

Posttranslationale
Chromatin-Modifikationen in
Dictyostelium discoideum

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von:

Balint Földesi

Kassel im März 2010

Datum der Disputation: 31.05.2010

1 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, 07.06.2010

Balint Földesi

2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Genetik der Universität Kassel unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Nellen durchgeführt. Diesem möchte ich an dieser Stelle für die Möglichkeit zur eigenständigen Bearbeitung dieses interessanten Themas besonders danken. Prof. Dr. Friedrich W. Herberg danke ich für seine Bereitschaft, sich als Zweitgutachter der Arbeit zu widmen sowie dafür, die für dieses Thema so wichtige Massenspektrometrie einsetzen zu können. Prof. Dr. Mireille Schäfer und Prof. Dr. Markus Maniak danke ich dafür, sich als Mitglieder der Prüfungskommission zur Verfügung zu stellen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Oliver Bertinetti aus der Abteilung Biochemie für die Vermessung der Proteinproben sowie bei Sonja Fuhrmann und Sonja Kasten aus der Abteilung Genetik für die Bereitstellung von Puffern, Lösungen und sonstigen Materialien. Ein besonderer Dank gebührt Birgit Jaeger für ihre jahrelange Unterstützung vor und während meiner Promotion bei allerhand Formalitäten.

Für ihre hilfreichen Anmerkungen zu dem Manuskript dieser Dissertation möchte ich mich auch ausdrücklich bei Frauke Hänel und Katharina Moog bedanken. Allen weiteren Mitgliedern der Abteilungen Genetik, Molekulare Interaktion und Zellbiologie sei für das angenehme und rücksichtsvolle Arbeitsklima während der gemeinsamen Jahre gedankt. Zu guter Letzt möchte ich nicht versäumen, mich auch bei allen Praktikanten zu bedanken, die durch ihre Experimente einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

3 Zusammenfassung

Die Erforschung posttranslationaler Veränderungen von Chromatin-Komponenten stellt einen wichtigen Pfeiler der Epigenetik dar. Epigenetische Mechanismen verändern die Aussagekraft der DNA-Sequenz und entscheiden somit beispielsweise über die Aktivierung oder Stilllegung von Genen. Ein häufiges Ziel der Stilllegung sind springende genetische Elemente, die ansonsten zur Destabilisierung des Genoms führen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Stilllegungsmechanismen der Transposons DIRS-1 und Skipper aus *Dictyostelium discoideum* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, auf welche Weise die RNA-Interferenz (RNAi) zur Zerstörung des DIRS-1 Transkripts führt und dass die Ursache dafür in der Promotor-Aktivität des Elements selbst liegt. Eine überraschende Erkenntnis konnte auch für das zweite Element gewonnen werden. Experimente legen nahe, dass die in der kodierenden Skipper-Sequenz gefundene Chromo-Domäne zu einer gezielten Integration des Elements in bereits stillgelegte heterochromatische Bereiche führt. Diese zeichnen sich vor allem durch eine spezielle posttranslationale Histon-Modifikation, der Methylierung von Lysin 9 des Histons H3 (H3K9), aus.

Während zu der Methylierung von H3K9 bereits Arbeiten erschienen sind, war ein Großteil der anderen in *Dictyostelium discoideum* kodierten Histon-Modifikationen bislang unbekannt. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte erstmalig eine umfassende Karte der veränderten Aminosäuren erstellt werden. Dabei konnten neue, bislang für keinen Organismus beschriebene Modifikationsziele identifiziert werden. Weitere lassen durch einen Vergleich mit Modellorganismen wie Hefe und Fruchtfliege Schlüsse auf die Evolution des Histon-Codes zu. Die erstellte Karte kann in Zukunft Forschern als Grundlage dienen, um weitergehende Fragestellungen in Bezug auf die Funktionen der hier vorgestellten Modifikationen zu erforschen.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit stellt die Charakterisierung posttranslationaler Veränderungen des an H3K9 bindenden Heterochromatin-Proteins 1 (HP1) dar. Neben einer ersten Analyse der in *Dictyostelium discoideum* vorhandenen Modifikationen der beiden Homologe HcpA und HcpB, wurde auch die Funktion der in der Chromoshadow-Domäne lokalisierten Acetylierung erforscht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des veränderten Lysins zu einem deutlichen Phänotyp in der Sporenform und im Wachstum der Zellen führt. Als Ursache dafür konnte eine Veränderung in der Fähigkeit zur Gen-Stilllegung durch das mutierte HP1-Protein nachgewiesen werden. Dies gelang mit Hilfe eines dafür etablierten Reporters auf Basis des Gal4/UAS-Systems aus der Fruchtfliege und beweist erstmalig die Funktion einer Acetylierung der HP1-Proteine.

4 Inhaltsverzeichnis

1	Erklärung.....	2
2	Danksagung.....	3
3	Zusammenfassung	4
4	Inhaltsverzeichnis.....	5
5	Abkürzungsverzeichnis.....	8
6	Einleitung.....	10
6.1	Histone.....	10
6.2	Histon-Varianten	12
6.3	Der Histon-Code	13
6.4	Modifikationsenzyme.....	15
6.5	Bindungsmodule	17
6.6	Heterochromatin-Protein 1.....	18
6.7	Epigenetik in <i>Dictyostelium discoideum</i>	20
7	Materialien	21
7.1	Geräte	21
7.2	Verbrauchsmaterialien	22
7.3	Kits.....	23
7.4	Chemikalien	23
7.5	Puffer und Lösungen	25
7.6	Antibiotika	30
7.7	Nährmedien.....	30
7.8	Enzyme	32
7.9	Enzypuffer	32
7.10	Antikörper.....	32
7.11	Größenstandards	33
7.12	Bakterienstämme.....	33
7.13	<i>Dictyostelium</i> -Stämme.....	33
7.14	Oligonucleotide.....	33
7.15	Plasmide	35
7.15.1	Plasmide anderer Arbeiten.....	35
7.15.2	Plasmide dieser Arbeit.....	36
7.15.3	Plasmidkarten.....	42
8	Methoden	48

8.1	Zellbiologische Methoden.....	48
8.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	48
8.1.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	48
8.1.3	Anzucht von <i>Dictyostelium discoideum</i>	48
8.1.4	Transformation von <i>Dictyostelium discoideum</i>	49
8.1.5	Subklonierung von <i>Dictyostelium discoideum</i>	49
8.1.6	Herstellung von Sporen.....	50
8.1.7	UV-Mutagenese.....	50
8.1.8	Sporulationsversuch.....	50
8.1.9	Wachstumskurven.....	51
8.1.10	Untersuchung der Entwicklung von <i>Dictyostelium discoideum</i>	51
8.2	Proteinbiochemie.....	52
8.2.1	Isolation von Proteinen.....	52
8.2.2	SDS-PAGE.....	54
8.2.3	SDS-Gradientengelelektrophorese.....	55
8.2.4	AU-PAGE.....	55
8.2.5	Coomassie-Färbung.....	56
8.2.6	Western Blot.....	56
8.2.7	Immundetektion.....	57
8.2.8	Massenspektrometrie.....	58
8.3	Molekularbiologische Methoden.....	58
8.3.1	PCR.....	58
8.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	59
8.3.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	59
8.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	59
8.3.5	Fällen von Nukleinsäuren.....	60
8.3.6	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	60
8.3.7	Plasmidpräparationen.....	61
8.3.8	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	61
8.3.9	Erzeugen von glatten DNA-Enden.....	62
8.3.10	Erzeugen von 3'A-Überhängen.....	63
8.3.11	Mutagenese von DNA-Fragmenten.....	63
8.3.12	Isolation von genomischer DNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	65

8.3.13	Radioaktive Markierung von DNA durch Oligonukleotide	66
8.3.14	RNA-Isolation aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	66
8.3.15	Northern Blot	67
8.4	Mikroskopische Methoden.....	67
8.4.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	67
8.4.2	<i>In vivo</i> Zellbeobachtung	68
8.4.3	Nocodazol Behandlung.....	68
8.4.4	Fixierung von Zellen.....	68
8.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz	69
9	Ergebnisse	71
9.1	Stilllegung von Retroelementen.....	71
9.1.1	Einfluss von Skipper und DIRS-1 Sequenzen auf benachbarte Promotoren	72
9.1.2	Inhibierung der GFP-Expression durch Einsatz des DIRS-1 rLTR als 3'-UTR.....	75
9.1.3	Untersuchung der Promotoraktivität des DIRS-1 rLTR und Skipper LTR.....	78
9.1.4	Heterochromatin-Targeting des Skipper-Retroelements.....	80
9.2	Posttranslationale Modifikationen von Histonen	84
9.2.1	Histone in <i>Dictyostelium discoideum</i>	84
9.2.2	Histon H2B Varianten in <i>Dictyostelium discoideum</i>	86
9.2.3	Massenspektrometrische Untersuchungen der Histone	89
9.2.4	Untersuchung der H2Bv3(K107)-Modifikationen	98
9.2.5	Posttranslationale Histon-Modifikationen in der Entwicklung.....	103
9.3	Posttranslationale Modifikationen von Heterochromatin-Proteinen	105
9.3.1	HcpB-Isoformen	105
9.3.2	Massenspektrometrische Untersuchungen der HP1-Proteine.....	108
9.3.3	Untersuchung der HP1-Acetylierung.....	112
9.3.4	Phänotyp der HcpAB ^{KO} -HcpA(K203R)-Mutante.....	114
9.3.5	Funktion der HP1-Acetylierung.....	121
10	Diskussion	123
10.1	Stilllegung von Retrotransposons.....	123
10.2	Der Histon-Code in <i>Dictyostelium discoideum</i>	127
10.3	Der HP1-Code in <i>Dictyostelium discoideum</i>	134
11	Anhang.....	137
12	Referenzen.....	140

5 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonuimpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Säure/Harnstoff
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSr	Blasticidinresistenz
C	Cytosin
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTBP	Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektroporation
G	Guanin
G418	Geneticin
GBP	GFP-bindendes Protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunden
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDM	Histon-Demethylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMT	Histon-Methyltransferase

KA	<i>Klebsiella aerogenes</i>
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minute
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NLS	Kernlokalisationsignal
ORF	Offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RGB	Rot/Grün/Blau
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	<i>Unit</i>
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt

6 Einleitung

6.1 Histone

Die Verpackung der rund zwei Meter langen genomischen DNA einer humanen Zelle in den nur wenige Mikrometer großen Kern erfolgt in erstaunlich strukturierter Art und Weise (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Die unterste Ebene dieser Verpackung resultiert dabei aus der dreidimensionalen Struktur der DNA-Doppelhelix selbst (Watson und Crick, 1953). Während dieser Schritt noch ohne jegliche Proteine auskommt, spielen bereits in der nächsten Verpackungsstufe die Histone-Proteine eine entscheidende Rolle.

Histone wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts vom deutschen Physiologen Albrecht Kossel entdeckt (Kossel, 1884). Bei ihnen handelt es sich um kleine, durch ihren hohen Gehalt an Arginin und Lysin basische Proteine. Die Verbindung von jeweils zwei Kopien der vier Kern-Histone H2A, H2B, H3 und H4 mit der darum gewundenen DNA bildet den sogenannten Nukleosomenkernpartikel. Wie in Abbildung 1 dargestellt entsteht durch die Zusammenlagerung von zwei Histone H3/H4 Dimeren zunächst ein stabiles Tetramer (Kornberg und Thomas, 1974; Roark *et al.*, 1974), zusammen mit zwei einzelnen Histone H2A/H2B Dimeren (Kelley, 1973) schließlich das Histone-Oktamer. Die Proteine interagieren dabei über ihre zentral gelegenen, hydrophoben Histone-Faltungs-Domänen (Luger *et al.*, 1997; Davey *et al.*, 2002).

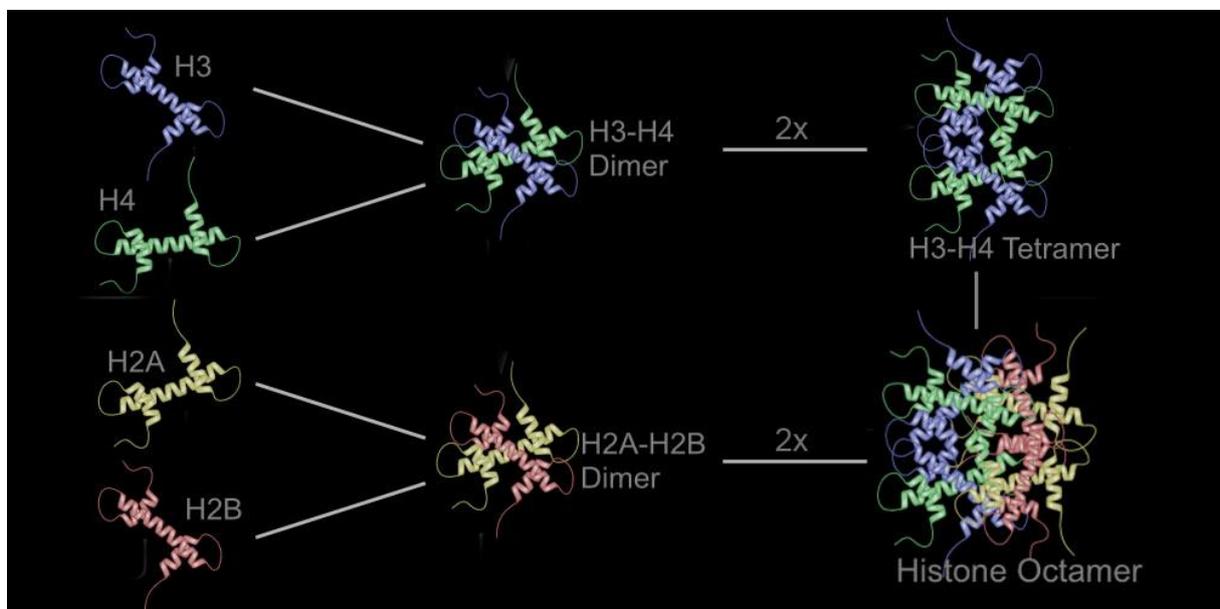


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildung eines typischen Nukleosomenkerns. Die Histone H3 und H4 formen dabei zuerst ein Dimer, bevor sich zwei Dimere zu einem stabilen Tetramer zusammenfinden. Das Histone-Oktamer entsteht schließlich durch die Bindung von zwei einzelnen, aus Histone H2A und H2B bestehenden Dimeren. (Die Abbildung basiert auf dem Bild „Nucleosome structure.png“ des Urhebers Richard Wheeler aus der freien Mediendatenbank „Wikimedia Commons“ und steht unter der GNU-Lizenz für freie Dokumentation.)

Wie in Abbildung 2 zu sehen, ist die DNA als linksgängige Schraube in 1,65 Windungen um das Histon-Oktamer organisiert, wobei die Länge der gebundenen DNA zirka 147 Bp beträgt (Richmond und Davey, 2003). Außerhalb des Nukleosomenkerns befindet sich oft das sogenannte Linker-Histon H1, welches dort den Ein- und Austrittswinkel der freien, zwischen den Nukleosomen befindlichen DNA moduliert (Bednar *et al.*, 1998). Während die Faltungs-Domänen der Histone H2A, H2B, H3 und H4 die zentrale Struktur des Nukleosoms bilden, ragen deren N- sowie C-Termini aus diesem Kern heraus (Hacques *et al.*, 1990). Sie sind dort für zahlreiche Faktoren zugänglich und sind wichtiger Bestandteil der später als Histon-Code besprochenen Funktion dieser Proteine.

Zwischen den einzelnen Nukleosomen bleiben typischerweise 10-80 bp der Linker-DNA ungebunden. Die dadurch separierten Nukleosomen sind dabei nicht statisch auf dem DNA-Strang verteilt. Da freie DNA für viele der interagierenden Enzyme zugänglicher ist, andere aber nur nukleosomale DNA binden, kann die Position der Nukleosomen die Genexpression positiv wie negativ beeinflussen (Lu *et al.*, 1995; Wyrick *et al.*, 1999). Anders als bei vielen anderen DNA-bindenden Proteinen erfolgt die Ausrichtung dabei nicht durch die Präferenz spezifischer Basen, sondern aufgrund der mechanischen Eigenschaften einzelner DNA-Bereiche (zusammengefasst in Segal und Widom, 2009). Während sich natürlicherweise die gebundenen DNA-Sequenzen von Nukleosom zu Nukleosom unterscheiden, können diese auch durch den Einbau spezieller Histon-Varianten verändert sein.

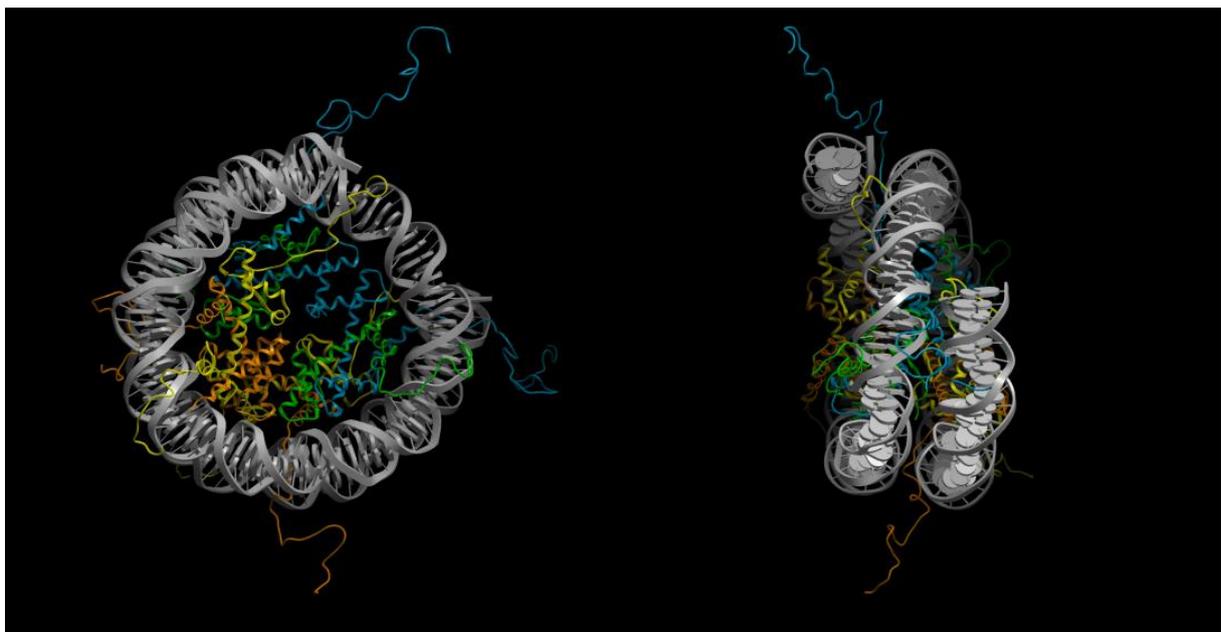


Abbildung 2: Dreidimensionale Darstellung des Nukleosomenkernpartikels in 1,9 Å Auflösung. Deutlich sind die aus dem zentralen Oktamer-Kern herausragenden terminalen Histon-Bereiche zu erkennen (DNA: Grau, Histon H3: Blau, H4: Grün, H2A: Gelb, H2B: Orange). Erstellt mit der Software Molsoft Molbrowser 3.6 (www.molsoft.com) anhand der Kristallstruktur des *Xenopus laevis* Nukleosoms (PDB: 1KX5).

6.2 Histon-Varianten

Neben den fünf Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 besitzen die meisten Organismen zahlreiche Subtypen, um spezielle Nukleosomen bilden zu können. Die weitaus größte Variabilität zeigt dabei Histon H1, von dem alleine in Säugern elf verschiedene Varianten kodiert werden. Die Expression der Varianten ist dabei auf bestimmte Zelltypen beschränkt (Wisniewski *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu konnten für Histon H4 bislang keine weiteren spezialisierten Formen gefunden werden.

Die bekanntesten Histon-Varianten stellen sicherlich die von Histon H2A abgeleiteten Proteine dar. Die Kristallstruktur des innerhalb der Eukaryoten hochkonservierten H2AZ legt einen destabilisierenden Einfluss dieser Variante auf das Nukleosom nahe (Suto *et al.*, 2000). Obwohl es zu den am besten untersuchten Histon-Subtypen gehört, ergeben die Veröffentlichungen noch kein klares Bild über die Funktion. Die hohe Konzentration von 10 % des gesamten H2A-Levels sowie die Letalität des Knockouts in Säugern und der Fruchtfliege belegen jedoch die biologische Relevanz des Proteins (van Daal und Elgin, 1992; Faast *et al.*, 2001). Der Knockout der H2A-Variante H2AX zeigt hingegen einen weniger starken Effekt. Durch das gehäufte Vorkommen des C-terminal an einem Serin phosphorylierten H2AX in der Nähe von Doppelstrang-Brüchen konnte diese Variante allerdings mit der DNA-Reparatur in Verbindung gebracht werden (zusammengefasst in Redon *et al.*, 2002). Das nur in Säugern vorkommende macroH2A wird durch sein Vorkommen auf dem inaktivierten X-Chromosom sowie DNA-methylierten Bereichen mit inaktivem Chromatin assoziiert (Costanzi und Pehrson, 1998; Choo *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wird das in Wirbeltieren gefundene Histon H2A.Bbd mit aktiver Transkription verbunden (Chadwick und Willard, 2001).

Die zweite große Gruppe stellen die verschiedenen Histon H3 Varianten dar. Zu ihnen gehört neben der häufigsten, als H3.1 bezeichneten Form auch das fast identische, mit Heterochromatin assoziierte Histon H3.2 (Hake *et al.*, 2006). Das im Euchromatin zu findende Histon H3.3 unterscheidet sich ebenfalls kaum von den vorhergegangenen, führt allerdings zu deutlich instabileren Nukleosomen (Jin und Felsenfeld, 2007). Eine weitere Histon-Variante findet sich speziell in centromerischen Nukleosomen. Das in Pflanzen als CenH3 und bei Säugern als CENP-A bezeichnete Protein ist dort zwischen die Histon H3 enthaltenden Nukleosomen eingestreut. Ähnlich wie die centromerischen DNA-Sequenzen ist auch die Sequenz des centromerischen Histons H3 zwischen den Organismen nur schwach konserviert. Der wichtige Einfluss des Proteins bei der Aufrechterhaltung der Centromer-Funktion ist jedoch unstrittig (zusammengefasst in Black und Bassett, 2008).

6.3 Der Histon-Code

Lange ging man davon aus, dass Histone einzig der Verpackung von DNA dienen. Durch die Entdeckung des durch kovalente Modifikationen spezifischer Aminosäuren verschlüsselten Histon-Codes (Strahl und Allis, 2000) hat sich diese Ansicht grundlegend verändert. Dieser liefert in Kombination mit Histon-Varianten die Grundlage zur Errichtung zeitlich und räumlich differenzierter Chromatin-Bereiche.

Die ersten Beschreibungen posttranslational modifizierter Histone erfolgten bereits Mitte der 1960er Jahre. Bei der Analyse von Histonen aus Kalbsthymus konnten methylierte, kurze Zeit später auch acetylierte Lysine nachgewiesen werden (Allfrey *et al.*, 1964; Murray, 1964). Seitdem wurden weitere Modifikationen wie Arginin-Methylierung, Phosphorylierung, Citrullinierung, Biotinylierung, Ubiquitinierung, ADP-Ribosylierung, Prolin-Isomerisierung und SUMOylierung mit Histonen in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Kouzarides, 2007). Der jüngste Vertreter in dieser Reihe stellt die Lysin-Formylierung dar (Jiang *et al.*, 2007; Wisniewski *et al.*, 2007). Die ebenfalls erst kürzlich beschriebene Acetylierung und Methylierung von Alanin konnte bislang lediglich für Trypanosomen belegt werden (Janzen *et al.*, 2006; Mandava *et al.*, 2007). Durch die verschieden starke Ausprägung einzelner Modifikationen wird die Komplexität zudem weiter gesteigert. So kann Lysin mit einer, zwei oder drei Methylgruppen versehen werden (Abbildung 3). Bei der Methylierung von Arginin findet man neben der Monomethylierung auch eine symmetrische oder asymmetrische Dimethylierung. Die Modifikationen sind dabei nicht auf einzelne Histone oder Proteindomänen beschränkt (Abbildung 4). Während sich die frühen Publikationen ausschließlich auf die terminalen Histon-Bereiche konzentrierten, konnten inzwischen auch zahlreiche Modifikationen innerhalb der Histon-Faltungs-Domänen belegt werden. Diese lassen sich im Hinblick auf die Lage innerhalb des Nukleosomenkernpartikels weiter unterscheiden (zusammengefasst in Mersfelder und Parthun, 2006).

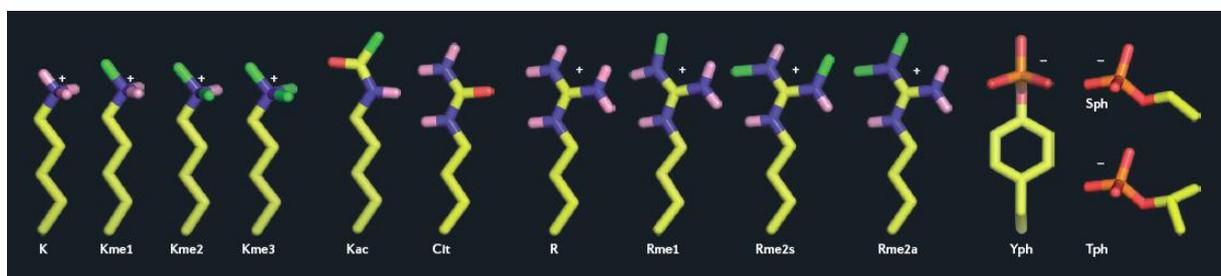


Abbildung 3: Stäbchenmodell der wichtigsten posttranslationalen Histon-Modifikationen (entnommen aus Li *et al.*, 2007). Hierzu gehören die Mono-, Di- und Trimethylierung sowie die Acetylierung von Lysin (K), die Citrullinierung, Mono- sowie symmetrische und asymmetrische Dimethylierung von Arginin (R) und die Phosphorylierung von Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin (Y). Gelb: Kohlenstoff; Blau: Stickstoff; Rosa: polarer Wasserstoff; Rot: Sauerstoff; Orange: Phosphat; Grün: Methylgruppe.

Die auf den flachen Seiten gelegenen Modifikationen spielen wahrscheinlich eine Rolle bei internukleosomalen Wechselwirkungen, während laterale Modifikationen vorzugsweise die DNA-Bindung modulieren. Intranukleosomal wirken vor allem Veränderungen innerhalb der Histon-Histon Interaktionsbereiche.

Die bekannteste Modifikation terminaler Histon-Bereiche stellt die Methylierung von Lysin 9 an Histon H3 (H3K9) dar. Sie markiert beispielsweise in Säugern je nach Ausprägung fakultatives oder konstitutives Heterochromatin, also Bereiche zeitlich begrenzter oder dauerhafter Genstilllegung (Rice *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu führt die Acetylierung der gleichen Aminosäure zu offenem, transkriptionell aktivem Chromatin (Bernstein *et al.*, 2005). Die am besten untersuchte Modifikation der flachen Nukleosomenseite ist die Methylierung von Lysin 79 an Histon H3 (H3K79). Diese steht mit aktivem Chromatin in Verbindung, während das Fehlen der Modifikation wiederum stillgelegte Bereiche markiert (Ng *et al.*, 2003). Ein Beispiel für eine Veränderung der lateralen Nukleosomen-Oberfläche ist die Acetylierung von H3K56. Sie ist ein Merkmal neu hergestellter H3-Moleküle und erfolgt im Zusammenhang mit der Replikation und Reparatur von DNA (Masumoto *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008b). Die Acetylierung von H4K91 stellt einen Vertreter des letzten Typus dar. Die zwischen H2A/H2B-Dimeren und H3/H4-Tetramer gelegene Modifikation führt zu einer Destabilisierung des Histon-Oktamers (Ye *et al.*, 2005). Dadurch kontrolliert sie wahrscheinlich den Ein- und Ausbau des fertigen Nukleosoms während der Transkription oder im Rahmen anderer Prozesse (Mersfelder und Parthun, 2006). Um die sich in Lage und Form unterscheidenden Modifikationen zu erzeugen, werden stark spezialisierte Enzyme benötigt.

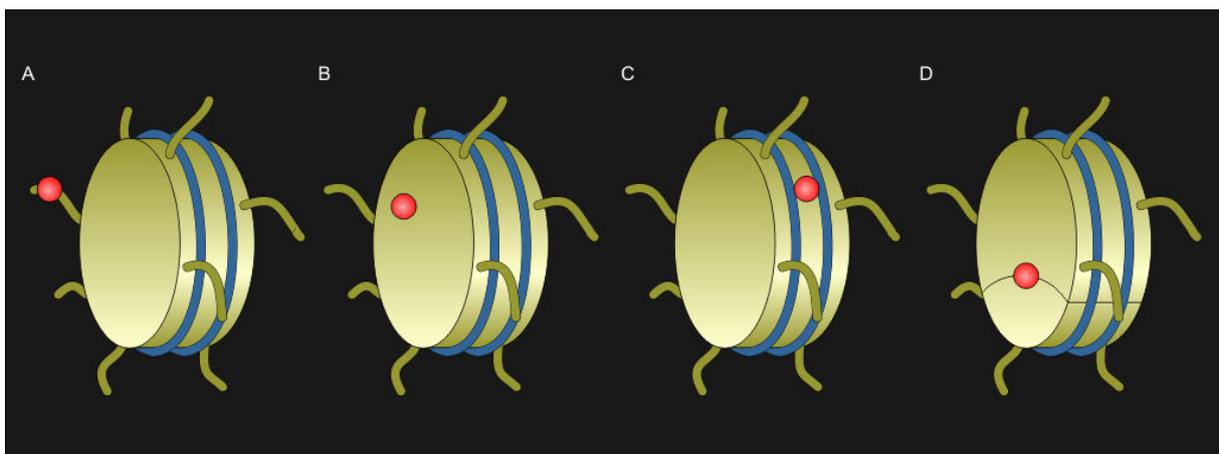


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lage von Histon-Modifikationen auf dem Nukleosomenkernpartikel (Rot: Modifikation, Blau: DNA, Gelb: Nukleosom). Hierbei lassen sich folgende Typen unterscheiden: A) Modifikation terminaler Histon-Bereiche, B) Modifikationen der flachen Nukleosomenseite, C) Modifikationen der lateralen Nukleosomen-Oberfläche und D) Modifikationen der Histon-Histon Interaktionsbereiche.

6.4 Modifikationsenzyme

Zu der Klasse der Modifikationsenzyme zählen zum einen Proteine, die die kovalenten Verbindungen an den Aminosäuren knüpfen und zum anderen solche, die die Verbindungen wieder lösen. Dazu gehören die Histon-Acetyltransferasen (HATs) und deren Gegenspieler, die Histon-Deacetylasen (HDACs). Der erste Vertreter einer Histon-Acetyltransferase konnte in dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila* entdeckt werden (Brownell *et al.*, 1996). Das in anderen Organismen als Gcn5 bekannte Enzym katalysiert die Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym-A auf die ϵ -Aminogruppe bestimmter Lysine (Loidl, 1994). Es ist wie auch andere Vertreter der HATs Bestandteil von Multienzymkomplexen und ein positiver Regulator der Gentranskription (Grant *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Im Jahr der Erstbeschreibung einer Histon-Acetyltransferase konnte mit Rpd3 auch die erste Histon-Deacetylase identifiziert werden (Taunton *et al.*, 1996).

Eine weitere Gruppe von Modifikationsenzymen sind die Histon-Methyltransferasen (HMTs). Ihre Affinität beschränkt sich meist auf ein spezifisches Lysin eines bestimmten Histons. Dabei wird je nach Enzym in der Regel eine bestimmte Ausprägung der Methylierung katalysiert. Sie sind damit wesentlich spezifischer als HATs und HDACs, die meist mehr als ein Lysin modifizieren. Bedingt durch die Spezifität können Histon-Methyltransferasen die Transkription positiv (H3K4, H3K36, H3K79) oder negativ (H3K9, H3K27, H4K20) beeinflussen (zusammengefasst in Kouzarides, 2007). Der bekannteste Vertreter dieser Enzymgruppe wurde durch seinen Einfluss auf die Ausbreitung von Heterochromatin in der Fruchtfliege (*position effect variegation*) entdeckt (Reuter und Spierer, 1992). Die Beschreibung der H3K9-Methylierungsfunktion gelang allerdings zuerst bei den Säugetier-Homologen des Su(var)3-9 (*suppressor of variegation*) genannten Enzyms (Rea *et al.*, 2000). Wie die meisten anderen HMTs enthält auch Su(var)3-9 eine SET-Domäne, die das katalytische Zentrum für die Methylierungsreaktion bildet. Diese wurde zuerst in den Proteinen Su(var)3-9, *Enhancer of zeste* und *Tritborax* beschrieben und nach ihnen benannt (Tschiersch *et al.*, 1994). Das einzige Beispiel einer Histon-Methyltransferase ohne SET-Domäne ist das für die Methylierung von H3K79 verantwortliche Enzym Dot1 (Dlakic, 2001).

Zwischen der Entdeckung von SUV39H1 und der ersten Histon-Demethylase (HDM) konnte über eine derartige Enzymgruppe nur spekuliert werden. Erst vor kurzem wurde mit der Beschreibung von LSD1 (Shi *et al.*, 2004) diese Lücke geschlossen. Bislang konnte für dieses Enzym ein deaktivierender Einfluss auf die Transkription durch Demethylierung von H3K4 (Lee *et al.*, 2005), aber auch eine aktivierende Funktion durch die Entfernung von H3K9me belegt werden (Metzger *et al.*, 2005). Noch jüngeren Datums sind die Beschreibungen einer weiteren Klasse von Histon-Demethylasen.

Die Gemeinsamkeit dieser Gruppe liegt in der katalytischen JmjC-Domäne. Diese wurde bereits früher verdächtigt, eine demethylierende Funktion auszuüben (Trewick *et al.*, 2005). Bestätigt wurde die Annahme durch die Entdeckung von JHDM1, der ersten Histon-Demethylase mit JmjC-Domäne (Tsukada *et al.*, 2006). Seitdem konnten zahlreiche Vertreter dieser Familie identifiziert werden. Diese besitzen meistens eine Spezifität für methyliertes H3K9 oder H3K36 (Klose *et al.*, 2006b; Yamane *et al.*, 2006).

Neben Lysin kann auch Arginin als Ziel für Methyltransferasen dienen. Die entsprechenden Enzyme werden zur Abgrenzung von den HMTs als PRMTs (Protein-Arginin-Methyltransferasen) bezeichnet. Den Enzymen dient S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor, wobei das gebundene Arginin zuerst monomethyliert und dann entweder symmetrisch oder asymmetrisch dimethyliert werden kann. Zu den Enzymen, die zu einer asymmetrischen Dimethylierung führen, gehören die Homologe von PRMT1 (Gary *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996), während PRMT5 ein Beispiel für eine symmetrisch wirkende Arginin-Methyltransferase ist (Branscombe *et al.*, 2001). Die meisten PRMTs beschränken sich nicht allein auf die Modifizierung von Histonen und sind in zahlreiche Regulationsmechanismen der Zelle involviert (zusammengefasst in Paik *et al.*, 2007). Die für eine Entfernung der Arginin-Methylierung verantwortlichen Enzyme wurden bislang kaum gefunden. Interessanterweise konnte für das Protein PAD4 eine demethylierende Wirkung durch Citrullinierung beschrieben werden (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Die Aktivität des Enzyms beschränkt sich jedoch lediglich auf monomethylierte Arginine, wodurch in den nächsten Jahren sicherlich mit weiteren Entdeckungen zu rechnen ist.

Die bekannteste Histon-Phosphorylierung ist die von Serin 10 an Histon H3. Durch die Nähe zu der bereits beschriebenen Methylierung von Lysin 9 zeigen beide Modifikationen interessante Wechselwirkungen (zusammengefasst in Fischle, 2008). Beispielsweise führt die Phosphorylierung wahrscheinlich zu einer Ablösung des Effektorproteins HP1 (Heterochromatin-Protein 1) von H3K9me (Fischle *et al.*, 2005). Zudem hat die Phosphorylierung einen Einfluss auf ein weiteres bereits besprochenes Modifikationsenzym. Untersuchungen zeigten, dass die Acetylierung von H3K14 durch die Acetyltransferase Gcn5 durch die Phosphorylierung von H3S10 gefördert wird (Clements *et al.*, 2003). Die für die Modifikation dieser Aminosäure verantwortlichen Kinasen kann man im Hinblick auf ihre Wirkungsweisen in zwei Gruppen einteilen. Während beispielsweise MSK1, MSK2 und PKA durch Interaktion mit sequenzspezifischen Proteinen direkt auf Promotorregionen wirken, führen mitotische Kinasen wie Aurora B zu einer globalen H3S10-Phosphorylierung. Als Gegenspieler dieser Modifikation konnten in Hefe und *C. elegans* die Phosphatasen Glc7/PP1 bestimmt werden (Hsu *et al.*, 2000).

6.5 Bindungsmodule

Um den Histon-Code lesen zu können, bedarf es bestimmter Proteine, die die gesetzten Modifikationen lesen und interpretieren. Dies gelingt ihnen durch spezialisierte Domänen, die nicht nur eine bestimmte Aminosäure finden, sondern auch zwischen verschiedenen Modifikationen unterscheiden können (zusammengefasst in Taverna *et al.*, 2007).

Eines dieser Module ist die AcetylK-bindende Bromo-Domäne (Abbildung 5). Diese findet man beispielsweise auch in der Histon-Acetyltransferase Gcn5, die darüber an H4K16ac bindet und somit zur Ausbreitung dieser Modifikation beiträgt (Owen *et al.*, 2000). Die Bindung von methylierten Lysinen erfolgt hingegen je nach Ausprägung durch eine ganze Reihe verschiedener Domänen. Dazu zählen die eng verwandten Chromo-, Tudor- und MBT- sowie das strukturell unterschiedliche PHD-Motiv. Am bekanntesten sind sicherlich die Proteine mit einer Chromo-Domäne. Durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz besitzen diese Affinitäten für H3K9me im Fall von HP1 (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001), beziehungsweise H3K27me im Fall von Polycomb (Fischle *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2003). Für die Bindung methylierter Arginine kommt bislang lediglich die Tudor-Domäne in Frage, da entsprechende Untersuchungen fehlen. Die lange mit der Bindung von methyliertem H3K4 in Verbindung gebrachte WD40-Domäne des Enzyms WDR5 wird nach neuesten Erkenntnissen eher als Adapter für unmodifiziertes H3R2 gesehen (diskutiert in Taverna *et al.*, 2007). Am Ende seien noch die beiden für die Erkennung phosphorylierter Aminosäuren verantwortlichen 14-3-3 und BRCT-Domänen erwähnt.

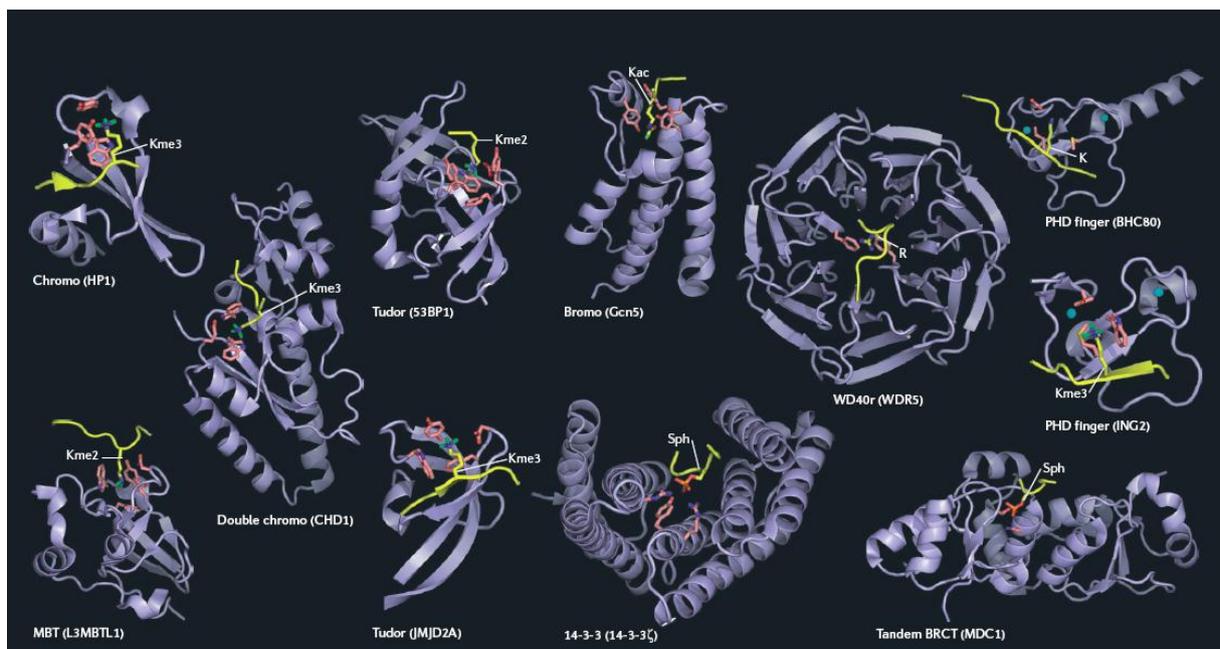


Abbildung 5: Dreidimensionale Darstellung verschiedener modifikationsbindender Domänen (entnommen aus Li *et al.*, 2007). Die Protein-Domänen sind als blaues Bänder-, die in die Bindung involvierten Seitenketten als rosa Stäbchenmodell dargestellt. Die gebundenen Histon-Peptide sind gelb markiert. Weitere Legende - Gelb: Kohlenstoff; Blau: Stickstoff; Rosa: polarer Wasserstoff; Rot: Sauerstoff; Orange: Phosphat; Grün: Methylgruppe.

6.6 Heterochromatin-Protein 1

Eines der Effektorproteine, das über den Histon-Code zur Errichtung spezialisierter Chromatin-Bereiche führt, ist Heterochromatin-Protein 1 (HP1). Der Begriff Heterochromatin geht dabei auf den Forscher Emil Heitz zurück, der in den 1920er Jahren bei lichtmikroskopischen Untersuchungen von Moosen zwei unterschiedliche Arten von Chromatin beobachten konnte (Heitz, 1928). Heute wird Heterochromatin in Abgrenzung zu Euchromatin gemeinhin als stark kondensiert, arm an Genen und reich an springenden genetischen Elementen (sogenannten Transposons) gesehen. Die frühere Ansicht, dass es sich um transkriptionell stillgelegtes Chromatin handelt wird heute differenzierter betrachtet. Zum einen konnten zahlreiche Gene gefunden werden, deren Expression von ihrer Einbettung in Heterochromatin abhängt (zusammengefasst in Yasuhara und Wakimoto, 2006) und zum anderen konnte gezeigt werden, dass eine heterochromatische Genstilllegung oft eine vorherige Transkription erfordert (zusammengefasst in Grewal und Elgin, 2007).

Mit HP1 wurde in der Fruchtfliege in den 1980er Jahren die erste, nicht zu den Histonen gehörende Heterochromatin-Komponente entdeckt (James und Elgin, 1986). Wie schon bei der Histon-Methyltransferase Su(var)3-9 zeigt auch das als Su(var)2-5 beschriebene Gen einen dosisabhängigen Effekt auf die Heterochromatinausbreitung (Eissenberg *et al.*, 1990). Seitdem konnten zahlreiche Homologe des Proteins in den unterschiedlichsten Organismen beschrieben werden, wobei die meisten zudem mehrere Varianten besitzen (zusammengefasst in Lomberk *et al.*, 2006b). Die universelle Verbreitung gibt auch einen Hinweis auf die hohe Konservierung der Proteinfunktion. Dazu trägt vor allem der strukturelle Aufbau bei (Abbildung 6A).

Den N-Terminus des Proteins bildet die bereits im Abschnitt zuvor als Bindungsmodul vorgestellte Chromo-Domäne. Sie trägt durch ihre Affinität für methyliertes H3K9 maßgeblich zur heterochromatischen Lokalisation bei (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Die C-terminale Chromoshadow-Domäne dient als Interaktionsmodul für weitere Chromatin-Komponenten (Cowieson *et al.*, 2000; Smothers und Henikoff, 2000). Sie ist zudem für die Dimerisierung der HP1-Proteine verantwortlich, worin aktuelle Modelle den Auslöser der Chromatinverdichtung sehen (Abbildung 6B). Verbunden werden beide Domänen durch die schwach konservierte Hinge-Region. Diese scheint mehr als ein flexibler Linker zu sein und konnte mit der Lokalisation sowie der Nukleinsäure-Bindung des Proteins in Verbindung gebracht werden (Zhao *et al.*, 2000; Smothers und Henikoff, 2001; Muchardt *et al.*, 2002). Eine weitere interessante Funktion besteht in der Phosphorylierung der mit zahlreichen Serinen und Threoninen ausgestatteten Region (Zhao *et al.*, 2001). Diese Beobachtung wurde als Hinweis auf das Vorhandensein eines möglichen HP1-Codes gedeutet (Lomberk *et al.*, 2006a).

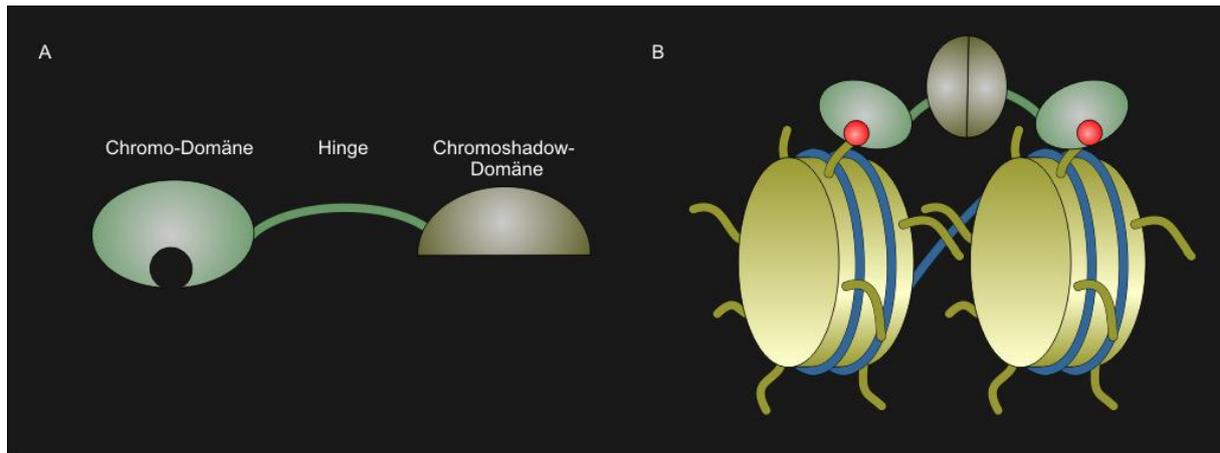


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur (A) und Wirkungsweise (B) von HP1-Proteinen. A) Alle Vertreter der Proteinfamilie zeichnen sich durch den dreigeteilten Aufbau aus H3K9me-bindender Chromo-Domäne, der c-terminalen Chromoshadow-Domäne und der dazwischen liegenden Linker-Region (Hinge) aus. B) Die Dimerisierung benachbarter HP1-Proteine über die Chromoshadow-Domäne gilt als ein Faktor bei der Kompaktierung heterochromatischer Bereiche. Rot: H3K9me; Ocker: Nucleosomen; Blau: DNA; Grün: HP1.

HP1-Proteine erfüllen im Zellkern eukaryotischer Organismen eine Vielfalt unterschiedlicher Funktionen. Grundlage dafür sind Interaktionen der verschiedenen Protein-Domänen mit zahlreichen Bindungspartnern (zusammengefasst in Lomberk *et al.*, 2006b). HP1-Proteine sind somit nicht nur maßgeblich an der heterochromatischen Verpackung von DNA beteiligt, sondern spielen auch eine Rolle beim Schutz von Chromosomenenden (Sharma *et al.*, 2003; Perrini *et al.*, 2004), der DNA-Replikation (Pak *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2009) sowie bei der Chromosomentrennung in der Spaltheife (Nonaka *et al.*, 2002). Erst vor kurzem konnte die gezielte Rekrutierung von HP1-Proteinen an Orte der DNA-Reparatur gezeigt werden (Luijsterburg *et al.*, 2009; Zarebski *et al.*, 2009).

Einen interessanten Einfluss haben die Proteine zudem auf die Genexpression. So wurde neben der stilllegenden auch ein aktivierende Funktion von HP1 auf bestimmte heterochromatische Gene nachgewiesen (Lu *et al.*, 2000). Neben der Lokalisation im Heterochromatin konnte in *Drosophila* und Säugern auch die euchromatische Lokalisation von HP1-Varianten gezeigt werden. Diese ist zum Teil unabhängig von einer H3K9-Methylierung und wirkt dort als positiver wie auch als negativer Regulator der Genexpression (Hwang *et al.*, 2001; Piacentini *et al.*, 2003). Häufigstes Ziel von HP1 bleiben jedoch transposonreiche Bereiche, die einen erheblichen Anteil komplexer Genome ausmachen (SanMiguel *et al.*, 1998; Lander *et al.*, 2001). Auf Grund ihrer potentiell mutagenen Wirkung haben Organismen verschiedene Wege gefunden, die Mobilisierung von Transposons zu unterdrücken. Neben der Genstilllegung durch Heterochromatisierung zählt dazu auch die Methylierung von DNA sowie die posttranskriptionell wirkende RNA-Interferenz (zusammengefasst in Girard und Hannon, 2008). Diese interagierenden Mechanismen werden auch unter dem Begriff Epigenetik zusammengefasst.

6.7 Epigenetik in *Dictyostelium discoideum*

Neben Fruchtfliege, Spaltheife, Maus und Acker-Schmalwand konnte mit dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* in den letzten Jahren ein weiterer Modellorganismus der Epigenetik etabliert werden. Der Begriff Epigenetik bezeichnet alle mitotisch wie meiotisch vererbbaeren Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind (Egger *et al.*, 2004). Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* kombiniert dabei die Vorteile eines einzelligen Eukaryoten mit der Besonderheit eines fakultativ multizellulären Stadiums.

Den natürlichen Lebensraum der 10-20 µm großen Amöbe bilden Waldböden, in denen sie sich von den dort vorkommenden Bakterien ernährt (Raper, 1935). Bei Nahrungsmangel kommt es zum Zusammenschluss zahlreicher Individuen und deren Differenzierung in Stielzellen und Sporen (zusammengefasst in Shaulsky und Kessin, 2007). Neben Eigenschaften wie dem relativ kompakten, haploiden Genom macht auch dessen vollständige Sequenzierung *D. discoideum* für die Molekularbiologie interessant (Eichinger *et al.*, 2005). Trotz der Kompaktheit lassen sich immerhin 10 % der genomischen Sequenz auf Transposons zurückführen (Glockner *et al.*, 2001). Der Einfluss von Epigenetik in Form von DNA-Methylierung und RNAi auf die Stilllegung der Retrotransposons Skipper und DIRS-1 konnte in *Dictyostelium discoideum* bereits gezeigt werden (Kuhlmann *et al.*, 2005).

Ein weiterer epigenetischer Forschungsbereich wurde mit der Untersuchung von HP1-Proteinen begonnen. Obwohl im Genom die drei Proteine HcpA, HcpB und HcpC kodiert werden, konnte die Expression nur für die ersten beiden Varianten nachgewiesen werden (Kaller *et al.*, 2006). Die Lokalisation wurde mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen untersucht und zeigt eine Konzentration in einem großen und weiteren kleinen Punkten in der Kernperipherie. Der große Punkt entspricht dabei wahrscheinlich den Centromeren, die in *Dictyostelium discoideum* auch während der Interphase zusammenliegen (Eichinger *et al.*, 2005). Immunfärbungen zeigten zudem, dass der Punkt mit dimethyliertem H3K9 kolokalisiert (Kaller *et al.*, 2006). Die für diese Modifikation verantwortliche HMT wurde in Anlehnung an das *Drosophila*-Homolog als SuvA bezeichnet und als GFP-Fusion kloniert (Manu Dubin, eingereicht). Ein Ausschalten der Methyltransferase erwies sich ebenso wie der HP1-Doppelknockout als letal (Essid, 2004; Kaller *et al.*, 2006). Die Einzelknockouts der Proteine HcpA und HcpB zeigen hingegen nur subtile Phänotypen und legen damit redundante Funktionen innerhalb der Zelle nahe. Unterschiede sind lediglich in Bezug auf ihr Dimerisierungsverhalten und bei ihrer Affinität zu RNA erkennbar, während die DNA-Bindung vergleichbar ist (Kaller *et al.*, 2007).

