

Heterochromatin Protein 1

Struktur und Interaktionen mit Chromatin

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades eines Master of Science

vorgelegt von
Sabine Kaltofen
aus Großschönau

angefertigt vom 1.10. 2007-30.3. 2008
am Deutschen Krebsforschungszentrum

Betreuer: PD Dr. Karsten Rippe

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Spatz (Universität Heidelberg)

2. Gutachter: PD Dr. Karsten Rippe (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Zusammenfassung	v
Summary	vi

1 Einleitung

1.1 Chromatin	1
1.2 Heterochromatin & Chromatindynamik	4
1.3 Chromosomale Proteine	6
1.4 Heterochromatin Protein 1 (HP1)	8
1.5 Zielstellung und Motivation	12

2 Material & Methoden

2.1 Probenvorbereitung	13
2.1.1 Molekularbiologie	13
2.1.2 Proteinexpression & -aufreinigung	14
2.1.3 Zellkultur	15
2.2 Analytische Ultrazentrifugation	16
2.3 Rasterkraftmikroskopie	23
2.4 Theoretische Methoden	26
2.5 Biochemische Methoden	28

3 Ergebnisse

3.1 Proteinexpression & -aufreinigung	31
3.2 Untersuchungen zur Selbstassoziation von HP1 mittels AUZ	36
3.3 Molekulare Modellierung der Struktur von HP1	41
3.4 Interaktion von HP1 mit DNA	42
3.5 Interaktion von HP1 mit <i>core</i> -Histonen	43

3.6 Interaktion von HP1 mit <i>Linker</i> -Histon H1	44
3.7 Qualitative Untersuchung der Interaktion von HP1 mit Suv3-9H1	48
3.8 Interaktion von HP1 mit Nukleosomen	49
4 Diskussion	
4.1 Expressions–und Reinigungsprotokolle für HP1 und Suv3-9H1	58
4.2 Untersuchung der Selbstassoziation von HP1 und Modellierung der Struktur	59
4.3 Untersuchungen zur Interaktion von HP1 mit chromosomalen Proteinen, DNA und RNA	60
4.4 Interaktion von HP1 mit nativen Chromatinfasern	63
4.5 Modelle der Nukleosomenbindung von HP1	63
4.6 Ausblick	65
 Literaturverzeichnis	 67

Abkürzungsverzeichnis

A ₂₈₀	UV-Absorption bei 280 nm	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalctosid
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>	kDa	kiloDalton
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation	M	Molekulargewicht
bp	Basenpaare	Ni-NTA	<i>Nickel-Nitriloacetic Acid</i>
CAF	<i>Chromatin Assembly Factor</i>	NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
CD	Chromo-Domäne	ORC	<i>origin of replication</i>
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>	PAA	Polyacrylamid
ChIP	Chromatin-Immuno- präzipitation	PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl- Guanosin-Dinukleotid	RKM	Rasterkraftmikroskopie
CSD	Chromoshadow-Domäne	PMSF	Phenylmethylsulfonyl- fluorid
DMNT	DNA-Methyl-Transferase	RNA	Ribonucleinsäure
DANN	Desoxyribonukleinsäure	rpm	<i>revolutions per minute</i>
DTT	Dithiothreitol	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
EDTA	Ethylendiaminessigsäure	S	Svedberg
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	s	Sedimentationskoeffizient
f/f ₀	Reibungskoeffizient	SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
FCS	Fetales Kälberserum	SedEq	<i>Sedimentation Equilibrium</i>
GSH	Glutathion	SedVel	<i>Sedimentation Velocity</i>
H2A·H2B	Heterodimer aus Histon H2A und H2B	SET	<i>Acronym aus den Proteinen Suv, Enhancer of Zeste und Trithorax</i>
H3K9Met	Histon H3, methyliert an Lysin (K) 9	Suv	<i>suppressor of variegation</i>
HAT	Histon-Acetyl-Transferase	TBE	Tris-Borat-EDTA
HDAC	Histon-Deacetylase	TCA	<i>Trichloro Acetic Acid</i>
HMT	Histon-Methyl-Transferase	U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
HP1	Heterochromatin Protein1	YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
HP1 ^f	fluoreszenzmarkiertes HP1		
IMAC	Immobilisierte Metallionen- Affinitätschromatographie		

Zusammenfassung

Chromatin ist die strukturelle Einheit von DNA und einer Vielzahl von Proteinen, welche die Packungsdichte der DNA variieren. Dicht gepacktes Chromatin wird dabei als Heterochromatin bezeichnet, wohingegen Euchromatin eine offene Konformation einnimmt. Heterochromatin Protein 1 (HP1) ist zentrales Strukturprotein von Heterochromatin. Es besteht aus einer Chromo-Domäne und einer Chromoshadow-Domäne, welche durch eine flexible Region verbunden sind. Das derzeitige Modell für die Entstehung von Heterochromatin geht davon aus, dass HP1 an trimethyliertes Histon H3 bindet und Euchromatin dadurch in eine kompaktere, transkriptionell inaktive Konformation überführt wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Details dieses Modells zu untersuchen. Zunächst konnte die Homodimerisierung von HP1 gezeigt werden. Diese wird durch die Chromoshadow-Domäne vermittelt. Es wurde ein Strukturmodell für das HP1-Dimer erstellt. Daraus wurden atomar aufgelöste Modelle zur Bindung von HP1 an Nukleosomen entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass HP1 nicht an DNA bindet. Eine Bindung an unmethylierte *core*-Histone wurde nicht nachgewiesen. Die Bildung eines Komplexes von HP1 mit der Histonmethyltransferase Suv3-9H1 wurde qualitativ beschrieben. Der Komplex von HP1 und *Linker*-Histon H1 weist eine 1:1-Stöchiometrie von H1 zu (HP1)₂ auf. Eine Beteiligung von Chromo-Domäne und Chromoshadow-Domäne wurde nachgewiesen. Eine veränderte Chromatinkonformation hin zu dichteren Anordnungen wurde mit Hilfe von Analytischer Ultrazentrifugation und Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen. Die Ergebnisse führen zu einem dynamischen Modell des Heterochromatin, in welchem HP1 als Mediator für verschiedene Protein-Protein-Interaktionen dient.

Summary

Chromatin is the structural unit of DNA and a variety of proteins which mediate changes in the packing density of the DNA. Heterochromatin is the highly compacted form whereas euchromatin adopts an open conformation which allows access of transcription factors, enzymes etc. Heterochromatin Protein 1 (HP1) is a central scaffold protein that is found mainly though not exclusively in heterochromatin. It comprises a chromo-domain and a chromoshadow-domain which are linked by a flexible hinge region. The current model of heterochromatin formation predicts that HP1 recognizes the trimethylation of H3 at lysine 9 and a dense conformation is adopted which is inaccessible to transcription factors. The aim of this thesis was to study the molecular details of this model. Firstly, the homodimerization of HP1 was shown. It is mediated by the chromoshadow-domain. Secondly, molecular interactions with DNA, RNA, core – and Linker histones as well the histone methyltransferase Suv3-9H1 were investigated *in vitro*. No DNA binding activity was observed and RNA does not seem to be involved in HP1 binding to chromatin *in vitro*. No complexes with unmethylated core histones were observed. It was demonstrated that HP1 forms a complex with the histone methyl transferase Suv3-9H1. An interaction between HP1 and linker histone H1 was also shown and investigated quantitatively. It exhibits a 1:1-stoichiometry of H1:(HP1)₂. Both domains of HP1 are involved in the formation of the complex. A modified chromatin conformation could be observed in analytical ultracentrifugation and scanning force microscopy upon addition of HP1. The results are rationalized in a revised model for the role of HP1. It is a mediator for various protein-protein interactions rather than a structural “glue” for heterochromatin.

1 Einleitung

Alle für eine Zelle notwendigen Informationen sind in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Bei der Handhabung der Informationen müssen zwei scheinbar gegensätzliche Anforderungen erfüllt werden. Zum einen muss die DNA sehr stark kompaktiert werden, um einen DNA-Faden von 2 m Länge in menschlichen Zellen in einen Zellkern von 10-20 μm Durchmesser zu verpacken. Zum anderen müssen einzelne Abschnitte der DNA in einer zeitlich und räumlich spezifischen Weise für Enzyme, Transkriptionsfaktoren etc. zugänglich gemacht werden, um das Ablaufen lebensnotwendiger Prozesse wie u. a. DNA-Replikation, Transkription und Regulierung der Genaktivität zu ermöglichen. Um große Packungsdichte bei gleichzeitig hoher Dynamik der DNA-Konformation zu erreichen, finden Interaktionen der DNA mit einer Vielzahl von Proteinen statt, wobei der entstehende Komplex als Chromatin bezeichnet wird. Auch RNA-Komponenten stellen einen wichtigen Bestandteil von Chromatin dar (für eine Übersicht: Bernstein & Allis, 2005).

1.1 Chromatin

Der Begriff Chromatin wurde von Walther Flemming im Jahr 1882 erstmals verwendet und bezeichnete eine Struktur, die mit Hilfe basischer Farbstoffe im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden konnte (griech.: *chroma* - farbig) (Flemming, 1882). Heute bezeichnet der Begriff einen Komplex aus DNA und Proteinen (van Holde, 1989). Als wichtigste dieser Proteine werden die vier sogenannten *core*-Histone beschrieben: H2A, H2B, H3 und H4. Dies sind kleine basische Proteine (~ 10 kDa), die alle aus einer globulären Domäne und einem unstrukturierten Arm bestehen (Rippe *et al.*, 2008). Sie sind in der Evolution stark konserviert, wenngleich es Varianten gibt, die spezifische Aufgaben übernehmen (Doenecke *et al.*, 1997, van Leeuwen & Gottschling, 2003). Jeweils 8 dieser Proteine (je zwei Kopien von H2A, H2B, H3, H4) lagern sich zu einem Histon-Oktamer zusammen. Dieses wird von 147 Basenpaaren (bp) des DNA-Doppelstrangs 1.67-fach umwunden. Die entstehende Struktur wird als Nukleosom-Kernpartikel (*core particle*) bezeichnet und bildet die kleinste repetitive Einheit des Chromatin. Durch Kristallstrukturanalyse sind die geometrischen Eigenschaften sowohl des Histon-

Oktamers als auch des Nukleosoms aufgeklärt worden (Arents *et al.*, 1991; Luger *et al.*, 1997). Auch der Mechanismus der Assemblierung von Nukleosomen mit Hilfe von Histon-Chaperonen ist gut untersucht (Akey & Luger, 2003; Mazurkiewicz *et al.*, 2006). Nukleosomen sind in regelmäßigen Abständen auf dem DNA-Strang positioniert und sorgen für eine erste Kompaktierungsebene. Im Bereich des Eintritts-/Austrittswinkels der DNA befindet sich an ~ 80 % der Nukleosomen ein weiteres Protein aus der Familie der *Linker*-Histone (H1, Travers, 1999). Dieses beeinflusst die Chromatindynamik, indem es zum einen für die Bindung weiterer 20 bp aus dem Bereich der *Linker*-DNA sorgt und damit die Mobilität der Nukleosomen einschränkt (Pennings *et al.*, 1994). Als *Linker*-DNA wird der DNA-Abschnitt zwischen zwei Nukleosomen bezeichnet, von der Austrittsstelle am ersten Nukleosom zur Eintrittsstelle am zweiten Nukleosom (van Holde, 1989). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von *Linker*-Histonen zu einer Stabilisierung höherer Chromatinstrukturen und Oligomere führt (u.a. Zlatanova & van Holde, 1996, Hansen, 2002). Dies wird vermutlich durch die Stabilisierung von *core*-Histon-vermittelten Interaktionen mit DNA erreicht (Carruthers & Hansen, 2000). Solche höheren Strukturen, deren Natur bisher nicht im Detail beschrieben wurde entstehen durch weitere Faltung und Spiralisierung, bis hin zum Chromosom, der kompaktesten bekannten DNA-Struktur (van Holde & Zlatanova, 1996; Bednar *et al.*, 1998; Kepper *et al.*, 2008, Stehr *et al.*, 2008). Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht über die Strukturebenen des Chromatins, wobei die Ebenen D und E hypothetische Beschreibungen darstellen.

Die Packungsdichte des Chromatins ist variabel, um die Funktionalität des DNA-Moleküls zu gewährleisten. Für diese Variabilität sorgt eine große Anzahl weiterer Proteine, die sowohl enzymatische als auch strukturelle Funktionen besitzen (Mc Bryant *et al.*, 2006; Rippe *et al.*, 2008).

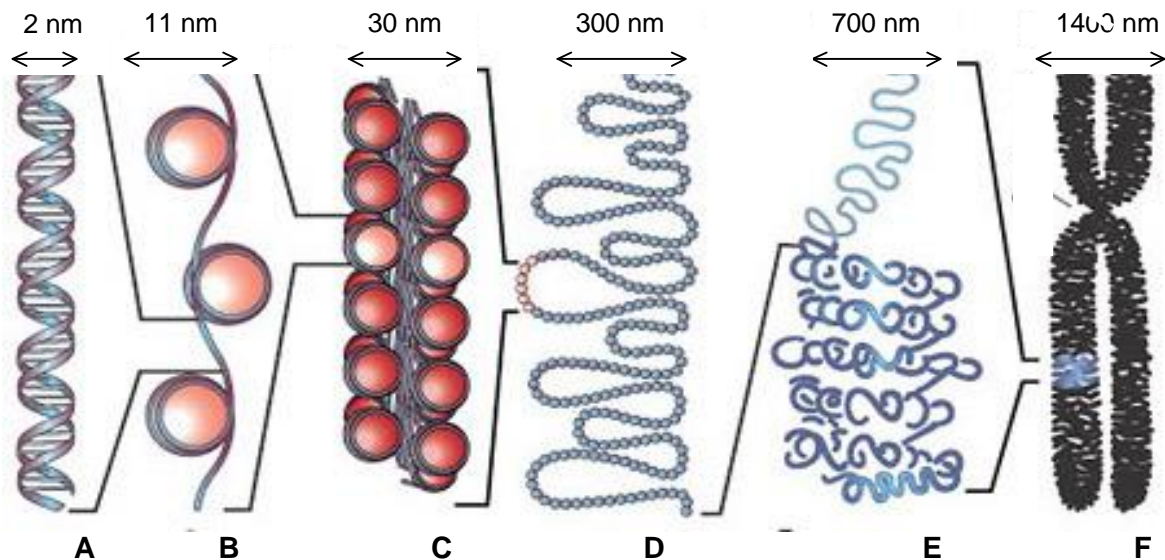


Abbildung 1.1: Organisationsebenen von Chromatin.

