Kontamination des Kernextraktes mit cytoplasmatischen Proteinen ausgeschlossen werden kann. Desweiteren wurde PRMT3 ursprünglich in einem Hefe-Two-Hybrid-Screen mit dem als Histonmethyltransferase identifizierten PRMT1 als Köder identifiziert (Tang *et al.*, 1998). Ein Heterodimer der beiden Proteine, das bei der Histonmethylierung beteiligt ist, scheint also möglich.

3.3 Funktion der Proteindomänen der PRMTn

Zusätzlich zu der konservierten PRMT-Domäne, in der der Kofaktor SAM und das Substrat-Arginin gebunden wird und von der die Dimerisierung und die enzymatische Aktivität der Proteine ausgeht, hat jede PRMT eine spezifische NH₂-terminale Region von unterschiedlicher Länge. Nur CARM1 hat als einziges Mitglied der PRMT-Familie eine zusätzliche variable COOH-terminale Sequenz.

Während die identifizierten *Drosophila*-PRMTn einen vergleichbar hohen Grad an Identität gegenüber ihren Säugerhomologen in der für sie charakteristischen PRMT-Domäne aufweisen, variieren sie unterschiedlich stark in ihren terminalen Regionen von ihnen. In CG5358/dCARM1 und CG6554/dPRMT1 sind die NH₂-terminalen Sequenzen stark konserviert. Im COOH-terminalen Bereich von CG5358/dCARM1 und außerhalb des C2H2-Zink-

fingers und der Tyrosinkinase-Konsensus-Sequenz von CG6563/dPRMT3 zeigen die Sequenzen dieser Proteine jedoch größere Deletionen im Vergleich zu den Säugerproteinen. Besonders stark fällt dies bei CG5358/dCARM1 auf, das eine 72 Aminosäure kürzere COOH-terminalen Sequenz besitzt als CARM1 aus Maus (mCARM1). Die Funktion dieser zusätzlichen Proteinregionen ist noch nicht genau charakterisiert. Für den kurzen NH₂-Terminus von PRMT1 aus Säuger und Hefe wurde vorgeschlagen, dass er bei der Substratspezifität der Enzyme eine Rolle spielt (Zhang *et al.*, 2000; McBride *et al.*, 2000). COOH- und NH₂-Deletionsmutanten von mCARM1 sind jedoch immer noch in der Lage spezifisch H3 zu methylieren (Teyssier *et al.*, 2002). Für die COOH-terminale Region von mCARM1 wurde eine transaktivierende Aktivität gezeigt, die neben der Histonmethyltransferase-Aktivität für die Koaktivatorfunktion des Proteins notwendig ist (Teyssier *et al.*, 2002). In CG5358/dCARM1 ist diese Region gegenüber der von mCARM1 nur etwa halb so lang. Dies könnte einerseits darauf hinweisen, dass in *Drosophila* andere Proteine/Koaktivatoren mit CARM1 interagieren. Andererseits könnte es auch sein, dass die zusätzliche Koaktivatorfunktion, die über die COOH-terminale Region vermittelt wird, in *Drosophila* nicht gebraucht wird. Die komplexere Struktur des Säugerproteins könnte demnach eine Antwort auf die komplexere Regulation in einem höher entwickelten Organismus sein.

3.4 Lysinspezifische Histonmethyltransferasen

Die SET-Domäne ist ein phylogenetisch konserviertes Sequenzmotiv, das ursprünglich in dem *Drosophila* „Position effect variegation“(PEV)-Suppressor SU(VAR)3-9, dem PcG-Protein „Enhancer of zeste“ (E(Z)) und dem trxG-Protein Trithorax (TRX) identifiziert wurde (Tschiersch *et al.*, 1994; Jones und Gelbart, 1993; Stassen *et al.*, 1995). Eine Hauptfunktion der SET-Domänen-Proteine ist die Regulation der Genaktivität (Jenuwein *et al.*, 1998), wobei der Mechanismus, wie sie das bewerkstelligen, gerade erst aufgedeckt wird. Mit der Identifizierung von SUV39H1 und dem Hefehomologen Clr4 als H3-spezifische Histonmethyltransferasen, war die Möglichkeit gegeben, dass SET-Domänen-Proteine die Genaktivität über Histonmethylierung regulieren (Rea *et al.*, 2000). Weitergehende Untersuchungen mit SUV39H1 lokalisierten die enzymatische Aktivität in der SET-Domäne und den NH₂- und COOH-terminal dazu benachbarten cysteinreichen Pre- und PostSET-Domänen (Cys) (Rea *et al.*, 2000).

Um weitere lysinspezifische Histonmethyltransferasen zu identifizieren wurde ein bioinformatischer Ansatz gewählt, bei dem das *Drosophila*-Genom nach Proteinen mit dem Sequenzmotiv Cys-SET-Cys durchsucht wurde. Neben SU(VAR)3-9 wurden sechs weitere zum größten Teil uncharakterisierte Proteine identifiziert: ASH1, TRR, CG12196, CG1716, CG2995 und CG4976. Die cDNAs dieser Proteine wurden kloniert. Proteinfragmente von ASH1, CG1716 und CG4976, die das Cys-SET-Cys-Sequenzmotiv beinhalten, wurden in dieser Arbeit und die von TRR und CG12196 in einer Masters-Arbeit in *Sf9*-Zellen exprimiert, gereinigt und die Proteine *in vitro* als Histonmethyltransferasen identifiziert (Mora-Bermúdez, 2002).

3.4.1 ASH1...

3.4.1.1 Histonmethylierung in der epigenetischen Genaktivierung

Genetische „Screens“ in *Drosophila* führten zur Identifizierung der PcG und der trxG als zwei antagonistisch wirkende Proteingruppen, die während der Entwicklung des Organismus reprimierte bzw. aktivierte Expressionsmuster aufrechterhalten (Kennison, 1995). Insbesondere Histonmethylierung scheint bei der Weitergabe epigenetischer Information eine wichtige Rolle zu spielen, wie mit der Charakterisierung des epigenetischen Repressors SU(VAR)3-9 als Histonmethyltransferase und der Methylierung von H3 Lysin 9 (H3-K9) als Markierung heterochromatischer Chromosomenregionen aufgedeckt wurde.

So war es auch keine Überraschung unter den trxG-Proteinen epigenetischer Transaktivatoren mit ASH1 eine lysinspezifische Histonmethyltransferase zu identifizieren. Es konnte mit mehreren *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass ASH1 H3-K4 und H3-K9 und H4-K20 methyliert (diese Arbeit und Beisel *et al.*, 2002). Damit ist ASH1 die lysinspezifische Histonmethyltransferase, mit der breitesten bisher gezeigten Substratspezifität. Nur für G9a, E(Z) und ESET ist bekannt, dass sie mehr als einen Lysinrest methylieren können. Wie vorher bereits erwähnt, methylieren G9a und E(Z) H3-K9 und H3-K27 (Tachibana *et al.*, 2001; Czermin *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002). ESET methyliert wie ASH1 H3-K4 und H3-K9 (Yang *et al.*, 2002; Lachner und Jenuwein, 2002). Die *in vitro* Aktivität von ASH1 gegenüber H3-K9 ist signifikant höher als die gegenüber H3-K4 und H4-

K20. Inwiefern dies *in vivo* Verhältnisse widerspiegelt, kann nicht erklärt werden. Es ist aber gut möglich, dass es sich dabei um ein Artefakt der *in vitro* Experimente handelt. Zum einen wurde nicht mit Vollängen-ASH1 gearbeitet, was mit Sicherheit keinen Einfluss auf die Substratspezifität, aber möglicherweise Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms haben könnte. Außerdem liegt ASH1 *in vivo* nicht als Monomer sondern in einem multimeren noch nicht charakterisierten Komplex von 2 MDa vor, was ebenfalls einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität haben kann (Papoulas *et al.*, 1998). So wird bei E(Z) die Histonmethyltransferase-Aktivität auch nur dann detektiert, wenn es als Komplex und nicht nur als Monomer vorliegt (Czermin *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002).

Einerseits wurde in *Drosophila* für die Histonacetyltransferase dCBP eine Interaktion mit ASH1 gezeigt (Bantignies *et al.*, 2000). Andererseits interagiert in HeLa-Kernextrakt CBP mit einer nicht identifizierten Histonmethyltransferase, die wie ASH1 H3-K4 und H3-K9 methyliert, wobei auch hier das Signal der K9-Methylierung stärker als das der K4-Methylierung war (Vandel und Trouche, 2001). So ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der nichtidentifizierten HMT um das humane ASH1 handelt.

Die *in vitro* Histonmethyltransferase-Aktivität von ASH1 warf verschiedene Fragen auf. 1) Ist die Histonmethyltransferase-Aktivität an ASH1-abhängigen Transaktivierungsmechanismen beteiligt? 2) Warum methyliert ASH1 als Aktivator H3-K9, was doch offenbar eine Markierung für Heterochromatin-Silencing darstellt? 3) Wie könnte das ASH1-katalysierte Methylierungsmuster die Transaktivierung vermitteln?

Für die beiden Allele *ash1¹⁰* und *ash1²¹*, die Aminosäureaustausche innerhalb der PreSET- und der SET-Domäne tragen, konnte *in vitro* eine verminderte Histonmethyltransferase-Aktivität gezeigt werden, wobei die funktionale Integrität der beiden mutanten Proteine anhand der für ASH1 bekannten Interaktion mit TRX bestätigt wurde. Zur Beantwortung der ersten Frage, wurden transgene Fliegen verwendet, die ein ASH1-abhängiges Reportergen tragen. Im Vergleich zu Wildtyp *ash1* zeigen die beiden Histonmethyltransferase-defekten Mutanten eine verminderte Reportergenaktivierung. Dieses Ergebnis konnte in Zellkulturexperimenten anhand der Expression eines stabil integrierten Reportergens und des endogenen ASH1-Zielgens, *Ubx*, bestätigt werden. In den transfizierten Reporterzellen wurde auch mit der Chromatin-Immunpräzipitation die ASH1-abhängige Aktivierung direkt mit der Methylierung von H3-K4, H3-K9 und H4-K20 in der Promotorregion der Gene korreliert. Aus diesen Er-

gebnissen kann gefolgert werden, dass die Histonmethyltransferase-Aktivität von ASH1 an der Transaktivierung des Proteins beteiligt ist.

In kürzlich veröffentlichten Arbeiten konnte auch für das PcG-Protein E(Z) und dem humanen TRX-Homolog ALL-1 Histonmethyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden (Czernin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002; Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002). Diese Resultate sind weitere Hinweise auf die Beteiligung der Histonmethylierung an PcG- und trxG-vermittelten epigenetischen Regulationsprozessen.

3.4.1.2 Funktion des ASH1-vermittelten Methylierungsmusters–Übersetzung des Histoncodes

Wie oben bereits erwähnt, methyliert ASH1 H3-K4, H3-K9 und H4-K20. H3-mK4 wurde in verschiedenen Arbeiten vor allem mit Genaktivierung in Verbindung gebracht. So methyliert auch der epigenetische Transaktivator ALL-1 H3-K4 (Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002). Die Methylierung von H3-K9 und H4-K20 wurden als Markierungen heterochromatischer Bereiche identifiziert (Turner, 2002). Die Kombination der drei Modifizierungen scheint dagegen eine aktivierende Funktion auszuüben. Durch *in vitro* Interaktionsexperimente, die in dieser Arbeit durchgeführt oder veröffentlicht wurden, konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, deren Chromatinassoziation durch Histonmethylierung positiv oder negativ beeinflusst werden könnten (Beisel *et al.*, 2002). Desweiteren wurde anhand von XChIP-Experimenten mit den mit *ash1*-Konstrukten transfizierten Reporterzellen und mit Imaginalscheiben des dritten Beinpaars aus dem dritten Larvenstadiums, in denen die Expression von *Ubx* ASH1-abhängig ist, überprüft, ob die ASH1-vermittelte Histonmethylierung Auswirkungen auf die Bindung der identifizierten Proteine innerhalb der Promotorregion der aktivierten Gene haben könnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Modifizierungen des ASH1-vermittelten Methylierungsmusters verschiedene Funktionen ausüben können. Durch H3-mK4 kann die Bindung von Repressoren wie Polycomb (PC) und p48/p55 an ASH1-Zielgene verhindert werden. Konsistent mit dieser Beobachtung wird auch die Interaktion des Repressorkomplexes NuRD mit H3 durch H3-mK4 unterbunden (Zegermann *et al.*, 2002).

PC besitzt wie HP1 eine Chromodomäne, sodass der Schluss nahe lag, dass auch die Bindung von PC an Chromatin über Histonmethylierung reguliert sein könnte. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Identifizierung von E(Z) als H3-K9/K27-spezifische Histonmethyltransferase

(Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002). Da gezeigt wurde, dass PC-vermitteltes Silencing E(Z)-abhängig sein könnte, wurde vorgeschlagen, dass die E(Z)-abhängige Histonmethylierung zur Stabilisierung der Assoziation von PcG-Komplexen mit Chromatin beiträgt (Rastelli *et al.*, 1993; Platero *et al.*, 1996; Poux *et al.*, 2001; Czermin *et al.*, 2002). Experimente verschiedener Arbeiten zeigen über die Natur dieser Regulation jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits wurde die Bindung von PC mit K9-methyliertem H3-Tail *in vitro* gezeigt, die durch H3-mK4 wieder aufgehoben werden kann (Beisel *et al.*, 2002). Dieses Ergebnis wird durch Antikörperfärbungen von *Drosophila*-Riesenchromosomen unterstützt, mit denen eine Kolokalisation von PC mit H3-mK9, nicht aber von PC mit H3-mK4 beobachtet wird (L. Ringrose, unveröffentlichte Ergebnisse). Andererseits zeigen Daten von *in vitro*-Interaktionsexperimenten eine Bindung von PC mit K27 methyliertem H3, nicht aber mit K9-methyliertem (Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002). Ein Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten das Sequenzmotiv, das bei H3-K9 und H3-K27 sehr ähnlich ist (QTARK₉STG, KAARK₂₇SAP), und experimentelle Unterschiede in den *in vitro* Interaktionsassays sein. Eine Klärung der Frage könnte die Antikörperfärbung von Riesenchromosomen mit Antikörpern gegen H3-mK27 und PC bringen, um deren eventuelle Kolokalisation zu bejahen oder zu verneinen.

Die Bindung von HP1 in der Promotorregion des Reportergens und des endogenen *Ubx* ist ebenfalls abhängig vom Methylierungszustand der Histone. Überraschend war bei dieser Beobachtung, dass HP1 scheinbar gleichzeitig mit PC in der Promotorregion gebunden sein kann. Das Vorhandensein beider Proteine in einem Komplex konnte aber bisher nicht gezeigt werden. Da die höchste Auflösung, die bei einem XChIP-Experiment erreicht wird, bei etwa 1000 Basenpaarfragmenten liegt, ist wohl eine Bindung beider Proteine auf voneinander getrennten DNA-Bereichen wahrscheinlich. Ein weiteres überraschendes Ergebnis war die scheinbare Dissoziation von HP1 vom Promotor bei ASH1-abhängiger Methylierung von H3-K9, da auch bei gleichzeitiger Methylierung von H3-K4 die Bindung von HP1 an H3 stabil sein sollte (Abb. 2-38; Jacobs *et al.*, 2001). Eine Möglichkeit, diese Beobachtung zu erklären, ist, dass die Histonmethylierung in diesem Fall keinen direkten Einfluss auf die HP1-Bindung ausübt, sondern dass andere Faktoren rekrutiert werden (siehe unten), die zur Dissoziation von HP1 führen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die gleichzeitige Methylierung von H4-K20 direkt zur Dissoziation führt, wie es durch ein *in vitro*-Interaktionsexperiment vorgeschlagen wird (Beisel *et al.*, 2002).

Die gleichzeitige Methylierung von H3-K4 und H3-K9 führt zur Rekrutierung oder Stabilisierung der Bindung von BRAHMA, womit ein weiteres Regulationsprinzip von Chromatin-Remodelling-Komplexen gezeigt werden konnte. BRAHMA gehört wie ASH1 zur trxB (Kennison und Tamkun, 1988). Die direkte Beteiligung des BRAHMA-Komplexes an der Aufrechterhaltung ASH1-abhängiger *Ubx*-Aktivierung wurde auch schon aufgrund ihrer genetischen Interaktion vorgeschlagen, was bisher jedoch auf molekularer Ebene nicht gezeigt werden konnte (Tripoulas *et al.*, 1994).

Zusammenfassend führt das ASH1-katalysierte Histonmethylierungsmuster durch Inhibition der Bindung repressorisch wirkender Proteine und gleichzeitiger Rekrutierung eines aktivierenden Chromatin-Remodelling-Komplexes zur Aufrechterhaltung aktiver Genstrukturen. Diese Abhängigkeit der Chromatinassoziation verschiedener Proteine von dem Zustand der Histonmodifizierung ist eine weitere Bestätigung der Histoncode-Hypothese.

3.4.2 ...und die anderen?

Aufgrund ihrer Domänenstruktur kann davon ausgegangen werden, dass alle hier in dieser Arbeit identifizierten Cys-SET-Cys-Proteine an chromatinabhängigen Regulationsprozessen beteiligt sind. Bis auf CG2995, das noch exprimiert und getestet werden muss, wurden alle Proteine als H3-spezifische Histonmethyltransferasen identifiziert. CG4976 methyliert, wie ASH1, mit einer geringeren Aktivität auch H4. Die Aktivität gegenüber den verschiedenen Histonsubstraten unterscheidet sich jedoch. Während zum Beispiel CG1716 Oligonukleosomen bevorzugt und einzelne Histone gar nicht methyliert, methyliert CG4976 einzelne Histone und Oktamere, aber keine Oligonukleosomen, was auch bei den identifizierten PRMTn beobachtet wurde. Dies und ihr Proteinaufbau weist darauf hin, dass die Cys-SET-Cys-Proteine nicht als Monomere sondern im Komplex mit anderen Proteinen arbeiten und die Spezifität gegenüber Chromatin induziert wird. Die enzymatische Aktivität der Proteine, die sich quantitativ in den *in vitro* Experimenten teilweise stark unterscheidet, lässt sich auch nicht vergleichen. Einerseits wurde nur mit Fragmenten der Proteine gearbeitet und andererseits wird die Aktivität auch, wie vorher schon einmal beschrieben, durch die Komplexbildung mit anderen Proteinen moduliert.