7 Materialien

7.1 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Binokular (Olympus SZ61)	Olympus, Japan
Blottingapparatur	von Keutz, Reiskirchen
Brutschrank	Adolf Kühner, Schweiz
Zellzähler (Coulter Counter ZM)	Coulter Electronics, Krefeld
Elektrophorese-Kammern	
Agarosegele	Metallwerkstatt, Uni Kassel
Proteingele (SE 250)	Hoefler Pharmacia, SF, USA
Gradientengele (XCell-SureLock™ -Mini-Cell)	Invitrogen, Karlsruhe
AU-Gele	Metallwerkstatt, Uni Kassel
Elektroporator (Gene PulserII®)	Biorad, München
Feinwaage (BP 210 S)	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRB)	Leica, Wetzlar
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Heizblock	Metallwerkstatt, Uni-Kassel
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Kulturschüttler	Schütt, Göttingen
Kühlfälle	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer (Heidolph MR 3000)	Bachofer, Reutlingen
Mikroliter-Pipetten (20 µl, 200 µl, 100 µl)	Gilson, Langenfeld
Mikroliter-Pipette (10 µl)	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle (Lunik 250)	Aldi, Essen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
PCR-Maschine (Mastercycler personal)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Bachofer, Reutlingen
Pipettierhelfer (Accu-Jet®)	Brand, Wertheim
Phosphor-Imager (FLA-7000)	Fujifilm, Düsseldorf
Photometer (Ultrospec® 2000)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Rotator	Metallwerkstatt, Uni Kassel
Schüttler (Heidolph Rotamax 120)	Schütt, Göttingen
Spannungsgeräte	
EPS 200, EPS 600, EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg

Macrodrive 5	LKB Bromma, Schweden
Sterilbank (<i>E. coli</i>)	Galaire, Italien
Sterilbank (<i>D. discoideum</i>)	Nunc, Wiesbaden
Stickstofftank	Messer Griesheim, Muddersbach
Ultraschallprozessor (UP 200S)	Dr. Hielscher, Hamburg
UV-Tisch	Bachofer, Reutlingen
Vakuu-Zentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Vortex	Bender & Hohbein, Zürich, Schweiz
Waage (PC440)	Mettler, Giessen
Wasserbad (Multitemp III)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Zentrifugen	
Avanti [®] 30	Beckmann, München
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Sigma 1K15	Sigma, Osterode am Harz
Sigma 1-15	Sigma, Osterode am Harz
Rotana/R	Hettich, Tuttlingen
Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

7.2 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser	Schott, Mainz
Chromatographie-Säulen (Poly-Prep [®])	Biorad, CA, USA
Costar-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalhandschuhe (Nobaglove [®] -Nitril)	Noba, Wetter
Einmalskalpell	Bayha, Tuttlingen
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegspritzen (Ominfix-F 1 ml)	B. Braun, Melsungen
Einwegtücher	Kimberly-Clark, Forchheim
EP-Küvetten (Gene Pulser [®] 0,4 cm)	Biorad, München
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapiere (3 mm Chr)	Whatman, Dassel
Glasflaschen	Schott, Mainz
Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt

Hybridisierungsröhren	Biometra, Göttingen
Nitrozellulosemembran (47 mm)	Millipore, Schwalbach
Nitrozellulosemembran (porablot™ NCP)	Macherey-Nagel, Düren
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Schütt, Göttingen
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss (1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter	Sarstedt, Nürnberg

7.3 Kits

NucleoSpin® ExtractII	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel, Düren
GeneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
NuPAGE® Novex® (4-12 % Bis-Tris)	Invitrogen, Karlsruhe

7.4 Chemikalien

[α - ³² P] dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %, 40 %)	Roth, Karlsruhe
Aceton	Fluka, Deisenhofen
Agarose	Sigma, Taufkirchen
Agar-Agar	Euler, Frankfurt am Main
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Pepton	Difco, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco, Augsburg
BCIP-T	Fermentas, St. Leon-Rot
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fluka, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Calcofluor	Sigma, Taufkirchen

Complete, Mini (Protease Inhibitor Tabletten)	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
DAPI	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMF	Merck, Darmstadt
DTBP	Sigma, Taufkirchen
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Fluka, Deisenhofen
Ethanol >99.8 %	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka, Deisenhofen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gelvatol Typ II	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin 86 %	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
GTC	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, GB
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hexanukleotid Random-Primer-Mix	Roth, Karlsruhe
IgG-Agarose	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isoton II	Coulter Electronics, Krefeld
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Edeka, Kassel
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol (-β)	Fluka, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nocodazol	Sigma, Deisenhofen
NBT	BTS, St. Leon-Rot
NP40	Fluka, Deisenhofen
Peptone aus Casein	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Fluka, Deisenhofen
PhosSTOP (Phosphatase-Inhibitor-Tabletten)	Roche, Mannheim
Protaminsulfat	Sigma, Taufkirchen
Protease-Peptide	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Pyronin Y (G)	Fluka, Deisenhofen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex [®] G50	Fluka, Deisenhofen
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
TCA	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Fluka, Deisenhofen

7.5 Puffer und Lösungen

AP-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 9,5 100 mM NaCl 20 mM MgCl ₂
AU-Probenpuffer (Shechter <i>et al.</i> , 2007)	0,36 g Harnstoff 100 µl Pyronin Y (0,2 %) 50 µl Essigsäure (100 %) 500 µl Protaminsulfat (25 mg/ml)
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP-T in DMF

Blockierlösung	2 % Magermilchpulver in 1 x NCP
Coomassie-Lösung	20 ml 85 % H_3PO_4 1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 60 g Ammoniumsulfat ad 1 l ddH ₂ O
DAPI-Lösung	1 mg/ml DAPI in ddH ₂ O
DNA-Auftragspuffer	30 % Glycerin 0,25 % Xylencyanol 0,25 % Bromphenolblau 50 mM EDTA
DNA-Lysepuffer	20 mM HEPES pH 7,5 40 mM $MgCl_2$ 20 mM KCl 5 % Saccharose 14 mM β -Mercaptoethanol
DNA-Lysepuffer B (Charette und Cosson, 2004)	10 mM Tris/HCl pH 8 50 mM KCl 2,5 mM $MgCl_2$ 0,45 % NP40 0,45 % Tween 20
Histon-Puffer (Cathrine Pears, unveröffentlicht)	50 mM Tris/HCl pH 8 10 mM NaCl 3 mM $MgCl_2$ 3 mM $CaCl_2$ 0,5 M Sorbitol 0,6 % TritonX-100 1 Complete, Mini auf 10 ml in ddH ₂ O
Hybridisierungslösung	50 % Formamid 50 mM NaP Puffer pH 7,2 5 x SSC Puffer 0,1 % Sarkosyl 7 % SDS

EP-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM Saccharose auf pH 6,1 einstellen, sterilfiltrieren
Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH ₂ O
Lämmli-Puffer (2 x)	25 ml Sammelgelpuffer pH 6,8 4 g SDS 20 ml Glycerin 3,1 g DTT 3 mg Bromphenolblau ad 100 ml ddH ₂ O
Lämmli-Puffer (9 x)	3,3 ml Glycerin 1,5 ml β-Mercaptoethanol 0,69 g SDS 0,228 g Tris ad 10 ml ddH ₂ O auf pH 6,8 einstellen 0,3 mg Bromphenolblau
Lösung D (Maniak <i>et al.</i> , 1989)	4 mM GTC 25 mM Natriumcitrat 0,5 % Sarkosyl 360 µl β-Mercaptoethanol auf 50 ml
Lösung I	25 mM Tris/HCl pH 7,4 10 mM EDTA 15 % Saccharose
Lösung II	200 mM NaOH 1 % SDS
Lösung III	3 M NaAc pH 4,7
Na/K-PO ₄ Puffer	15 mM KH ₂ PO ₄ ad 15 mM Na ₂ HPO ₄ bis pH 6,5

Nanotrap-Lysepuffer (Rothbauer <i>et al.</i> , 2008)	20 mM Tris/HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,5 µg/100 µl DNaseI 5 mM MgCl ₂ 0,1 % SDS 0,5 % NP40 1 Complete, Mini auf 10 ml
Nanotrap-Verdünnungspuffer (Rothbauer <i>et al.</i> , 2008)	20 mM Tris/HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,5 % NP40
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70 % DMF
NCP-Puffer (10 x)	12,1 g Tris/HCl pH 8,0 87 g NaCl 5 g Tween [®] 20 ad 1 l ddH ₂ O
NP40-Lösung	10 % Nonident [®] P40 in ddH ₂ O
OLB-Mix (5 x)	100 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 12,5 µl 1 M MgCl ₂ 1,7 µl β-Mercaptoethanol 2,5 µl 50 mM dCTP 2,5 µl 50 mM dGTP 2,5 µl 50 mM dTTP 250 µl 2 M HEPES pH 6,6 150 µl 90 A ₂₆₀ u/ml Oligos
PBS (10 x)	80,6 g NaCl/HCl pH 7,3 7,65 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2,01 g KCl 1,91 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l ddH ₂ O

Protein-Laufpuffer (5 x)	15,1 g Tris 72 g Glycin 5 g SDS ad 1 l ddH ₂ O
Protein-Sammelgepuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 14 mM SDS
Protein-Trenngelbuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 14 mM SDS
RNA-Probenpuffer	95 % Formamid 2 mM EDTA 0,25 % Xylencyanol 0,25 % Bromphenolblau 1 mg/ml Ethidiumbromid
Semi-dry Blotpuffer	5,8 g Tris 2,92 g Glycin 0,38 g SDS 200 ml Ethanol ad 1 l ddH ₂ O
Soerensen-Phosphatpuffer (Malchow <i>et al.</i> , 1972)	2 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 6,0 mit H ₃ PO ₄ einstellen
SSC-Puffer (20 x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
TAP-Lysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 400 mM KCl 100 mM Galactose 1 % TritonX-100 1 Complete, Mini auf 10 ml in ddH ₂ O

TAP-Waschpuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 400 mM KCl 100 mM Galactose 0,1 % NP40
TEV-Cleavage Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 400 mM KCl 0,1 % NP40 0,5 mM EDTA 1 mM DTT
TBE-Puffer (10 x)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

7.6 Antibiotika

Amphotericin (0,25 mg/ml)	PAA, Cölbe
Ampicillin (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Blasticidin (5 mg/ml)	MP Biomedicals, Eschwege
Genitacin G418 (100 mg/ml)	PAA, Cölbe
Penicillin (1000 u/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Cölbe

7.7 Nährmedien

BS10-Medium	G0-Medium + 10 µg/ml Blasticidin
G0-Medium	HL5-Medium + 50 µg/ml Ampicillin + 0,25 µg/ml Amphotericin + 10 u/ml Penicillin + 10 µg/ml Streptomycin
G10-Medium	G0-Medium + 10 µg/ml Genitacin (G418)
G10/BS10-Medium	G0-Medium + 10 µg/ml Genitacin (G418) + 10 µg/ml Blasticidin

HL5-Medium, pH 6,7 (Watts und Ashworth, 1970)	2,5 g Bacto-Trypton 2,5 g Pepton aus Casein 5 g Protease-Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g Glucose 0,35 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O
LB-Medium, pH 7,0	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O
LB _{Amp} -Medium	LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin
LB-Agar	LB-Medium + 13 g/l Agar-Agar
LB _{Amp} -Agar	LB-Agar + 50 µg/ml Ampicillin
Phosphatagar	Soerensen-Phosphatpuffer + 13 g/l Agar-Agar
SM-Agar, pH 6,5 (Singleton <i>et al.</i> , 1987)	13 g Agar-Agar 10 g Bacto-Pepton 10 g Glucose 1 g Hefeextrakt 1 g Magnesiumsulfat 2,2 g KH ₂ PO ₄ 1,3 g K ₂ PO ₄ * 3H ₂ O ad 1 l H ₂ O

7.8 Enzyme

AcTEV™ Protease	Invitrogen, Karlsruhe
CIP	Fermentas, St. Leon-Rot
DNaseI (RNase frei)	Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow Fragment	Fermentas, St. Leon-Rot
N-Glycosidase F, rekombinant	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Universität Kassel, Kassel
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Merck Biosciences, Bad Soden
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Universität Kassel, Kassel

7.9 Enzympuffer

10 x B ⁺ Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x G ⁺ Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x O ⁺ Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x Pfu Puffer (+MgSO ₄)	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x T4 Ligase-Puffer (+DTT)	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x <i>Taq</i> -Puffer (+ KCl, +MgCl ₂)	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x Y ⁺ /Tango Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot

7.10 Antikörper

Ratte-Anti- α Tubulin	Universität Kassel, Kassel
AP-gekoppelter Ziege-Anti-Maus	Dianova, Hamburg
AP-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg
Cy3-gekoppelter Ziege-Anti-Maus	Dianova, Hamburg
Cy3-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg
Kaninchen-Anti-H3K9me ²	Millipore, MA, USA
Maus-Anti-Coronin	Universität Kassel, Kassel
Maus-Anti-GFP	Universität Kassel, Kassel
Maus-Anti-myc	Universität Kassel, Kassel
Kaninchen-Anti-TAP	Open Biosystems, AL, USA

7.11 Größenstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Roti®-Mark PRESTAINED	Roth, Karlsruhe

7.12 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> - DH5α™	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> – GM2163 (<i>dcm</i> -, <i>dam</i> -)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Universität Kassel, Kassel

7.13 *Dictyostelium*-Stämme

AX2	(Watts und Ashworth, 1970)
DnmA ^{KO}	(Kuhlmann <i>et al.</i> , 2005)
HcpA ^{KO}	(Kaller <i>et al.</i> , 2007)
HcpAB ^{KO} -HcpA-GFP	(Kaller <i>et al.</i> , 2007)
HcpB ^{KO}	(Kaller <i>et al.</i> , 2007)
RrpC ^{KO}	(Stefan Wiegand, unveröffentlicht)

7.14 Oligonucleotide

BS ^R -G1-5′	CGCTACTTCTACTAATTTCTAGA
Chr01-fw	GTCGACAAAAAAGAGAAAGCTTGAGAC
Chr01-rev	CTCGAGTTATTTTATTTTATTTTATTCCTTTTGGCATATTC
Chr03-fw	GTCGACAAGTGGTAGTGGTTTATCAAC
Chr03-rev	CTCGAGTTACTTTCTCTTTTGGCACTAATG
Gal4-DBD-fw	CTGCAGTGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC
Gal4-DBD-rev	GTCGACGTCCTCCTCTGAGATCAGCTTC
H2Bv1-BglII-fw	AGATCTAAAATGAGACATAGAGGAAGACGATC
H2Bv1-BamHI-rev	GGATCCAGAAAGATAAGGAATTGAACAATGGTTTTG
H2Bv1-SalI	GTCGACAATGAGACATAGAGGAAGACG
H2Bv1-XhoI	CTCGAGTTAGAAAGATAAGGAATTGAACAATGG
H2Bv2-EcoRI-fw	GAATTCAAAATGGAATCATATTCACCATCAATTC

H2Bv2-BamHI-rev	GGATCCACGTTGCTTCCATATGTATAACC
H2Bv2-SalI	GTCGACAATGGAATCATATTCACCATCAATTC
H2Bv2-XhoI	CTCGAGTCACGTTGCTTCCATATGTATAAC
H2Bv3-EcoRI-fw	GAATTCAAAATGGTATTCGTTAAAGGTCAAAAG
H2Bv3-R107-fw	AAGCTTCTGGTTTAGCCAGAAAGAAGAAG
H2Bv3-R107-rev	TCTGGCTAAACCAGAAGCTTCGGTG
H2Bv3-BamHI-rev	GGATCCGTTTGTGCTTTCAGTTGGATTGTAC
HcpB-4	GGATCCACTTGGCTGACCACTATAACC
HcpB-5	ATTGGATCCTTAACTTGGCTGACCACTATAACC
HcpB-3'-outer	GGAAATTAACGAACATTTTGAC
HcpB-5'-outer	AAAAGATATAGAATCTACAACATC
HcpB-Glyc2	TCTTATTATACTACATCAACACACCAAAAAACAAATC
HcpB-N142/143Y-rev	GGTGTGTTGATGTAGTATAATAAGAAAAATATGTATCTGTTG
HcpB-SalI-fw	GTCGACATGGGAAAAAGAGATAAAAAAATAATAATAG
HcpA-TAP-5'	AAGCTTATGGGAAAAAGAGATAAGAGAATAATAG
HcpA-TAP-3'	TCTAGAACITTTGTTGACCCTTATAACCAAATTTAAG
HcpB-TAP-5'	AAGCTTATGGGAAAAAGAGATAAAAAAATAATAATAG
HcpB-TAP-3'	TCTAGAACITTTGGCTGACCACTATAACC
JmjC-HindIII-5'	AAGCTTTCACCAAGAAATAATGAAACTCATAAC
JmjC-MfeI-3'	GCGTTACAATTGGTACAAAAGATGATTG
HcpAB-K222R-fw	GAAATCCTTAAACATAGAGAACCATTACAATTAATTG
HcpAB-K222R-rev	CAATTAATTGTAATGGTTCTCTATGTTTAAGGATTC
M13-forward	GTAACGACGGCCAGT
M13-reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
NLS2-MfeI-5'	AATTGGCCAAAAAAGAAACGTAAAGTTTCTAGAA
NLS2-XbaI-SpeI-3'	CTAGTTCTAGAAACTTTACGTTTCTTTTGGCC
ORFII-forw-SalI	GTCGACACTTACCAGTAGGTGGACGTTTG
ORFII-rev-SalI	GTCGACAAACCAGCAAGTTTCTTGGGGAG
pTX-GFP-SEQ	CGTAATACGACTCACTATAGG
pTX-MCS-fw	TCGAGCCGCGGTCTAGATGTCGACC
pTX-MCS-rev	TCGAGGTCGACATCTAGAACCGCGGC
Skromo-fw	GTCGACATTAAGAGAAGAGATATCGATGC
Skromo2-rev	CTCGAGCTATAAACTCTTGGGTGTAAC

7.15 Plasmide

7.15.1 Plasmide anderer Arbeiten

Die folgenden Vektoren entstammen anderen Arbeiten oder wurden bei kommerziellen Herstellern erworben. Sie wurden in ihrem Ursprungszustand oder zur Herstellung eigener Plasmide verwendet.

BSr Kasette	(Sutoh, 1993)
pDd-GFP	(Maniak <i>et al.</i> , 1995)
pDd-HcpA-GFP	(Kaller <i>et al.</i> , 2006)
pDd-HcpB-GFP	(Kaller <i>et al.</i> , 2006)
pDneo2	(Witke <i>et al.</i> , 1987)
pDneo2a-GFP	(Manu Dubin, eingereicht)
pDneo2myc HcpA	(Kaller, 2006)
pDneo2myc HcpB	(Kaller, 2006)
pDneo-GFP HcpA	(Kaller <i>et al.</i> , 2006)
pDneo-GFP HcpB	(Kaller <i>et al.</i> , 2006)
pDV-NTAP	(Meima <i>et al.</i> , 2007)
pDV-CGFP-CTAP	(Meima <i>et al.</i> , 2007)
pGBKT7	Clontech, CA, USA
pGEM [®] -T Easy	Promega, Mannheim
pGEM [®] -T Easy Short GFP	(Sonja Kasten, unveröffentlicht)
pGEM [®] -T Easy HelF (<i>EcoR</i> I, <i>Bam</i> H I)	(Popova <i>et al.</i> , 2006)
pGEM [®] -T Easy SkipperLTR AS	(Kuhlmann <i>et al.</i> , 2005)
pGEM [®] -T Easy DIRS-1 rLTR	(Kuhlmann <i>et al.</i> , 2005)
pGEM7z-HcpB KO	(Kaller <i>et al.</i> , 2007)
pJET1/blunt	Fermentas, St. Leon-Rot
pLPBLP	(Faix <i>et al.</i> , 2004)
pTX-GFP	(Levi <i>et al.</i> , 2000)
pUAST	(Brand und Perrimon, 1993)

7.15.2 Plamide dieser Arbeit

Folgende Vektoren sind Bestandteil dieser Dissertation und wurden von mir angefertigt.

pDd-H2Bv1-GFP

Für die C-terminale GFP-Fusion wurde die kodierende Region des *Dictyostelium*-Gens H2Bv1 mit den Primern H2Bv1-BglIII-fw und H2Bv1-BamHI-rev amplifiziert und in den Vektor pJET1/blunt ligiert. Für die Ligation in den Zielvektor pDd-GFP (Maniak *et al.*, 1995) wurden die durch die Primer angefügten Restriktionsschnittstellen *Bgl* II und *Bam*H I genutzt. Zur Bestimmung der Orientierung des Fragments fanden die gleichen Enzyme Verwendung.

pDd-H2Bv2-GFP und pDd-H2Bv3-GFP

Die Amplifikation zur Herstellung von pDd-H2Bv2-GFP sowie pDd-H2Bv3-GFP fand mit den Primern H2Bv2-EcoRI-fw und H2Bv2-BamHI-rev sowie H2Bv3-EcoRI-fw und H2Bv3-BamHI-rev auf genomische *Dictyostelium*-DNA statt. Anschließend wurden die Fragmente in den Vektor pJET1/blunt ligiert. Der Restriktionsverdau und die Ligation in den Zielvektor pDd-GFP (Maniak *et al.*, 1995) erfolgte über die durch die Primer angefügten Schnittstellen *Eco*R I und *Bam*H I.

pDd-H2Bv3(K107R)-GFP

Für die Mutation von Lysin 107 zu Arginin wurde das PCR-Mutagenese Protokoll, wie unter 8.3.11.1 beschrieben, verwendet. In der ersten PCR wurden der linke Teil des Gens mit den Primern H2Bv3-EcoRI-fw und H2Bv3-R107-rev, der rechte Teil mit H2Bv3-R107-fw sowie H2Bv3-BamHI-rev amplifiziert. Dadurch wurde die für Lysin 107 kodierende Basensequenz von AAA in AGA (Arginin) mutiert. In einer weiteren PCR wurden beide Teile zusammengefügt und in den Vektor pJET1/blunt ligiert. Das Vorhandensein der Mutation wurde durch eine Sequenzierung bestätigt, bevor das Fragment über die Schnittstellen *Eco*R I und *Bam*H I verdaut und in den Zielvektor pDd-GFP (Maniak *et al.*, 1995) ligiert wurde.

pDd-HcpA(K203R)-GFP

Als Vorlage für die unter 8.3.11.2 dargestellte Mutagenese diente das Plasmid pDd-HcpA-GFP (Kaller *et al.*, 2006). Die Primer HcpAB-K222R-fw und HcpAB-K222R-rev enthielten dafür in der Mitte das veränderte Basentriplett AGA anstatt AAA, welches für Arginin anstelle von Lysin kodiert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch eine Sequenzierung nachgewiesen, wonach das

HcpA-Fragment durch einen Restriktionsverdau mit *EcoR* I und *BamH* I in einen neuen pDd-GFP Vektor (Maniak *et al.*, 1995) ligiert wurde. Dieser Schritt erfolgte um weitere, eventuell im Plasmid entstandene Mutationen auszuschließen.

pDneo2-Gal4DBD-cmyc

Die Gal4DBD und das cmyc des Vektors pGBKT7 wurde durch eine PCR mit den Primern Gal4-DBD-fw und Gal4-DBD-rev amplifiziert und in den Vektor pJET1/blunt ligiert. Über die bei der PCR angefügten Schnittstellen *Pst* I und *Sal* I konnte das Fragment anschließend in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pDneo2 (Witke *et al.*, 1987) ligiert werden.

pDneo2-Gal4DBD-cmyc HcpA und pDneo2-Gal4DBD-cmyc HcpB

Für die Herstellung dieser beiden Konstrukte wurden die Vektoren pDneo-GFP HcpA und pDneo-GFP HcpB (Kaller *et al.*, 2006) genutzt. Die kodierenden Regionen der HP1-Proteine wurden mit Hilfe eines *Sal* I, *EcoR* I Verdau herausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor pDneo2-Gal4DBD-cmyc ligiert. Das Ergebnis waren N-terminal mit einer DNA-bindenden Domäne gekoppelte HP1-Proteine.

pDneo2-Gal4DBD-cmyc HcpA(K203R)

Um die Aminosäuremutation K203R in den Vektor pDneo2-Gal4DBD-cmyc HcpA einzufügen, wurde ein Fragment aus dem Plasmid pDd-HcpA(K203R)-GFP umklontiert. Zuerst mussten beide Plasmide in *Escherichia coli* – GM2163 (*dcm*-, *dam*-) transformiert werden, da die benötigte *Bcl* I Schnittstelle ansonsten durch DNA-Methylierung blockiert werden würde. Anschließend konnte das Fragment aus pDd-HcpA(K203R)-GFP mit einem *Bcl* I, *BamH* I Restriktionsverdau gegen das unmutierte Teilstück in pDneo2-Gal4DBD-cmyc HcpA getauscht werden. Der Erfolg wurde durch eine Sequenzierung nachgewiesen.

pDneo2a-GFP H2Bv1 und pDneo2a-GFP H2Bv2

Für die N-terminalen GFP-Fusionen der Gene H2Bv1 und H2Bv2 wurde abermals genomische DNA amplifiziert. Als Primer wurden H2Bv1-SalI, H2Bv1-XhoI sowie H2Bv2-SalI und H2Bv1-XhoI eingesetzt und die PCR-Produkte in den Vektor pJET1/blunt ligiert. Über die bei der Amplifikation angefügten Restriktionsschnittstellen *Sal* I und *Xho* I konnten die Fragmente anschließend in den Vektor pDneo2a-GFP (Manu Dubin, eingereicht) ligiert werden.

pDneo2a-GFP Skipper ChrDomain

Die N-terminale GFP-Fusion der Chromo-Domäne des Retrotransposons Skipper wurde wie folgt hergestellt. Durch eine PCR auf genomische *Dictyostelium*-DNA mit den Primern Skromo-fw und Skromo2-rev wurde das Fragment amplifiziert und in pJET1/blunt ligiert. Die Ligation in den Vektor pDneo2a-GFP (Manu Dubin, eingereicht) erfolgte über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen *Sal*I und *Xba*I.

pDneo2a-GFP DDB0189801 ChrDomain und pDneo2a-GFP DDB0220640 ChrDomain

Die Herstellung dieser Vektoren erfolgte wie bei pDneo2a-GFP Skipper ChrDomain zuvor beschrieben. Im Unterschied dazu wurden die Fragmente mit den Primern Chr1-fw und Chr1-rev für die Chromo-Domäne von DDB0189801, sowie Chr3-fw und Chr3-rev für die Chromo-Domäne des Gens DDB0220640 amplifiziert.

pDneo2myc HcpB(N142/143Y)

Für die Mutation der Asparagine 142/143 von HcpB in Tyrosine wurde das PCR-Mutagenese Protokoll unter 8.3.11.1 verwendet. Als Vorlage diente das Plasmid pDneo-GFP HcpB (Kaller *et al.*, 2006). Für den linken Arm wurden bei der PCR die Primer HcpB-SalI-fw und HcpB-N142/143Y-rev, für den rechten Teil HcpB-Glyc2 und HcpB-5 eingesetzt. Das Produkt wurde anschließend in pJET1/blunt ligiert und sequenziert. Durch Herausschneiden der HcpA-Sequenz aus dem Vektor pDneo2myc HcpA (Kaller, 2006) mit den Enzymen *Sal*I und *Bam*H I konnte das mutierte Fragment schließlich in den Zielvektor ligiert werden.

pDV-NTAP HcpA und pDV-NTAP HcpB

Die Gene *hcpA* und *hcpB* wurden zur Herstellung der N-terminalen TAP-Fusionen mit den Primern HcpA-TAP-5', HcpA-TAP-3' sowie HcpB-TAP-5' und HcpB-TAP-3' amplifiziert. Als Vorlage diente genomische DNA aus *Dictyostelium discoideum*. Die verwendeten Oligonukleotide fügten am 5'-Ende des ORFs eine *Hind* III und am 3'-Ende eine *Xba*I Schnittstelle an. Nach erfolgreicher Ligation in den Vektor pGEM[®]-T Easy wurden die Fragmente durch einen entsprechenden *Hind* III, *Xba*I Verdau in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pDV-NTAP (Meima *et al.*, 2007) ligiert.

pDV-CGFP-CTAP HcpA und pDV-CGFP-CTAP HcpB

Die Herstellung der Vektoren mit C-terminalem TAP- und GFP-Tag erfolgte mit den bereits zuvor erzeugten pGEM[®]-T Easy HcpA, HcpB (*Hind* III, *Xba* I) Plasmiden. Nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *Hind* III und *Xba* I wurden die Fragmente in den Ziel-Vektor pDV-CGFP-CTAP (Meima *et al.*, 2007) ligiert.

pDV-CGFP-CTAP JmjC NLS

Die Amplifikation der PHD- und JmjC-Domäne des Gens *cbfA* wurde mit der *Pfu*-Polymerase auf genomische *Dictyostelium*-DNA durchgeführt. Hierfür wurden die Primer JmjC-HindIII-5' und JmjC-MfeI-3' verwendet. Während JmjC-HindIII-5' dem Fragment am 5'-Ende eine *Hind* III Schnittstelle anfügte, blieb das 3'-Ende unmodifiziert. Nach dem Anhängen von 3'A-Überhängen (siehe 8.3.10) wurde das Fragment in pGEM[®]-T Easy ligiert. Der erhaltene Vektor wurde im Anschluss mit *Mfe* I und *Spe* I geschnitten, um das NLS-Fragment ligieren zu können. Dieses wurde durch Zusammenfügen der Oligos NLS2-MfeI-5' und NLS2-XbaI-SpeI-3' gewonnen. Das verwendete Motif entsprach dabei der Aminosäuresequenz PKKKRKV. Die abschließende Ligation in den Zielvektor pDV-CGFP-CTAP (Meima *et al.*, 2007) erfolgte nach einem Restriktionsverdau des Plasmids mit den Enzymen *Hind* III und *Xba* I.

pDV-NTAP HelF

Für die Herstellung eines HelF TAP-Konstrukts wurde T Easy HelF (*Eco*R I, *Bam*H I) (Popova *et al.*, 2006) mit *Eco*R I verdaut und das Fragment in den ebenfalls mit *Eco*R I geschnittenen Vektor pDV-NTAP (Meima *et al.*, 2007) ligiert. Die richtige Orientierung konnte durch einen *Bam*H I Verdau nachgewiesen werden.

pTX-5xUAS-A15-GFP BSr

Der *Drosophila* Vektor pUAST (Brand und Perrimon, 1993) wurde zur Gewinnung der 5 x UAS-Sequenz mit *Pst* I geschnitten und danach die 3'-Überhänge wie in Protokoll 8.3.9 beschrieben entfernt. Das Plasmid pTX-MCSfw-A15-GFP wurde sodann durch einen *Sal* I Verdau mit anschließender Entfernung der 5'-Überhänge für die Ligation vorbereitet. Nach erfolgreicher Ligation der Fragmente wurde die gewünschte Orientierung durch eine Sequenzierung mit dem Primer pTX-GFP-SEQ bestätigt. Der Austausch der G418- gegen eine BSr-Resistenz erfolgte durch Herausschneiden der G418 Kasette mit *Sma* I und der Ligation der mit *Eco*R V geschnittenen BSr Kasette (Sutoh, 1993).

pTX-MCSfw-A15-GFP und pTX-MCSrev-A15-GFP

Da der ursprüngliche pTX-GFP Vektor (Levi *et al.*, 2000) nur eine *Sal*I Restriktionsschnittstelle vor dem A15 Promotor besitzt und damit keine gerichtete Klonierung ermöglichte, wurde an dieser Stelle eine MCS eingefügt. Nach Schneiden des Vektors mit *Sal*I wurden die zuvor zusammengesetzten Oligos pTX-MCS-fw und pTX-MCS-rev in die Schnittstelle ligiert. Die Oligonukleotide waren dabei von *Xba*I Erkennungssequenzen flankiert, die bei der Ligation die endogene *Sal*I Schnittstelle zerstörten. Die neu eingefügten Restriktionsschnittstellen *Sac*II, *Xba*I und *Sal*I ermöglichten zudem einen direkten Transfer von Fragmenten des Vektors pGEM[®]-T Easy über einen *Sac*II, *Sal*I Verdau. Um diese Fragmente später in beiden Ausrichtungen klonieren zu können, wurden Plasmide ausgewählt, die die MCS in unterschiedlicher Orientierung inseriert hatten. Dies geschah durch Auswahl entsprechender Plasmide nach Sequenzierung mit dem Primer pTX-GFP-SEQ.

pTX-SkipperLTRfw-A15-GFP und pTX-SkipperLTRrev-A15-GFP

Um die Skipper LTR-Sequenz in verschiedenen Orientierungen vor dem Aktin15-Promotor zu inserieren wurde entweder der Vektor pTX-MCSrev-A15-GFP oder pTX-MCSfw-A15-GFP mit *Sac*II und *Sal*I geschnitten. Das Herausschneiden der Skipper LTR-Sequenz aus dem Plasmid pGEM[®]-T Easy SkipperLTR AS (Kuhlmann *et al.*, 2005) erfolgte mit den gleichen Enzymen. Durch die Ligation ergab sich eine vorwärtsgerichtete Orientierung des Fragments in pTX-MCSrev-A15-GFP und eine rückwärtsgerichtete in pTX-MCSfw-A15-GFP.

pTX-DirsLTRfw-A15-GFP und pTX-DirsLTRrev-A15-GFP

Die Herstellung des pTX-GFP Vektors mit der DIRS-1 rLTR-Sequenz erfolgte wie zuvor für Skipper beschrieben. Allerdings erzeugte die Ligation des herausgeschnittenen Fragments aus pGEM[®]-T Easy DIRS-1 rLTR (Kuhlmann *et al.*, 2005) eine Vorwärts-Orientierung in dem Plasmid pTX-MCSfw-A15-GFP und eine rückwärtsgerichtete in pTX-MCSrev-A15-GFP.

pTX-ORF2fw-A15-GFP und pTX-ORF2rev-A15-GFP

Für die Insertion des DIRS-1 ORF2-Fragments vor den Aktin15-Promotor des Vektors pTX-GFP (Levi *et al.*, 2000) wurde dieses zuerst durch eine PCR mit den Primern ORFII-forw-SalI und ORFII-rev-SalI amplifiziert. Die anschließende Ligation erfolgte in den Vektor pJET1/blunt, bevor das Fragment über die durch die Primer eingefügten, flankierenden *Sal*I Schnittstellen wieder herausgeschnitten wurde. Das Einfügen in den Zielvektor erfolgte ungerichtet in die direkt vor dem Aktin15-Promotor liegende *Sal*I Schnittstelle. Plasmide, die eine unter-

schiedliche Orientierung des ORF2-Fragmentes aufwiesen, konnten nach einem *Xba* I Verdau ausgewählt werden.

pTX-A15-GFP-DirsLTRfw und pTX-A15-GFP-DirsLTRrev

Die Integration der DIRS-1 LTR-Sequenz als 3'-UTR begann mit einem Restriktionsverdau des Vektors pTX-DirsLTRfw-A15-GFP mit dem Enzym *Eco*R I. Die 5'-Überhänge des Fragments wurden anschließend nach Protokoll 8.3.9 entfernt. Gleiches geschah mit dem *Xba* I geschnittenen Vektor pTX-GFP (Levi *et al.*, 2000). Nach der Ligation des DIRS-1 LTR-Fragments in den Zielvektor konnte die Orientierung des Fragments durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Nco* I und *Spe* I überprüft und beide Varianten isoliert werden.

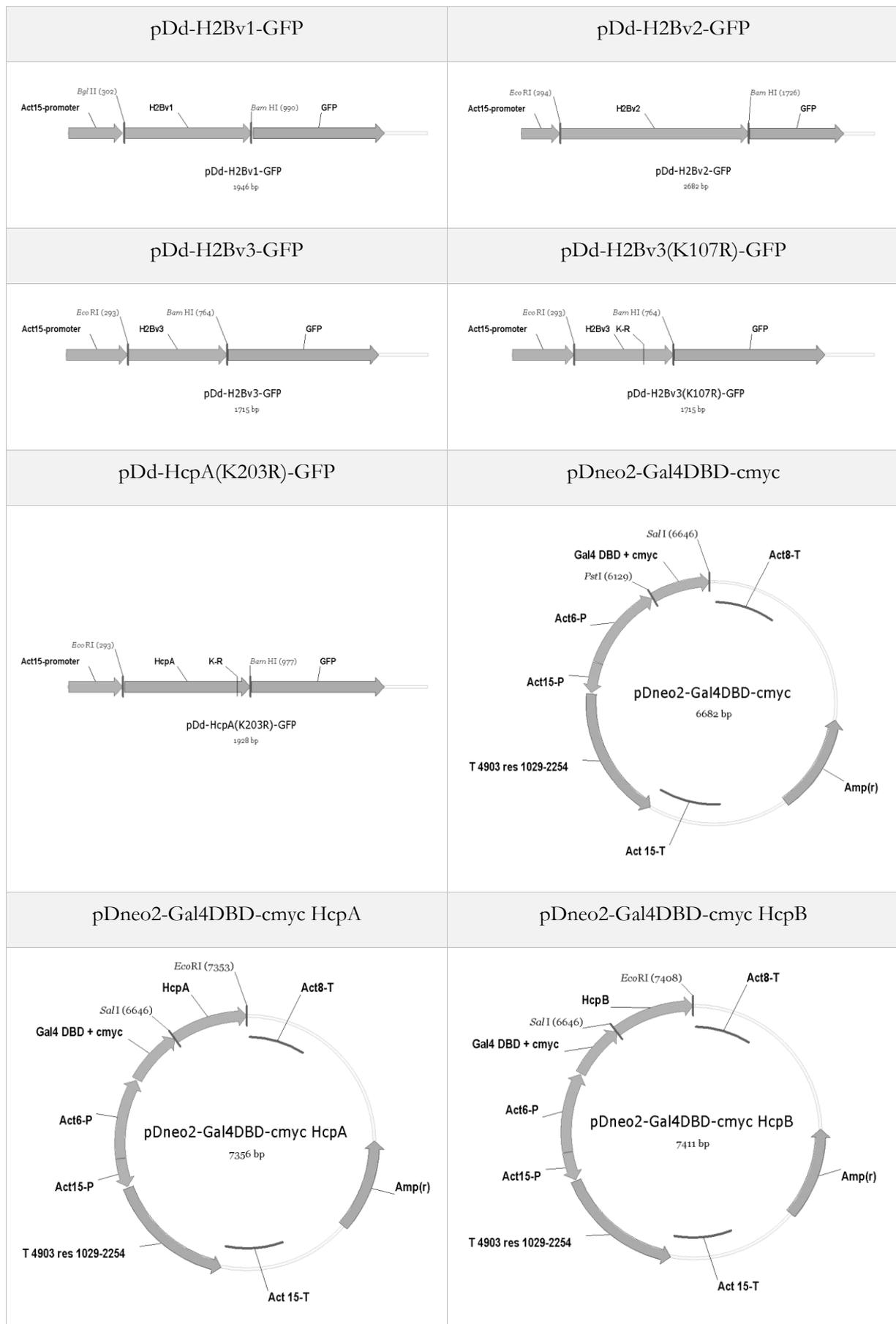
pTX-DirsLTRfw-GFP und pTX-SkipperLTRrev-GFP

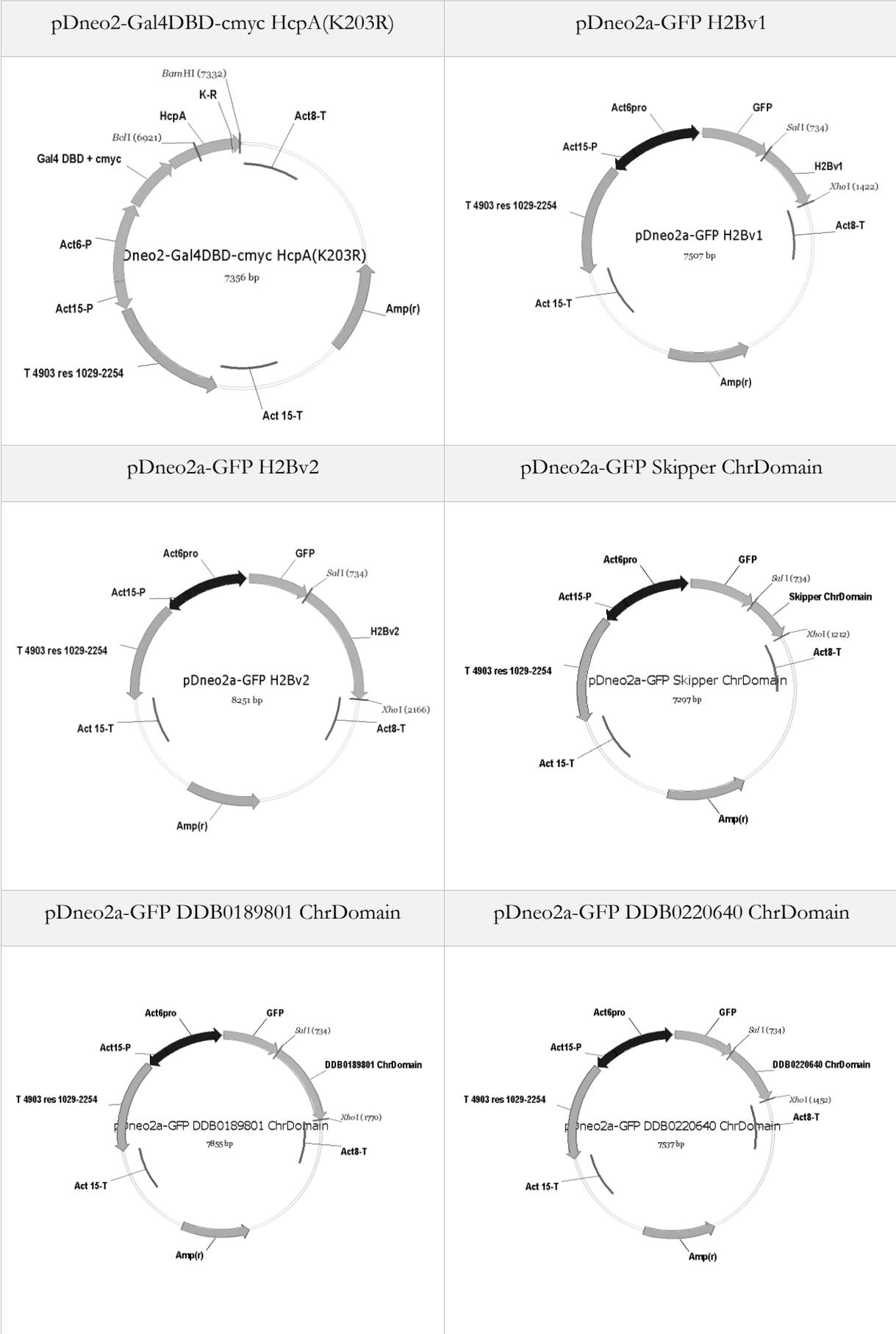
Für die Untersuchung der Promotoraktivität der LTRs von Skipper und DIRS-1 wurden diese vor die kodierende Sequenz von GFP kloniert. Dies war nur über einen Umweg möglich. Die Plasmide pTX-DirsLTRfw-A15-GFP und pTX-SkipperLTRrev-A15-GFP wurden hierfür mit *Sac* II und *Xbo* I geschnitten, um die Expressionskassetten zu gewinnen. Diese wurden in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pLPBLP (Faix *et al.*, 2004) ligiert. Der Aktin15-Promotor konnte anschließend durch einen Restriktionsverdau mit *Hind* III und *Xbo* I herausgeschnitten werden. Vor der Religation wurden die 5'-Überhänge der Schnittstellen nach Protokoll 8.3.9 in glatte Enden umgewandelt. Die Expressionskassetten ohne Aktin15-Promotor konnten anschließend über die Enzyme *Sac* II und *Xbo* I in den Ursprungsvektor zurückligiert werden.

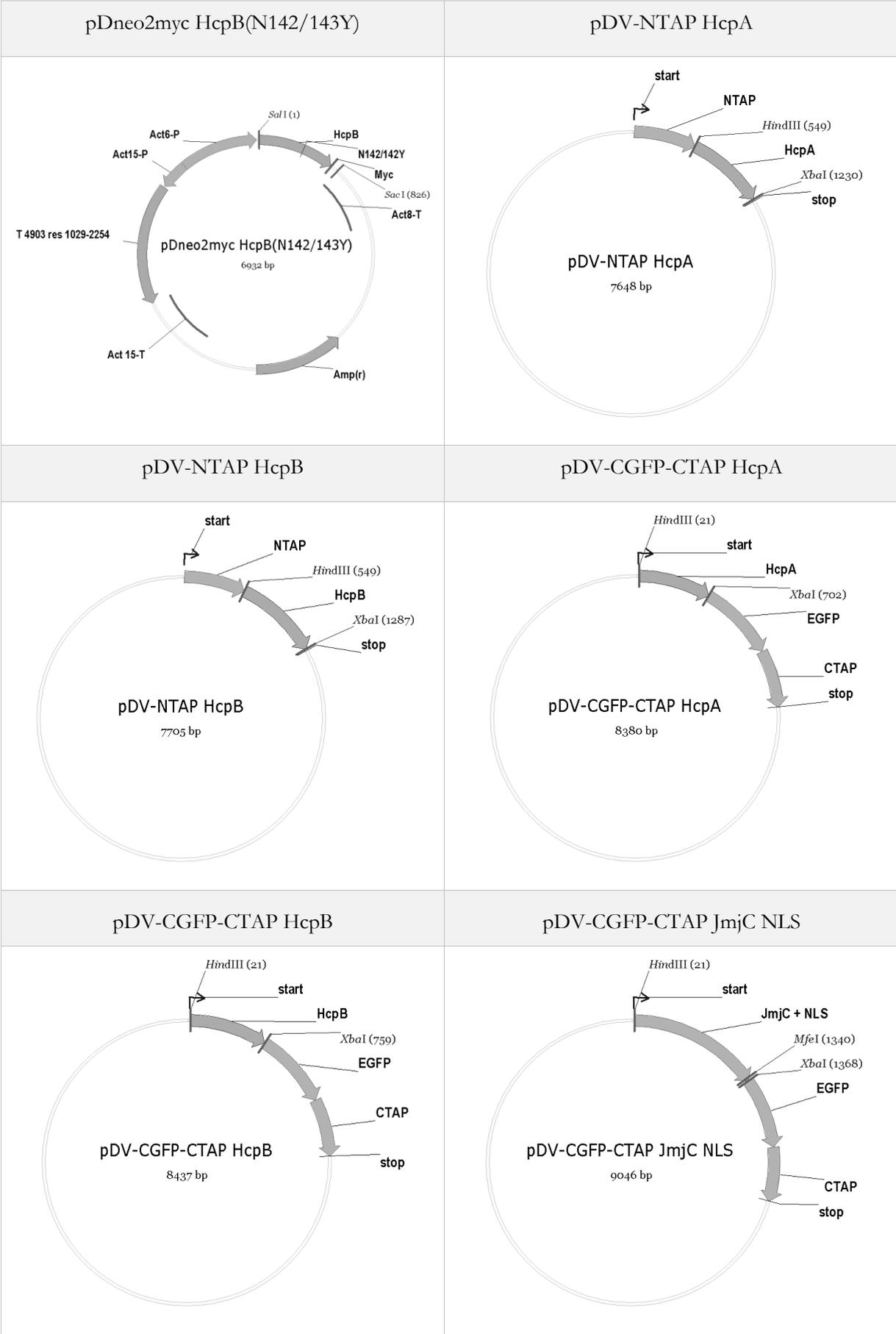
pTX-DirsLTRrev-GFP und pTX-SkipperLTRfw-GFP

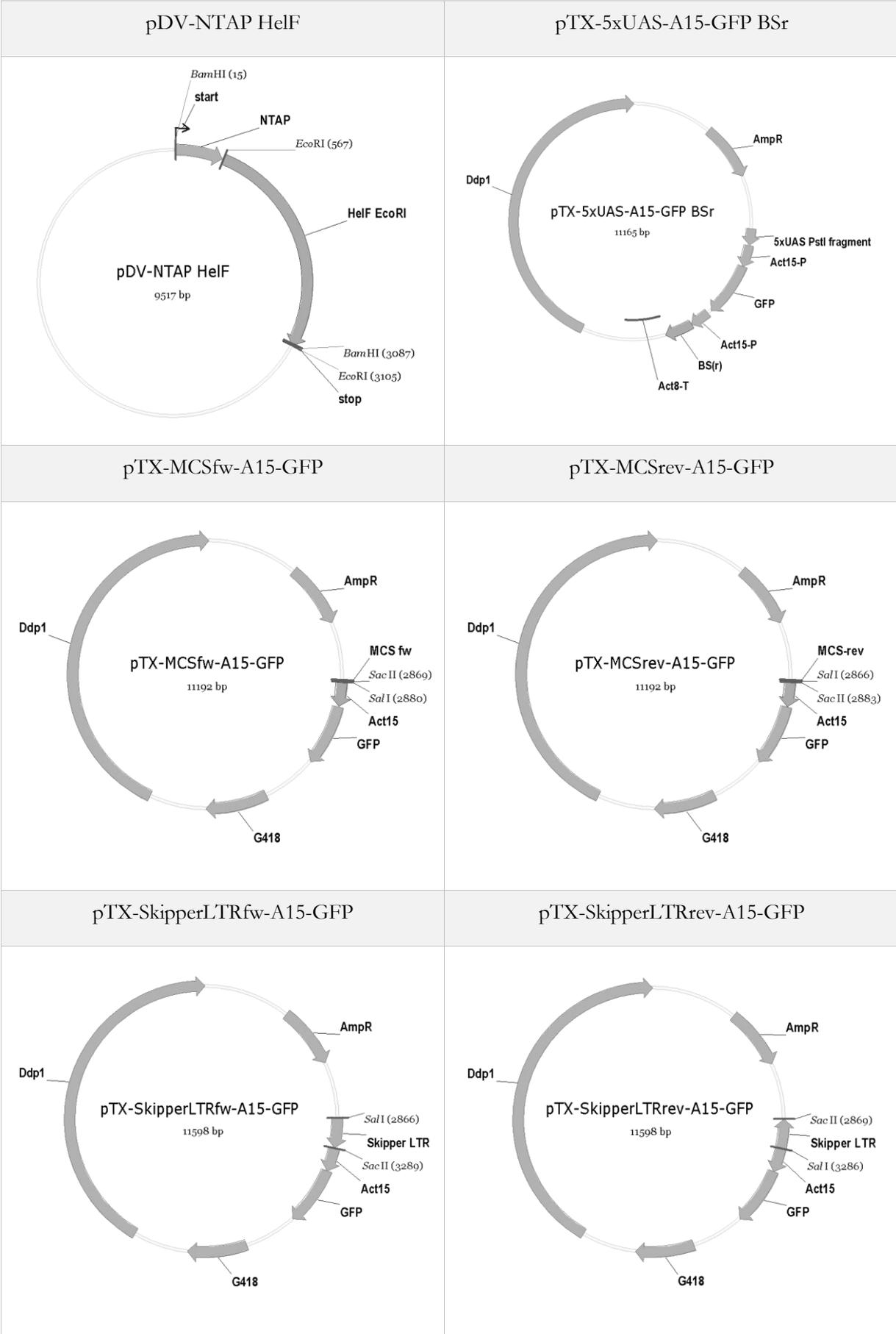
Die Herstellung der Plasmide mit umgekehrt orientierten LTRs zur Untersuchung der Promotoraktivität erfolgte über einen weiteren Zwischenvektor. Die Expressionkassetten von pTX-DirsLTRrev-A15-GFP und pTX-SkipperLTRfw-A15-GFP wurden über einen Restriktionsverdau mit *Sal* I und *Bam*H I in den Vektor pJET1-H2Bv1 ligiert, aus dem zuvor mit den gleichen Enzymen das H2Bv1-Fragment entfernt wurde. Der Aktin15-Promotor wurde anschließend durch einen *Hind* III, *Sac* II Verdau herausgeschnitten. Nach Entfernen der 5'-Überhänge (Protokoll 8.3.9) konnten die Vektoren religiert und über die Schnittstellen *Sal* I und *Bam*H I die Expressionskassetten zurück in die Ursprungsvektor kloniert werden.

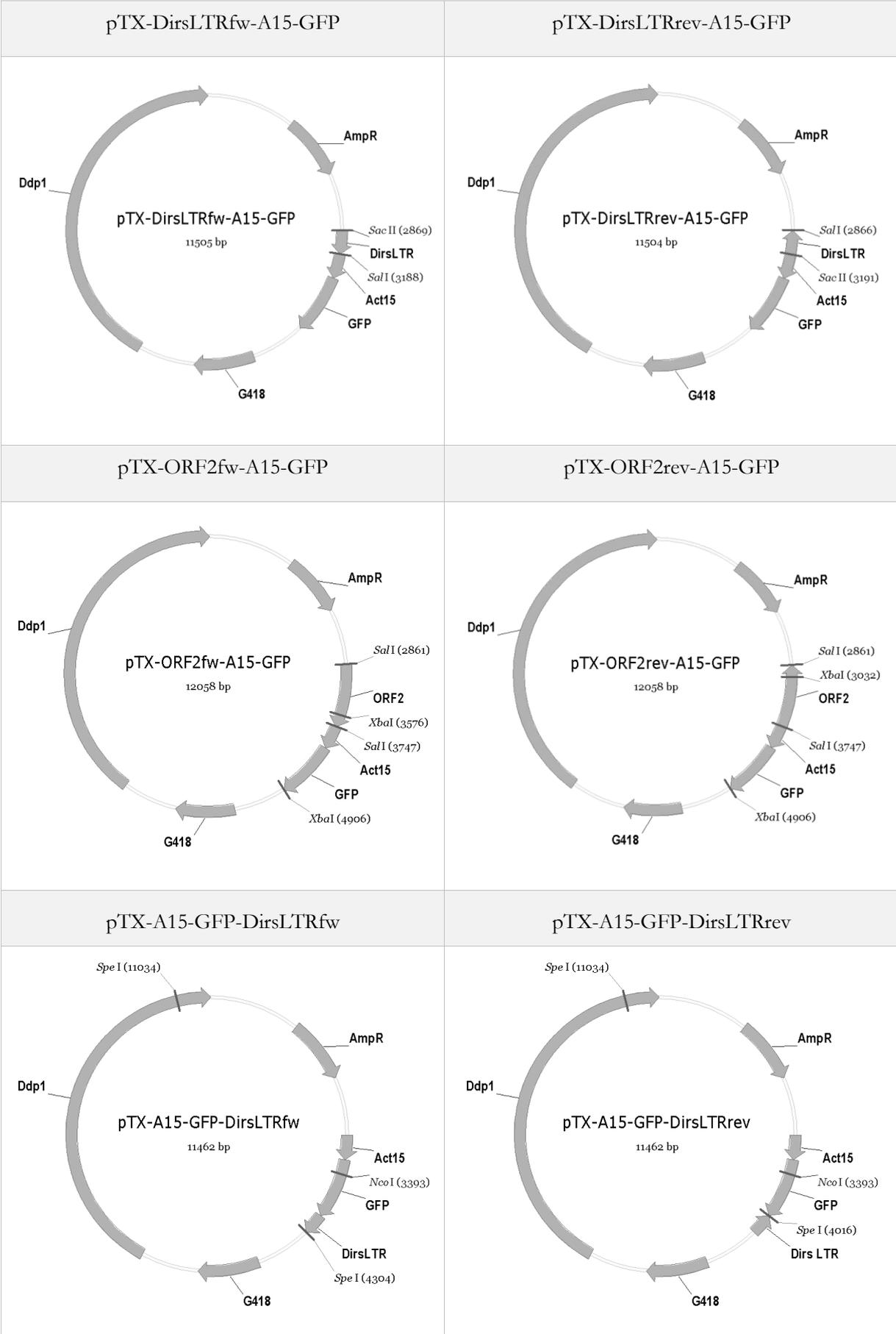
7.15.3 Plasmidkarten

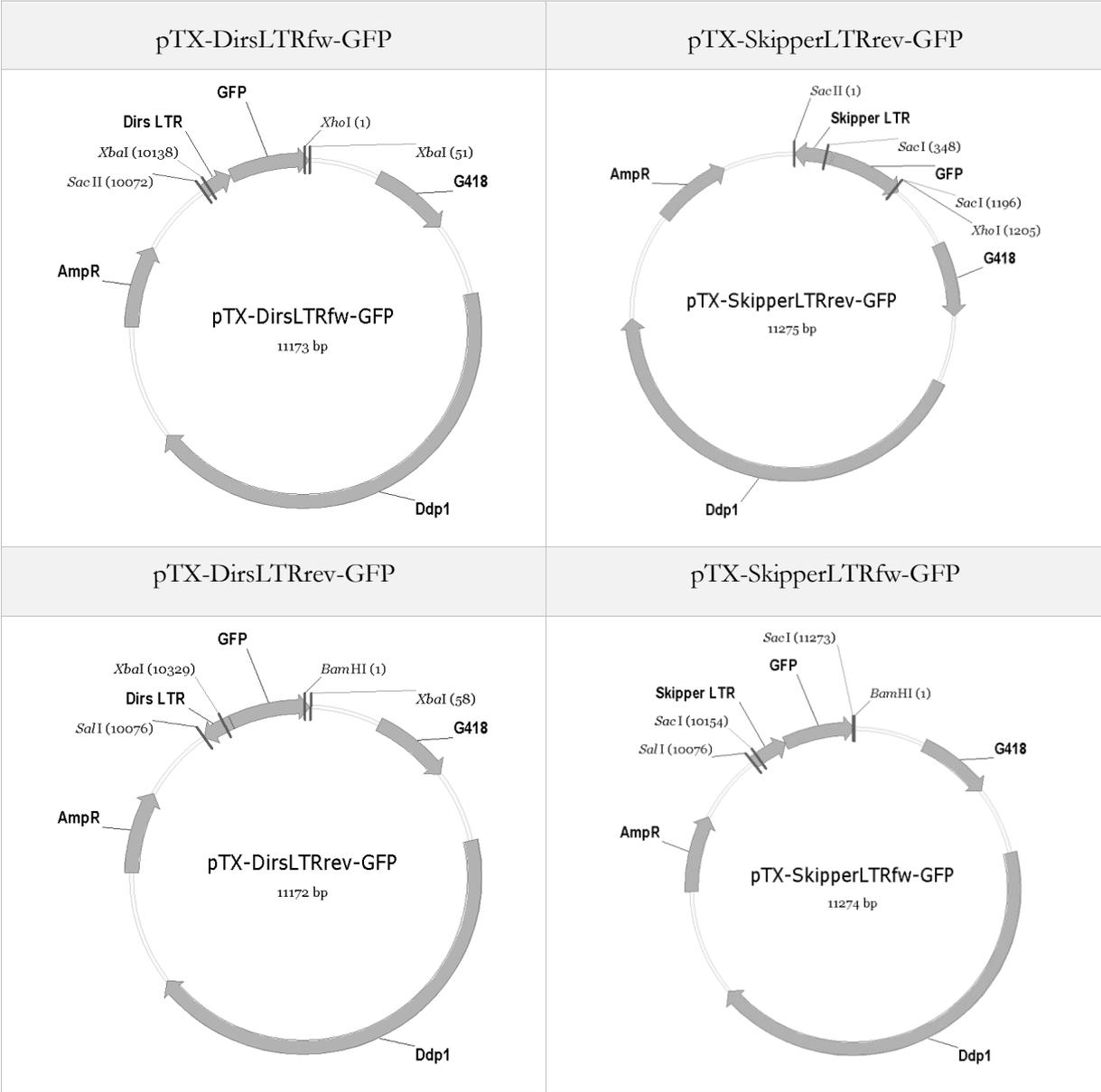












8 Methoden

Ein Teil der hier beschriebenen Methoden wurde in überarbeiteter Form aus meiner Diplomarbeit übernommen.

8.1 Zellbiologische Methoden

8.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Soweit im Folgenden nicht anders beschrieben, wurde *Escherichia coli* in LB-Medium bei 37 °C im Brutschrank angezogen. Das Medium wurde dabei ständig durch einen Schüttler bewegt. Antibiotika wurden dem Medium zur Selektion hinzugefügt. LB_{Amp}-Platten fanden zur Selektion transformierter Zellen Verwendung. Diese konnten anschließend dauerhaft bei 4 °C im Kühlraum gelagert werden.

8.1.2 Transformation von *Escherichia coli*

Um Plasmide in *Escherichia coli* zu transformieren, fand die Hitzeschock-Methode Verwendung. Dazu wurden kompetente Zellen kurz auf Eis aufgetaut und anschließend jeweils 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 1-5 µl Plasmid-DNA oder eines kompletten 15 µl Ligationsansatzes fand eine weitere Inkubation für 20 min auf Eis statt. Anschließend wurden die Zellen für 90 Sekunden im Heizblock auf 42 °C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gebracht. Nach Zugabe von 1 ml kalten LB-Mediums wurde der Ansatz für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt für 3 min bei 4000 rpm wurden die Zellen am Boden des Gefäßes gesammelt und der Überstand dekantiert. Die Zellen konnten nun durch vorsichtiges Pipettieren im verbliebenen Restmedium resuspendiert und auf LB_{Amp}-Agar zur Selektion ausplattiert werden. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C.

8.1.3 Anzucht von *Dictyostelium discoideum*

Die Anzucht von *Dictyostelium discoideum* fand unter Dauerlicht in Schüttelkultur bei 150 rpm oder in Petrischalen statt. In axenischem Medium und bei einer Temperatur von 22 °C beträgt die Verdoppelungszeit von *Dictyostelium discoideum* ca. 9 h. Durch gleichbleibende Bedingungen konnte so die für verschiedene Versuche benötigte Zelldichte im Vorfeld eingestellt werden. Zur Vermeidung von Kontaminationen und zur Selektion wurde das Medium mit verschiedenen Antibiotika versetzt. Schüttelkulturen wurden alle 3 Tage durch frisches Medium verdünnt, bei Kulturen in Petrischalen im gleichen Abstand das Medium komplett gewechselt.

8.1.4 Transformation von *Dictyostelium discoideum*

Für die Elektroporation von *Dictyostelium discoideum* wurden von einer Zellsuspension der Dichte $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml 2×10^7 Zellen abgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 1200 rpm wurden die Zellen in 10 ml Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert, um das Restmedium herauszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml EP-Puffer gewaschen und in 700 μ l EP-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10 μ g Plasmid-DNA wurde der Ansatz mit EP-Puffer auf 800 μ l aufgefüllt und die Suspension in eine vorgekühlte EP-Küvette überführt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis fand die Elektroporation bei 1 kV und 25 μ F statt. Während die Zellen erneut 10 min auf Eis standen, wurden 8 μ l 100 mM $MgCl_2$ sowie 8 μ l 100 mM $CaCl_2$ in eine Petrischale gegeben. Nach dem Zugeben der Suspension wurde diese 15 min in der Petrischale belassen und anschließend mit 10 ml G0-Medium aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel gegen das Selektionsmedium mit den entsprechenden Antibiotika. Nach erfolgreicher Transformation wurden nach etwa einer Woche einzelne Kolonien sichtbar.

8.1.5 Subklonierung von *Dictyostelium discoideum*

Wurden nach einer erfolgreichen Transformation in *Dictyostelium discoideum* Einzelklone benötigt, wurde wie folgt verfahren. Im ersten Schritt wurde das Selektionsmedium abgenommen und die Zellen anschließend in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte wurde eine Verdünnungsreihe berechnet, um eine Konzentration von 10^3 Zellen/ml zu erreichen. Der letzte Verdünnungsschritt fand dabei in KA-Suspension statt. Hierzu wurde eine mit *Klebsiella aerogenes* bewachsene SM-Platte mit Soerensen-Phosphatpuffer abgespült. Vom letzten Schritt der Verdünnungsreihe wurden nach gründlichem Mischen jeweils 100 μ l und 200 μ l auf frischen SM-Agar ausplattiert. Nach drei Tagen bei 22 °C wurden bei Erfolg einzelne Plaques sichtbar. Dabei handelt es sich um von *Dictyostelium discoideum* verursachte Fresshöfe im Bakterienrasen. Zur weiteren Verwendung wurden vom Rand der Plaques Zellen mit einem Zahnstocher gepickt und in mit G0-Medium gefüllte 24-Loch Costar-Platten überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium durch ein entsprechendes Selektionsmedium gewechselt und nach weiteren zwei Tagen resistente Klone für weitere Untersuchungen eingesetzt.