(A) kurzer Abschnitt der DNA-Doppelhelix, (B) Perlchnur-Anordnung von Nucleosomen, (C) Nucleosomen in eine 30 nm-Faser gepackt, (D) lockerer Abschnitt eines Chromosoms, (E) dichter Abschnitt eines Chromosoms, (F) Metaphase-Chromosom. Entnommen aus (Felsenfeld & Groudine, 2003).

Zur Unterscheidung hochverdichteter und weniger dichter Bereiche innerhalb der Chromatinstruktur werden die Begriffe Eu- und Heterochromatin herangezogen (van Holde, 1989). Hierbei bezeichnet Euchromatin eine offene und transkriptionell aktive Chromatinregion, wohingegen hochkompakte und inaktive Bereiche als Heterochromatin bezeichnet werden. Mit der Zunahme der Forschung auf diesem Gebiet und vielen methodischen Verbesserungen der letzten Jahrzehnte (hochauflösende Mikroskopie, Methoden zur Bestimmung der Genaktivität etc.) zeigt sich jedoch, dass diese starre Einteilung der Komplexität und Dynamik der ablaufenden Prozesse nicht gerecht wird (Dillon & Festenstein, 2002). Graduelle Veränderungen der Aktivität von Genen aufgrund veränderter Lebensbedingungen laufen auf zahlreichen Loci parallel ab. Dabei hat sich gezeigt, dass auch von heterochromatischen Bereichen beträchtliche Aktivität bei der Regulation von Genen ausgeht (Dillon & Festenstein, 2002). Auch für die Verteilung von Chromosomen auf Tochterzellen im Verlauf einer Zellteilung ist Heterochromatin unerlässlich (Taddei *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2001). Die Einteilung in Eu- und Heterochromatin bezieht sich daher heute eher auf die Struktur als auf die Genaktivität. Ausgehend von der historischen Definition wird der Bereich als Heterochromatin bezeichnet, der während des

gesamten Zellzyklus, also auch während der Interphase, stärker kompaktiert bleibt. Euchromatin hingegen wird während der Interphase aufgelockert, um die DNA für Transkriptionsfaktoren u. a. zugänglich zu machen. Euchromatische Bereiche sind nur während der Metaphase stark kompaktiert.

1.2 Heterochromatin und Chromatindynamik

Die oben eingeführte Definition von Heterochromatin reicht zur Beschreibung der in der Zelle ablaufenden Prozesse nicht aus. Man unterscheidet konstitutives und fakultatives Heterochromatin (van Holde, 1989). Konstitutives Heterochromatin bleibt stets hochverdichtet, während die Packungsdichte von fakultativem Heterochromatin je nach Erfordernissen der Zelle variabel ist. Als typisch konstitutives Heterochromatin gilt z.B. perizentrisches Heterochromatin, welches in großen Bereichen um die Centromere der Chromosomen lokalisiert ist. An diesem Beispiel lässt sich zeigen, welche strukturellen Merkmale Heterochromatin aufweist. Auf der Ebene der DNA-Sequenz findet man im perizentrischen Heterochromatin repetitive Bereiche, die reich an A - und T - Nukleotiden sind. Diese werden als *satellite repeats* bezeichnet (Vissel & Choo, 1989). Ein weiteres Merkmal für Heterochromatin ist ein hoher Methylierungsgrad der DNA, insbesondere von CpG-Nukleotiden (Bird, 2002). Besonders hervorzuheben sind kovalente Modifikationen der Histone, vor allem die Methylierung der Positionen K9 und K27 des Histon H3. Für alle Histone ist eine Vielzahl von Modifikationen (Methylierung, Acetylierung, Ubiquitylierung etc.) bekannt, deren komplexes Zusammenspiel von großer Bedeutung für die Chromatinkonformation und damit die Aktivität von Genen ist (Fischle *et al.*, 2003; Allis *et al.*, 2007). Dies hat zur Postulierung der so genannten Histon-Code-These geführt. Dieser zufolge dienen Kombinationen der posttranslationalen Modifikationen dazu, Bereiche auf der DNA als ein – oder ausgeschaltet zu markieren (Strahl & Allis, 2000; Jenuwein & Allis, 2001). Dieser Code wird von spezifischen Enzymen wie Histonmethyltransferasen (HMTs) „geschrieben“. Darüber hinaus gibt es den Begriff des epigenetischen Codes, der die Kontrolle der Genaktivität mit Hilfe der Gesamtheit von Histonmodifikationen, DNA-Modifikationen, Verschiebung von Histonen (*remodeling*) und nichtcodierenden RNAs beschreibt (Allis *et al.*, 2007). Deutlich wird hierbei, dass nicht die Nukleotidsequenz (genetischer Code) allein für die Zellfunk-

tion entscheidend ist. Als epigenetische Marker werden solche Modifikationen bezeichnet, die über den gesamten Zellzyklus erhalten bleiben und vererbt werden. Zu diesen Markern kommt eine Vielzahl chromosomaler Proteine hinzu, denen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Stabilität von Heterochromatin zukommt und auf die im nächsten Abschnitt detailliert eingegangen wird.

Verschiedene Wirkungsweisen der Konformationsänderung mit Hilfe der Histon-Arme werden diskutiert. Zum einen werden durch die kovalenten Modifikationen die positiven Ladungen der Histon-Arme teilweise kompensiert, was zu veränderten Wechselwirkungen insbesondere mit *Linker*-DNA führt (Hansen, 1997, Hansen *et al.*, 1998). Zum anderen sind die Histon-Arme Kontaktstellen für viele Protein-Protein-Interaktionen, für die die Modifikationen spezifische Signale darstellen können (Tse & Hansen, 1997, Luger & Richmond, 1998). Vermutlich haben sowohl Ladungskompensation als auch spezifische Protein-Interaktionen wesentlichen Anteil an der Dynamik der Chromatinkonformation. Auch die Verwendung von Histonvarianten mit leicht variierten Aminosäure-Sequenzen ist Teil des epigenetischen Codes (van Leeuwen & Gottschling, 2003).

Fakultatives Heterochromatin kann auch in offener Konformation vorliegen. Dies ermöglicht die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren, Reparaturenzyme etc. Um eine solche Dynamik zu gewährleisten, müssen die posttranslationalen Modifikationen verändert werden. Hierbei sind für einige Modifikationen spezifische Enzyme gefunden worden. So spielen beispielsweise Methyltransferasen und Demethylasen eine große Rolle bei Veränderung des epigenetischen Musters. Zu den gut beschriebenen Enzymen gehört die Histonmethyltransferase (HMT) Suv3-9H1, welche spezifisch die Trimethylierung von Histon H3 an der Position Lysin-9 katalysiert (Schotta *et al.*, 2002 Chin *et al.*, 2006). Auch DNA-Methyltransferasen (DNMT) gehören zu diesen Enzymen (Bird & Wolffe, 1999; El-Osta & Wolffe, 2000, El-Osta, 2003). Oft werden verschiedene Modifikationen parallel durchgeführt. So findet man die DNMT1 mit Histondeacetylasen assoziiert (HDAC, Fuks *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2000; El-Osta & Wolffe, 2000). ATP-abhängige Nukleosomen-Remodellierungskomplexe (Eberharter & Becker, 2004; Saha *et al.*, 2006) und Histon-Chaperone (Ito *et al.*, 1996; Akey & Luger, 2003) sind Proteinfamilien, die nicht direkt das epigenetische Muster beeinflussen, aber dennoch mitentscheidend für die Chromatindynamik sind.

Die Chromatinkonformation unterliegt sowohl lokalen, d.h. auf einzelne Gene beschränkte als auch globalen, ganze Chromosomen beeinflussende Veränderungen. Dies erfordert konzertierte, räumlich und zeitlich spezifische Protein-DNA - und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Einige Einzelproteine sowie verschiedene Inter-aktionen wurden bereits detailliert beschrieben. Ein Gesamtbild der bei der Chromatinkompaktierung ablaufenden Prozesse und darauf einwirkender Faktoren fehlt jedoch bisher. Hier sollen im Folgenden zunächst die bereits bekannten beteiligten Proteine sowie ihre Wechselwirkungen systematisiert werden.

1.3 Chromosomale Proteine

Bisher wurden Histone als wesentliche Proteinkomponenten des Chromatins behandelt. Eine Vielzahl weiterer Proteine ist dauerhaft oder zeitweise mit Chromatin assoziiert. Nach strukturellen Motiven können sie in drei Gruppen eingeteilt werden. Dies sind Proteine mit Bromo -, Chromo - oder SET - Domänen.

Bromodomänen binden spezifisch an acetylierte Lysinreste (Zeng & Zhou, 2002). Es sind etwa 75 menschliche Proteine mit Bromodomänen bekannt. Einige davon enthalten bis zu sechs Kopien dieser Domäne. Diese sind oft in regelmäßigen Abständen angeordnet. Dies legt nahe, dass diese Proteine acetylierte Lysine mehrerer Histone gleichzeitig binden und so internukleosomale Kontakte vermitteln. TAF_{II}250 enthält zwei Bromodomänen und ist daher besonders geeignet, diacetylierte N-terminale Histon-Arme zu binden. Auch die ATPase SNF2, die Bestandteil ATP-abhängiger Nukleosom-Remodellierungskomplexe (z.B. SWI/SNF, Peterson *et al.*, 2000) ist, enthält eine Bromodomäne. Unter den Bromo-Proteinen sind auch viele Transkriptionsfaktoren, die selbst als Histonacetyltransferasen (HATs) aktiv sind (Winston & Allis, 1999). Zu diesen gehört neben TAF_{II}250 auch PCAF.

Für die Chromo-Domäne, welche hohe Affinität für methylierte Lysin-Reste zeigt, lassen sich analoge Aussagen treffen (für eine Übersicht: Jones *et al.*, 2000). Auch hier gibt es Vertreter, die mehrere Kopien der Domäne enthalten und in der Lage sind, Methylierungen in passendem Abstand zu erkennen. Hierzu gehört u. a. die ATPase-Untereinheit des NuRD-Komplexes, welche zwei Chromo-Domänen enthält. Eine weitere Parallele zur Bromodomäne liegt darin, dass einige der Chromoproteine selbst Histonmethyltrans-

ferasen sind. Ein Beispiel hierfür ist die Histonmethyltransferase Suv3-9H1. Eines der bekanntesten Chromoproteine ist Heterochromatin Protein 1 (HP1), das im nachfolgenden Abschnitt detaillierter vorgestellt wird.

Die dritte Domäne wird nach ihren wichtigsten Vertretern als SET-Domäne bezeichnet (Dillon *et al.*, 2005). Diese sind die bereits eingeführte Histonmethyltransferase Suv3-9H1, *Enhancer of Zeste* (E(z)) (ein Vertreter der Polycomb-Komplexe) und Trithorax. Die SET-Domäne ist die katalytisch aktive Domäne der Histonmethyltransferasen.

Diese Domänen kommen nicht isoliert vor (Mc Bryant *et al.*, 2006). Vielmehr gibt es Proteine, die Kombinationen der drei Domänen enthalten. Dies spiegelt das Zusammenspiel der verschiedenen Modifikationen eines oder mehrerer Histone wider. So findet man z.B. in den Polycomb-Komplexen sowohl SET – als auch Chromo-Domänen. Diese Kombinatorik ermöglicht es, den Kompaktierungsgrad des Chromatins genau den Erfordernissen der Zelle anzupassen (Hansen, 1997). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über wichtige Gruppen chromosomaler Proteinkomplexe.

Tabelle 1.1: Zusammenstellung chromosomaler Proteine (Auswahl) und ihrer Funktionen.

Gruppe	Funktion	Beispiele	Literatur
DNA-modifizierende Enzyme	Kovalente Modifikation (Methylierung etc.) von DNA	Dnmt1	Ei-Osta, 2003
Histon-modifizierende Enzyme	Kovalente Modifikation von Histonen	Suv3-9 (HMT), PCAF, TAFII250, Mof (HAT)	Peterson & Lanier, 2004
Histon-Chaperone	Mitwirkung bei der Assemblierung des Histon-Oktamers	NAP1, Nucleoplasmin, CAF1	Ito <i>et al.</i> , 1996; Akey & Luger, 2003
Nukleosom-Remodellierungs-Komplexe	Modifikation der Position von Nukleosomen	NuRD, NuRF, Brm, SWI/SNF	Eberharter & Becke, 2004; Saha <i>et al.</i> , 2006
Strukturfaktoren	DNA-Krümmung, Gerüstfunktion, etc.	HMG-Proteine, HP1	Bustin & Reeves, 1996, Maison & Almouzni, 2004

1.4 Heterochromatin Protein 1 (HP1)

Ein zentrales Heterochromatin-Strukturprotein ist das Heterochromatin Protein 1 (HP1). Erstmals beschrieben wurde es 1982 in einer Arbeit, in der die Autoren nach primär am Chromozentrum von Chromosomen lokalisierten Proteinen in *D. melanogaster* suchten (James & Elgin, 1986). Seitdem wurden homologe Proteine in einer Vielzahl von Organismen gefunden, von niederen Eukaryoten wie *S. pombe* (Swi6) bis hin zu Mäusen (M31) und Menschen (Maison & Almouzni, 2004). HP1 wurde als stark negativer Regulator der positionsabhängigen Regulation von Genaktivität identifiziert. In diesem als *position effect variegation* (PEV) bezeichneten Prozess werden Gene inaktiviert, indem sie durch Umlagerung und bewegliche DNA-Sequenzen (Transposons) in heterochromatische Bereiche gelangen.

In höheren Eukaryoten sind drei Isoformen von HP1 bekannt, welche als HP1 α , β und γ bezeichnet werden. Diese weisen hohe Sequenzidentität auf, zeigen jedoch gewisse Unterschiede in ihrer Lokalisierung am Chromatin. Während HP1 α überwiegend in Heterochromatin gefunden wird, lässt sich HP1 β und besonders HP1 γ auch in euchromatischen Regionen nachweisen (Volpe *et al.*, 2002; Ayyanathan *et al.*, 2003). Entgegen früheren Vermutungen ist heute bekannt, dass sowohl in eu - als auch in heterochromatischen Bereichen ein schneller Austausch von HP1-Molekülen stattfindet (Festenstein *et al.*, 2003; Cheutin *et al.*, 2003).

Es handelt sich bei allen HP1-Homologen um kleine Proteine (~25 kDa), die vermutlich als Dimer vorliegen. HP1 besteht aus zwei Domänen. Den N-Terminus bildet eine Chromo-Domäne (CD), die auch aus anderen chromosomalen Proteinfamilien bekannt ist und für die eine Bindung an den methylierte Lysinreste bekannt ist (s. o.). Die Struktur dieser Domäne wurde mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Nielsen *et al.*, 2004). Abbildung 1.2 B zeigt die Chromo-Domäne mit einem gebundenen synthetischen Peptid, welches den Aminosäurenresten 3 bis 15 des Histons H3 entspricht. Dabei ist Position K9 trimethyliert (Nielsen *et al.*, 2004). Dieser Bindung wird eine wesentliche Bedeutung für die Funktion von HP1 in der Chromatinkompaktierung zugeschrieben (Fischle *et al.*, 2005).