3.4.2.1 CG2995/dG9a

Obwohl CG2995 bisher noch nicht auf Histonmethyltransferase-Aktivität getestet wurde, ist mit großer Sicherheit davon auszugehen, dass es Histonmethyltransferase-Aktivität besitzt. 1) Sind essentielle Aminosäuren innerhalb der SET-Domäne konserviert und 2) wurde mit G9a das Säugerhomolog von CG2995 als Histonmethyltransferase identifiziert (Tachibana *et al.*, 2001). Wie E(Z) methyliert G9a H3-K9 und H3-K27, wobei die H3-K9-Methylierung *in vivo* eine größere Signifikanz zu haben scheint (Tachibana *et al.*, 2002). Für die H3-K27-Methylierung konnte noch kein funktionaler Zusammenhang gefunden werden. Die H3-K9-Methylierung von G9a wurde mit euchromatischer Transkriptionsrepression in der frühen Embryogenese in Zusammenhang gebracht (Tachibana *et al.*, 2002). Eine ähnliche Rolle könnte CG2995 auch in *Drosophila* spielen. Während SU(VAR)3-9 vor allem mit der heterochromatischen Centromerregion assoziiert ist, könnte CG2995 in den euchromatischen Bereichen die Transkription regulieren.

3.4.2.2 CG4976/dMES-4

Für CG4976 wurde von einer anderen Arbeitsgruppe Histonmethyltransferase-Aktivität gezeigt und in der Flybase wird es als dMES-4, dem *Drosophila*-Homolog des *C. elegans*-Proteins MES-4, geführt (Ketel *et al.*, 2002). MES-4 wird mit epigenetischer Repression in Keimbahnzellen in Verbindung gebracht und wird auch als potentielles PcG-Protein in *Drosophila* angesehen (Kelly und Fire, 1998; Ketel *et al.*, 2002). Damit wäre dMES-4 die vierte Histonmethyltransferase aus der Gruppe der PcG- und trxG-Proteine und damit ein weiteres Indiz für die Relevanz der Histonmethylierung an PcG- und trxG-relevanten Regulationsmechanismen. Das Säugerhomolog von dMES-4 ist WHSC1/MMSET, das mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie das Wolf-Hirschhorn-Syndrom oder neoplastische Transformationen in Verbindung gebracht wird (Stec *et al.*, 1998; Chesi *et al.*, 1998). So könnten die Erkenntnisse, die mit dem *Drosophila*-Protein gewonnen werden zum besseren Verständnis dieser Krankheitsbilder beitragen.

3.4.2.3 TRR

TRR wurde ursprünglich aufgrund seiner Homologie zu TRX identifiziert und kloniert (Sedkov *et al.*, 1999). Trotz seiner Gemeinsamkeiten mit anderen PcG- und trxG-Proteinen, wie die SET-Domäne oder die PHD-Fingerdomäne, wurde keine genetische Interaktion mit Vertretern dieser Gruppen oder ein Einfluss auf die Regulation homöotischer Gene nachgewiesen. Seine H3-K4-spezifische Histonmethyltransferase-Aktivität weist auf eine genaktivierende Funktion hin, die jedoch noch näher charakterisiert werden muss.

3.4.2.4 CG12196

Eine weitere epigenetische Markierung, die noch vor der Histonmethylierung als solche identifiziert wurde, ist die DNA-Methylierung, die reprimierte Chromatinomänen stabilisiert. Methylierte DNA-Bereiche sind vor allem in Pilzen, Pflanzen und Vertebraten, aber nur in sehr geringem Ausmaß in *Drosophila* vertreten (Bird, 2002; Lyko *et al.*, 2000). Die repressorische Funktion der DNA-Methylierung wird durch Rekrutierung von Methyl-CpG-Bindende-Domänen-Proteine (MBDs) wie MeCP2 ausgeführt. MeCP2 bindet über seine MBD an methylierte DNA und rekrutiert unter anderem Histondeacetylasen (HDACn) zur Etablierung reprimierter Chromatinbereiche (Nan *et al.*, 1998).

Ein funktionaler Zusammenhang zwischen DNA- und Histonmethylierung wurde vor kurzem in *Neurospora crassa* und *Arabidopsis thaliana* identifiziert. In *N. crassa* führt eine Mutation in *dim-5*, das eine H3-K9 spezifische Histonmethyltransferase codiert, zur Reduktion der DNA-Methylierung (Tamaru und Selker, 2001). In *A. thaliana* methyliert KRYP-
TONITE H3-K9, wodurch ein HP1-ähnliches Protein rekrutiert wird, das seinerseits eine DNA-Methyltransferase rekrutiert (Jackson *et al.*, 2002). In diesen Arbeiten konnte dementsprechend eine Kontrolle der DNA-Methylierung durch vorhergehende Histonmethylierung gezeigt werden.

Die Identifizierung von CG12196 implizierte die entgegengesetzte Richtung, Histonmethylierung folgt auf vorhergehende DNA-Methylierung. Einerseits konnte für CG12196 die Methylierung von H3-K9 gezeigt werden (Mora-Bermúdez, 2002), andererseits trägt CG12196 eine MBD. Tatsächlich wurde kürzlich gezeigt, dass in *A. thaliana* die H3-K9-Methylierung auch von der DNA-Methylierung kontrolliert wird und MeCP2 mit einer H3-K9-

spezifischen Histonmethyltransferase interagiert (Fuks *et al.*, 2002; Soppe *et al.*, 2002). So scheint die Interaktion dieser beiden epigenetischen Repressionsmechanismen keine „Einbahnstraße“ sondern eher ein komplexes, noch nicht vollständig verstandenes Zusammenspiel zu sein.

3.4.2.5 CG1716

Die H3-spezifische Histonmethyltransferase CG1716 ist mit 2362 Aminosäuren das größte der identifizierten Proteine. Es hat keine bekannte Homologe und seine Domänenzusammensetzung wird auch in keinem weiteren Protein gefunden. Die AT-Hooks weisen auf direkte DNA-Bindungseigenschaften hin. Die WW-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen und kommt in einer Reihe verschiedener Proteine vor, die bei Signaltransduktionsprozessen eine Rolle spielen.

3.5 Einige Schlussbemerkungen und Ausblicke

Nach Durchsicht der Ergebnisse dieser Arbeit wird man sich eventuell die ein oder andere Fragen stellen, wie: Lohnt sich der Versuch, weitere Histonmethyltransferasen zu reinigen oder reicht die computergestützte Homologiesuche mit den bereits bekannten katalytisch aktiven Domänen aus, um weitere zu identifizieren? Gibt es überhaupt noch andere Histonmethyltransferasen in *Drosophila*? Warum wurden keine SET-Domänen-Proteine in den Reinigungsansätzen identifiziert? Warum gibt es so viele Histonmethyltransferasen?

Die Identifizierung von E(Z) als Histonmethyltransferase ist ein aktuelles Beispiel, die Relevanz der chromatographischen Reinigung von enzymatischen Aktivitäten zu belegen. Rea *et al.* charakterisierten mit SUV39H1 die erste lysinspezifische Histonmethyltransferase, wobei sie das Cys-SET-Cys-Sequenzmotiv als essentiell für die Histonmethyltransferase-Aktivität beschrieben haben, da sie für E(Z) mit Cys-SET- und für HRX, einem TRX-Homolog mit SET-Cys-Sequenzmotiv, keine Histonmethyltransferase-Aktivität nachweisen konnten (Rea *et al.*, 2000). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass E(Z), vorliegend in einem gereinigten Komplex, Histon H3 methyliert (Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002). Das heißt, für manche Proteine ist die Interaktion mit anderen Proteinen und die

Bildung eines oligomeren Komplexes notwendig, um ihre enzymatische Aktivität zu entfalten. Diese Komplexe werden aber auch in näherer Zukunft nur über die chromatographische Reinigung und nicht durch einfache *in silico*-Arbeit identifiziert werden können. Desweiteren besteht weiterhin die Möglichkeit, dass bisher unbekannte Protein-Domänen Histonmethyltransferase-Aktivität vermitteln und damit nicht über Sequenzhomologiesuche identifiziert werden können. Außerdem erhält man durch die chromatographische Reinigung die Möglichkeit, interagierende Proteine zu identifizieren und so einen Einblick in die biologischen Prozesse, bei denen das gereinigte Enzym eine Rolle spielt.

Durch die Ergebnisse von Rea *et al.* angeregt, hat sich ein Teil der vorliegenden Arbeit mit der Identifizierung von weiteren Histonmethyltransferasen mit Cys-SET-Cys-Sequenzmotiv beschäftigt. Wie anhand Tab. 1-3 und oben beschriebenen Beispielen ersichtlich ist, sind die cysteinreichen Domänen jedoch nicht unbedingt erforderlich, sondern die SET-Domäne mitunter allein ausreichend für die Histonmethyltransferase-Aktivität. Das heißt, neben den sieben (CG2995 mit eingerechnet; siehe Punkt 3.4.2.1) als Histonmethyltransferase identifizierten Cys-SET-Cys-Proteinen existieren in *Drosophila* mindestens elf weitere potentielle Histonmethyltransferasen mit SET-Domäne (C. Beisel, Daten nicht gezeigt). Darunter ist auch das H4-K20-spezifische PR-Set7/Set8 (Fang *et al.*, 2002; Nishioka *et al.*, 2002). Sequenzvergleiche der SET-Domänen auf das Vorhandensein der durch Mutationsanalysen als essentiell für die Histonmethyltransferase-Aktivität identifizierten Sequenzmotive und der Vergleich mit bekannten Kristallstrukturen verschiedener SET-Domänen wird möglicherweise einen Aufschluss über ihre enzymatische Aktivität geben (Rea *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2002; Trievel *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002).

Die Reinigungsansätze zur Identifizierung von Histonmethyltransferasen konzentrierten sich in dieser Arbeit auf die Proteine, die während des ersten Chromatographieschrittes nicht an das Säulenmaterial Heparin-Sepharose gebunden haben (Peak I), wobei drei PRMTn identifiziert werden konnten. Dass kein SET-Domänen-Protein dabei war, ist keinem offensichtlichen Grund zuzuschreiben sondern beruht auf Zufall. In den anderen Proteinpeaks, die durch Salz eluiert wurden, befinden sich weitere Histonmethyltransferase-Aktivitäten (darunter mit Sicherheit auch SET-Domänen-Proteine). Als Histonsubstrat wurde dabei nur ein Gemisch aller Histone verwendet. Aus der Analyse der *in vitro* Aktivitäten der in dieser Arbeit rekombinant gewonnenen Proteine ist zu ersehen, dass je nach Protein *in vitro* unterschiedliche

Histonsubstrate bevorzugt werden. So könnte es möglich sein, durch Verwendung von Oligonukleosomen, aus Peak I weitere Histonmethyltransferasen zu reinigen. Peak III (400 mM NaCl-Elution) der Heparin-Sepharose-Säule wurde zum Beispiel zur weiteren Analyse auf eine Anionentauschersäule geladen und durch einen linearen Salzgradienten eluiert (C. Beisel, Daten nicht gezeigt). Die Fraktionen wurden parallel mit Histonoktameren und Oligonukleosomen getestet, wobei für jedes Substrat je vier unterschiedliche H3- und H4-spezifische Histonmethyltransferase-Aktivitäten voneinander getrennt werden konnten (C. Beisel, Daten nicht gezeigt). Durch weitere Fraktionierung sollte es möglich sein, die verantwortlichen Enzym(komplexe) zu identifizieren.

Im Laufe der letzten zweieinhalb Jahre wurden mindestens 17 Histonmethyltransferasen identifiziert (Tab. 1-3). Obwohl nicht alle SET-Domänen Histonmethyltransferase-Aktivität vermitteln, zeigt die große Anzahl identifizierter SET-Domänen-Proteine – mehr als 60 in Mensch (Pfam-Datenbank: <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00856>), fast 40 in *Arabidopsis* (Baumbusch *et al.*, 2001) und jeweils etwa zwischen 10 und 20 in *Drosophila* und den Pilzen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Neurospora crassa* – dass noch weitere folgen werden. Diese Vielzahl an Histonmethyltransferasen spiegelt eine Vielfalt an regulatorischen Prozessen, an denen die Histonmethylierung beteiligt ist, und ein komplexes Zusammenspiel mit den anderen Arten der Histonmodifizierungen wider.

Der argininspezifischen Histonmethylierung wurde bisher eine spezialisierte Rolle in der HR-abhängigen Transkriptionsaktivierung zugewiesen, wobei sie mit Histonacetyltransferasen synergistisch wirken kann (Wang *et al.*, 2001a; Lee *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2002). Jede bisher identifizierte Histon-PRMT ist in der Lage sowohl eine als auch zwei Methylgruppen an ein Arginin zu binden (McBride und Silver, 2001). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass *in vivo* sowohl mono- als auch dimethylierte Arginine in Histonen identifiziert wurden (Zhang und Reinberg, 2001). Der Mechanismus, inwiefern die argininspezifische Histonmethylierung zur Transkriptionsaktivierung führt und ob den unterschiedlich methylierten Argininformen verschiedene Funktionen zukommen, ist bisher jedoch ungeklärt. Proteine, die argininmethylierte Histontails binden können, wurden bisher nicht identifiziert, können aber aufgrund der Erkenntnisse, die bei der lysinspezifischen Histonmethylierung gewonnen wurden, postuliert werden.

Im Gegensatz zur argininspezifischen hat die lysinspezifische Histonmethylierung sowohl reprimierende als auch aktivierende Funktion und reguliert die Genaktivität auf

unterschiedlichen Ebenen, wie der Bildung von fakultativem und konstitutivem Heterochromatin und der euchromatischen Genregulation, was ein Grund für die größere Anzahl an lysinspezifischen Histonmethyltransferasen sein könnte. Die Methylierung von H3-K9 wird zum Beispiel bei unterschiedlichen Regulationsprozessen von verschiedenen Histonmethyltransferasen katalysiert. Für die Etablierung des inaktiven X-Chromosoms in Säugern wurde die Methylierung von H3-K9 als essentieller Schritt identifiziert (Heard *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2002). Diese Methylierung erfolgt aber nicht durch Suv39 (Peters *et al.*, 2002), das vor allem im centromeren Heterochromatin wirkt, oder G9a (Tachibana *et al.*, 2002), das eher bei der euchromatischen Genexpression eine Rolle spielt. Stattdessen könnte aufgrund neuerer Daten E(Z) für die H3-K9-Methylierung des inaktiven X-Chromosoms verantwortlich sein (Wang *et al.*, 2001c; Mak *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002). Eine weitere Ebene der Komplexität erreicht die Histonmethylierung durch die Möglichkeit an die ϵ -Aminogruppe von Lysin eine, zwei oder drei Methylgruppen zu binden. *In vivo* wurden alle drei Arten der Lysinmethylierung in Histonen gefunden, die auch unterschiedliche Funktionen zu haben scheinen (Strahl *et al.*, 1999). So wurde in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass dimethyliertes H3-K4 sowohl in inaktiven als auch in aktiven euchromatischen Genen vorkommt, wohingegen die Trimethylierung nur in aktiven Genen zu finden ist (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Gleichzeitig wurden Histonmethyltransferasen identifiziert, die Di- und Trimethylierung katalysieren, während andere nur monomethylieren können (Santos-Rosa *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002). Verantwortlich für diese unterschiedliche katalytische Aktivität scheint die erste Aminosäure innerhalb des konservierten Motivs H ϕ NHSC (ϕ : hydrophobe Aminosäure) in der SET-Domäne zu sein (Zhang *et al.*, 2002). Ist das erste Histidin durch ein Arginin ersetzt, kann die Histonmethyltransferase Lysine di- und trimethylieren, ansonsten scheint nur Monomethylierung möglich zu sein (Zhang *et al.*, 2002). Interessanterweise tragen bis auf SU(VAR)3-9 alle in dieser Arbeit identifizierten Cys-SET-Cys-Proteine ein Arginin an dieser Stelle.

An welchen Mechanismen die identifizierten Cys-SET-Cys-Proteine beteiligt sind, müssen zukünftige Untersuchungen aufdecken. Dass ihnen eine zentrale Bedeutung zukommt, lässt sich anhand ihrer Größe und ihrer Multidomänenstruktur ablesen, die auf die Existenz der Proteine in multimeren Komplexen hinweist. Die Identifizierung interagierender Proteine, bei denen es sich zum Beispiel um andere histonmodifizierende Enzyme handeln könnte, wie es für ASH1-CBP oder SU(VAR)3-9-HDAC1 gezeigt werden konnte (Bantignies *et al.*, 2000;

Czermin *et al.*, 2001), wird einen Aufschluss über ihre Rolle in der Regulation chromatinabhängiger Prozesse geben und zu einem besseren Verständnis des Zusammenspiels der verschiedenen Histonmodifizierungen führen.