8.1.6 Herstellung von Sporen

Um transformierte *Dictyostelium*-Zellen dauerhaft zu lagern, konnten deren Sporen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. Dazu wurden 20 ml einer dicht gewachsenen Schüttelkultur 3 min bei 1200 rpm herunterzentrifugiert und anschließend das verbliebene Restmedium durch Waschen mit 20 ml Soerensen-Phosphatpuffer entfernt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert und auf einer Phosphatagar-Platte verteilt. Nach 3 Tagen konnten die reifen Sporenköpfe durch Abspülen mit 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer geerntet und in 1,5 ml Cryoröhrchen eingefroren werden. Mit 100 μl dieser Sporensuspension konnte zu einem späteren Zeitpunkt eine frische Kultur auf Petrischalen angesetzt werden. Dazu wurde zuerst G0-Medium verwendet und erst nach Schlupf der Amöben auf das entsprechende Selektionsmedium gewechselt.

8.1.7 UV-Mutagenese

Die UV-Mutagenese sollte Aufschluss darüber geben, in wie weit spezielle *Dictyostelium*-Stämme in der Lage waren, sich nach einer bestimmten Strahlendosis wieder zu erholen. Dazu wurden jeweils 1×10^5 Zellen in 10 ml G0-Medium auf Petrischalen gegeben und offen in den UV-Tisch gestellt. Nach Einstellen der verschiedenen Dosismengen wurde die Platte mit einer Wellenlänge von 312 nm bestrahlt. Die Zellen wurden anschließend im Medium resuspendiert und 1 ml davon abgenommen. Eine Verdünnung fand durch Zugabe von 100 μl dieser Lösung zu 900 μl KA-Suspension statt. Diese wurde im Vorfeld durch Abspülen von mit *Klebsiella aerogenes* bewachsenen SM-Platten gewonnen. Nach gründlicher Durchmischung wurden abschließend jeweils 100 μl und 200 μl der Suspension auf SM-Agar ausplattiert. Nach drei Tagen konnten die entstandenen Plaques auf den Platten ausgezählt werden.

8.1.8 Sporulationsversuch

Mit Hilfe dieses Versuches sollte die Sporulationsfähigkeit verschiedener Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Dazu wurden 1×10^6 Sporen, die nach Protokoll 8.1.6 hergestellt worden waren, in eine Petrischale mit 10 ml G0-Medium gegeben. Nach vier Tagen wurden die Zellen und Sporen im Medium resuspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

8.1.9 Wachstumskurven

8.1.9.1 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit in axenischem Medium

Um die Verdopplungszeit von axenisch gewachsenen *Dictyostelium*-Zellen zu bestimmen, wurden Wachstumskurven erstellt. Hierzu wurden am Vortag Schüttelkulturen in G0-Medium angesetzt, die so eingestellt waren, dass die Zelldichte kurz vor Beginn der Messung 1×10^6 Zellen pro ml betrug. Am nächsten Tag wurden davon, nach Verifizierung der Dichte, 30 ml Kulturen mit 5×10^4 Zellen pro ml angesetzt. Diese Kultur wurde bei 150 rpm und 22 °C auf dem Schüttler bewegt und alle 4 Stunden mit dem Zellzähler vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Eingabe der Ergebnisse in Microsoft Excel. Durch die Erstellung einer Regressionsgeraden der logarithmisch aufgetragenen Messpunkte konnte die Steigung ermittelt werden. Die Division von $\ln(2)$ durch die ermittelte Steigung ergab schließlich die Verdopplungszeit in Stunden für die entsprechende Zelllinie.

8.1.9.2 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit in KA-Suspension

Die Verdopplungszeit von *Dictyostelium* in KA-Suspension beträgt im Unterschied zu axenischem Medium nur etwa 4 Stunden. Für die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit in diesem Medium wurden zuerst mit *Klebsiella aerogenes* bewachsene SM-Platten mit Soerensen-Phosphatpuffer abgespült. Die zu untersuchenden *Dictyostelium*-Zellen wurden im Anschluss aus axenischer Schüttelkultur gewonnen, gezählt und mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurde jeweils 30 ml KA-Suspension mit so vielen Zellen angeimpft, dass die Schüttelkultur eine Dichte von 1×10^4 Zellen/ml erreichte. Diese und alle weiteren Messungen wurden mit einer Neubauerkammer unter einem Mikroskop durchgeführt. Nach Verifizierung der Startdichte folgten alle zwei Stunden weitere Messungen, bis die KA-Suspension transparent wurde und damit den Verbrauch der Nahrungsquelle anzeigte. Die anschließende Auswertung mit Microsoft Excel erfolgte wie unter 8.1.9.1 beschrieben.

8.1.10 Untersuchung der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*

Um die Entwicklung verschiedener *Dictyostelium*-Zellen untersuchen zu können, wurde diese fotografisch dokumentiert. Die dafür benötigte feuchte Kammer wurde wie folgt vorbereitet. Der Boden wurde mit zwei in Soerensen-Phosphatpuffer getränkten 3MM Whatman Papieren bedeckt. Auf der Unterseite des Deckels wurde ein weiterer Streifen 3MM Whatman mit Klebeband befestigt. Anschließend wurden 47 mm Nitrozellulosemembranen kurz in ddH₂O aufgeköcht und auf dem Boden plan ausgelegt. Pro Filter wurden 5×10^7 Zellen nach einem Waschschrift mit Soerensen-Phosphatpuffer ausgebracht, die Entwicklung der Zellen alle 4 Stunden mit einem

Binokular begutachtet und gegebenenfalls fotografisch dokumentiert. Etwaige Proben für eine Proteinaufreinigung wurden durch Abspülen der Membranen mit 5 ml Soerensen-Phosphatpuffer gewonnen.

8.2 Proteinbiochemie

8.2.1 Isolation von Proteinen

8.2.1.1 Isolation von Gesamtproteinen

Für die Präparation von Gesamtproteinen aus *Dictyostelium discoideum* wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Sollten Proben für einen einfachen Western Blot gewonnen werden, wurden 1×10^7 Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 10 Sekunden herunterzentrifugiert und anschließend in 100 μ l 2 x Lämmli-Puffer aufgenommen. Für die Untersuchung der HP1-Proteine wurde eine aufwendigere Präparation durchgeführt. Dazu wurden 1×10^8 Zellen aus einer Schüttelkultur durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 ml Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation, bevor das Pellet in 10 ml 150 mM NaCl und einer Protease-Inhibitor-Tablette resuspendiert wurde. Anschließend wurde so lange 10 % NP40 unter Mischen hinzugefügt, bis die Lösung aufklarte. Die Zellen wurden danach weitere 10 min auf Eis belassen. Eine Sonifizierung des Lysats fand für 2 x 15 Sekunden (Zyklus: 0,5 s; Amplitude: 100) mit einer Pause von 15 Sekunden statt. Es folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C. Vom Überstand konnten nun 80 μ l abgenommen und mit 10 μ l 9 x Lämmli-Puffer aufgeköcht werden.

8.2.1.2 HCl-Extraktion von Histonen

Das Protokoll zur Extraktion von Histonen mit Hilfe von Salzsäure folgt einem Protokoll von (Catherine Pears, unveröffentlicht). Dafür wurden pro Versuch 6×10^7 *Dictyostelium*-Zellen durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min geerntet und zweimal in Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml Histon-Puffer resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Inkubation von 10 min auf Eis, bevor die isolierten Zellkerne durch eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min am Boden des Gefäßes gesammelt wurden. Durch zwei weitere Wiederholungen konnte die Reinheit des Kernpellets gesteigert werden, wobei dem zuletzt eingesetzten Histon-Puffer 4 M Harnstoff und 10 μ l/ml β -Mercaptoethanol hinzugefügt wurden. Nach Abnahme des Überstandes folgte die Extraktion der Histone durch Zugabe von 150 μ l 0,4 M HCl. Dieser Schritt erfolgte für eine Stunde auf Eis, bevor der Überstand durch eine Zentrifugation bei 1300 rpm für 15 min bei 4 °C gereinigt wurde. Dieser wurde an-

schließlich abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Fällern der Proteine erfolgte durch Zugabe von 1,9 ml Aceton und einer Inkubation über Nacht bei -20 °C. Am nächsten Tag wurden die Proteine durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 15 min gesammelt und drei Mal mit kaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde anschließend unter einer Sterilbank luftgetrocknet und in der gewünschten Menge Lämmli-Puffer resuspendiert.

8.2.1.3 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Die Aufreinigung von TAP-getaggtten Proteinen erfolgte nach der Methode von (Rigaut *et al.*, 1999) wurde dabei aber in verschiedenen Punkten verändert. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden in Schüttelkultur so eingestellt, dass diese eine Dichte von 2×10^6 Zellen/ml erreichten. Durch Zentrifugationen bei 1200 rpm wurden diese in einem Pellet von 1×10^9 Zellen verdichtet. Während der jeweils dreiminütigen Zentrifugationen wurden die Zellen mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend konnte das Pellet in 10 ml TAP-Lysepuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert werden. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 min. Währenddessen wurde 300 µl IgG-Sepharose in einer Säule mit 5 ml TAP-Lysepuffer gewaschen. Der Überstand des zentrifugierten Lysats wurde im Anschluss in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und die gewaschene IgG-Sepharose hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 2 Stunden bei 4 °C auf einem Rotator. Die Lösung wurde anschließend in eine leere Säule überführt, um die IgG-Sepharose von den ungebundenen Proteinen zu trennen. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 10 ml TAP-Waschpuffer. Durch das Waschen der Säule mit 5 ml TEV-Cleavage Puffer wurde die Säule danach für den Protease-Verdau vorbereitet. Dieser erfolgte nach Überführung der Sepharose in 2 ml Reaktionsgefäße, bei der die Lösung auf 1 ml aufgefüllt und 100 u TEV-Protease hinzugegeben wurde. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 4 Stunden bei 4 °C auf dem Rotator. Sepharose und Überstand konnten nun durch eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 2 min getrennt und der Überstand abgenommen werden. Die Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 1 ml 20 % TCA (10 % Endkonzentration) während einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis gefällt. Ein Pellet konnte nach einer Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min und 4°C gewonnen werden. Bevor es unter einer Sterilbank luftgetrocknet wurde folgte ein Waschschrte mit 1 ml kaltem Aceton (-20 °C). Das Pellet wurde anschließend in der benötigten Menge Lämmli-Puffer gelöst.

8.2.1.4 Aufreinigung mit dem Nanotrap

Die Aufreinigung von GFP-gekoppelten Proteinen erfolgte über die Bindung an das GFP-bindende Protein (GBP) oder auch kurz Nanotrap (Rothbauer *et al.*, 2008). Je nach Versuch wurden dafür 1×10^7 bis 2×10^9 *Dictyostelium*-Zellen durch Zentrifugation (3 min, 1200 rpm, 4 °C) geerntet. Während des Zusammenführens der Zellen in ein 10 ml Gefäß wurden diese mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Sollten Proteine vor der Aufreinigung gecrosslinked werden, wurde das aus 2×10^9 Zellen bestehende Pellet in 10 ml Soerensen-Phosphatpuffer mit 5 mM DTBP eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift. Das Pellet wurde danach je nach Zellzahl in 0,2 bis 10 ml Nanotrap-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis belassen. Unlösliche Bestandteile wurden im Anschluss durch eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 min bei 4 °C entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 15 bis 50 µl mit Nanotrap-Verdünnungspuffer gewaschene GFP-Binder Sepharose hinzugegeben. Die halbstündige Inkubation fand auf einem Rotator statt. Die Sepharose wurde anschließend während einer Zentrifugation (2700 x g, 2 min, 4 °C) gesammelt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl Nanotrap-Verdünnungspuffer und die abschließende Aufnahme der Sepharose in 100 µl 2 x Lämmli-Puffer. Die Lösung der Proteinkomplexe von der Sepharose erfolgte durch ein Aufkochen für 10 min bei 95 °C.

8.2.2 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden denaturierte Proteine durch SDS negativ geladen und in einem elektrischen Feld nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurden 12 % Trenngele wie in Tabelle 1 gezeigt vorbereitet und zwischen die mit Platzhaltern präparierten Glasplatten gegossen. Bis die Trenngele vollständig auspolymerisiert waren wurden diese mit Isopropanol überschichtet, um eine saubere Oberflächengrenze zu erhalten. Nach Abgießen des Isopropanols konnten die Sammelgele auf die Trenngele gegossen und die Kämme eingeführt werden. Der letzte Schritt der Vorbereitung bestand im Befestigen der Gele in der Elektrophoreseapparatur und dem Überschichten mit 1 x Protein-Laufpuffer. Nun konnten die Proben sowie 5 µl Protein-Marker aufgetragen werden. Die Gelelektrophorese wurde anschließend bei 20 mA pro Gel durchgeführt bis das Bromphenolblau des Lämmli-Puffers am unteren Ende herausgelaufen war.

Tabelle 1: Komponenten für die SDS-PAGE (ausreichend für 2 Gele).

Komponente	12 % Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	4,4 ml	450 µl
Protein-Trenngelpuffer	2,64 ml	-
Protein-Sammelgelpuffer	-	1 ml
ddH ₂ O	3,4 ml	2,5 ml
150 mM EDTA	43,2 µl	16 µl
TEMED	6 µl	4 µl
20 % APS	120 µl	60 µl

8.2.3 SDS-Gradientengelelektrophorese

Für die bestmögliche Auftrennung von Proteinen vor einer massenspektrometrischen Untersuchung wurden 4-12 % NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini-Gele verwendet. Diese wurden in eine Xcell-SureLock[™]-Mini-Cell Apparatur eingespannt. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers.

8.2.4 AU-PAGE

Für die Auftrennung von posttranslational modifizierten Histonisoformen wurde die AU (Acid/Urea)-Gelelektrophorese verwendet. Diese ermöglicht im Unterschied zur SDS-PAGE eine Auflösung abhängig vom Phosphorylierungs- oder Acetylierungsstatus der Histone. Grundlage für das hier in angepasster Form dargestellte Protokoll war die Veröffentlichung von (Shechter *et al.*, 2007). Der Versuch begann mit dem Zusammengeben der in Tabelle 2 dargestellten Komponenten für das AU-Trenngel. Nachdem als letztes TEMED und APS hinzugegeben und damit die Polymerisation gestartet wurde, konnte die Lösung zwischen zwei große, durch Platzhalter und Agarose abgedichtete Glasplatten gegossen werden. Die Lösung wurde mit ddH₂O überschichtet und für eine Stunde so belassen. Nach Abnehmen des ddH₂O wurde das Sammelgel anschließend wie in Tabelle 2 dargestellt vorbereitet und auf das Trenngel gegossen. Idealerweise sollte nur noch 1 cm zwischen dem Sammelgel und der oberen Kante der Glasplatten verbleiben. Dieser Spalt wurde wiederum mit ddH₂O ausgefüllt. Die Polymerisation erfolgte in den folgenden 2 Stunden.

Tabelle 2: Komponenten für ein AU-Gel.

Komponente	AU-Trenngel	AU-Sammelgel
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	35 ml	1 ml
Harnstoff	25,2 g	1,8 g
100 % Essigsäure	3,5 ml	250 µl
ddH ₂ O	11,2 ml	2,3 ml
TEMED	420 µl	30 µl
20 % APS	490 µl	35 µl

Um Radikale des Polymerisationsprozesses zu entfernen, wurde ein Vorlauf durchgeführt. Der untere Platzhalter musste dafür entfernt, das Gel in die Apparatur eingespannt und die Wannen mit Laufpuffer (5 % Essigsäure) aufgefüllt werden. Das Sammelgel wurde anschließend mit 500 µl AU-Probenpuffer überschichtet und der Vorlauf bei 300 V für 20 Stunden, bei umgekehrter Stromzufuhr durchgeführt. Anders als bei der SDS-PAGE tragen Histone und das im AU-Probenpuffer enthaltene Protaminsulfat eine positive Ladung und wandern darum zum negativen Pol. Nach Beendigung der Vorbehandlung wurde das Gel aus der Apparatur genommen und alle Pufferreste entfernt. In das Sammelgel konnte nun ein selbstgebauter Kamm gesteckt werden, der das Gießen von Ladetaschen unnötig machte. Nach erneutem Einspannen in die Gelapparatur wurden die Proben vorbereitet. Die getrockneten Histone wurden dafür in je 10 µl AU-Probenpuffer durch Vortexen gelöst und auf das Gel geladen. Freie Stellen wurden mit AU-Probenpuffer aufgefüllt. Anschließend wurde die Elektrophorese zunächst für 2 Stunden bei 200 V und dann für 20 Stunden bei 300 V durchgeführt. Danach konnten die aufgetrennten Proteine durch eine Coomassie Färbung sichtbar gemacht werden.

8.2.5 Coomassie-Färbung

Um die aufgetrennten Proteine nach einer SDS-PAGE oder AU-Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden die Gele über Nacht schwenkend in kolloidaler Coomassie-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Lösung gegen Wasser gewechselt und die Gele schwenkend entfärbt werden. Übrig bleiben sichtbare Proteinbanden, die eine quantitative Aussage über die Proteinmengen zuließen.

8.2.6 Western Blot

Der Transfer von Proteinen nach einer SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran fand mit Hilfe von Western Blots statt. Zu diesem Zweck wurden pro zu blottendem Gel 4 Lagen 3MM

Filterpapiere, sowie eine Nitrozellulosemembran zugeschnitten und in Semi-dry Blotpuffer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2 Lagen der Filterpapiere auf die Kathode der Blotapparatur gelegt. Darauf folgten das Gel, die Membran und wiederum zwei Lagen der getränkten Papiere. Während des Aufbaus wurden eventuell vorhandene Luftschlüsse zwischen den Lagen sorgfältig entfernt. Nach Auflegen der Deckplatte wurde der Transfer für 1 h bei 85 mA durchgeführt.

8.2.7 Immundetektion

Die Detektion von geblotteten Proteinen wurde mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase Reaktion durchgeführt. Dazu wurde die Membran für 30 min in 10 ml Blockierlösung schwenkend präinkubiert. Anschließend konnte die Membran über Nacht bei 4°C in 10 ml Blockierlösung und dem darin verdünnten 1. Antikörper inkubiert werden.

Tabelle 3: Eingesetzte Verdünnungen der 1. Antikörper.

Antikörper	Verdünnungen	Hersteller
Maus-Anti-Coronin	1:20	Universität Kassel, Kassel
Maus-Anti-GFP	1:5	Universität Kassel, Kassel
Maus-Anti-myc	1:5	Universität Kassel, Kassel
Kaninchen-Anti-TAP	1:2000	Open Biosystems, AL, USA

Am darauf folgenden Tag wurde die Membran zuerst 3 x 10 min in 1 x NCP-Puffer gewaschen. Anschließend folgte eine zweistündige Inkubation mit dem in 10 ml Blockierlösung gelösten 2. Antikörper, der die alkalische Phosphatase trug.

Tabelle 4: Eingesetzte Verdünnungen der 2. Antikörper.

Antikörper	Verdünnungen	Hersteller
AP-gekoppelter Ziege-Anti-Maus	1:2500	Dianova, Hamburg
AP-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen	1:2500	Dianova, Hamburg

Ein erneuter Waschschrift von 3 x 10 min in 1 x NCP-Puffer diente dem Entfernen aller nicht gebundenen Antikörper. Die Farbreaktion wurde im Dunkeln durch Inkubation der Membran in 10 ml AP Puffer und 35 µl BCIP-Lösung gestartet. Schwache Signale konnten durch Zugabe von 50 µl NBT-Lösung verstärkt werden. Trat die spezifische Färbung ein, wurde die Membran sofort mit Wasser abgespült.

8.2.8 Massenspektrometrie

Um einzelne Banden eines SDS-Gels einem Protein zuordnen zu können oder um posttranslationale Modifikationen von Proteinen nachzuweisen, wurde die Massenspektrometrie eingesetzt. Die experimentelle Arbeit wurde in der Abteilung Biochemie der Universität Kassel von Oliver Bertinetti durchgeführt und wird deshalb hier nicht im Detail erläutert. Die zu untersuchenden Gelbanden wurden zuerst ausgeschnitten und nachfolgend einem Verdau mit verschiedenen Proteasen unterzogen. Nach Absprache wurden dafür die Enzyme Trypsin (schneidet nach einem Lysin oder Arginin), Chymotrypsin (schneidet nach Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin) oder die Kombination aus beiden eingesetzt. Die Detektion der Peptide erfolgte mit einem Hybrid Instrument aus Triple-Quadrupol MS und linearer Ionenfalle (4000 Q TRAP[®]). Die Daten wurden mit der Software MASCOT[®] des Herstellers Matrix Science analysiert. Auf die Auswertung der Daten wird in den Ergebnissen detailliert eingegangen.

8.3 Molekularbiologische Methoden

8.3.1 PCR

Der Einsatz der Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986) diente der spezifischen Amplifizierung von DNA Fragmenten. Hierbei wurde durch Verwendung der thermostabilen *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase, sequenzspezifischer Primer sowie weiterer Komponenten (siehe Tabelle 5) der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Ein Programmbeispiel einer Standard-PCR ist in Tabelle 6 dargestellt. Das Programm wurde den Bedürfnissen (Probe, Fragmentlänge, Primer) entsprechend modifiziert.

Tabelle 5: Reaktionsansatz einer Standard-PCR.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Probe	-	2 µl
PCR-Puffer	10 x	2,5 µl
dNTPs	10 mM	2,5 µl
5'-Primer	5 mM	2,5 µl
3'-Primer	5 mM	2,5 µl
Polymerase	-	1 µl
ddH ₂ O	-	12 µl
		Σ25 µl

Tabelle 6: Programmbeispiel einer Standard-PCR.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	94	5 min	1
2	94	30 s	30
3	50*	30 s	
4	68*	1 min/ kb <i>Taq</i> -Polymerase 2 min/ kb <i>Pfu</i> -Polymerase	

* Werte wurden den Bedürfnissen entsprechend angepasst.

8.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte mit Hilfe nichtdenaturierender Agarosegele. Die Färbung der Nukleinsäuren erfolgte mit Ethidiumbromid, welches zwischen benachbarten Basen der Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht im sichtbaren Bereich von 560 nm fluoresziert. Zur Durchführung wurde Agarose durch Aufkochen in 1 x TBE gelöst und anschließend 0,01 % Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben. Die flüssige Agaroselösung konnte nun in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen werden. Ein Kamm diente dabei als Platzhalter für die Probenaschen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x TBE Puffer gefüllt und die Proben nach Zugabe von 3 µl DNA-Auftragspuffer in die Taschen pipetiert. Die Elektrophorese wurde im Anschluss bei 6 V/cm durchgeführt.

8.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Gelelutionen wurden durchgeführt, um DNA-Fragmente nach einer elektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel zu isolieren. Dazu wurden die gewünschten Banden auf einem UV-Tisch mittels Skalpell ausgeschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die anschließende Elution erfolgte mit dem NucleoSpin® ExtractII Kit nach Anleitung des Herstellers. Sollten Plasmide nach einem Restriktionsverdau von Enzymen und Puffern befreit werden, wurde die Lösung dem Protokoll zur direkten Reinigung von PCR-Produkten des gleichen Kits unterzogen.

8.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Sollten DNA-Fragmente in einen Vektor ligiert werden, wurde die Eigenschaft der T4 DNA-Ligase genutzt, kovalente Verbindungen zwischen DNA-Molekülen zu knüpfen. Die Ligation erfolgte meist nach einem im Vorfeld durchgeführten Restriktionsverdau, um kompatible, einzelsträngige Überhänge nutzen zu können. Ein Standard Ligationsansatz ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 7: Beispiel eines typischen Ligationsansatzes.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Vektor	-	2 μl^*
Insert	-	2 μl^*
T4 Ligase-Puffer (+ DTT)	10 x	1,5 μl
T4 DNA-Ligase	1 u/ μl	1 μl
ddH ₂ O	-	8,5 μl^*
		Σ 15 μl

* Werte wurden den Bedürfnissen entsprechend angepasst.

Insert und Vektor wurden möglichst im gleichen Verhältnis eingesetzt, welches nach einer vorherigen elektrophoretischen Auftrennung abgeschätzt werden konnte. Nachdem alle Komponenten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben wurden, fand die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur statt. Anschließend konnte der gesamte Ansatz für eine Transformation eingesetzt werden. Sollten Fragmente in den Vektor pJET1/blunt ligiert werden, wurde das GeneJET™ PCR Cloning Kit verwendet und nach Anleitung des Herstellers verfahren.

8.3.5 Fällen von Nukleinsäuren

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurden diese mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach kurzem Mischen der Lösung folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 14000 rpm. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 min wurde der Überstand abermals verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Abschließend konnte die Nukleinsäure in der gewünschten Menge ddH₂O aufgenommen werden.

8.3.6 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion. Dabei wurde die Lösung mit einem Volumen 1:1 Phenol/Chloroform versetzt, kurz gevortext und für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte die wässrige, nukleinsäurehaltige Phase vorsichtig abgenommen werden. Um Reste der organischen Lösungsmittel zu entfernen, wurde die Nukleinsäure anschließend einer Fällung unterzogen.

8.3.7 Plasmidpräparationen

8.3.7.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Um geringe Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu gewinnen, wurden Minipräparationen nach (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt. Dazu wurden 1 ml Schüttelkulturen für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Pellet durch Vortexen in 100 µl Lösung I gelöst. Nachdem 200 µl Lösung II hinzugegeben und der Ansatz kurz invertiert wurde, fand eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Nach Zugabe von 200 µl vorgekühlter Lösung III und erneutem kurzem Invertieren wurde ein weiterer Inkubationsschritt von 10 min auf Eis eingelegt. Durch eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm wurden die Zellreste gesammelt und anschließend der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde 1 ml kalter Ethanol hinzugegeben und die Lösung 30 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut durch Zentrifugation gesammelt. Nach Abgießen des Ethanols wurde die DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet und danach in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

8.3.7.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Sollten Plasmide in großer Menge gewonnen werden, wurden diese mit dem NucleoBond® PC 100 Kit nach Anleitung des Herstellers aus 50 ml Schüttelkulturen gewonnen. Durch diese Methode wurde eine höhere Reinheit und eine Ausbeute von rund 100 µg Plasmid erzielt.

8.3.8 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

8.3.8.1 Analytischer Restriktionsverdau

Analytische Restriktionsverdaue wurden durchgeführt, um Plasmide auf das Vorhandensein bestimmter Fragmente zu testen. Dafür wurde meist Plasmid-DNA aus Minipräparationen verwendet. Die Auswahl des Enzympuffers erfolgte nach Vergleich der Aktivitäten der verwendeten Enzyme. Ein typischer Restriktionsansatz ist in Tabelle 8 aufgeführt. Nachdem die Komponenten zusammengegeben wurden, fand die Inkubation für mindestens 1 Stunde bei der entsprechenden Aktivitätstemperatur statt. Eine Inaktivierung der Enzyme erübrigte sich durch die anschließende Gelelektrophorese, die der Auswertung diente.

Tabelle 8: Typischer Ansatz eines analytischen Restriktionsverdaus.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Plasmid-DNA	-	5 µl
Enzym 1	10 u/µl	0,5 µl
Enzym 2	10 u/µl	0,5 µl
Enzympuffer	10 x	1,5 µl*
RNase A	1 µg/µl	1 µl
ddH ₂ O	-	6,5 µl*
		Σ15 µl

* Werte wurden den Bedürfnissen entsprechend angepasst.

8.3.8.2 Präparativer Restriktionsverdaus

Durch präparative Restriktionsverdaue sollten ausreichende Mengen geschnittener Vektoren oder Inserts gewonnen werden, um diese für eine Ligation einsetzen zu können. Hierfür wurde Plasmid-DNA aus Maxipräparationen verwendet und in eine Reaktion, wie sie in Tabelle 9 dargestellt ist, eingesetzt.

Tabelle 9: Typischer Ansatz eines präparativen Restriktionsverdaus.

Komponente	Konzentration	Vektor	Insert
Plasmid-DNA	1 µg/µl	5 µl	10 µl
Enzym 1	10 u/µl	1 µl	1 µl
Enzym 2	10 u/µl	1 µl	1 µl
Enzympuffer	10 x	10 µl*	5 µl*
CIP	1 u/µl	1 µl	-
ddH ₂ O	-	82 µl*	33 µl*
		Σ100 µl	Σ50 µl

* Werte wurden den Bedürfnissen entsprechend angepasst.

Nach Mischung der Komponenten wurden die Ansätze für mindestens 2 h bei der optimalen Aktivitätstemperatur der Enzyme inkubiert. Anschließend wurden die Proben vor der Ligation aufgereinigt.

8.3.9 Erzeugen von glatten DNA-Enden

Das Erzeugen von glatten DNA-Enden wurde je nach Art der vorhandenen Überhänge auf verschiedene Weise durchgeführt. Für 3'-Überhänge wurde dem Restriktionsansatz nach Deaktivie-

rung der darin enthaltenen Enzyme 5 u T4 DNA-Polymerase und 2,5 µl dNTPs (je 2 mM) hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deaktivierung fand auf einem Heizblock bei 75 °C für 10 min statt. Die Bearbeitung von 5'-Überhängen erfolgte durch Zugabe von 2 µl dNTPs (je 2,5 mM) und 5 u Klenow-Fragment in den deaktivierten Restriktionsansatz. Die Inkubation fand für eine Stunde bei 37 °C statt, bevor die Fragmente aufgereinigt wurden.

8.3.10 Erzeugen von 3'A-Überhängen

Sollte ein Fragment in den Vektor pGEM[®]-T Easy ligiert werden, wurde die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase ausgenutzt, ein Desoxyribonukleotid, meist ein Adenosin an das 3'-Ende doppelsträngiger DNA anzuhängen (Clark, 1988). Das Plasmid enthält an der Insertionsstelle einen 3'T-Überhang, womit eine Klonierung ermöglicht wird. Die Überführung von glatten Enden in 3'A-Überhänge, zum Beispiel nach einer Amplifikation mit der *Pfu*-Polymerase, erfolgte durch das Zusammengeben der in Tabelle 10 dargestellten Komponenten. Die Inkubation fand im Anschluss für 30 min bei 70 °C in einem Thermocycler statt.

Tabelle 10: Komponenten zur Erzeugung von 3'-Überhängen

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
DNA-Fragment	-	5 µl
<i>Taq</i> -Puffer (+ KCl, +MgCl ₂)	10 x	1 µl
dATP	2 mM	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	-	1 µl
ddH ₂ O	-	2 µl
		Σ10 µl

8.3.11 Mutagenese von DNA-Fragmenten

8.3.11.1 PCR-Mutagenese mit überlappenden Fragmenten

Das Einfügen von Punktmutationen mit Hilfe überlappender Fragmente wurde wie folgt durchgeführt. Zuerst wurden Amplifikationen wie unter 8.3.1 beschrieben, ausgehend von der zu mutierenden Stelle, in 5'- und in 3'-Richtung durchgeführt. Für die erste PCR wurde ein Vorwärts-Primer, der am 5'-Ende des zu amplifizierenden Gens band, sowie ein Rückwärts-Primer, der am 5'-Ende die Punktmutation trug, eingesetzt. Die zweite PCR erfolgte durch einen Vorwärts-Primer mit integrierter Punktmutation am 5'-Ende sowie eines Rückwärts-Primers, der am 3'-Ende des Gens band. Dadurch entstanden zwei Fragmente, die an der mutierten Stelle überlappen. Nach einer Aufreinigung wurden diese in einer weiteren PCR eingesetzt. Die einzelnen

Komponenten dafür sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen der Standard-PCR, wobei lediglich 15 Zyklen durchlaufen wurden. Anschließend konnte das Fragment in den Vektor pJET1/blunt ligiert werden.

Tabelle 11: Ansatz einer PCR mit überlappenden Fragmenten.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
linkes Fragment	-	4 μ l
rechtes Fragment	-	4 μ l
<i>Pfu</i> -Puffer (+MgSO ₄)	10 x	2,5 μ l
dNTPs	10 mM	2,5 μ l
<i>Pfu</i> -Polymerase	-	1 μ l
ddH ₂ O	-	11 μ l
		Σ 25 μ l

8.3.11.2 Schnelle PCR-Mutagenese

Die schnelle PCR-Mutagenese basiert auf dem im *QuikChange Site-Directed-Mutagenesis-Kit* enthaltenen Protokoll des Herstellers Stratagene. Hierfür wurden lediglich zwei Primer benötigt, die die gewünschte Punktmutation in der Mitte trugen. Als Vorlage für die PCR diente das Zielplasmid, in das die Mutation eingefügt werden sollte. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 12, das dazugehörige PCR-Programm in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die schnelle PCR-Mutagenese.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
Plasmid-DNA	5 ng / μ l	4 μ l
<i>Pfu</i> -Puffer (+MgSO ₄)	10 x	5 μ l
dNTPs	10 mM	5 μ l
5'-Primer	50 ng/ μ l	2,5 μ l
3'-Primer	50 ng/ μ l	2,5 μ l
<i>Pfu</i> -Polymerase	-	2 μ l
ddH ₂ O	-	29 μ l
		Σ 50 μ l

Tabelle 13: Programm für die schnelle PCR-Mutagenese.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	94	30 s	18
2	56	1 min	
3	68	2 min/ kb	

Da das Restriktionsenzym *Dpn* I nur methylierte, nicht aber die bei der PCR entstandene nicht methylierte Plasmid-DNA schneidet, konnte das Ursprungsplasmid durch Zugabe von *Dpn* I zerstört werden. Hierzu wurden 2 µl des Enzyms zu dem PCR-Produkt gegeben und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Übrig blieben idealerweise nur Plasmide, die die gewünschte Mutation trugen. Anschließend wurden 10 µl des Restriktionsansatzes in *E. coli* transformiert. Der Erfolg konnte nach Maxipräparationen der erhaltenen Klone durch Sequenzierungen nachgewiesen werden.

8.3.12 Isolation von genomischer DNA aus *Dictyostelium discoideum*

8.3.12.1 Maxipräparation

Um große Mengen genomischer *Dictyostelium*-DNA für beispielsweise Southern Blot Analysen zu gewinnen, wurden Maxipräparationen durchgeführt. Hierfür wurden aus Schüttelkulturen 2×10^8 Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 3 min) geerntet und zwei Mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 25 ml DNA-Lysepuffer aufgenommen und 10 % NP40 Lösung so lange hinzugegeben, bis die Suspension aufklarte. Es folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml 0,7 % SDS-Lösung resuspendiert und 100 µl Proteinase K hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 3 Stunden bei 65 °C im Wasserbad. Anschließend wurden 2 Phenol/Chlorophorm-Extraktionen (Protokoll 8.3.6) durchgeführt, bevor die DNA nach Protokoll 8.3.5 gefällt wurde.

8.3.12.2 Kurzprotokoll

Das Kurzprotokoll wurde für die Untersuchung von Knockout-Zellen aus Costar-Platten verwendet. Es folgt der Veröffentlichung von (Charette und Cosson, 2004). Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen zuerst im Medium resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch eine Zentrifugation bei 4000 rpm für eine Minute wurden diese anschließend am Boden des Gefäßes gesammelt und in 100 µl DNA-Lysepuffer B aufgenommen. Nach Zugabe von 4 µl Proteinase K wurde die Lösung 5 min bei Raumtemperatur belassen. Die Inaktivierung des En-

zyms fand auf einem Heizblock bei 95 °C für 10 min statt. Von dieser Lösung konnten nun 5 µl in einer PCR eingesetzt werden.

8.3.13 Radioaktive Markierung von DNA durch Oligonukleotide

Mit Hilfe von Hexanukleotid-Primern und der Klenow-Polymerase wurden durch Inkorporation von radioaktiv markiertem ATP-Sonden für Northern Blots hergestellt. Der dafür benötigte Reaktionsansatz ist in Tabelle 14 dargestellt. Kurz vor dem Zusammengeben der Komponenten wurde die eingesetzte DNA für 5 min auf 95 °C erhitzt, um diese zu denaturieren. Der Reaktionsansatz wurde danach für eine Stunde bei 37 °C belassen. Um nicht inkorporierte Nukleotide zu entfernen, wurde die Lösung anschließend durch eine Sephadex[®] G50 Säule zentrifugiert und kurz vor der Hybridisierung durch eine Inkubation von 5 min bei 95 °C denaturiert.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für das Oligolabeling.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen
DNA	0,1 µg/µl	2 µl
OLB-Mix	5 x	10 µl
BSA	10 µg/µl	2 µl
[α- ³² P] dATP	110 TBq/mmol	5 µl
Klenow Fragment	5 u/µl	1 µl
ddH ₂ O	-	30 µl
		Σ50 µl

8.3.14 RNA-Isolation aus *Dictyostelium discoideum*

Die Isolation von RNA fand als Vorbereitung für Northern Blots statt und basiert auf dem Protokoll von (Maniak *et al.*, 1989). Dazu wurden 2×10^7 *Dictyostelium*-Zellen aus axenischer Schüttelkultur entnommen und für 3 min bei 1200 rpm pelletiert. Die Zellen wurden anschließend mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Danach wurden diese durch Aufnahme in 500 µl Lösung D lysiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform wurden Proteine denaturiert und durch Zugabe von 50 µl Lösung III die Nukleinsäurefällung vorbereitet. Nach Vortexen und einer Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und abermals in ein neues Gefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 ml Isopropanol für 20 min bei -20 °C gefällt und anschließend durch eine Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4 °C) gesammelt. An-

schließlich wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet konnte nun in 100 µl Formamid aufgenommen werden.

8.3.15 Northern Blot

Für die Analyse von *Dictyostelium*-RNA mit Hilfe von Northern Blots wurde diese auf einem denaturierenden 1,8 % GTC-Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in 100 ml TBE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 60 °C 500 µl 1 M GTC hinzugegeben und das Gel gegossen. Pro Spur wurden 10 µg RNA mit 2 Volumen RNA-Probenpuffer gemischt, für 5 min auf 85 °C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgte im Anschluß bei 90 V im Kühlraum. Das Gel wurde danach für den späteren Vergleich zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte durch Schichtung eines 3MM Whatman Papiers auf eine Glasplatte, worauf das Gel, die Membran, 3 weitere Whatman Papiere, ein Stapel Papierhandtücher und wiederum eine Glasplatte folgten. Beschriftet wurde der Stapel mit einer gefüllten 500 ml Flasche. Das Pufferreservoir wurde mit 20 x SSC Puffer gefüllt und der Transfer über Nacht durchgeführt. Die Membran konnte am nächsten Tag aus dem Aufbau entnommen und mit 2 x SSC Puffer gewaschen und dann getrocknet werden. Das Crosslinking fand unter UV-Licht bei 256 nm, 0,125 J/cm² statt. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde in Hybridisierungslösung bei 42 °C inkubiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde fand bei gleicher Temperatur über Nacht statt. Die Membran wurde danach mit 2 x SSC Puffer, 0,1 % SDS und zwei Mal mit 0,2 x SSC, 0,1 % SDS für jeweils 30 min gewaschen. Die Auswertung erfolgte nach Exposition der Membran auf eine Imager Platte mit dem Phosphorimager.

8.4 Mikroskopische Methoden

8.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Begutachtung fixierter Zellpräparate fand an einem Leica DM IRB Fluoreszenzmikroskop statt. Entsprechende Filter für Cy3, GFP und DAPI standen zur Verfügung. Alle Bilder wurden bei einer 1000fachen Vergrößerung über die eingebaute Digitalkamera aufgenommen und als Graustufenbilder exportiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe der Software Adobe Photoshop durch Verteilen der Graustufenbilder auf die entsprechenden Kanäle eines RGB Bildes (R=Cy3, G=GFP, B=DAPI) und anschließender Kontrastanpassung. Für die Längenbestimmung von Sporen wurde auf die Software ImageJ zurückgegriffen, die nach Kalibrierung mit einem Mikrometer genaue Messungen ermöglichte.

8.4.2 *In vivo* Zellbeobachtung

Für die Beobachtung von lebenden Zellen wurden diese in ihrem Medium resuspendiert und die benötigte Menge auf 50 mm Deckgläschen gegeben. Nach einem halbstündigen Absitzen wurde das Medium abgesaugt und gegen Soerensen-Phosphatpuffer gewechselt. Sollten Sporen untersucht werden, wurden diese durch 0,01 % Calcofluor angefärbt und nach einer zehnminütigen Inkubation mikroskopiert.

8.4.3 Nocodazol Behandlung

Unter normalen Bedingungen befinden sich weniger als 1 % der *Dictyostelium*-Zellen in der Mitose. Für mikroskopische Beobachtungen war allerdings je nach Versuch ein höherer Wert wünschenswert. Zur Anreicherung mitotischer Zellen diente das Protokoll von (King und Insall, 2003). Dazu wurden 5×10^6 Zellen in 5 cm Petrischalen gegeben, in denen sich mit HCl gewaschene Deckgläschen befanden. Nach 2 Stunden wurden dem Medium 33 μ M Nocodazol hinzugefügt. Das Medium verblieb nun für weitere 2 Stunden auf den Zellen, bevor mit der Fixierung der Zellen fortgefahren werden konnte.

8.4.4 Fixierung von Zellen

Sofern nicht anders vermerkt basieren die folgenden Fixierungstechniken auf den auf dictybase.org (Kreppel *et al.*, 2004) veröffentlichten Protokollen.

8.4.4.1 Methanol-Fixierung

Die Fixierung von *Dictyostelium discoideum* Zellen diente der Vorbereitung für mikroskopische Untersuchungen. Hierzu wurden mit HCl-gewaschene 20 mm Deckgläschen in 5 ml Petrischalen gegeben. Von einer Zellkultur wurden nun 5×10^6 Zellen abgenommen und damit die Deckgläschen überschichtet. Die Zellen konnten in den folgenden 0,5 bis 2 Stunden absitzen, bevor die Deckgläschen wieder aus den Petrischalen genommen wurden. Nach Entfernen des Restmediums wurden die Deckgläschen für 20 min in vorgekühltes Methanol getaucht und bei -20 °C im Gefrierschrank inkubiert. Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit jeweils 500 μ l PBS/0,05 % Tween 20, um die verbliebenen Methanolreste zu entfernen. Sollte eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt werden, wurde ab diesem Schritt nach Protokoll 8.4.5 verfahren. Andernfalls wurden für die Chromosomenfärbung 200 μ l DAPI-Lösung in einer 1:15000 Verdünnung für 10 min auf das Deckgläschen gegeben. Nach den folgenden drei Waschschrten mit PBS/0,05 % Tween 20 wurde das Deckgläschen kurz in ddH₂O getaucht und die verbliebene

Flüssigkeit mit einem Papiertuch entfernt. Mit Hilfe eines Tropfens Gelvatol konnte das Deckgläschen abschließend dauerhaft auf einem Objektträger fixiert werden.

8.4.4.2 Zwei-Schritt-Fixierung

Für die Untersuchung von Mitosen und der dafür benötigten Immunfärbung von α -Tubullin durch Antikörper, wurden die Zellen einer kombinierten Fixierungstechnik unterzogen. Nachdem wie zuvor beschrieben Deckgläschen mit anhaftenden Zellen hergestellt wurden, konnte mit dem ersten Teilschritt begonnen werden. Eine Lösung von 1,85 % Formaldehyd in 15 mM Na/K-PO₄ Puffer diente hierbei als Fixativ. Die Zellen wurden mit 200 μ l dieser Lösung überschichtet und 5 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Abnehmen des Fixativs wurden die Zellen sogleich in vorgekühltes Methanol getaucht und bei -20 °C für 5 min inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS/0,05 % Tween 20 bevor die Behandlung des Präparats nach Protokoll 8.4.5 fortgesetzt wurde.

8.4.4.3 Herstellung von Chromosomen-Spreads

Zur Untersuchung der Diploidität einer *Dictyostelium*-Population wurden Chromosomen-Spreads nach dem Protokoll von (King und Insall, 2003) angefertigt. Um eine statistisch verwertbare Anzahl an Metaphase Zellen zu erhalten, erfolgte vorher eine Nocodazol-Behandlung wie unter 8.4.3 beschrieben. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit eiskaltem ddH₂O überschichtet und für 10 min darin belassen. Die Fixierung erfolgte anschließend durch Eintauchen der Deckgläschen in eiskalte „Carnoy's Lösung“ (3:1 Ethanol:Essigsäure), in der die Zellen für 1 Stunde verblieben. Anschließend erfolgte eine weitere zehnmünütige Inkubation in frischem Fixativ, bevor die Deckgläschen an der Luft getrocknet wurden. Die darauf folgende DAPI-Färbung verlief wie unter 8.4.4.1 beschrieben.

8.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Alle folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Nach erfolgter Fixierung der Zellen wurden zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Antikörper freie Bindungsstellen blockiert. Dazu diente PBS/0,1 % BSA. Die Zellen wurden mit 200 μ l dieser Lösung überschichtet und für 30 min bei 37 °C belassen. Nach dem Absaugen der Blockierlösung konnte der erste Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBS/0,1 % BSA eingesetzt werden.

Tabelle 15: Eingesetzte Verdünnungen der 1. Antikörper.

Antikörper	Verdünnungen	Hersteller
Ratte-Anti- α Tubulin	unverdünnt	Universität Kassel, Kassel
Kaninchen-Anti-H3K9me ²	1:100	Millipore, MA, USA

Dieser verblieb wiederum für 30 min bei 37 °C auf den Proben, bevor er durch drei jeweils fünfminütige Waschschrte mit jeweils 500 μ l PBS/0,05 % Tween 20 entfernt wurde. Die anschließende Inkubation des zweiten, mit Cy3-gekoppelten Antikörpers fand in gleicher Weise statt.

Tabelle 16: Eingesetzte Verdünnungen der 2. Antikörper.

Antikörper	Verdünnungen	Hersteller
Cy3-gekoppelter Ziege-Anti-Maus	1:1000	Dianova, Hamburg
Cy3-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen	1:1000	Dianova, Hamburg

Zum Anfärben der DNA diente wiederum 200 μ l DAPI-Lösung in einer 1:15000 Verdünnung, die für 10 Minuten auf dem Präparat verblieb. Es folgten drei weitere Waschschrte bevor das Präparat nach Eintauchen in ddH₂O mit Gelvatol auf einem Objektträger fixiert wurde.

9 Ergebnisse

9.1 Stilllegung von Retroelementen

Die Regulation springender genetischer Elemente stellt einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des Genoms eukaryotischer Organismen dar. In diesem Teil der Arbeit sollten Mechanismen der Stilllegung der Retrotransposons DIRS-1 und Skipper aus *Dictyostelium discoideum* untersucht werden. Da bereits verschiedene Daten für die LTR-Sequenzen (*Long Terminal Repeats*) der Transposons vorlagen und der Einfluss von DNA-Methylierung auf die Transkription der Skipper LTRs gezeigt werden konnte (Kuhlmann *et al.*, 2005), wurden diese als Ausgangspunkt für die folgenden Versuche verwendet. Hierbei sollten mögliche transkriptionelle und posttranskriptionelle Effekte der rLTR-Sequenzen mit Hilfe eines GFP-Reportersystems analysiert werden. Um die bei einer Integration von Transgenen ins Genom bedingten Einflüsse des Chromatin-Kontexts auszuschließen, wurden extrachromosomale Vektoren verwendet. Dadurch kann eine gleichbleibende Expression auch bei unabhängigen Transformationen gewährleistet werden (Levi *et al.*, 2000). Außerdem wurde davon ausgegangen, dass extrachromosomale Vektoren aufgrund ihrer isolierten nicht repetitiven Struktur nicht heterochromatisiert werden. Einen Überblick über den Aufbau der untersuchten Retroelemente und die Lage der für die folgenden Experimente verwendeten Sequenzen zeigen Abbildung 7 und Abbildung 8.



Abbildung 7: Struktur des 7 kb großen Retrotransposons Skipper mit seinen drei ORFs und den zwei identischen LTRs in direkter Wiederholung. Die rechte LTR-Sequenz (rot) wurde für Experimente verwendet.

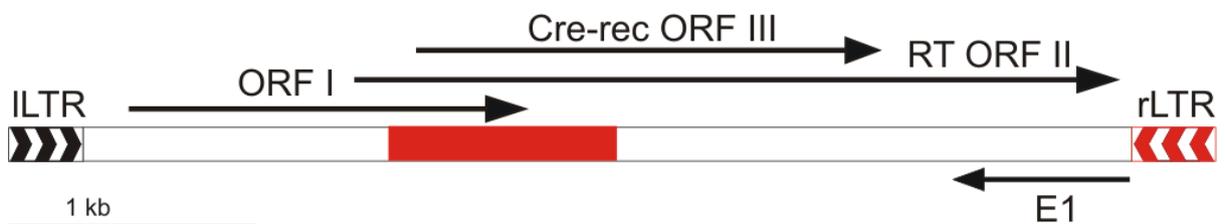


Abbildung 8: Struktur des 4,7 kb großen Retrotransposon DIRS-1 mit den überlappenden ORFs und den invertierten Wiederholungen (LTRs). Die LTRs sind im Gegensatz zu Skipper nicht identisch. Für die Experimente wurde die Sequenz des rechten LTRs und ein Teilstück aus dem Überlappungsbereich der drei ORFs verwendet (beides rot markiert).

9.1.1 Einfluss von Skipper und DIRS-1 Sequenzen auf benachbarte Promotoren

Um eine sequenzspezifische transkriptionelle Regulation der Retroelemente Skipper und DIRS-1 nachzuweisen, wurden in diesem Versuch verschiedene Sequenzen vor den Aktin15-Promotor des GFP-Reportersystems kloniert. Neben den LTRs wurde hierfür ein weiteres Fragment der kodierenden DIRS-1 Sequenz ausgewählt, da für diesen Bereich ein gehäuftes Vorkommen von kleinen RNAs beobachtet wurde (Kuhlmann *et al.*, 2005). Hierdurch könnte eine RNA-gerichtete DNA-Methylierung, wie sie auf natürliche Weise bei Retroelementen in Pflanzen vorkommt (Huettel *et al.*, 2006), nachgewiesen werden. Aber auch ohne den Einfluss kleiner RNAs wäre es möglich, durch sequenzspezifisch bindende Proteine eine Heterochromatisierung auszulösen. In *S. pombe* konnte mit CENP-B bereits ein solches Protein nachgewiesen werden, das für die Ausbildung centromerischen Heterochromatins verantwortlich ist (Nakagawa *et al.*, 2002). Interessanterweise kommen die hier verwendeten Retroelemente im Fall von DIRS-1 ausschließlich und im Fall von Skipper zumindest gehäuft in *Dictyostelium*-Centromeren vor (Glockner und Heidel, 2009). Sie könnten somit ebenfalls als Auslöser zur Herausbildung von Heterochromatin fungieren. In den geschilderten Szenarien wäre eine Reduktion der GFP-Expression durch Ausbreitung des inhibitorischen Chromatins auf den Aktin15-Promotor zu erwarten. Dass dieser Effekt in *Dictyostelium* durch die gezielte Bindung der Heterochromatin-Protein 1 (HP1) Homologe in der Nähe des Aktin15-Promotors induziert werden kann, zeigt ein weiteres im Rahmen dieser Arbeit durchgeführtes Experiment (siehe 9.3.5). Für den hier dargestellten Versuch wurden die in Abbildung 9 dargestellten Plasmide in *D. discoideum* transformiert. Als Kontrolle diente der Ursprungsvektor ohne vorgelagerte Transposon-Sequenzen. Die Begutachtung der Expression erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, die in Abbildung 10 dargestellt sind.

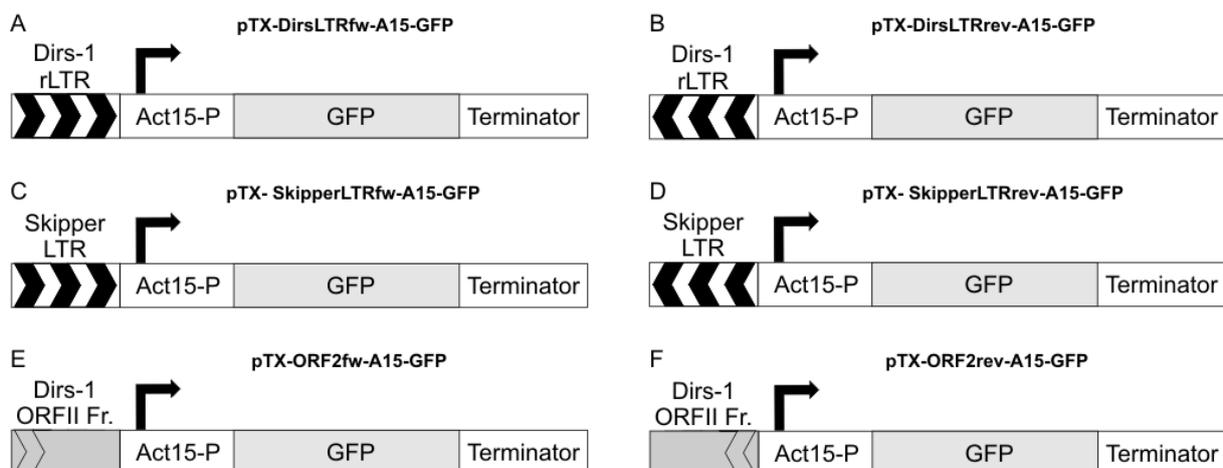


Abbildung 9: Übersicht über die Konstrukte zur Untersuchung des Einflusses von Transposon-Sequenzen auf die Expression eines GFP-Reporters. Verschiedene Sequenzen der Retroelemente Skipper und DIRS-1 wurden dazu vor den Aktin15-Promotor der Expressionskassette kloniert. Die Orientierung der Fragmente ist durch innenliegende Pfeile angedeutet.

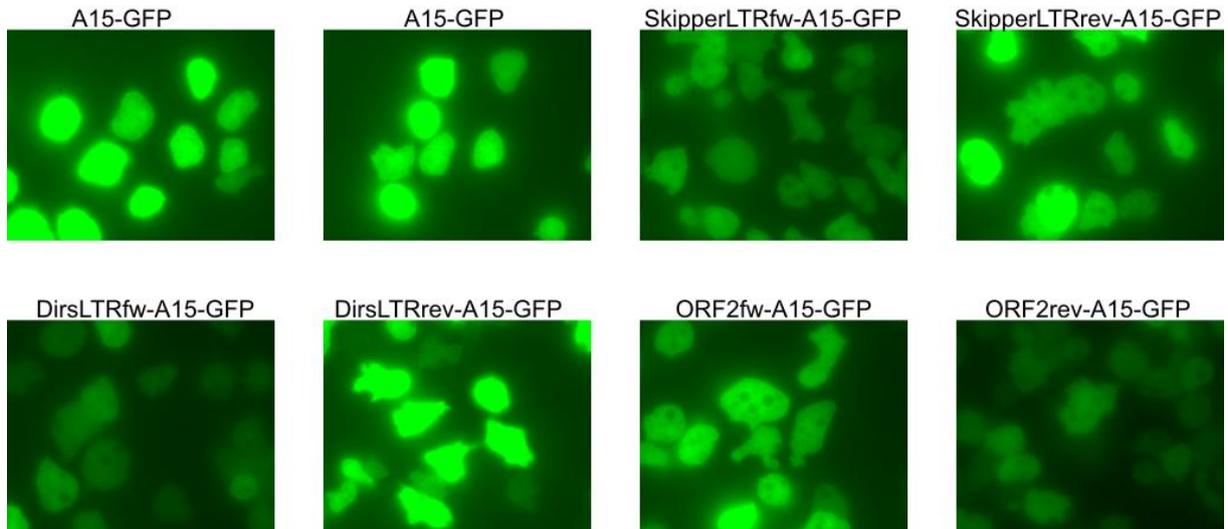


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender *Dictyostelium*-Zellen (AX2), bei denen Transposon-Sequenzen vor den Aktin15-Promotor einer GFP-Kassette kloniert wurden. Die Zellen zeigen unterschiedliche Expressionslevel abhängig von der Orientierung aber nicht der Art der Fragmente.

Die Aufnahmen zeigen, dass in allen transformierten Zellen das GFP-Reportergen exprimiert wurde. Eine Reduktion in der Expressionsstärke lässt sich nur bei den Konstrukten SkipperLTRfw-a15-GFP, DirsLTRfw-A15-GFP und ORF2rev-A15-GFP erkennen. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden Western Blots mit Gesamtproteinen aus 1×10^7 *Dictyostelium*-Zellen durchgeführt. Die Detektion des Reportergens erfolgte mittels GFP-Antikörper, während der hinzugegebene Coronin-Antikörper als Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge diente. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 11 dargestellt und zeigen die gleichen Ergebnisse wie die mikroskopische Untersuchung zuvor.