Die N – und C-terminalen Bereiche von HP1 weisen große Sequenzhomologien auf; der C-Terminus wird als Chromoshadow-Domäne (CSD) bezeichnet. Der CSD wird im Wesentlichen die Vermittlung der Selbstassoziation von HP1 zugeschrieben sowie eine Rol-

le als Adapter für verschiedene Protein-Protein-Interaktionen (Maison & Almouzni, 2004). Viele Arbeiten gehen von einer Dimerisierung von HP1 aus, es wurde jedoch auch ein Tetramer-Modell postuliert (Wang *et al.*, 2000). Die Struktur der CSD, die durch Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt wurde, macht die Verwandtschaft mit der oben beschriebenen Chromo-Domäne deutlich (Brasher *et al.*, 2000). In Abbildung 1.2 A ist die im Kristall als Dimer vorliegende CSD dargestellt. In beiden Fällen handelt es sich um globuläre Domänen, die aus einem antiparallelen, dreisträngigen β -Faltblatt und einer bzw. zwei α -Helices bestehen.

Die beiden Domänen werden verbunden durch einen Bereich von etwa 30 Aminosäuren, dessen Sequenz nur wenig konserviert ist und der als *hinge*-Region bezeichnet wird. Hierfür wurde bisher keine Struktur veröffentlicht, ebenso wie eine Struktur des Gesamtproteins bisher fehlt. Für diesen bisher am wenigsten untersuchten Bereich werden DNA - und RNA - Bindungsaktivitäten diskutiert (Muchardt *et al.*, 2002; Maison *et al.*, 2002; Meehan *et al.*, 2003). Desweiteren enthält die Sequenz eine Reihe von Phosphorylierungs-Stellen. Die Selbstassoziation und die Bindung von methylierten H3-Armen hängt auch vom Phosphorylierungsgrad dieser Region ab (Zhao *et al.*, 2001). In der Phosphorylierung der *hinge*-Region könnte daher ein Mechanismus zur Regulation von HP1 liegen.

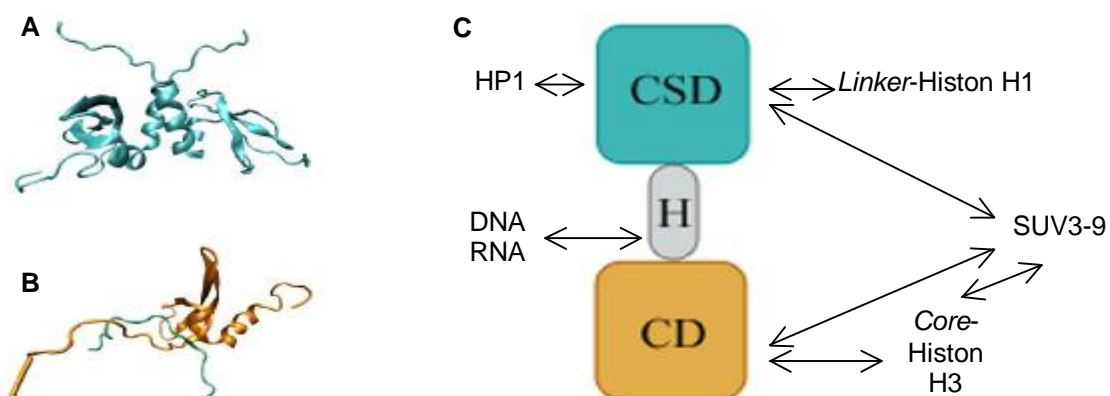


Abbildung 1.2: Domänenstruktur von HP1.

In (A) ist die Kristallstruktur der Chromoshadow-Domäne gezeigt (Dimer, Brasher *et al.*, 2000). (B) zeigt die NMR-Struktur der Chromo-Domäne (orange) mit einem methylierten H3-Arm-Peptid (grün) (Nielsen *et al.*, 2004). In (C) ist die Domänen-Struktur schematisch mit ausgewählten Interaktionspartnern der einzelnen Domänen gezeigt.

Einige wenige Interaktionen wurden für die *hinge*-Region nachgewiesen, ebenso für die Chromo-Domäne. So wurde eine Bindung der CD und der *hinge*-Region an *origin recognition complexes* (ORCs) publiziert (Shareef *et al.*, 2001, Badugu *et al.*, 2003). Für die Bindung des Inneren Centromer-Proteins INCENP ist die *hinge*-Region unerlässlich (Ainsztein *et al.*, 1998). Als zentrale Plattform für Protein-Protein-Interaktionen dient vermutlich die Chromoshadow-Domäne (Brasher *et al.*, 2000).

Eine Vielzahl möglicher Interaktionspartner wurde für HP1 postuliert, wobei die Literatur oft widersprüchlich ist und bisher kein klares Bild der Funktionsweise von HP1 liefert. Abbildung 1.3 fasst wichtige Interaktionspartner und mögliche Funktionen zusammen. Als essentiell für die Etablierung von Heterochromatin wurde vielfach die Bindung von HP1 an trimethylierte H3K9-Arme beschrieben. Einige Arbeiten lieferten Hinweise auf eine methylierungsunabhängige Bindung an die globuläre Domäne von H3 (Nielsen *et al.*, 2001; Dialynas *et al.*, 2006). Ebenfalls gezeigt wurde eine Komplexbildung von HP1 und Suv3-9H1, der für die Methylierung von H3K9 verantwortlichen Histonmethyltransferase (Eskeland *et al.*, 2007). Dadurch könnte eine positive Rückkopplung entstehen, die die Wirkung des HP1-H3K9Met3-Komplexes verstärkt. Auch die Interaktion von HP1 mit Histondeacetylasen könnte zu einer solchen Rückkopplung beitragen. Es wurde gezeigt, dass der ansonsten schnelle Austausch von HP1-Molekülen an trimethylierten H3K9-Loci verlangsamt ist (Cheutin *et al.*, 2003; Cheutin *et al.*, 2004). Die Ausbreitung von Heterochromatin hängt ebenfalls mit der Bindung von HP1 an histonmodifizierende Proteine zusammen. Diese vermitteln eine Interaktion mit Transkriptionsrepressorkomplexen. Eine bisher wenig untersuchte Interaktion wurde zwischen *Linker*-Histon H1 und HP1 postuliert (Daujat *et al.*, 2005; Hale *et al.*, 2006). Durch Interaktion von HP1 mit Lamin B und anderen Bestandteilen der Kernmembran werden inaktive Loci an die Peripherie des Zellkerns transportiert. Dieser Prozess steht in Zusammenhang mit der Ausbreitung von Heterochromatin (Kourmouli *et al.*, 2000). Für die Vererbung von epigenetischen Markern und heterochromatischen Bereichen wird ein Komplex aus PCNA, CAF1 und H3·H4 gebildet, der auch HP1 an die Replikationsgabel rekrutiert.

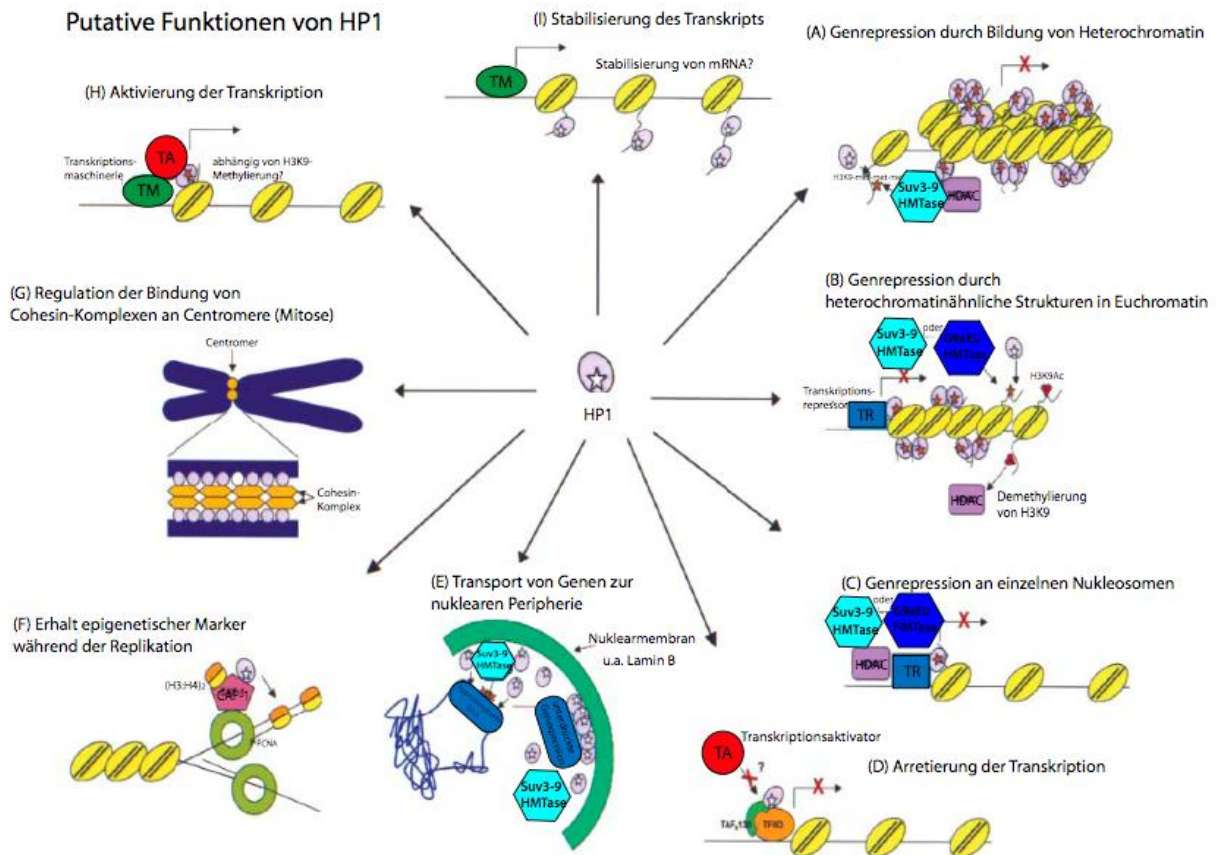


Abbildung 1.3: Übersicht über putative Interaktionspartner und Funktionen von HP1.

(A) HP1-Dimere verknüpfen eine regelmäßige Anordnung von H3K9-methylierten Nucleosomen. Dadurch entsteht eine kompakte Chromatinstruktur. (B) Durch die Interaktion von HP1 mit einem Transkriptionsrepressorkomplex wird die Propagierung von Heterochromatin vermittelt. (C) Genrepression im Bereich einzelner Nucleosomen. (D) Die Assemblierung der Transkriptionsmaschinerie (TM) und damit die Genexpression wird durch die Interaktion von HP1 mit TAF₁₁₃₀ verhindert. (E) Gene oder repetitive DNA-Elemente können durch Interaktion von HP1 mit Lamin B an die nukleare Peripherie transportiert und ihre Expression so unterdrückt werden. (F) Die Vererbung von epigenetischen Markern wird durch HP1 unterstützt. (G) HP1 unterstützt die Rekrutierung von Cohesin an die Centromere vor der Chromosomenverteilung. (H) Die Aktivierung der Transkription kann von HP1 unterstützt werden. Dazu wird ein Komplex von HP1 mit der trans-aktivierenden Form von TIF1 α/β oder SNF2 β gebildet. (I) Durch Bindung an nascente mRNA kann HP1 diese stabilisieren. Zusammenstellung entnommen aus (Hiragami & Festenstein, 2005 und enthaltene Referenzen).

1.5 Zielstellung und Motivation

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Wechselwirkungen von Heterochromatin Protein 1 mit zentralen Interaktionspartnern auf molekularer Ebene. Diese Untersuchungen sollen zum besseren Verständnis der Bildung und Verbreitung von Heterochromatin beitragen. Dazu gehört zum einen die Charakterisierung der Selbstassoziation, zum anderen die qualitative und quantitative Beschreibung von Wechselwirkungen mit Histonen und weiteren chromosomalen Proteinen. Auf diese Weise sollen Faktoren identifiziert werden, deren Zusammenwirken die Etablierung von Heterochromatin ermöglicht. Ein weiterer Abschnitt befasst sich mit Untersuchungen zum Einfluss von HP1 auf die globale Konformation von Chromatinfasern. Hierzu wurden verschiedene biophysikalische Techniken wie analytische Ultrazentrifugation (AUZ) und Rasterkraftmikroskopie (RKM) sowie biochemische Methoden wie Co-Präzipitationen und Elektrophorese angewandt. Zusätzlich wurde auch die Berechnung hydrodynamischer Parameter aus Strukturinformationen durchgeführt. Experimentelle Ergebnisse wurden verwendet, um mittels molekulardynamischer Berechnungen Modelle in atomarer Auflösung zur Struktur und damit ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von HP1 zu gewinnen.

2 Material & Methoden

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben von Appllichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Gibco (Invitrogen, Carlsbad, USA) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Enzyme sowie Standards für die Elektrophorese von Fermentas (Burlington, Kanada) wurden verwendet. Kompetente Zellen stammten von Novagen (Darmstadt). Alle Geräte und Säulen für die Chromatographie waren von Amersham Pharmacia Biotech, (Uppsala, Schweden), die Säulenmaterialien (Ni-NTA-*beads*, GST-*beads*) stammten ebenfalls von Amersham Pharmacia Biotech oder von Qiagen (La Jolla, USA). Plasmide für die Überexpression von HP1 wurden von Dr. N. Murzina (University of Cambridge; Ball *et al.*, 1997) zur Verfügung gestellt. Zur Überexpression von Suv3-9H1 (*Mus Musculus*) wurden Plasmide der Arbeitsgruppe Yamamoto (Kyushu University, Japan; Yamamoto & Sonoda, 2003) verwendet. Das Plasmid zur Überexpression von Suv3-9H1 aus *Drosophila melanogaster* stammte von der Arbeitsgruppe Imhof (Ludwig-Maximilian-Universität München; Eskeland *et al.*, 2004).