4 Abkürzungen

AA	Acrylamid
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Ap	Aprotinin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphat
□ ME	□-Mercaptoethanol
BSA	Albumin aus Rinderseren
Cam	Chloramphenikol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
HEMG	Hepes-EDTA-MgCl ₂ -Glycerin Puffer
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HMT	Histonmethyltransferase
IPTG	Isopropyl-thio-b-galaktopyranosid
Km	Kanamycin
l	Liter
Leu	Leupeptin
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium-Chlorid
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pep	Pepstatin
PVDF	Polyvinylendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV	Säulenvolumen
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tweenzusatz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Triethylmethylethylendiamin
ün	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

5 Material und Methoden

5.1 Laborausstattung

Analytische Waage	Sartorius
Autoradiographiekassetten	Suprema, Dr. Goos
Binokular	Stemi SV6, Zeiss
Chromatographiesäulen und -Materialien	alle von Amersham Pharm. Biotech Heparin Sepharose CL-6B HiTrap Chelating, 1 ml , 5 ml HiTrap Desalting HiTrap Heparin, 1 ml HiTrap HIC Test Kit HiTrap IEX Test Kit Hitrap NHS-activated, 1 ml, 5 ml HiTrap S Sepharose, 5 ml Mini Q PE 4.6/50 Mini S PE 4.6/50 Mono S HR 5/5 Prepacked Gluthathione Sepharose 4B Q Sepharose HP Sepharcryl S-300 HR Source 15 Q Source 15Q PE 4.6/100 Superdex 200 HR 10/30 Superdex 200 prep grade 16/60 Superose 6 HR10/30
Chromatographiesysteme	Äkta Purifier, Äkta FPLC, Amersham Pharm. Biotech
Computer Hardware	Power Book G3, Apple Corp. (meiner) Laser Drucker Optra S1855, Lexmark Laser Drucker Dokuprint N2125 Tintenstrahldrucker business inkjet 2250tn, HP
Computer Software	Canvas 7.0, Deneba DNA Strider 1.3 Excel 2001, Microsoft Corp. Internet Explorer 5.1, Microsoft Corp. Lasergene Navigator, DNASTar Linoscan Linocolor Elite 6.0.1, Heidelberg Netscape Navigator 4.76, Netscape Corp. Photoshop 5.0, Adobe Word 2001, Microsoft Corp.
DNA-Gellaufkammern	ZMBH-Werkstatt
Drehrad	CMV, Tröbel
Eisbäder	Neolab
Eismaschiene	Scotsman B-550

Filmentwickler	Amersham Pharmacia Biotech
Fliegeninkubator	RUMED
Flugkäfige	Werkstatt, ZMBH
Gel-Trockner	Drygel Sr., SE 1160
Heizblock	Eppendorf Thermomixer 5436
	Dri Block DB3, und 2D
Kühlzentrifugen	Sorvall RC 5B, RC 5C
Laborwippe	DuPont Laborwippe CAT ST5
Laborwaage	Sartorius BP 2100 S
Magnetrührer	Heidolph MR 3000 und 3001
Mikro-Pipetten	P10, P20, P200, P1000 Gilson Pipetman
Mikrowellenherd	Panasonic
MilliQ Wasser System	Millipore® Molsheim, France
pH-Meter	MP 220, Mettler Toledo
Photokopierer	Nashuatec D422
Photometer	Ultrospect 3000, Amersham Pharmacia Biotech
Pipettierhilfe, elektr.	Accu-jet, Brand
Rotoren	SS34, GS3, GSA DuPont
	Ti45, Beckmann
Schüttelinkubator	Innova 4230, New Brunswick Scientific
Schüttler, horizontal	GFL 3005
SDS-PAGE Laufkammern	Miniprotean II & III, Biorad
Sf9 Spinner	Belco glass
Stickstoffbehälter	Isotherm, KGW
Szintillationszähler	Beckman
Thermocycler	MJ Research Inc. PTC-1000
Tiefkühlschränke	Liebherr comfort (-20°C)
	Tritec Hannover (-20°C)
	Heraeus HFU-86 450 (-85°C)
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Biofuge 15, Heraeus Instruments
Transformatoren für Gelelekt.	Biorad Power Pac 200 & 300
Ultraschallgerät	Digital Branson 450D
Ultrazentrifuge	Beckmann L8-70M Ultracentrifuge
Untertischzentrifuge	Heraeus Varifuge 3.0R
UV Stratalinker	Stratagene
Vakuumkonzentrator	Speed Vac Concentrator, Bachofer
Vortex	Heidolph REAX 2000
Wasserbad	SUB 14, Grant
Western-Blot Apparaturen	Mini Trans-Blot Transfer Cell, Biorad, ZMBH-Werksatt

5.2 Verbrauchsmaterial

Colloidal Coomassie	Novex, San Diego
Dialyse Membran	Regenerated Cellulose, Spectra PorMolecular porus membrane (6-8kDa), Spectrum
Echthaarpinsel	neolab

Edelstahlprüfsiebe (1 mm, 25 μ m)	Linker
Einmalhandschuhe	Powder-Free Pehasoft, Hartmann; Nitrile N-Dex®, Best
Filter	0,2 und 0,45 μ m, Cellulose Ester, Schleicher & Schuell
Filterpapier (3 MM)	Whatman
<i>In vitro</i> transcription/translation	TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems Kit, Promega
Küvetten	10 mm x 4 mm x 45 mm, Sarstedt
Maxi Kit	JETstar, Genomed
Membranfilter (0,2 μ m, 0,4 μ m)	Schleicher & Schuell
Papiertücher	KimWipes Lite 200, Kimberly Clark
Parafilm	American National Can.
Pasteur Pipetten	WU Mainz
PCR-Purification kit	Qiagen
PCR-ReaktionsgefäÙe	Greiner
Petrischalen	Greiner
Polypropylenröhrchen (15/50 ml)	Greiner
Protein Assay Kit	BioRad
ReaktionsgefäÙe	0,5, 1,5 u. 2 ml, Sarstedt, Eppendorf
Silikonisierte Reaktionsgef.	1,5 ml, Biozym
Spritzen	1,0, 5,0, 10,0, u. 50,0 ml, Becton Dickinson
Spritzennadeln	0,4 x 20 mm, Braun
Szintillationscocktail	Rotiszint eco plus, Roth
Szintillationsröhrchen	8 ml Hinge cap vial, Packard

5.3 Chemikalien, Enzyme, Proteine, Molekulargewichtsmarker

Nicht aufgeführte Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den Firmen Sigma (München), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Fluka AG (Buchs, CH) bezogen.

Agarose ultra pure	Gibco BRL
Aprotinin	Applichem
Baculovirus DNA	Baculo Gold, Pharmingen
DNA-Standards	GeneRuler 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas
	123 Bp ladder, Gibco
Ethanol, 99 %	Zentrallager INF
Freund's Adjuvant complete	Sigma
Glykogen	Roche
Hefeextrakt	Gibco BRL
Histone H2B, H3, H4	S. Kwoczynski
Histonmix, Bovine	Typ II A, Sigma
L-Arginin freie Base	Applichem
Leupeptin	Applichem
Lipofectin	Life Technologies
LQ Adjuvant incomplete	Gerba
Lysozym	Roche
Natriumhydroxid	J.T. Baker
Natriumhypochlorit, 12 % Chlor	Zentrallager INF

Pepstatin	Applichem
Pepton	Gibco BRL
Proteinase K	Roche
Proteinstandards	Broad range und Prestained, New England Biolabs
RNase A	Roche
RNasin, Ribonuklease-Inhibitor	Promega
Saccharose	J.T. Baker
S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]- Methionin 60-85 Ci/mmol	Amersham Pharm. Biotech
S7-Nuklease	Roche

Restriktionsenzyme waren von New England Biolabs oder Roche.

5.4 Antikörper und –Konjugate

Antikörper	Quelle	erhalten von	Verdünnung
<i>Anti</i> -Maus-IgG HRP-Konjugat		Amersham	1:5000 (Western)
<i>Anti</i> -BRM	Kaninchen	R. Deuring	1:50 (XChIP), 1:1000 (Western)
<i>Anti</i> -Dimethyl-H3-K4	Kaninchen	Upstate	1:50 (XChIP)
<i>Anti</i> -Dimethyl-H3-K9	Kaninchen	Upstate	1:50 (XChIP)
<i>Anti</i> -Dimethyl-H4-K20	Kaninchen	Upstate	1:50 (XChIP)
<i>Anti</i> -Dimethyl-H4-K20	Ratte	M. Meisterernst	
<i>Anti</i> -Flag M2	Maus	Sigma	1:2000 (Western)
<i>Anti</i> -GST	Kaninchen	Sigma	1:5000 (Western)
<i>Anti</i> -HP1	Kaninchen	L. Ringrose (Paro)	1:50 (XChIP)
<i>Anti</i> -Kaninchen-IgG AP-Konjugat		Promega	1:5000 (Western)
<i>Anti</i> -Kaninchen-IgG HRP-Konjugat		Amersham	1:5000 (Western)
<i>Anti</i> -Maus-IgG AP-Konjugat		Promega	1:5000 (Western)
<i>Anti</i> -PC	Kaninchen	B. Koch (Paro)	1:50 (XChIP)
<i>Anti</i> -poly-Histidin	Maus	Sigma	1:2000 (Western)

5.5 Peptide

K*: dimethyliertes Lysin

Histon H3-Peptid (Peptide Specialty Laboratories)
ARTKQ TARKS TGGKA PRKQC

Histon H3-Peptid, dimethyliertes K4 (Peptide Specialty Laboratories)
ARTK*Q TARKS TGGKA PRKQC

Histon H3-Peptid, dimethyliertes K9 (Peptide Specialty Laboratories)
ARTKQ TARK*S TGGKA PRKQC

Histon H3-Peptid, dimethyliertes K4 und dimethyliertes K9 (Peptide Specialty Laboratories)
ARTK*Q TARK*S TGGKA PRKQC

Histon H3-Peptid, K4L (ZMBH)
ARTLQ TARKS TGGKA PRKQL

Histon H3-Peptid, K9L (ZMBH)
ARTKQ TARLS TGGKA PRKQL

Histon H4-Peptid (ZMBH)
TGRGL GGLGL GLGGA KRHRL VLRD

5.6 DNA

5.6.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der ARK-Primer Synthese hergestellt.

5.6.1.1 Oligonukleotide für die *in vitro*-Mutagenese von *ash1*

ash1 ¹⁰ .a:	5'-CGATTGTAGGTTTGTCAACAAGTCTTGCGAACCCAATTGCG
ash1 ¹⁰ .b:	5'-CGCAATTGGGTTTCGCAAGACTTGTTGACAAACCTACAATCG
ash1 ^{H1459K} .a:	5'-GCAGCGATTGTAGGTTTGTTCATCCATTCTTGCGAACCCAATTGC
ash1 ^{H1459K} .b:	5'-GCAATTGGGTTTCGCAAGAATGGATGACAAACCTACAATCGCTGC
ash1 ²¹ .a:	5'-CCGCATGGTTTATACGAAGTGCTCGCCCAGC
ash1 ²¹ .b:	5'-GCTGGGCGAGCACTTCGTATAAACCATGCGG

5.6.1.2 Oligonukleotide für PCR-Klonierungen

ash1.1	5'-AAAGCGGCCGCATATGACCAATCAAAAAGCCCC Restriktionsschnittstellen: NotI, NdeI
ash1.2	5'-AAAGGATCCTTATGCTGGCGAGGATGCAGTCG Restriktionsschnittstellen: BamHI

ash1.b	5'- <u>AGCACTAGTCTCGAGTTATGTTGAGTTGGCCGTAG</u> Restriktionsschnittstellen: SpeI, XhoI
cg12196.a	5'- <u>AGCGAATTCATATGTCTGGGCAGCCAACAGC</u> Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI
cg12196.b	5'- <u>AAAGGATCCGGTACCTTAGAGCAGACGAAGGCG</u> Restriktionsschnittstellen: BamHI, KpnI
cg1716Nde1201	5'-AGACTAAACATAT <u>GGCCAAGTTTATCGAGGACG</u> Restriktionsschnittstellen: NdeI
cg1716-1700	5'-AGAATCTAGACTAAAGCACACGCAAAGTGCC Restriktionsschnittstellen: XbaI
cg2995.a	5'-GCGGGTACCATATGACGGACTTTGTTGAGC Restriktionsschnittstellen: KpnI, NdeI
cg2995.b	5'-AAA <u>ACTAGTCTCGAGCTACGCGTGCCAATTTTCTCC</u> Restriktionsschnittstellen: SpeI, XhoI
cg4976.1	5'-AAAGAATTCATATGACAGCCGACGCCAAGGAGG Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI
cg4976.4	5'-AATATGGATCCTCGAGCTAGAGTTTGCCGCCTATCTCG Restriktionsschnittstellen: BamHI, XhoI
cg5358.a	5'-AAAGAATTCATATGTCCAGCCTGCGACCCGAGGAGG Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI
cg5358.b:	5'-AAAGGATCCGGTACCCTAGTGCGGATGCATAAGTCC Restriktionsschnittstellen: BamHI, KpnI
cg6554.a:	5'-AAAGAATTCATATGGCCAGCACAGACATCCCATGGAGGC Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI
cg6554.b:	5'-AAATCTAGAGGTACCTCGAGCTAGCGCATGCGGTATG Restriktionsschnittstellen: XbaI, KpnI, XhoI
cg6563.a:	5'-ACGGAAGCTTCATATGAAAGACACCGAGGTCAACGACAAC Restriktionsschnittstellen: HindIII, NdeI
cg6563.b:	5'-GCGCGGATCCGGTACCTTAAACCACATTGTATTTGTGTTTC Restriktionsschnittstellen: BamHI, KpnI
su(var)3-9.a	5'-AGAGAATTCATATGGCCACGGCTGAAGCCC Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI

su(var)3-9.b	5'-AAAGGATCCTCGAGTCAAAAGAGGACCTTTCTGC Restriktionsschnittstellen: BamHI, XhoI
su(var)3-9.1	5'-CGCGAATTCATATGCCGCAGAAAATTGGAGAACG Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI
trr.1	5'-GCGGAATTCATATGCTGCCAAGAAAATCGGTTCC Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI
trr.b	5'-AAAGGATCCGGTACCCTAGTTCATCCACTTGCG Restriktionsschnittstellen: BamHI, KpnI

5.6.1.3 Oligonukleotide zur PCR-Analyse der XChIPn

UBX-241	5'-CCATGATGAATTTCCCGCGGC
UBX+90rc	5'-TGCGGTAAAGCGCTGAGGGC

5.6.2 Plasmide

pBluescript II KS (pBS, Stratagene)
Klonierungsvektor

pCRII-Topo (Invitrogen)
Klonierungsvektor; direkte Klonierung Taq-Polymerase generierter PCR-Fragmente

pet19b (Novagene)
E. coli-Expressionsvektor; NH₂-terminal Polyhistidin(His₁₀)-markierte Fusionsproteine
IPTG induzierbarer T7-Polymerase abhängiger Promotor

pT \square Stop (Sauer *et al.*, 1995)
Klonierungsvektor; *in vitro*-Expression

pVLFlag (Sauer *et al.*, 1995)
Transferplasmid zur Herstellung rekombinanter Baculoviren; NH₂-terminal Flag-
markierte Fusionsproteine

5.6.2.1 E.coli-Expression

pet3a-H2A (Luger *et al.*, 1997b)
E. coli-Expression von Histon H2A aus *Xenopus laevis*.

pet19b-*cg5358*

Das 1,6 kb-Fragment *cg5358* wurde mit NdeI/BamHI aus pBS-*cg5358* ausgeschnitten, gereinigt und in den NdeI/BamHI-verdauten pet19b-Vektor kloniert..

pet19b-*cg6554*

Das 1,1 kb-Fragment *cg6554* wurde mit NdeI/XhoI aus pBS-*cg6554* ausgeschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI-verdauten pet19b-Vektor kloniert..

pet19b-*cg6563*

Das 1,5 kb-Fragment *cg6563* wurde mit NdeI/BamHI aus pBS-*cg6563* ausgeschnitten, gereinigt und in den NdeI/BamHI-verdauten pet19b-Vektor kloniert..

pet19b-*su(var)3-9*

Das 1,9 kb-Fragment *su(var)3-9* wurde mit NdeI/XhoI aus pBS-*su(var)3-9* ausgeschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI-verdauten pet19b-Vektor kloniert..

pGEX-*HP1_{Chromo}* (S. Schönfelder)

E. coli-Expression von HP1 Aminosäuren 14-82 (Chromodomäne von HP1) mit NH₂-terminal fusioniertem GST

pGEX-*trx* (A. Mazo)

E. coli-Expression von TRX Aminosäuren 3389-3759 (SET-Domäne von TRX) mit NH₂-terminal fusioniertem GST

5.6.2.2 *Sf9*-Expression

pVLFlag-*ash1¹⁰ΔN*

Das 3,5 kb-Fragment *ash1¹⁰ΔN* wurde mit NdeI/XhoI aus pT□Stop-*ash1¹⁰ΔN* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI-verdauten pVLFlag-*su(var)3-9ΔN*-Vektor kloniert.

pVLFlag-*ash1^{H1459K}ΔN*

Das 3,5 kb-Fragment *ash1^{H1459K}ΔN* wurde mit NdeI/XhoI aus pT□Stop-*ash1^{H1459K}ΔN* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI-verdauten pVLFlag-*su(var)3-9ΔN*-Vektor kloniert.

pVLFlag-*ash1²¹ΔN*

Dieses Konstrukt wurde aus pVLFlag-*ash1²¹ΔN* mittels *in vitro*-Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *ash1²¹.a* und *ash1²¹.b* generiert.

pVLFlag-*ash1ΔN*

Das 3,5 kb-Fragment *ash1ΔN* wurde mit NdeI/XhoI aus pBS-*ash1ΔN* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI-verdauten pVLFlag-*su(var)3-9ΔN*-Vektor kloniert.

pVLFlag-*ash1ΔNC*

Das 1,8 kb-Fragment *ash1ΔNC* wurde mit NdeI/BamHI aus pCRII-Topo-*ash1ΔNC* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/BglII-verdauten pVLFlag-Vektor kloniert.

pVLFlag-*cg1716ΔNC*

Das 1,5 kb-Fragment *cg1716ΔNC* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg1716Nde1201* und *cg1716-1700* aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde NdeI/XbaI verdaut und in den NdeI/XbaI-verdauten pVLFlag-Vektor kloniert.

pVLFlag-*cg4976ΔNC*

Das 1,6 kb-Fragment *cg4976ΔNC* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg4976.1* und *cg4976.4* aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde NdeI/XhoI verdaut und in den NdeI/XhoI-verdauten pVLFlag-*su(var)3-9ΔN*-Vektor kloniert.

pVLFlag-*su(var)3-9ΔN*

Das 0,9 kb-Fragment *su(var)3-9ΔN* wurde mit NdeI/BamHI aus pBS-*su(var)3-9ΔN* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/BglII-verdauten pVLFlag-Vektor kloniert.