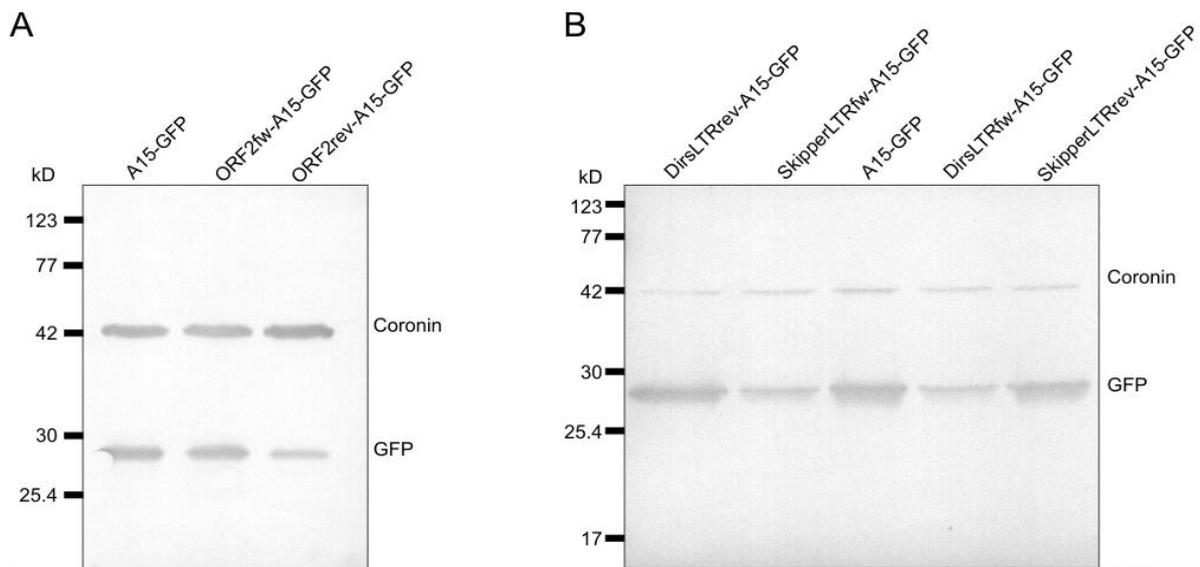


Abbildung 11: Western Blots der mit verschiedenen Transposon-Konstrukten transformierten *Dictyostelium*-Zellen mit Anti-GFP- und Anti-Coronin-Antikörper als Ladekontrolle. A) zeigt die schwächere GFP-Expression des Konstruktes ORF2rev-A15-GFP. B) verdeutlicht die bereits zuvor beobachteten Expressionsunterschiede mit den Konstrukten SkipperLTRfw-a15-GFP, DirsLTRfw-A15-GFP.

Schließlich sollte die Expression der Konstrukte auch in der Entwicklung von *Dictyostelium* begutachtet werden. Dies war vor allem deshalb interessant, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Transkriptionsrate von DIRS-1 nach zehn Stunden in der Entwicklung deutlich erhöht ist (Rosen *et al.*, 1983). Diese Veränderung könnte sich somit auch auf die Beobachtungen mit dem Reportersystem niederschlagen. Dazu wurden die transformierten *Dictyostelium*-Zellen ohne Nahrungszufuhr auf Phosphatagar ausgebracht, um die Entwicklung zu sporentragenden Fruchtkörpern einzuleiten. Die fertigen Sporen konnten nach zwei Tagen durch Abklopfen der Platten geerntet und mikroskopiert werden. Abbildung 12 zeigt die so entstandenen Bilder. Auch hier zeigen sich die gleichen Expressionsunterschiede, die schon bei amöboiden Zellen beobachtet wurden.

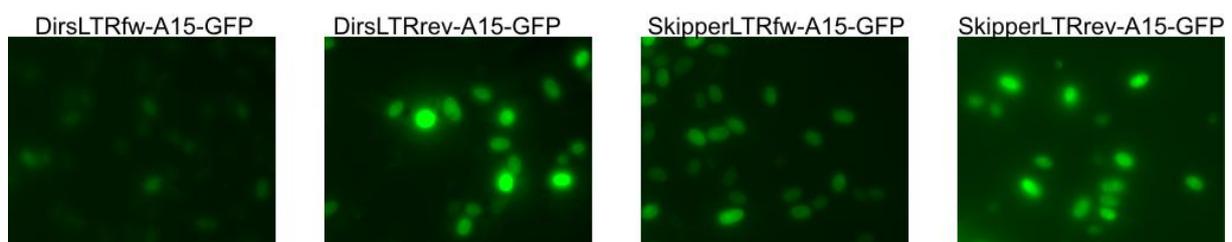


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Dictyostelium*-Sporen (AX2) mit vier der hergestellten Transposon-Konstrukten. Wie schon bei lebenden Zellen zeigen die Konstrukte DirsLTRfw-A15-GFP und SkipperLTRfw-A15-GFP eine Reduktion der GFP-Expression.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass in Wildtyp-Zellen der rechte DIRS-1 LTR DNA-methyliert wird und ein Knockout der RNA-abhängigen RNA-Polymerase RrpC eine erhöhte DIRS-1 Transkription zur Folge hat (Kuhlmann *et al.*, 2005), wurden die beiden DIRS-1 Konstrukte auch auf ihr Verhalten in den entsprechenden Zelllinien untersucht. Wie die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 13 zeigen, bleiben die Expressionsunterschiede im DnmA- sowie im RrpC-Knockout erhalten. Somit lässt sich der beobachtete Effekt weder auf DNA-Methylierung noch auf einen RrpC-abhängigen Mechanismus zurückführen. Abgesehen davon übt keine der getesteten Sequenzen einen entscheidenden Einfluss auf den A15-Promotor aus.

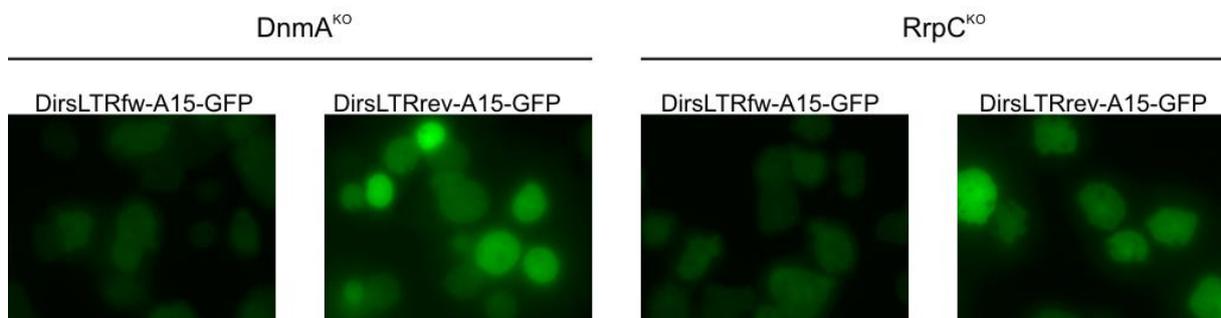


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DIRS-1 GFP-Konstrukte in dem DNA-Methyltransferase-Knockout ($DnmA^{KO}$) und dem Knockout der RNA-abhängigen RNA-Polymerase ($RrpC^{KO}$). In beiden Zelllinien treten die zuvor beobachteten Unterschiede in der GFP-Expression auf.

9.1.2 Inhibierung der GFP-Expression durch Einsatz des DIRS-1 rLTR als 3'-UTR

Da die vorhergehenden Experimente keine Klarheit über die Regulation der Transposon-Sequenzen geben konnten, wurde untersucht, ob der DIRS-1 rLTR als Ziel für den RNAi-Mechanismus fungieren kann. Bei einer Suche nach kleinen RNAs konnten 57 % der Bibliothek auf DIRS-1 Sequenzen zurückgeführt werden (Hinas *et al.*, 2007), obwohl DIRS-1 Kopien nur 3,2 % des *Dictyostelium*-Genoms ausmachen (Glockner *et al.*, 2001). Mit Hilfe des GFP-Reportersystems sollte aufgeklärt werden, ob die gefundenen siRNAs ein *trans-silencing* auslösen können. Hierfür wurde der DIRS-1 rLTR in beiden Orientierungen hinter die kodierende GFP-Sequenz des Reporters kloniert, um diesen als 3'-UTR einzusetzen. Eine schematische Darstellung der verwendeten Reporterkonstrukte zeigt Abbildung 14.

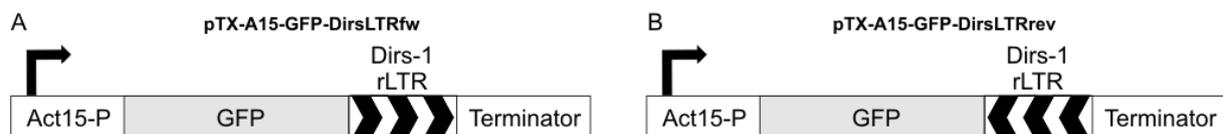


Abbildung 14: Übersicht über die Konstrukte zur Untersuchung des Einflusses des DIRS-1 rLTR als 3'-UTR auf die Expression eines GFP-Reporters. Dazu wurde der rLTR in verschiedenen Orientierungen hinter die kodierende GFP-Sequenz kloniert. Die Orientierung der Fragmente ist durch innenliegende Pfeile angedeutet.

Um herauszufinden wie groß die 3'-UTRs der Transkripte und damit auch die Zielsequenzen für die mögliche Interaktion mit siRNAs sein würden, wurde nach möglichen Polyadenylierungssignalen in den LTRs gesucht. Da für das Anhängen der Poly(A)-Sequenz in *Dictyostelium* lediglich das Basenmotiv AAUAAA benötigt wird (Maniak und Nellen, 1991), konnte dieses mit hoher Wahrscheinlichkeit nach 84 bp des rLTR im Konstrukt A15-GFP-DirsLTRfw und nach 273 bp im Konstrukt A15-GFP-DirsLTRrev identifiziert werden. Mit diesen Bereichen korrespondierende endogene siRNAs wurden bereits früher nachgewiesen (Kuhlmann *et al.*, 2005). Eine posttranskriptionale Stilllegung durch den Abbau der mRNA durch den RNAi-Mechanismus sollte einen deutlichen Effekt auf die GFP-Expression zur Folge haben. Um dies zu untersuchen, wurden die Plasmide pTX-A15-GFP-DirsLTRfw und pTX-A15-GFP-DirsLTRrev in *Dictyostelium discoideum* transformiert. Als Kontrolle diente der Ursprungsvektor pTX-GFP. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 15 zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die GFP-Expression bei dem Konstrukt mit dem Dirs-1 rLTR in Vorwärts-Orientierung im Vergleich zum Kontrollvektor deutlich verringert ist. Bei dem Konstrukt mit rückgerichtetem rLTR ist sie hingegen nicht mehr sichtbar. Bei diesem Aufbau, der die gleiche Orientierung des rLTR wie im Transposon DIRS-1 selbst zeigt, kommt es somit zu einer vollständigen Stilllegung der GFP-Expression. Um das mikroskopische Ergebnis zu überprüfen, wurden Western Blots von Gesamtproteinen aus den drei Zelllinien hergestellt.

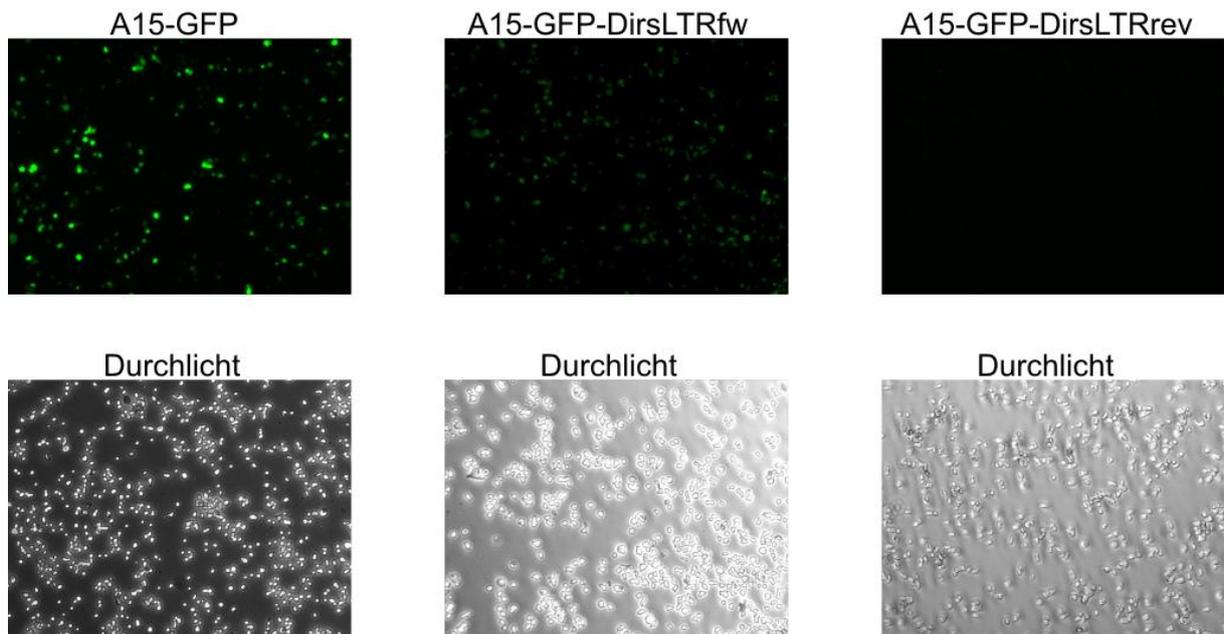


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender *Dictyostelium*-Zellen (AX2), die mit GFP-Konstrukten transformiert wurden, welche im 3'-UTR den DIRS-1 rLTR tragen. A15-GFP zeigt als Kontrolle die Expression ohne inserierten DIRS-1 rLTR. Daneben die beiden Konstrukte mit dem rLTR in Vorwärts- und Rückwärts-Richtung. Die Durchlichtaufnahmen sind zur Kontrolle der Zellzahl angefügt. Die GFP-Expression ist bei dem DirsLTRfw-Konstrukt deutlich verringert und bei dem DirsLTRrev-Konstrukt nicht mehr sichtbar.

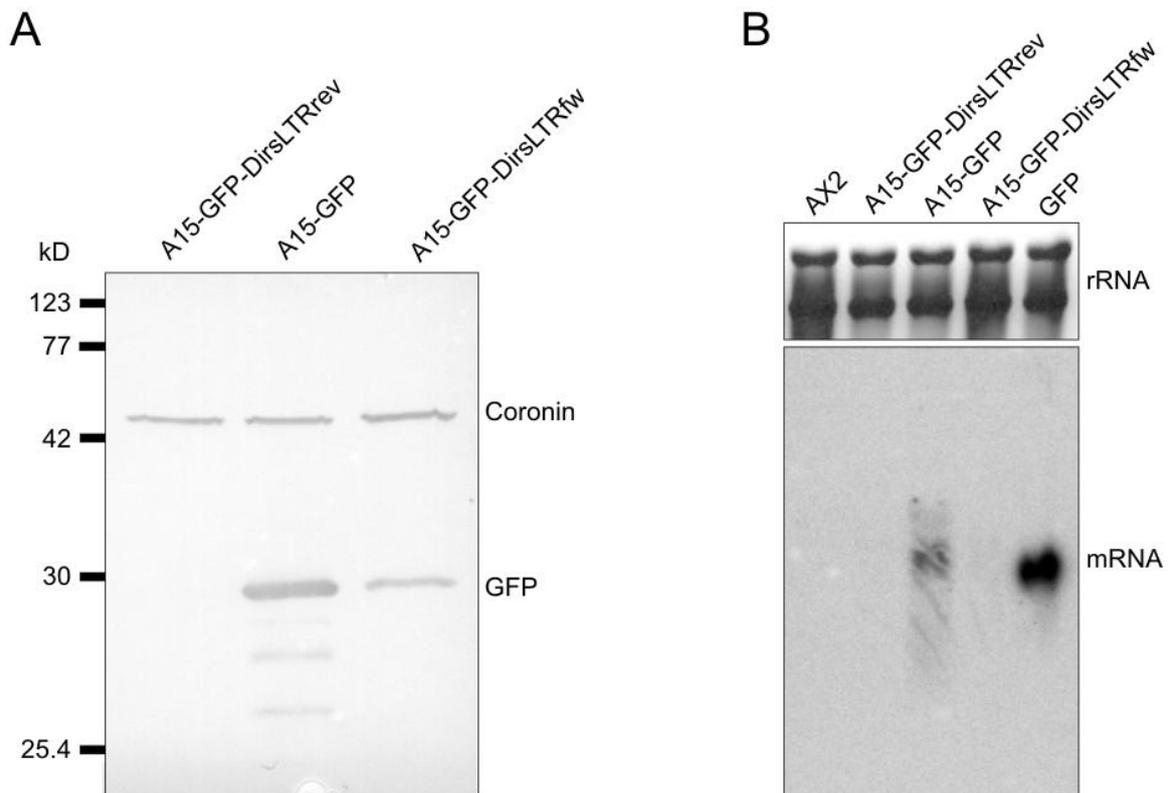


Abbildung 16: Western- und Northern Blot zum Nachweis des GFP-Proteins beziehungsweise der GFP-mRNA in verschiedenen Zelllinien. A) Der Western Blot mit Anti-GFP-Antikörper zeigt das gleiche Ergebnis wie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zuvor (Ladekontrolle: Anti-Coronin). B) Der Northern Blot verdeutlicht mit Hilfe einer GFP-OLB-Sonde das komplette Fehlen entsprechender GFP-mRNA in den stillgelegten Zellen (A15-GFP-DirsLTRrev), während diese in der Linie A15-GFP-DirsLTRfw noch schwach zu erkennen ist. Die Abbildung der rRNAs aus dem Ethidiumbromid gefärbten GTC-Gel zeigt die Qualität der isolierten RNAs.

Bei der Detektion mit einem Anti-GFP-Antikörper konnte ein starkes Signal bei der Kontrolle A15-GFP und ein deutlich schwächeres in der Zelllinie mit vorwärtsgerichtetem DIRS-1 rLTR im 3'-UTR des GFP nachgewiesen werden. In der entgegengesetzten Orientierung führte der rLTR zu einer kompletten Stilllegung der GFP-Expression (Abbildung 16 A). Ein Northern Blot mit den gleichen Stämmen wurde durchgeführt, um zu zeigen, ob sich dieser Effekt auf eine Degradation der GFP-mRNA zurückführen lässt oder ob es zu einer Inhibierung der Translation kommt. Im letzteren Fall sollte es keinen Unterschied in der detektierten mRNA-Menge geben. Die 351 Bp große DNA-Sonde wurde durch eine PCR mit den Primern M13-forward und M13-reverse auf das Plasmid pGEM[®]-T-Easy-Short-GFP hergestellt. Als Kontrolle dienten Wildtyp (AX2) und mit einem integrierenden GFP-Plasmid (pDneo2a-GFP) transformierte Zellen. Mit der GFP-Sonde hybridisiert zeigt der Northern Blot (Abbildung 16 B) ein Signal in der Zelllinie A15-GFP und ein sehr schwaches in der Spur A15-GFP-DirsLTRfw, während in der Negativkontrolle und im Stamm A15-GFP-DirsLTRrev keine GFP-mRNA detektiert werden konnte. Da wie bereits im Abschnitt zuvor erwähnt ein Knockout der RNA-abhängigen RNA-Polymerase RrpC zu einer Erhöhung der Dirs-1 Expression führte (Kuhlmann *et al.*, 2005), sollte dessen Einfluss auch auf die hier beobachtete Stilllegung untersucht werden. Dazu wurden die Konstrukte in den *Dictyostelium*-Stamm RrpC^{KO} transformiert, bei dem das Enzym durch die Insertion einer Bsr-Kassette ausgeschaltet wurde. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, die in Abbildung 17 dargestellt sind, zeigen hier allerdings keine Expressionsunterschiede im Vergleich zu denen aus dem Wildtyp.

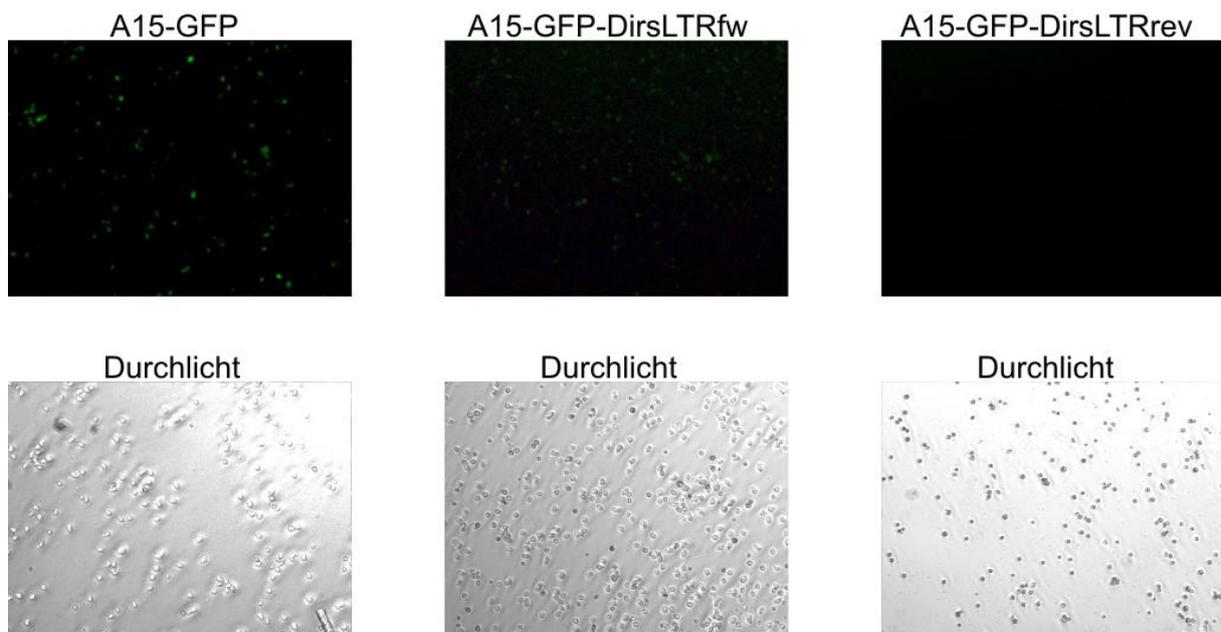


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender *Dictyostelium*-Zellen, bei denen die RNA-abhängige RNA-Polymerase RrpC ausgeschaltet wurde (RrpC^{KO}) und mit den gleichen Konstrukten wie in Abbildung 15 transformiert wurden. Im Vergleich zum Wildtyp (AX2) zeigen sich keine Unterschiede in dem RrpC-Knockout.

9.1.3 Untersuchung der Promotoraktivität des DIRS-1 rLTR und Skipper LTR

Im vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass die DIRS-1 rLTR-Sequenz, sofern am 3'-Ende des ORFs inseriert, zu einer Stilllegung des Reporters führt. Je nach Orientierung des Fragments zeigten sich jedoch Unterschiede in der Stärke dieses Effekts. Eine Erklärung dafür könnte eine im rLTR zu findende Promotoraktivität sein, die zu einer *Antisense*-Transkription führen könnte. Eine solche RNA, die ihren Ursprung im rechten LTR von DIRS-1 hat, konnte mit E1 (siehe Abbildung 8) bereits nachgewiesen werden (Cohen *et al.*, 1984; Zuker *et al.*, 1984). Allerdings wurde die Promotoraktivität des rechten LTR nur in der frühen Entwicklung und während eines Hitzeschocks beobachtet. Damit unterscheidet sich das Verhalten im Vergleich zum sehr ähnlichen linken LTR. Das durch Sequenzanalysen identifizierte Heatschock-Motiv gleicht dem aus *Drosophila* und führte durch seinen palindromischen Aufbau in beiden Arbeiten zu der Spekulation einer Bidirektionalität. Eine solche konnte jedoch experimentell bislang nicht nachgewiesen werden.

Um die Frage zu klären, inwieweit eine Aktivität des Promotors auch in vegetativen Zellen vorliegt und ob dieser bidirektional funktioniert, wurde der in den vorangegangenen Experimenten eingesetzte Aktin15-Promotor des Reporterkonstrukts durch den DIRS-1 rLTR ersetzt. Eine Promotoraktivität hätte eine Expression des GFP zur Folge und ließe sich demnach lichtmikroskopisch beobachten. Um zu untersuchen, ob ein ähnlicher Vorgang auch für die LTRs des Retrotransposons Skipper gilt, wurden diese ebenso mit in das Experiment einbezogen. Eine Promotoraktivität konnte für diese LTRs bislang nicht gezeigt werden. Bekannt ist allerdings, dass die natürliche Transkriptionsrate der Skipper-mRNAs in vegetativen Zellen sehr gering ist und erst in der Entwicklung ansteigt (Kuhlmann *et al.*, 2005). Eine schematische Darstellung der für diesen Versuch hergestellten Konstrukte gibt Abbildung 18.

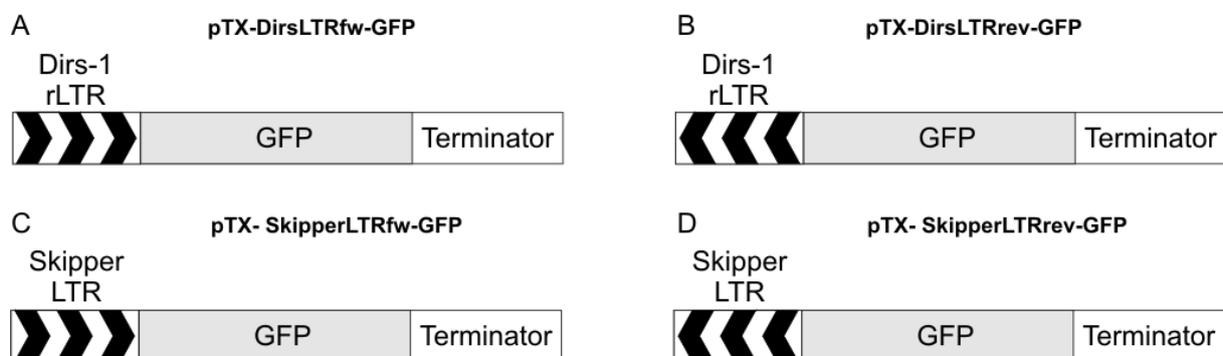


Abbildung 18: Übersicht über die Konstrukte zur Untersuchung der Promotoraktivität des DIRS-1 rLTR (A und B) und des Skipper LTR (C und D). Die Fragmente wurden anstelle des Aktin15-Promotors vor die GFP-Sequenz kloniert. Die Orientierung der Fragmente ist durch innenliegende Pfeile angedeutet.

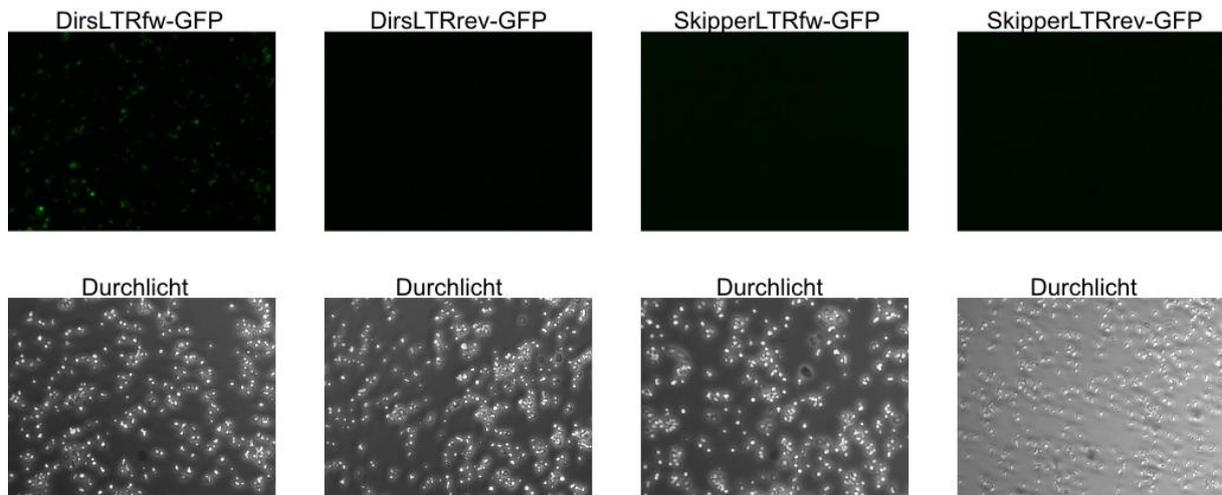


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender *Dictyostelium*-Zellen (AX2), bei denen zur Untersuchung einer möglichen Promotoraktivität der LTR-Sequenzen von Skipper und DIRS-1 der Aktin15-Promotor des Reporters durch diese Sequenzen ersetzt wurde. Lediglich mit dem Konstrukt DirsLTRfw-GFP kann eine Fluoreszenz ausgelöst und damit eine Promotoraktivität nachgewiesen werden. Die Durchlichtaufnahmen dienen zur Kontrolle der Zellzahl.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung nach Transformation der Konstrukte ist in Abbildung 19 zu sehen. Sie zeigt deutlich, dass lediglich der DIRS-1 rLTR aber nicht der Skipper LTR eine GFP-Expression in vegetativen Zellen auslösen kann. Die Stärke der Expression ist zudem durchaus mit den ansonsten in Expressionskassetten verwendeten Aktin-Promotoren vergleichbar (siehe Abbildung 17). Des Weiteren zeigt sich in den Aufnahmen, dass die Promotoraktivität unter den gewählten Bedingungen nicht bidirektional ist. Nur bei einer vorwärtsgerichteten Anordnung des DIRS-1 rLTR führt dies zur Expression. Diese Beobachtungen konnten mit Hilfe von Western Blots bestätigt werden, bei denen lediglich bei diesem Konstrukt GFP detektiert wurde (Abbildung 20).

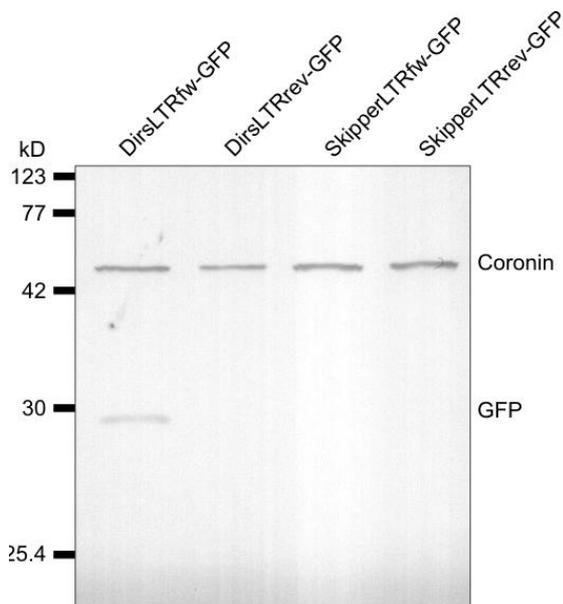


Abbildung 20: Western Blot zur Kontrolle der durch die Promotoraktivität der Transposon-LTRs induzierten GFP-Expression mit Anti-GFP und Anti-Coronin-Antikörper als Ladekontrolle. Nur mit dem vorwärtsgerichteten DIRS-1 rLTR kann GFP detektiert werden und bestätigt damit die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen.

9.1.4 Heterochromatin-Targeting des Skipper-Retroelements

Während die vorangegangenen Experimente deutliche Hinweise auf die Regulationsmechanismen zur Kontrolle des DIRS-1 Retroelements geben konnten, fand sich keine Erklärung für den Auslöser der DNA-Methylierung beim Transposon Skipper. Ein direkter Einfluss der LTR-Sequenzen auf einen benachbarten Promotor und einer damit einhergehenden sequenzspezifischen DNA-Methylierung konnte nicht nachgewiesen werden.

Durch eine Untersuchung der von den drei Skipper-ORFs kodierten Proteine ergab sich ein weiterer Ansatzpunkt. Eine Suche in den Proteindatenbanken PFAM, PROFILE, PROSITE, SMART und SSF nach Proteindomänen in dem Retrotransposon Skipper lieferte die in Tabelle 17 dargestellten Ergebnisse. Dabei konnte mit der Chromo-Domäne eine möglicherweise für die Integration wichtige Domäne identifiziert werden. Wie in der Einleitung bereits beschrieben findet man diese Domäne vor allem in Chromatin-bindenden Proteinen wie HP1, PC (Polycomb) oder CHD (Chromo-Domäne, Helikase, DNA-bindend). Dabei erkennen diese Proteine mit Hilfe der Chromo-Domäne methylierte Lysine an bestimmten Positionen von Histon H3 und fungieren als *targeting*-Motiv. Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung bestimmen die Präferenz für spezielle Bindestellen. Die Chromo-Domäne von HP1 bindet beispielsweise di- und trimethyliertes Lysin 9 (Jacobs und Khorasanizadeh, 2002; Nielsen *et al.*, 2002), während Polycomb methyliertes Lysin 27 (Min *et al.*, 2003), CHD-Proteine methyliertes Lysin 4 (Flanagan *et al.*, 2005) und andere Lysin 36 des Histons H3 erkennen (Sun *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

Tabelle 17: Ergebnis der Suche nach Proteindomänen des Retrotransposons Skipper (DDB0218314) in 5 verschiedenen Datenbanken. Die Chromo-Domäne wurde von vier der Datenbanken identifiziert (grau unterlegt).

Datenbank	ID	Domäne	Beginn	Ende	Score
PFAM	PF00078	Reverse Transkriptase	344	511	3.30E-29
PFAM	PF00385	Chromo	1184	1229	5.40E-6
PFAM	PF00665	Integrase	879	1040	1.20E-22
PROFILE	PS50013	Chromo	1184	1238	0
PROFILE	PS50878	Reverse Transkriptase	334	511	0
PROFILE	PS50994	Integrase	876	1045	0
PROSITE	PS00141	Asparagin-Protease	110	121	0
SMART	SM00298	Chromo	1183	1231	4.70E-9
SSF	SSF50630	Asparagin-Protease	85	186	2.1E-7
SSF	SSF53098	Polynucleotidyltransferase	875	1045	4.4E-30
SSF	SSF54160	Chromo	1171	1239	2.5E-11
SSF	SSF56672	SSF56672	309	745	4.1E-104

Eine Suche mit Hilfe der neuesten Version der *Dictyostelium discoideum* Datenbank unter www.dictybase.org (Fey *et al.*, 2009) nach weiteren Proteinen mit Chromo-Domänen lieferte die in Tabelle 18 gezeigten Resultate. Anhand der Domänenarchitektur kann man diese grob in vier Gruppen einteilen. Die der HP1-Proteine (HcpA, HcpB und HcpC) enthält neben der Chromo-Domäne noch die nah verwandte Chromoshadow-Domäne. Die *in vivo*-Lokalisation der Chromo-Domäne aus HcpA und HcpB konnte mit trunkierten Proteinen ohne Chromoshadow-Domänen bereits gezeigt werden (Kaller *et al.*, 2007). Sie führt zu einem einzelnen Punkt in der nuklearen Peripherie und überlappt dort mit H3K9-Dimethylierung. Eine weitere Gruppe nicht annotierter Proteine enthält neben der Chromo- noch eine DnaJ-Domäne während die Vertreter der CHD-Proteine durch Helikase-Domänen ausgezeichnet werden. Das Genprodukt des Skipper-ORFs Pol enthält neben der C-terminalen Chromo- noch eine Reverse Transkriptase- und eine Integrase-Domäne und stellt den einzigen Vertreter der letzten Gruppe dar.

Tabelle 18: Ergebnis der Suche nach Chromo-Domänen in der *Dictyostelium discoideum* Datenbank unter www.dictybase.org. Die Chromo-Domänen der grau markierten Proteine wurden weiter analysiert.

Dictybase ID	Genprodukt	Domänen
DDB0220646	HcpA	Chromo, Chromoshadow
DDB0220645	HcpB	Chromo, Chromoshadow
DDB0220647	HcpC	Chromo, Chromoshadow
DDB0189801	-	DnaJ, Chromo
DDB0190510	-	DnaJ, Chromo
DDB0220640	CHD Protein	Chromo, HELICc, DEXDc
DDB0220643	CHD Protein	Chromo, HELICc, DEXDc, UBQ
DDB0220644	CHD Protein	Chromo, HELICc, DEXDc, SANT
DDB0218314	Skipper, Polymerase	Reverse Transkriptase, Integrase, Chromo

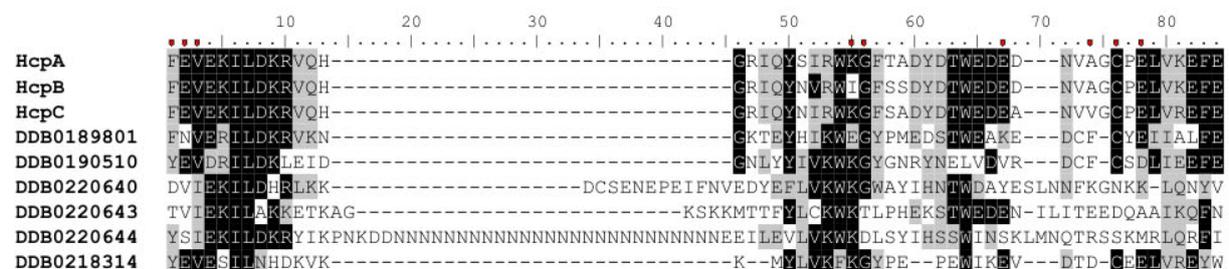


Abbildung 21: Alignment der Aminosäuresequenzen der in *Dictyostelium discoideum* kodierten Chromo-Domänen mit ClustalW. Ab 50 % Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Aminosäuren sind diese grau hinterlegt, identische Aminosäuren sind ab 50 % schwarz markiert. Rote Pfeile zeigen die bei dem *Drosophila* HP1-Homolog in die H3K9-Bindung involvierten Positionen (Jacobs *et al.*, 2001).

Das *Alignment* in Abbildung 21 zeigt die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der Chromo-Domänen der gefundenen Proteine. Die Guppeneinteilung wird durch den Vergleich konservierter Positionen bestätigt, wobei auffällt, dass es auch innerhalb der Gruppen große Unterschiede zwischen einzelnen Vertretern gibt. Während die HP1-Proteine eine hohe Ähnlichkeit in der Chromo-Domäne besitzen, zeigen die CHD-Proteine zum Beispiel eine deutliche Variabilität. Vergleicht man die Chromo-Domäne des Skipper-ORFs mit den anderen, findet man die größte Übereinstimmung mit den HP1- und DnaJ-Proteinen und eine geringere Ähnlichkeit zu den CHD-Proteinen.

Um zu untersuchen, wo die Chromo-Domänen *in vivo* lokalisieren, wurde je ein Vertreter der einzelnen Gruppen ausgewählt und GFP-Fusionen hergestellt. Da sich, außer bei den CHD-Proteinen, das zu klonierende Motiv am C-terminalen Ende befindet, wurde das GFP am N-Terminus angefügt, um die Zugänglichkeit der Domäne möglichst nicht zu beeinflussen. Mit CbfA wurde für diesen Versuch ein weiteres Protein aufgenommen, welches zwar keine Chromo-Domäne besitzt, aber wie bekannt ist an bestimmten Bereichen des Transposons TRE5-A bindet (Geier *et al.*, 1996). CbfA besitzt neben einer N-terminalen JmjC-Domäne, die in anderen Proteinen die Funktion einer aktiven Histon-Demethylase ausübt (Klose *et al.*, 2006a), keine von den fünf oben genannten Datenbanken identifizierten Motive. Somit wurde für diesen Versuch ausschließlich die JmjC-Domäne als GFP-Fusion kloniert und aufgrund eines in diesem Bereich fehlenden Kernlokalisationssignals (NLS) zusätzlich mit diesem ausgestattet. Inzwischen ist bekannt, dass auch der C-terminale Teil des Proteins eine regulatorische Funktion ausübt und dabei ein ungewöhnliches NLS-Motiv enthält (Lucas *et al.*, 2009).

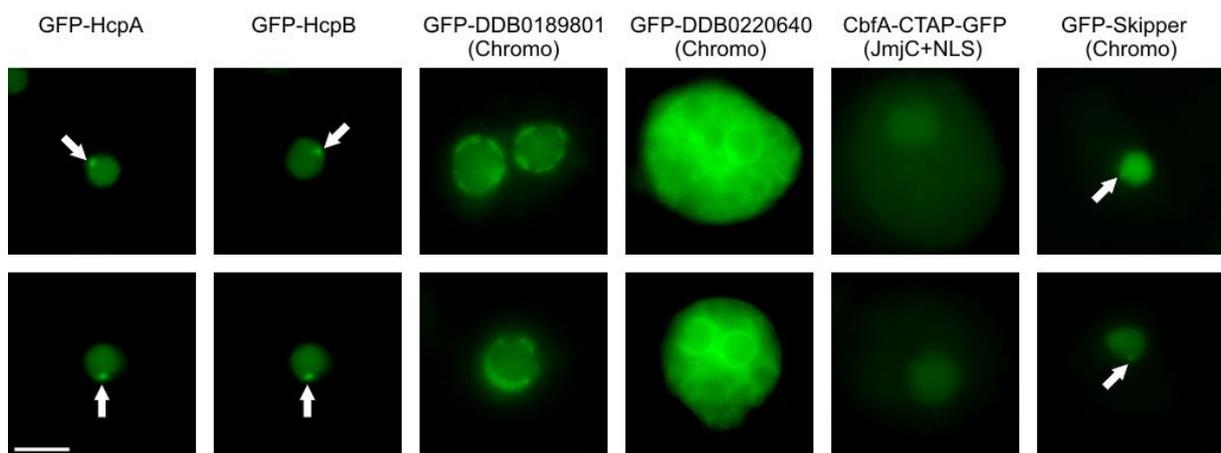


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender Dictyostelium-Zellen (AX2), die mit verschiedenen GFP-Fusionsproteinen transformiert wurden. GFP-HcpA und GFP-HcpB zeigen die bekannte Lokalisation im Zellkern mit dem dominanten Punkt in der Kernperipherie (Pfeil). Die Chromo-Domäne von GFP-DDB0189801 lokalisiert an der Außenseite des Zellkerns, während die des Proteins DDB0220640 ebenfalls dort akkumuliert aber auch eine starke cytoplasmatische Verteilung zeigt. Die JmjC+NLS-Domäne von CbfA lokalisiert im Zellkern und zu einem geringen Teil im Cytoplasma. Die Chromo-Domäne von Skipper zeigt eine Verteilung ähnlich der HP1-Proteine, wobei der Punkt in der Kernperipherie schwächer ausgeprägt ist (Pfeil). Maßstab: 5 µm.

Die Transformation der Plasmide pDd-HcpA-GFP und pDd-HcpB-GFP in AX2-Zellen und die mikroskopische Auswertung zeigt die typische Lokalisation der HP1-Proteine in *Dictyostelium discoideum*, die auf das Kernlokalisierungssignal und das *targeting* der Chromo-Domäne zurückzuführen ist (Abbildung 22). Die Begutachtung der Lokalisation der Chromo-Domäne vom Typ 2 durch Transformation des Plasmids pDneo2a-GFP DDB0189801 ChrDomain zeigt eine Konzentration in der Nähe des Zellkerns, wahrscheinlich an dessen Außenseite und somit nicht am Chromatin. Ähnlich, aber mit einer stärkeren cytoplasmatischen Verteilung, lokalisiert das Fusionsprotein aus GFP und der Chromo-Domäne vom Typ 3 nach Transformation des Vektors pDneo2a-GFP DDB0220640 ChrDomain. Die Lokalisation der JmjC+NLS Domäne durch den Einsatz des Vektors pDV-CGFP-CTAP JmjC NLS zeigt im Unterschied zu den zuvor besprochenen eine Konzentration im Zellkern. Dort ist allerdings keinerlei Struktur zu erkennen, die eine Aussage über den eventuell gebundenen Chromatinkontext zulassen würde. Im Prinzip ließe sich diese Verteilung auch durch die Fusion des GFP mit dem Kernlokalisierungssignal erklären. Interessanterweise zeigt die Chromo-Domäne von Skipper eine aussagekräftigere Lokalisation. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Transformation mit dem Vektor pDneo2a-GFP Skipper ChrDomain zeigen eine Lokalisation im Zellkern und eine Konzentration in einem Punkt der Kernperipherie, die im Vergleich zu den HP1-Proteinen allerdings schwächer ausfällt. Dass dieser Punkt mit Heterochromatin kolokalisiert, zeigt die in Abbildung 23 dargestellte Immunfärbung mit Anti-H3K9me²-Antikörper. Ob die Lokalisation unabhängig von den dort vorhandenen HP1-Proteinen ist, konnte in Anbetracht des letalen Doppelknockouts von HcpA und HcpB (Kaller *et al.*, 2007) lediglich exemplarisch durch Transformation des Plasmids in den Stamm HcpB^{KO} gezeigt werden.

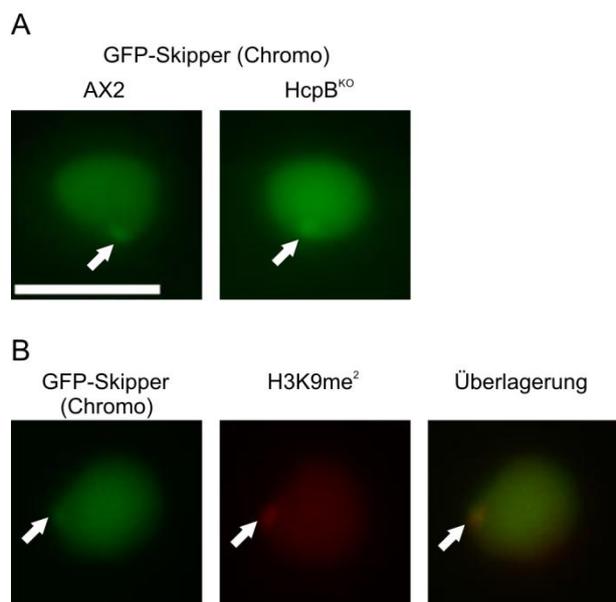


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen fixierter *Dictyostelium*-Zellkerne, die eine GFP-Fusion der Skipper Chromo-Domäne exprimieren. A) Die Lokalisation der Chromo-Domäne im Zellkern mit einer Konzentration in der Kernperipherie (Pfeil) zeigt im Wildtyp (AX2) die gleiche Verteilung wie im HcpB^{KO}-Hintergrund. B) Die Immunfärbung mit Anti-H3K9me²-Antikörper zeigt die Kolokalisation des GFP-Punkts (Pfeil) mit der heterochromatischen Histonmodifikation. Maßstab: 2,5 μ m.

9.2 Posttranslationale Modifikationen von Histonen

9.2.1 Histone in *Dictyostelium discoideum*

Um die epigenetische Kontrolle des Chromatins verstehen zu können, ist ein umfassendes Verständnis für dessen Bestandteile unabdingbar. Obwohl bereits früh Arbeiten zu Histonen in *Dictyostelium* erschienen sind (Charlesworth und Parish, 1975; Charlesworth und Parish, 1977; Bakke und Bonner, 1979), bieten erst die heutigen Techniken die Möglichkeit, ein genaues Bild des Chromatins dieses einfachen Eukaryoten zu zeichnen. Die Veröffentlichung des vollständigen *Dictyostelium*-Genoms (Eichinger *et al.*, 2005) macht es heute zudem möglich, experimentelle mit bioinformatischen Daten zu vergleichen.

Eine Datenbankanalyse unter Dictybase.org (Kreppel *et al.*, 2004) nach den im Genom kodierten Histon-Proteinen lieferte die sechzehn in Tabelle 19 dargestellten Kandidaten. Während für Histon H1 nur eine Variante im Genom kodiert wird, konnten für Histon H2A und Histon H3 jeweils fünf und für Histon H2B drei Varianten identifiziert werden. Einen besonderen Fall stellt Histon H4 dar, da die als H4a und H4b bezeichneten Formen zwar Unterschiede in der DNA-Sequenz, nicht jedoch in der dadurch kodierten Aminosäuresequenz aufweisen. Einen Hinweis darauf, welche dieser Varianten tatsächlich Bestandteil des *Dictyostelium*-Chromatins sind, lieferte die Analyse der auf Dictybase.org verzeichneten ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Dazu wurden diese für jeden der Kandidaten ausgezählt und ebenfalls in Tabelle 19 aufgenommen. Zur zusätzlichen Gewinnung experimenteller Daten wurden mit Salzsäure extrahierte, basische Kernproteine isoliert und mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch eine massenspektrometrische Untersuchung der in Frage kommenden Proteinbanden konnten diese, wie in Abbildung 24 zu sehen, den einzelnen Histon-Varianten zugeordnet werden.

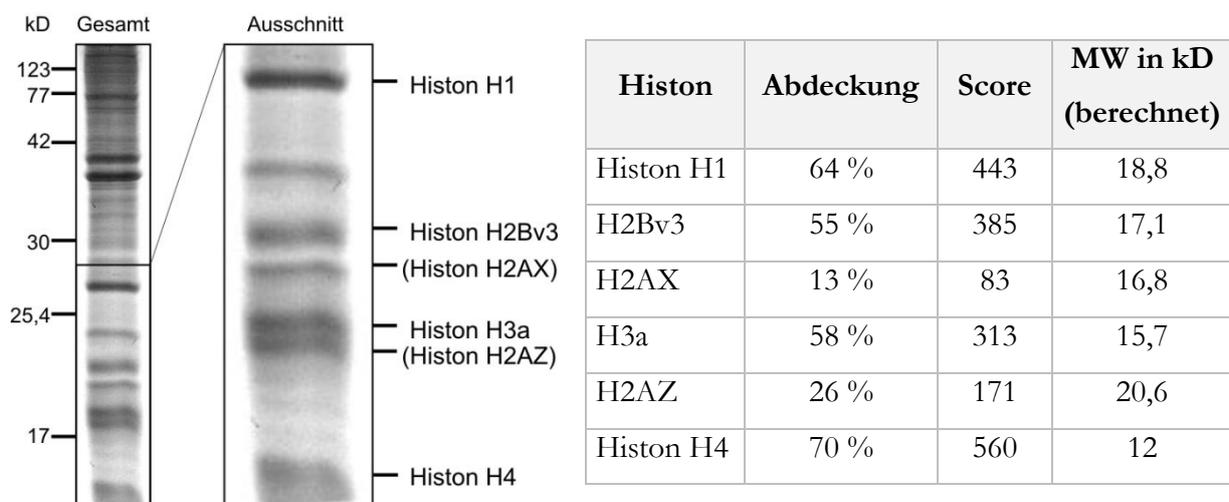


Abbildung 24: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (20 %) HCl-extrahierter Kernproteine und Ergebnisse der massenspektrometrischen Vermessung (Messdatum: 12.10.06). Die Klammer umfasst Histone, die nicht den Hauptbestandteil der untersuchten Proteinbande ausmachen.

Tabelle 19: Vergleich der im Genom kodierten Histon-Proteine mit den auf Dictybase.org veröffentlichten ESTs und den durch Experimente gewonnenen Daten. Bis auf die Proteine H2Bv1 und H2Bv2, die nicht durch Massenspektrometrie gefunden wurden, stimmen beide Datensätze überein.

Proteinkandidaten	ESTs in Dictybase.org	Durch Massenspektrometrie identifiziert
H1	52	+
H2AX	26	+
H2AZ	6	+
H2Av1	-	-
H2Av2	-	-
H2Av3	-	-
H2Bv1	12	-
H2Bv2	2	-
H2Bv3	95	+
H3a	64	+
H3b	9	+**
H3c	-	-
H3v1	-	-
H3v2	-	-
H4a	9	+*
H4b	17	+*

* Eine Unterscheidung der beiden H4-Isoformen ist auf Proteinebene aufgrund der hundertprozentigen Homologie nicht möglich. ** Diese Histon H3 Variante konnte in Folgeexperimenten identifiziert werden.

Das Ergebnis zeigt, dass mindestens eine Variante der Kernhistone und das Linker-Histon H1 in ausreichenden Mengen isoliert und detektiert werden konnten. Interessant ist, wie stark sich das Laufverhalten der einzelnen Proteine in der SDS-PAGE von dem berechneten Molekulargewicht unterscheidet. Während Histon H4 und Histon H2AZ diesem sehr genau entsprechen, weichen die anderen Vertreter deutlich davon ab. Ursächlich dafür sind nicht zuletzt die zahlreichen post-translationalen Modifikationen der Histone, auf die zu einem späteren Zeitpunkt ausführlich eingegangen wird.

Vergleicht man die gefundenen Proteine mit den zuvor genannten EST-Daten, zeigen beide eine hohe Übereinstimmung. Lediglich drei weitere Histon-Varianten werden über EST-Daten gestützt, konnten allerdings anfangs nicht durch Massenspektrometrie gefunden werden. Immerhin konnte in Folgeexperimenten mit der Identifikation von Histon H3b eine weitere Lücke geschlossen werden. Dieses migriert in der SDS-PAGE auf der Höhe von Histon H3a.

9.2.2 Histon H2B Varianten in *Dictyostelium discoideum*

Wie im Abschnitt zuvor erläutert, zeigte der Vergleich von EST- mit experimentell ermittelten Daten eine Diskrepanz in Bezug auf die Expression der drei H2B-Varianten in *Dictyostelium*. Während für H2Bv1 und H2Bv2 ebenfalls EST-Daten wenn auch nicht so zahlreich wie bei H2Bv3 vorlagen, konnte lediglich letzteres mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die drei gefundenen Sequenzen funktionelle Proteine kodieren und wo entsprechende GFP-Fusionsproteine lokalisieren. Dadurch ließe sich auch zeigen ob die H2B-Varianten 1 und 2 eng begrenzte Nischen besetzen und dadurch der Detektion entgangen sein könnten.

Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der drei potentiellen Proteine ist in Abbildung 25 dargestellt und zeigt deren schwache Konservierung. Während H2Bv1 und H2Bv3 eine ähnliche Größe aufweisen und eine insgesamt höhere Homologie zeigen, ist die Variante H2Bv2 deutlich länger und enthält zudem eine C-terminale Poly-Asparagin Wiederholung.

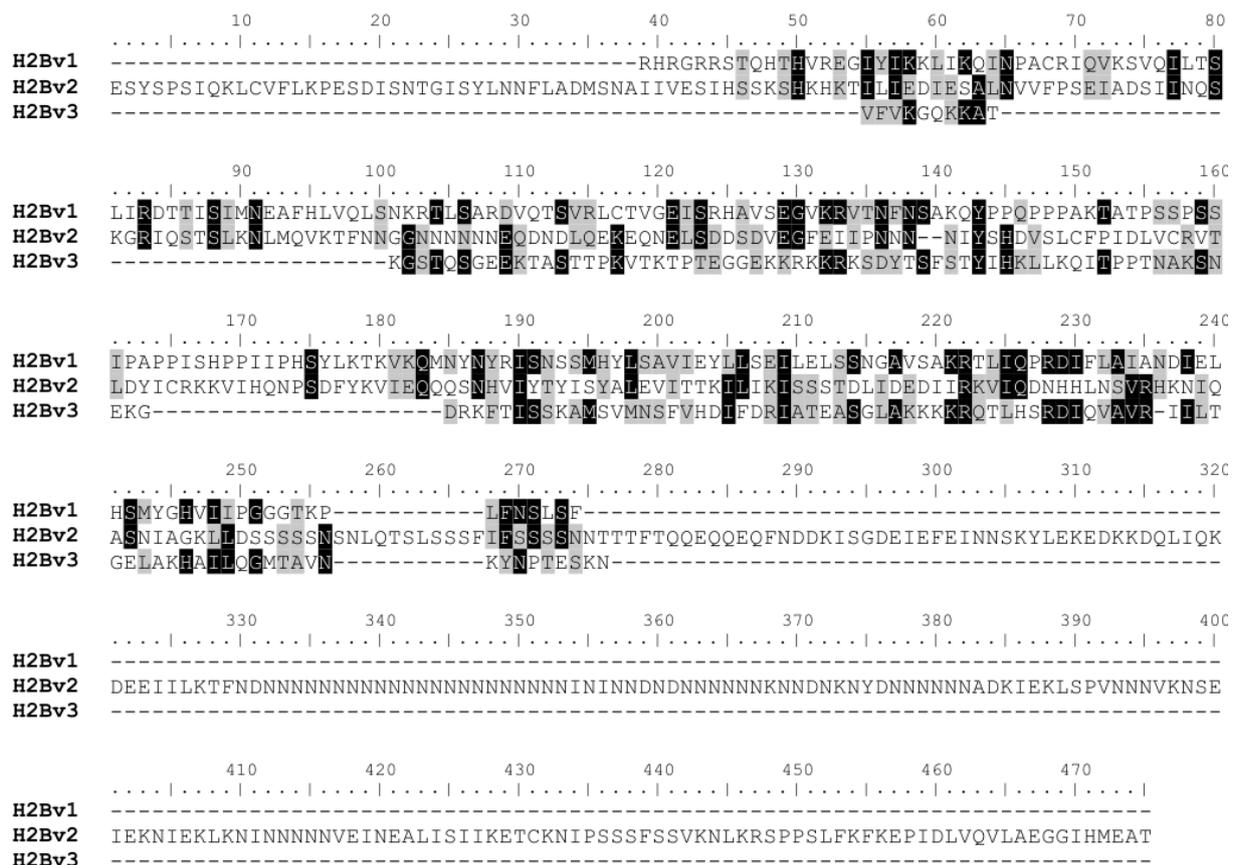


Abbildung 25: Das ClustalW *Alignment* der im Genom von *Dictyostelium discoideum* kodierten Histon H2B Varianten zeigt eine schwache Konservierung der Aminosäuren. Die Variante H2Bv2 zeigt im Vergleich zu den anderen eine N-terminale Verlängerung und eine lange Poly-Asparagin-Wiederholung am vergrößerten C-Terminus. Ab 50 % Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Aminosäuren sind diese grau hinterlegt, identische Aminosäuren sind ab 50 % schwarz markiert.

Zur Untersuchung der Lokalisation wurden zuerst C-terminale GFP-Fusionen durch Integration der kodierenden Regionen in den Vektor pDd-GFP (Maniak *et al.*, 1995) hergestellt. Das Anhängen des GFPs an den C-Terminus von H2B-Proteinen wurde als zellbiologisches Werkzeug bereits in vielen Organismen verwendet und sollte somit nicht mit der Proteinfunktion interferieren (Kanda *et al.*, 1998). Trotz Kontrolle der Zielvektoren durch Sequenzierungen und zahlreiche Transformationen, konnte lediglich mit dem Vektor pDd-H2Bv3-GFP eine Fluoreszenz beobachtet und durch Western Blots detektiert werden (Abbildung 26). Darum wurden für H2Bv1 und H2Bv2 ebenfalls N-terminale GFP-Fusionen durch Integration in den Vektor pDneo2a-GFP (Manu Dubin, eingereicht) hergestellt. Für beide Proteine konnte hierdurch ein detektierbares Ergebnis erzielt werden. Eine Zusammenfassung der getesteten Fusionsproteine zeigt Tabelle 20.

Tabelle 20: Übersicht über die hergestellten GFP-Fusionsproteine der drei H2B-Varianten. Ein Plus (+) oder Minus (-) zeigt an, ob mit dem Konstrukt eine Fluoreszenz beobachtet werden konnte oder nicht.