2.1 Probenvorbereitung

2.1.1 Molekularbiologie

Transformation von Bakterien. Die Transformation aller verwendeten Bakterien erfolgte mittels eines Hitzeschocks. Nach Zugabe der DNA zu chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (DH5 α , BL21 pLysE) wurden diese nach dem folgenden Temperaturschema behandelt: 30 min bei 4 °C, 45 sec bei 37 °C, 2 min bei 4 °C. 150 μ l SOC-Wachstumspuffer wurden zu 50 μ l Zellen hinzu gegeben und die Ansätze eine Stunde bei 37 °C und Rotation (1400 rpm) inkubiert. Die Proben wurden auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 100 μ g/ml, Chloramphenicol 34 μ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Plasmidisolierung und -verifikation. Um die verwendeten Plasmide zu, wurde das Ausgangsmaterial in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (s. amplifizieren o.). 50 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (13.000 rpm, 4 °C, 15 min) und eine Plasmid-Midipräparation mit Hilfe des Nucleobond AX-Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Die Plasmide wurden mittels eines Verdauens mit Restriktionsendonukleasen charakterisiert. ~ 1 μ g DNA wurde mit je 1 U der geeigneten Enzyme verdaut (37 °C, über Nacht). Anschliessend wurden die Verdauungsprodukte durch Zugabe von 1/3 Volumen 7.5 M NH₄Ac und 2.5 Volumen Ethanol präzipitiert (30 min, 4 °C). Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden abzentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, 30 min), mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 10 μ l H₂O bidest. gelöst. Der Verdau wurde analysiert durch Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose in TBE-Puffer, Laufzeit ~ 45 min bei 90 V) und anschliessender Färbung mit Ethidiumbromid für 30 min. Die Dokumentation erfolgte mit einem GelDoc-Transilluminator (BioRad) und einer Digitalkamera.

2.1.2 Proteinexpression und –aufreinigung

Histon H1 aus *Xenopus laevis* wurde von Roche (Basel, Schweiz) bezogen und mittels Größenausschlusschromatographie weiter aufgereinigt wie beschrieben (Kepert *et al.*, 2005).

Expression rekombinanter Proteine. Alle anderen verwendeten Proteine wurden rekombinant exprimiert. Die für die Expression von HP1 und Suv3-9H1 verwendeten Protokolle wurden neu erstellt und optimiert, sie sind im Abschnitt 3 – Ergebnisse angegeben. Die Präparation der *core*-Histone folgte dem Protokoll von Luger *et al.* (Luger *et al.*, 1999).

Proteinmarkierung mit Alexa-488. Zu der zu markierenden Proteinpräparation wurde die 5-10fache Menge an Fluoreszenzfarbstoff (Alexa-488, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, USA) gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 mM DTT wurde weitere 30 min in Dunkelheit inkubiert. Als Chroma-

tographoematrix wurden Bio-Rex-*beads* verwendet. Diese wurden mit Waschpuffer (10 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl) + Benzamidine gewaschen. Der Markierungsansatz wurde zu den Bio-Rex-*beads* gegeben und 10 min bei 4 °C und 200 rpm rotiert. Anschliessend wurden die *beads* abzentrifugiert (2000 rpm, 2 min) und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschrift (5 min Rotation bei 200 rpm, 4 °C), bevor das markierte Protein 3 mal eluiert wurde (10 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl). Hierbei wurde die Probe ebenfalls 5 min bei 200 rpm und 4 °C rotiert. Die Eluatfraktionen wurden abzentrifugiert, um das Bio-Rex vollständig zu entfernen. Die Eluate wurden anschliessend vereinigt und nach Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.3 Zellkultur

Kultivierung von HeLa-Zellen. HeLa - Zellen wurden 3 – 5 Tage in RPMI 1640 Medium kultiviert, welches mit 5 % FCS und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) komplettiert wurde. Nachdem jede Schale mit 15 ml IT-Puffer (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,3 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,7 mM CaCl₂) gewaschen wurde, erfolgte die Ernte der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers. Um die adherent wachsenden Zellen abzulösen, wurden sie mit 10 ml 1x PBS gewaschen und für ~ 3 min bei 37 °C mit Trypsin (0.25 % w/v) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml RPMI-Medium gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und auf 10 neue Petrischalen mit je 20 ml frischem RPMI-Medium verteilt.

Kernisolierung. Zur Isolierung der Zellkerne wurde 0.2 % NP-40 (v/v) zu der Zellsuspension gegeben und die Präparation wurde nach dem folgenden Schema behandelt: Vortex 90 sec, Inkubieren auf Eis 90 sec, (Vortex 30 sec, Inkubieren auf Eis 90 sec) x 3. Anschliessend wurden die Kerne durch Zentrifugation (2000 rpm, 4 °C, 5 min) geerntet, in einem geeigneten Volumen IT-Puffer resuspendiert und nach Quantifizierung (Messung von A₂₆₀ in einem Jasco V-530 Photometer) und Zugabe von 50 % (v/v) Glycerol bei -80 °C aufbewahrt. Ein 1x-Aliquot beinhaltete ~ 150 µg DNA.

Präparation von Chromatin. Vor allen Experimenten wurden Chromatinfasern frisch aus gefrorenen HeLa-Kernen isoliert (Giannasca *et al.*, 1993). Die Kernpräparationen wurden 2 mal mit 200 µl TIB-buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF) pro Aliquot gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Kerne abzentrifugiert (2000 rpm, 4 °C, 5 min). Jedes 1x-Aliquot wurde in 30 µl Verdaupuffer (15 mM HEPES, pH 8.0, 1 mM CaCl₂, 35 mM NaCl, 0.2 mM PMSF) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,045 U MNase (oder DNase, s. Ergebnisse) wurden die Präparationen für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 mM EDTA gestoppt. Die Proben wurden anschliessend weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert um die Chromatin-fasern freizusetzen. Nach dem Abzentrifugieren der leeren Zellkerne wurden die Überstände vereinigt.

2.2 Analytische Ultrazentrifugation

Aufbau & Funktionsprinzip. Verschiedenste Fragestellungen unterschiedlicher Komplexität können mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge gelöst werden. Generelle Fragen wie Reinheit und Monodispersität einer Präparation oder Molmassenbestimmungen von kleinsten Substanzen bis hin zu großen Makromolekülen können ebenso betrachtet werden wie das Assoziations- und Dissoziationsverhalten von Komplexen, Ligandenbindung, etc.

Eine analytische Ultrazentrifuge muss die Möglichkeit bieten, eine radial aufgelöste Konzentrationsverteilung zu einem genau definierten und vorher festgelegten Zeitpunkt zu bestimmen. Die heute kommerziell erhältlichen analytischen Ultrazentrifugen, Optima XL-A und XL-I (Beckman-Coulter, Palo Alto, USA) sind prinzipiell präparative UZs, die mit optischen Systemen zur Detektion einer solchen Verteilung ausgestattet sind (Ralston, 1993).

Detektionssysteme. Es sind verschiedene Systeme zur Detektion von Konzentrationsgradienten erhältlich. Im Wesentlichen werden Absorptionsoptik, Rayleigh – Interferenzoptik sowie ein neuartiger Fluoreszenzdetektor verwendet. Diese können sowohl getrennt voneinander als auch simultan benutzt werden. Im Folgenden soll nur die für die vorliegende Arbeit verwendete Absorptionsoptik vorgestellt werden.

Der Absorptionsoptik (s. Abb. 2.1) liegt das Prinzip eines Zweistrahlphotometers zugrunde. Durch eine Xenonblitzlampe wird ein Wellenlängenbereich von 190 bis 800 nm abgedeckt. Die Lampe wird beim Vorbeilaufen der Zellen am Detektor jeweils kurz gezündet. Auf diese Weise ist es möglich, nur einzelne Sektoren oder ausgewählte Zellen zu belichten.

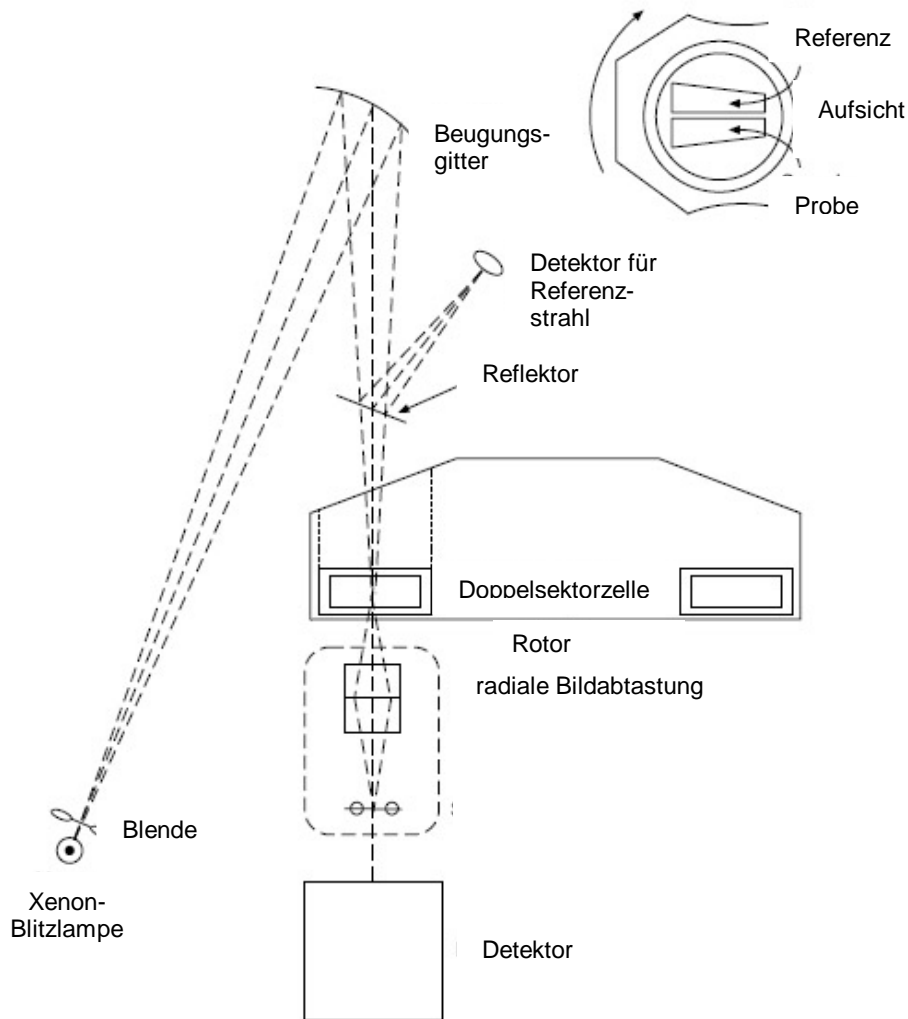


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Absorptionsoptik der Optima XL-A.

Eine Blitzlampe löst einen kurzen Lichtpuls aus. Dieses Licht wird an einem Gitter gebeugt und so die gewünschte Wellenlänge selektiert. Der Lichtstrahl fällt durch den Proben- oder Referenzsektor auf einen Detektor. Entnommen aus (Ralston, 1993).

Die Benutzung von Doppelsektorzellen (Referenz - und Probensektor) bzw. 6-Sektorzellen ermöglicht es, die Absorption des Puffers als Referenz unter denselben experimentellen Bedingungen zu messen, unter denen die Messung der Probe erfolgt. Ist der Extinktionskoeffizient ϵ des untersuchten (Makro-) Moleküls bekannt, kann so auch die absolute Konzentration an jedem beliebigen Punkt in der Zelle bestimmt werden. Absorptionsmessung ist im Gegensatz zur refraktometrischen Konzentrationsbestimmung eine selektive Methode der Detektion. Die Wellenlänge, bei der die Messung durchgeführt wird, kann vom Benutzer festgelegt und damit die Sedimentation dieses Moleküls spezifisch gemessen werden (Lebowitz *et al.*, 2002).

Der Sedimentationskoeffizient s einer Spezies ist definiert als die Geschwindigkeit eines sedimentierenden Partikels korrigiert um den Einfluss des Zentrifugalfeldes. Dieser Zusammenhang ist in Gleichung 2.1 gezeigt.

$$s \equiv \frac{dr_{\text{bnd}}/dt}{w^2 r} \quad (2.1)$$

Der Sedimentationskoeffizient ist unter anderem eine Funktion des Molekulargewichtes, der Dichte des verwendeten Lösungsmittels und des Partikels sowie dessen hydrodynamischer Form. Außerdem hängt s ab von experimentellen Parametern wie der Temperatur (Schuck, 2000). Dagegen ist s nicht abhängig von der Winkelgeschwindigkeit ω^2 . Aus einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment (*sedimentation velocity*, SedVel) lassen sich s und der Diffusionskoeffizient D bestimmen. Den Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen gibt die LAMM-Gleichung (2.2) wieder.

$$\frac{dc}{dt} = \frac{1}{r} \cdot \frac{d}{dr} \left(rD \frac{dc}{dr} - sw^2 r^2 c \right) \quad (2.2)$$

Die LAMM - Gleichung beschreibt die Ausbildung einer Konzentrationsverteilung einer Komponente mit dem Sedimentationskoeffizienten s und dem Diffusionskoeffizienten D in einem sektorförmigen Volumen und dem Zentrifugalfeld $\omega^2 r$. Damit lassen sich die experimentellen Daten auswerten.

Abbildung 2.2 B zeigt beispielhaft die Darstellung der Datensätze eines SedVel-Experimentes. Dabei handelt es sich um Rohdaten, es ist die Konzentration in Abhängigkeit vom Radius aufgetragen. Die Farben repräsentieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommene Datensätze.

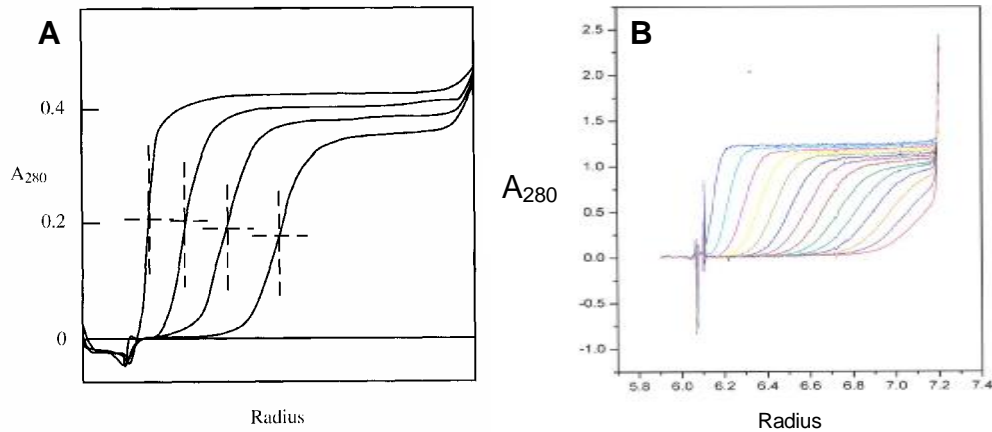


Abbildung 2.2: Rohdaten eines Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimentes.