5.6.2.3 Klonierung und *in vitro*-Expression

pBS-*ash1ΔN*

Das 3,5 kb-Fragment *ash1ΔN* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *ash1.1* und *ash1.b* aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde NotI/SpeI verdaut und in den NotI/SpeI-verdauten pBS-Vektor kloniert.

pBS-*cg5358*

Das 1,6 kb-Fragment *cg5358* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg5358.a* und *cg5358.b* aus dem cDNA-Klon LD30574 (Research Genetics, Huntsville, USA) amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde EcoRI/BamHI verdaut und in den EcoRI/BamHI-verdauten pBS-Vektor kloniert.

pBS-*cg6554*

Das 1,1 kb-Fragment *cg6554* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg6554.a* und *cg6554.b* aus dem cDNA-Klon LD38136 (Research Genetics, Huntsville, USA) amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde EcoRI/XbaI verdaut und in den EcoRI/XbaI-verdauten pBS-Vektor kloniert.

pBS-*cg6563*

Das 1,5 kb-Fragment *cg6563* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg6563.a* und *cg6563.b* aus dem cDNA-Klon LD34544 (Research Genetics, Huntsville, USA) amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde HindIII/BamHI verdaut und in den HindIII/BamHI-verdauten pBS-Vektor kloniert.

pBS-*su(var)3-9*

Das 1,9 kb-Fragment *su(var)3-9* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *su(var)3-9.a* und *su(var)3-9.b* aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde EcoRI/BamHI verdaut und in den EcoRI/BamHI-verdauten pBS-Vektor kloniert.

pBS-*su(var)3-9ΔN*

Das 0,9 kb-Fragment *su(var)3-9ΔN* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *su(var)3-9.1* und *su(var)3-9.b* aus pBS-*su(var)3-9* amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde EcoRI/BamHI verdaut und in den EcoRI/BamHI-verdauten pBS-Vektor kloniert.

pBS-*trrΔN*

Das 2 kb-Fragment *trrΔN* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *trr.1* und *trr.b* aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde EcoRI/BamHI verdaut und in den EcoRI/BamHI-verdauten pBS-Vektor kloniert.

pCRII-Topo-*ash1ΔNC*

Das 1,8 kb-Fragment *ash1ΔNC* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *ash1.1* und *ash1.2* aus pBS-*ash1ΔN* amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde nach Angaben des Herstellers in pCRII-Topo kloniert.

pCRII-Topo-*cg12196*

Das 3,8 kb-Fragment *cg12196* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg12196.a* und *cg12196.b* aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde nach Angaben des Herstellers in pCRII-Topo kloniert.

pCRII-Topo-*cg2995*

Das 4,9 kb-Fragment I wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg2995.a* und *cg2995.b* aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde nach Angaben des Herstellers in pCRII-Topo kloniert.

pT□Stop-*ash1ΔN*

Das 3,5 kb-Fragment *ash1ΔN* wurde mit NdeI/XhoI aus pBS-*ash1ΔN* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI-verdauten pT□Stop-*su(var)3-9ΔN*-Vektor kloniert.

pT□Stop-*ash1¹⁰ΔN*

Dieses Konstrukt wurde aus pT□Stop-*ash1ΔN* mittels *in vitro*-Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *ash1¹⁰.a* und *ash1¹⁰.b* generiert.

pT□Stop-*ash1^{H1459K}ΔN*

Dieses Konstrukt wurde aus pT□Stop-*ash1ΔN* mittels *in vitro*-Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *ash1^{H1459K}.a* und *ash1^{H1459K}.b* generiert.

pT□Stop-*ash1²¹ΔN*

Das 3,5 kb-Fragment *ash1²¹ΔN* wurde mit NdeI/XhoI aus pVLFlag-*ash1²¹ΔN* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI-verdauten pT□Stop-*su(var)3-9ΔN*-Vektor kloniert.

pT□Stop-*su(var)3-9ΔN*

Das 0,9 kb-Fragment *su(var)3-9ΔN* wurde mit NdeI/BamHI aus pBS-*su(var)3-9ΔN* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/BamHI-verdauten pT□Stop-Vektor kloniert.

5.7 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

XL1-blue (Bullock et al., 1987)

recA⁻ (recA1 lac⁻ endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 {F' proAB lacI^f lacZDM15 Tn10})

MC4100 (Casadaban, 1976)

F⁻ araD139 D(argF-lac) U169 rpsL150 relA1 deoC1 ptsF25 rpsR flbB301

BL21(DE3) (Stratagene)

B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal □(DE3)

BL21(DE3) pLysS (Statagene)

B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal □(DE3) [pLysS Cam^r]

Epicurian Coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL-Competent cells (Stratagene)

B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal □(DE3) Tet^r endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]

Epicurian Coli BL21-CodonPlus (DE3)-RP-Competent cells (Stratagene)

B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal □(DE3) Tet^r endA Hte [argU proL Cam^r]

5.8 Fliegenstämme

Oregon R

ash1¹⁰

ash1²¹

N18/15

Laborsammlung

A. Shearn

A. Shearn

A. Mazo

5.9 Medien, Puffer und Stammlösungen

5.9.1 Antibiotika

Ampizillin (Na-Salz)

100 mg/ml

Chloramphenikol

30 mg/ml in Ethanol

Kanamycin

20 mg/ml

Tetrazyklin

5 mg/ml

Die Stammlösungen wurden in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt.

5.9.2 Medien, Lösungen zur Herstellung kompetenter *E. coli*

LB-Medium	1 %	Pepton aus Casein
	0,5 %	Hefeextrakt
	0,5 %	NaCl
SOB-Medium	0,5 %	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	pH 7, steril filtrieren	

Zur Herstellung von Agarplatten werden dem entsprechenden Medium 1,5% Agar-Agar hinzugefügt.

FSB-Puffer	10 mM	KOAc, pH 7
	100 mM	KCl
	45 mM	MnCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	3 mM	Hexamin-CoCl ₃
	pH 6,4, steril filtrieren, 4 °C	
TBjap	10 mM	Pipes
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl
	mit KOH auf pH 6,7 einstellen	
	55 mM	MnCl ₂
	steril filtrieren	

5.9.3 Lösungen für SDS-PAGE

4xSammelgelpuffer	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4 %	SDS
4xTrenngel	1,5 M	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4 %	SDS
1xProteingelprobenpuffer	125 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	3 %	SDS
	3 %	β-Mercaptoethanol
	20 %	Glyzerin
	0,02 %	Bromphenolblau

10× Proteingel-Laufpuffer	0,25 M	Tris
	2 M	Glyzin
	1 %	SDS

5.9.4 Lösungen für die Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbelösung	0,2 %	Coomassie R250
	10 %	Essigsäure
	45 %	Methanol
Entfärber	10 %	Essigsäure
	45 %	Methanol

5.9.5 Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen

Fixierlösung	50 %	Ethanol
	12 %	Essigsäure
	0,0185 %	Formaldehyd
Waschlösung	50 %	Ethanol
Vorbehandlungslösung	0,02 %	Na ₂ S ₂ O ₃ •5 H ₂ O
	(w/v)	
Färbelösung	0,2 %	AgNO ₃
	(w/v)	
	0,028 %	Formaldehyd
Entwickler	6 % (w/v)	Na ₂ CO ₃
	0,019 %	Formaldehyd
	0,0004 %	Na ₂ S ₂ O ₃ •5 H ₂ O
	(w/v)	
Stopplösung	44 %	Ethanol
	12 %	Essigsäure

5.9.6 Lösungen für Western Blot

Transfer-Puffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,01 %	SDS
TBST-Puffer	100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	140 mM	NaCl
	0,05-0,1 %	Tween20

TBS	31 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	170 mM	NaCl
	6,4 mM	KCl

5.9.7 Häufig verwendete Stammlösungen/Puffer

Ethidiumbromid	10 mg/ml	in 100 μl TBE-Puffer
HEMG	25 mM	Hepes/KOH, pH 7,6
	12,5 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	EDTA
	10 %	Glycerin
HMT-Puffer	20 mM	Tris/HCl, pH 8
	50 mM	NaCl
	0,4 mM	EDTA
	2 mM	βME
100 μl TBE-Puffer	900 mM	Tris
	900 mM	Borsäure
	30 mM	EDTA
100 μl TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	1 mM	EDTA

5.10 Analyse und Manipulation von DNA (Standardmethoden)

5.10.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach Hanahan (Hanahan, 1983)

Eine ÜNK wurde 1:100 in 25 ml SOB-Medium verdünnt und bei guter Durchlüftung aufgezogen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,3 wurden 200 μl ml der Kultur in zwei eisgekühlte, sterile Corex-Röhrchen überführt und zentrifugiert (HB-4, 2500 rpm, 10 min, 4°C). Die Zellpellets wurden in je 3,5 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und ein weiteres Mal zentrifugiert (HB-4, 2500 rpm, 10 min, 4°C). Die Pellets wurden in insgesamt 2 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert. Im Abstand von 5 min wurden zweimal 70 μl DMSO zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in sterile Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

5.10.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach Inoue *et al.*

Um hochkompetente *E. coli*-Zellen für die Transformation nach einer Ligation zu erhalten, wurde die von Inoue *et al.* publizierte Methode für *E. coli*-XL1blue optimiert (Inoue *et al.*, 1990).

5 ml einer ÜNK wurden in 250 ml SOB-Medium gegeben und für ca. 31 h bis zu einer OD_{600} 0,6 bei 18 °C wachsen gelassen. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und mit einem vorgekühlten GS3-Rotor (4000 Upm, 10 min, 4 °C) zentrifugiert. Die Bakterien wurden in eisgekühltes 80 ml TBjap+DMSO (100 ml TBjap + 2 ml DMSO) aufgenommen und für 10 min auf Eis gehalten. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die Bakterien im Kühlraum in 18,6 ml eisgekühltes TBjap aufgenommen. Zu der Suspension wurden 1,4 ml DMSO zugegeben. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Suspension in 200 µl Aliquots in sterile Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

5.10.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

10-20 µl eines Ligationsansatzes oder cccDNA wurden vorsichtig mit 100 µl einer eiskalten Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 90 sek auf 42 °C erwärmt und sofort wieder auf Eis gekühlt. Danach wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden (Tischzentrifuge, 4000 Upm, 5 min) zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden mit dem im Eppendorfgefäß verbliebenen Rest (ungefähr 50-100 µl) resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

Kontrollansätze: - kompetente Zellen ohne DNA (Negativkontrolle)
 - Transformation mit definierter Menge cccDNA (Positivkontrolle)

5.10.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Miniprep Plasmidpräparation:

1,5 ml einer ÜNK wurden in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 45 sek). Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lösung (2,5 M LiCl, 65 mM EDTA pH 8, 0,4 % Triton-X-100, 50 mM Tris pH 7,5, 0,25 mg/ml Lysozym) durch vortexen resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde für 90 sek gekocht, kurz auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 8 min, RT). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, und die DNA durch Zugabe von 0,7 ml 2-Propanol für 5-10 min bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 5 min) wurde die DNA durch Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und im "Speed Vac"-Konzentrator getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl 1/4 TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit dem "QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (50)" entsprechend den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Auf den optionalen Schritt 7 der Anleitung wurde verzichtet. Die Säulen wurden mit 50 µl 1/4 TE-Puffer eluiert.

Maxiprep Plasmidpräparationen wurden mit den entsprechenden Kits von Qiagen oder Jetstar nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

5.10.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt photometrisch bei 260 nm.

$A_{260} = 1$ entspricht $50 \mu\text{g/ml}$ dsDNA oder $33 \mu\text{g/ml}$ ssDNA.

Anhand der Ultraviolettabsorption kann man auch die Reinheit einer DNA-Präparation überprüfen. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das A_{260}/A_{280} -Verhältnis bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.

5.10.6 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA wurde in Volumina von 20 (analytisch)-100 μl (präparativ) durchgeführt. Es wurden die vom Hersteller (New England Biolabs, Roche) empfohlenen Reaktionspuffer verwendet. Je nach Ansatz wurden 1-10 μg DNA für eine Stunde bis ∞ bei der für die verwendeten Enzyme empfohlenen Temperatur verdaut.

5.10.7 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der zu bearbeitenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2 %ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde eingewogen und in 1 \times TBE durch Erwärmen gelöst. Danach wurde Ethidiumbromid ($10 \mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) zugegeben und die Lösung in einen „Gelschlitten“ gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 \times Probenpuffer (1 \times TBE, 50 % Glycerin, 0,25 % Orange G) versetzt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Illuminators sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

5.10.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAEX II-Kits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aus einem Agarosegel isoliert.

5.10.9 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um aus einem Protein/Nukleinsäuregemisch die DNA zu reinigen, wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion angewendet. Die Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol (Rothiphenol, Roth) versetzt und 2 min gevortext. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform zugegeben, 2 min gevortext und die Phasen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 3 min) voneinander getrennt. Die wässrige Phase, die die

gelöste DNA enthält, wurde abgenommen, ohne die weiße proteinhaltige Interphase aufzuwirbeln. Durch Zugabe von 2 Volumina Chloroform, 2 min vortexen, Zentrifugation und abnehmen der oberen Phase wurde die DNA-Lösung weiter gereinigt, falls in der Interphase noch viel Protein vorhanden war.

5.10.10 Ethanol-Präzipitation

Zur Konzentrierung von DNA nach der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die Ethanol-Präzipitation angewendet. Zu der Nukleinsäurelösung wurde 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,5 und 2,5 Volumina Ethanol_{abs} zugegeben. Die Nukleinsäure wurde bei -20 °C üN oder bei -80 °C für 30 min gefällt und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 20 min). Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 Upm, 5 min) und im "Speed Vac"-Konzentrator getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl 1/4 TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

5.10.11 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Zur Verhinderung intramolekularer Ligation wurden die 5'-Enden der linearisierten Plasmide durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach dem Restriktionsverdau wurde zu dem Ansatz 1/10 Volumen 10× Dephosphorylierungspuffer (Roche) und 1 Unit „Shrimp alkalischer Phosphatase“ (Roche) zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt.

5.10.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten dephosphorylierten Plasmiden erfolgte in einem Volumen von 20 µl für 4 h bei RT oder bei 16 °C üN. Es wurden ungefähr 50 ng Plasmid und 150 ng zu inserierendes DNA-Fragment verwendet. Der Ansatz wurde durch Zugabe von 2 µl 10× Ligasepuffer (Roche) auf die optimalen Bedingungen für die 10× DNA-Ligase (Roche) eingestellt. Alternativ wurde das „Quick Ligation Kit“ (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ligationsansätze wurden nach abgelaufener Inkubation entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

5.10.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR wurde verwendet, um neue cDNAs aus embryonalen *Drosophila* cDNA-Pools oder Fragmente bereits klonierter cDNAs zu amplifizieren. Dabei wurden zur weiteren Klonierung durch die spezifischen Primer geeignete Restriktionsschnittstellen an die 3'- und 5'-Enden der Amplifikate angefügt. PCR-Ansatz (nach Angaben zur ExTaq-Polymerase (TaKaRa)): 50-100 ng Template DNA oder 5 µl des cDNA-Pools, 1,25-2,5 U ExTaq-Polymerase (TaKaRa), 10 µl 10× ExTaq-Puffer, 8 µl dNTP-Mix, 0,2-1 µM Primer 1 und Primer 2 (Endkonzentration), ad 100 µl H₂O. Schmelztemperatur: 94 °C (30 sek),

Annealingtemperatur: etwa 5 °C unterhalb der angegebenen Schmelztemperatur der Primer (1 min), Elongationstemperatur: 72 °C (1-1,5min pro 1 kb-Fragment). 25-35 Wiederholungen und zum Abschluss eine weitere Elongation aber 50-100 % länger um sicher zu gehen, dass alle Amplifikate vollständig sind.

5.10.14 Gerichtete Mutagenese von DNA *in vitro*

Die gerichtete Mutagenese wurde entsprechend den Anweisungen für das „Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene mit folgenden Abweichungen durchgeführt. Anstatt der PfuTurbo DNA Polymerase wurde die ExTaq DNA-Polymerase von Takara und anstatt der „XL1-Blue supercompetent cells“ von Stratagene wurden die kompetenten XL1-Blue-Zellen nach Inoue *et al.* (s. o.), verwendet.

5.11 Analyse von Proteinen (Standardmethoden)

5.11.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit einem Tris/Glyzin-Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Entweder wurden zwischen zwei Glasplatten Abstandhalter gelegt und mit Vaseline abgedichtet oder es wurde das Miniprotein II-System von Biorad verwendet, bei dem keine zusätzlichen Spacer oder Vaseline gebraucht wurden. Das Trenngel (in der Regel 8-15% Acrylamid; 0,03 % APS; 0,15 % TEMED) wurde hineingegossen und anschließend mit 2-Propanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde das 2-Propanol abgeschüttet und der Raum über dem Trenngel mit Wasser gespült. Das überschüssige Wasser wurde mit Kimwipes-Präzisionstüchern (Kimberley Clark) entfernt, das Sammelgel (5 % Acrylamid; 0,04 % APS; 0,4 % TEMED) hineingegossen und sofort der Kamm in die Lösung geschoben. Die Elektrophorese wurde mit 150 V gestartet und nach Eindringen der Proben in das Gel bei 200-250 V bis zum Ende laufen gelassen.

Vorbereitung der Proteinproben: Proteinlösungen wurden mit dem gleichen Volumen 2x Proteingelprobenpuffer versetzt. Um den gesamten Proteingehalt von *E. coli* durch eine SDS-PAGE zu analysieren, wurde das Sediment von 1ml Flüssigkultur pro OD₆₀₀ 1 in 100ml 1x Proteingelprobenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben für 5min gekocht und aufgetragen.

Waren nicht alle Geltaschen mit Proben belegt, wurden diese mit einem Probenvolumen 1x Proteingelprobenpuffer gefüllt, um eine gleichmäßige Ionenverteilung im Gel zu erhalten.

5.11.2 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde für 30-60 min auf einem Schüttler in einer Schale mit Coomassie-Färbelösung inkubiert, wodurch die Proteinbanden sowohl gefärbt als auch fixiert wurden. Anschließend

wurde die Färbelösung, die man mehrmals verwenden kann, abgeschüttet. Noch in der Schale verbliebene Färbelösung wurde vor Zugabe von Entfärber mit Wasser ausgespült. Die Entfärbelösung wurde für einige Stunden auf dem Gel belassen, bis sich die Proteinbanden gut vom Gelhintergrund abhoben. Das gefärbte Gel wurde in Wasser aufgenommen, dokumentiert und im Vakuum-Geltrockner auf Whatman-Papier getrocknet.

Der Entfärber kann, wie auch die Färbelösung, wiederverwendet werden. Durch einfache Zugabe von Zellstofftüchern in die Lösung wird der Entfärber regeneriert.

5.11.3 Silberfärbung

Gegenüber der Coomassie-Färbung ist die Silberfärbung nach Blum (Blum *et al.*, 1987) etwa zehnmal sensitiver. Mit ihr kann man noch Banden sichtbar machen, die nur 10 ng Protein enthalten. Aufgrund dieser Empfindlichkeit muß man darauf achten, daß man das Gel nur mit (ungepuderten) Handschuhen anfaßt. Ein bereits mit Coomassie gefärbtes Gel kann mit Silber nachgefärbt werden.