H2B-Proteine	N-terminale GFP-Fusion	C-terminale GFP-Fusion
H2Bv1	+	-
H2Bv2	+	-
H2Bv3	nicht getestet	+

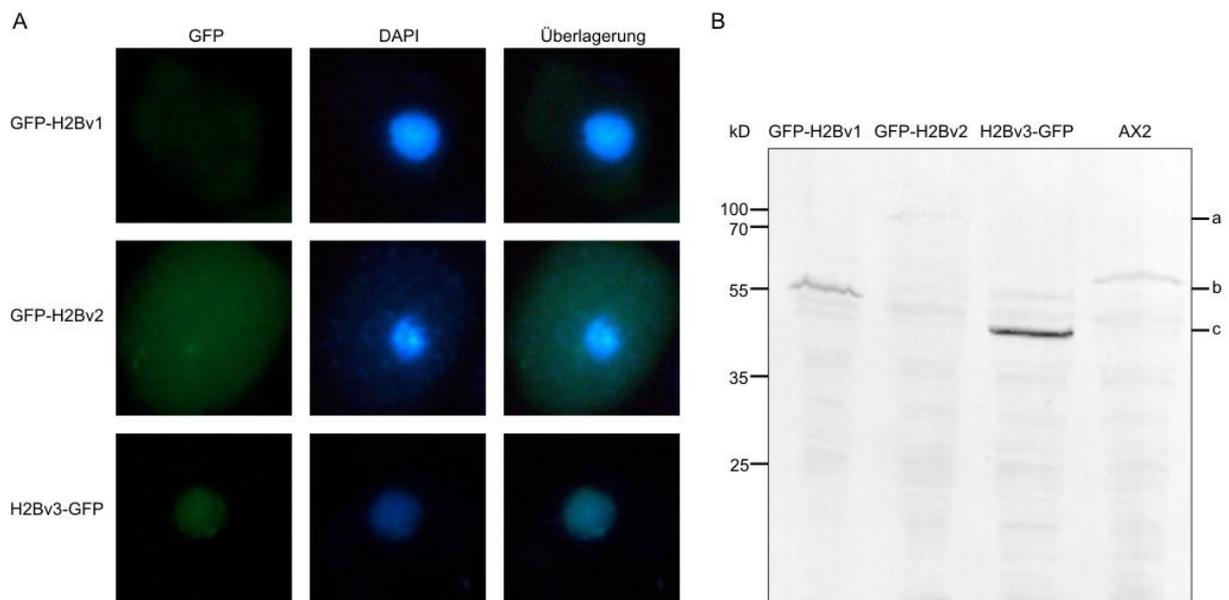


Abbildung 26: Ergebnisse der Überexpression von H2B-Varianten als GFP-Fusionen. A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen fixierter *Dictyostelium*-Zellen. H2Bv1 zeigt eine schwache cytoplasmatische Verteilung während das Signal von H2Bv2 gleich lokalisiert aber stärker ausfällt. Lediglich H2Bv3 lokalisiert alleine im Kern und deckt sich mit der durch DAPI angefärbten DNA. Maßstab: 2,5 μ m. B) Western Blot mit Anti-GFP-Antikörper der per SDS-PAGE aufgetrennten Fusionsproteine. Die Signale decken sich größtenteils mit dem berechneten Molekulargewichten von b) GFP-H2Bv1: 52 kD a) GFP-H2Bv2: 80 kD c) H2Bv3-GFP: 44 kD. Die Proteine wurden somit in voller Länge exprimiert. Als Kontrolle wurden AX2-Zellen aufgetragen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Methanol-fixierten und mit DAPI gegengefärbten Zellen ist in Abbildung 26A dargestellt. Lediglich H2Bv3-GFP zeigt das erwartete Ergebnis einer Lokalisation im Zellkern. Das Signal zeigt interessanterweise eine stärkere Konzentration in einem Punkt der Kernperipherie. Die beiden anderen H2B-GFP-Varianten lokalisieren vorwiegend im Cytoplasma und scheinen somit nicht funktional, obwohl die volle Länge der Fusionsproteine exprimiert wurde (Abbildung 26B). Um zu untersuchen, ob die gezeigte Kernlokalisierung von H2Bv3-GFP tatsächlich auf einer Inkorporation in Chromatin beruht, wurden Aufnahmen mitotischer Zellen angefertigt. Abbildung 27A zeigt beispielhaft kondensierte mitotische Chromosomen, die einerseits durch DAPI (DNA) andererseits durch H2Bv3-GFP deutlich angefärbt sind. Dabei ist zudem zu beobachten, dass die Färbung gleichmäßig über alle Chromosomen erfolgt. Es lässt sich somit, anders als bei den Interphase-Chromosomen, kein spezifisches Färbungsmuster erkennen.

Um zu zeigen worauf die beobachtete Verteilung von Histon H2Bv3 in der Interphase beruht, wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Dazu wurden Methanol-fixierte Zellen mit Anti-H3K9me²-Antikörper behandelt, um die Lage des Heterochromatins und der Centromere im Bezug auf H2Bv3-GFP festzustellen. Eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines so behandelten Zellkerns zeigt Abbildung 27. Die Färbung wurde mit Hilfe des zweiten Cy3-gekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht und zeigt eine perfekte Überlagerung des H2Bv3-GFP und des H3K9me²-Signals. Der beobachtete Punkt in der Kernperipherie stimmt somit mit der Lage der heterochromatisierten Centromere während der Interphase überein.

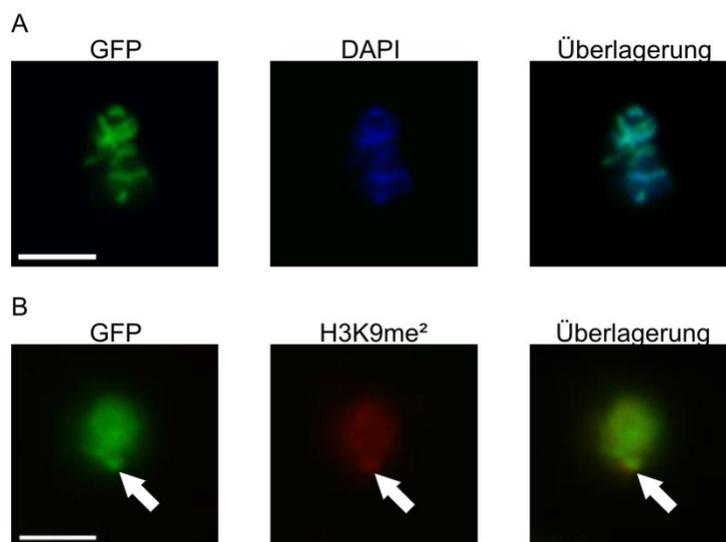


Abbildung 27: Lokalisation des überexprimierten Histons H2Bv3-GFP anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen fixierter *Dictyostelium*-Zellen. A) Kondensierte Mitose-Chromosomen zeigen die Inkorporation des Fusionsproteins mit gleichmäßiger Anfärbung des Chromatins (DAPI=DNA). B) Zeigt eine Immunfluoreszenz mit einem Anti-H3K9me²-Antikörper. Die Überlagerung zeigt eine Kolokalisation des H2Bv3-GFP (Pfeil) und des H3K9me²-Signals (Pfeil). Der beobachtete Punkt deckt sich somit mit der Lage der *Dictyostelium*-Centromere während der Interphase. Maßstab: 2,5 µm.

9.2.3 Massenspektrometrische Untersuchungen der Histone

Neben der Untersuchung des in *Dictyostelium discoideum* exprimierten „Histoms“ war vor allem die epigenetische Veränderung desselben von Interesse. Der durch posttranslationale Modifikationen spezifischer Aminosäuren verschlüsselte Histon-Code liefert dabei die Grundlage zur Errichtung definierter Chromatin-Bereiche. Durch massenspektrometrische Untersuchungen von unterschiedlich präparierten Histonen sollten möglichst genaue Daten über Art und Verteilung der in *Dictyostelium* vorkommenden Modifikationen gewonnen werden.

Die zu untersuchenden Histone wurden dafür aus *Dictyostelium*-Zellen mittels HCl-Extraktion gewonnen und dann entweder durch SDS-PAGE oder mittels AU-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden vor der massenspektrometrischen Untersuchung mit Trypsin, Chymotrypsin oder einem Gemisch aus beiden verdaut, um kurze Peptide zu erhalten. Nach der Vermessung dieser erfolgte eine Auswahl verschiedener, auf die Ergebnisse anzuwendender Parameter über die Software MASCOT[®]. In diesem Schritt wurden auch die in die Suche einzubeziehenden Modifikationen ausgewählt. Die unterschiedlichen Kombinationen dieser Schritte in Bezug auf einzelne Messungen sind in Tabelle 21 dargestellt. Im weiteren Verlauf wird lediglich auf die spezifischen Messdaten verwiesen, in deren Rahmen die jeweilige Modifikation gefunden wurde. Posttranslationale Modifikationen wie Methylierungen verändern die Massen der Aminosäuren. Im besten Fall lassen sich die Modifikationen anhand des Fragmentationsspektrums einer einzelnen Aminosäure zuordnen. Dies ist jedoch nicht immer mit Bestimmtheit möglich und wird daher an entsprechenden Stellen diskutiert.

Tabelle 21: Übersicht über Datum, Art der Gelelektrophorese, Probenvorbereitung und mittels MASCOT[®]-Software untersuchter Modifikationen der Histone. Abkürzungen: ac= Acetylierung, bi= Biotinylierung, me^{2,3}= Mono-, Di-, Trimethylierung, p=Phosphorylierung, ox=Oxidation, K=Lysin, R=Arginin, M=Methionin.

Messdatum	Geltyp	Verdau	Modifikationen
23.06.06	SDS-PAGE	Trypsin	ac(K), bi(K), me(K,R), me ² (K,R), me ³ (K), ox(M)
10.07.06	SDS-PAGE	Trypsin	ac(K), bi(K), me(K,R), me ² (K,R), me ³ (K), ox(M)
12.10.06	SDS-PAGE	Trypsin	ac(K), bi(K), me(K,R), me ² (K,R), me ³ (K), ox(M)
07.11.06	SDS-PAGE	Trypsin	ac(K), me(K,R), ox(M)
24.04.08	AU-Gel	Trypsin	ac(K), p(S,T), me(K,R), me ² (K,R), me ³ (K), ox(M)
05.04.09	SDS-PAGE	Trypsin	ac(K), p(S,T), me(K,R), me ² (K), me ³ (K), ox(M)
05.04.09	SDS-PAGE	Chymotrypsin	ac(K), p(S,T), me(K,R), me ² (K), me ³ (K), ox(M)
05.04.09	SDS-PAGE	Trypsin/ Chymotrypsin	ac(K), p(S,T), me(K,R), me ² (K), me ³ (K), ox(M)

Die Massenveränderungen der in dieser Arbeit untersuchten Proteinmodifikationen von Histonen sind in Tabelle 22 gegenübergestellt. Die verwendete Software MASCOT[®] liefert nach der Berechnung eine Übersicht über die gefundenen Peptide, mögliche Modifikationen und deren Positionen. Der Ion Score soll dabei als Anhaltspunkt dafür dienen, wie gut das Massenspektrum mit dem laut Sequenz erwarteten übereinstimmt. Um falsch-positive Treffer möglichst auszuschließen, wurde im Laufe dieser Arbeit ein Ion Score von mindestens 20 vorausgesetzt. Erst ab diesem Wert wurden Peptide einer weitergehenden Prüfung unterzogen.

Tabelle 22: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten, durch Histon-Modifikationen hervorgerufenen Massenveränderungen einzelner Aminosäuren. Quelle: www.unimod.org. * Die Oxidation von Methionin stellt ein Präparationsartefakt und keine natürliche Histon-Modifikation dar.

Modifikation	Masse (monoisotopisch)	Masse (durchschnittlich)	Aminosäure	Neutralverlust
Acetylierung	42.010565	42.0367	K	-
Phosphorylierung	79.966331	79.9799	S,T	97.976896
Monomethylierung	14.015650	14.0266	K,R	-
Dimethylierung	28.031300	28.0532	K,R	-
Trimethylierung	42.046950	42.0797	K	-
Biotinylierung	226.077598	226.2954	K	-
Oxidation*	63.998285	64.1069	M	-

Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, zahlreiche Modifikationen für die Histone H3a, H3b, H2Bv3 und H4 zu identifizieren. Lediglich für Histon H2AX konnten unter diesen Bedingungen keine und für Histon H1 nur drei Modifikationen gefunden werden. Zum einen handelt es sich dabei um die Dimethylierung von Lysin 77 (Score 27) und zum anderen um die Monomethylierungen von Lysin 94 (Score 39) und Lysin 129 (Score 75). Beide Ergebnisse sind mit den zusammenhängenden Messdaten in Tabelle 23 gegenübergestellt. Obwohl es Hinweise auf weitere Modifikationen wie Phosphorylierungen gab, waren diese meist nur schwach gestützt und blieben hinter denen anderer Histone weit zurück.

Tabelle 23: Überblick über die für Histon H1 gefundenen modifizierten Peptide, deren Sequenzen, Massen (Mr), Fehlsplattungen (Miss), Scores und Messdaten. Unmodifizierte und identische Peptide sind nicht aufgeführt.

Peptid	Sequenz	Mr(gem.)	Miss	Score	Datum
74-84	LVAKme ² GTLTMoxVK	1203.69	1	27	24.04.2008
89-106	LSEEGKmeKEHQATLGPVAK	1935.09	2	39	24.04.2008
112-130	TTATSTETTAAPPATPTKmeK	1888.88	1	75	24.04.2008

9.2.3.1 Histon H3a

Die für Histon H3a gefundenen Modifikationen sind im Vergleich zu den vorangegangenen weitaus zahlreicher wie Tabelle 24 beweist. Neben der Mono-, Di- und Trimethylierung von Lysinen konnten hier auch Acetylierungen, die Dimethylierung von Arginin und die Phosphorylierung von Serin und Threonin beobachtet werden.

Tabelle 24: Überblick über die für Histon H3a gefundenen modifizierten Peptide, deren Sequenzen, Massen (Mr), Fehlsplaltungen (Miss), Scores und Messdaten. Unmodifizierte und identische Peptide sind nicht aufgeführt. Modifikationen in Klammern konnten nicht zweifelsfrei bestimmten Positionen zugeordnet werden.

Peptid	Sequenz	Mr(gem.)	Miss	Score	Datum
09-17	Kme ² STGAKacVPR	1012.53	2	56	24.04.2008
09-17	KacSTGAKacVPR	1026.58	2	59	05.04.2009
09-17	KacSTGAKme ³ VPR	1026.57	2	53	24.04.2008
09-17	KSTGAKacVPR	984.59	2	77	05.04.2009
10-17	STGAKacVPR	856.46	1	48	05.04.2009
24-39	QAHKacQTPVSSSSGGVK	1638.88	1	60	05.04.2009
24-39	QAHKmeQTPVSSSSGGVK	1610.85	1	34	24.04.2008
24-40	QAHKQTPVSSSSGGVKK (Kac,Kme ²)	1795.99	2	36	12.10.2006
24-40	QAHKQTPVSSSSGGVKK (Kac,Kac)	1809.96	2	37	12.10.2006
24-40	QAHKacQTPVSSSSGGVKK	1767.88	2	42	05.04.2009
28-40	QTPVSSSSGGVKKme	1274.67	1	47	05.04.2009
28-40	QTPVSSSSGGVKKme ² K	1288.76	1	47	05.04.2009
28-40	QTPVSSSSGGVKKac	1302.75	1	35	05.04.2009
28-40	QTPVSSSSGGVKKme ²	1288.73	1	41	05.04.2009
28-40	QTPVSSSSGGVKKme ³	1303.67	1	42	05.04.2009
40-52	KacVHRme ² FRme ² PGTVALR	1633.10	2	24	12.10.2006
44-52	FRme ² PGTVALR	1043.49	0	34	23.06.2006
76-82	EIAQEFKme	877.44	0	48	24.04.2008
76-86	EIAQEFKme ² TDLR	1376.52	1	46	23.06.2006
76-86	EIAQEFKmeTDLR	1362.74	1	64	24.04.2008
73-83	EIAQEFKTpDLR	1428.65	1	28	24.04.2008
87-118	FQSpAAIGALQEA- SEAYLVGLFEDTNLCAIHAK	3460.27	0	45	05.04.2009
120-131	VTIMoxPKmeDIHLAR	1422.90	1	34	24.04.2008

9.2.3.2 Histon H3b

Die Modifikationen, die für Histon H3b gefunden wurden, gleichen den zuvor beschriebenen, zeigen im Detail allerdings auch einige Unterschiede. Dies lässt sich zumindest teilweise auf veränderte Aminosäuresequenzen zurückführen. Histon H3b fehlt auch die bei H3a besprochene dreifache Serin-Insertion. Tabelle 25 fasst die durch Massenspektrometrie gewonnenen Daten zusammen. Gelistet sind wiederum nur die Peptide, in denen Modifikationen gefunden wurden und die einen Ion-Score von über 20 zeigen. Redundanzen wurden zudem entfernt.

Tabelle 25: Überblick über die für Histon H3b gefundenen modifizierten Peptide, deren Sequenzen, Massen (Mr), Fehlsplaltungen (Miss), Scores und Messdaten. Unmodifizierte und identische Peptide sind nicht aufgeführt.

Peptid	Sequenz	Mr(gem.)	Miss	Score	Datum
09-17	KSTGAKacVPR	984.60	2	77	05.04.2009
09-17	Kme ² STGAKacVPR	1012.50	2	52	24.04.2008
09-17	KacSTGAKme ³ VPR	1026.57	2	53	24.04.2008
09-17	KacSTGAKacVPR	1026.58	2	59	05.04.2009
10-17	STGAKacVPR	856.46	1	48	05.04.2009
24-36	SSQKacSFPSTQGLK	1435.69	1	33	24.04.2008
24-37	SSQKacSFPSTQGLKK	1563.88	2	43	24.04.2008
24-37	SSQKacSFPSTQGLKmeK	1577.97	2	43	24.04.2008
24-37	SSQKacSFPSTQGLKack	1605.91	2	31	24.04.2008
28-37	SFPSTQGLKKme	1105.56	1	29	24.04.2008
28-37	SFPSTQGLKKme ²	1119.64	1	36	05.04.2009
28-37	SFPSTQGLKKac	1133.71	1	40	24.04.2008
28-37	SFPSTQGLKme ² K	1119.58	1	45	24.04.2008
28-37	SFPSTQGLKmeK	1105.56	1	42	24.04.2008
28-37	SFPSTQGLKack	1133.54	1	29	24.04.2008
57-63	SSELLIKme ²	816.44	0	34	24.04.2008
57-64	SSELLIKmeKme	944.54	1	35	24.04.2008
57-64	SSELLIKme ²	944.58	1	31	24.04.2008
73-79	EIAQEFKme	877.46	0	47	24.04.2008
73-80	EIAQEFKmeT	877.44	0	48	24.04.2008
73-83	EIAQEFKmeTDLR	1362.74	1	64	24.04.2008
73-83	EIAQEFKtpDLR	1428.65	1	28	24.04.2008

9.2.3.3 Histon H2Bv3

Für H2Bv3 konnten längst nicht so viele Modifikationen gefunden werden wie für die beiden Histon H3 Varianten. Die in Tabelle 26 zusammengefassten Befunde zeigten im Verlaufe der Untersuchung aber eine erstaunliche Konsistenz. Gerade die Modifikation des Peptids 98-IATEASGLAKK-108 durch eine Acetylierung und Dimethylierung an K107 konnte in zahlreichen Versuchen gezeigt werden. Dabei lag der Ion-Score sehr deutlich über der festgelegten 20er Grenze. Die Tabelle zeigt somit auch für das acetylierte Peptid einen Score von 76. Dieser Modifikation ist aufgrund der vermutlich biologischen Relevanz auch ein gesonderter Abschnitt dieser Arbeit gewidmet (siehe 9.2.4).

Tabelle 26: Überblick über die für Histon H2Bv3 gefundenen modifizierten Peptide, deren Sequenzen, Massen (Mr), Fehlsplattungen (Miss), Scores und Messdaten. Unmodifizierte und identische Peptide sind nicht aufgeführt.

Peptid	Sequenz	Mr(gem.)	Miss	Score	Datum
28-38	VTKme ² TPTEGGEK	1173.54	1	33	24.04.2008
60-68	QITPPTNAKme	982.55	0	32	24.04.2008
76-82	Kme ² FTISSK	837.45	1	26	23.06.2006
98-108	IATEASGLAKack	1129.56	1	49	10.07.2006
98-108	IATEASGLAKme ² K	1115.59	1	76	24.04.2008
112-124	QTLHSRmeDIQVAVR	1535.79	1	41	24.04.2008

Diese und alle weiteren Modifikationen sind in Abbildung 30 in aufbereiteter Form zu sehen. In der Abbildung wird ersichtlich, dass die Modifikationen nicht am N- oder C-Terminus des Proteins liegen sondern in der Histon-Faltungs-Domäne. Somit stellt die Dimethylierung von Lysin 30 die erste vom N-Terminus gesehene und in diesen Untersuchungen vorgefundene H2Bv3-Modifikation dar. Das zweite identifizierte Ziel einer Histon-Methyltransferase ist Lysin 68. Dieses wurde auf dem Peptid 60-QITPPTNAK-68 in Form einer Monomethylierung gefunden. Es folgt die Dimethylierung von K76 vor dem bereits besprochenen und mehrfach modifizierten Lysin 107. Bei der letzten Modifikation in dieser Reihe handelt es sich um die einzige für H2Bv3 identifizierte Arginin-Methylierung an Position 117. Hierbei handelt es sich um eine Dimethylierung wie sie schon zuvor bei Histon H3a beobachtet wurde.

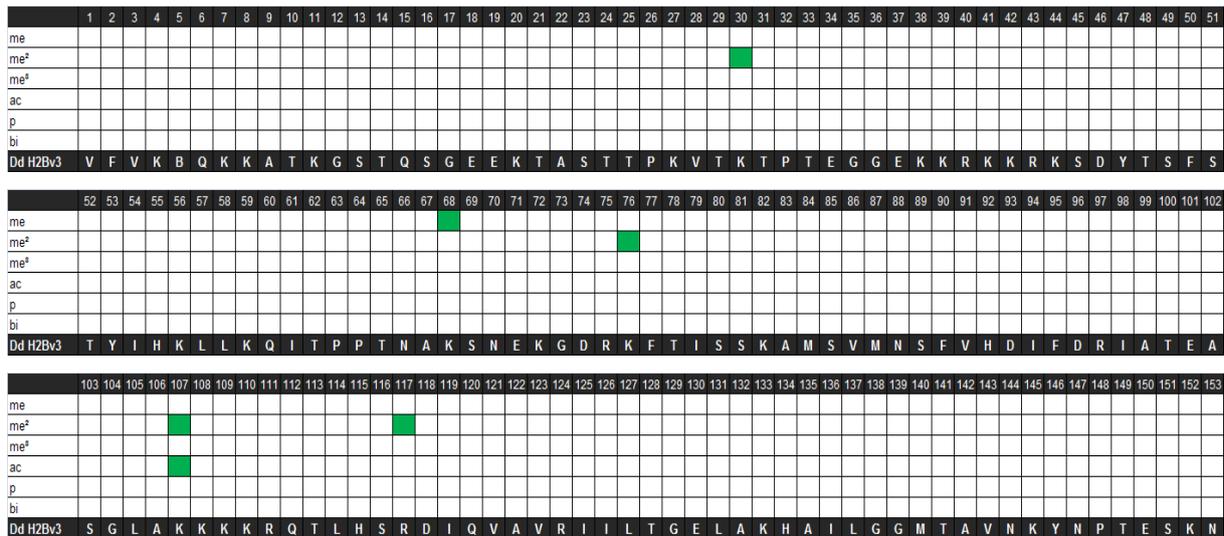


Abbildung 30: Grafische Darstellung der für Histon H2Bv3 gefundenen posttranslationalen Modifikationen. Veränderte Aminosäuren sind durch darüber liegende grüne Kästchen markiert, die je nach Zeile für bestimmte Modifikationen stehen. Abkürzungen: me^{2,3}= Mono-, Di-, Trimethylierung, ac= Acetylierung, p=Phosphorylierung, bi= Biotinylierung.

9.2.3.4 Histon H4

Die Untersuchung posttranslationaler Modifikationen von Histons H4 zeigt zwei Besonderheiten. Zum einen handelt es sich um das einzige Histon, für das Hinweise einer Biotinylierung gefunden wurden. Leider konnte die genaue Stelle der Modifikation nicht bestimmt werden. Hinweise auf die betroffene Aminosäure ergeben sich allerdings aus dem Vergleich mit anderen Organismen. Zum anderen ist es das einzige *Dictyostelium*-Histon, bei der eine Arginin-Monomethylierung auftritt. Tabelle 27 fasst die Messergebnisse für Histon H4 zusammen.

Tabelle 27: Überblick über die für Histon H4 gefundenen modifizierten Peptide, deren Sequenzen, Massen (Mr), Fehlpaltungen (Miss), Scores und Messdaten. Unmodifizierte und identische Peptide sind nicht aufgeführt. Modifikationen in Klammern konnten nicht zweifelsfrei bestimmten Positionen zugeordnet werden.

Peptid	Sequenz	Mr(gem.)	Miss	Score	Datum
07-17	GGKacTGGKacVGGK	1028.56	2	64	05.04.2009
07-17	GGKacTGGKme ³ VGGK	1028.52	2	56	05.04.2009
10-21	TGGKVGGKVGAK (Kac,Kme,Kbi)	1339.69	2	20	12.10.2006
10-21	TGGKacVGGKacVGAK	1141.55	2	85	05.04.2009
14-22	VGGKacVGAKacR	954.52	2	69	05.04.2009
51-60	ISFPIYEETRme	1267.47	0	33	05.04.2009
73-83	DSVAYTEHAGRme	1218.44	0	30	28.04.2008
73-84	DSVAYTEHAGRmeR	1374.61	0	27	28.04.2008

9.2.4 Untersuchung der H2Bv3(K107)-Modifikationen

Wie im Abschnitt 9.2.3.3 gezeigt, konnte im Rahmen dieser Arbeit für Histon H2Bv3 die Methylierung und Acetylierung verschiedener Aminosäuren nachgewiesen werden. Am weitaus häufigsten wurde dabei die Dimethylierung von Lysin 107 beobachtet. Die gleiche Aminosäure konnte zudem auch acetyliert werden. Diese Beobachtungen führten zu der Ansicht, dass es sich hierbei um wichtige epigenetische Signale handeln könnte. Um aufzuklären welche Funktionen sich hinter der posttranslationalen Modifikation von Lysin 107 verstecken, wurden die im Folgenden erläuterten Experimente und Analysen durchgeführt.

Da die Modifikationen ausschließlich in dem Peptid 98-IATEASGLAKK-108 aber nie in einem Peptid mit fehlendem letztem Lysin nachgewiesen werden konnten, wurde das Fragmentationsspektrum zur Verifizierung wie in Abbildung 32 gezeigt untersucht. Durch den Vergleich der entscheidenden Massenpeaks kann davon ausgegangen werden, dass in der Tat Lysin 107 und nicht Lysin 108 als Modifikationsstelle fungiert. Inwieweit die darauf folgenden Lysine 109 und 110 ebenfalls modifiziert werden, lässt sich auf Grund des Fehlens entsprechender Peptide nicht beantworten.

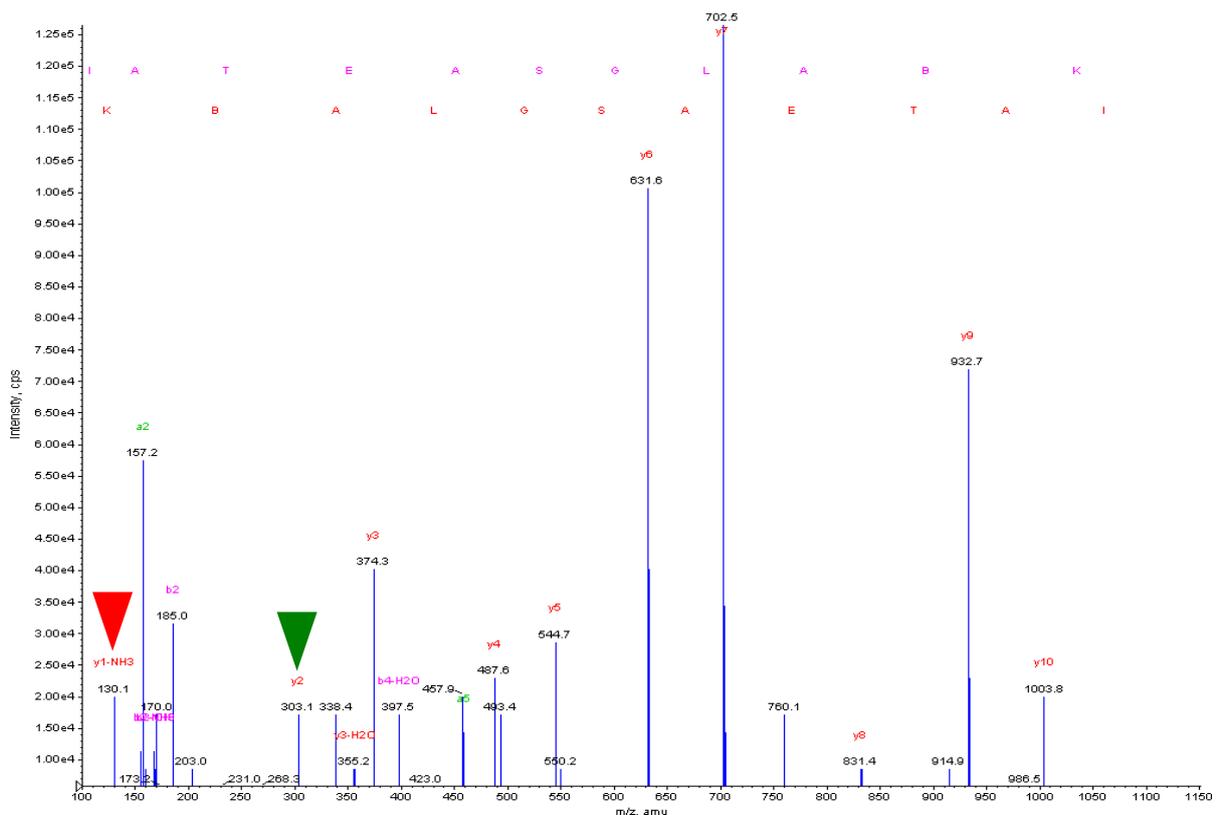


Abbildung 32: Fragmentationsspektrum des Peptids 98-IATEASGLAKme²K-108 zur Verifizierung der Modifikation von Lysin 107 von H2Bv3. Das Vorhandensein einer Dimethylierung an einem der Lysine 107 oder 108 wird durch die Masse des y₂-Ions gezeigt (Grüner Pfeil: y₂ m/z=303,1; KK m/z=275,2 + Dimethylierung m/z=28). Bei einer Dimethylierung von Lysin 108 würde man den y₁ Ionen-Peak bei m/z = 158,1 erwarten (Lysin y₁-NH₃ m/z=130,1 + Dimethylierung m/z=28). Tatsächlich erhält man aber nur m/z=130,1 (roter Pfeil), was einem unmethylierten y₁-NH₃ entspricht. Somit muss die Modifikation Lysin 107 betreffen.

Die Funktion von Histon-Modifikationen kann man zu einem gewissen Grad von ihrer Lokalisation auf dem Nukleosom ableiten (zusammengefasst in Mersfelder und Parthun, 2006). Um die Lage des Lysins 107 zu bestimmen, wurde die Sequenz des Histons H2Bv3 auf der Kristallstruktur des publizierten *Xenopus laevis* Nukleosoms (Luger *et al.*, 1997) ausgerichtet. Eine Visualisierung des Ergebnisses zeigt Abbildung 33. Lysin 107 liegt somit auf der lateralen Oberfläche des Nukleosoms in der Nähe der DNA. Innerhalb der Struktur des Histons H2Bv3 befindet sich das Lysin in einem Loop, der zwei benachbarte α -Helices voneinander trennt. Anhand der Lage ist es wahrscheinlich, dass die Modifikationen des Lysins 107 die Interaktion zwischen Nukleosom und DNA direkt oder indirekt modulieren.

Gewöhnlich sind Histon-Modifikationen hoch konserviert. Potentielle Modifizierungsstellen und die dafür verantwortlichen modifizierenden Enzyme lassen sich häufig nach einem einfachen Sequenzvergleich vorhersagen. Im Fall von H2Bv3 Lysin 107 lieferte dieser Vergleich allerdings ein überraschendes Ergebnis. Für die Analyse wurden Sequenzen von 311 H2B-Varianten der *Histone Sequence Database* (Sullivan *et al.*, 2002) mit der von H2Bv3 aus *Dictyostelium discoideum* verglichen. Dazu wurde der Algorithmus von ClustalW verwendet. Einen beispielhaften Ausschnitt des *Alignments* von 15 dieser 312 Sequenzen zeigt Abbildung 34. Hierbei handelt es sich um zufällig ausgewählte Vertreter, die aber bereits die schlechte Konservierung von Lysin 107 verdeutlichen. Lediglich H2B aus *Plasmodium falciparum* zeigt an gleicher Position ebenfalls ein Lysin.

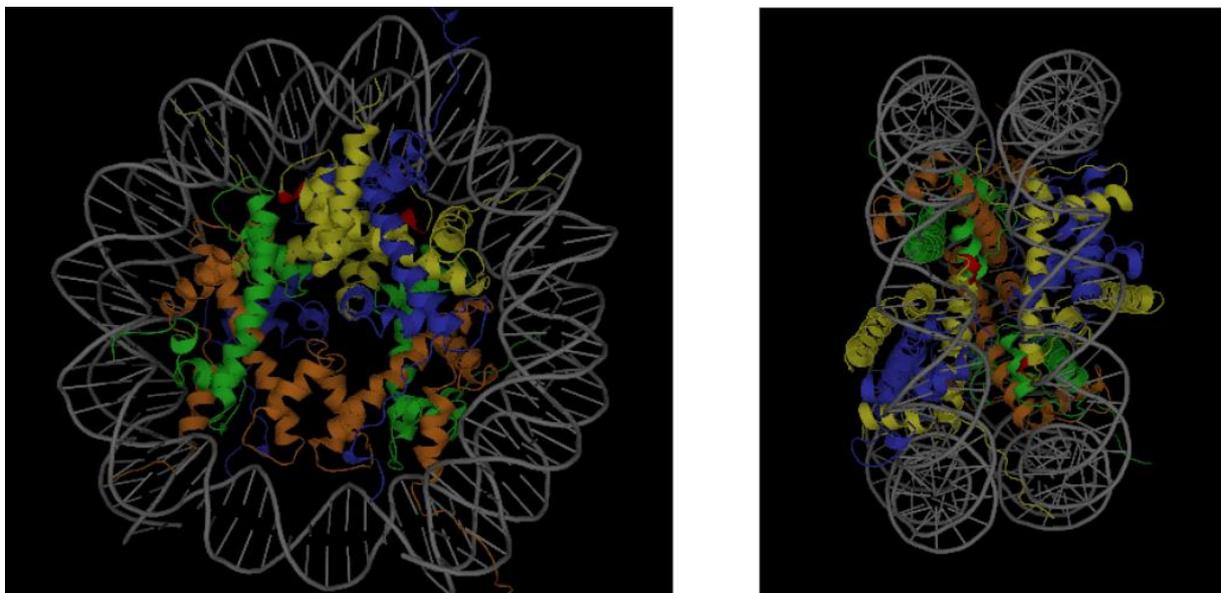


Abbildung 33: Lokalisation des Lysins 107 (Rot) von H2Bv3 (Gelb) im Nukleosom in seitlicher (links) und frontaler Ansicht (rechts). Lysin 107 befindet sich am Rande eines Loops zwischen zwei α -Helices. Damit lokalisieren die beiden K107-Vorkommen an der lateralen Seite des Nukleosoms in DNA-Nähe (Grau). Erstellt mit VMD (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd) anhand der Kristallstruktur des *Xenopus laevis* Nukleosoms (PDB: 1AOI).

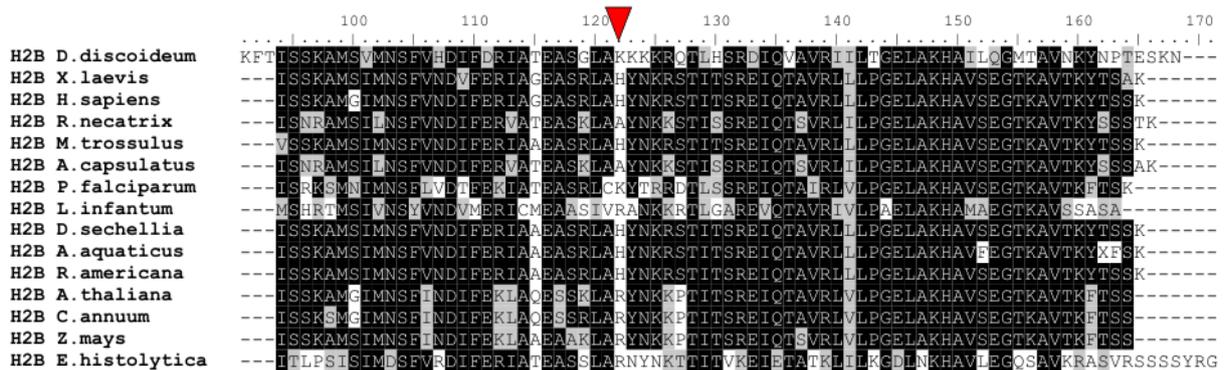


Abbildung 34: ClustalW-Alignment von 15 zufällig ausgewählten H2B C-Termini mit der von H2Bv3 aus *Dictyostelium discoideum*. Die Position von Lysin 107 ist durch den roten Pfeil markiert. Lediglich H2B aus *Plasmodium falciparum* enthält an gleicher Position ebenfalls ein Lysin. Ab 50 % Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Aminosäuren sind diese grau hinterlegt, identische Aminosäuren sind ab 50 % schwarz markiert.

Betrachtet man alle 312 Sequenzen findet sich an der entsprechenden Position wie in Abbildung 35 verdeutlicht lediglich in fünf Fällen ein Lysin. Wesentlich häufiger nehmen Histidin (169), Arginin (76), Alanin (24) und Glutamin (19) diese Position ein. Neben H2Bv3 aus *Dictyostelium discoideum* tritt lediglich bei zwei Varianten aus *Plasmodium falciparum* und je einer aus *Plasmodium vivax* und *Strongylocentrotus purpuratus* an dieser Stelle ein Lysin auf.

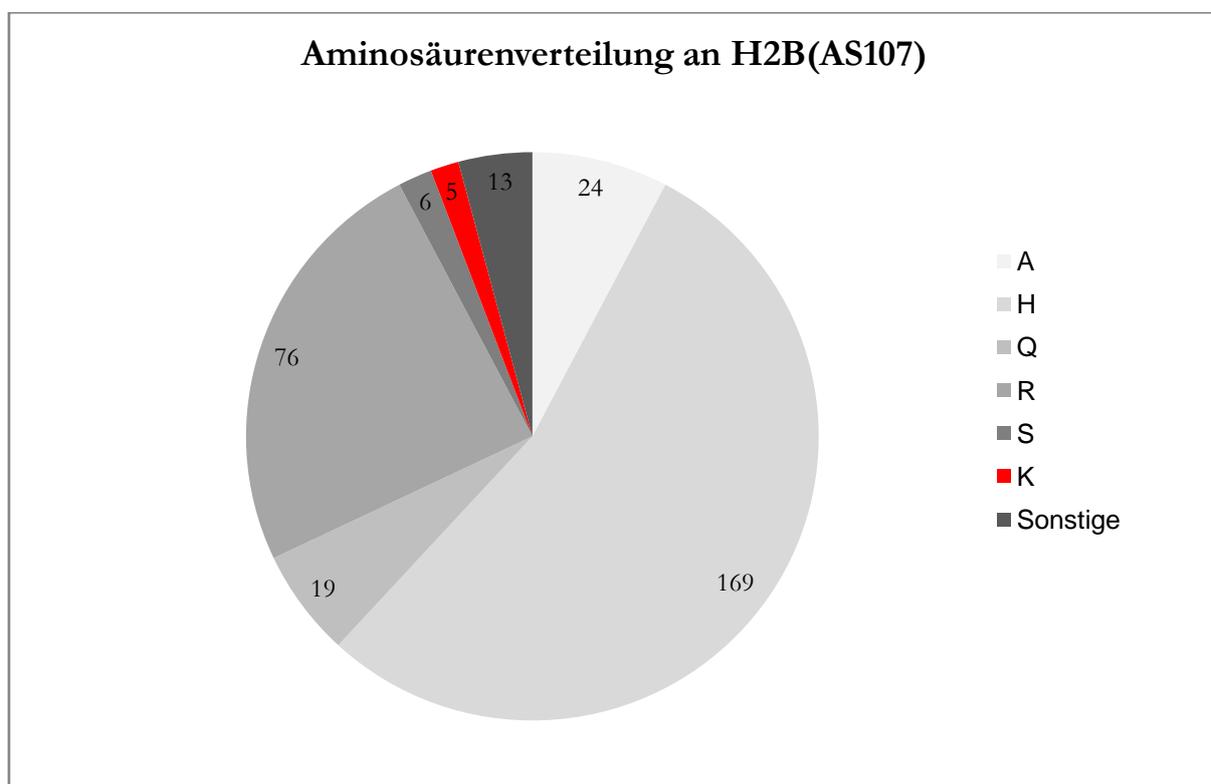


Abbildung 35: Diagramm der Aminosäurenverteilung von 312 H2B-Sequenzen an der dem H2Bv3(K107) entsprechenden Position. Die Sequenzen entstammen der *Histone Sequence Database* (Sullivan *et al.*, 2002) und wurden mit ClustalW ausgerichtet. Das nur fünfmal vorhandene Lysin ist rot hervorgehoben. Wesentlich häufiger an dieser Position sind Histidin (169), Arginin (76), Alanin (24) und Glutamin (19).

Die Untersuchung der Funktion posttranslationaler Histon-Modifikationen gestaltet sich äußerst schwierig. Obwohl mehrere hundert von ihnen bekannt sind, konnte nur für die wenigsten eine zelluläre Aufgabe nachgewiesen werden. Um die Funktion der K107-Acetylierung des *Dictyostelium discoideum* Histons H2Bv3 zu erforschen, wurde eine Überexpressionsmutante erstellt. Hierfür wurde das Lysin 107 im bereits zuvor verwendeten Vektor in Arginin mutiert. Das daraus resultierende Plasmid pDd-H2Bv3(K107R)-GFP wurde anschließend in *Dictyostelium discoideum* transformiert und mit Zellen, die pDd-H2Bv3-GFP trugen, verglichen. Sollte die fehlende Acetylierung eine wichtige Chromatin-Funktion verhindern, wäre dies ein Beweis für eine neue, in relativ kurzer Zeit entstandene Modifikationsstelle. Da das endogene H2Bv3 allerdings immer noch in der Zelle exprimiert wird, kann dieser Effekt schwächer ausfallen oder aber ganz ausbleiben. Nach der Transformation und anschließender Selektion überexprimierender Klone wurde die Lokalisation der Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop verglichen. Wie Abbildung 36A zeigt konnte weder in amöboiden Zellen noch in Sporen ein Unterschied in der Lokalisation zwischen H2Bv3-GFP und H2Bv3(K107R)-GFP exprimierenden Zellen festgestellt werden. Der schwache Punkt in der Kernperipherie bleibt in Interphasekernen erhalten und auch während der Mitose verhalten sich beide Fusionsproteine gleich (nicht gezeigt). Der Western Blot in Abbildung 36B zeigt, dass beide Proteine komplett und etwa gleich stark exprimiert werden. Mikroskopisch lässt sich somit kein Unterschied zwischen beiden Zelllinien feststellen.

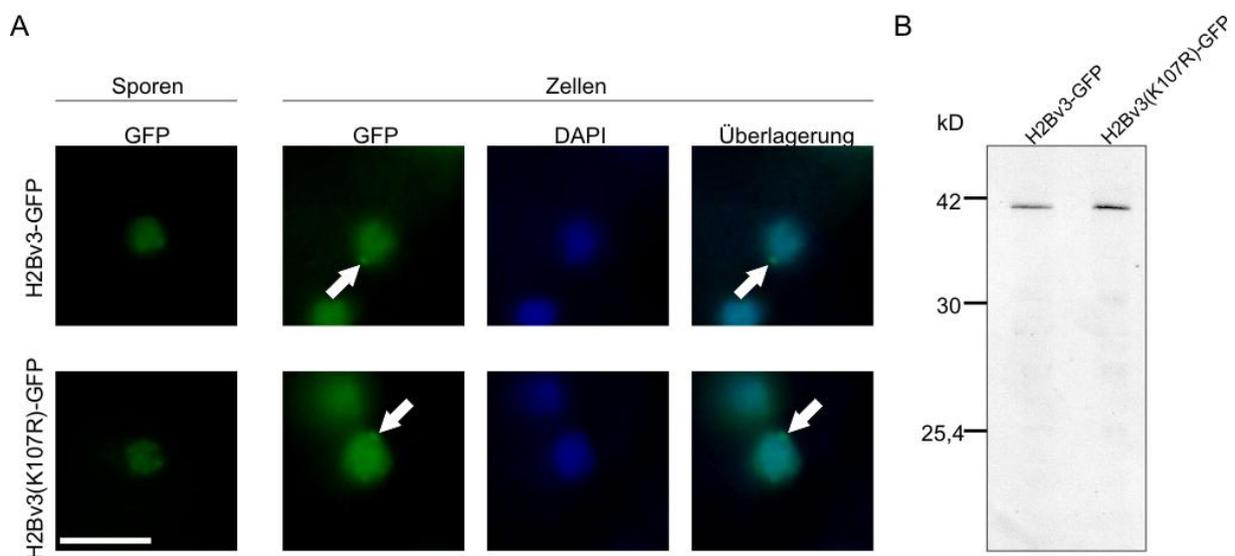


Abbildung 36: Ergebnisse der Überexpression von H2Bv3 und dem mutierten H2Bv3(K107R) als GFP-Fusionen. A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Sporen und fixierten *Dictyostelium*-Zellen. Beide Proteine lokalisieren im Kern und zeigen in vegetativen Zellen einen Punkt in der Kernperipherie (Pfeil). Die durch DAPI angefärbte DNA verdeutlicht die Dimension des Zellkerns. Maßstab: 5 µm. B) Western Blot mit Anti-GFP-Antikörper der per SDS-PAGE aufgetrennten Fusionsproteine. Die Signale decken sich ungefähr mit dem berechneten Molekulargewicht von 44 kD. Die Abweichung ist für Histone aufgrund der Basenkomposition und den zahlreichen Modifikationen nicht ungewöhnlich.

Neben der Mikroskopie wurden die Zellen auch während der Entwicklung über 24 Stunden beobachtet. Auf Phosphatagar sowie auf mit Bakterien bewachsenen KA-Platten verlief die Entwicklung zu sporentragenden Fruchtkörpern gleich. Identisch verhielten sich die Zellen auch bei Plaque-Assays, bei dem die Ausbreitung auf KA-Platten untersucht wird, sowie bei Sporulations- und Wachstumsversuchen in axenischem Medium (nicht gezeigt).

Da diese Versuche keinen Defekt der H2Bv3 Mutante zeigen konnten, wurde untersucht, ob die Acetylierung eine Funktion in der Reparatur von DNA in *Dictyostelium* haben könnte. Die Verbindung von DNA-Reparatur und Histon-Modifikationen konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Thiriet und Hayes, 2005; Yan *et al.*, 2009; Costelloe und Lowndes, 2010). Da *Dictyostelium discoideum* über ein ausgezeichnetes Reparatursystem zur Vermeidung von UV-Schäden verfügt (Freim und Deering, 1970), bietet sich ein Test der UV-Sensitivität an. Hierbei konnte, wie in Abbildung 37 gezeigt, wieder kein Unterschied zwischen den Überexpressionsstämmen gefunden werden. Interessanterweise unterscheidet sich die Fähigkeit zur Reparatur von UV-Schäden bei beiden aber deutlich vom Wildtyp. Während sich dieser auch bei höher werdenden Strahlendosen gut erholt, stirbt ein Großteil der Zellen aus den beiden Überexpressionsstämmen ab einer Dosis von 0,02 J/cm² ab.

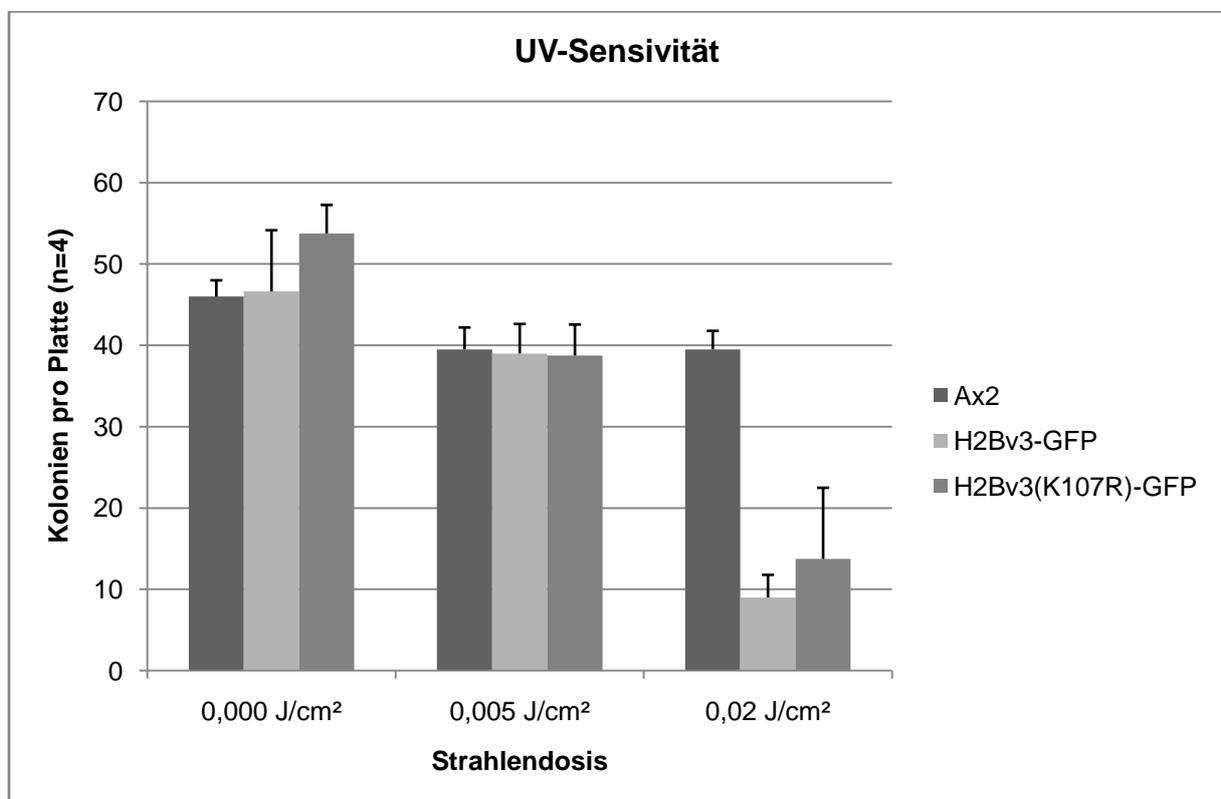


Abbildung 37: Grafische Darstellung der UV-Sensitivität von H2Bv3-GFP und H2Bv3(K107R)-GFP überexprimierenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp (AX2). Während AX2-Zellen keine Schäden nach der Bestrahlung mit 0,02 J/cm² zeigen, stirbt ein Großteil der überexprimierenden Zellen bei dieser Dosis ab. Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwertes.

9.2.5 Posttranslationale Histon-Modifikationen in der Entwicklung

Obwohl es sich bei *Dictyostelium discoideum* um ein vergleichsweise einfaches Lebewesen handelt, verfügt es über die Möglichkeit zur differenzierten Entwicklung. Diese wird durch Nahrungsmangel ausgelöst und führt innerhalb von 24 Stunden zur Ausbildung von sporentragenden Fruchtkörpern. Mit dem Wissen über die zahlreichen posttranslationalen Histon-Modifikationen in diesem Organismus sollte nun eine mögliche Veränderung während der Entwicklung untersucht werden.

Um die Histone aus verschiedenen Entwicklungsstadien gewinnen zu können, wurden axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen auf Nitrozellulosemembranen ausgebracht. Durch die fehlende Nahrungsquelle leiten die Zellen kurz darauf ihren Entwicklungszyklus ein. Die Zellen konnten anschließend in 4stündigen Intervallen abgeerntet und die Histone mit HCl extrahiert werden. Da für umfassende Versuche nicht genügend spezifische Antikörper zur Verfügung standen, wurden die Histone anschließend in einer AU-PAGE aufgetrennt, um möglichst viele Isoformen separieren zu können. Anders als in der SDS-PAGE ist es damit möglich, auch unterschiedlich geladene Proteine zu unterscheiden. Die Ladungsänderung könnte beispielsweise auf einer Acetylierung oder Phosphorylierung des Histons beruhen. Da keinerlei Erfahrungswerte für das Laufverhalten von *Dictyostelium*-Histonen in der AU-PAGE vorlagen, wurden die in Frage kommenden Proteinbanden über einen Vergleich mit Rinder-Histonen eingegrenzt. Die endgültige Identifizierung erfolgte anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie. Abbildung 38 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.

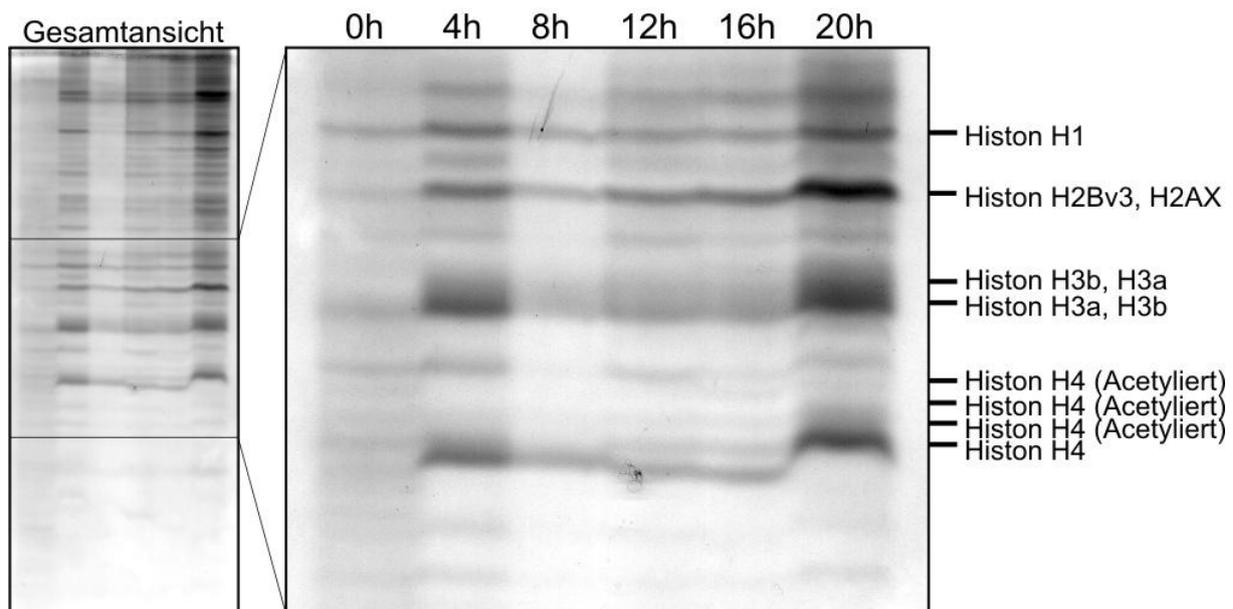


Abbildung 38: Coomassiegefärbte AU-PAGE mit HCl-extrahierten Kernproteinen unterschiedlicher Entwicklungszeitpunkte von *D. discoideum*. Links: Komplette Ansicht des Gels. Rechts: Nahaufnahme der identifizierten Histone. Das Bandenmuster ist bei allen Zeitpunkten nahezu identisch (Die untere H4-Bande zeigt einen Laufartefakt).

Das abgebildete AU-Gel zeigt vier verschiedene Histon H4 Banden, von denen die untere unmodifizierte und die restlichen acetylierte Proteine repräsentieren. Zudem zeigt das Gel, anders als bei der SDS-PAGE, eine Auftrennung zwischen den Histonen H3a und H3b. Die Histone H2Bv3, H2AX und H1 konnten zwar identifiziert werden, zeigen aber kein besonderes Bandenmuster. Innerhalb der Entwicklung zeigen sich zudem keine Veränderungen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die dieser Auftrennung zugrundeliegenden Modifikationen im Durchschnitt der Population unverändert bleiben.

Schaut man sich allerdings die Chromatinstruktur mit Hilfe des H2Bv3-GFP Fusionsproteins an, gibt es starke Veränderungen im Zellkern. Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, entwickelt sich das relativ uniform verteilte Chromatin in eine stark strukturierte Form. Während in Interphase-Zellen nur die Konzentration in einem Punkt zu beobachten ist, zeigen sich in Sporen nun zahlreiche Verdichtungen über den gesamten Zellkern. Dies liegt allerdings nicht an der Ausbreitung von Heterochromatin, wie die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HcpB-GFP zeigt. Dort zeigt sich in Zellen wie in Sporen das gleiche Bild des in einem großen und einigen kleinen Punkten konzentrierten Heterochromatins.