(A) zeigt eine schematische Darstellung des Sedimentationsverlaufes, in (B) sind reale experimentelle Daten gezeigt. Der Mittelpunkt der Sedimentationsfront (in (A) durch + gekennzeichnet) wandert in Richtung Boden der Probenzelle. ((A) Ralston, 1993; (B) K. Rippe, nicht veröffentlicht).

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel wird repräsentiert durch die Geschwindigkeit, mit der die Sedimentationsfront (*boundary*) fortschreitet. Wendet man diese Geschwindigkeit in nachstehender SVEDBERG - Gleichung an, so lässt sich ein gemittelttes Molekulargewicht bestimmen. Diese Gleichung gilt jedoch nur, wenn in dem System nur eine einheitliche Spezies vorhanden ist.

$$s \equiv \frac{dr_{\text{bnd}}/dt}{w^r r} = \frac{u}{w^2 r} = \frac{M(1-\bar{v}r)}{Nf} = \frac{MD(1-\bar{v}r)}{RT} \quad (2.3)$$

s	Sedimentationskoeffizient
dr_{bnd}/dt	Wanderungsgeschwindigkeit der Sedimentationsfront
ω	Winkelgeschwindigkeit
r	Radius
u	Geschwindigkeit des sedimentierenden Partikels

M	Molekulargewicht des sedimentierenden Partikels
\bar{v}	partielles spezifisches Volumen des Partikels ¹
ρ	Dichte des Puffers
N	AVOGADRO – Konstante
f	Reibungskoeffizient
D	Diffusionskoeffizient
R	universelle Gaskonstante
T	experimentelle Temperatur

Das Experiment wird bei so hohen Drehzahlen durchgeführt, dass eine ausreichend große Wanderungsgeschwindigkeit erreicht wird. Mit Hilfe der optischen Detektionssysteme wird in definierbaren Zeitintervallen eine Konzentrationsverteilung über den Zellradius r (Abstand von der Rotorachse) gemessen. Durch Übereinanderlegen der aufeinander folgenden *scans* lässt sich der Sedimentationsverlauf der Gesamtheit aller vorhandenen Spezies verfolgen.

Der Begriff Spezies bezeichnet einen Teil eines thermodynamischen Systems, der nicht entfernt werden kann, sondern sich u. U. aus einer vorhandenen Komponente immer wieder neu bildet. Davon abzugrenzen ist der Begriff Komponente. Diese ist definiert als Teil eines thermodynamischen System, der, zumindest konzeptuell aus diesem System entfernt werden kann.

Sind in der Probe mehrere Spezies oder Komponenten präsent, so gibt die Berechnung einer Sedimentationskoeffizientenverteilung aus experimentellen Daten Aufschluss über die Polydispersität einer Probe. Da s von molekularen Parameter wie M und \bar{v} abhängt, wird eine Probe, in der unterschiedliche Spezies präsent sind, bei differentieller Darstellung eine Verteilung mit mehreren Maxima (*peaks*) ergeben. Die Berechnung solcher Verteilungen erfolgt mit Hilfe von Spezialsoftware. Aus dem Verhältnis von Sedimentations - zu Diffusionskoeffizient lässt sich bei Kenntnis der Parameter \bar{v} und ρ das Molekulargewicht des Makromoleküls abschätzen. Üblicherweise werden jedoch zur Bestimmung von Molekulargewichten Sedimentationsgleichgewichtsexperimente

¹Das partielle spezifische Volumen eines Partikels lässt sich experimentell durch Messung der Dichte einer ausreichend konzentrierten Präparation und des reinen Puffers bestimmen. Da für die vorliegende Arbeit kein Densitometer zur Verfügung stand, wurde \bar{v} mit Hilfe der Software SEDNTERP (Laue *et al.*, 1992) aus der Aminosäuresequenz berechnet.

durchgeführt. Mit diesen kann eine deutlich höhere Präzision erreicht werden, da statt der zwei Parameter s und D nur einer bestimmt werden muss.

Mit Hilfe des Sedimentationsgleichgewichtsexperimentes (*sedimentation equilibrium*, SedEq) lassen sich gemittelte Molekulargewichte der im System vorhandenen Komponente ermitteln.

Während der Zentrifugation, die bei geringeren Drehzahlen als ein SedVel-Experiment durchgeführt wird, stellt sich ein Gleichgewicht der Massenbewegungen aufgrund von Sedimentation und Diffusion ein. Zunächst sedimentiert Material zum Boden der Zelle, so dass die Konzentration dort zunimmt. Dies hat nach dem Ersten FICKschen Gesetz zur Folge, dass verstärkt Diffusion auftritt, da dieser Prozess konzentrationsabhängig ist. Die gegenläufigen Tendenzen dieser beiden Bewegungen sind Abbildung 2.3 verdeutlicht.

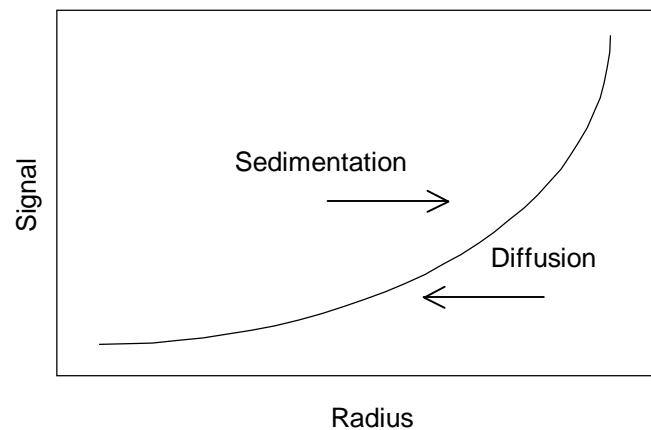


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Bewegungstendenzen während eines Sedimentationsgleichgewichtsexperimentes.

Durch Zentrifugalkraft sedimentieren Teilchen zum Boden der Zelle. Dort nimmt deren Konzentration zu. Dadurch wird die Diffusion (ein konzentrationsabhängiger Prozess) verstärkt. Einige Teilchen diffundieren in entgegengesetzte Richtung. Dort wirkt wiederum die Zentrifugalkraft, die weitere Sedimentation bewirkt. Nach einer ausreichenden Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Teilchenbewegungen ein.

Ist keine Veränderung der Verteilung mit der Zeit (d.h. kein Massentransport) mehr detektierbar, befindet sich das System im Rahmen der Messgenauigkeit im Sedimentationsgleichgewicht. Dies lässt sich überprüfen, indem die letzten aufgenommenen *scans* überlagert werden.

Diese hier detektierte Verteilung ist abhängig von $M(1 - \bar{v}r)$, der Winkelgeschwindigkeit ω^2 und der Temperatur. Aus der Anwendung der LAMM – Gleichung für den Gleich-

gewichtszustand lässt sich folgende Beziehung ableiten, die den Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsgradienten und der Molmasse beschreibt:

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{v}_R)w^2} \cdot \frac{d(\ln c)}{dr^2} \quad (2.3).$$

Für eine einheitliche Spezies erhält man bei graphischer Darstellung von $\ln c$ in Abhängigkeit von r^2 eine Gerade. Abweichungen von dieser Geraden können unterschiedliche Ursachen haben, Polydispersität, thermodynamische Nichtidealität oder Selbstassoziation. In solchen Fällen reicht eine Auswertung mit Hilfe von $\ln c$ vs. r^2 – Graphen nicht mehr aus, um Assoziationsphänomene des Systems durch ihre Stöchiometrie und Stärke der Interaktion durch eine K_D zu beschreiben. Statistische Auswerteverfahren müssen hierfür herangezogen werden.

In jedem Fall aber lässt sich aus dem genannten Graphen eine erste Abschätzung lokaler oder globaler Molekulargewichte ableiten. Dabei handelt es sich immer um ein gemittelttes Molekulargewicht, welches sich wie folgt zusammensetzt:

$$M_w = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} = \frac{\sum_i c_i}{\sum_i c_i / M_i} \quad (2.4)$$

Experimentelles Vorgehen. Alle Messungen wurden in einer Optima XL-A (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA, USA) mit Absorptionsoptik und einem An-Ti-60 Rotor durchgeführt. Alle Bauteile der Zellen stammten ebenfalls von Beckman-Coulter. Die Temperatur betrug immer 20 °C. Nach Erreichen dieser Temperatur in der Rotorkammer wurde der Rotor vor Beginn des Experimentes noch für mindestens eine Stunde equilibriert. Für Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente wurden 2-Sektor-Epon-Mittelstücke mit einem Füllvolumen von 400 µl und Quarzfenster verwendet. Die Daten wurden mit einer radialen Auflösung von 0.03 cm aufgenommen. Die verwendeten Geschwindigkeiten und Wellenlängen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente wurden mit der Software Sedfit9.4 (www.analyticalultracentrifugation.com; Schuck, 2000) ausgewertet. Für Sedimentati-

onsgleichgewichtsexperimente wurden 6-Sektormittelstücke aus Epon mit einem Füllvolumen von 150 μl pro Sektor und Quarzfenster verwendet. Nach 3 Stunden *overspeeding* wurden bei jeder gewählten Geschwindigkeit *scans* nach 24, 27 und 30h aufgenommen. Die Einstellung des Sedimentationsgleichgewichtes wurde durch Überlagerung der aufeinander folgenden *scans* mit Hilfe der Software WinMatch überprüft. Die Daten wurden mit einer radialen Auflösung von 0.01 cm aufgenommen. Die Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Programm *UltraScan* 8.4 (<http://www.ultrascan.uthscsa.edu/>; Demeler, 2005).

2.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (RKM) gehört zusammen mit der Rastertunnelmikroskopie (RTM) zu den Nahfeld-Techniken, bei denen die Messsonde bis auf wenige Angström an die Probe herangebracht wird. Mit der Sonde wird anschliessend die Oberfläche der Probe abgetastet (engl. *to scan* – abtasten, daher auch als *scanning force microscopy*, SFM bezeichnet). Über die Messung von Wechselwirkungen zwischen Sonde und Probe lässt sich ein topographisches Bild der Probe gewinnen. Beide Methoden wurden in den 1980er Jahren entwickelt und werden unter dem Begriff Rastersondenmikroskopie zusammengefasst. Sie liefern die am höchsten aufgelösten Abbildungen aller Mikroskopietechniken. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich RKM zum Einsatz kam, werden die Prinzipien der Rastertunnelmikroskopie hier nicht weiter betrachtet.

Aufbau und Funktionsprinzip. Die Messsonde ist eine Nadel, die auf einem Hebelarm aus Silizium befestigt wird. Auf die Spitze dieser Nadel wird ein Laserstrahl gerichtet. Die Nadel wird in Schwingung versetzt. Je nach Aufnahmemodus kann dies die Resonanzfrequenz oder eine andere definierte Frequenz sein (s. u.). Durch die Wechselwirkung der Nadelspitze mit der Probe verändert sich die Frequenz der Schwingung. Diese Frequenzänderung stellt in der Rasterkraftmikroskopie das primäre Messsignal dar. Es wird von einer Photodiode detektiert, welche die Ablenkung des Laserstrahls durch die Bewegung der Nadelspitze registriert. Mit der Photodiode verbunden ist ein piezoelektrisches Stellelement, welches wieder die ursprüngliche Frequenz einstellt. Diese Regelung geschieht entweder durch eine Bewegung des beweglichen Tisches oder der Hebelarm-

position. In beiden Fällen wird der Abstand zwischen Nadelspitze und Probe reguliert. Auf diese Weise wird die gesamte Probenoberfläche zeilenweise abgetastet.

Kräfte. Verantwortlich für die Änderung der Schwingungsfrequenz der Nadel sind Kräfte, welche zwischen Nadel und Probe wirken. Im interatomaren Bereich sind dies zumeist Abstoßungskräfte, welche durch die Überlappung von Elektronenwolken hervorgerufen werden. In einer Entfernung von ~ 1 nm wirken anziehende van-der-Waals-Kräfte, die ihre Ursache in Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen der Probe und Molekülen der Nadel haben. Bis in eine Entfernung von etwa 200 nm wirken anziehende Kapillarkräfte. Hinzu kommen noch elektrostatische Kräfte, die die größte Reichweite haben.

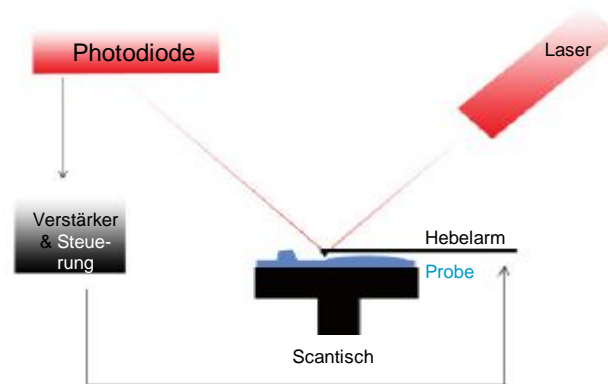


Abbildung 2.4: Prinzipieller Aufbau eines Rasterkraftmikroskopes.

Ein beweglicher Hebelarm tastet die Oberfläche der Probe ab. Dabei wird die Auslenkung des Hebelarmes von einem Laser erfasst und auf einer Photodiode registriert. Diese ist über ein piezoelektrisches Steuerelement mit dem Hebelarm verbunden, sodass ein Regelkreis entsteht, der über die Schwingungsfrequenz des Hebelarmes die Topographie der Probe erfasst.

Aufnahmemodi. Im Bereich der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie (zu unterscheiden von der spektroskopischen RKM, welche hier nicht vorgestellt wird) sind im Wesentlichen drei Aufnahmemodi zu unterscheiden. Abbildung 2.5 A zeigt den Kontaktmodus, bei welchem die Nadelspitze direkten Kontakt zur Probe hat. Hierbei kann entweder die Auslenkung der Spitze (als Funktion der Höhe der Probe) die Messgröße selbst sein (ge-regelter Modus, *constant height mode*) oder diese Auslenkung geht in einen Regelkreis

ein, welcher den Aufhängungspunkt der Nadel reguliert, sodass die Kraft zwischen Nadelspitze und Probe möglichst gleich bleibt (ungeregelter Modus, *constant force mode*). Der Nicht-Kontakt-Modus ist in Abbildung 2.5 B dargestellt. Hier schwingt die Nadel mit ihrer Resonanzfrequenz, welche durch Interaktionen mit der Probe ständig verändert wird. Das in diesem Modus gemessene Signal ist die Änderung der Resonanzfrequenz der Nadel. Der dritte Modus (2.5 C) wird als intermittierender Modus (*tapping mode*) bezeichnet. Hierbei wird die Nadel mit einer festen Frequenz zur Schwingung angeregt. Die Änderung der Resonanzfrequenz führt zu einer veränderten Schwingungsamplitude und einer Phasenverschiebung zwischen Anregung und Schwingung. Die Amplitude ist im intermittierenden Modus die Regelgröße, welche konstant gehalten werden soll. Dies wird durch Änderungen des Abstandes zwischen Nadel und Probe erreicht.