Das Gel wurde für mindestens eine Stunde in Fixierlösung gegeben. Anschließend wurde es 30 min in 50% Ethanol gewaschen, für 20-60 sek in Vorbehandlungslösung geschwenkt, dreimal mit H₂O_{bidest.} (je 20 sek) gespült und für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Nach Abkippen der Färbelösung wurde das Gel mehrmals mit H₂O_{bidest.} gespült. Hierbei sollte darauf geachtet werden, daß auch die Gelunterseite von überschüssigem Silber befreit wird. Nach dem Waschvorgang wurde das Gel in Entwickler geschwenkt bis die gewünschte Färbintensität erreicht war. Der Entwickler wurde abgeschüttet und der Färbeprozess durch Zugabe von Stopplösung beendet. In diesem Zustand wurde das Gel dokumentiert. Anschließend wurde es in Wasser rehydratisiert und auf Whatman-Papier in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

5.11.4 Immunologischer Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot)

Neben der Coomassie- und der Silberfärbung kann man durch die Technik des Western Blots Proteine nach der SDS-PAGE sichtbar machen. Im Gegensatz zur herkömmlichen Färbung der Gele kann man jedoch durch diesen immunologischen Nachweis mittels spezifischer Antikörper die sichtbaren Banden einem bestimmten Protein zuordnen.

Diese Methode kann in zwei aufeinanderfolgende Schritte unterteilt werden:

1. Elektrotransfer der Proteine auf eine Membran (z. B. Nitrozellulose, PVDF)
2. Immunologischer Nachweis der Proteine durch spezifische Antikörper

5.11.4.1 Elektrotransfer von Proteinen

Als Transfermembran wurde Nitrozellulose- oder PVDF-Membran verwendet. PVDF-Membran ist sehr hydrophob und muß daher vor dem Elektrotransfer kurz in Methanol_{p.a.} eingelegt werden. Anschließend wurde die Membran bis zum Gebrauch in Transferpuffer gelegt.

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel durch folgende Anordnung für den Elektrotransfer vorbereitet:

(Kathode)
Schaumstoff
3 Lagen Whatman-Papier
Trenngel
PVDF-/Nitrozellulose-Membran
2 Lagen Whatman-Papier
Schaumstoff
(Anode)

Der Aufbau dieser Anordnung erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten Kunststoffschale. Alle Komponenten wurden mit Transferpuffer getränkt und direkt auf dem Kunststoffeinsatz, der die Anordnung während des Elektrotransfers zusammenhält, luftblasenfrei aufeinandergelegt. Dieser Aufbau wurde senkrecht in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer geschoben. Je nach verwendeter Blotting-Apparatur wurde der Elektrotransfer bei 300 mA für eine Stunde (Biorad-Apparatur) oder für drei Stunden (Werkstatt, ZMBH) durchgeführt.

5.11.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Vor der eigentlichen Detektion der Proteine mit einem spezifischen Antikörper müssen unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Hierzu wurde die Membran in einer 5 % Magermilchpulver-TBST-Lösung (1 h, RT oder 4°C) geschwenkt.

Danach erfolgte die Inkubation (1 h, RT oder 4°C) mit dem ersten Antikörper, der in einer geeigneten Verdünnung in 1 TBST angesetzt wurde. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen (2 Spülen, 2 min, 1 min, RT) mit 1 TBST entfernt. Die Wahl des zweiten Antikörpers richtet sich nach der Herkunft des ersten Antikörpers und nach der gewünschten Nachweisreaktion (Alkalische Phosphatase-gekoppelt bei AP oder „horseradish peroxidase“ (HRP)-gekoppelt bei ECL). Die Inkubationszeiten und die anschließenden Wasch-Schritte waren bei beiden Nachweisreaktionen gleich. Die Zweit-Antikörper wurden in 1 TBST verdünnt und für eine Stunde bei RT mit der Membran geschwenkt. Anschließend wurden ungebundene Antikörper gewaschen (2 Spülen, 2 min, 1 min, RT).

AP: Für den AP-Western wurde Alkalische-Phosphatase gekoppelter zweiter Antikörper eingesetzt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Membran mit AP-Puffer gespült und anschließend mit der Detektionslösung (4,5 ml NBT, 0,5 ml BCIP pro ml AP-Puffer) so lang inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Die Detektionslösung wurde abgkippt und die Membran intensiv mit Wasser gewaschen, anschließend getrocknet und dokumentiert.

„ECL-Plus Western Blotting Detection System“ (Amersham): Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Membran mit der Detektionslösung inkubiert. Nach 5 min wurde die Membran durch Abtropfenlassen von der Flüssigkeit befreit und luftblasenfrei zwischen zwei Folien in eine Filmkassette gebettet. Die fluoreszierenden Signale wurden durch Exposition mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer detektiert. Je nach Signalstärke variierten die Expositionszeiten zwischen einigen Sekunden und 45 min.

5.11.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration der Proteinlösungen wurde nach der Bradford-Methode mit dem "Protein Assay" der Firma BioRad durchgeführt. Nach Vorlegen von 800 μ l Wasser mit einer Multipipette (Gilson Distriman) wurden, je nach erwarteter Konzentration, 0,5-10 μ l der zu analysierenden Probe zugegeben. Anschließend wurden 200 μ l der Bradford-Lösung zugegeben und das Eppendorfgefäß auf kleiner Stufe kurz gevortext. Die Farbreaktion wurde für 15 min inkubiert und wiederum gevortext. Danach wurde die Extinktion der Lösung bei OD₅₉₅ vermessen. Von jeder Proteinlösung wurden aus Gründen der Genauigkeit Dreifachwerte bestimmt. Für Eichkurven wurde ein BSA-Stammlösung bekannter Konzentration verwendet. Eine Eichkurve wurde spätestens dann neu erstellt, wenn eine neue "Protein Assay"-Lösung angebrochen wurde.

5.11.6 TCA-Präzipitation von Proteinen

Zu der Proteinlösung wurde 1/4 des Volumens 100% TCA, 4 μ g/ml Desoxycholat zugegeben, gevortext und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13-15000 Upm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Pellet durch Zugabe von 1 μ l Aceton gewaschen. Das Aceton wurde bei RT für 10 min auf dem Pellet inkubiert, bevor ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte (Tischzentrifuge, 13-15000 Upm, 15 min, 4 °C). Das Aceton wurde mit einer Pipette entfernt und das Pellet bei geöffnetem Gefäßdeckel auf Eis für 10-30 min getrocknet. Danach wurden 10-20 μ l 1 \times Proteingelprobenpuffer zugegeben, die Probe aufgeköcht und durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Wurden nur sehr geringe Proteinmengen (<100 μ g) in der Lösung erwartet, wurden silikonisierte Eppendorfgefäße verwendet.

5.11.7 Radioaktive Edman-Sequenzierung

Zur Bestimmung der methylierten Aminosäure innerhalb eines Histontails, wurden die Histone wie oben beschrieben, durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert, mit Coomassie gefärbt und die betreffende Histonbande ausgeschnitten. Das Membranstück wurde dann entweder zu einem kommerziellen Edman-Sequenzierservice verschickt (Midwest Analytical, Inc., St. Louis) oder innerhalb einer Kollaboration durch Hediye Erdjument-Bromage im Labor von P. Tempst (NY, USA) bearbeitet.

5.12 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine in bzw. aus *E. coli*

Alle Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten auf einem Äkta-FPLC- oder Äkta-Purifier-System von Amersham.

5.12.1 Polyhistidin(His₁₀)-markierte Proteine

CG5358, CG6554, CG6563 und SU(VAR)3-9 wurden mit den Expressionsvektoren pet19b-cg5358, pet19b-cg6554, pet19b-cg6563 bzw. pet19b-su(var)3-9 als His₁₀-markierte Fusionsproteine in *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3) RIL exprimiert und aus den Zellextrakten durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Der Ablauf der Expression und Reinigung war bei allen Proteinen gleich, weshalb er hier einheitlich dargestellt wird. Die Expressionsvektoren wurden in die kompetenten Bakterien transformiert und auf LB/Cam/Amp-Agarplatten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden je fünf Kolonien in 10 ml LB/Cam/Amp-Medium überimpft und üN bei 37 °C wachsen gelassen. Mit den 10 ml Kultur wurden 600 ml LB/Cam/Amp angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 wachsen gelassen. (*E. coli* BL21-Codon Plus (DE3) RIL pet19b-su(var)3-9 wurden auf 30 °C weiterinkubiert, während die anderen bei 37 °C blieben.) Dann wurde die Expression der plasmidkodierten Gene durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert. Das Wachstum wurde für 3 h fortgesetzt. Anschließend wurden die Kulturen in einem Eis-Wasser-Bad abgekühlt, um eine Beendigung der Stoffwechselaktivität zu erreichen. Die Zellen wurden zentrifugiert (GS3-Rotor, 5000 Upm, 10 min, 4°C) und das Pellet in 25 ml eiskaltem Puffer A (5 mM Imidazol, 25 mM Hepes, pH 7,9, 200 mM NaCl, 10% Saccharose) resuspendiert. Die Suspension wurde bei -20 °C eingefroren, wieder langsam bei 4 °C aufgetaut und in ein Becherglas überführt. Anschließend wurden 5 ml Puffer A, in dem vorher 50 mg Lysozym gelöst wurden, zugegeben und die Suspension 45 min unter Rühren inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Eis sonifiziert (Branson Digital Sonifier 450-D, große Spitze, 80-90 % Intensität, dreimal 20 sek). Nach Zentrifugation (SS34, 20000 Upm, 40 min, 4 °C) wurde der Überstand mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert und mit 1 ml/min auf eine 1 ml HiTrap Ni²⁺-Chelating-Sepharose-Säule geladen, die zuvor mit Puffer A äquilibriert wurde. Anschließend wurde mit Puffer A nachgewaschen, bis keine Proteine mehr durch UV-Absorption detektiert wurden. Gebundene Proteine wurden durch einen Gradienten über 20 ml auf 500 mM Imidazol in Puffer A eluiert, wobei Fraktionen von 1 ml gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert und die saubersten Fraktionen vereint. Die Proteine wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.12.2 GST-markierte Proteine

Fragmente von HP1 und TRX wurden als GST-Fusionsproteine (GST-HP1_{Chromo}: Aminosäuren 14-82; GST-TRX: Aminosäuren 3389-3759) mit den Expressionsvektoren pGEX2TKN-HP1_{Chromo} und pGEX-trx in *E. coli* MC4100 exprimiert.

Die Plasmide wurden in *E. coli* MC4100 transformiert und auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Für die Expression wurden am nächsten Tag mit 5 Bakterienkolonien 10 ml LB/Amp-Medium angeimpft und üN bei 37 °C wachsen gelassen. Die 10 ml Kultur wurde in 500 ml LB/Amp-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 bis 0,6 bei 37 °C wachsen gelassen. Die Expression der plasmidkodierten Gene wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Kultur für weitere 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in einem Eis-Wasser-Bad abgekühlt, um eine Beendigung der Stoffwechselaktivität zu erreichen. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (GS3-Rotor, 5000 Upm, 10 min, 4°C), in 50 ml PBS, pH 7,5, 0,1% Triton-X-100 resuspendiert und 2 mg/ml Lysozym zugegeben. Die Suspension wurde für 45 min unter

Rühren inkubiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Einfrier/Auftau-Zyklus wurde zwei weitere Male wiederholt und das Lysat in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Ti45-Rotor, 45 min, 30000 Upm, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend in 10 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Aufreinigung der Proteine wurde ein 10 ml Aliquot aufgetaut und mit 50-200 µl in PBS, pH 7,5 äquilibrierter Glutathion-Sepharose (Amersham) für 1 h auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose 5 min mit 15 ml PBS, pH 7,5 gewaschen. Entweder wurde die Glutathion-Sepharose mit immobilisiertem GST-Fusionsprotein direkt für Interaktionsexperimente verwendet oder die GST-Fusionsproteine wurden eluiert. Die Elution erfolgte durch Inkubation der Matrix mit 50-200 µl 50 mM Tris, pH 8, 10 mM Glutathion, 2 mM DTT für 10 min bei RT. Der Überstand wurde abgenommen und die Elution fünf weitere Male wiederholt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert.

5.12.3 Rekombinantes Histon H2A aus *Xenopus laevis*

Rekombinante Histone werden in *E. coli* exprimiert und aus „Inclusion bodies“ gereinigt. Das Expressionsplasmid pet3a-H2A (Luger *et al.*, 1997b) wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert und die Zellen auf LB/Cam/Amp-Agarplatten ausplattiert. Mit 5-10 Kolonien wurden 20 ml LB/Cam/Amp-Medium angeimpft und üN bei 37 °C wachsen gelassen. Die 20 ml Kultur wurden in 500 ml LB/Cam/Amp-Medium überimpft. Bei einer OD₆₀₀=0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Nach dreistündiger Expression wurden die Zellen zentrifugiert (GS3, 5000 Upm, 10 min), in 20 ml TW (50 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM βME, 0,2 mM PMSF) resuspendiert, in ein 50 ml Falcon Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden sie in einem warmen Wasserbad aufgetaut. Um die Viskosität zu erniedrigen wurde die Suspension 30 sek sonifiziert (kleine Spitze, Intensität 40 %). Nach Zentrifugation (SS34, 15000 Upm, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet 2 mal mit 20 ml TW/1 % Triton und 2 mal mit 20 ml TW gewaschen. Das Pellet wurde in 30 ml Entfaltungspuffer (7 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 mM Tris, pH 7,5, 10 mM DTT (DTT vor Gebrauch frisch dazugegeben)) für 1 h bei RT unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde zentrifugiert (SS34, 15000 Upm, 20 min, RT) und der Überstand üN gegen 5 SAU-200 (7 M Harnstoff, 20 mM Natriumacetat, pH 5,2, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM βME) dialysiert. Das Dialysat wurde zentrifugiert (SS34, 10000 Upm, 10 min, RT) und mit 1 ml/min auf eine 5 ml HiTrap SP-Sepharose-Säule geladen, die zuvor in SAU-200 äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit 25 ml SAU-200 gewaschen, bevor gebundenes Protein durch einen Gradienten über 12 SV auf SAU-600 (wie SAU-200 aber mit 600 mM statt 200 mM NaCl) eluiert wurde. Während der Elution wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt, die durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung auf den H2A-Gehalt analysiert wurden. Die reinen Fraktionen wurden vereint und 3 mal gegen 1 l H₂O (das dritte Mal üN) dialysiert. Das Dialysat wurde zentrifugiert (SS34, 10000 Upm, 10 min, 4 °C) und die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Der Überstand wurde dann in Aliquots zu je 1 µg Protein aufgeteilt, die Proteine anschließend im „Speed Vac“-Konzentrator lyophilisiert und bei -80 °C gelagert. Bei Gebrauch konnten die Histone in dem gewünschten Puffer gelöst werden.

5.13 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine in bzw. aus *Sf9*-Zellen

Bis auf SU(VAR)3-9 wurden alle weiteren SET-Domänen-Proteine mit Hilfe des Baculovirussystems als NH₂-terminal Flag-markierte Fusionsproteine in *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)-Zellen exprimiert.

Die *Sf9*-Zellen wurden als Suspensionskultur in einem „Spinner“ in serumhaltigen Medium (SF900 III-Medium, 1% Pluronic F-68, 1% L-Glutamin 200 mM, 1% Penicillin/Streptomycin, 10 % Foetal Bovine Serum, Gibco) kultiviert. Zur Primärtransfektion, der Herstellung der rekombinanten Baculoviren, wurden 10⁶ *Sf9*-Zellen in einer Kavität einer 6-Kavitäten-Zellkulturplatte ausgesät. Lösung A (175 ng Baculo Gold-DNA, 1,3-1,5 µg Transferplasmid, 33 µl Medium serumfrei (SF900 II-Medium, 1 % Pluronic F-68, 1 % L-Glutamin 200 mM, 1 % Penicillin/Streptomycin, Gibco)) und Lösung B (10 µl Lipofectin Reagent, 23 µl SF900-Medium, Gibco) wurden einzeln angesetzt, gemischt (Lösung AB) und 15-45 min inkubiert. Die abgesetzten *Sf9*-Zellen wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Die Lösung AB wurde in 440 µl serumfreies Medium aufgenommen und auf die *Sf9*-Zellen gegeben. Die *Sf9*-Zellen wurden mit der Transfektionslösung 15 h auf einer Wippe bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde abgenommen, die *Sf9*-Zellen mit serumhaltigen Medium gewaschen und mit 2 ml serumhaltigen Medium für 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Danach wurde der virenhaltige Überstand abgenommen und für die Virenamplifikation verwendet, da der Virustiter des Überstandes noch zu gering für die Proteinexpression ist.

5.13.1 Amplifikation und Reamplifikation rekombinanter Baculoviren

Für die Amplifikation wurden 10⁷ *Sf9*-Zellen auf einer 10 cm Zellkulturplatte ausgesät. Der Überstand wurde abgenommen. Auf die *Sf9*-Zellen wurden 2,5 ml serumhaltiges Medium und 1 ml Überstand der Primärtransfektion gegeben und für 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden 10 ml serumhaltiges Medium zugegeben und die Platte für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, zentrifugiert (867 g, 5 min, 4 °C) und für einen weiteren Virusamplifikationsschritt, der Reamplifikation, verwendet.

Für die Reamplifikation wurden 22-25 × 10⁶ *Sf9*-Zellen auf einer 15 cm Zellkulturplatte ausgesät. Der Überstand wurde abgenommen. Auf die *Sf9*-Zellen wurden 5 ml serumhaltiges Medium und 50-250 µl des Amplifikationsüberstandes gegeben und für 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden 15 ml serumhaltiges Medium zugegeben und die Platte für 3-5 Tage bei 27 °C inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde abgenommen, zentrifugiert (867 g, 5 min, 4 °C) und bei 4 °C aufbewahrt. Mit diesem Überstand konnte jetzt die Proteinexpression durchgeführt werden.

5.13.2 Proteinexpression in *Sf9*-Zellen

Für die Proteinexpression wurden *Sf9*-Zellen bei einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml verwendet. Je nach gewünschter Proteinmenge wurden Expressionskulturen von 50-500 ml in 0,5-5 L-Kolben ohne Schikane angesetzt. Der Kultur wurden 1/100-1/50 des Volumens Virus-Reamplifikationsüberstand zugegeben. Die Expressionskultur schüttelte mit 60 Upm über 2-3 Tage bei 27 °C.