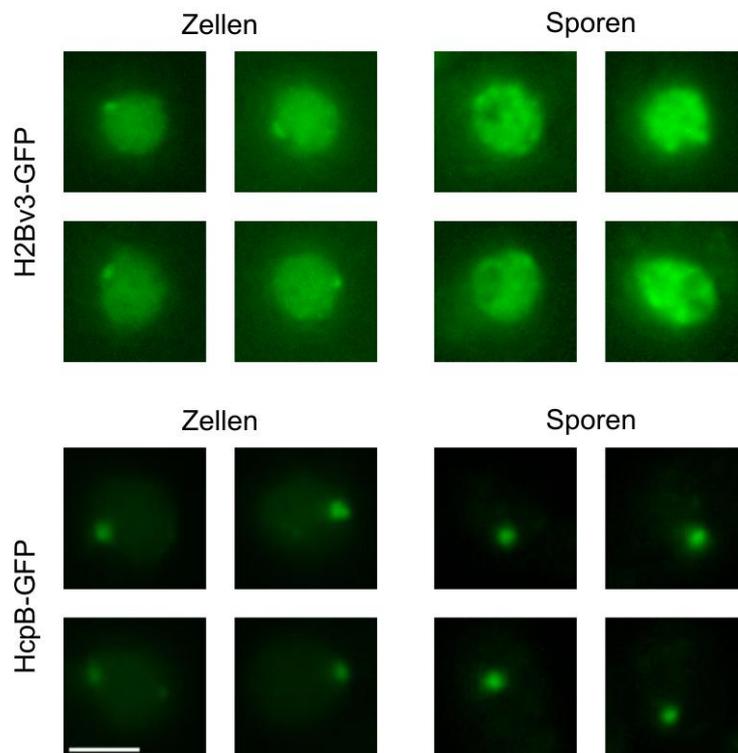


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender *Dictyostelium*-Zellen und Sporen. Anhand von Markerproteinen wie H2Bv3-GFP und HcpB-GFP lässt sich die Chromatinumformung während der Entwicklung nachvollziehen. Während das Heterochromatin (HcpB-GFP) in seiner Ausbreitung unverändert bleibt, zeigt das Histon H2Bv3 eine strukturierte Verteilung in den Sporen. Maßstab: 2,5 μ m.

Einen weiteren Hinweis auf die Umformung des Chromatins auf dem Weg zum Dauerstadium lieferte der Western Blot, der in Abbildung 40 gezeigt ist. Hierfür wurden *Dictyostelium discoideum* Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung gesammelt, Gesamtproteine isoliert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe eines Anti-H3K9me²-Antikörpers wurde im Western Blot nach einer Veränderung dieser Modifikation in der Entwicklung gesucht. Die Aussichten waren nicht besonders vielversprechend, da sich die Lokalisation von HcpB in der Entwicklung wie gezeigt nicht verändert. Da HcpB durch die Chromo-Domäne an methyliertem H3K9 bindet, lässt sich indirekt auf das Verhalten dieser Modifikation schließen. Der Western Blot zeigt auch keine schwächere oder stärkere Dimethylierung von H3K9 während der Entwicklung, deutlich aber zwei unterscheidbare Banden. Während die untere im Zeitraum von 0 bis 4 Stunden dominiert, ist ab 12 Stunden nur noch die obere sichtbar. Bei 8 Stunden sind beide Banden gleich stark ausgeprägt. Es ist somit wahrscheinlich, dass es während der Entwicklung zu einer weiteren Modifikation kommt, die das Molekulargewicht des bereits an Lysin 9 dimethylierten Histons H3 verändert.

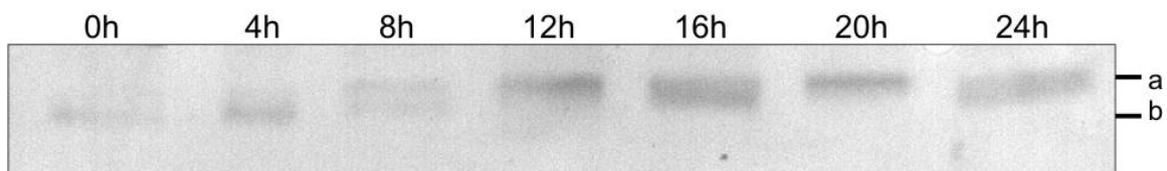


Abbildung 40: Western Blot mit Anti-H3K9me²-Antikörper auf zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung isolierten Gesamtproteinen. Deutlich sind die beiden elektrophoretischen Formen a und b erkennbar. Während Bande a von 0 bis 4 Stunden dominiert, sind bei 8 Stunden beide und danach nur noch die obere detektiert.

9.3 Posttranslationale Modifikationen von Heterochromatin-Proteinen

9.3.1 HcpB-Isoformen

Die Beschreibung einer elektrophoretischen Isoform des Proteins HcpB erfolgte bereits in meiner Diplomarbeit (Földesi, 2005). Der Grund für das unterschiedliche Laufverhalten in der SDS-PAGE konnte allerdings zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Phosphorylierungen, wie sie bereits bei Heterochromatin-Proteinen in verschiedenen Organismen beschrieben wurden (Eisenberg *et al.*, 1994; Minc *et al.*, 1999), konnten durch 2D-Gelelektrophoresen als Ursache ausgeschlossen werden. Außerdem kamen sowohl Degradationsprodukte als auch SDS-resistente Konformationen als Erklärung nicht in Frage.

Bei der Suche nach Chromatin-Komponenten, die eine Veränderung während der Entwicklung zeigen, wurden auch die Proteine HcpA und HcpB untersucht. Im Laufe von 24 Stunden wurden hierfür aus myc-HcpA bzw. myc-HcpB exprimierenden Zellen Gesamtproteine isoliert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels Anti-myc-Antikörper. Während bei HcpA keine Veränderung sichtbar war (nicht gezeigt), konnte bei HcpB eine Veränderung im Bandenmuster detektiert werden. Abbildung 41 zeigt schematisch das verwendete Fusionsprotein und den Western Blot. Während bis zum Zeitpunkt von 8 Stunden beide Mobilitätsformen sichtbar sind, verschwindet die untere Bande im weiteren Verlauf. Sollte es sich bei einer der beiden Formen um ein differentiell modifiziertes Protein handeln, könnte eine vollständige Entfernung oder Anbringung der Modifikation die Beobachtung erklären. Der Unterschied im Molekulargewicht konnte mit Hilfe einer Eichgeraden auf rund 2 kD eingegrenzt werden. Als Ursache dafür kommt beispielsweise eine Glykosylierung in Frage, die diese Mobilitätsveränderung auslösen könnte (Bolt *et al.*, 2005).

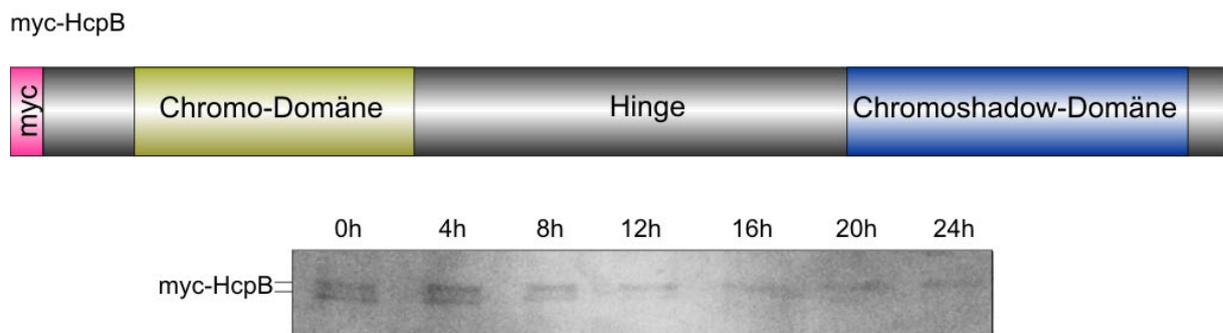


Abbildung 41: Schematische Darstellung des verwendeten Fusionsproteins (oben) und des Western Blots mit Proben aus der Entwicklung von *D. discoideum* (unten). Das N-terminale myc-Tag des Fusionsproteins wurde im Western Blot mit Anti-myc-Antikörper detektiert und zeigt zum Zeitpunkt 0h das Vorhandensein von zwei Mobilitätsformen. Ab etwa 8 Stunden verschwindet die untere der beiden Banden. Die obere Bande bleibt bis zur vollständigen Entwicklung nach 24h erhalten.

Obwohl eine Glykosylierung für dieses Protein ungewöhnlich wäre, da es sich weder um ein sekretorisches noch um ein Membranprotein handelt, wurde versucht, mögliche Modifikationsstellen zu identifizieren. Die Suche nach Zielsequenzen für N-Glykosylierungen erfolgte mit Hilfe des NetNGlyc-Programms (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). Hierdurch konnten zwei Sequenzen identifiziert werden, die beide dem für N-Glykosylierung benötigten N-X-T/S-Motiv entsprechen. Hierbei kann jede Aminosäure bis auf Prolin den Platz des X einnehmen. Wie Abbildung 42 zeigt, kommt eine der beiden Sequenzen nur in HcpB vor. Somit stellt sie den wahrscheinlicheren Ort der Modifikation dar, da die Mobilitätsveränderung in der SDS-PAGE nur bei HcpB, nicht aber bei HcpA beobachtet werden konnte.

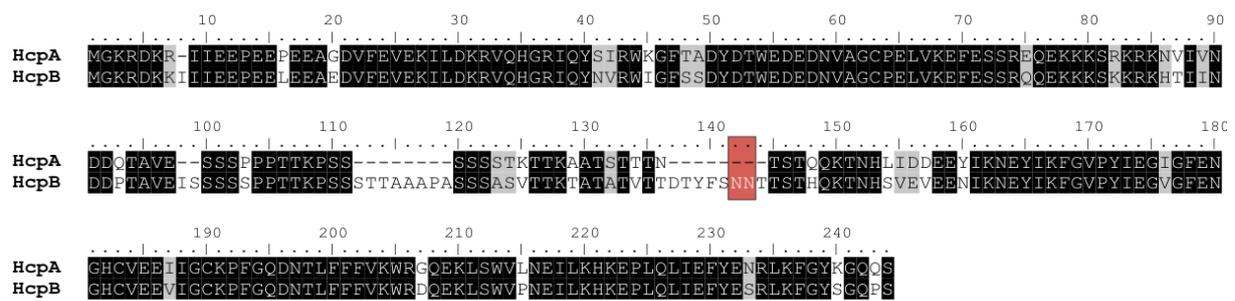


Abbildung 42: Alignment der Aminosäuresequenzen von HcpA und HcpB aus *Dictyostelium discoideum* mit ClustalW. Schwarze Bereiche zeigen identische und graue ähnliche Bereiche. Bei den rot eingefassten Aminosäuren handelt es sich um die als mögliche Glykosylierungsstellen identifizierte Asparagine. Diese kommen nur in HcpB, nicht jedoch in HcpA vor.

Um eine Mutationsanalyse durchzuführen, wurden die beiden benachbarten Asparagine mittels PCR-Mutagenese in Tyrosine umgewandelt. Dies sollte die Proteinfunktion weiterhin ermöglichen, aber eine Glykosylierung an diesen Stellen verhindern. Abbildung 43 zeigt schematisch das daraus hervorgegangene Konstrukt. Dieses wurde durch den Vektor pDneo2myc HcpB(N142/143Y) in *D. discoideum* transformiert und konnte anschließend mit dem unmutierten Fusionsprotein verglichen werden. Das Ergebnis des Western Blots mit Anti-myc-Antikörper auf beide Proteinvarianten ist in der gleichen Abbildung zu sehen. In der Tat verschwindet durch die mutierten Aminosäuren die Doppelbande von HcpB. Der direkte Nachweis einer Glykosylierung konnte jedoch bislang nicht erbracht werden.

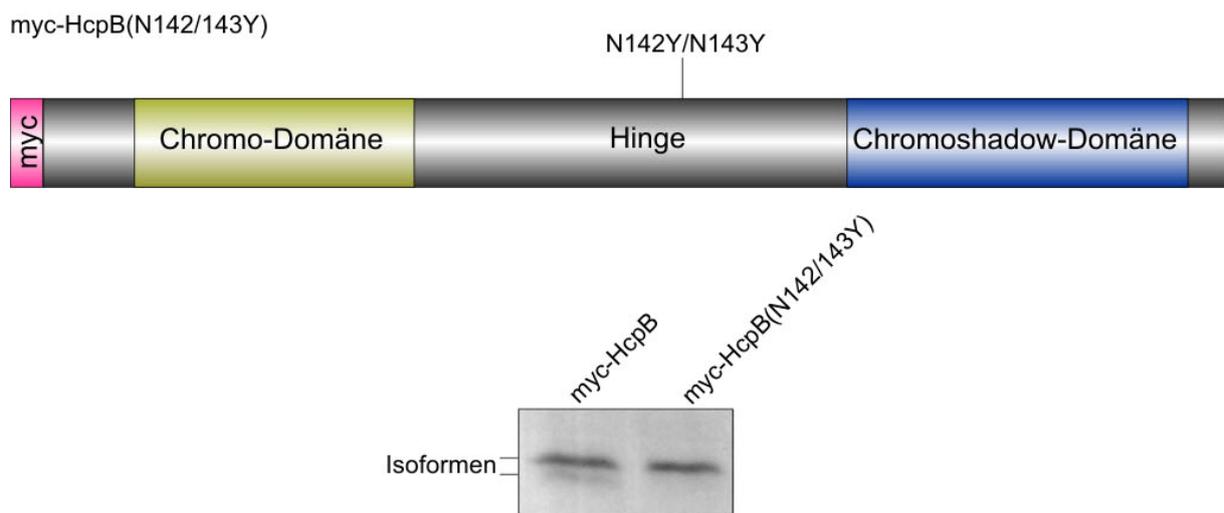


Abbildung 43: Schematische Darstellung des mutierten Fusionsproteins myc-HcpB(N142/143Y) und des vergleichenden Western Blots mit Anti-myc-Antikörper. Das Verschwinden der Doppelbande im mutierten Protein zeigt, dass zumindest eines der beiden Asparagine an dieser Beobachtung beteiligt sind.

9.3.2 Massenspektrometrische Untersuchungen der HP1-Proteine

Ausgangspunkt für die Untersuchung posttranslationaler Modifikationen von Heterochromatin-Proteinen waren Proteinaufreinigungen. Diese wurden durchgeführt, um mögliche HP1 enthaltende Komplexe zu isolieren. Die Bindung von Effektorproteinen an HP1 über deren Chromo-shadow-Domäne konnte bereits mehrfach belegt werden (Cammass *et al.*, 2002; Lechner *et al.*, 2005; Honda und Selker, 2008). Um mögliche Interaktionspartner der HP1-Proteine HcpA und HcpB aus *Dictyostelium discoideum* zu isolieren, wurden Tandem-Affinitäts-Aufreinigungen (TAP) sowie Aufreinigungen mit dem Nanotrap durchgeführt (Rigaut *et al.*, 1999; Rothbauer *et al.*, 2008). Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung basiert auf der Bindung des mit dem Zielprotein verbundenen Proteins A an IgG. Durch Abspalten des Zielproteins mit Hilfe der sequenzspezifischen TEV-Protease können Komplexe unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. Der fakultative zweite Aufreinigungsschritt über das Calmodulin-bindende Peptid wurde nach den ersten Vorexperimenten aufgegeben, da ansonsten zu viel Zielprotein verloren ging (nicht gezeigt). Für die Aufreinigungen wurden von HcpA, HcpB und der in der RNA-Interferenz involvierten Helikase Helf verschiedene Fusionsproteine erstellt.

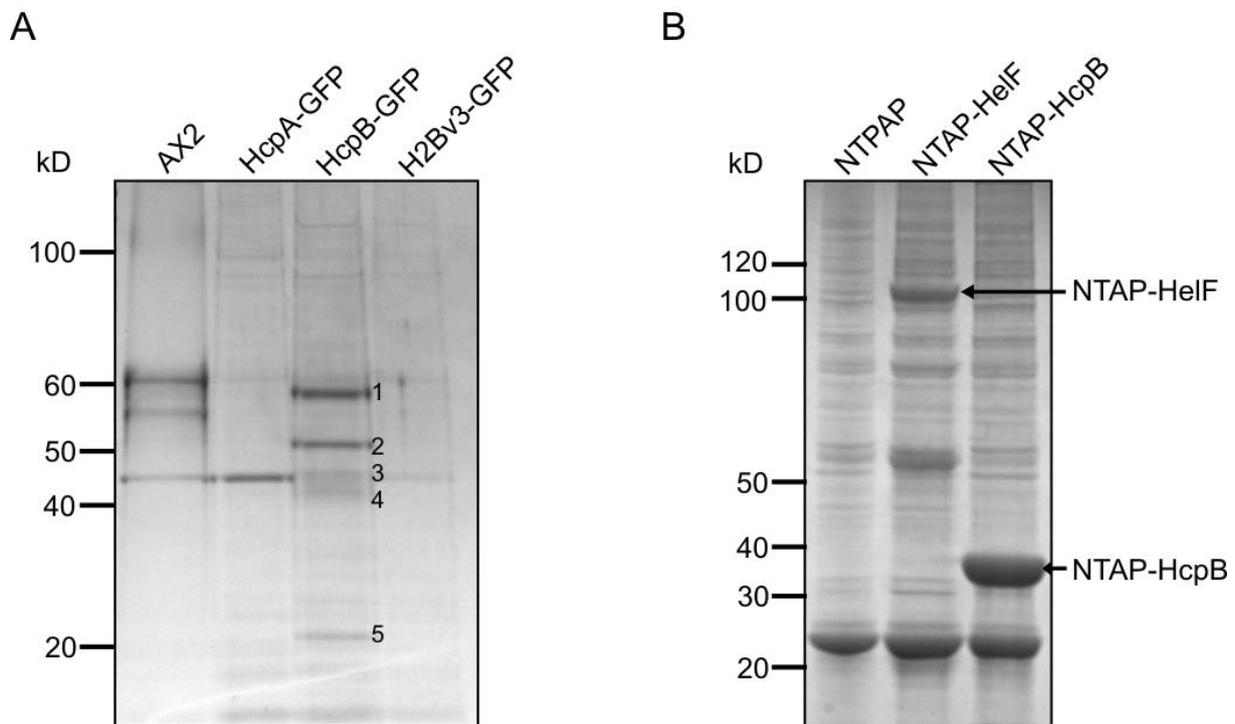


Abbildung 44: Coomassiegefärbte SDS-PAGE von durch Nanotrap (A) oder TAP-Aufreinigung (B) gewonnenen Proteinen. A) Von den auf dem 12 % SDS-PAA Gel aufgetrennten Proteinen wurden die sechs markierten Banden durch Massenspektrometrie bestimmt. Bei Bande 1 handelt es sich um das Zielprotein HcpB-GFP. B) Auf dem 4-12 % Bis-Tris-Gel konnten die NTAP-markierten Proteine Helf und HcpB aufgereinigt und durch Massenspektrometrie bestimmt werden.

Die C-terminalen TAP-Fusionen der HP1-Proteine enthielten zusätzlich GFP und zeigten in der mikroskopischen Begutachtung die erwartete Lokalisation, ergaben in der Aufreinigung aber nur geringe Ausbeuten (nicht gezeigt). Für diesen Zweck kamen N-terminale Fusionen zum Einsatz. Die besten Ergebnisse konnten mit den Vektoren pDV-NTAP HcpB und pDV-NTAP HelF erzielt werden. Das Ergebnis einer Aufreinigung aus jeweils 1×10^9 Zellen ist in Abbildung 44B zu sehen. Obwohl dabei große Mengen NTAP-HcpB isoliert wurden, zeigt das Gel keine zusätzlichen Proteinbanden im Vergleich zur Kontrolle (NTAP). Lediglich bei NTAP-HelF sind weitere Banden in der Elution vorhanden. Die Auswertung durch Massenspektrometrie zeigte allerdings, dass es sich dabei wahrscheinlich um Kontaminationen handelt (nicht gezeigt).

Da die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurden erneute Versuche mit Hilfe des Nanotrap durchgeführt. Die Aufreinigung mit dem Nanotrap erfolgt durch Bindung des GFP-markierten Zielproteins an das GFP-bindende Protein (GBP). Hierfür wurden mit pDd-HcpA-GFP, pDd-HcpB-GFP und pDd-H2Bv3-GFP transformierte Zellen verwendet. Abbildung 44A zeigt das coomassiegefärbte Gel mit den Elutionsfraktionen einer Aufreinigung aus jeweils 1×10^9 Zellen. Während in den Spuren von HcpA-GFP und H2Bv3-GFP nicht die erwarteten Banden zu erkennen sind, zeigt HcpB-GFP eine Bande in der Größe des Fusionsproteins. Zudem sind im Vergleich zur Kontrolle (AX2) vier weitere Banden zu erkennen. Um zu klären, ob es sich dabei um Interaktionspartner handeln könnte, wurden die Banden ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie untersucht. Tabelle 28 zeigt die identifizierten Proteine, deren berechnetes Molekulargewicht und den Protein-Score. Bei der ersten Bande handelt es sich um das Zielprotein HcpB-GFP. Die weiteren Banden stellen zumeist Aktin-Proteine dar. Da diese praktisch bei jeder Aufreinigung unabhängig von den verwendeten Zielproteinen gefunden wurden, handelt es sich dabei höchstwahrscheinlich um Kontaminanten.

Tabelle 28: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Proteinbanden aus Abbildung 44. Mit beiden Aufreinigungsverfahren konnte HcpB, allerdings keine Interaktionspartner isoliert werden. A1-A5: Banden aus der Aufreinigung mit dem Nanotrap (Abbildung 44A). B1, B2: Proteine aus der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (Abbildung 44B).

Bande	Protein	MW	Protein-Score
A1	HcpB-GFP	54,8 kD	307
A2	Actin-15 (Actin A8)	41,6 kD	206
A3	Actin-15 (Actin A8)	41,6 kD	278
A4	Actin, chain A	40,8 kD	113
A5	Ribosomal protein L12	17,8 kD	103
B1	NTAP-HELf	115,6 kD	2602
B2	NTAP-HcpB	48,1 kD	675

Obwohl die Ergebnisse aus den Proteinaufreinigungen keine potentiellen Interaktionspartner hervorbrachten, lieferten sie dennoch Datensätze zur weiteren Verwendung. Mit Hilfe des durch die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung stark konzentrierten HcpB-Proben konnte eine Modifikationsanalyse durchgeführt werden. Tabelle 29 zeigt die für die Recherche ausgewählten posttranslationalen Modifikationen. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung des aufgereinigten Proteins unter Einbeziehung dieser variablen Modifikationen konnte für HcpB eine Peptidabdeckung von 77 % erreicht werden. Abbildung 45 zeigt die Lage der gefundenen Peptide auf der Sequenz von HcpB.

Die Suche nach posttranslationalen Modifikationen ergab zwei Treffer. Zum einen konnte eine Lysin-Dimethylierung und zum anderen eine Lysin-Acetylierung gefunden werden. Die korrespondierenden Peptide wurden zudem auch unmodifiziert gefunden und erlauben so einen direkten Vergleich der Massenverhältnisse. Tabelle 30 zeigt die entscheidenden Messdaten für die modifizierten Peptide sowie deren unmodifizierte Gegenstücke. Die K7-Dimethylierung wie auch die Acetylierung von Lysin 222 sind durch die sehr hohen Ion Scores von 83 bzw. 51 gestützt, wobei wiederum nur Modifikationen gezählt wurden, die die Grenze von 20 überschritten. Abbildung 46 zeigt eine grafische Darstellung der Lokalisation der Modifikationen im Hinblick auf die Domänenarchitektur von HcpB.

Tabelle 29: Übersicht über die für HcpB untersuchten Massenveränderungen zur Identifikation posttranslationaler Modifikationen. Quelle: www.unimod.org.

Modifikation	Masse (monoisotopisch)	Masse (durchschnittlich)	Aminosäuren	Neutralverlust
Acetylierung	42.010565	42.0367	K	-
Phosphorylierung	79.966331	79.9799	S,T	97.976896
Methylierung	14.015650	14.0266	K,R	-
di-Methylierung	28.031300	28.0532	K,R	-
tri-Methylierung	42.046950	42.0797	K	-

```

1  MGKRDKKIII EEPPELEEA E DVFEVEKILD KRVQHGRIQY NVRWIGFSSD YDTWEDEDNV
51  AGCPPELVKEF ESSRQQEKKK SKKRKHTIIN DDPTAVEISS SSSPPTTKPS SSTTAAAPAS
101 SSASVTTKTA TATVTTDTYF SNNTTSTHQQ TNHSVEVEEN IKNEYIKFGV PYIEGVGFEN
151 GHCVEEVIGC KPFGQDNTLF FFVKWRDQEK LSWVPNEILK HKEPLQLIEF YESRLKFGYS
201 GQPS

```

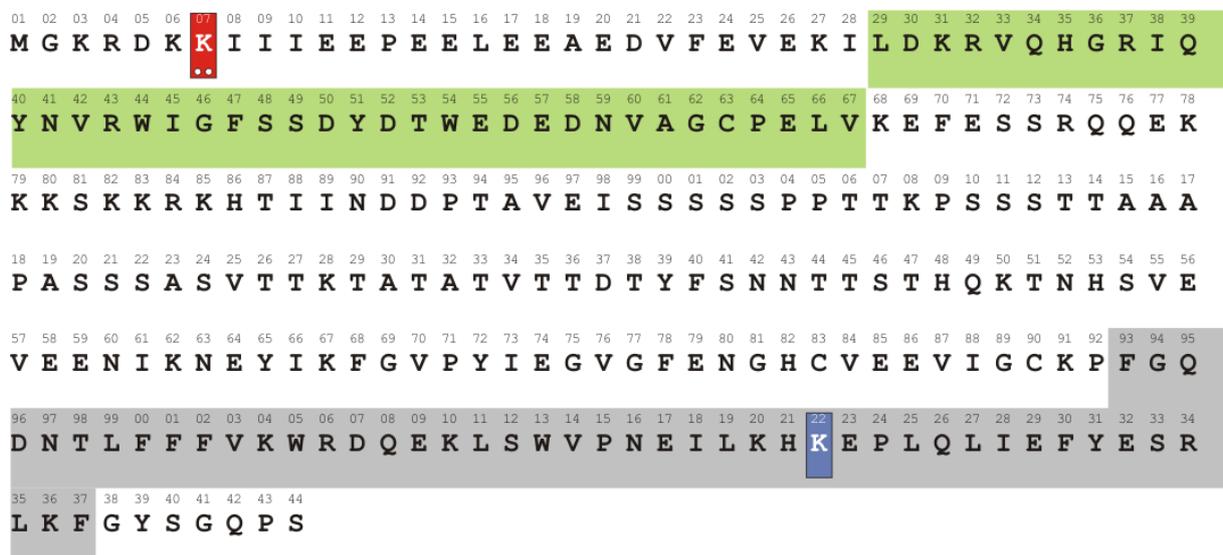
Abbildung 45: Lage der durch Massenspektrometrie identifizierten Peptide (rot) auf der Aminosäuresequenz von HcpB. Insgesamt konnte eine Abdeckung von 77 % erreicht werden.

Tabelle 30: Überblick über die für HcpB durch Massenspektroskopie gefundenen modifizierten Peptide und deren unmodifizierte Gegenstücke. Daneben sind deren Sequenzen, berechnete und bestimmte Massen, die Anzahl an Fehlsplaltungen und die Ion-Scores aufgeführt.

Sequenz	Mr(gemessen)	Mr(berechnet)	Δ	Miss	Score
KIIIEEPEEELEEAEDVFEVEK	2516.14	2516.24	-0.10	1	64
Kme ² IIIEEPEEELEEAEDVFEVEK	2543.96	2544.27	-0.31	1	83
HKEPLQLIEFYESR	1788.05	1787.92	0.13	1	80
HKacEPLQLIEFYESR	1829.57	1829.93	-0.36	1	51

Die Abbildung zeigt, dass sich die K7-Dimethylierung nahe dem N-Terminus und damit vor der Chromo-Domäne von HcpB befindet. Die Chromo-Domäne dient den HP1-Proteinen als Adapter, um selbst eine Modifikation, die Methylierung von H3K9, zu binden (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Die Acetylierung von K222 hingegen befindet sich innerhalb einer weiteren Protein-Protein Interaktionsdomäne. Die eng mit der Chromo-Domäne verwandte Chromoshadow-Domäne ist neben der Interaktion mit anderen Proteinpartnern auch für das Dimerisierungsverhalten der HP1-Proteine in *Dictyostelium discoideum* verantwortlich (Földesi, 2005; Kaller *et al.*, 2007).

HcpB



■ = Methylierung

■ = Chromo-Domäne

■ = Acetylierung

■ = Chromoshadow-Domäne

Abbildung 46: Grafische Darstellung der für HcpB gefundenen posttranslationalen Modifikationen. Die Dimethylierung von K5 liegt vor der grün unterlegten Chromo-Domäne, die für die H3K9-Bindung verantwortlich ist. Die Acetylierung von K222 befindet sich innerhalb der grau unterlegten Chromoshadow-Domäne. Diese ist für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich.

9.3.3 Untersuchung der HP1-Acetylierung

Die beiden Modifikationen, die bei der massenspektrometrischen Untersuchung von HcpB gefunden wurden, stellen interessante Untersuchungsobjekte dar. Das liegt vor allem daran, dass zwar das Vorhandensein eines durch HP1 verschlüsselten Subcodes propagiert wurde (Lomberk *et al.*, 2006a), die funktionell beschriebenen Modifikationen diesem Anspruch allerdings bislang nicht gerecht werden.

Um die Funktion der beobachteten HP1-Modifikationen aufzuklären, wurden folgende Vorüberlegungen angestellt. Es war durch Vorexperimente bekannt, dass die beiden *Dictyostelium* HP1-Homologe weitestgehend redundante Funktionen übernehmen (Kaller *et al.*, 2006). Während sich zudem die Herstellung eines Doppelknockouts als nicht möglich erwies, konnte durch Überexpression einer der beiden Isoformen der letale Phänotyp gerettet werden (Kaller *et al.*, 2007). Daher wurde von folgenden Annahmen ausgegangen: Zum einen sollte die Modifikation in beiden Proteinen prinzipiell möglich sein, da sonst wie bei den Einzelknockouts kein spezifischer Effekt zu erwarten wäre. Des Weiteren sollte ein Fehlen der Modifikation einen signifikanten Effekt zeigen.

Ein Sequenzvergleich ergab, dass die beobachtete Dimethylierung von K7 aufgrund von Unterschieden am N-Terminus der beiden Proteine nur in HcpB vorkommen kann. Nur in dieser Form befindet sich in diesem Bereich ein entsprechendes Lysin. Zudem ist der Sequenzkontext in diesem Bereich nur schlecht konserviert (nicht gezeigt). Der Knockout von HcpB zeigt somit bereits den maximalen Effekt, den diese Modifikation ausüben könnte. Die Chromoshadow-Domäne hingegen ist hochkonserviert und zeigt nur minimale Unterschiede. Das in HcpB acetylierte Lysin 222 ist im gleichen Sequenzumfeld auch in HcpA vorhanden (K203) und stellt somit auch hier ein potentiell Modifikationsziel dar (Abbildung 47). Gemäß den Vorüberlegungen sollte eine Mutation von HcpA(K203) im Doppelknockout den gleichen Effekt haben wie eine Mutation von HcpB(K222). Würde diese Mutation keinen signifikanten Phänotyp hervorrufen, kann die Modifikation keinen entscheidenden Einfluss auf den Organismus haben.

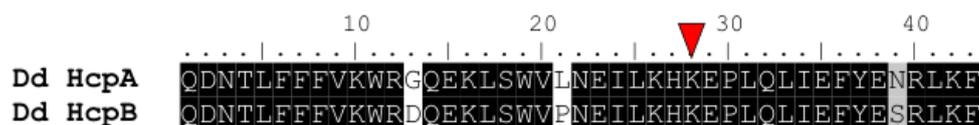


Abbildung 47: *Alignment* der Chromoshadow-Domänen von HcpA und HcpB aus *Dictyostelium discoideum*. Die Lage des acetylierten K222 aus HcpB ist durch den roten Pfeil markiert. Identische Aminosäuren der beiden Proteine sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Die Chromoshadow-Domänen beider Proteine sind hochkonserviert und weitestgehend identisch.

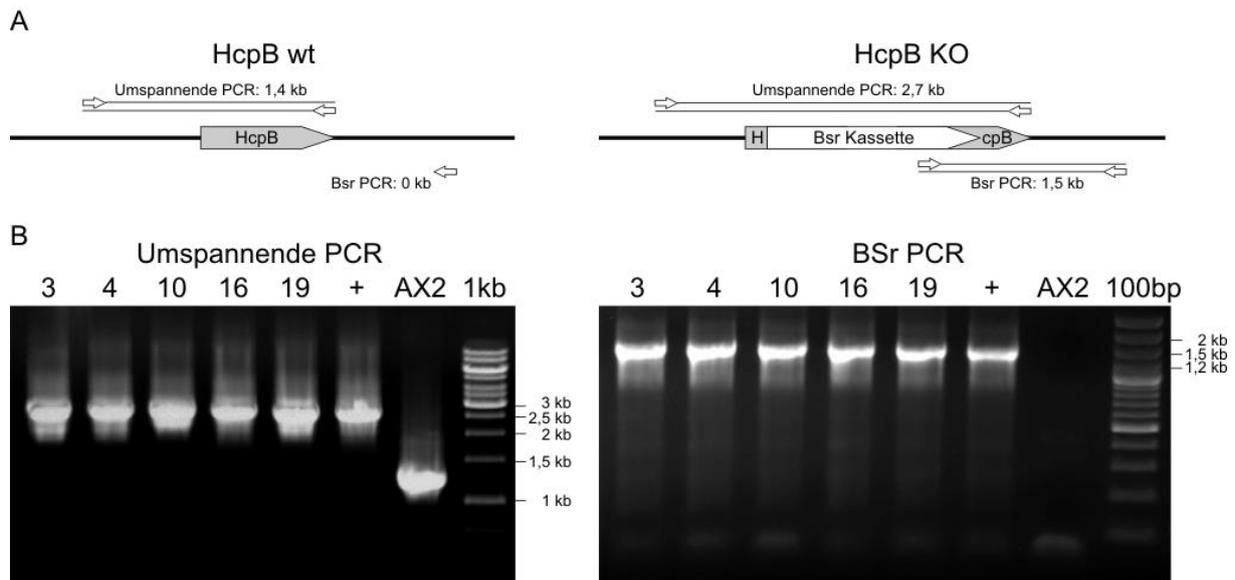


Abbildung 48: Verifizierung der Knockouts von HcpB im HcpA^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Hintergrund durch PCR. A) Schematische Darstellung der genomischen Sequenzen vor und nach dem Knockout sowie der Primerbindestellen und der resultierenden Fragmentgrößen. B) Agarosegele mit den durch die PCRs verifizierten Doppelknockouts. Als Positiv-Kontrolle kam HcpAB^{KO}-HcpA-GFP zum Einsatz. Die umspannende PCR zeigt durch die Fragmentgröße von 2,7 kb eine Größenveränderung des HcpB-Gens an, während die BSr-PCR die Integration der BSr-Kassette anzeigt.

Um dies zu untersuchen, wurde das Plasmid pDd-HcpA(K203R)-GFP hergestellt, bei dem das für Lysin 203 kodierende Basentriplett in ein für Arginin kodierendes umgewandelt wurde, um die Acetylierung zu verhindern. Es folgte die Transformation in den Knockout-Stamm HcpA^{KO} und die Subklonierung der HcpA(K203R)-GFP exprimierenden Zellen. Anschließend wurde das mit *Bpi* I verdaute Knockout-Plasmid pGEM7z-HcpB-KO transformiert und nach einer erneuten Subklonierung Klone durch PCRs auf die Integration des Konstruktes in das HcpB-Gen untersucht. Von 134 getesteten Klonen konnte für fünf ein Knockout festgestellt werden (Abbildung 48). Diese Frequenz ist mit 5 % deutlich geringer als im Stamm mit unmutiertem HcpA-GFP (50 %, siehe Tabelle 31). Dies deutet bereits auf einen negativen Effekt der HcpA(K203R)-Mutation hin. Durch langsames Wachstum könnten Zellen mit falscher Integration des Konstruktes die echten Knockouts überwachsen.

Tabelle 31: Knockout-Frequenz des HcpB-Gens in verschiedenen *Dictyostelium*-Stämmen. Deutlich ist zu erkennen, dass die Frequenz im HcpA^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Hintergrund deutlich niedriger ist als im Stamm mit unmutiertem HcpA-GFP. *(Kaller et al., 2007).

Stamm	positive Klone/ Klone getestet	Knock-out Frequenz
AX2	28/42*	67 %
HcpA ^{KO}	0/292*	0 %
HcpA ^{KO} -HcpA-GFP	20/40*	50 %
HcpA ^{KO} -HcpA(K203R)-GFP	5/134	7 %

9.3.4 Phänotyp der HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-Mutante

Die geringe Effizienz des Doppelknockouts deutete bereits auf einen negativen Einfluss des Aminosäureaustausches hin. Die Untersuchung der Verdopplungszeit der verschiedenen Stämme anhand von Wachstumskurven bestätigten diesen Verdacht. Wie in dem Diagramm in Abbildung 49 deutlich zu erkennen ist, verhalten sich Wildtyp (AX2), die Überexpressionsmutante HcpA(K203R), die gleiche Mutante im HcpA-Knockout sowie der Stamm mit unmutiertem HcpA im Doppelknockout gleich. Diese Stämme zeigen eine für *Dictyostelium discoideum* AX2 unter den gewählten Bedingungen typische Verdopplungszeit von 9,5 Stunden. Die Überexpression des Proteins HcpA(K203R)-GFP im Doppelknockout von HcpA und HcpB hingegen führt zu einem verzögerten Wachstum und einer Verdopplungszeit von rund 16 Stunden. Da dieser Effekt erst dann auftritt, wenn die beiden endogenen HP1-Homologe ausgeschaltet wurden, scheint diese Mutation rezessiv und durch unmutiertes Protein kompensiert werden zu können.

Um die Ursache für das langsamere Wachstum zu ergründen, wurde die Lokalisation des mutierten, überexprimierten Proteins mikroskopisch überprüft. Dazu wurden zunächst lebende Zellen und Sporen der Stämme HcpAB^{KO}-HcpA-GFP und HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP untersucht.

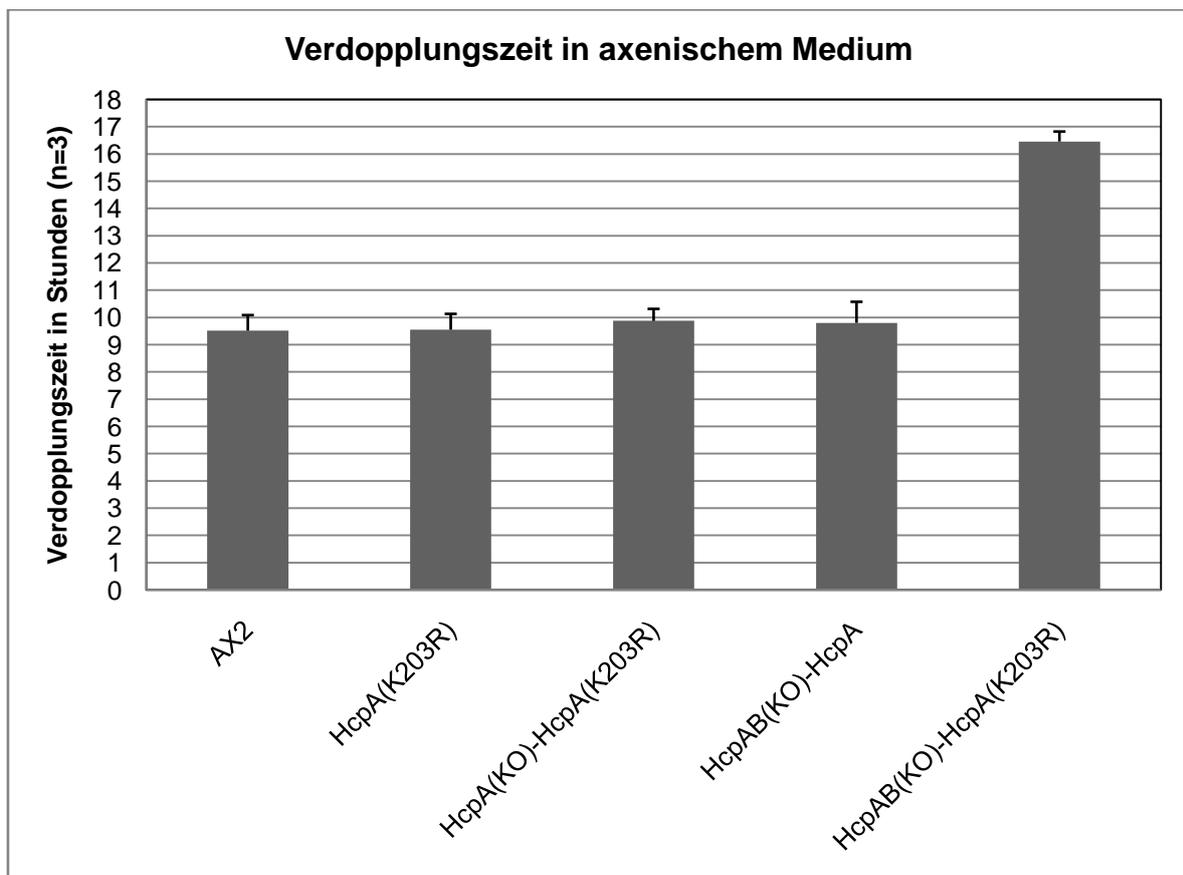


Abbildung 49: Diagramm der Verdopplungszeit verschiedener *Dictyostelium*-Stämme in axenischem Medium. Deutlich zu erkennen ist das verzögerte Wachstum der Mutante HcpA(K203R) im Doppel- nicht jedoch im Einzelknockout und in der unmutierten Form. Versuche: n=3. Fehlerbalken: Standardabweichung (SD).

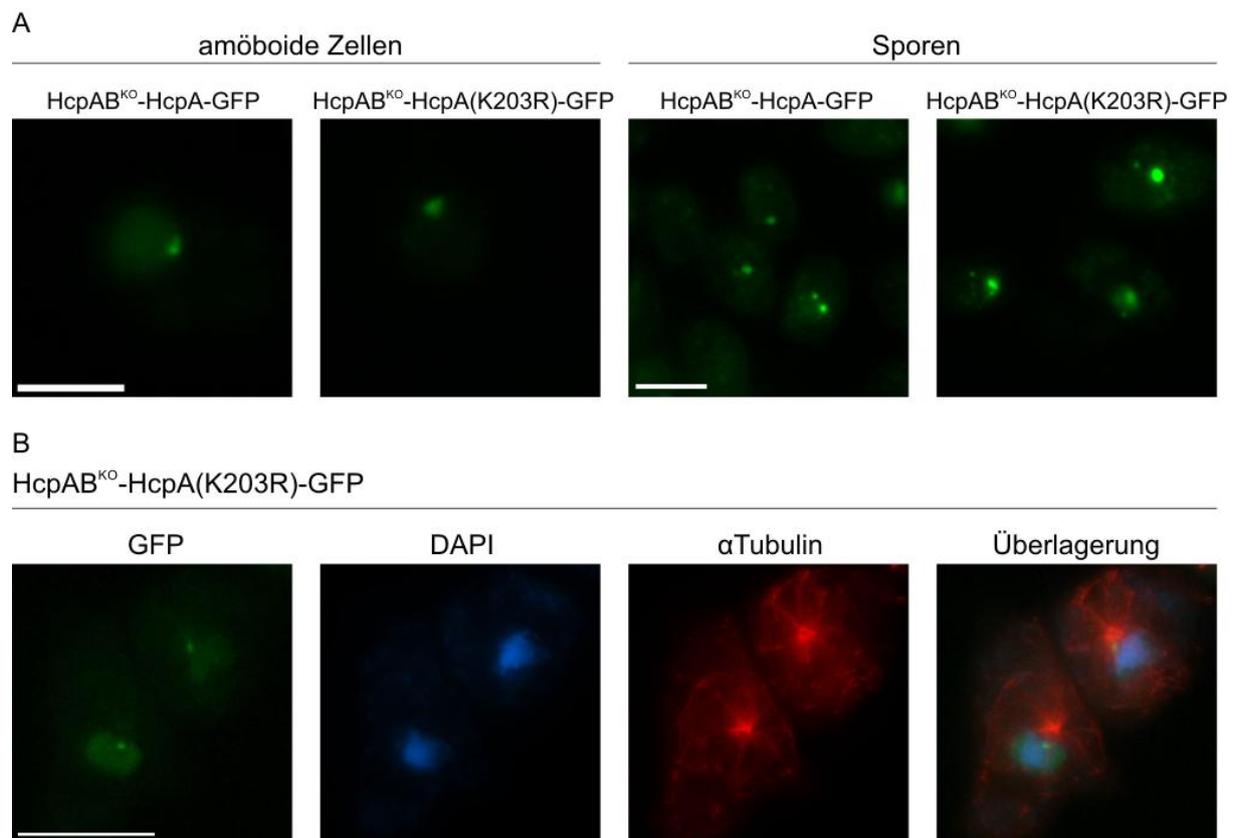


Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A) lebenden Zellen und Sporen und B) fixierten HcpA-GFP oder HcpA(K203R)-GFP exprimierenden Doppelknockout-Zellen. A) die Lokalisation des mutierten und unmutierten Fusionsproteins ist in beiden Zelltypen identisch. Maßstab 5 μ m. B) Die Immunfärbung mit Anti- α Tubulin-Antikörper zeigt den Zusammenhang zwischen der Lage des HcpA(K203R)-GFP Punkts und der Lage des Centrosoms in Interphase-Zellen. Die DNA ist zum Vergleich mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab: 10 μ m.

Die mikroskopischen Aufnahmen dieses Versuches sind in Abbildung 50A zu sehen. In beiden Zelltypen sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Stämmen zu erkennen. Beide Proteine sind in Zellen und Sporen in einem großen und wenigen kleinen Punkten in der Kernperipherie konzentriert. Um die Lage des großen Punkts in Bezug auf das Centrosom zu untersuchen, wurden zudem Immunfärbungen mit Anti- α Tubulin und daran bindendem Cy3-gekoppeltem zweiten Antikörper hergestellt. Die in Abbildung 50B dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich, dass Centrosom und HcpA(K203R)-GFP in einander zugewandten Positionen lokalisieren. Damit unterscheidet sie sich nicht von der bereits gezeigten Lage des unmutierten Proteins im Doppelknockout (Kaller *et al.*, 2007). Die Lokalisation des Proteins wird somit durch die Mutation und dem daraus resultierenden Fehlen einer möglichen Acetylierung nicht verändert.

Eine Besonderheit des Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* ist sicherlich die Fähigkeit der Amöben zur Herausbildung multizellulärer Aggregate. Dies verlangt eine komplexe Veränderung der Genexpression. In diesem Versuch sollte darum der Einfluss der Mutation auf die Entwicklung des Organismus untersucht werden. Hierfür wurden Wildtyp (AX2), HcpAB^{KO}-HcpA-GFP

und HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Zellen auf mit *Klebsiella aerogenes* bewachsenen SM-Platten ausplattiert. Nachdem die bakterielle Nahrungsgrundlage aufgebraucht ist, leiten die Zellen den Entwicklungszyklus ein. Die Begutachtung der entstandenen Fruchtkörper fand mit Hilfe eines Binokulars statt und ist in Abbildung 51 gezeigt. Besonders in der vergrößerten Darstellung ist zu erkennen, dass die Fruchtkörper des Stammes HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP wesentlich kleiner sind als die des unmutierten Überexpressionsstammes und des Wildtyps.

Nach der Untersuchung der Fruchtkörper wurden auch die Sporen begutachtet. Es sollte dabei geprüft werden, ob diese selbst unterschiedliche Größen aufweisen. Dazu wurden verschiedene Stämme auf Phosphatagar-Platten ohne Nahrungsgrundlage ausplattiert und die Sporen nach 24 Stunden abgeerntet. Um die Sporen besser mikroskopieren zu können, wurde die zellulosehaltige Zellwand der Sporen mit Calcofluor angefärbt. Die Begutachtung fand unter dem Fluoreszenzmikroskop statt und ist in Abbildung 52 beispielhaft dargestellt. Die Sporen der dort gezeigten Stämme zeigen bis auf HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP alle die typische, symmetrische Form. Einzig bei der Mutante sind die Sporen deutlich verlängert und zudem bohnenförmig gekrümmt. Eine genaue Größenmessung von jeweils 100 Sporen mit Hilfe der Software ImageJ ergab, dass die typischen Sporen im Mittel 7,5 µm lang sind. Die des Stammes HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP zeigen eine Größe von rund 11 µm (Abbildung 53).

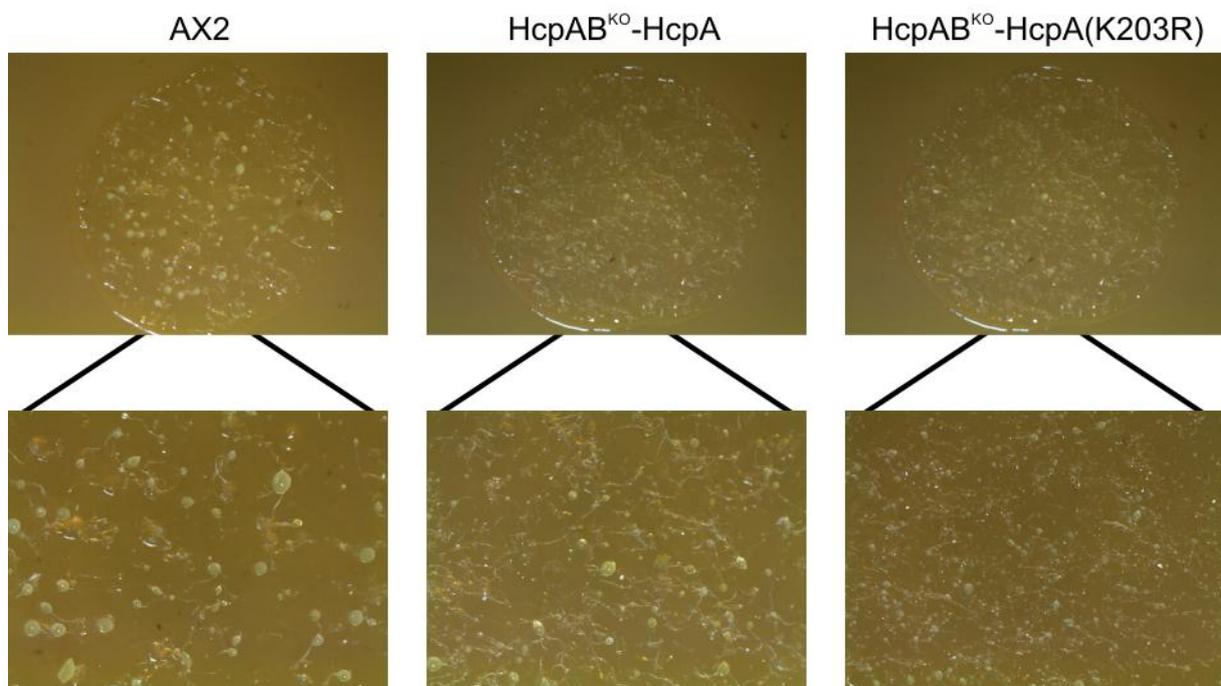


Abbildung 51: Vergrößerte Aufnahmen von fertig entwickelten Zellen des Wildtyps (AX2) und der Stämme HcpAB^{KO}-HcpA-GFP sowie HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP. Die Entwicklung erfolgte aufgrund von einsetzendem Nahrungsmangel auf mit *Klebsiella aerogenes* bewachsenen SM-Platten. Besonders in der Ausschnittsvergrößerung in der zweiten Bildzeile sind die verkleinerten Fruchtkörper der HcpA(K203R)-Mutante zu erkennen.

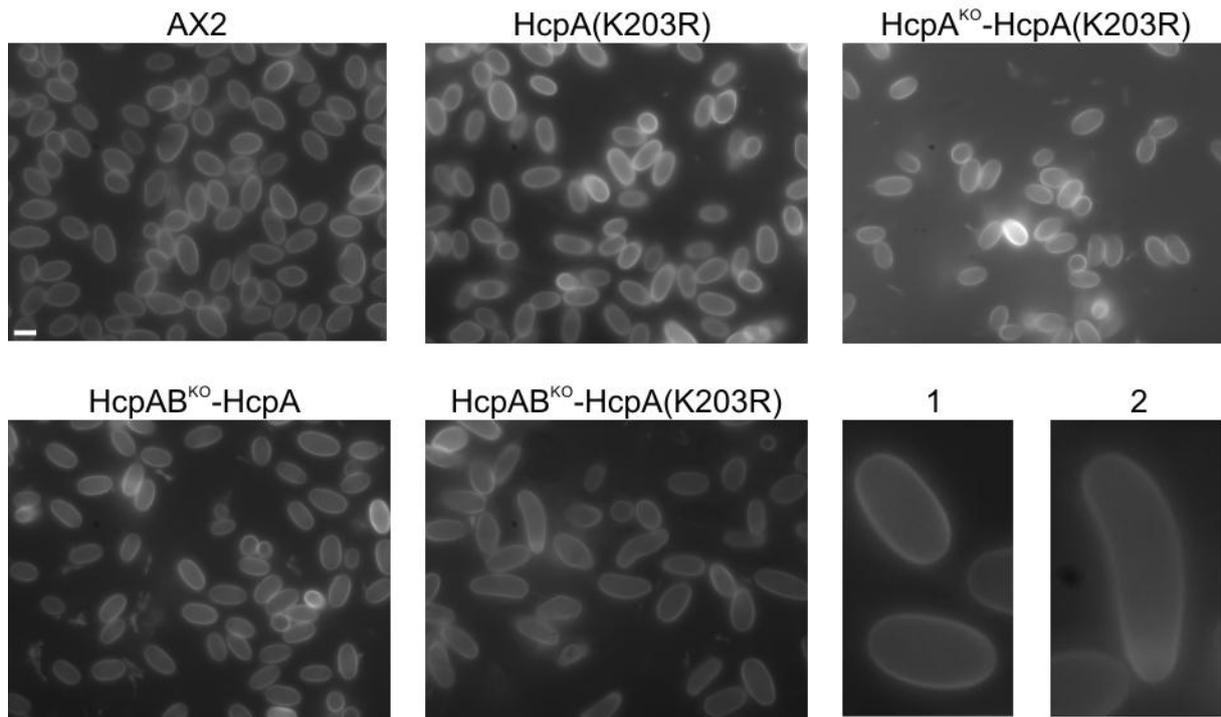


Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit Calcofluor angefärbten Sporen verschiedener *Dictyostelium*-Zelllinien. Während die Sporen von AX2-Zellen sowie der meisten anderen Überexpressionsstämmen die typische, symmetrische Form zeigen, sind die des Stammes HcpAB^{KO}-HcpA(K203R) bohnenförmig. Maßstab: 5 µm.

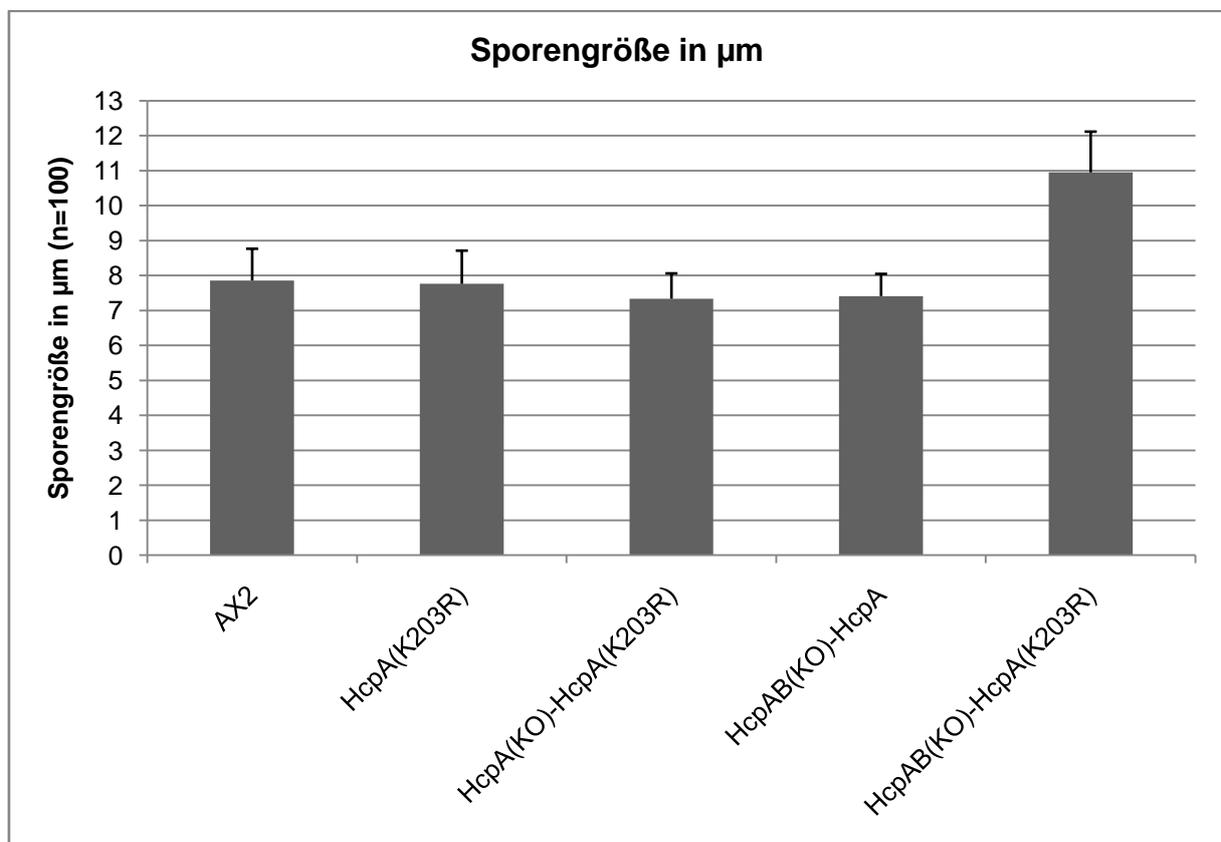


Abbildung 53: Diagramm zur Sporengröße untersuchter *Dictyostelium*-Stämme. Während die Sporen von AX2, dem HcpA-GFP Überexprimierer im HP1-Doppelknockout sowie den HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Vorläufern eine Größe von 7,5 µm aufweisen, sind diese in der HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Mutante deutlich vergrößert (n=100).