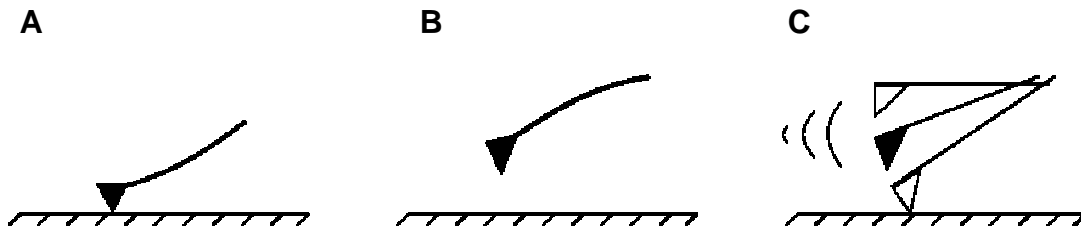


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der AFM-Aufnahmemodi.

In (A) hat die Spitze der Nadel direkten Kontakt zur Probenoberfläche. Dies wird als Kontaktmodus bezeichnet. (B) zeigt den Nicht-Kontakt-Modus und (C) den intermittierenden Modus (*tapping mode*), bei dem die Schwingungsfrequenz der Nadel fest ist.

Experimentelles Vorgehen. Für die Rasterkraftmikroskopie wurde ein NanoscopeTM IV von Digital Instruments (Woodbury, NY, USA) und die zugehörige Steuer – und Auswertungssoftware verwendet. Alle Aufnahmen wurden im *tapping mode* gemacht. 10 μ l der Chromatinproben wurden auf die Mica-Oberfläche gebracht, nachdem A_{260} auf $\sim 0,02$ eingestellt worden war. Die Mica-Plättchen wurden zweimal mit ~ 40 ml H_2O bi-dist. gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die Ausrichtung des Lasers auf die Nadelspitze wurde ein Lichtmikroskop verwendet.

2.4 Theoretische Methoden

Visualisierung & fragmentbasierte Modellierung. Das Programm VMD wurde für die Visualisierung von Strukturen und die Manipulation von Atomkoordinaten für die fragmentbasierte Modellierung verwendet. VMD ist ein *molecular-graphics*-Programm mit der Möglichkeit, Strukturen in vielen verschiedenen Dateiformaten zu laden und zu betrachten (Humphrey *et al.*, 1996). Die Sprache Babel wird zur entsprechenden Konversion verwendet. Die Darstellung der geladenen Moleküle kann vom Benutzer definiert werden, wobei eine große Zahl variabler Parameter wie Farben und Darstellungsarten zur Verfügung steht.

Ein für das fragmentbasierte Modellieren sehr nützlicher Bestandteil ist eine Tcl/Tk-Konsole. Mit Hilfe von Textbefehlen lassen sich die Koordinaten der geladenen Strukturen manipulieren um eine Überlagerung von Molekülen zu erreichen.

Homologiebasierte Modellierung. COMPOSER ist ein in die Software SYBYL implementiertes Hilfsmittel, welches die Durchführung multipler Sequenzabgleiche (*alignments*) der Zielsequenz gegen Datenbanken wie die PDB ermöglicht. (Wang *et al.*, 2000; Berman *et al.*, 2000). In diesen *alignments* werden Punkte für jede identische oder homologe Aminosäure vergeben. Substitutionen und Lücken erhalten negative Strafpunkte (*gap penalty*). Alle Einzelpunkte und Strafen werden zum *score* addiert, welcher ein Maß für die Übereinstimmung zwischen Sequenzen darstellt. (Needleman & Wunsch, 1970). Anschliessend wird auf der Basis der gefundenen homologen Sequenzen eine Faltung der Zielsequenz vorgeschlagen. SYBYL wurde auch verwendet, um kurze Peptide mit zufälliger Konformation zu generieren, welche die N- und C-terminalen Enden repräsentieren. Diese sind in den in der Einleitung (Abbildung 1.2) gezeigten Strukturen nicht aufgelöst.

Energieminimierung & Molekulardynamik wurden mit Hilfe des Software-Pakets AMBER 8 (Case *et al.*, 2004) durchgeführt. Dieses beinhaltet unter anderem das *script* Xleap. Es wurde zur Vorbereitung² der zu minimierenden Strukturen und Erstellung der dazu notwendigen Parameter-Dateien verwendet.

² Vor dem Start der Simulation ist es notwendig, die passenden Kraftfelder auszuwählen, sowie eine Lösungsumgebung und eventuell zusätzliche Ionen zu definieren.

Die Kraftfelder ff.99 und ff.03 (Duan *et al.*, 2003) sowie ein spezifisches Kraftfeld für methylierte Lysinreste (N. Kepper, nicht veröffentlicht) wurden für Energieminimierungen und MD-Simulationen in der Anwendung SANDER verwendet. Das Prinzip beider Prozesse ist es, eine gegebene Struktur zu entspannen, indem die Atome in einem iterativen Verfahren einen Energiegradienten bis zu einem hinreichend tiefen Minimum hinabgeführt werden. In MD-Simulationen wird hierbei ein größerer Energiebereich abgedeckt und tiefere Minima können gefunden werden.

Hydrodynamische Simulation. Das Programm HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000) wurde verwendet, um das hydrodynamische Verhalten von HP1 als Monomer und Dimer sowie seiner Einzeldomänen zu modellieren. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf den Sedimentations – und Diffusionskoeffizienten. Die Software nutzt ein Kugelmodell, welches auf der Ausfüllung des theoretischen Molekülvolumens mit Kugeln basiert. Größe und Anzahl dieser Kugeln können vom Benutzer definiert werden. Die verwendete Kugelgröße wurde hier mit 3.1 Å angegeben, die Anzahl hingegen wurde vom Programm selbst festgelegt.

Modellierungsstrategie. Die für die Modellierung der HP1-Struktur verwendeten Ausgangsstrukturen sind in der Einleitung (Abb 1.2) gezeigt. Dieses sind die Chromoshadow-Domäne von HP1 ohne die Aminosäuren 1-12, die dimerisierte CSD und die Chromo-Domäne inklusive einem gebundenen Peptid, das den Resten 4-10 des Histons H3 entspricht. Um ein Strukturmodell des Volllängenproteins zu erstellen, wurde wie folgt vorgegangen:

- (1) Homologiemodellierung der *hinge*-Region mittels COMPOSER.
- (2) Verknüpfung der Chromo-Domäne und *hinge*-Region durch Überlagerung von überlappenden Resten in VMD und Erstellung einer neuen pdb-Datei mit den resultierenden Koordinaten
- (3) Verknüpfung von CD+*hinge*-Region mit je einer Hälfte des CSD-Dimers (wieder mittels des in (2) angewendeten Überlappungsprinzips)
- (4) Anknüpfung der unstrukturierten Enden (erstellt in SYBYL) am N – und C – Terminus.

Nach jedem Schritt wurde eine Energieminimierung mit SANDER durchgeführt, nachdem die entsprechenden Parameter-Dateien mit Xleap erstellt wurden. Auch die Gesamtstruktur wurde zunächst energetisch minimiert, bevor eine Molekuldynamik-Simulation durchgeführt wurde. Die Simulation wurde bei einer Temperatur von 330 K gestartet und nach 500 Picosekunden auf 310 K abgekühlt. Insgesamt wurden 5 Nanosekunden in implizitem Lösungsmittel simuliert.

Alle Schritte wurden in pdb-Dateien dokumentiert, welche die Atomkoordinaten der neuen Molekülfragmenten enthalten. Für die Verknüpfung der einzelnen Fragmente wurden die PEARL Skripte *pdb_join.pl* und *pdb_add_chain.pl* verwendet (N. Kepper, pers. Mitteilung).

Basierend auf der veröffentlichten Struktur des CSD-Dimers wurde ein Strukturmodell des HP1-Dimers entwickelt. Dieses wurde für die Modellierung der Interaktion von HP1 und Nukleosomen verwendet. Dazu wurde ausgenutzt, dass eine Struktur der Chromodomäne mit einem gebundenen H3-Arm-Peptid veröffentlicht ist (Nielsen *et al.*, 2004). So konnten mit Hilfe von Überlappung verschiedene Modi der Bindung getestet werden. Die so entstandenen Strukturen wurden ebenfalls in SANDER energetisch minimiert.

2.5 Biochemische Methoden

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Steigende Mengen von DNA-Fragmenten (146 bp und 2.500 bp, 0,1-1 µg) wurden zu fluoreszent markiertem HP1 (HP1^f) gegeben (~ 8 µM). Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose in 1 x TBE-Puffer, Laufzeit 45 min bei 90 V) untersucht. Vor der Färbung mit Ethidiumbromid wurde das Fluoreszenzsignal von HP1^f aufgenommen.

Fraktionierung von Chromatin mittels HP1-Affinität. Um die Chromatinbindung von HP1 zu untersuchen, wurde ein Affinitätsassay etabliert. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 2.6 gezeigt. HP1 wurde an Ni-NTA-*beads* gebunden, wie im Abschnitt Proteinaufreinigung beschrieben. Anschliessend wurden Chromatinfasern hinzugegeben, die molaren Verhältnisse sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil angegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf Eis wurde der Überstand entfernt. Die Waschschr

und Elution erfolgten analog der Aufreinigung von HP1. Die Proben wurden mit 15 % TCA präzipitiert (Inkubation 30 min auf Eis, Zentrifugation 30 min, 13.000 rpm, 4 °C) und mit Aceton gewaschen (Zentrifugation 15 min, 13.000 rpm, trocknen bei Raumtemperatur). Anschliessend wurden alle Proben mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung untersucht, um eine mögliche Co-Elution von HP1 und Chromatin (Histon-Banden) zu verifizieren. Außerdem wurden die Proben für Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente und zur Aufnahme von AFM-Bildern (s. o.) verwendet, um mögliche Unterschiede in der Chromatinkonformation der einzelnen Fraktionen zu detektieren.

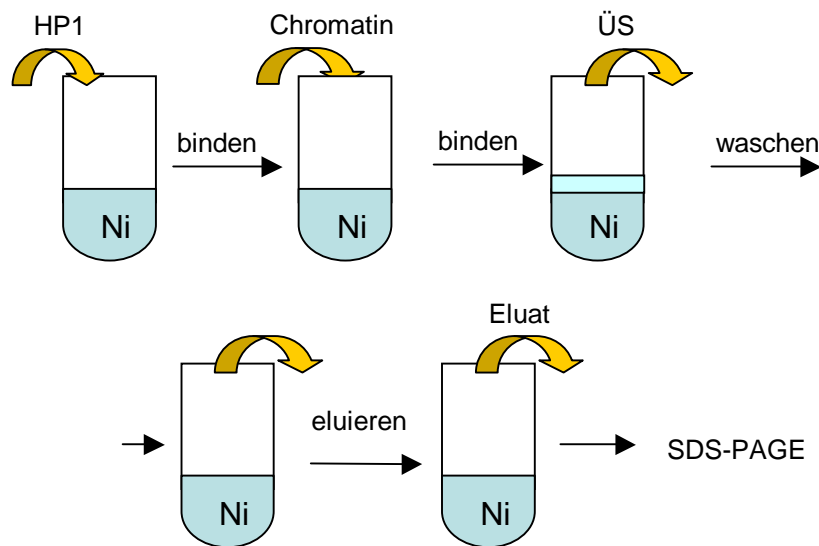


Abbildung 2.6: schematischer Ablauf des pull-down-Assay.

HP1 mit einem Polyhistidinschwanz wurde an Ni-NTA-beads gebunden. Anschliessend wurde Chromatin hinzugegeben und inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und nach einem Waschschrift wurde HP1 eluiert. Von allen Fraktionen wurden Aliquots genommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

MgCl₂-Fällung. Frisch isolierte Chromatinfasern (~ 3 µM Nukleosomen) wurden zu HP1 (~ 8 µM) gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. MgCl₂ wurde in einer Endkonzentration von 10 mM freien Mg²⁺-Ionen zugegeben um das Chromatin zu präzipitieren. Wegen des Vorhandenseins von 10 mM EDTA in der Präparation betrug die absolute Konzentration an MgCl₂ 20 mM. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (30 min, 13.000 rpm) und das Pellet in SDS-Ladepuffer gelöst. Der Überstand wurde mit 15 % TCA gefällt (Inkubation 30 min auf Eis) und das Präzipitat nach dem Abzentrifugieren (30 min, 13.000 rpm)

mit Aceton gewaschen. Auch diese Proben wurden in SDS-Ladepuffer gelöst. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (14 % Acrylamid), um zu verifizieren, dass HP1 zusammen mit Chromatinfasern durch MgCl_2 präzipitiert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinexpression & Proteinaufreinigung

HP1

Die Plasmide zur Expression von murinem HP1 sowie der Fragmente AS 10-80 (CD) und AS 104-185 (CSD) wurden zunächst durch Transformation in *E. coli* XL1-*blue* und anschließende Plasmidisolierung vervielfältigt (Murzina *et al.*, 1999). Anschließend erfolgte ein Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen, um die Identität der Plasmide zu überprüfen. Für die Expression wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21 pLysE-Zellen transformiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden jeweils 8-10 Kolonien verwendet, um 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika für eine Testexpression anzupflanzen. Die Kulturen wurden zunächst bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine OD₅₉₅ von 0.6 erreicht war. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und die Kulturen weitere 3 Stunden geschüttelt. Nach jeweils 30 Minuten wurden den Kulturen Proben entnommen und mittels SDS-PAGE die Expression des Zielproteins verfolgt. Wie in Abb. 3.1 gezeigt, wurde in allen drei Kulturen Zielprotein exprimiert. Bereits im Pilotmaßstab wurde jedoch deutlich, dass für die CD nur geringe Ausbeuten erzielt werden können.

Die Expression wurde anschließend im präparativen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden jeweils 25 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur zum Animpfen verwendet. Für das Vollängen-Protein sowie die CSD konnte von einer genügend hohen Expressionsrate ausgegangen werden. Für die CD war es notwendig, die Expressionsbedingungen zu optimieren. Nach Umklonierung des Fragmentes vom Ursprungsvektor pET16d in pET24d konnten die gleichen Expressionsbedingungen wie für Vollängen-HP1 verwendet werden.