5.13.3 Reinigung der Flag-markierten Proteine aus *Sf9*-Zellen

Die Zellen wurden zentrifugiert (etwa 800 g, 10 min, 4 °C) und in 30 ml 0,5 M NaCl-HEMG (0,5 M NaCl, 25 mM Hepes, pH 7,6, 12,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin), 0,1 % NP-40, 0,2 mM PMSF pro 500 ml Expressionskultur resuspendiert. Die Suspension wurde zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 30-37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. Danach wurde auf Eis sonifiziert (kleine Spitze, 40-60 % Intensität, 30-45 sek), zentrifugiert (SS34, 20000 Upm, 30 min, 4 °C) und der Überstand mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert. Zur Reinigung der Flag-markierten Proteine wurde *Anti-Flag* M2-Agarose (M2-Agarose, Sigma) verwendet. Etwa 100 µl der M2-Agarose wurden, nachdem sie in 0,5 M NaCl-HEMG äquilibriert worden waren, pro 10 ml des Filtrats für 2 h bis zu 100 µM bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde die M2-Agarose, an die Flag-markiertes Protein gebunden war (Protein-M2-Agarose), 5 min auf dem Drehrad mit 0,5 M NaCl-HEMG, 0,1 % NP-40, 0,2 mM PMSF gewaschen. Zwischen den Waschschriffen wurde die Protein-M2-Agarose zentrifugiert (etwa 220 g, 2 min, 4 °C) und der Überstand mit einer Kanüle oder Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wurde die Protein-M2-Agarose noch einmal mit 25 mM Tris, pH 8, 100 mM NaCl, 0,2 mM PMSF gewaschen. 5-10 µl der Protein-M2-Agarose wurde mit 10 µl 2× Proteingelprobenpuffer versetzt, aufgeköcht und durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassifärbung analysiert. Durch 10 µl M2-Agarose wurden etwa 0,5-1 µg Flag-markiertes Protein immobilisiert. Die Protein-M2-Agarose wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb der nächsten 2-3 Tage verwendet.

5.14 Präparation von Oligonukleosomen und Histonoktameren aus *Drosophila*-Embryonen

5.14.1 Sammeln von *Drosophila*-Embryonen

Etwa 200 ml Fliegen wurden zur Gewinnung von *Drosophila*-Embryonen in 28 × 28 × 36 cm³ Flugkäfigen gehalten. Um die Embryonen absammeln zu können, wurden die Käfige mit 20 × 30 cm² Apfelsaftagarplatten für die Eiablage bestückt. Herstellung der Apfelsaftagarplatten: 200 g Agar (Agar Agar Serva Kobe, in Streifen) wurden mit 165 g Zucker, 9 g Nipagin (9 g Methyl-4-hydroxybenzoat-Natriumsalz gelöst in 150 ml 95 %igem Ethanol) 3 l Wasser und 2 l Apfelsaft aufgeköcht. Die heiße Lösung wurde anschließend in Schalen gegossen und bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung wurden die Apfelsaftagarplatten auf RT erwärmt und mit frischer Hefepaste bestrichen.

5.14.2 Dechorionisierung von *Drosophila*-Embryonen

0-16 h alte Embryonen wurden unter laufendem Wasser mit einem Pinsel von den Agarplatten durch ein Sieb mit 1 mm Maschenweite gespült und in einem feineren Sieb (25 µm Maschenweite) gesammelt. Anschließend wurden die Embryonen mit Embryo-Wasch-Puffer (EW; 0,7 % NaCl, 0,04 % Triton-X-100) in einen Messzylinder gespült und mit EW auf 200 ml pro 50-80 g Embryonen aufgefüllt. Mit 12-13 %iger Natriumhypochloridlösung wurde

auf 3% Natriumhypochlorid-Endkonzentration eingestellt und für 3 min heftig gerührt. Die Embryonen wurden in den Feinsieb zurückgegossen und gründlich mit Wasser gespült. Dann wurden sie in einen Messzylinder (500 ml oder 1 l) gegeben. Der Zylinder wurde mit EW gefüllt und die Embryonen resuspendiert. Anschließend wurde gewartet, bis die Embryonen sedimentiert waren. Der Überstand wurde mit den nichtsinkenden Embryonen abgegossen oder abgesaugt. Dieser Vorgang der Resuspension/Sedimentation wurde noch einmal mit EW und ein weiteres mal mit einer 0,7%igen NaCl-Lösung wiederholt.

In diesem Zustand konnten die Embryonen für die Präparation von Kernextrakt, Nukleosomen oder Histone verwendet werden. Wurden sie nicht sofort gebraucht, wurden sie eingefroren.

5.14.3 Einfrieren dechorionisierter *Drosophila*-Embryonen

Bevor die Embryonen eingefroren wurden, wurden sie mit MilliQ-Wasser gründlich gespült und getrocknet. Hierzu wurde ein mit Wasser getränktes Filterpapier in einen Trichter gegeben, der über eine Saugflasche an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Die Embryonen wurden auf den Filter gegeben und gründlich mit MilliQ-Wasser gespült. Nachdem die Embryonen mit Hilfe der Vakuumpumpe fast trocken waren, wurden sie in 50 ml Propylenröhrchen überführt und gewogen. Die Gefäße wurden mit dem Alter der Embryonen, Gewicht und Datum beschriftet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.14.4 Präparation von Zellkernen aus *Drosophila*-Embryonen

Die benötigten Puffer wurden einen Tag vor der Präparation angesetzt und auf 4°C gekühlt. Am Tag der Verwendung wurden die Puffer auf 1 mM DTT und 0,2 mM PMSF eingestellt. Außerdem wurde eine Tablette Complete-Protease-Inhibitoren (Roche) pro 50 ml Puffer gelöst. Als Startmaterial wurden 50 g dechorionisierte Embryonen in 40 ml Glycin-Puffer (15 mM Hepes/KOH, pH 7,6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0,05 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 10% Glycerin) resuspendiert und mit Hilfe eines Yamato-Homogenisators (1000 Upm, 4°C) aufgebrochen. Nach Erreichen einer flüssig-homogenen Masse wurden noch weitere 4-6 Yamato-Läufe durchgeführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (HB-4-Rotor, 10 min, 8000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellkerne, die auf einem festen Pellet liegen, mit SUC-Puffer (15 mM Hepes/KOH, pH 7,6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0,05 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 350 mM Saccharose) abgespült und in einem Endvolumen von 50 ml resuspendiert. Es wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und die Zellkerne wiederum in SUC-Puffer (50 ml Endvolumen) resuspendiert. Der Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, die Zellkerne in 30 ml SUC-Puffer aufgenommen und für die Präparation von Oligonukleosomen (Punkt 5.14.5) oder Histonoktameren (5.14.6) bei 4°C aufbewahrt.

5.14.5 Reinigung von Oligonukleosomen

Das Volumen der SUC-Puffer/Zellkern-Suspension (Punkt 5.14.4) wurde mit Hilfe eines Messzylinders oder einer Pipette bestimmt. Um das Chromatin mit der geeigneten Menge S7-

Nuklease zu verdauen, muß der Gesamtchromatingehalt der Suspension ermittelt werden. Hierzu wird die Optische Dichte bei 260 nm einer 1:200 in 1 M NaOH (5 min Inkubation bei RT) verdünnter Suspension bestimmt und auf das Gesamtvolumen hochgerechnet.

(Bsp: 1:200 Verdünnung: $OD_{260} = 0,64$

□ 128 OD_{260} -Einheiten pro ml

□ bei angenommenen 36 ml Suspensionsvolumen: 4608 OD_{260} -Einheiten)

Die Suspension wurde mit einer 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung auf 0,1 mM $CaCl_2$ eingestellt, in ein 50 μ l Polypropylenröhrchen überführt und für 5-10 min in einem 30 °C-Wasserbad inkubiert. Pro 1000 OD_{260} -Einheiten wurden 16 μ l S7-Nuklease-Stammlösung (50 U/ μ l 10 mM Tris, pH 7,6, 16,5 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 10 % Glycerin) hinzugefügt und durch mehrmaliges Drehen des Polypropylenröhrchens gemischt. Nach 8 min bei 30 °C wurde das Gefäß auf Eis gestellt und der Verdau durch Zugabe von 0,5 M EGTA (10 mM Endkonzentration) gestoppt. Die Zellkerne wurden zentrifugiert und das Pellet in TE, pH 8 (1 mM DTT, Complete-Protease-Inhibitoren) resuspendiert (TE-Volumen entsprach der Hälfte des zu anfangs gemessenen Suspensionsvolumens). Die Zellkerne wurden für 20 min bei RT gequollen und anschließend zentrifugiert (SS34, 10 min, 15000 Upm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 3500 Da, 1 ml/cm) überführt und in einem Saccharosebett bei 4 °C konzentriert. Nach der Konzentrierung auf ein Volumen von ca. 6-8 ml wurde die Saccharose von dem Dialyseschlauch entfernt und eine der beiden Klammern neu ausgerichtet. Die Lösung wurde dreimal für mindestens eine Stunde gegen 1 l TE600 (TE, 600 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF) dialysiert. Durch die Dialyse und anschließendem Gelfiltrationslauf wurde Histon H1 und weitere Proteinkontaminanten von den Oligonukleosomen getrennt. Die konzentrierte und dialysierte Lösung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min durch die in TE600 äquilibrierte präparative Superdex200 (1,6 cm \times 30 cm) gepumpt; Fraktionsgröße 3 ml. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE und die Integrität des kurzen Chromatins durch ein analytisches 1 % Agarosegel (mindestens 20 cm lang; 80 V 1h, 40 V \ddot{u} N) nach Phenol/Chloroform-Extraktion überprüft. Das kurze Chromatin umfasste eine Länge von 2-20 Nukleosomen. Fraktionen wurden gepoolt, in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Wurde ein Aliquot aufgetaut, wurde es anschließend bei 4 °C aufbewahrt und nicht mehr eingefroren.

5.14.6 Reinigung von Histonoktameren

Der SUC-Puffer/Zellkern-Suspension (Punkt 5.14.4) wurden 90 μ l 1 M $CaCl_2$ zugegeben. Die Suspension wurde für 5 min auf 26 °C erwärmt. Anschließend wurden 125 μ l S7-Nuklease-Stammlösung (50 U/ μ l 10 mM Tris, pH 7,6, 16,5 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 10 % Glycerin) zugegeben und für 10 min bei 26 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 μ l 0,5 M EDTA gestoppt und die Suspension sofort zentrifugiert (HB-4, 10 min, 8000 Upm, 4 °C). Das Pellet wurde in 6 ml TE, pH 7,6, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, Complete-Protease-Inhibitoren (Roche) resuspendiert und für 30-45 min bei 4 °C auf dem Drehrad rotiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (HB-4, 30 min, 12000 Upm, 4 °C) wurde das Pellet verworfen und der Überstand mit 2 M NaCl, 100 mM Natriumphosphat, pH 7,2 auf 0,63 M NaCl eingestellt. Diese Proteinlösung wurde mit 1 ml/min auf eine 30 ml Hydroxylapatit-Säule (BIORAD, Bio gel HT) geladen, die zuvor in 0,63 M NaCl, 100 mM Natriumphosphat, pH 7,2 äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml 0,63 M NaCl, 100 mM Natriumphosphat, pH 7,2 gewaschen und die Histonoktamere durch einen Stufengradienten auf 2 M NaCl, 100 mM Natriumphosphat, pH

7,2 eluiert. Es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt, die durch SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung auf ihren Histongehalt analysiert wurden. Die positiven Fraktionen wurden vereint und auf eine 50 %ige Glycerinkonzentration eingestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

5.15 Herstellung von Kernextrakt aus *Drosophila*-Embryonen

Alle Arbeiten wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die dechorionisierten Embryonen (Punkt 5.14.2) wurden in 3 ml/g Embryonen Puffer I (15 mM Hepes/KOH, pH7,6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 350 mM Saccharose, 1 mM DTT, 1 mM Natriummetabisulfit, 0,2 mM PMSF) resuspendiert und durch einen Lauf durch einen Yamato LH-21-Homogenisator bei 1000 Upm homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch eine Lage Miracloth (Calbiochem) in GSA-Rotorbecher filtriert, wobei mit 2 ml/g Embryonen Puffer I nachgespült wurde. Nach Zentrifugation (8000 Upm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde der Überstand von den Zellkernen abgekippt und Fettreste mit Kimwipes (Kimberly-Clark) entfernt. Die Zellkerne wurden mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators mit Pistill B in 1 ml/g Embryonen Puffer AB (15 mM Hepes/KOH, pH7,6, 110 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM Natriummetabisulfit, 0,2 mM PMSF) resuspendiert. Das Homogenisat wurde in Zentrifugenröhrchen für den Beckman 45 Ti-Rotor überführt, mit 1/10 Volumen 4 M Ammoniumsulfat versetzt und für 20 min auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zentrifugation (35000 Upm, 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde der Überstand abgenommen und die Proteine durch Zugabe von 0,3 g Ammoniumsulfat pro ml Überstand über 5 min und weiteren 15 min Inkubation auf einem Magnetrührer gefällt. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (SS34, 15000 Upm, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und nach Abkippen des Überstandes in 0,1 M KCl, 1 mM Natriummetabisulfit, 0,1 mM PMSF, HEMG (0,1 ml/g Embryonen) aufgenommen. Diese Lösung wurde anschließend so lang gegen 40 mM KCl, 1 mM Natriummetabisulfit, 0,1 mM PMSF, HEMG dialysiert, bis sie eine Leitfähigkeit hatte, die einem 0,1 M KCl, HEMG-Puffer entsprach. Das Dialysat (Kernextrakt) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

5.16 Chromatographische HMT-Reinigungen

Alle Reinigungsschritte wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder auf Eis durchgeführt. Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten auf einem Äkta-FPLC- oder Äkta-Purifizier-System von Amersham. Direkt nach einem Fraktionierungsschritt wurden Aliquots für HMT-Aktivitätstests und SDS-PAGE-Analyse entnommen. Anschließend wurden die Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder in flüssigem Stickstoff oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Positiv geteste Fraktionen wurden für den nächsten Reinigungsschritt im $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad aufgetaut, sofort auf Eis gekühlt und vereint. Alle verwendeten Säulenmaterialien und Leersäulen waren von Amersham.

Laufbedingungen und Daten der verwendeten Säulen:

- Heparin-Sepharose (2,6 cm x 10 cm, 54 ml): Affinitätsreinigung von Wachstumsfaktoren und DNA-bindender Proteine. Kationentauscher; 2-5 ml/min. Selbstgegossen in XK26/20-Leersäule.
- HiTrap Heparin (1 ml): Affinitätsreinigung von Wachstumsfaktoren und DNA-bindender Proteine, Kationentauscher; 0,5-1 ml/min.

- Source15Q (1,6 cm x 6 cm, 12 ml): Anionentauscher. 2 ml/min. Selbstgegossen in HR16/10-Leersäule.
- Hydroxylapatit (1 cm x 4,7 cm, 3,7 ml): Proteine binden phosphat- und salzsensitiv an die Matrix. 1 ml/min. Selbstgegossen in C10-Leersäule.
- MiniQPE4.6/50 (0,8 ml): Anionentauscher. 0,5 ml/min.
- Q-SepharoseHP (2,6 cm x 9 cm, 48 ml): Anionentauscher. 3 ml/min. Selbstgegossen in XK26/20-Leersäule.
- Source15QPE4.6/100 (1,7 ml): Anionentauscher. 1 ml/min.
- Superdex200 16/60 (1,6 cm x 60 cm, 120 ml): Präparative Gelfiltration. Maximale Ladekapazität 4-5 ml. 1 ml/min.
- Superdex200HR10/30 (1 cm x 30 cm, 24 ml): Analytische Gelfiltration. Maximale Ladekapazität 0,4 ml. 0,4-0,5 ml/min.

5.17 Histonmethyltransferase(HMT)-Aktivitäts-Tests

Der Test auf HMT-Aktivität basiert auf der Detektion radioaktiv markierter Histonproteine, auf die eine oder mehrere Tritium(³H)-markierte Methylgruppe(n) des Methylgruppendonors S-Adenosylmethionin (SAM) übertragen wurden. Die HMT-Aktivität von Proteinfractionen und von rekombinant gewonnenen Proteinen wurde sowohl quantitativ mittels Szintillationszähler als auch qualitativ mittels SDS-PAGE und anschließender Fluorographie getestet.

Reaktionsansätze während der chromatographischen Reinigung von HMTn: 10-100 μ l der zu testenden Proteinfractionen wurden mit 50-100 μ g eines Gemisches aller Histone: H1, H2A, H2B, H3 und H4 (Histonmix, Sigma; 5 μ g/ μ l in H₂O) und 1 μ Ci [³H]-SAM in 1 μ l HMT-Puffer (Reaktionsvolumen: 100-200 μ l) für 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels TCA-Präzipitation (Punkt 5.11.6) gefällt. Statt des Acetonwaschschrittes wurde das Pellet zweimal mit 1 ml einer 20 %igen TCA-Lösung gewaschen und dazwischen zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 \times rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 100-200 μ l 1 \times Proteingelprobenpuffer+8 M Harnstoff gelöst.

Qualitative Analyse mittels Fluorographie: 20 μ l der Probe wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und das SDS-Polyacrylamidgel mit Amplify (Amersham) behandelt. Nach Trocknen des SDS-Polyacrylamidgels auf Whatman-Papier wurden radioaktiv markierte Proteine fluorographisch detektiert. Die Röntgenfilme wurden für 1-7 Tage bei -80 °C exponiert.

Quantitative Analyse mittels Szintillationszähler: 50-150 μ l der Probe wurden in 4 ml Szintillationscocktail überführt und die ³H-Aktivität im Szintillationszähler quantifiziert. Jede Probe wurde 2 \times 2 min vermessen.

Reaktionsansätze mit rekombinanten Proteinen: Bei Test der HMT-Aktivität der rekombinanten Proteine wurden verschiedene Histonsubstrate verwendet: 1-2 μ g Histonmix, 1-2 μ g aus *Drosophila*-Embryonen isolierte Histonoktamere oder Oligonukleosomen, 1 μ g rekombinant gewonnene Einzelhistone H3, H2A, H2B, H4 oder 5 μ g Peptide, die der NH₂-terminalen Sequenz des Histons H3 entsprechen. Die Flag-markierten Proteine wurden immobilisiert an M2-Agarose verwendet, jeweils 10-20 μ l der Protein-M2-Agarose, was einer Proteinmenge von 0,5-2 μ g entsprach. Von den in Lösung befindlichen His₁₀-markierten Proteinen wurden 1-2 μ g pro Assay eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden in einem

Volumen von 20 μl 1 \times HMT-Puffer für 1 h bei 30 °C inkubiert und durch Zugabe von 7 μl 4 \times Proteingelprobenpuffer und Aufkochen gestoppt. 20 μl der Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Qualitative Analyse mittels Fluorographie: Das SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Amplify (Amersham) behandelt, auf Whatman-Papier getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine fluorographisch detektiert. Die Röntgenfilme wurden für 1-21 Tage bei -80 °C exponiert.