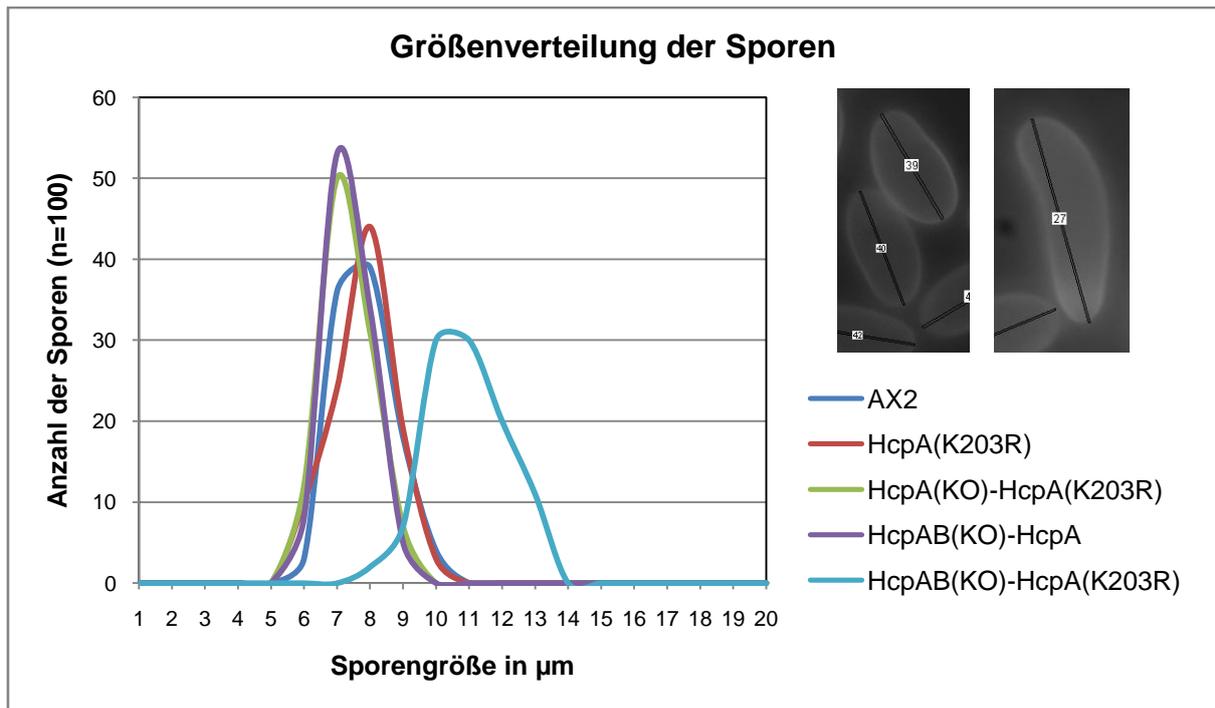


Abbildung 54: Diagramm der Größenverteilung von jeweils 100 gemessenen Sporen. Das Vorhandensein nur eines Peaks innerhalb jeder Messreihe zeigt, dass die einzelnen Zelllinien eine homogene Sporengröße hervorbringen. Dabei liegt die Verteilung bei den normalförmigen Vertretern zwischen 5 und 11 μm . Im Stamm HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP verteilt sich die Sporengröße hingegen auf 7 bis 14 μm .

Ausgehend von dem Vorexperiment war es wichtig zu erfahren, ob die beobachteten Sporengrößen innerhalb der Populationen homogen sind. Dabei interessierte vor allem inwieweit im Stamm HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Sporen der Wildtypgröße vorkommen. Eine heterogene Verteilung würde somit auf einen nicht stabilen Phänotyp schließen lassen, bei dem der beobachtete Effekt sporadisch auftritt. Eine entsprechende Auswertung der Messwerte ergab das in Abbildung 54 dargestellte Diagramm. Dort ist klar ersichtlich, dass sich die Sporengrößen innerhalb der Normalverteilungen befinden und homogen sind.

Die Beobachtung von in diesem Maße veränderten *Dictyostelium*-Sporen ist nicht neu. Eine solche Auffälligkeit wurde bereits vor geraumer Zeit im Zusammenhang mit diploiden Zelllinien gemacht (Cotter und Hohl, 1969). Allerdings zeigten die diploiden Zellen keine Besonderheiten im Wachstum sowie in der Entwicklung. Um den Ploidiegrad der hier untersuchten Zelllinien zu vergleichen, wurden Metaphase-Chromosomenspreads angefertigt. Diese erlauben durch einfaches Auszählen eine schnelle Aussage, ob es sich um den normalen, haploiden oder um einen diploiden Chromosomensatz handelt (King und Insall, 2003). Abbildung 55 zeigt entsprechende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Deutlich sind auf diesen Bildern in den AX2 sowie den HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Zellen sieben chromosomenartige Strukturen zu erkennen. *Dictyostelium discoideum* besitzt allerdings nur sechs Kopplungsgruppen (Cox *et al.*, 1990; Kuspa *et al.*, 1992; Loomis *et al.*, 1995). Bei der anderen Struktur handelt es sich nach allgemeiner Auffassung

um das ebenfalls kondensierte ribosomale DNA-Palindrom (Sugang *et al.*, 2003; Insall, 2005). Die sieben chromosomenartigen Strukturen zeigen, dass es sich bei der HcpA-Mutante wie beim Wildtyp um einen haploiden Stamm handelt.

Weitere mikroskopische Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob der Wachstumsphänotyp von HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP Zellen eine Folge von Auffälligkeiten während der Mitose ist. Wie bekannt ist, kann eine Fehlregulierung des HP1-Levels zu so genannten Anaphase-Brücken führen (Fanti *et al.*, 1998; Kaller *et al.*, 2006). Dabei kommt es einer fehlenden oder verzögerten Aufteilung einiger Chromosomen während der Anaphase. Dies lässt sich einfach mit Hilfe immungefärbter Präparate mikroskopisch belegen. Aufgrund des stark ausgeprägten Wachstumsdefizits der hier charakterisierten HP1-Mutante, sollte dieser Fehler bei nahezu jeder Mitose zu beobachten sein. Die Analyse mittels DAPI und Anti- α Tubulin gefärbter Zellen ergab keine Anaphase-Brücken bei dreißig ausgewerteten Anaphasen. In Abbildung 56 sind vier exemplarische Aufnahmen dieses Mitosestadiums in dieser und eine weitere in der AX2-Zelllinie dargestellt.

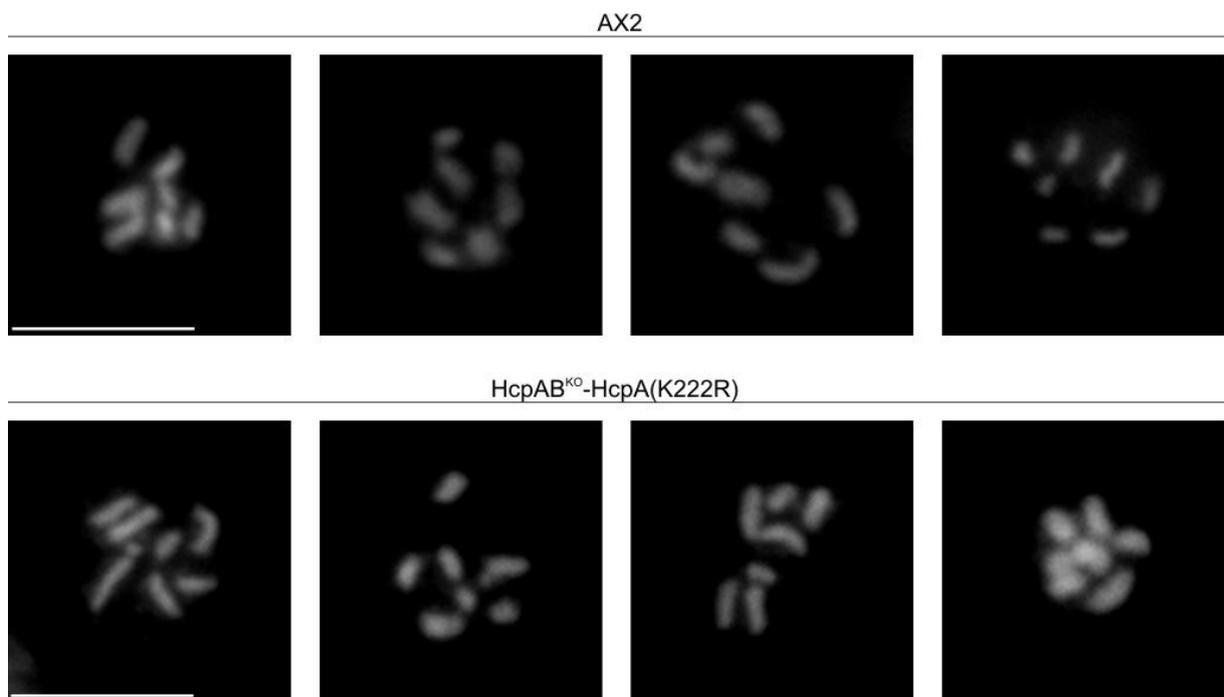
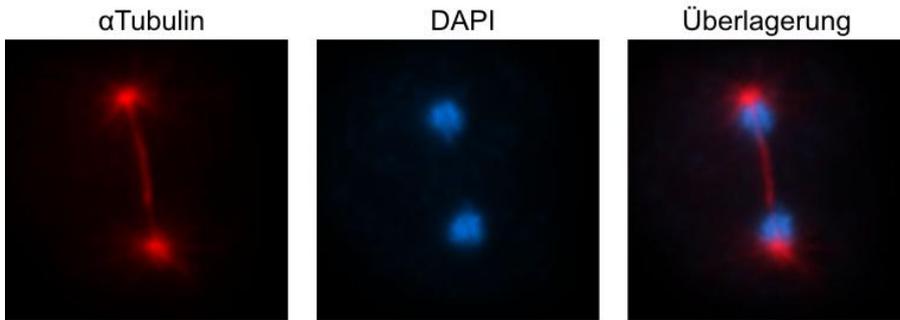


Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen kondensierter *D. discoideum* Metaphase-Chromosomen. Die durch DAPI angefärbte DNA lässt deutlich sieben chromosomenartige Strukturen pro Zellkern erkennen. Dabei handelt es sich um jeweils sechs Chromosomen und das ebenfalls kondensierte rDNA-Palindrom. Dieser Befund zeigt, dass es sich bei HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP ebenfalls um einen haploiden Stamm handelt. Maßstab: 5 μ m.

AX2



HcpAB^{KO}-HcpA(K203R)-GFP

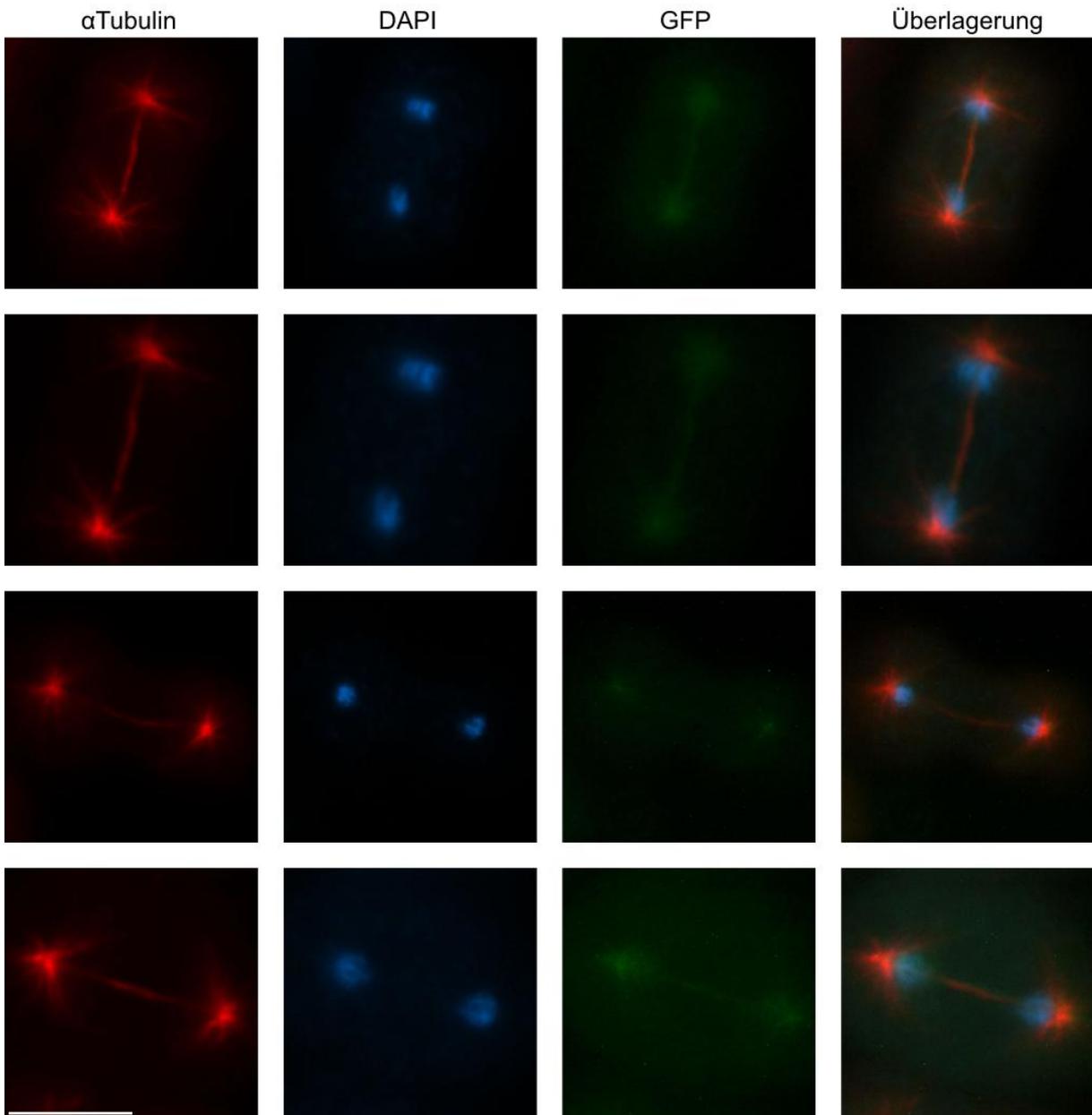


Abbildung 56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen fixierter und immungefärbter Anaphase-Zellen. Durch die Färbung der Zellen mit Anti- α Tubulin und Cy3-gekoppeltem 2. Antikörper sowie DAPI sollten Fehlverteilungen der Chromosomen und Anaphasebrücken sichtbar gemacht werden. Die beispielhaften Abbildungen zeigen, dass die Mitose in dem Stamm HcpAB^{KO}-HcpA(K203R) normal verläuft. Maßstab: 10 μ m.

9.3.5 Funktion der HP1-Acetylierung

Durch die Herstellung verschiedener Stämme konnte ein Unterschied zwischen den natürlicherweise modifizierten und den unmodifizierten, da mutierten HP1-Proteinen gezeigt werden. Dies äußerte sich durch einen distinkten Phänotyp der HcpA(K203R)-GFP überexprimierenden HP1 Doppelknockout-Zellen. Um die Ursache für den beobachteten Effekt im Wachstum, Entwicklung sowie der Sporenmorphologie zu finden, wurde das Gal4/UAS-System in *Dictyostelium discoideum* etabliert

Das Gal4/UAS-System wurde aus der Hefe abgeleitet, bei der der Mechanismus eine wichtige Rolle in der Regulation der Galaktose-Expression spielt (Giniger *et al.*, 1985). Dabei bindet die DNA-bindende-Domäne des Gal4-Proteins an die UAS-Sequenz (*Upstream Activating Sequence*) und forciert damit die Expression dahinterliegender Gene (West *et al.*, 1984). Diesen Zielmechanismus macht man sich insbesondere bei *Drosophila* zunutze, um Gene in bestimmten Zelltypen zu exprimieren (zusammengefasst in Elliott und Brand, 2008). Eine angepasste Version des Gal4/UAS-Systems wurde bereits für die Untersuchung von HP1-Proteinen verwendet. Dabei wurde mit wechselhaftem Erfolg der Effekt von Gal4DBD/HP1-Fusionen auf die Expression verschiedener chromosomaler Gene erforscht (Li *et al.*, 2003; Mateescu *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005). Um dieses System in *Dictyostelium* zu verwenden, wurden Gal4DBD-Fusionen von den Proteinen HcpA, HcpB und HcpA(K203R) erstellt.

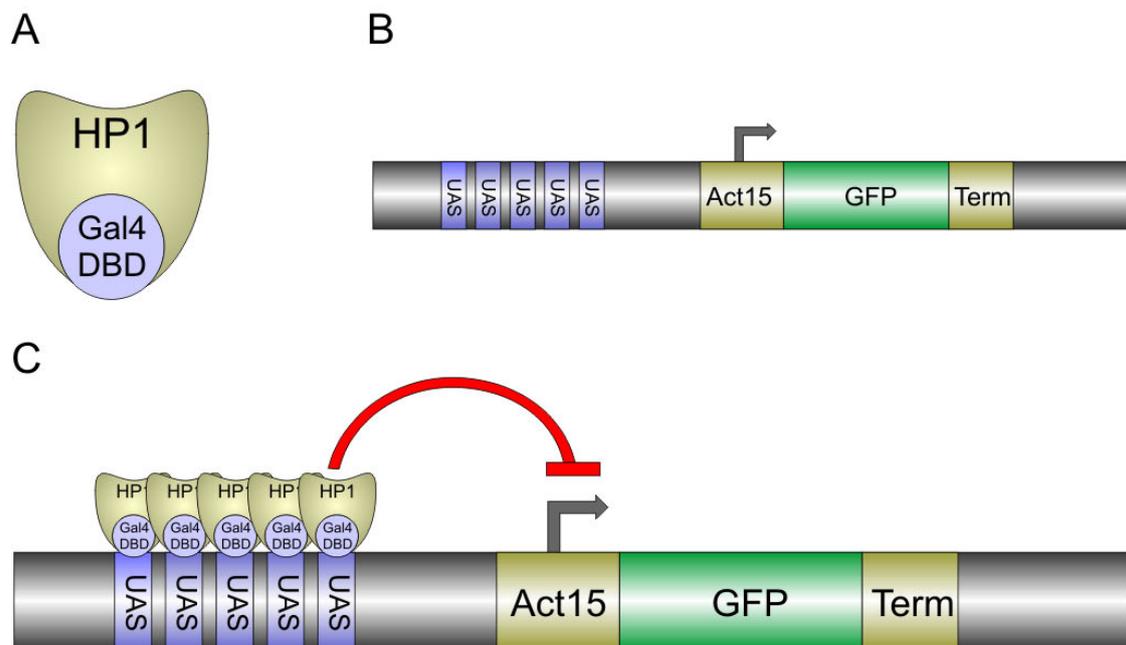


Abbildung 57: Schematische Darstellung des in *D. discoideum* verwendeten Gal4/UAS-Reportersystems. A) Die DNA-bindende Domäne des Gal4-Proteins wurde an den N-Terminus der HP1-Proteine kloniert. B) Als Bindestellen für das Fusionsprotein dienten fünf Wiederholungen der UAS-Sequenz. Diese wurden vor einer extrachromosomalen GFP-Kassette integriert. C) Der Effekt der HP1-Proteine auf den A15-Promotor konnte über die Expressionsstärke des GFP abgelesen werden.

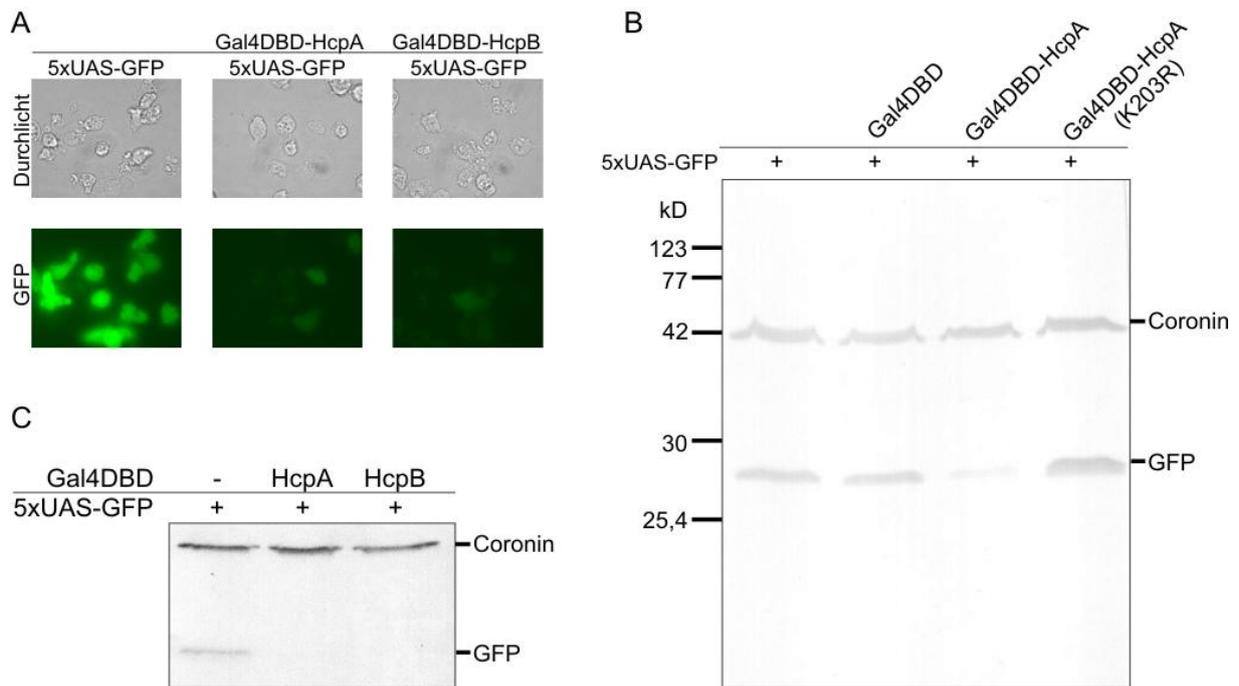


Abbildung 58: Einfluss von HP1-Proteinen auf die Expression eines GFP-Reporters mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems. A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die Stilllegung der GFP-Expression durch Bindung der Gal4DBD-HcpA und Gal4DBD-HcpB Fusionsproteine. C) Western Blot der Proben. B) Der inhibitorische Effekt des Gal4DBD-HcpA Proteins kann durch die Mutation von Lysin 203 in Arginin vollständig aufgehoben werden.

Eine fünffache Wiederholung der UAS-Sequenz wurde im Abstand von 148 Bp vor den A15-Promotor einer GFP-Kassette kloniert. Diese Kassette diente als Reporter, um die Expressionsstärke ablesen zu können. Um den Einfluss einer Integration der Sequenz ins Genom auszuschließen, fanden hierfür wiederum extrachromosomale Vektoren Verwendung. Diese wurden zur Selektion mit einer B5r-Kassette ausgestattet, während die Selektion des integrierenden Gal4-Plasmids über Geneticin erfolgte.

Wie in Abbildung 58A zu sehen ist, zeigen Zellen, in denen eines der beiden HP1-Proteine als Gal4DBD-Fusion vorliegt, eine stark verminderte GFP-Expression. Zum Vergleich dazu sind Zellen, die kein Gal4DBD exprimieren, dargestellt. Das Ergebnis der mikroskopischen Begutachtung konnte zudem mit Hilfe von Western Blots bestätigt werden (Abbildung 58C). Die Antwort auf die Frage, ob die DNA-bindende Domäne alleine einen Einfluss auf den benachbarten A15-Promotor hat, liefert der Western Blot in Abbildung 58B. Hier zeigt sich die gleiche Expressionsstärke in den Zelllinien, die keine Gal4DBD sowie denen, die die Gal4DBD besitzen. Die Stilllegung des GFP-Reporters über das Gal4DBD-HcpA Fusionsprotein ist hier zudem nochmals zu sehen. Wichtigster Teil dieser Abbildung ist jedoch die Wirkung des Gal4DBD-HcpA(K203R) Proteins auf den GFP-Reporter. Der zuvor beobachtete stilllegende Effekt der HP1-Proteine konnte durch den Austausch der Aminosäure 203 komplett aufgehoben werden.

10 Diskussion

10.1 Stilllegung von Retrotransposons

Die Stilllegung springender genetischer Elemente durch Mechanismen wie RNA-Interferenz, DNA-Methylierung sowie Heterochromatisierung gilt als Paradebeispiel der Epigenetik. Im Mais lassen sich mindestens dreiviertel des Genoms auf Transposons zurückführen, während es beim Menschen rund die Hälfte sind (SanMiguel *et al.*, 1998; Lander *et al.*, 2001). In dem kompakten Genom des Modelorganismus *Dictyostelium discoideum* machen diese Elemente immer noch zirka 10 % der gesamten Sequenz aus (Glockner *et al.*, 2001). Eine ungehinderte Verbreitung der Transposons hätte fatale Auswirkungen auf die Integrität und Stabilität der betroffenen Genome. In diesem Teil der Arbeit wurden Mechanismen der Stilllegung der Retrotransposons DIRS-1 und Skipper aus *Dictyostelium discoideum* untersucht. Obwohl im Vorfeld bereits bekannt war, dass RNA-Interferenz beziehungsweise DNA-Methylierung in die Regulation der Retrotransposons DIRS-1 und Skipper aus *Dictyostelium discoideum* involviert sind (Kuhlmann *et al.*, 2005), geben die Ergebnisse dieser Arbeit einen genaueren Einblick in den Mechanismus.

Durch die Verwendung eines extrachromosomalen Reportersystems wurde gezeigt, dass die verwendete rLTR-Sequenz von DIRS-1 nicht repressiv auf die Expression benachbarter Gene wirkt (siehe Kapitel 9.1.1). Es wurden weder Effekte einer Heterochromatisierung durch sequenzspezifisch bindende Proteine wie in der Spalthefe (Nakagawa *et al.*, 2002), noch die Auswirkungen einer ebenfalls stilllegenden DNA-Methylierung wie in Pflanzen (Huettel *et al.*, 2006) beobachtet. Falls eine transkriptionelle Genstilllegung die Expression des Retroelements beeinflusst, ist diese zumindest nicht in der rLTR-Sequenz kodiert. Ein solcher Effekt wäre für DIRS-1 nicht überraschend gewesen, da dieses Element in *Dictyostelium discoideum* die Centromer-Funktion erfüllt (Glockner und Heidel, 2009). Die Experimente zeigen zudem, dass die Einbettung endogen heterochromatisierter Sequenzen keine Stilllegung in *trans* auslöst. Ein solcher Vorgang konnte beispielsweise bei *Drosophila melanogaster* durch eine in die kodierende Region eines Reporters integrierte Satelliten-DNA ausgelöst werden. Dies führte in heterozygoten Fliegen zur Paarung des mutanten und des normalen Allels mit der homologen heterochromatischen Satelliten-DNA und damit zur Stilllegung des Reporters in *trans* (Dernburg *et al.*, 1996). Dass sich dies in *D. discoideum* nicht nachvollziehen ließ, könnte an der unbekanntenen Verteilung der verwendeten Vektoren im Zellkern liegen, was unter Umständen eine Paarung homologer Sequenzen verhindert. Zum anderen sind die Eigenschaften des Chromatins extrachromosomaler Plasmide vollkommen ungeklärt. Der Auslöser der Heterochromatisierung von DIRS-1 ist somit in einem Motiv außerhalb des rLTRs, der repetitiven Struktur oder in einem anderen Mechanismus zu suchen.

Die Entdeckung einer starken, auch in vegetativen Zellen vorhandenen Promotoraktivität im rLTR von DIRS-1 (siehe Kapitel 9.1.3) erklärt hingegen die posttranskriptionelle Stilllegung dieses Elements durch den RNAi-Mechanismus. Durch die Integration der Sequenz in unterschiedlichen Orientierungen vor einen GFP-ORF konnte gezeigt werden, dass die Aktivität entgegen früherer Annahmen (Cohen *et al.*, 1984; Zuker *et al.*, 1984) nur in eine Richtung wirkt. Sie kann wie in Abbildung 59 dargestellt das Vorhandensein eines *Antisense*-Transkripts erklären. Ähnliche Transkripte konnten bereits für andere Transposons nachgewiesen werden (Lankenau *et al.*, 1994; Sewell und Kinsey, 1996). Die Beobachtung eines kompletten Expressionsverlustes durch eine Integration des rLTR als *Antisense*-Promotor dokumentiert die Wirksamkeit der durch die Doppelstrangbildung ausgelösten Stilllegung (siehe Kapitel 9.1.2). Dass dieser Effekt auf einer Zerstörung der DIRS-1 RNA beruht, wurde mit Hilfe von Northern Blots nachgewiesen. Da keine Doppelknockouts der für die RNA-Interferenz essentiellen DICER-Homologe verfügbar waren, konnte die Beobachtung allerdings nicht mit letzter Sicherheit auf diesen Mechanismus zurückgeführt werden. Geht man aber davon aus, dass die Zerstörung der Transkripte zur Produktion von siRNAs durch DICER führt, kann eine weitere Beobachtung erklärt werden. Wurde der rLTR in einer Orientierung integriert, bei der es nicht zur Herstellung eines *Antisense*-Transkripts kommen konnte, war dennoch ein abgeschwächter Stilllegungseffekt erkennbar. Da zahlreiche natürliche DIRS-1 siRNAs bekannt sind (Hinas *et al.*, 2007) ist davon auszugehen, dass diese auch in *trans* zur Zerstörung des Transkripts führen. Dementsprechend weniger GFP RNA konnte in Northern Blots detektiert werden.

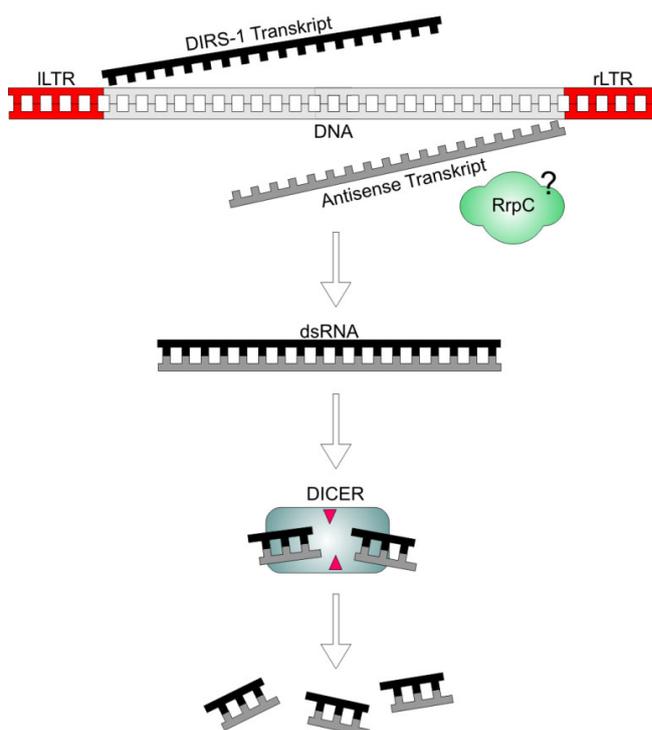


Abbildung 59: Modell des Stilllegungsmechanismus des Retrotransposons DIRS-1 durch RNAi. Zwei Transkripte, die ihren Ursprung in der Promotoraktivität des linken und des rechten LTRs haben, lagern sich zu einem Doppelstrang zusammen. Bei der Herstellung des *Antisense*-Transkripts spielt in der Zelle wahrscheinlich auch das Enzym RrpC eine Rolle. Der entstandene Doppelstrang wird anschließend durch das Enzym DICER in siRNAs prozessiert und dadurch das kodierende DIRS-1 Transkript zerstört.

Obwohl der Einfluss der RNA-abhängigen RNA-Polymerase RrpC auf die Stilllegung von DIRS-1 bereits gezeigt wurde (Kuhlmann *et al.*, 2005), konnte der Effekt des Knockouts mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht nachvollzogen werden (Kapitel 9.1.2, Abb. 17). Es ist daher davon auszugehen, dass RrpC eine bestimmte Rolle bei der Herstellung der endogenen DIRS-1 *Antisense*-Transkripte spielt, vielleicht indem siRNAs dem Enzym als Primer zur Synthese weiterer RNAs dienen. Die Funktion von RrpC würde damit der aus der Spaltheife bekannten Polymerase Rdp1p gleichen, die dort für die Produktion von centromerischen siRNAs verantwortlich ist (Sugiyama *et al.*, 2005). Ein derartiger Mechanismus ließe sich mit Hilfe des verwendeten Reporters am einfachsten durch Identifizierung von GFP siRNAs beweisen. Für eine Bestätigung des in Abbildung 59 vorgestellten Modells wäre zudem ein Knockout der beiden DICER-Homologe in *Dictyostelium discoideum* von Nutzen.

Die Ergebnisse für das Retrotransposon Skipper legen neue, teils überraschende Interpretation vorhandener Daten nahe. So konnte gezeigt werden, dass der Skipper LTR ebenso wie das DIRS-1 Gegenstück keine repressive Chromatinbildung auslöst (siehe Kapitel 9.1.1). Im Gegensatz zum DIRS-1 rLTR konnte für die Sequenz auch keine Promotoraktivität nachgewiesen werden (siehe Kapitel 9.1.3). Dies steht im Einklang mit der Ansicht, dass diese Aktivität bei Skipper zwischen linkem LTR und erstem ORF liegt (Leng *et al.*, 1998). Außerdem lässt sich dadurch das weitestgehende Fehlen von Skipper siRNAs erklären (Hinas *et al.*, 2007). Die fehlende *Antisense*-Transkription durch den rLTR verhindert somit die Produktion eines Doppelstrangs und dessen nachfolgende Prozessierung in siRNAs durch den RNAi-Mechanismus.

Die Identifikation einer Chromo-Domäne innerhalb der von Skipper kodierten Proteine gibt erstmalig Aufschluss darüber, wie es zur Assoziation des Transposons mit stillgelegtem Chromatin kommen kann. Bei der Suche nach Proteinen mit dieser Interaktionsdomäne konnten die Treffer in vier verschiedene Familien eingeteilt werden (siehe Kapitel 9.1.4). Dazu gehört die Gruppe der HP1-, die der DnaJ- sowie die der CHD-Proteine. Als einziger Vertreter der vierten Gruppe entpuppte sich die Polymerase des Retrotransposons Skipper. Sie enthält neben der Chromo- und Reversen Transkriptase- auch eine Integrase-Domäne und ist damit für den Einbau der Transposon-DNA ins Genom verantwortlich. Durch eine GFP-Fusion der in Skipper gefundenen Chromo-Domäne konnte deren Lokalisation im Bereich von H3K9-Dimethylierung und Heterochromatin gezeigt werden (Kapitel 9.1.4, Abb. 23). Die Lokalisation entspricht damit denen der HP1-Proteine in *Dictyostelium discoideum* aber keiner der anderen untersuchten Chromo-Domänen (Kapitel 9.1.4, Abb. 22). Wie das daraus abgeleitete Modell in Abbildung 60 zeigt, führt die Chromo-Domäne wahrscheinlich zu einer gezielten Integration des Retroelements in Heterochromatin aufgrund der Bindung an methyliertes H3K9.

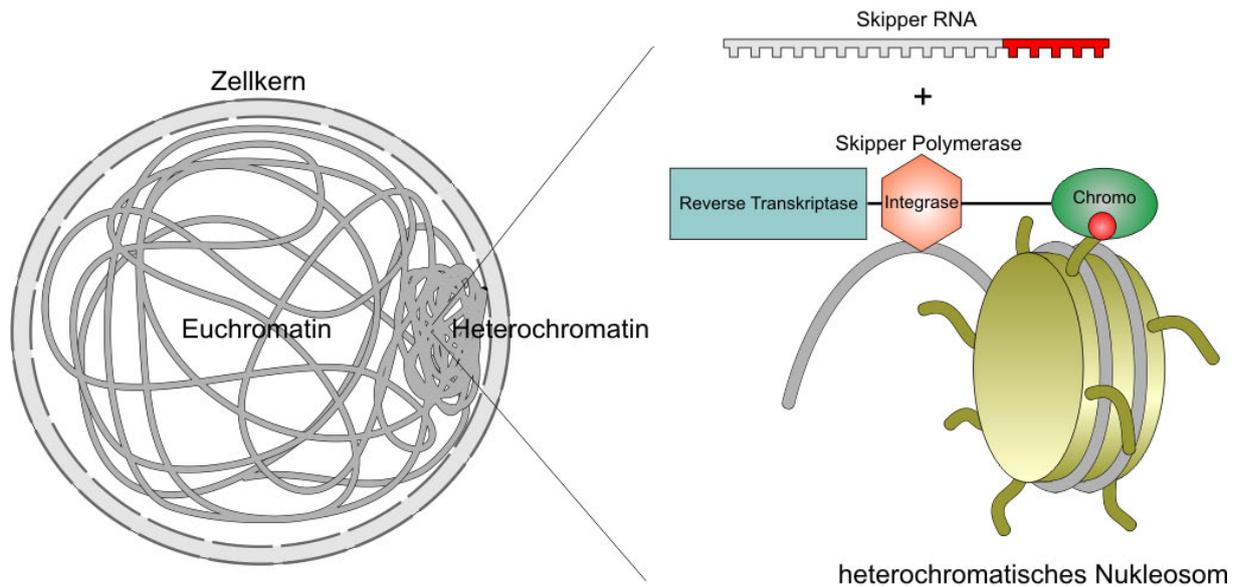


Abbildung 60: Modell der Stilllegung des Retrotransposons Skipper durch gezielte Integration in Heterochromatin. Links: Heterochromatin lokalisiert im *Dictyostelium*-Zellkern in einem Punkt der Kernperipherie. Rechts: Die in diesem Bereich vorhandene H3K9 Histon-Methylierung (roter Kreis) wird von der C-terminalen Chromo-Domäne (grünes Oval) der Skipper Polymerase gebunden und führt zur dortigen Integration des Transposons.

Dies erklärt auch das gehäufte Vorkommen von Skipper-Sequenzen in der Nähe der Centromere und Telomere innerhalb des *Dictyostelium*-Genoms (Eichinger *et al.*, 2005). Damit wäre die gezeigte DNA-Methylierung (Kuhlmann *et al.*, 2005) ein sekundärer Effekt aufgrund der Integration in heterochromatische Bereiche. Dies deckt sich mit Erkenntnissen, wonach das für die C-Methylierung verantwortliche Enzym DnmA keine Präferenz für bestimmte Sequenzen zeigt (V. Maximov, unveröffentlicht). Eine heterochromatische Lokalisation aufgrund einer H3K9-Bindung konnte für das Transposons MAGGY aus *Magnaporthe grisea* vor kurzem publiziert werden (Gao *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Skipper aus *Dictyostelium discoideum* wurde dieses Ergebnis allerdings nur von einem heterologen System abgeleitet.

Eine Funktion der selektiven Integration in Heterochromatin wäre die Umgehung negativer Selektion, die eine Zerstörung vorhandener Gene mit sich bringen würde. Die Möglichkeit einer Transposition in bestehende Gene wäre dadurch in dem kompakten Genom von *Dictyostelium discoideum* deutlich verringert. Da gänzlich unerforscht ist, wie genau sich der Promotor des Skipper Elements verhält, kann über dessen Aktivität ebenfalls nur spekuliert werden. Obwohl DNA-Methylierung diese negativ beeinflusst (Kuhlmann *et al.*, 2005), könnte wie im Fall des in *Saccharomyces cerevisiae* vorkommenden Transposons Ty5 ein zusätzlicher Faktor zu einer verstärkten Expression auch innerhalb des repressiven Chromatin-Kontextes führen (Ke *et al.*, 1997). Eine Unterdrückung der Expression durch DNA-Methylierung und Heterochromatisierung würde somit lediglich die unkontrollierte Ausbreitung verhindern.

10.2 Der Histon-Code in *Dictyostelium discoideum*

Neben der Analyse der Stilllegung von Retroelementen wurden im Rahmen dieser Dissertation auch zahlreiche Erkenntnisse über das in *Dictyostelium discoideum* exprimierte „Histon“ gewonnen. Die Ergebnisse sollten Einblick in die Evolution und Verbreitung von Histon-Varianten und deren posttranslationale Modifikationen geben. Durch die massenspektrometrische Untersuchungen HCl-extrahierter Kernproteine wurden die Histon-Varianten H3a, H3b, H2AX, H2AZ, H3Bv3, H1 und H4 identifiziert (siehe Kapitel 9.2.1). Somit besitzt *D. discoideum* ein vollständiges Set der zur Bildung eines Nukleosoms notwendigen Proteine. Zusätzlich dazu zeigt die Variante H2AX, dass es auch zur Ausbildung weiter spezialisierter Nukleosomen kommt. Während Untersuchungen das Protein bereits mit der DNA-Reparatur in Verbindung bringen konnten (Hudson *et al.*, 2005), kann man über die Funktion der beiden Histon H3 Formen nur spekulieren.

Da Histon H3b in allen Versuchen unterrepräsentiert war, scheint es sich bei H3a um die dominierende Histon H3 Variante zu handeln. Die Unterschiede in der Expression sowie der Aminosäuresequenz (Abbildung 61) legen eine eng begrenzte Verbreitung von H3b nahe. Wie die gleiche Abbildung zeigt, ähneln beide Proteine in den entscheidenden Bereichen dem Histon H3.3 aus Mensch und Fruchtfliege und gehören somit zur euchromatischen H3-Familie. Ein Vertreter des zu stabileren Nukleosomen führenden Histons H3.1 findet sich ebenso wie das heterochromatische H3.2 in *Dictyostelium discoideum* wie auch in der Hefe nicht. Dieser Befund steht im Einklang mit der Beobachtung, dass einfache Eukaryoten einen höheren Anteil aktiven Chromatins besitzen als die komplexeren Organismen wie Mensch oder Fruchtfliege (Garcia *et al.*, 2007). Immunfärbungen mit Antikörpern gegen die H3-Varianten sollten Aufschluss darüber geben können, welche Nischen H3a und H3b in der sozialen Amöbe besetzen.

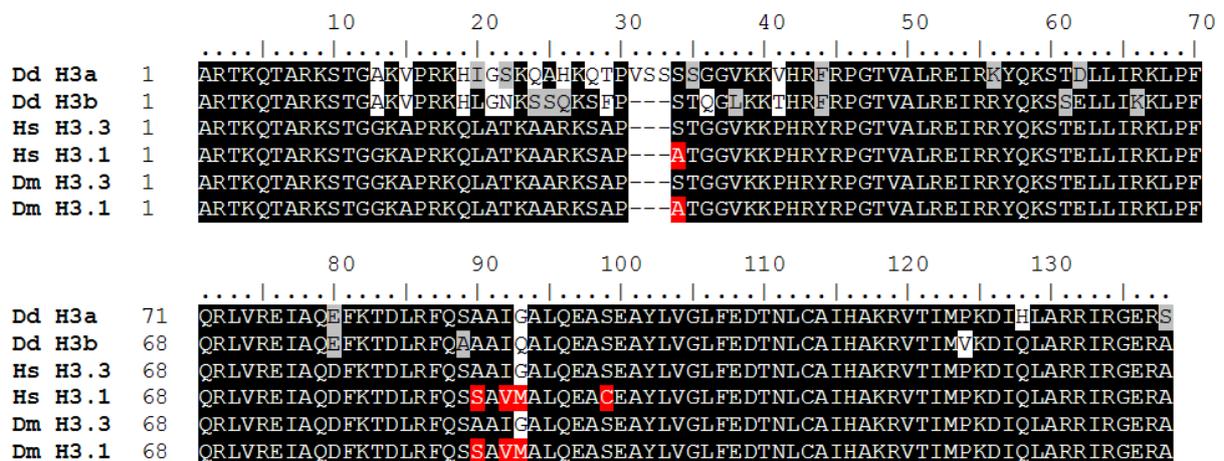


Abbildung 61: Alignment der Aminosäuresequenzen der Histon-Varianten H3a und H3b aus *Dictyostelium discoideum* mit Vertretern der Histon H3.1 und H3.3 Familie aus Mensch (Hs) und Fruchtfliege (Dm). Die Rot unterlegten Aminosäuren sind für die Unterscheidung der beiden Histon-Varianten wichtig. Histon H3a und H3b gehören demnach beide zu der euchromatischen Histon H3.3 Familie.

Der Nachweis einer weiteren, dem centromerspezifischen Histon H3 entsprechenden Variante gelang nicht. Diese wurde im Rahmen einer anderen Arbeit mit Histon H3v1 identifiziert und als GFP-Fusion exprimiert (Manu Dubin, eingereicht). Die geringe Verbreitung des in nur wenige Nukleosomen eingestreuten Proteins kommt als Ursache für die fehlende Identifikation durch Massenspektrometrie in Frage. Ein weiterer Grund könnte in der verwendeten Extraktionsmethode liegen, die unter Umständen eine Isolierung bestimmter Chromatinformen erschwert.

Neben den verschiedenen Histon-Varianten konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie auch zahlreiche Histon-Modifikationen bestimmt werden. Da vergleichbare Ergebnisse für *Dictyostelium discoideum* nicht vorlagen sind diese von großer Bedeutung. Ein Großteil davon entfiel auf die Histone H3, H2Bv3 und H4, während für die H2A-Varianten keine und für Histon H1 lediglich drei Modifikationen gefunden wurden (siehe Kapitel 9.2.3). Dies steht im Einklang mit der auch in anderen Organismen vorhandenen Verteilung, da auch dort die drei Erstgenannten die meisten Modifikationen beherbergen. Optimierungen der Aufreinigungsbedingungen könnten allerdings weitere Entdeckungen ermöglichen. Die Untersuchung beschränkte sich zudem auf die wichtigsten Buchstaben des Histon-Codes. Dazu zählt die Methylierung, Acetylierung und Biotinylierung von Lysin, die Methylierung von Arginin sowie die Phosphorylierung von Serin und Threonin. Um den in *Dictyostelium discoideum* vorgefundenen Histon-Code mit dem anderer Modellorganismen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse erneut prozessiert. Wie Abbildung 62 für Histon H3 zeigt, dienten dafür Mensch (Hs), Fruchtfliege (Dm) und Hefe (Sc) als Vergleichsobjekte (Quellen: Anhang). Die Nummerierung der ausgerichteten Aminosäuren erfolgte anhand der humanen Sequenz und entspricht somit nicht immer der Position in *D. discoideum*.

Auf den ersten Blick erscheint der H3-Code der unterschiedlichen Organismen sehr ähnlich, wobei es auch signifikante Unterschiede gibt. So fehlen in *Dictyostelium discoideum* die Modifikationen der Bereiche zwischen den Aminosäuren 17-23 und 40-56. Da eine geringe Verbreitung einer Modifikation auch zu deren Unsichtbarkeit in der Massenspektrometrie führen kann, sollte man diese allerdings nicht völlig ausschließen. Das könnte auch ein Grund für die fehlende Detektion einer H3K9-Trimethylierung sein, die Immunfärbungen nahelegten (Manu Dubin, eingereicht). Da aber auch eine Kreuzreaktion mit einer anderen Trimethylierung vorliegen könnte, kann das Vorhandensein nicht zweifelsfrei geklärt werden. Aufgrund einer fehlenden Abdeckung der Protein N-Termini gelang zudem der Nachweis der bereits publizierten Methylierung von H3K4 (Chubb *et al.*, 2006) nicht. Das Vorhandensein eines AuroraB-Homologs in *Dictyostelium discoideum* (Li *et al.*, 2008a) legt zudem eine H3S10-Phosphorylierung nahe. *Dictyostelium*-spezifische Modifikationen konnten für die Aminosäuren 40, 42 und 86 bei Histon H3a sowie für das nur in H3b vorhandene Lysin 63 gefunden werden.

Betrachtet man die mit der positiven wie negativen Genexpression in Zusammenhang stehenden H3-Modifikationen, so fällt auf, dass das Muster eher dem der Hefe ähnelt. Während die mit aktivem Chromatin assoziierte Methylierung von H3K4 in der Hefe, Fruchtfliege und *Dictyostelium discoideum* in drei Stufen vorhanden und damit stark vertreten ist, fehlt die Di- und Trimethylierung im Mensch völlig. Dafür präsentiert sich das Muster der repressiven H3K9-Methylierungen im Mensch und der Fruchtfliege komplett. Schleimpilz und Hefe verfügen im Gegensatz dazu lediglich über ein, maximal zwei Methylierungsstufen. Ähnlich verhalten sich die ebenfalls repressiven H3K27-Modifikationen. Diese sind in *Dictyostelium* und der Hefe mit nur einer Stufe schwach vertreten, während Mensch und Fruchtfliege Mono-, Di- und Trimethylierungen von H3K27 besitzen. Ein ausgeglichenes Verhältnis zeigt sich lediglich im Bereich der mit aktivem Chromatin verbundenen H3K79-Methylierung. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich in den einfachen Eukaryoten wie Hefe und Schleimpilz mehr aktivierende H3-Modifikationen finden, während im Menschen und der Fruchtfliege repressive Modifikationen vorherrschen.

Diese Aussage kann noch durch eine weitere Beobachtung gestützt werden. So fehlt in *Dictyostelium*, der Hefe aber auch in der Fruchtfliege die Acetylierungen von H3K4 und H3K79. Da die Methylierung dieser Aminosäuren mit aktivem Chromatin assoziiert ist, blockiert eine solche Modifikation wahrscheinlich entsprechende HMTs und führt somit ebenfalls zu eher repressivem Chromatin (Garcia *et al.*, 2007). Die Befunde korrelieren somit direkt mit dem Gehalt an Heterochromatin in den beschriebenen Organismen. Während im Menschen über 60 % des Genoms heterochromatisiert vorliegt, macht dies in der Hefe nur einen einstelligen Bereich aus (Jenuwein *et al.*, 1998). Mikroskopische Beobachtungen des mit Anti-H3K9me²-Antikörper angefärbten Chromatins sowie der Verteilung der HP1-Proteine stellen *Dictyostelium discoideum* in dieser Hinsicht eher zur Hefe, womit sich die Ähnlichkeit des Histon-Codes erklärt.

Im Gegensatz zu Histon H3 ist die Sequenz von Histon H2B zwischen den Organismen nur schwach konserviert. Somit ergeben sich zahlreiche unterschiedliche Modifikationen wie Abbildung 63 zeigt. Die meisten davon beschränken sich aus diesem Grund auf einzelne Organismen. Die Funktion solch eng begrenzter Modifikationen ist unklar und wurde am Beispiel des dimethyliert und acetyliert vorgefundenen Lysins 107 untersucht (siehe Kapitel 9.2.4). Bei Versuchen mit einem mutierten GFP-Fusionsprotein konnte jedoch keine Auswirkung auf Sporulationsfähigkeit, Wachstum und Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* festgestellt werden. Der erzielte Effekt dürfte somit entweder zu schwach, nicht vorhanden oder nur im Rahmen anderer Experimente zu beobachten sein. Eine Aussage über die Funktion dieser Modifikation ist daher nicht möglich. Die Überexpressionsversuche zeigten aber, dass das häufig als Kontrolle verwendete H2B-GFP Protein zu einer Störung der DNA-Reparatur führt. Grund dafür dürfte das durch die Überexpression gestörte Verhältnis der Histon-Proteine zueinander sein.

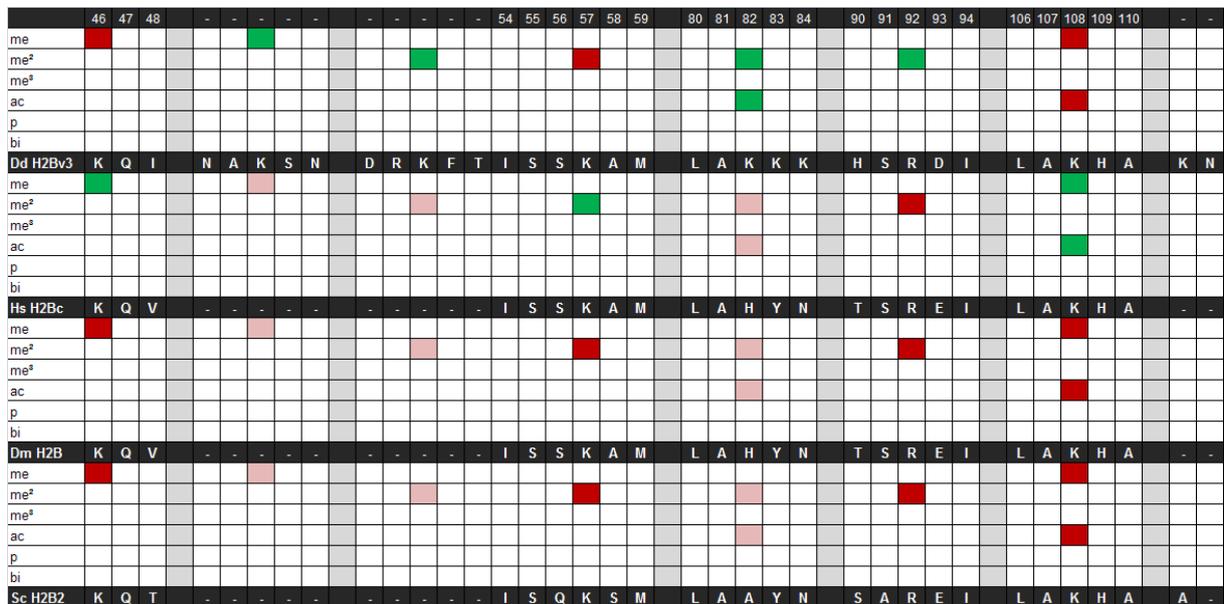
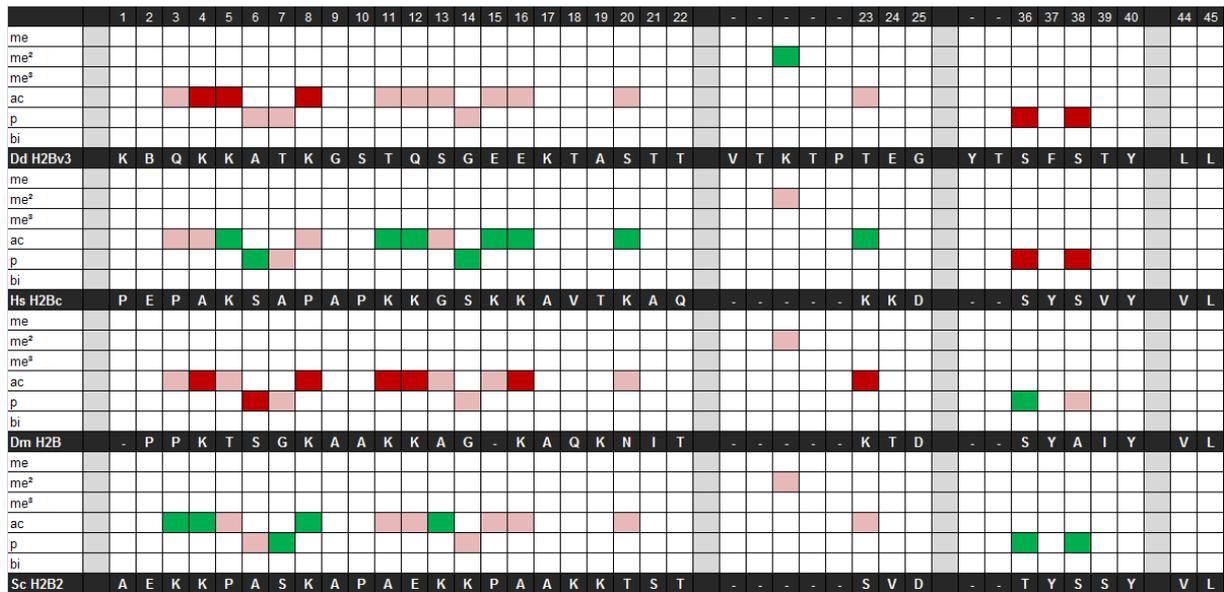


Abbildung 63: Grafische Darstellung der Histon H2Bv3 Modifikationen aus *Dictyostelium discoideum* im Vergleich mit denen aus Mensch (Hs H2Bc), Fruchtfliege (Dm H2B) und Hefe (Sc H2B2). Veränderte Aminosäuren sind durch darüber liegende grüne Kästchen markiert, während rote Kästchen in diesem Organismus fehlende Modifikationen anzeigen (Rosa: Zusätzlich veränderte Aminosäure). Gelbe Kästchen stehen für nicht experimentell nachgewiesene Modifikationen. Die Nummerierung der Aminosäuren folgt zum besseren Vergleich der humanen Histon-Variante. Abkürzungen: me^{2,3}= Mono-, Di- und Trimethylierung, ac= Acetylierung, p=Phosphorylierung, bi= Biotinylierung. Die Quellen sind im Anhang (Kapitel 11) aufgelistet.

Die in Abbildung 64 dargestellte Grafik zu Histon H4 zeigt die im Vergleich zu Histon H2B weniger stark ausgeprägten Sequenzunterschiede innerhalb dieser Protein-Familie. Dabei ist die Anzahl an Modifikationen in den Organismen geringer als bei Histon H3. Dennoch gehören einige davon zu den am stärksten konservierten Modifikationen überhaupt. Dazu gehört die Acetylierung der am N-Terminus eingestreuten Lysine 5, 8, 12 und 16. Die definierte Abfolge der aufeinander folgenden Acetylierungsreaktionen führte in der Literatur zum Vergleich mit einem Reißverschluss (Zhang *et al.*, 2002). So folgt auf die Acetylierung von K16 die von K12, K8 und zuletzt die Modifikation von Lysin 5. Obwohl die Position von K5 in *Dictyostelium discoideum* aufgrund von Sequenzunterschieden um eine Aminosäure verschoben ist, konnten alle diese Acetylierungen auch in der sozialen Amöbe gefunden werden.

Abbildung 64 zeigt ebenfalls, dass anders als im Mensch, der Hefe und der Fruchtfliege Lysin 20 von Histon H4 in *Dictyostelium discoideum* vollkommen unmodifiziert zu sein scheint. Das ist auf den ersten Blick auch deshalb überraschend, da es sich nicht um eine einzelne Modifikation handelt, sondern diese Aminosäure mit bis zu drei Modifikationsstufen ausgestattet ist. Ein Hinweis darauf, dass diese Aminosäure in *Dictyostelium* tatsächlich unmodifiziert ist, gibt das Fehlen der Modifikationen in dem Ciliaten *Tetrahymena* (Nishioka *et al.*, 2002) und der nur schwachen Präsenz in der Hefe (Garcia *et al.*, 2007). Im Hinblick auf das vorzugsweise euchromatische Genom der einfachen Eukaryoten scheint die Notwendigkeit dieser zusätzlichen heterochromatischen Modifikation gering.