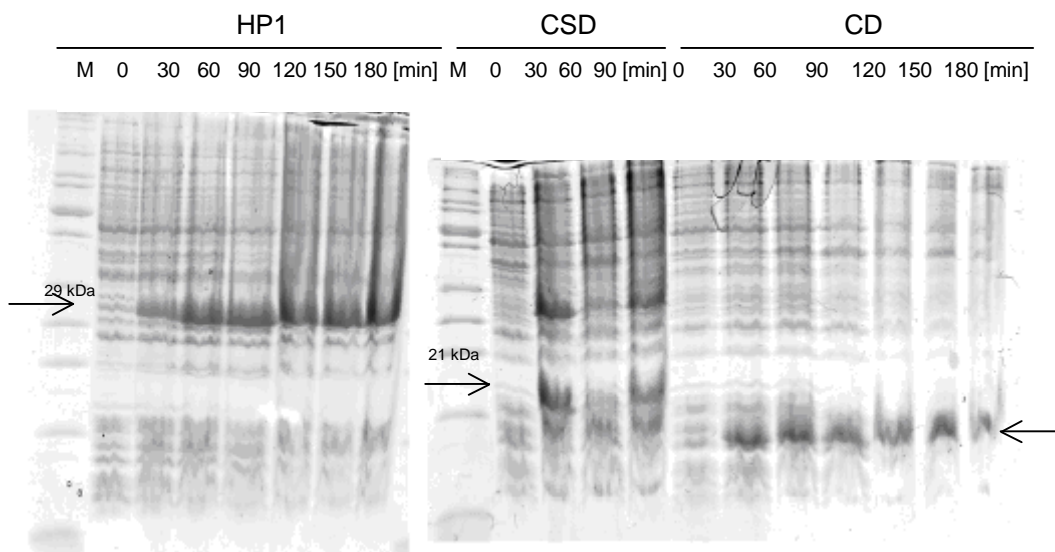


Abbildung 3.1: Testexpression von HP1.

Je 10 μ l des *E. coli* – Lysates wurden auf ein PAA-Gel aufgetragen. Volllängenprotein (links), CSD (Mitte) und CD (Originalplasmid, rechts). Über den Spuren ist jeweils die Expressionszeit in Minuten angegeben, die Pfeile markieren die Größe der Zielproteine. Das Volllängenprotein sowie die CSD konnten in ausreichender Menge exprimiert werden. Für hohe Ausbeuten war für die CD ein Umklonierungsschritt notwendig (s. Text). Als Marker (M) wurde der *Low Range*-Protein Marker von Fermentas verwendet. Die Höhe der Banden 21 kDa und 29 kDa ist markiert.

Das Protokoll zur Aufreinigung wird hier exemplarisch für das Volllängen-Protein dargestellt. Es wurde in gleicher Weise auch für die beiden anderen Konstrukte verwendet. Da die Proteine über einen Polyhistidin-Schwanz verfügten, waren sie einer Aufreinigung mittels Ni-Affinitätschromatographie zugänglich. Diese wurde als erster Schritt durchgeführt.

Dazu wurden die Kulturen nach Beendigung der Expression zunächst geerntet (Zentrifugation 20 min, 4.000 rpm) und in Lysepuffer aufgenommen (20 mM Tris pH 7.5, 500 mM KCl, 20 mM Imidazol, 15 % Glycerol v/v, 0.1 % NP-40 v/v). Die Lyse erfolgte durch Ultraschallbehandlung (mind. 8 mal 15 sec). Hierbei zeigte sich, dass eine sorgfältige Lyse der Zellen wichtig für eine hohe Proteinausbeute ist. Dabei war die Anzahl der Ultraschallzyklen wichtiger als deren Dauer. Eine Lyse von 4 mal 30 sec war weniger effektiv als 8 mal 15 sec, obwohl es sich um die gleiche Gesamtdauer handelte. Das erhaltene Lysat wurde 30 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. War der Überstand nicht klar, so wurde weitere 15 min zentrifugiert. Für die Affinitätschromatographie wurden zwei alternative Verfahren verwendet.

Zum einen wurde die Aufreinigung im *batch*-Verfahren durchgeführt, zum anderen wurden mit Ni-NTA-Agarose befüllte Durchfluss-Säulen verwendet. In beiden Fällen wurde zunächst der klare Überstand des Lysats zum Chromatographie-Material (ca. 0.5 ml pro Liter Bakterienkultur) gegeben. Nach etwa 1 h war das gesamte Lysat durch die Säule getropft. Beim *batch*-Verfahren wurde das Lysat 1 h unter ständiger langsamer Rotation mit den Ni-NTA-*beads* inkubiert. Gewaschen wurde jeweils 3 – 4 mal mit steigenden Mengen (0-20 mM) Imidazol in 20 mM Tris, 100 mM KCl. Für die anschließende Elution wurden 200 mM Imidazol eingesetzt. Im *batch*-Ansatz wurde 4 mal mit jeweils 500 µl Elutionspuffer pro ml *beads* für 15 min inkubiert. Auf die Durchfluss-Säulen wurden 2 ml Elutionspuffer gegeben und Fraktionen von je 500 µl gesammelt. Abbildung 3.2 oben zeigt eine typische Aufreinigung mit Hilfe des *batch*-Verfahrens. Die Aufreinigung mittels der Durchfluss-Säulen brachte keine weitere Verbesserung und wurde nicht weiter verwendet (siehe Diskussion). Die Spuren Ü1 und P zeigen Überstand und Pellet nach der Ultraschallbehandlung. Das gesamte exprimierte Protein war löslich, im Pellet ist keine HP1-Bande nachweisbar. In der nachfolgenden Spur ist der Überstand nach der Inkubation mit Ni-NTA-*beads* aufgetragen, sie zeigt nicht gebundenes Protein. Hier wird deutlich, dass nicht alles Zielprotein an das Chromatographie-Material gebunden hat. Die Verwendung von mehr Ni-NTA-*beads* pro Liter aufgearbeiteter Kultur brachte jedoch keine Verbesserung und wurde verworfen, um unspezifische Bindung von Proteinen zu vermeiden. Die folgenden vier Spuren zeigen die Waschfraktionen. Weiteres Waschen erschien nicht sinnvoll, da in der vierten Waschfraktion bereits kaum noch Verunreinigungen enthalten waren. Alle Eluat-fraktionen zeigen sehr hoch konzentriertes Zielprotein, aber auch noch einige Verunreinigungen, die in einem weiteren Aufreinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie (Abb. 3.2 unten) hinreichend, jedoch nicht vollständig entfernt werden konnten.

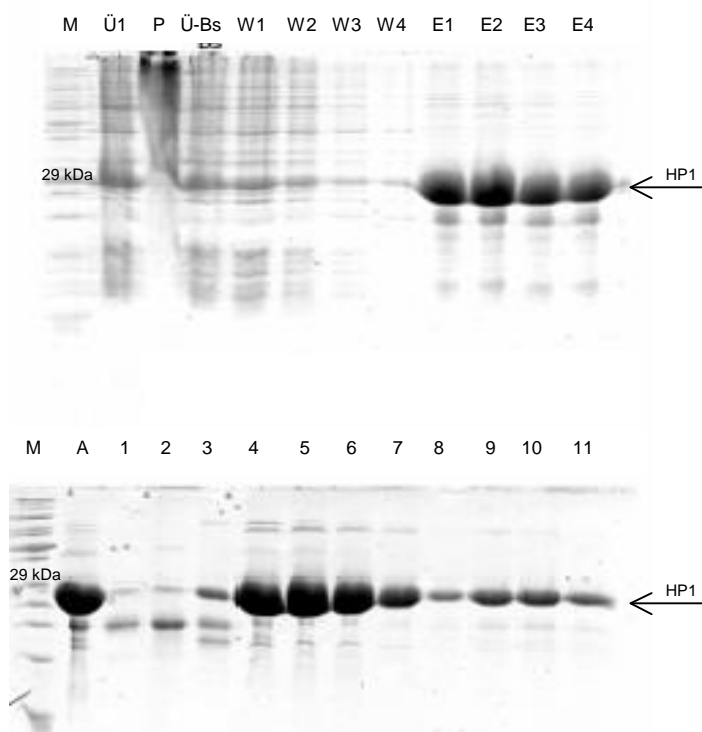


Abbildung 3.2: Aufreinigung von rekombinantem HP1.

Oben ist der erste Aufreinigungsschritt (Ni-Affinitätschromatographie, IMAC) gezeigt, unten die weitere Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie, jeweils auf einem PAA-Gel mit Coomassie-Färbung. Ü Überstand nach Ultraschallbehandlung, P Pellet nach Ultraschallbehandlung, Ü-Bs ungebundenes Protein, W Waschfraktionen 1 – 4, E Elutionsfraktionen 1-4. A Ausgangsmaterial (nach IMAC), 1-11 Elutionsfraktionen. Die Pfeile markieren die Größe des Zielproteins. Da das aufgereinigte Protein nach der Affinitäts-chromatographie noch signifikante Mengen Fremdprotein enthielt (s. oben, Spuren E1 bis E4), wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Hierbei konnten die Verunreinigungen weitestgehend abgetrennt werden (Fraktionen 1 bis 3). Als Größenmarker (M) wurde der *low range*-Proteinmarker von Fermentas verwendet. Zur Orientierung ist die Position der 29 kDa-Bande angegeben.

Suv3-9H1

Auch für die Expression von Suv3-9H1 wurden bakterielle Vektoren verwendet (*D. melanogaster*: Eskeland *et al.*, 2007; *Mus musculus*: Yamamoto & Sonoda, 2003). Für Suv3-9H1 aus *Drosophila* wurde keine detektierbare Menge Protein exprimiert. Daher wurden im Folgenden die Plasmide von Yamamoto & Sonoda zur Expression von murinem Suv3-9H1 benutzt. Die Expression erfolgte analog zu HP1 zunächst im Pilotmaßstab von 50 ml. Hierfür wurden die *E. coli*-Stämme BL21 pLysE und Rosetta pLysE verwendet. In beiden Fällen war die Expressionsrate jedoch gering. Auch ein *Screening* nach verbesserten Expressionsbedingungen brachte keine höheren Ausbeuten. Weder eine geringere Expressionstemperatur noch ein veränderter Zeitpunkt der Induktion oder

Expression über Nacht konnte die Proteinmenge erhöhen. Daher war ein effizientes Aufreinigungsprotokoll von größter Wichtigkeit.

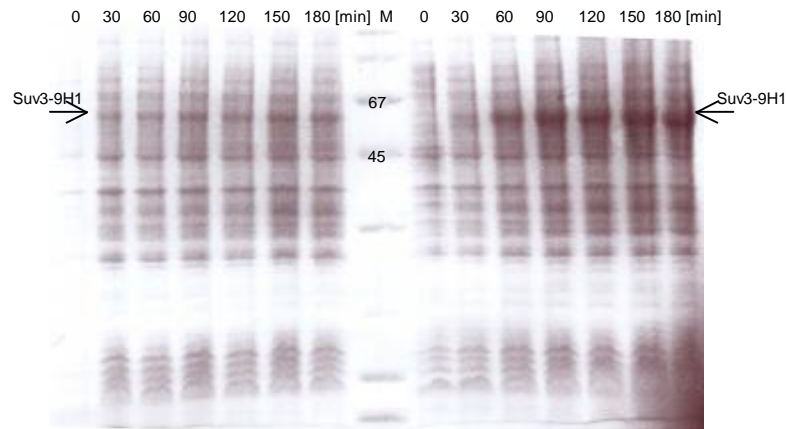


Abbildung 3.3: Testexpression von Suv3-9H1.

Je 10 µl des E. coli – Lysates wurden auf ein PAA-Gel aufgetragen. Die Expression wurde in verschiedenen Bakterienstämmen getestet. Links ist die Expression in E. coli Rosetta pLysE gezeigt, rechts die Expression in E. coli BL21 pLysE. Über den Spuren ist die Expressionszeit in Minuten angegeben. Die Pfeile markieren die Größe des Zielproteins. In beiden Fällen war die Überexpression von Suv3-9H1 schwach. Für die Expression von größeren Proteinmengen wurden E. coli BL21 pLysE-Zellen verwendet, da mit diesen eine höhere Zelldichte erreicht werden kann. Zur Größenbestimmung diente der Proteinmarker von Serva, die Höhe der 45 kDa- und 67 kDa-Banden ist angegeben.

Zur Expression im 4L-Maßstab wurden BL21 pLysE-Zellen verwendet, da hiermit eine etwas höhere Zelldichte und damit mehr Gesamtprotein erzielt werden konnte. Für die Aufreinigung wurde zunächst ein Pellet aus 2L Kultur in PBS gelöst und 8 mal 15 sec sonifiziert. Anschliessend wurden die Zelltrümmer 30 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf GST-beads gegeben und für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Die beads wurden 3 mal mit PBS gewaschen und die Elution erfolgte 3 mal mit 10 mM Glutathion in 50 mM Tris, pH 7.5. Mit diesem Protokoll wurden Ausbeuten von durchschnittlich 2-5 mg Protein aus einem Liter Kultur erzielt. Da die exprimierte Absolutmenge des Proteins gering war, wurde auf einen weiteren Aufreinigungsschritt verzichtet, der wiederum mit Proteinverlusten einhergegangen wäre. Für Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge reichen diese Ausbeuten und der Reinheitsgrad (beurteilt durch SDS-PAGE) nicht aus. Deshalb beschränkt sich die Untersuchung der Interaktion zwischen Suv3-9H1 und HP1 auf biochemische Assays (s. unten).

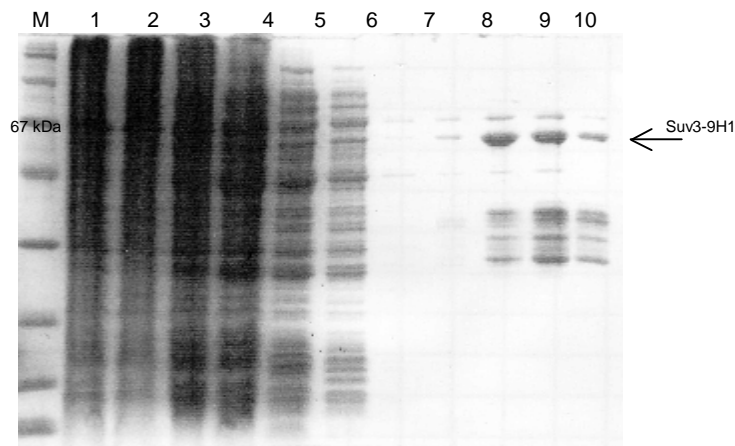


Abbildung 3.4: Aufreinigung von Suv3-9H1.