Quantitative Analyse mittels Szintillationszähler: Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE auf PVDF-Membran transferiert und mit Coomassie gefärbt. Die Histonbanden wurden ausgeschnitten und in 4 ml Szintillationscocktail überführt. Die inkorporierten ^3H -markierten Methylgruppen wurden im Szintillationszähler quantifiziert, wobei jede Probe 2 \times 2-5 min vermessen wurde.

5.18 UV-Quervernetzung von [^3H]-SAM

Zu 15 μl der zu testenden Proteinfraction wurden 4 μCi [^3H]-SAM zugegeben und für 5 min in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis mit geöffnetem Deckel zweimal mit 0,96 Joule UV-Licht (Stratalinker, Stratagene) bestrahlt. Abstand zur UV-Röhre ca. 2 cm. Als Negativkontrolle wurden gleiche Ansätze bei normalem Raumlicht inkubiert. Nach Zugabe von 4 \times Proteingelprobenpuffer und Aufkochen wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Nach Behandlung des SDS-Polyacrylamidgels mit Amplify (Amersham) wurde es auf Whatman getrocknet und fluorographisch analysiert, wobei der Röntgenfilm 7 Tage bei -80 °C exponiert wurde. Durch Überlagerung des mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgels mit dem entwickelten Röntgenfilm konnte auf die [^3H]-SAM-Protein-Quervernetzungsprodukte geschlossen werden.

5.19 „In-Gel-Assay“: HMT-Aktivitäts-Gel-Assay

Für den „In-Gel-Assay“ wurden 15 μl der zu analysierenden Proteinfraction mit 5 μl 4 \times Proteingelprobenpuffer versetzt, aber nicht aufgeköcht. In das Trenngel des SDS-Polyacrylamidgels wurden vor der Polymerisierung 0,5 mg/ml Histonmix, 0,7 mg/ml Histonpeptid oder 0,5 mg/ml BSA (Negativkontrolle) gelöst. Nach der Elektrophorese der Proteinprobe wurde das SDS-Polyacrylamidgel 1 h bei RT in Puffer B (50 mM Tris, pH 8, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA) 20% Isopropanol und anschließend für 30 min bei RT in Puffer B gewaschen. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde in Puffer B 4M Guanidiniumhydrochlorid für 1 h bei RT und danach in bei 4 °C in Puffer B + 0,04 % Tween 20 inkubiert. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde für 10 min in HMT-Puffer äquilibriert und anschließend für 1-3 h in HMT-Puffer 40 μCi [^3H]-SAM inkubiert. Zuletzt wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit 5 % TCA-Lösung gewaschen und mit Amplify (Amersham) behandelt. Radioaktiv markierte Proteine wurden fluorographisch detektiert. Der Röntgenfilm wurde für 4 Wochen bei -80 °C exponiert.

5.20 Protein-Protein-Interaktionsexperimente

5.20.1 ASH1-TRX-Interaktion

GST-TRX (Aminosäuren 3389-3759 von TRX fusioniert an das COOH-terminale Ende von GST) und GST wurden in *E. coli* exprimiert und mit GSH-Sepharose aus dem Extrakt affinitätsgereinigt. Je 1 μg von GST-TRX und 2 μg von GST wurden direkt für die Interaktionsansätze verwendet. Die *ash1 Δ N*-Konstrukte wurden in pT \square Stop kloniert und mit dem „TNT T7 coupled transcription-translation reticulocyte lysate system“ (Promega) in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* exprimiert. Aus diesen Ansätzen wurden 5 μl in 500 μl Bindungspuffer (20 mM Tris, pH 8, 0,2 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,2 mM PMSF) gelöst und die GSH-Sepharose mit den immobilisierten Proteinen zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Proteinmatrix wurde anschließend dreimal mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen und in Proteingelprobenpuffer gekocht. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Amplify behandelt, getrocknet und mit anschließender Fluorographie analysiert.

5.20.2 Protein-Histontail-Interaktion

Die verschiedenen Histontail-Peptide (Aminosäuren 1-19 von Histon H3 + COOH-terminales Cystein; ARTKQTARKSTGGKAPRKQC) wurden über das COOH-terminale Cystein thiol-spezifisch an eine thiolreaktive Agarosematrix (Sulfolink Coupling Gel, Pierce) nach Anweisungen des Herstellers kovalent gekoppelt. Die Effizienz der Kopplung wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Peptidlösungen, vor und nach Kopplung analysiert. Verwendete Histontail-Peptide: 1) nicht modifizierte Aminosäuresequenz. 2) Lysin an Position 4 dimethyliert. 3) Lysin an Position 9 dimethyliert. 4) Lysine an den Positionen 4 und 9 dimethyliert. Als Negativkontrolle wurde die Agarosematrix ohne gekoppeltes Peptid aber mit Cystein blockiert verwendet.

Gezielte Analyse *in vitro* exprimierter und rekombinanter Proteine:

Je 10 μl der Peptid-Agarosematrizes wurden mit den zu analysierendem Proteinen (in *E. coli* exprimiertes Protein: 2 μg GST-HP1_{Chromo}; *in vitro* exprimiert mit „TNT T7 coupled transcription-translation reticulocyte lysate system“ (Promega) in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin: p48/55, 5 μl des *in vitro* Expressionsansatzes), in 500 μl 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM \square ME, pH 7,8 für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Peptidmatrizes dreimal mit 1 ml des gleichen Puffers gewaschen und die Proteine durch Zugabe von Proteingelprobenpuffer und Aufkochen eluiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot oder Fluorographie mit vorhergehender Amplify-Behandlung (Amersham) analysiert. Bei dem Western-Blot wurden die Proteine mit Antikörper gegen GST detektiert.

Identifikation von Histontail-bindenden Proteinen aus Kernextrakt:

100 μl der Peptid-Agarosematrizes wurden mit 1 ml embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt, der zuvor in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8 1:2 verdünnt wurde, für 2 h bei 4 °C auf

einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Peptidmatrizes in Mobicol-Säulen (Mobitec) überführt und mit 2 ml 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8 gewaschen. Anschließend wurden dreimal 100 μ l 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,8 zugegeben, jeweils für 10 min bei RT inkubiert und in jeweils neue Eppendorfgefäße zentrifugiert (Tischzentrifuge, 2000 Upm, 5 sek). Die Proteine wurden durch Zugabe von 1 ml Isopropanol ∞ N bei RT gefällt und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13-15000 Upm, 4 °C, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet bei RT getrocknet, in jeweils 20 μ l 1 \times Proteingelprobenpuffer aufgenommen und gekocht. Die Proben der drei Eluate wurden vereint. 15 μ l davon wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Banden von Proteinen, die eine spezifische Bindung zeigten, wurden massenspektrometrisch analysiert (Zentrale Einheit Biomolekulare Chemie, ZMBH).

5.21 Chromatin-Immunpräzipitation (XChIP)

5.21.1 Präparation und Fixierung der Imaginalscheiben des dritten Beinpaars

Oregon R *Drosophila*-Larven des dritten Larvenstadiums wurden in Wasser gespült und anschließend zur Präparation der Imaginalscheiben in eine kleine Petrischale, gefüllt mit PBS, überführt. Die Präparation erfolgte unter einem Binokular mit Pinzetten der Marke Dumont #5. Die Larven wurden zunächst halbiert. Die Kopfhälfte wurde umgestülpt und von Darmresten, Fettkörper und Bauchspeicheldrüse befreit. Anschließend wurden die Präparate auf Eis in einem Eppendorfgefäß in PBS mit den Proteaseinhibitoren Pep, Leu, Ap (je 1 μ g/ μ l) und 0,2 mM PMSF aufbewahrt. Auf diese Weise wurde für eine Dauer von einer Stunde präpariert und anschließend fixiert. Für die Fixierung wurden die Präparate kurz in PBS \square 0,8% Formaldehyd gespült und anschließend für 15 min in 1ml PBS \square 0,8% Formaldehyd auf einem Drehrad bei RT inkubiert. Nach abnehmen des Überstandes wurde die Fixierung durch Inkubation mit PBS \square 25 mM Glycin (10 min RT) abgebrochen, und die Präparate 2 \times kurz, 1 \times 3 min und 1 \times 10 min (Drehrad, RT) mit PBS/Pep/Leu/Ap/PMSF gewaschen und bei 4 °C aufbewahrt.

Spätestens am nächsten Tag wurden die Imaginalscheiben von den Kutikulas in PBS entfernt und auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Imaginalscheiben zentrifugiert (Tischzentrifuge, 4°C, 4000 Upm, 2-3 min), PBS durch 50-100 μ l Lysepuffer (25 mM Tris, pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, 0,1 % SDS) + Pep, Leu, Ap, PMSF ersetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Lyse der Zellen der Imaginalscheiben wurden 500-600 Imaginalscheiben aufgetaut und ad 1 \times Lysepuffer + Pep, Leu, Ap, PMSF aufgefüllt und sonifiziert (Microtip, 30-40 % Output, 5 sek Puls, 8-10 \square). Die Zelltrümmer wurden zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15 min, 13-15000 \square pm, 4 °C) und der Überstand abgenommen.

5.21.2 Chromatin-Immunpräzipitation

Alle folgenden Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Drehrad bei 4 °C.

Vorbereitung: Protein A-Sepharose FF (PAS, Roche) wurde mit Lysepuffer + 1mg/ml BSA + 1µg/ml Heringssperma-DNA zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vorinkubiert (2-3 h) und anschließend mit Lysepuffer gewaschen (3× Pufferwechsel). Diese blockierte PAS wurde für die Immunpräzipitation verwendet.

Pro Immunpräzipitation wurde der Überstand von 500-600 lysierten Imaginalscheiben verwendet. Zur Klärung des Überstandes wurden 25 µl blockierter PAS zugegeben (2 h). Der Überstand wurde abgenommen und mit dem Antikörper üN inkubiert. Nach Zugabe von 20-25µl blockierter PAS wurde für weitere 3 h inkubiert. Die PAS wurde anschließend verschiedenen aufeinanderfolgenden Waschschritten unterzogen (jeweils 2 min Drehrad, Zentrifugation: 4000 Upm, 1 min): 4× Lysepuffer, 4× IP1 (Lysepuffer mit 500 mM statt 140 mM NaCl), 4× IP2 (10 mM Tris, pH 8, 250 mM LiCl, 0,5 % NP-40, 0,5 % Na-Desoxycholat, 1 mM EDTA), 4× IE, pH8.

Die PAS-Komplexe wurden in 100 µl TE resuspendiert, RNase A zugegeben (Endkonz. 50 µg/ml) und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden auf 0,5 % SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K eingestellt und üN bei 37 °C und anschließend für 6 h bei 65 °C inkubiert. Zur Reinigung und Konzentrierung der DNA wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion und eine Ethanolpräzipitation durchgeführt. Bei der Phenol-/Chloroform-Extraktion wurde nach der Phenolbehandlung die Phenolphase mit 100 µl TE versetzt, um weitere DNA zu extrahieren, die nicht in der wässrigen Phase enthalten war. Die beiden wässrigen Überstände wurden dann kombiniert und mit Chloroform behandelt. Bei der Ethanol-fällung wurde zu der DNA-Lösung 1µl 20 mg/ml Glycogen als Fällungshilfe zugegeben.

5.21.3 Analyse der XChIPn durch PCR

Zur Analyse wurde eine PCR mit 1/50-1/20 der DNA-Lösung durchgeführt. Die optimale Annealing-Temperatur wurde für jedes Primerpaar anhand genomischer *Drosophila*-DNA bestimmt. Bedingungen für die PCR: x µl DNA-Probe, 0,25 µl ExTaq-Polymerase (TaKaRa), 5 µl 10× ExTaq-Puffer, 4 µl dNTP-Mix, 0,8 µM Primer1, 0,8 µM Primer2, ad 50 µl H₂O. PCR-Produkte wurden auf 1-2 %igen Agarosegelen analysiert.

6 Literatur

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M...Rubin GM, Venter JC (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.

Ahmad A, Nagamatsu N, Kouriki H, Takami Y, Nakayama T (2001). Leucine zipper motif of chicken histone acetyltransferase-1 is essential for *in vivo* and *in vitro* interactions with the p48 subunit of chicken chromatin assembly factor-1. *Nucl. Acid Res.* **29**, 629-637.

Akthar A, Becker PB (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol. Cell* **5**, 367-375.

Anderson JD, Widom J (2000). Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J. Mol. Biol.* **296**, 979-987.

Annunziato AT, Eason MB, Perry CA (1995). Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry* **34**, 2916-2924.

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.

Bantignies F, Goodman RH, Smolik SM (2000). Functional interaction between the coactivator *Drosophila* CREB-binding protein and ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 9317-9330.

Bauer UM, Daujat S, Nielsen SJ, Nightingale K, Kouzarides T (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep.* **3**, 39-44.

Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R, Schulz I, Reuter G, Aalen RB (2001). The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4319-4333.

Becker PB, Hörz W (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 247-273.

Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* **419**, 857-862.

Berger SL (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 142-148.

- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 8695-8700.
- Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Branno M, De Franciscis V, Tosis L (1983). *In vitro* methylation of histones in sea urchin nuclei during early embryogenesis. *Bioch. Biophys. Acta* **741**, 136-142.
- Brehm A, Längst G, Kehle J, Clapier CR, Imhof A, Eberharder A, Müller J, Becker PB (2000). dMi-2 and ISWI chromatin remodeling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *EMBO J.* **19**, 4332-4341.
- Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Winston F, Allis CD (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **15**, 3286-3295.
- Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD, Strahl BD (2002) Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**, 498
- Brown JL, Mucci D, Whiteley M, Dirksen ML, Kassis JA (1998). The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol. Cell* **1**, 1057-1064.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson, DG, Roth SY, Allis, CD (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851.
- Brownell JE, Allis CD (1995). An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6364-6368.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* stain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-383.
- Camato R, Tanguay RM (1982). Changes in methylation pattern of core histones during heat-shock in *Drosophila* cells. *EMBO J.* 1982xxx, 1529-1532.
- Carruthers LM, Bednar J, Woodcock CL, Hansen JC (1998). Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry* **37**, 14776-14787.
- Carruthers LM, Hansen JC (2000). The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation. *J. Biol. Chem.* **275**, 37285-37290.

- Casadaban MJ (1976). Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**, 541-555.
- Chang YL, King BO, O'Connor M, Mazo A, Huang, DH (1995). Functional reconstruction of trans regulation of the *Ultrabithorax* promoter by the products of two antagonistic genes, *trithorax* and *Polycomb*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6601-6612.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**, 2174-2177.
- Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL (1998). The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* **92**, 3025-3034.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000a). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell* **5**, 905-915.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000b). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263-271.
- Chevillard-Briet M, Trouche D, Vandel L (2002). Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J.* **21**, 5457-5466.
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185-196.
- Czermin B, Schotta G, Hulsman BB, Brehm A, Becker PB, Reuter G, Imhof A (2001). Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.* **2**, 915-919.
- Davie JK, Dent SYR (2002). Transcriptional control: An activating role for arginine methylation. *Curr. Biol.* **12**, 59-61.
- Deroo BJ, Archer TK. Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling *in vivo* (2001). *Oncogene* **20**, 3039-3046.
- Desrosiers R, Tanguay RM (1985). The modifications in the methylation patterns of H2B and H3 after heat shock can be correlated with the inactivation of normal gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 823-829.
- Desrosiers R, Tanguay RM (1988). Methylation of *Drosophila* histones at Proline, Lysine, and Arginine residues during heat shock. *J. Biol. Chem.* **263**, 4686-4692.
- Deuring R, Fanti L, Armstrong JA, Sarte M, Papoulas O, Prestel M, Daubresse G, Verardo M, Moseley SL, Berloco M, Tsukiyama T, Wu C, Pimpinelli S, Tamkun JW (2000). The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol. Cell* **5**, 355-365.

-
- Eberharter A, Becker PB (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep.* **3**, 224-229.
- Fang J, Feng Q, Ketel CS, Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Simon JA, Zhang Y (2002). Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr. Biol.* **12**, 1086-1099.
- Finley KD, Edeen PT, Foss M, Gross E, Ghbeish N, Palmer RH, Taylor BJ, McKeown M (1998). Dissatisfaction encodes a tailless-like nuclear receptor expressed in a subset of CNS neurons controlling *Drosophila* sexual behavior. *Neuron* **21**, 1363-1374.
- Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT (2002). The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem.* **277**, 3537-3543.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T (2002). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* Manuskript M210256200 im Druck.
- Grewal SI, Elgin SC (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 178-187.
- Groudine M, Weintraub H (1975). Rous sarcoma virus activates embryonic globin genes in chicken fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 4464-4468.
- Grunstein M (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol.* **166**, 557-580.
- Hayes, JJ, Hansen JC (2001). Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 124-129.
- Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL (2001). Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X Chromosome during X inactivation. *Cell* **107**, 727-738.
- Henikoff S (1996) in *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 319-334.
- Hill DA, Imbalzano AN (2000). Human SWI/SNF nucleosome remodeling activity is partially inhibited by linker histone H1. *Biochemistry* **39**, 11649-11656.
- Horard B, Tatout C, Poux S, Pirrotta V (2000). Structure of a polycomb response element and *in vitro* binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3187-3197.