Andere Modifikationen konnten nur in Histon H4 identifiziert werden. Dazu gehört zum einen die Monomethylierung von R55 und R78, die zudem bislang nur in *Dictyostelium* bekannt ist. Zum anderen zählt dazu eine Biotinylierung, die durch Vergleich mit der publizierten Modifikation des humanen Proteins (Camporeale *et al.*, 2004) wahrscheinlich auf K12 entfällt. Da biotinylierte Histone vorzugsweise in transkriptionell inaktivem Heterochromatin gefunden wurden (Peters *et al.*, 2002), dient diese Modifikation wahrscheinlich als Gegenspieler des ansonsten acetylierten und somit aktivierenden Lysins 12. Das Vorhandensein des acetylierten Reißverschluss-Motivs konnte auch durch AU-Gelelektrophoresen bestätigt werden (Kapitel 9.2.5, Abb. 38). Leider gelang dabei der Nachweis einer globalen Histon-Code Veränderung während der Entwicklung nicht. Western Blots auf modifizierte Histone und die Beobachtung einer strukturellen Chromatinveränderungen durch GFP-markiertes H2Bv3 geben jedoch Hinweise auf dessen Existenz (Kapitel 9.2.5, Abb. 39/40). Die Veränderung des Expressionsmusters von immerhin 25 % des *Dictyostelium*-Genoms während der Entwicklung (Van Driessche *et al.*, 2002) legt einen entsprechenden Mechanismus nahe. Mit Hilfe GFP-markierter HP1-Proteine konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das Heterochromatin in diesem Zeitraum nicht signifikant verändert (Kapitel 9.2.5, Abb. 39).

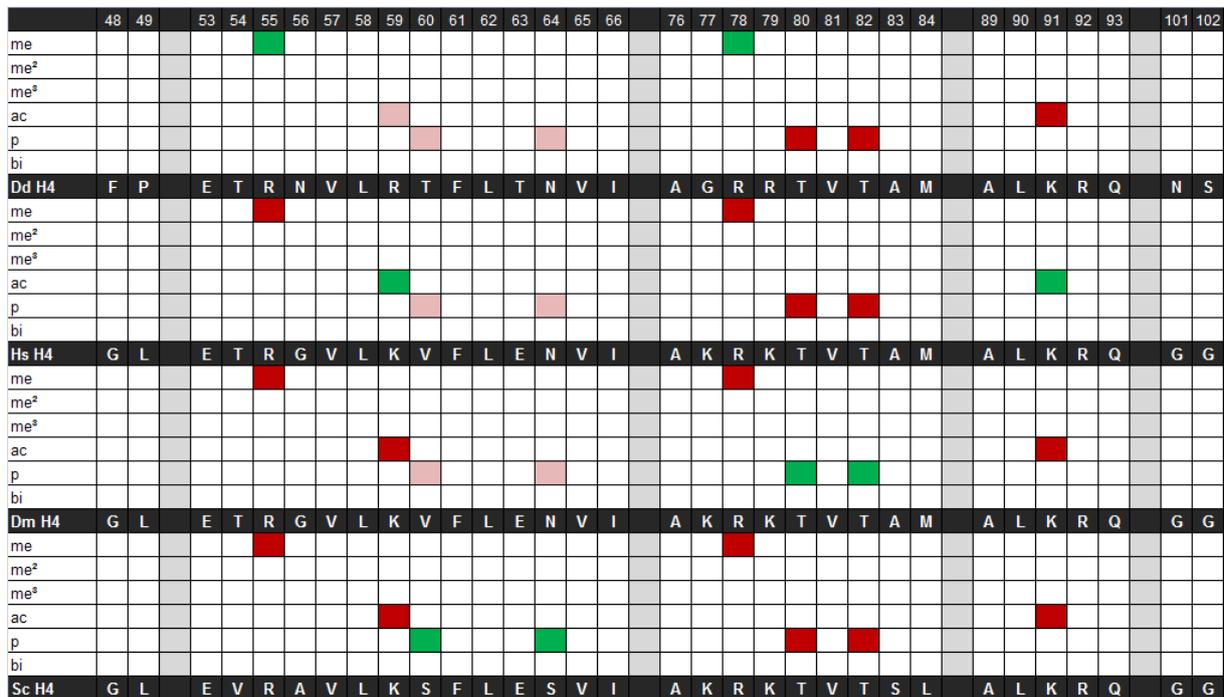
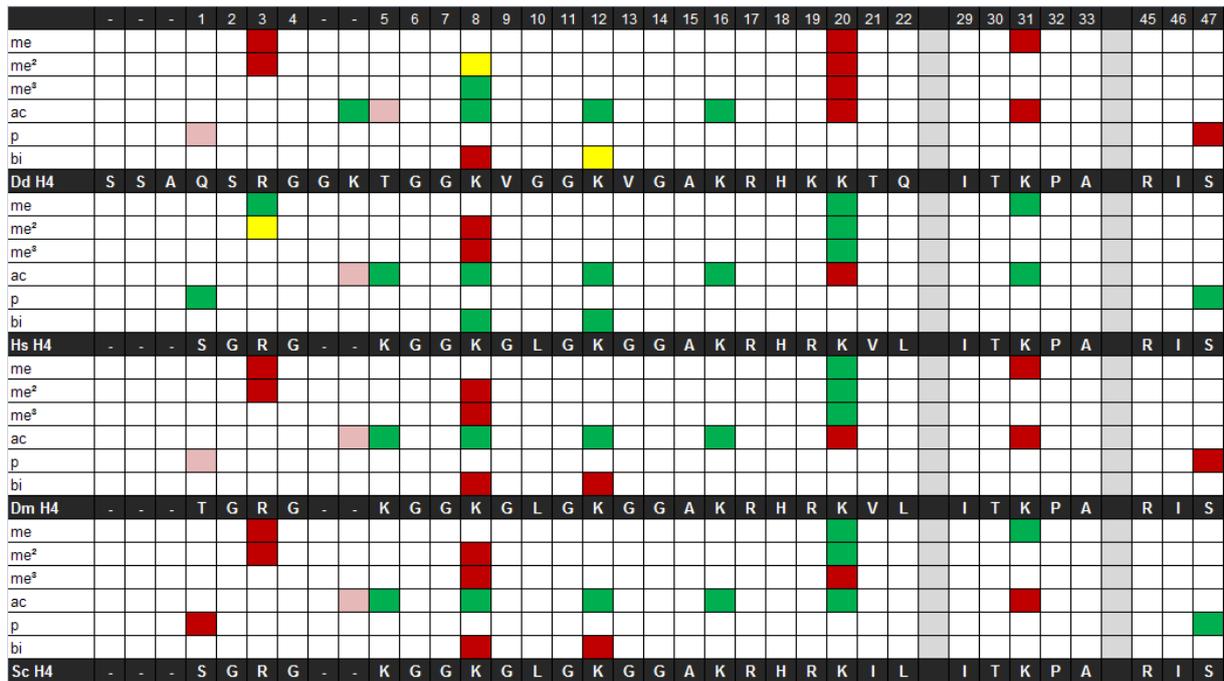


Abbildung 64: Grafische Darstellung der Histon H4 Modifikationen aus *Dictyostelium discoideum* im Vergleich mit denen aus Mensch (Hs H4), Fruchtfliege (Dm H4) und Hefe (Sc H4). Veränderte Aminosäuren sind durch darüber liegende grüne Kästchen markiert, während rote Kästchen in diesem Organismus fehlende Modifikationen anzeigen (Rosa: Zusätzlich veränderte Aminosäure). Gelbe Kästchen stehen für nicht experimentell nachgewiesene Modifikationen. Die Nummerierung der Aminosäuren folgt zum besseren Vergleich der humanen Histon-Variante. Abkürzungen: me^{2,3}= Mono-, Di- und Trimethylierung, ac= Acetylierung, p=Phosphorylierung, bi= Biotinylierung. Die Quellen sind im Anhang (Kapitel 11) aufgelistet.

10.3 Der HP1-Code in *Dictyostelium discoideum*

Neben dem Histon-Code wurde vor kurzem auch das Vorhandensein eines durch HP1 vermittelten Subcodes propagiert (Lomberk *et al.*, 2006a). Diese Aussage stützt sich im Wesentlichen auf die Ähnlichkeit der in HP1 vorgefundenen posttranslationalen Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung mit denen der Histone. Während die Acetylierung und Methylierung zuerst keinen bestimmten Aminosäuren zugeordnet und erst kürzlich eine diesbezügliche Karte für die humanen HP1-Varianten erstellt wurde (Leroy *et al.*, 2009), liegen für die Phosphorylierungen bereits genauere Ergebnisse vor.

Die erste Beschreibung einer Phosphorylierung erfolgte für ein in der Fruchtfliege kodiertes HP1-Protein (Eissenberg *et al.*, 1994). Die Modifikation konnte dort mit der Heterochromatin-Bildung und Lokalisation von HP1 in Verbindung gebracht werden (Zhao und Eissenberg, 1999). Eine Mutation der entsprechenden Aminosäuren führte in späteren Experimenten zu einem kompletten Verlust der Stilllegungseigenschaften des Proteins (Zhao *et al.*, 2001). Weitere Experimente konnten zudem die unterschiedliche Assoziation der hypophosphorylierten und hyperphosphorylierten HP1-Proteine mit Interphase-Chromatin und den Untereinheiten des *Origin Recognition Complex* (ORC) zeigen (Huang *et al.*, 1998; Badugu *et al.*, 2005). Die partielle Kollokalisierung der HP1-Proteine und der in *Dictyostelium discoideum* kodierten Untereinheit OrcB (Kaller *et al.*, 2007) lässt in der sozialen Amöbe ähnliche Mechanismen vermuten. Auch in der Spaltheife konnte bereits eine funktionelle Phosphorylierung des HP1-Homologs Swi6 nachgewiesen werden. Diese scheint die Interaktion mit anderen Proteinen und damit die transkriptionelle Genstilllegung zu beeinflussen (Shimada *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die posttranslationalen HP1-Modifikationen aus *D. discoideum* entschlüsselt werden. Hinweise auf deren Existenz gaben bereits früher durchgeführte biochemische Versuche sowie 2D-Gelelektrophoresen der Proteine (Földesi, 2005; Kaller, 2006). Diese legten bereits das Vorhandensein verschiedener Modifikationen nahe. Durch die massenspektrometrische Vermessung aufgereinigter HP1-Proteine konnte in dieser Arbeit zwar keine Phosphorylierung dafür aber die Dimethylierung eines N-terminalen sowie die Acetylierung eines in der Chromoshadow-Domäne befindlichen Lysins gezeigt werden (siehe Kapitel 9.3.2). Experimente legen zudem das Vorhandensein einer weiteren, bislang unbekanntem Modifizierung innerhalb der Hinge-Region von HcpB nahe. Hierbei konnten die beiden Asparagine 142 und 143 als Ziele ausgemacht werden (siehe Kapitel 9.3.1). Eine Aussage zur Funktion ist aufgrund der unklaren Art der Veränderung derzeit noch nicht möglich. Ein essentieller Effekt auf den Organismus kann allerdings ebenso wie für die ebenfalls nur in HcpB mögliche Dimethylierung aufgrund der Vitalität des HcpB-Knockouts (Kaller *et al.*, 2006) weitgehend ausgeschlossen werden.

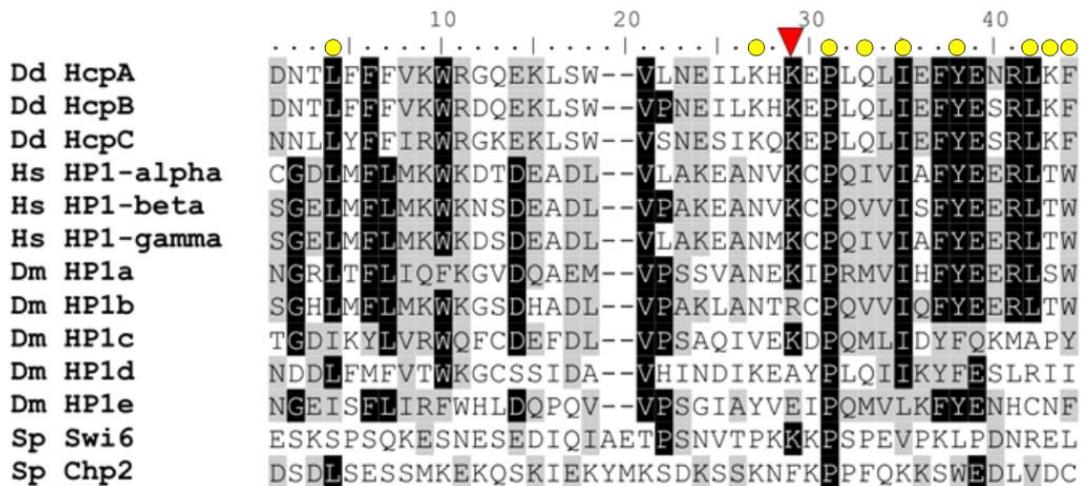


Abbildung 65: *Alignment* der Chromoshadow-Domänen verschiedener HP1-Proteine aus *Dictyostelium discoideum* (Dd), Mensch (Hs), Fruchtfliege (Dm) und Spaltheife (Sp). Die in der sozialen Amöbe gefundene Acetylierung ist durch einen roten Pfeil markiert. Alle HP1-Proteine aus dem Menschen, 3 von 5 Varianten aus der Fruchtfliege und eine der beiden Formen aus *Schizosaccharomyces pombe* enthalten an gleicher Position ebenfalls ein Lysin. Die in die Dimerisierung des Maus-Homologs involvierten Aminosäuren (Brasher *et al.*, 2000) sind durch gelbe Kreise markiert.

Obwohl die Acetylierung der Chromoshadow-Domäne lediglich bei HcpB direkt nachgewiesen werden konnte, zeigt der Phänotyp der HcpABKO-HcpA(K203R) Mutante, dass diese Modifikation sehr wahrscheinlich auch in HcpA vorhanden ist (siehe Kapitel 9.3.4). Dies ist aufgrund der hohen Sequenzkonservierung dieses Bereiches nicht überraschend (Kapitel 9.3.3, Abb. 47) und verdeutlicht die Wichtigkeit der Modifikation in *Dictyostelium discoideum*. Die Acetylierung von HP1-Proteinen wurde bereits im Menschen mit Hilfe von Antikörpern und Massenspektrometrie nachgewiesen (Lomberk *et al.*, 2006a; Leroy *et al.*, 2009). Allerdings konnte dieser Modifikation bislang keine biologische Relevanz zugeschrieben werden.

Wie das *Alignment* in Abbildung 65 zeigt, ist das in *D. discoideum* acetylierte Lysin ebenso in HP1-Proteinen von Mensch, Fliege und Spaltheife vorhanden und stellt somit auch dort ein potentielles Modifikationsziel dar. Interessant dabei ist, dass die in anderen Organismen in ihrer Funktion und Lokalisation unterschiedlichen HP1-Varianten diese Aminosäure nur zum Teil besitzen. Wie erst vor kurzem gezeigt wurde, ist zumindest das humane Protein HP1 α an genau dieser Stelle modifiziert. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um eine Acetylierung, sondern um die bislang für HP1 nicht beschriebene Formylierung, deren Funktion bislang weder für HP1 noch für andere Histone geklärt ist (Leroy *et al.*, 2009). Sowohl die Formylierung als auch die Acetylierung scheinen somit experimentell gesichert. Wie gezeigt wurde, führt die fehlende Acetylierung innerhalb der Chromoshadow-Domäne des *Dictyostelium*-Proteins HcpA zu ungewöhnlichen Sporen (Kapitel 9.3.4, Abb. 52-54), verzögertem Wachstum (Kapitel 9.3.4, Abb. 49) und kleineren Fruchtkörpern (Kapitel 9.3.4, Abb. 51).

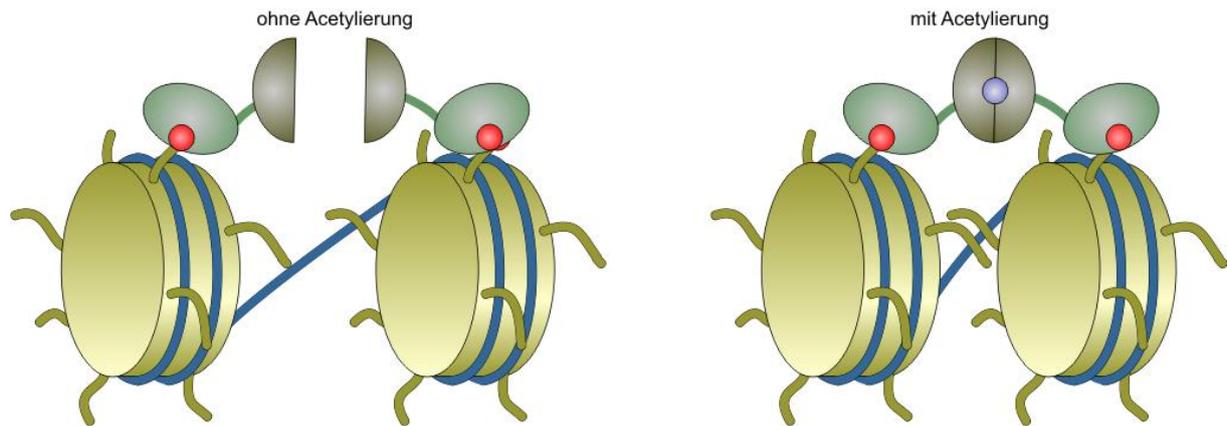


Abbildung 66: Modell einer möglichen Wirkungsweise der HP1-Acetylierung. Benachbarte, an H3K9me² (Roter Kreis) gebundene HP1-Proteine dimerisieren in Abhängigkeit vom Vorhandensein der Acetylierung (Blauer Kreis). Die Dimerisierung über die Chromoshadow-Domäne führt zu einer Kompaktierung des Chromatins und damit zur Stilllegung ansonsten zugänglicher Bereiche.

Der Phänotyp konnte mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems mit einer fehlenden Stilllegungsfunktion der HP1-Mutante in Verbindung gebracht werden (siehe Kapitel 9.3.5). Einen Hinweis auf die Ursache dieses Effekts gibt erneut die Position des acetylierten Lysins in direkter Nachbarschaft der für die Dimerisierung wichtigen Aminosäuren (Abbildung 65). Es ist somit wahrscheinlich, dass die Acetylierung in die Dimer-Bildung der HP1-Proteine eingreift, obwohl der Einfluss eines weiteren Faktors nicht ausgeschlossen werden kann. Die Beobachtung der schwächeren Dimerisierungsfähigkeit des in Spaltheefe vorkommenden Proteins Chp2 im Gegensatz zu Swi6 (Sadaie *et al.*, 2008) verstärkt diesen Verdacht, da nur das letztere ein modifizierbares Lysin an vergleichbarer Stelle trägt.

Abbildung 66 zeigt ein mögliches Modell, bei dem die fehlende Dimerisierung zu einem lockeren Chromatin führt. Eine fehlende Kompaktierung könnte zu einer verlangsamten Zellteilung führen, womit sich das beobachtete Wachstumsdefizit erklären ließe (Kapitel 9.3.4, Abb. 49). Fehler in der Mitose, wie die in *Drosophila melanogaster* beobachteten Anaphase-Brücken (Fanti *et al.*, 1998), konnten in diesem Zusammenhang jedoch nicht festgestellt werden (Kapitel 9.3.4, Abb. 56). Interessanterweise zeigten die HcpAB^{KO}-HcpA(K203R) Sporen eine große Ähnlichkeit mit denen diploider *Dictyostelium*-Stämme (Cotter und Hohl, 1969). Aufgrund mikroskopischer Untersuchungen konnte eine Diploidität als Ursache in diesem Fall allerdings ausgeschlossen werden (Kapitel 9.3.4, Abb. 55). Ein Grund für die Ähnlichkeit könnten jedoch vergrößerte Zellkerne durch die fehlende Kompaktierung auf der einen und dem doppelt vorhandenen DNA-Gehalt auf der anderen Seite sein. Eine erhöhte Expression heterochromatischer Gene wäre als Ursache ebenfalls denkbar. Weitere Experimente sollten diese Fragen klären und damit zur Interpretation dieser Beobachtung beitragen können.

11 Anhang

Tabelle 32: Quellen für Abbildung 62: Grafische Darstellung der Histon H3 Modifikationen im Vergleich.

AS	Dd H3a/b	Hs H3	Dm H3	Sc H3
R2me ²		(Hyllus <i>et al.</i> , 2007)		
T3p		(Garcia <i>et al.</i> , 2005)		
K4me	(Chubb <i>et al.</i> , 2006)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(Schubeler <i>et al.</i> , 2004)	(Roguev <i>et al.</i> , 2001)
K4me ²	(Chubb <i>et al.</i> , 2006)		(Schubeler <i>et al.</i> , 2004)	(Roguev <i>et al.</i> , 2001)
K4me ³	(Chubb <i>et al.</i> , 2006)		(Schubeler <i>et al.</i> , 2004)	(Roguev <i>et al.</i> , 2001)
K4ac		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		
K9me		(Garcia <i>et al.</i> , 2005)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K9me ²	diese Arbeit (K9)	(Garcia <i>et al.</i> , 2005)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	
K9me ³	(Manu Dubin, eingereicht)	(Garcia <i>et al.</i> , 2005)	(Ebert <i>et al.</i> , 2006)	
K9ac	diese Arbeit (K9)	(Garcia <i>et al.</i> , 2005)	(Ebert <i>et al.</i> , 2006)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
S10p	(Li <i>et al.</i> , 2008a)	(Garcia <i>et al.</i> , 2005)	(Schubeler <i>et al.</i> , 2004)	(Hsu <i>et al.</i> , 2000)
T11p		(Preuss <i>et al.</i> , 2003)		
K14me			(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	
K14me ²			(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K14me ³	diese Arbeit (K14)			
K14ac	diese Arbeit (K14)	(Garcia <i>et al.</i> , 2005)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
R17me ²		(Miao <i>et al.</i> , 2006)		
K18me		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K18ac		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K23me		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K23ac		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K27me	diese Arbeit (K27)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	
K27me ²		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	
K27me ³		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K27ac	diese Arbeit (K27)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
S28p		(Garcia <i>et al.</i> , 2005)		
K36me	diese Arbeit (K36)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K36me ²	diese Arbeit (K39)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K36me ³		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(Ebert <i>et al.</i> , 2006)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K36ac	diese Arbeit (K36)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K37me	diese Arbeit (K37/40)	(Coon <i>et al.</i> , 2005)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	
K37me ²	diese Arbeit (K37/40)		(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	
K37me ³	diese Arbeit (K40)			
K37ac	diese Arbeit (K37/40)			
R40me ²	diese Arbeit (R43)			

R42me ²	diese Arbeit (R45)			
K56me		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		
K56me ³		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		
K56ac		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K63me	diese Arbeit (K63)			
K63me ²	diese Arbeit (K63)			
K64me	diese Arbeit (K64)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		
K64me ²	diese Arbeit (K64)			
K64ac				(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K79me	diese Arbeit (K79/82)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K79me ²	diese Arbeit (K82)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)	(McKittrick <i>et al.</i> , 2004)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K79me ³				(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K79ac		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		
T80p	diese Arbeit (T80/83)			
S86p	diese Arbeit (S89)			
K122me	diese Arbeit (K125)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		

Tabelle 33: Quellen für Abbildung 63: Grafische Darstellung der Histon H2Bv3 Modifikationen im Vergleich.

AS	Dd H2Bv3	Hs H2Bc	Dm H2B	Sc H2B2
K3ac				(Nathan <i>et al.</i> , 2006)
K4ac				(Nathan <i>et al.</i> , 2006)
K5ac		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
S6p		(Gauci <i>et al.</i> , 2009)		
S7p				(Ahn <i>et al.</i> , 2005)
K8ac				(Suka <i>et al.</i> , 2001)
K11ac		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K12ac		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K13ac				(Nathan <i>et al.</i> , 2006)
S14p		(Cheung <i>et al.</i> , 2003)		
K15ac		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K16ac		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K20ac		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K-me ²	diese Arbeit (K30)			
K23ac		(Kim <i>et al.</i> , 2006)		
T/S36p			(Maile <i>et al.</i> , 2004)	(Chi <i>et al.</i> , 2007)
S38p				(Albuquerque <i>et al.</i> , 2008)
K46me		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K-me	diese Arbeit (K68)			

K-me ²	diese Arbeit (K76)			
K57me ²		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K82me ²	diese Arbeit (K107)			
K82ac	diese Arbeit (K107)			
R92me ²	diese Arbeit (R117)			
K108me		(Beck <i>et al.</i> , 2006)		
K108ac		(Kim <i>et al.</i> , 2006)		

Tabelle 34: Quellen für Abbildung 64: Grafische Darstellung der Histon H4 Modifikationen im Vergleich.

AS	Dd H4	Hs H4	Dm H4	Sc H4
S1p		(Bonenfant <i>et al.</i> , 2006)		
R3me		(Strahl <i>et al.</i> , 2001)		
K-ac	diese Arbeit (K9)			
K5ac		(Bonenfant <i>et al.</i> , 2006)	(Ivanovska <i>et al.</i> , 2005)	(Suka <i>et al.</i> , 2001)
K8me ²	diese Arbeit (K13)			
K8me ³	diese Arbeit (K13)			
K8ac	diese Arbeit (K13)	(Bonenfant <i>et al.</i> , 2006)	(Grau <i>et al.</i> , 2008)	(Suka <i>et al.</i> , 2001)
K8bi		(Camporeale <i>et al.</i> , 2004)		
K12ac	diese Arbeit (K17)	(Bonenfant <i>et al.</i> , 2006)	(Ivanovska <i>et al.</i> , 2005)	(Suka <i>et al.</i> , 2001)
K12bi	diese Arbeit (K17)	(Camporeale <i>et al.</i> , 2004)		
K16ac	diese Arbeit (K21)	(Pesavento <i>et al.</i> , 2008)	(Grau <i>et al.</i> , 2008)	(Suka <i>et al.</i> , 2001)
K20me		(Bonenfant <i>et al.</i> , 2006)	(Ebert <i>et al.</i> , 2006)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K20me ²		(Bonenfant <i>et al.</i> , 2006)	(Ebert <i>et al.</i> , 2006)	(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K20me ³		(Bonenfant <i>et al.</i> , 2006)	(Ebert <i>et al.</i> , 2006)	
K20ac				(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K31me		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)		(Garcia <i>et al.</i> , 2007)
K31ac		(Choudhary <i>et al.</i> , 2009)		
S47p		(Olsen <i>et al.</i> , 2006)		(Albuquerque <i>et al.</i> , 2008)
R55me	diese Arbeit (R60)			
K59ac		(Choudhary <i>et al.</i> , 2009)		
S60p				(Albuquerque <i>et al.</i> , 2008)
S64p				(Chi <i>et al.</i> , 2007)
R78me	diese Arbeit (R83)			
T80p			(Zhai <i>et al.</i> , 2008)	
T82p			(Zhai <i>et al.</i> , 2008)	
K91ac		(Yan <i>et al.</i> , 2009)		

12 Referenzen

- Ahn, S.H., Cheung, W.L., Hsu, J.Y., Diaz, R.L., Smith, M.M. und Allis, C.D. (2005) Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, **120**, 25-36.
- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J. und Zhou, H. (2008) A multi-dimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 1389-1396.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. und Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 786-794.
- Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P.B. und Kellum, R. (2005) Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma*, **113**, 370-384.
- Bakke, A.C. und Bonner, J. (1979) Purification and the histones of *Dictyostelium discoideum* chromatin. *Biochemistry*, **18**, 4556-4562.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. und Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Beck, H.C., Nielsen, E.C., Matthiesen, R., Jensen, L.H., Sehested, M., Finn, P., Grauslund, M., Hansen, A.M. und Jensen, O.N. (2006) Quantitative proteomic analysis of post-translational modifications of human histones. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 1314-1325.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J. und Woodcock, C.L. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14173-14178.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L. und Lander, E.S. (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, **120**, 169-181.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Black, B.E. und Bassett, E.A. (2008) The histone variant CENP-A and centromere specification. *Curr Opin Cell Biol*, **20**, 91-100.
- Bolt, G., Kristensen, C. und Steenstrup, T.D. (2005) Posttranslational N-glycosylation takes place during the normal processing of human coagulation factor VII. *Glycobiology*, **15**, 541-547.
- Bonenfant, D., Coulot, M., Towbin, H., Schindler, P. und van Oostrum, J. (2006) Characterization of histone H2A and H2B variants and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 541-552.

- Brand, A.H. und Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.
- Branscombe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z., Pestka, S. und Clarke, S. (2001) PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J Biol Chem*, **276**, 32971-32976.
- Brasher, S.V., Smith, B.O., Fogh, R.H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P.R., Broadhurst, R.W., Ball, L.J., Murzina, N.V. und Laue, E.D. (2000) The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *Embo J*, **19**, 1587-1597.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. und Allis, C.D. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, **84**, 843-851.
- Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J.L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P. und Losson, R. (2002) Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J Cell Sci*, **115**, 3439-3448.
- Camporeale, G., Shubert, E.E., Sarath, G., Cerny, R. und Zempleni, J. (2004) K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *Eur J Biochem*, **271**, 2257-2263.
- Chadwick, B.P. und Willard, H.F. (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*, **152**, 375-384.
- Charette, S.J. und Cosson, P. (2004) Preparation of genomic DNA from Dictyostelium discoideum for PCR analysis. *Biotechniques*, **36**, 574-575.
- Charlesworth, M.C. und Parish, R.W. (1975) The isolation of nuclei and basic nucleoproteins from the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Eur J Biochem*, **54**, 307-316.
- Charlesworth, M.C. und Parish, R.W. (1977) Further studies on basic nucleoproteins from the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Eur J Biochem*, **75**, 241-250.
- Chen, C.C., Carson, J.J., Feser, J., Tamburini, B., Zabaronick, S., Linger, J. und Tyler, J.K. (2008) Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair. *Cell*, **134**, 231-243.
- Cheung, W.L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C.A., Beeser, A., Etkin, L.D., Chernoff, J., Earnshaw, W.C. und Allis, C.D. (2003) Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, **113**, 507-517.
- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L.Y., Coon, J.J., Syka, J.E., Bai, D.L., Shabanowitz, J., Burke, D.J., Troyanskaya, O.G. und Hunt, D.F. (2007) Analysis of phosphorylation sites on proteins from Saccharomyces cerevisiae by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2193-2198.
- Choo, J.H., Kim, J.D., Chung, J.H., Stubbs, L. und Kim, J. (2006) Allele-specific deposition of macroH2A1 in imprinting control regions. *Hum Mol Genet*, **15**, 717-724.

- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V. und Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, **325**, 834-840.
- Chubb, J.R., Bloomfield, G., Xu, Q., Kaller, M., Ivens, A., Skelton, J., Turner, B.M., Nellen, W., Shaulsky, G., Kay, R.R., Bickmore, W.A. und Singer, R.H. (2006) Developmental timing in *Dictyostelium* is regulated by the Set1 histone methyltransferase. *Dev Biol*, **292**, 519-532.
- Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9677-9686.
- Clements, A., Poux, A.N., Lo, W.S., Pillus, L., Berger, S.L. und Marmorstein, R. (2003) Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol Cell*, **12**, 461-473.
- Cohen, S.M., Cappello, J. und Lodish, H.F. (1984) Transcription of *Dictyostelium discoideum* transposable element DIRS-1. *Mol Cell Biol*, **4**, 2332-2340.
- Coon, J.J., Ueberheide, B., Syka, J.E., Dryhurst, D.D., Ausio, J., Shabanowitz, J. und Hunt, D.F. (2005) Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9463-9468.
- Costanzi, C. und Pehrson, J.R. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, **393**, 599-601.
- Costelloe, T. und Lowndes, N.F. (2010) Chromatin assembly and signalling the end of DNA repair requires acetylation of histone h3 on lysine 56. *Subcell Biochem*, **50**, 43-54.
- Cotter, D.A. und Hohl, H.R. (1969) Correlation between plaque size and spore size in *Dictyostelium discoideum*. *J Bacteriol*, **98**, 321-322.
- Cowieson, N.P., Partridge, J.F., Allshire, R.C. und McLaughlin, P.J. (2000) Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol*, **10**, 517-525.
- Cox, E.C., Vocke, C.D., Walter, S., Gregg, K.Y. und Bain, E.S. (1990) Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8247-8251.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J. und Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, **118**, 545-553.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W. und Richmond, T.J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, **319**, 1097-1113.
- Dernburg, A.F., Broman, K.W., Fung, J.C., Marshall, W.F., Philips, J., Agard, D.A. und Sedat, J.W. (1996) Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, **85**, 745-759.

- Dlakic, M. (2001) Chromatin silencing protein and pachytene checkpoint regulator Dot1p has a methyltransferase fold. *Trends Biochem Sci*, **26**, 405-407.
- Ebert, A., Lein, S., Schotta, G. und Reuter, G. (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res*, **14**, 377-392.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. und Jones, P.A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, **429**, 457-463.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., *et al.* (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435**, 43-57.
- Eissenberg, J.C., Ge, Y.W. und Hartnett, T. (1994) Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem*, **269**, 21315-21321.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V. und Elgin, S.C. (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9923-9927.
- Elliott, D.A. und Brand, A.H. (2008) The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol*, **420**, 79-95.
- Essid, M. (2004) Untersuchungen zur Funktion der Histon3-Lysin9 Methyltransferase SuvA in *Dictyostelium discoideum*. *Diplomarbeit*, Universität Kassel, Abteilung Genetik.
- Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J. und Lyons, I. (2001) Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol*, **11**, 1183-1187.
- Faix, J., Kreppel, L., Shaulsky, G., Schleicher, M. und Kimmel, A.R. (2004) A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res*, **32**, e143.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M. und Pimpinelli, S. (1998) The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell*, **2**, 527-538.
- Fey, P., Gaudet, P., Curk, T., Zupan, B., Just, E.M., Basu, S., Merchant, S.N., Bushmanova, Y.A., Shaulsky, G., Kibbe, W.A. und Chisholm, R.L. (2009) dictyBase--a *Dictyostelium* bioinformatics resource update. *Nucleic Acids Res*, **37**, D515-519.
- Fischle, W. (2008) Talk is cheap--cross-talk in establishment, maintenance, and readout of chromatin modifications. *Genes Dev*, **22**, 3375-3382.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H. und Allis, C.D. (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, **438**, 1116-1122.

- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D. und Khorasanizadeh, S. (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*, **17**, 1870-1881.
- Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F. und Khorasanizadeh, S. (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, **438**, 1181-1185.
- Földesi, B. (2005) Funktionelle Analyse von Heterochromatin Proteinen in *Dictyostelium discoideum*. *Diplomarbeit*, Universität Kassel, Abteilung Genetik.
- Freim, J.O., Jr. und Deering, R.A. (1970) Ultraviolet irradiation of the vegetative cells of *Dictyostelium discoideum*. *J Bacteriol*, **102**, 36-42.
- Gao, X., Hou, Y., Ebina, H., Levin, H.L. und Voytas, D.F. (2008) Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. *Genome Res*, **18**, 359-369.
- Garcia, B.A., Barber, C.M., Hake, S.B., Ptak, C., Turner, F.B., Busby, S.A., Shabanowitz, J., Moran, R.G., Allis, C.D. und Hunt, D.F. (2005) Modifications of human histone H3 variants during mitosis. *Biochemistry*, **44**, 13202-13213.
- Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Kauer, M., Morris, S.A., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B.D., Allis, C.D. und Hunt, D.F. (2007) Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem*, **282**, 7641-7655.
- Gary, J.D., Lin, W.J., Yang, M.C., Herschman, H.R. und Clarke, S. (1996) The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **271**, 12585-12594.
- Gauci, S., Helbig, A.O., Slijper, M., Krijgsveld, J., Heck, A.J. und Mohammed, S. (2009) Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Anal Chem*, **81**, 4493-4501.
- Geier, A., Horn, J., Dingermann, T. und Winckler, T. (1996) A nuclear protein factor binds specifically to the 3'-regulatory module of the long-interspersed-nuclear-element-like *Dictyostelium* repetitive element. *Eur J Biochem*, **241**, 70-76.
- Giniger, E., Varnum, S.M. und Ptashne, M. (1985) Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, **40**, 767-774.
- Girard, A. und Hannon, G.J. (2008) Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control. *Trends Cell Biol*, **18**, 136-148.
- Glockner, G. und Heidel, A.J. (2009) Centromere sequence and dynamics in *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res*, **37**, 1809-1816.
- Glockner, G., Szafranski, K., Winckler, T., Dingermann, T., Quail, M.A., Cox, E., Eichinger, L., Noegel, A.A. und Rosenthal, A. (2001) The complex repeats of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Res*, **11**, 585-594.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. und Workman, J.L. (1997) Yeast Gcn5

- functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*, **11**, 1640-1650.
- Grau, B., Popescu, C., Torroja, L., Ortuno-Sahagun, D., Boros, I. und Ferrus, A. (2008) Transcriptional adaptor ADA3 of *Drosophila melanogaster* is required for histone modification, position effect variegation, and transcription. *Mol Cell Biol*, **28**, 376-385.
- Grewal, S.I. und Elgin, S.C. (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, **447**, 399-406.
- Hacques, M.F., Muller, S., De Murcia, G., Van Regenmortel, M.H. und Marion, C. (1990) Accessibility and structural role of histone domains in chromatin. biophysical and immunochemical studies of progressive digestion with immobilized proteases. *J Biomol Struct Dyn*, **8**, 619-641.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Duncan, E.M., Kauer, M., Dellaire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D. und Hunt, D.F. (2006) Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem*, **281**, 559-568.
- Hayashi, M.T., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Nakayama, J. und Masukata, H. (2009) The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus. *Nat Cell Biol*, **11**, 357-362.
- Heitz, E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik*, **69**, 762-818.
- Hinas, A., Reimegard, J., Wagner, E.G., Nellen, W., Ambros, V.R. und Soderbom, F. (2007) The small RNA repertoire of *Dictyostelium discoideum* and its regulation by components of the RNAi pathway. *Nucleic Acids Res*, **35**, 6714-6726.
- Honda, S. und Selker, E.U. (2008) Direct interaction between DNA methyltransferase DIM-2 and HP1 is required for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, **28**, 6044-6055.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. und Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Huang, D.W., Fanti, L., Pak, D.T., Botchan, M.R., Pimpinelli, S. und Kellum, R. (1998) Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol*, **142**, 307-318.
- Hudson, J.J., Hsu, D.W., Guo, K., Zhukovskaya, N., Liu, P.H., Williams, J.G., Pears, C.J. und Lakin, N.D. (2005) DNA-PKcs-dependent signaling of DNA damage in *Dictyostelium discoideum*. *Curr Biol*, **15**, 1880-1885.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J. und Matzke, M. (2006) Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. *Embo J*, **25**, 2828-2836.

- Hwang, K.K., Eissenberg, J.C. und Worman, H.J. (2001) Transcriptional repression of euchromatic genes by Drosophila heterochromatin protein 1 and histone modifiers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11423-11427.
- Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J. und Bauer, U.M. (2007) PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev*, **21**, 3369-3380.
- Insall, R. (2005) The Dictyostelium genome: the private life of a social model revealed? *Genome Biol*, **6**, 222.
- Ivanovska, I., Khandan, T., Ito, T. und Orr-Weaver, T.L. (2005) A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in Drosophila oocytes. *Genes Dev*, **19**, 2571-2582.
- Jacobs, S.A. und Khorasanizadeh, S. (2002) Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science*, **295**, 2080-2083.
- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C.D. und Khorasanizadeh, S. (2001) Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J*, **20**, 5232-5241.
- James, T.C. und Elgin, S.C. (1986) Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene. *Mol Cell Biol*, **6**, 3862-3872.
- Janzen, C.J., Fernandez, J.P., Deng, H., Diaz, R., Hake, S.B. und Cross, G.A. (2006) Unusual histone modifications in Trypanosoma brucei. *FEBS Lett*, **580**, 2306-2310.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R. und Reuter, G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 80-93.
- Jiang, T., Zhou, X., Taghizadeh, K., Dong, M. und Dedon, P.C. (2007) N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 60-65.
- Jin, C. und Felsenfeld, G. (2007) Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev*, **21**, 1519-1529.
- Kaller, M. (2006) Heterochromatin und epigenetische Kontrolle der Centromere in Dictyostelium discoideum. *Dissertation*, Universität Kassel, Abteilung Genetik.
- Kaller, M., Euteneuer, U. und Nellen, W. (2006) Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in Dictyostelium discoideum. *Eukaryot Cell*, **5**, 530-543.
- Kaller, M., Foldesi, B. und Nellen, W. (2007) Localization and organization of protein factors involved in chromosome inheritance in Dictyostelium discoideum. *Biol Chem*, **388**, 355-365.
- Kanda, T., Sullivan, K.F. und Wahl, G.M. (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol*, **8**, 377-385.

- Ke, N., Irwin, P.A. und Voytas, D.F. (1997) The pheromone response pathway activates transcription of Ty5 retrotransposons located within silent chromatin of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **16**, 6272-6280.
- Kelley, R.I. (1973) Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **54**, 1588-1594.
- Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N.V., White, M., Yang, X.J. und Zhao, Y. (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*, **23**, 607-618.
- King, J. und Insall, R.H. (2003) Parasexual genetics of *Dictyostelium* gene disruptions: identification of a ras pathway using diploids. *BMC Genet*, **4**, 12.
- Klose, R.J., Kallin, E.M. und Zhang, Y. (2006a) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*, **7**, 715-727.
- Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. und Zhang, Y. (2006b) The transcriptional repressor JHD3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*, **442**, 312-316.
- Kornberg, R.D. und Thomas, J.O. (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, **184**, 865-868.
- Kossel, A. (1884) Über einen peptoartigen Bestandteil des Zellkern. *Z. Physiol. Chem.*, **8**, 511-515.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Kreppel, L., Fey, P., Gaudet, P., Just, E., Kibbe, W.A., Chisholm, R.L. und Kimmel, A.R. (2004) dictyBase: a new *Dictyostelium discoideum* genome database. *Nucleic Acids Res*, **32**, D332-333.
- Kuhlmann, M., Borisova, B.E., Kaller, M., Larsson, P., Stach, D., Na, J., Eichinger, L., Lyko, F., Ambros, V., Soderbom, F., Hammann, C. und Nellen, W. (2005) Silencing of retrotransposons in *Dictyostelium* by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6405-6417.
- Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E. und Allis, C.D. (1998) Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev*, **12**, 627-639.
- Kuspa, A., Maghakian, D., Bergesch, P. und Loomis, W.F. (1992) Physical mapping of genes to specific chromosomes in *Dictyostelium discoideum*. *Genomics*, **13**, 49-61.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. und Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.

- Lankenau, S., Corces, V.G. und Lankenau, D.H. (1994) The *Drosophila micropia* retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*, **14**, 1764-1775.
- Lechner, M.S., Schultz, D.C., Negorev, D., Maul, G.G. und Rauscher, F.J., 3rd. (2005) The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 929-937.
- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N. und Shiekhattar, R. (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, **437**, 432-435.
- Leng, P., Klatt, D.H., Schumann, G., Boeke, J.D. und Steck, T.L. (1998) Skipper, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2008-2015.
- Leroy, G., Weston, J.T., Zee, B.M., Young, N.L., Plazas-Mayorca, M.D. und Garcia, B.A. (2009) Heterochromatin protein 1 is extensively decorated with histone code-like post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics*.
- Levi, S., Polyakov, M. und Egelhoff, T.T. (2000) Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid*, **44**, 231-238.
- Li, H., Chen, Q., Kaller, M., Nellen, W., Graf, R. und De Lozanne, A. (2008a) *Dictyostelium* Aurora kinase has properties of both Aurora A and Aurora B kinases. *Eukaryot Cell*, **7**, 894-905.
- Li, H., Taverna, S.D., Ruthenburg, A.J., Patel, D.J. und Allis, C.D. (2007) Readout of chromatin marks by histone-binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Li, Q., Zhou, H., Wurtele, H., Davies, B., Horazdovsky, B., Verreault, A. und Zhang, Z. (2008b) Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell*, **134**, 244-255.
- Li, Y., Danzer, J.R., Alvarez, P., Belmont, A.S. und Wallrath, L.L. (2003) Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development*, **130**, 1817-1824.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S. und Dekker, J. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, **326**, 289-293.
- Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S. und Herschman, H.R. (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem*, **271**, 15034-15044.
- Loidl, P. (1994) Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma*, **103**, 441-449.
- Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M.E. und Urrutia, R. (2006a) Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol*, **8**, 407-415.

- Lomberk, G., Wallrath, L. und Urrutia, R. (2006b) The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol*, **7**, 228.
- Loomis, W.F., Welker, D., Hughes, J., Maghakian, D. und Kuspa, A. (1995) Integrated maps of the chromosomes in *Dictyostelium discoideum*. *Genetics*, **141**, 147-157.
- Lu, B.Y., Emtage, P.C., Duyf, B.J., Hilliker, A.J. und Eissenberg, J.C. (2000) Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics*, **155**, 699-708.
- Lu, Q., Wallrath, L.L. und Elgin, S.C. (1995) The role of a positioned nucleosome at the *Drosophila melanogaster* hsp26 promoter. *Embo J*, **14**, 4738-4746.
- Lucas, J., Bilzer, A., Moll, L., Zundorf, I., Dingermann, T., Eichinger, L., Siol, O. und Winckler, T. (2009) The carboxy-terminal domain of *Dictyostelium* C-module-binding factor is an independent gene regulatory entity. *PLoS One*, **4**, e5012.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Luijsterburg, M.S., Dinant, C., Lans, H., Stap, J., Wiernasz, E., Lagerwerf, S., Warmerdam, D.O., Lindh, M., Brink, M.C., Dobrucki, J.W., Aten, J.A., Foustari, M.I., Jansen, G., Dantuma, N.P., Vermeulen, W., Mullenders, L.H., Houtsmuller, A.B., Verschure, P.J. und van Driel, R. (2009) Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol*, **185**, 577-586.
- Maile, T., Kwoczyński, S., Katzenberger, R.J., Wassarman, D.A. und Sauer, F. (2004) TAF1 activates transcription by phosphorylation of serine 33 in histone H2B. *Science*, **304**, 1010-1014.
- Malchow, D., Nagele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G. (1972) Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem*, **28**, 136-142.
- Mandava, V., Fernandez, J.P., Deng, H., Janzen, C.J., Hake, S.B. und Cross, G.A. (2007) Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **156**, 41-50.
- Maniak, M. und Nellen, W. (1991) 3' processing in *Dictyostelium*: unusual sequence requirements and interaction with a downstream promoter. *Mol Microbiol*, **5**, 245-251.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. und Gerisch, G. (1995) Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*, **83**, 915-924.
- Maniak, M., Saur, U. und Nellen, W. (1989) A colony-blot technique for the detection of specific transcripts in eukaryotes. *Anal Biochem*, **176**, 78-81.
- Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R. und Verreault, A. (2005) A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature*, **436**, 294-298.

- Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M. und Muchardt, C. (2004) Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep*, **5**, 490-496.
- McKittrick, E., Gafken, P.R., Ahmad, K. und Henikoff, S. (2004) Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1525-1530.
- Meima, M.E., Weening, K.E. und Schaap, P. (2007) Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in Dictyostelium. *Protein Expr Purif*, **53**, 283-288.
- Mersfelder, E.L. und Parthun, M.R. (2006) The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res*, **34**, 2653-2662.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Gunther, T., Buettnner, R. und Schule, R. (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, **437**, 436-439.
- Miao, F., Li, S., Chavez, V., Lanting, L. und Natarajan, R. (2006) Coactivator-associated arginine methyltransferase-1 enhances nuclear factor-kappaB-mediated gene transcription through methylation of histone H3 at arginine 17. *Mol Endocrinol*, **20**, 1562-1573.
- Min, J., Zhang, Y. und Xu, R.M. (2003) Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev*, **17**, 1823-1828.
- Minc, E., Allory, Y., Worman, H.J., Courvalin, J.C. und Buendia, B. (1999) Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma*, **108**, 220-234.
- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J.S., Trouche, D., Dejean, A. und Yaniv, M. (2002) Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep*, **3**, 975-981.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Murray, K. (1964) The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry*, **3**, 10-15.
- Nakagawa, H., Lee, J.K., Hurwitz, J., Allshire, R.C., Nakayama, J., Grewal, S.I., Tanaka, K. und Murakami, Y. (2002) Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev*, **16**, 1766-1778.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., Johnson, E.S. und Berger, S.L. (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev*, **20**, 966-976.

- Ng, H.H., Ciccone, D.N., Morshead, K.B., Oettinger, M.A. und Struhl, K. (2003) Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1820-1825.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V. und Laue, E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, **416**, 103-107.
- Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., Lis, J.T., Allis, C.D. und 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.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I. und Watanabe, Y. (2002) Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, **4**, 89-93.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. und Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, **127**, 635-648.
- Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P. und Travers, A.A. (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J*, **19**, 6141-6149.
- Paik, W.K., Paik, D.C. und Kim, S. (2007) Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem Sci*, **32**, 146-152.
- Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D.W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P. und Botchan, M.R. (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*, **91**, 311-323.
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., Turano, C., Ferraro, A. und Pimpinelli, S. (2004) HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell*, **15**, 467-476.
- Pesavento, J.J., Yang, H., Kelleher, N.L. und Mizzen, C.A. (2008) Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **28**, 468-486.
- Peters, D.M., Griffin, J.B., Stanley, J.S., Beck, M.M. und Zemleni, J. (2002) Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C878-884.
- Piacentini, L., Fanti, L., Berloco, M., Perrini, B. und Pimpinelli, S. (2003) Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol*, **161**, 707-714.
- Popova, B., Kuhlmann, M., Hinas, A., Soderbom, F. und Nellen, W. (2006) HelF, a putative RNA helicase acts as a nuclear suppressor of RNAi but not antisense mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res*, **34**, 773-784.

- Preuss, U., Landsberg, G. und Scheidtmann, K.H. (2003) Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res*, **31**, 878-885.
- Raper, K. (1935) *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J Agr Res*, **50**, 135-147.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. und Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. und Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 162-169.
- Reuter, G. und Spierer, P. (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays*, **14**, 605-612.
- Rice, J.C., Briggs, S.D., Ueberheide, B., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Shinkai, Y. und Allis, C.D. (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell*, **12**, 1591-1598.
- Richmond, T.J. und Davey, C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, **423**, 145-150.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. und Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, **17**, 1030-1032.
- Roark, D.E., Geoghegan, T.E. und Keller, G.H. (1974) A two-subunit histone complex from calf thymus. *Biochem Biophys Res Commun*, **59**, 542-547.
- Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R. und Stewart, A.F. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *Embo J*, **20**, 7137-7148.
- Rosen, E., Sivertsen, A. und Firtel, R.A. (1983) An unusual transposon encoding heat shock inducible and developmentally regulated transcripts in *Dictyostelium*. *Cell*, **35**, 243-251.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M.C. und Leonhardt, H. (2008) A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 282-289.
- Sadaie, M., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Arisaka, F., Tanaka, K., Shirahige, K. und Nakayama, J. (2008) Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol Cell Biol*, **28**, 6973-6988.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- SanMiguel, P., Gaut, B.S., Tikhonov, A., Nakajima, Y. und Bennetzen, J.L. (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet*, **20**, 43-45.

- Schubeler, D., MacAlpine, D.M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D.E., O'Neill, L.P., Turner, B.M., Delrow, J., Bell, S.P. und Groudine, M. (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev*, **18**, 1263-1271.
- Segal, E. und Widom, J. (2009) What controls nucleosome positions? *Trends Genet*, **25**, 335-343.
- Sewell, E. und Kinsey, J.A. (1996) Tad, a Neurospora LINE-like retrotransposon exhibits a complex pattern of transcription. *Mol Gen Genet*, **252**, 137-145.
- Sharma, G.G., Hwang, K.K., Pandita, R.K., Gupta, A., Dhar, S., Parenteau, J., Agarwal, M., Worman, H.J., Wellinger, R.J. und Pandita, T.K. (2003) Human heterochromatin protein 1 isoforms HP1(Hsalph) and HP1(Hsbeta) interfere with hTERT-telomere interactions and correlate with changes in cell growth and response to ionizing radiation. *Mol Cell Biol*, **23**, 8363-8376.
- Shaulsky, G. und Kessin, R.H. (2007) The cold war of the social amoebae. *Curr Biol*, **17**, R684-692.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D. und Hake, S.B. (2007) Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc*, **2**, 1445-1457.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. und Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
- Shimada, A., Dohke, K., Sadaie, M., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Urano, T. und Murakami, Y. (2009) Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. *Genes Dev*, **23**, 18-23.
- Singleton, C.K., Delude, R.L. und McPherson, C.E. (1987) Characterization of genes which are deactivated upon the onset of development in Dictyostelium discoideum. *Dev Biol*, **119**, 433-441.
- Smothers, J.F. und Henikoff, S. (2000) The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol*, **10**, 27-30.
- Smothers, J.F. und Henikoff, S. (2001) The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol*, **21**, 2555-2569.
- Stewart, M.D., Li, J. und Wong, J. (2005) Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*, **25**, 2525-2538.
- Strahl, B.D. und Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Koh, S.S., Ma, H., Cook, R.G., Shabano-witz, J., Hunt, D.F., Stallcup, M.R. und Allis, C.D. (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.

- Sucgang, R., Chen, G., Liu, W., Lindsay, R., Lu, J., Muzny, D., Shaulsky, G., Loomis, W., Gibbs, R. und Kuspa, A. (2003) Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2361-2368.
- Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. und Grewal, S.I. (2005) RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 152-157.
- Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J. und Grunstein, M. (2001) Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell*, **8**, 473-479.
- Sullivan, S., Sink, D.W., Trout, K.L., Makalowska, I., Taylor, P.M., Baxeavanis, A.D. und Landsman, D. (2002) The Histone Database. *Nucleic Acids Res*, **30**, 341-342.
- Sun, B., Hong, J., Zhang, P., Dong, X., Shen, X., Lin, D. und Ding, J. (2008) Molecular basis of the interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Eaf3 chromo domain with methylated H3K36. *J Biol Chem*, **283**, 36504-36512.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J. und Luger, K. (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol*, **7**, 1121-1124.
- Sutoh, K. (1993) A transformation vector for *dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid*, **30**, 150-154.
- Taunton, J., Hassig, C.A. und Schreiber, S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272**, 408-411.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D. und Patel, D.J. (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1025-1040.
- Thiriet, C. und Hayes, J.J. (2005) Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell*, **18**, 617-622.
- Trewick, S.C., McLaughlin, P.J. und Allshire, R.C. (2005) Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep*, **6**, 315-320.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. und 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.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. und Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **439**, 811-816.
- van Daal, A. und Elgin, S.C. (1992) A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell*, **3**, 593-602.
- Van Driessche, N., Shaw, C., Katoh, M., Morio, T., Sucgang, R., Ibarra, M., Kuwayama, H., Saito, T., Urushihara, H., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H., Eaton, W., Tollett, J., Halter, J.,

- Kuspa, A., Tanaka, Y. und Shaulsky, G. (2002) A transcriptional profile of multicellular development in *Dictyostelium discoideum*. *Development*, **129**, 1543-1552.
- Wang, L., Liu, L. und Berger, S.L. (1998) Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev*, **12**, 640-653.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., Roeder, R.G., Clarke, S., Stallcup, M.R., Allis, C.D. und Coonrod, S.A. (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science*, **306**, 279-283.
- Watson, J.D. und Crick, F.H. (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **18**, 123-131.
- Watts, D.J. und Ashworth, J.M. (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J*, **119**, 171-174.
- West, R.W., Jr., Yocum, R.R. und Ptashne, M. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol Cell Biol*, **4**, 2467-2478.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Kruger, S. und Mann, M. (2007) Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 72-87.
- Witke, W., Nellen, W. und Noegel, A. (1987) Homologous recombination in the *Dictyostelium* alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. *Embo J*, **6**, 4143-4148.
- Wu, R., Terry, A.V., Singh, P.B. und Gilbert, D.M. (2005) Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Mol Biol Cell*, **16**, 2872-2881.
- Wyrick, J.J., Holstege, F.C., Jennings, E.G., Causton, H.C., Shore, D., Grunstein, M., Lander, E.S. und Young, R.A. (1999) Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature*, **402**, 418-421.
- Xu, C., Cui, G., Botuyan, M.V. und Mer, G. (2008) Structural basis for the recognition of methylated histone H3K36 by the Eaf3 subunit of histone deacetylase complex Rpd3S. *Structure*, **16**, 1740-1750.
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. und Zhang, Y. (2006) JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, **125**, 483-495.
- Yan, Q., Dutt, S., Xu, R., Graves, K., Juszczynski, P., Manis, J.P. und Shipp, M.A. (2009) BBAP monoubiquitylates histone H4 at lysine 91 and selectively modulates the DNA damage response. *Mol Cell*, **36**, 110-120.
- Yasuhara, J.C. und Wakimoto, B.T. (2006) Oxymoron no more: the expanding world of heterochromatic genes. *Trends Genet*, **22**, 330-338.

- Ye, J., Ai, X., Eugeni, E.E., Zhang, L., Carpenter, L.R., Jelinek, M.A., Freitas, M.A. und Parthun, M.R. (2005) Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Mol Cell*, **18**, 123-130.
- Zarebski, M., Wiernasz, E. und Dobrucki, J.W. (2009) Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites. *Cytometry A*, **75**, 619-625.
- Zhai, B., Villen, J., Beausoleil, S.A., Mintseris, J. und Gygi, S.P. (2008) Phosphoproteome analysis of *Drosophila melanogaster* embryos. *J Proteome Res*, **7**, 1675-1682.
- Zhang, K., Williams, K.E., Huang, L., Yau, P., Siino, J.S., Bradbury, E.M., Jones, P.R., Minch, M.J. und Burlingame, A.L. (2002) Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 500-508.
- Zhao, T. und Eissenberg, J.C. (1999) Phosphorylation of heterochromatin protein 1 by casein kinase II is required for efficient heterochromatin binding in *Drosophila*. *J Biol Chem*, **274**, 15095-15100.
- Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C.D. und Eissenberg, J.C. (2000) Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem*, **275**, 28332-28338.
- Zhao, T., Heyduk, T. und Eissenberg, J.C. (2001) Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem*, **276**, 9512-9518.
- Zuker, C., Cappello, J., Lodish, H.F., George, P. und Chung, S. (1984) *Dictyostelium* transposable element DIRS-1 has 350-base-pair inverted terminal repeats that contain a heat shock promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2660-2664.