- Horn PJ, Carruthers LM, Logie C, Hill DA, Solomon MJ, Wade PA, Imbalzano AN, Hansen JC, Peterson CL (2002). Phosphorylation of linker histones regulates ATP-dependent chromatin remodeling enzymes. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 263-267.
- Horn PJ, Peterson CL (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding-wrapping up transcription. *Science* **297**, 1824-1827.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002). Control of CpNpG methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**, 556-560.
- Jacobs SA, Taverna SD, Zhang Y, Briggs SD, Li J, Eissenberg JC, Allis CD, Khorasanizadeh S (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* **20**, 5232-5241.
- Jenuwein T, Laible G, Dorn R, Reuter G (1998). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci.* **54**, 80-93.
- Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jones RS, Gelbart WM (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6357-6366.
- Kelly WG, Fire A (1998). Chromatin silencing and the maintenance of a functional germline in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**, 2451-2456.
- Kennison JA (1995). The polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 289-303.
- Kennison JA, Tamkun JW (1988). Dosage-dependent modifiers of *Polycomb* and *Antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8136-8140.
- Ketel CS, Hart CM, Miller EL, Simon JA (2002). Analysis of *Drosophila* MES-4: A SET domain protein potentially involved in Polycomb group repression. *A. Dros. Res. conf.* **43** 2002:288C.
- Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**, 59-77.
- Koh SS, Chen D, Lee YH, Stallcup MR (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem.* **276**, 1089-1098.
- Koh SS, Li H, Lee YH, Widelitz RB, Chuong CM, Stallcup MR (2002). Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-cate-

- nin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J Biol Chem.* **277**, 26031-26035.
- Kouzarides T (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 198-209.
- Kuo MH, Allis CD (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615-626.
- Kuzin B, Tillib S, Sedkov Y, Mizrokhi L, Mazo A (1994). the *Drosophila trithorax* gene encodes a chromosomal protein and directly regulates the region specific homeotic gene fork head. *Genes Dev.* **8**, 2478-2490.
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Development* **16**, 2893-2905.
- Lachner M, Jenuwein T (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 286-298.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaJeunesse D, Shearn A (1995). Trans-regulation of thoracic homeotic selector genes of the Antennapedia and bithorax complexes by the trithorax group genes: *absent, small, and homeotic discs 1* and *2*. *Mech. Dev.* **53**, 123-139.
- Längst G, Becker PB (2001). Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J. Cell Sci.* **114**, 2561-2568.
- Larsson J, Zhang J, Rasmuson-Lestander A (1996). Mutations in the *Drosophila melanogaster* gene encoding S-adenosylmethionine synthetase suppress position-effect variegation. *Genetics* **143**, 887-896.
- Lee YH, Koh SS, Zhang X, Cheng X, Stallcup MR (2002). Synergy among nuclear receptor coactivators: Selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3621-3632.
- Litt MD, Simpson M, Recillas-Targa F, Prioleau MN, Felsenfeld G (2001) Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* **20**, 2224-2235.
- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked *in vitro* and *in vivo* to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* **5**, 917-926.

-
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997a). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Luger K, Rechsteiner T, Richmond TJ (1997b) Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* **272**, 301-311.
- Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R (2000). DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **408**, 538-540.
- Ma H, Baumann CT, Li H, Strahl BD, Rice R, Jelinek MA, Aswad DW, Allis CD, Hager GL, Stallcup MR (2002). Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr. Biol.* **11**, 1981-1985.
- Mak W, Baxter J, Silva J, Newall AE, Otte AP, Brockdorff N (2002). Mitotically stable association of Polycomb group proteins *eed* and *enx1* with the inactive X-chromosome in trophoblast stem cells. *Curr. Biol.* **12**, 1016-1020.
- Marmorstein R (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 422-432.
- Marmorstein R, Roth SY (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 155-161.
- McBride AE, Silver PA (2001). State of the Arg: Protein methylation at arginine comes of age. *Cell* **106**, 5-8.
- McBride AE, Weiss VH, Kim HK, Hogle JM, Silver PA (2000). Analysis of the yeast arginine methyltransferase Hmt1p/Rmt1p and its *in vivo* function. Cofactor binding and substrate interactions. *J. Biol. Chem.* **275**, 3128-3136.
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, Hess JL (2002). MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Mol. Cell* **10**, 1107-1117.
- Min J, Zhan X, Cheng X, Grewal SIS, Xu R (2002). Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 828-832.
- Mora-Bermúdez F (2002). Functional Characterization of SET Domain-Containing Proteins in *Drosophila melanogaster*. *Master of Science Thesis*.
- Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, David M (2001). Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell* **104**, 731-841.
- Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197-208.
- Murray K (1964). The occurrence of ϵ -N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* **3**, 10-15.

- Nagy PL, Griesenbeck J, Kornberg RD, Cleary ML (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 90-94.
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E (2002). ALL-1 Is a Histone Methyltransferase that Assembles a Supercomplex of Proteins Involved in Transcriptional Regulation. *Mol. Cell* **10**, 1119-1128.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-487.
- Nauber U, Pankratz MJ, Kienlin A, Seifert E, Klemm U, Jackle H (1988). Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene knirps. *Nature* **336**, 489-492.
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D (2001). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* **16**, 479-489.
- Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD, Reinberg D (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* **9**, 1201-1213.
- Nowak SJ, Corces VG (2000). Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev.* **14**, 3003-3013.
- O'Carroll D, Scherthan H, Peters AH, Opravil S, Haynes AR, Laible G, Rea S, Schmid M, Lebersorger A, Jerratsch M, Sattler L, Mattei MG, Denny P, Brown SD, Schweizer D, Jenuwein T (2000). Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 9423-9433.
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**, 1132-1136.
- Orlando V, Paro R (1993). Mapping Polycomb-repressed domains in the *bithorax complex* using *in vivo* formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* **75**, 1187-1198.
- Paik WK, Kim S (1971). Protein methylation. *Science* **174**, 114-119.
- Pankratz MJ, Jäckle H (1993). The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Papoulas O, Beek SJ, Moseley SL, McCallum CM, Sarte M, Shearn A, Tamkun JW (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* **125**, 3955-3966.
- Paro R, Hogness DS (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 263-267.
- Peters AH, Mermoud JE, O'Carroll D, Pagani M, Schweizer D, Brockdorff N, Jenuwein T (2002). Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat. Genet.* **30**, 77-80.
- Peterson CL (2002). Chromatin remodeling enzymes: taming the machines. *EMBO Rep.* **3**, 319-322.
- Peterson CL, Workman JL (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 187-192.
- Pham AD, Sauer F (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in. *Science* **289**, 2357-2360.
- Platero JS, Sharp EJ, Adler PN, Eissenberg JC (1996). *In vivo* assay for protein-protein interactions using *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma* **104**, 393-404.
- Polach KJ, Lowary PT, Widom J (2000). Effects of core histone tail domains on the equilibrium constants for dynamic DNA site accessibility in nucleosomes. *J. Mol. Biol.* **298**, 211-223.
- Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S (1999). The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 31531-31542.
- Poux S, Melfi R, Pirrotta V (2001). Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev.* **15**, 2509-2514.
- Rastelli L, Chan CS, Pirrotta V (1993). Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on Enhancer of zeste function. *EMBO J.* **12**, 1513-1522.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun Z, Schmid, M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein, T (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-599.
- Richards EJ, Elgin SC (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.
- Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, Pijnappel WW, Wilm M, Aasland R, Stewart AF (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J.* **20**, 7137-7148.

- Rozovskaia T, Tillib S, Smith S, Sedkov Y, Rozenblatt-Rosen O, Petruk S, Yano T, Nakamura T, Ben-Simchon L, Gildea J, Croce CM, Shearn A, Canaani E, Mazo A (1999). Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the Trithorax Group-Responsive *bx1* region of the *Ultrabithorax* promoter. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6441-6447.
- Sandaltzopoulos R, Ossipow V, Gdula DA, Tsukiyama T, Wu C (1999). Purification of *Drosophila* nucleosome remodeling factor. *Methods Enzymol.* **304**, 757-765.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Tolga Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407-411.
- Sauer F, Hansen SK, Tjian R (1995). DNA template and activator-coactivator requirements for transcriptional synergism by *Drosophila* Bicoid. *Science* **270**, 1825-1828.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5857-5864.
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ 3rd (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* **16**, 919-932.
- Schurter BT, Koh SS, Chen D, Bunick GJ, Harp JM, Hanson BL, Henschen-Edman A, Mackay DR, Stallcup MR, Aswad DW (2001). Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* **40**, 5747-5756.
- Sedkov Y, Benes JJ, Berger JR, Riker KM, Tillib S, Jones RS, Mazo A (1999). Molecular genetic analysis of the *Drosophila trithorax-related* gene which encodes a novel SET domain protein. *Mech Dev.* **82**, 171-179.
- Segraves WA (1991). Something old, some things new: The steroid receptor superfamily in *Drosophila*. *Cell* **67**, 225-228.
- Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* **98**, 37-46.
- Shearn A (1989). The *ash-1*, *ash-2* and *trithorax* genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics* **121**, 517-525.
- Shearn A, Hersperger E, Hersperger G (1987). Genetic studies of mutations at two loci of *Drosophila melanogaster* which cause a wide variety of homeotic transformations. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**, 231-242.
- Sif S, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kingston RE (1998). Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes Dev.* **12**, 2842-2851.
- Simon JA, Tamkun JW (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 210-218.

- Smith JJ, Rucknagel KP, Schierhorn A, Tang J, Nemeth A, Linder M, Herschman HR, Wahle E (1999). Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and *in vitro* methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J. Biol. Chem.* **274**, 13229-13234.
- Sobel RE, Cook RG, Allis CD (1994). Non-random acetylation of histone H4 by a cytoplasmic histone acetyltransferase as determined by novel methodology. *J. Biol. Chem.* **269**, 18576-18582.
- Soppe WJJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Hunag MS, Jacobsen SE, Schubert I, Franz PF (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**, 6549-6559.
- Stassen MJ, Bailey D, Nelson S, Chinwalla V, Harte PJ (1995). The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech. Dev.* **52**, 209-223.
- Stec I, Wright TJ, van Ommen GJ, de Boer PA, van Haeringen A, Moorman AF, Altherr MR, den Dunnen JT (1998). WHSC1, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a *Drosophila* dysmorphism gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Hum Mol Genet.* **7**, 1071-1082.
- Strahl BD, Allis CD (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Strahl BD, Briggs SD, Brame CJ, Caldwell JA, Koh SS, Ma H, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Stallcup MR, Allis CD (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs *in vivo* and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr. Biol.* **11**, 996-1000.
- Strahl BD, Grant PA, Briggs SD, Sun ZW, Bone JR, Caldwell, JA, Mollah S, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD (2002). Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1298-1306.
- Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14957-14972.
- Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **9**, 1-4.
- Strutt H, Cavalli G, Paro R (1997). Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J.* **16**, 3621-3632.
- Suka N, Suka Y, Carmen AA, Wu J, Grunstein M (2001). Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol. Cell* **8**, 473-479.

- Sun ZW, Allis CD (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**, 104-108.
- Suzuki T, Kawasaki H, Yu RT, Ueda H, Umesono K (2001). Segmentation gene product Fushi tarazu is an LXXLL motif-dependent coactivator for orphan receptor FTZ-F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12403-12408.
- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* **16**, 1779-1791.
- Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y (2001). SET domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* **276**, 25309-25317.
- Tamaru H, Selker EU (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**, 277-283.
- Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR (1998). PRMT3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* **273**, 16935-16945.
- Teysier C, Chen D, Stallcup MR (2002). Requirement for Multiple Domains of the Protein Arginine Methyltransferase CARM1 in Its Transcriptional Coactivator Function. *J. Biol. Chem.* **277**, 46066-46072.
- Thomas G, Lange HW, Hempel K (1975). Kinetics of histone methylation *in vivo* and its relation to the cell cycle in Ehrlich ascites tumor cells. *Eur. J. Biochem.* **51**, 609-615.
- Tillib S, Petruk S, Sedkov Y, Kuzin A, Fujioka M, Goto T, Mazo A (1999). Trithorax- and Polycomb group response elements within an *Ultrabithorax* transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5189-5202.
- Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 373-383.
- Triebel RC, Beach BM, Dirk LMA, Houtz RL, Hurley JH (2002). Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase. *Cell* **111**, 91-103.
- Tripoulas NA, Hersperger E, LaJeunesse D, Shearn A (1994). Molecular genetic analysis of the *Drosophila melanogaster* gene *absent, small or homeotic discs1 (ash1)*. *Genetics* **137**, 1027-1038.
- Tripoulas N, LaJeunesse D, Gildea J, Shearn A (1996). The *Drosophila ash1* gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. *Genetics* **143**, 913-928.

- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* **13**, 3822-3831.
- Tsukiyama T, Wu C (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* **83**, 1011-1020.
- Turner BM (1993). Decoding the nucleosome. *Cell* **75**, 5-8.
- Turner BM (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-845.
- Turner BM (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**, 285-291.
- Turner BM, Birley AJ, Lavender J (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* **69**, 375-384.
- Tyler JJ, Bulger M, Kamakaka RT, Kobayashi R, Kadonaga JT (1996). The p55 subunit of *Drosophila* Chromatin Assembly Factor 1 is homologous to a Histone Deacetylase-associate protein. *Mol. Cell. Biol* **16**, 6149-6159.
- Ueda H, Sonoda S, Brown JL, Scott MP, Wu C (1990). A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes Dev.* **4**, 624-635.
- van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**, 745-756.
- Vandel L, Trouche D (2001). Physical association between the histone acetyltransferase CBP and a histone methyltransferase. *EMBO Rep.* **2**, 21-26.
- Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**, 95-104.
- Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B (1998). Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol.* **8**, 96-108.
- Wampler SL, Tyree CM, Kadonaga JT (1990). Fractionation of the General RNA Polymerase II Transcription Factors from *Drosophila* Embryos. *J. Biol. Chem.* **265**, 21223-21231.
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y (2001a). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**, 853-857.
- Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y (2001b). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Cell* **8**, 1207-1217.
- Wang J, Mager J, Chen Y, Schneider E, Cross JC, Nagy A, Magnuson T (2001c). Impaired X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nat. Genet.* **28**, 371-375.

- Weiss VH, McBride AE, Soriano MA, Filman DJ, Silver PA, Hogle JM (2000). The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1165-1171.
- White CL, Suto RK, Luger K (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J.* **20**, 5207-5218.
- Wilson JR, Jing C, Walker PA, Martin SR, Howell SA, Blackburn GM, Gamblin SJ, Xiao B (2002). Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9. *Cell* **111**, 105-115.
- Wolffe AP, Guschin D (2000). Chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J. Struct. Biol.* **129**, 102-122.
- Woodcock CL, Dimitrov S (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 130-135.
- Workman JL, Kingston RE (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 545-579.
- Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* **294**, 2507-2511.
- Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, Wang W (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* **2**, 851-861.
- Yang L, Xia L, Wu DY, Wang H, Chansky HA, Schubach WH, Hickstein DD, Zhang Y (2002). Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* **21**, 148-152.
- Yu Y, Li W, Su K, Yussa M, Han W, Perrimon N, Pick L (1997). The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein Ftz. *Nature* **385**, 552-555.
- Zegermann P, Canas B, Pappin D, Kouzarides T (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 11621-11624.
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* **13**, 1924-1935.
- Zhang Y, Reinberg D (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**, 2343-2360.

Zhang X, Tamaru H, Khan SI, Horton JR, Keefe LJ, Selker EU, Cheng X (2002). Structure of the *Neurospora* SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell* **111**, 117-127.

Zhang X, Zhou L, Cheng X (2000). Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J.* **19**, 3509-3519.

7 Veröffentlichung

Teile der Arbeit sind veröffentlicht in:

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E., Sauer, F. (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* **419**, 857-862.

8 Zusammenfassung

In eukaryotischen Zellen ist die DNA mit Histonen und anderen chromosomalen Proteinen zu Chromatin komplexiert. Das sich wiederholende Grundelement des Chromatins, das Nukleosom, besteht aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4, um die 146 Basenpaare DNA gewunden sind. Durch Kondensierung der Nukleosomenreihen bilden sich übergeordnete Chromatinstrukturen, die noch wenig verstanden sind. Zur Ausführung DNA-abhängiger Prozesse muss die Verpackung der DNA teilweise gelockert werden, um zu gewährleisten, dass die ausführenden Proteine Zugang zu ihren Zielsequenzen haben. Daher existieren verschiedene biochemische Systeme, die die grundlegende Struktur des Chromatins dynamisch kontrollieren. Das Zusammenspiel verschiedener Histonmodifizierungen, wie Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung setzt sowohl synergistische als auch antagonistische Signale, die mit der Häufigkeit, mit der ein Gen transkribiert wird, korrelieren. Dieser „Histoncode“ erzeugt eine Architektur des Chromatins, die von Nichthistonproteinen erkannt wird und dann den Übergang zwischen transkriptionsaktiven und –inaktiven Chromatinodomänen bewirken.

Untersuchungen in den 1970er und 1980er Jahren zeigten für die Histonmethylierung, die sowohl an Argininen als auch an Lysinen erfolgen kann, eine Beteiligung an der eu- und heterochromatischen Transkriptionsregulation. Enzyme, die Histone methylieren können, waren jedoch zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

Durch die chromatographische Fraktionierung von embryonalem *Drosophila*-Kernextrakt konnten hier drei argininspezifische Histonmethyltransferasen identifiziert werden, die den Säugerproteinen CARM1, PRMT1 und PRMT3 homolog sind. Die cDNAs wurden kloniert und die rekombinanten Proteine biochemisch charakterisiert.

Während dieser Arbeit wurden von anderen Gruppen mehrere lysinspezifische Histonmethyltransferasen mit dem katalytisch aktiven Cys-SET(-Domäne)-Cys-Sequenzmotiv in Säugern und Hefe identifiziert. Außerdem wurde eine zentrale Rolle der lysinspezifischen Histonmethylierung in der epigenetischen Genrepression gezeigt.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden sieben in *Drosophila* vorkommende Cys-SET-Cys-Proteine identifiziert und kloniert. Für alle Proteine wurde Histonmethyltransferase-Aktivität mit teilweise unterschiedlicher Substratspezifität gezeigt. Darunter befindet sich auch ASH1 (Absent, Small or Homeotic discs), ein bekannter epigenetischer Aktivator der Trithorax-Gruppe. ASH1 methyliert in Histon H3 Lysin 4 und 9 und in Histon H4 Lysin 20. Die ASH1-abhängige Transkriptionsaktivierung konnte mit der Methylierung der drei Lysinreste in der Promotorregion von ASH1-Zielgenen korreliert werden. Mittels *in vitro* Interaktionsexperimenten und Chromatin-Immünpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass durch ASH1-vermittelte Histonmethylierung die Assoziation von Repressoren, wie Polycomb und Heterochromatin-Protein 1 (HP1), verhindert wird. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der epigenetischen ASH1-abhängigen Aktivierung der *Ultrabithorax*-Transkription in *Drosophila* mit ASH1-vermittelter Histonmethylierung und Rekrutierung oder Stabilisierung der Bindung des aktivierenden Chromatin-Remodelling-Komplexes BRAHMA, dem *Drosophila* SWI/SNF-Homolog, nachgewiesen werden. Die Histonmethyltransferase-Aktivität von ASH1 könnte daher spezifische Signale für die Etablierung epigenetisch aktiver Transkriptionsmuster setzen.

Diese Arbeit legt die Grundlagen für die Einbeziehung des Modellsystems *Drosophila melanogaster* in die Erforschung der Funktionen der Histonmethylierung, für ein besseres Verständnis der epigenetischen Aktivierung und erweitert die Komplexität des „Histoncodes“.