Die Schritte der Affinitätschromatographie wurden auf ein PAA-Gel aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie gefärbt. Es wurden aufgetragen: 1 Zellen nach Beendigung der Expression, 2 Lysat, 3 Überstand des Lysates (lösliches Protein), 4 Überstand GST-beads (ungebundenes Protein), 5-8 Waschfraktionen, 9-11 Eluate. Die Größe des Zielproteins ist durch einen Pfeil angezeigt. Ein großer Anteil in den Eluatfraktionen ist Fremdprotein, der Aufreinigungsgrad ist für biophysikalische Untersuchungen nicht ausreichend. Als Größenmarker (M) wurde der Proteinmarker von Serva verwendet.

3.2 Untersuchungen zur Selbstassoziation von HP1 mittels AUZ

Um die Selbstassoziation von HP1 zu untersuchen, wurden zunächst Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt. Abbildung 3.5 zeigt in rot die bestimmte Sedimentationskoeffizientenverteilung (A) und die daraus abgeleitete Molekulargewichtsverteilung (B). Das Experiment wurde in einem Konzentrationsbereich von 8 μM bis 30 μM HP1-Monomer durchgeführt. In den untersuchten Proben wurde jeweils nur eine Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten von $2.8 \pm 0.1\text{S}$ gefunden. Dies entspricht dem zu erwartenden Wert für ein ~ 50 kDa großes Protein. Das Molekulargewicht eines HP1-Monomers beträgt 22.7 kDa inklusive des Polyhistidinschwanzes. Für ein Dimer ergibt sich eine Größe von 45.4 kDa. Da der experimentell bestimmte Sedimentationskoeffizient wie auch das abgeleitete Molekulargewicht von $52 \text{ kDa} \pm 5 \text{ kDa}$ nicht konzentrationsabhängig sind liegt HP1 ausschliesslich als Dimer vorliegt. Die zufällige Verteilung der Residuen (nicht dargestellt) zeigt, dass die berechnete $c(s)$ -Verteilung die experimentellen Daten sehr gut beschreibt.

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, welche der Domänen für die Dimerisierung verantwortlich ist. Dafür wurden die Fragmente CD und CSD getrennt experi-

miert und analog zum Vollängen-Protein mittels Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten untersucht. Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse für die CD in schwarz, die berechneten Verteilungen für die CSD sind grün dargestellt. Auch hier wurde über den untersuchten Konzentrationsbereich von 10-20 μM jeweils nur eine Spezies ermittelt. Für die Chromo-Domäne liegt der ermittelte S-Wert bei 1.4 S, sie liegt im untersuchten Konzentrationsbereich nur als Monomer vor. Dies wird bestätigt durch das abgeleitete Molekulargewicht (B) von 9 ± 2 kDa, der aus der Aminosäuresequenz berechnete Wert beträgt 9.4 kDa. Die Chromoshadow-Domäne bildet ein Homodimer, wie der ermittelte mittlere S-Wert von 1.9 S zeigt. Dies entspricht einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa, der theoretische Wert des CSD-Dimers liegt bei 21.5 kDa.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente eine durch die Chromoshadow-Domäne vermittelte Homodimerisierung von HP1 zeigen. Die Dissoziationskonstante muß im nanomolaren Bereich liegen, da bei den verwendeten Konzentrationen im μM -Bereich kein Monomer detektiert wurde. Die Chromodomäne ist an der Dimerisierung nicht beteiligt.

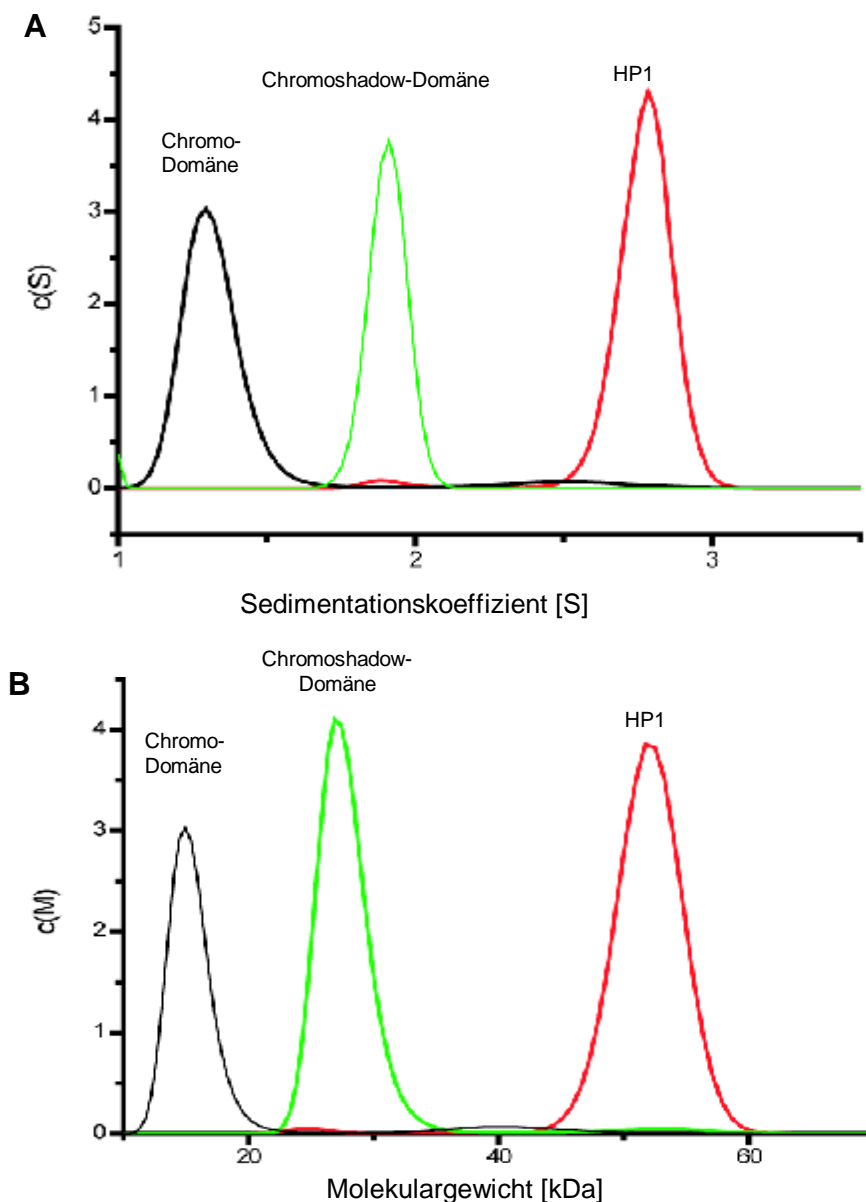


Abbildung 3.5: Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente von HP1 und den Fragmenten CD und CSD.

In (A) ist die $c(s)$ -Verteilung gezeigt, in (B) die daraus abgeleitete $c(M)$ -Verteilung. Alle Proteine liegen jeweils als eine einheitliche Spezies vor, die Chromo-Domäne als Monomer (9 kDa) das Vollängenprotein und die Chromoshadow-Domäne jeweils als Dimer (52 kDa bzw. 25 kDa). Die Chromo-Domäne ist an der Dimerisierung von HP1 nicht beteiligt.

Die weitere Untersuchung des Assoziationszustandes von HP1 und den Fragmenten CD und CSD erfolgte mittels Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten. Diese bieten die Möglichkeit, verschiedene Assoziationsmodelle auf ihre Anwendbarkeit hin zu überprüfen und Gleichgewichtskonstanten zu ermitteln. Die Versuche wurden mit jeweils drei

Proteinkonzentrationen bei drei Geschwindigkeiten durchgeführt und eine globale Kurvenanpassung (*fit*) an verschiedene Modelle durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 zusammengefasst. Dabei zeigt der linke Teil jeweils die experimentellen Daten (schwarze Punkte) und die berechneten Kurven für das Modell „eine einheitliche Spezies“ (durchgezogene Linie). Rechts sind die Residuen aufgetragen. Sowohl für das Volllängen-Protein als auch für die beiden Fragmente wird das System durch das gewählte Modell gut beschrieben. Kurvenanpassungen mit anderen Modellen („Monomer-Dimer-Assoziation“ und „zwei nicht-interagierende Spezies“) brachten keine Verbesserung der Residuen. Das berechnete Molekulargewicht der Spezies beträgt für HP1 46.7 ± 0.3 kDa (Abb. 3.6 A). Für die Einzeldomänen wurden ein Molekulargewicht von 9 kDa (CD, Abb. 3.6 B) bzw. 21 kDa (CSD, Abb. 3.6 C) ermittelt. Eine Zusammenfassung dieser Resultate ist Tabelle 3.1 zu entnehmen. Alle drei Proteine wurden nochmals untersucht, nachdem der Polyhistidinschwanz enzymatisch entfernt wurde (nicht gezeigt). Auch in diesen Experimenten konnte die C-terminal vermittelte Homodimerisierung von HP1 bestätigt werden, es handelt sich somit nicht um eine artifizielle Dimerisierung durch den Aufreinigungstag.

Tabelle 3.1: Hydrodynamische Berechnungen zu HP1.

Struktur	M_{exp}^2 [kDa]	M_{calc} [kDa]	s_{exp}^3 [S]	s_{calc} [S]	\bar{v} [ml/g]
HP1 ₂	46.7 +/- 0.3	45.4	2.8 +/- 0.1	2.8	0.728
CD	9.0 +/- 0.2	9.4	1.4 +/- 0.2	1.3	0.731
CSD ₂	21.0 +/- 0.3	21.5	1.9 +/- 0.2	2.6	0.726

² aus Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten

³ aus Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten

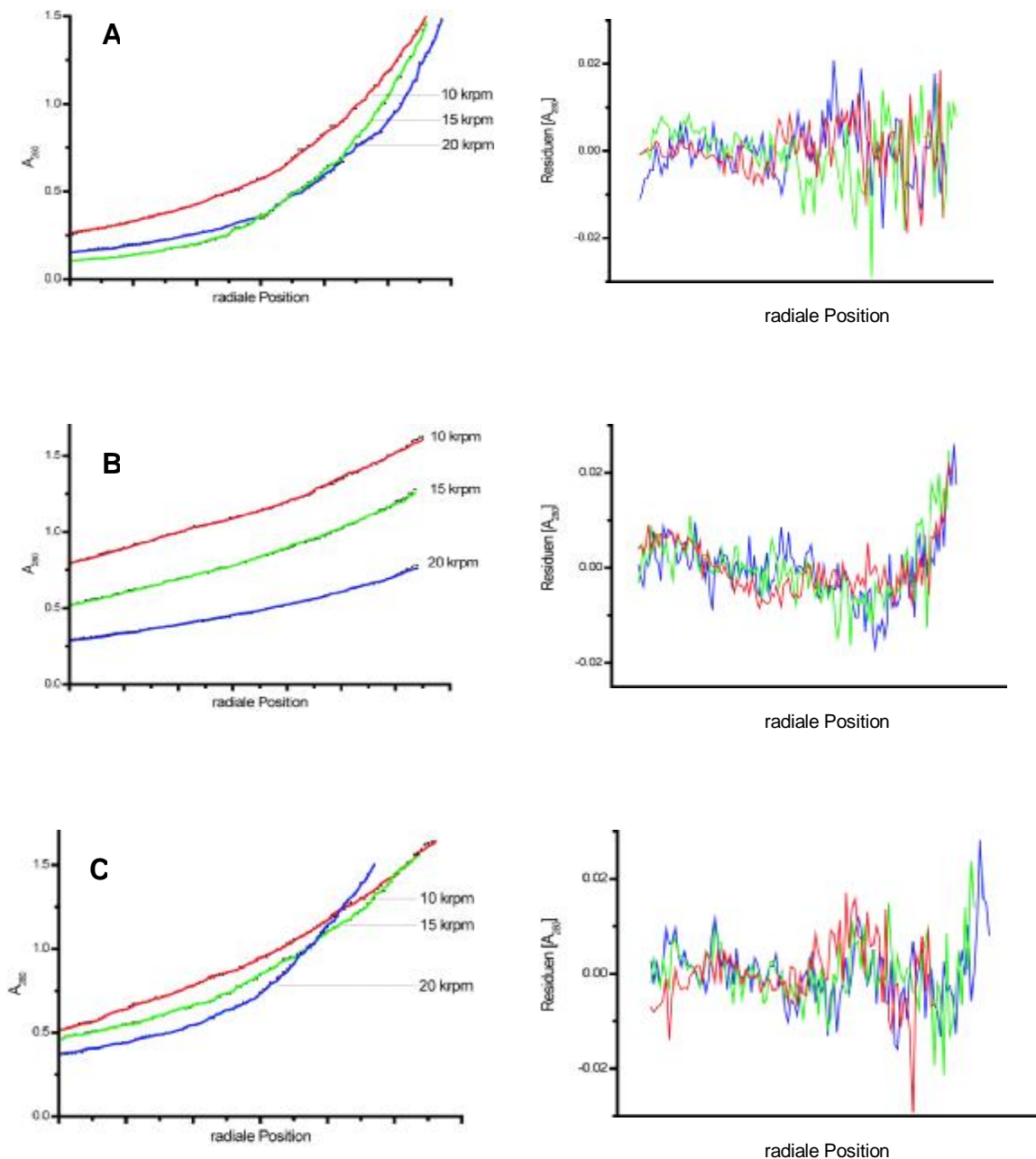


Abbildung 3.6: Sedimentationsgleichgewichtsexperimente.

Von HP1 (A), der Chromo-Domäne (B) und der Chromoshadow-Domäne (C) wurden während des Gleichgewichtsexperimentes bei 3 Geschwindigkeiten Konzentrationsgradienten aufgezeichnet. Diese sind jeweils links dargestellt. Es wurde eine Kurvenanpassung an das Modell „eine einheitliche Spezies“ durchgeführt. Die Residuen (Abweichungen der realen Daten von der berechneten Kurve) sind rechts gezeigt. Die Daten werden durch dieses Modell gut beschrieben. Alle drei Konstrukte liegen jeweils als eine Spezies vor. Das Vollängenprotein und die CSD liegen als Dimer vor, die CD als Monomer.

3.3 Molekulare Modellierung der Struktur von HP1

Um eine Vorstellung von der räumlichen Anordnung der Domänen zu gewinnen und einen möglichen Modus der Interaktion mit Chromatin postulieren zu können, wurde aus den publizierten Strukturen (Ball *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2004) ein Strukturmodell des Gesamtproteins HP1 erstellt. Abb. 3.7 A zeigt das Modell des dimerisierten Moleküls vor der Molekulardynamik-Simulation, darunter ist die Struktur nach der Simulation gezeigt. Die Homologie-Modellierung ergab für die *hinge*-Region eine Faltung in eine einzelne α -Helix. Diese stellt eine flexible Verbindung zwischen CD und CSD her.

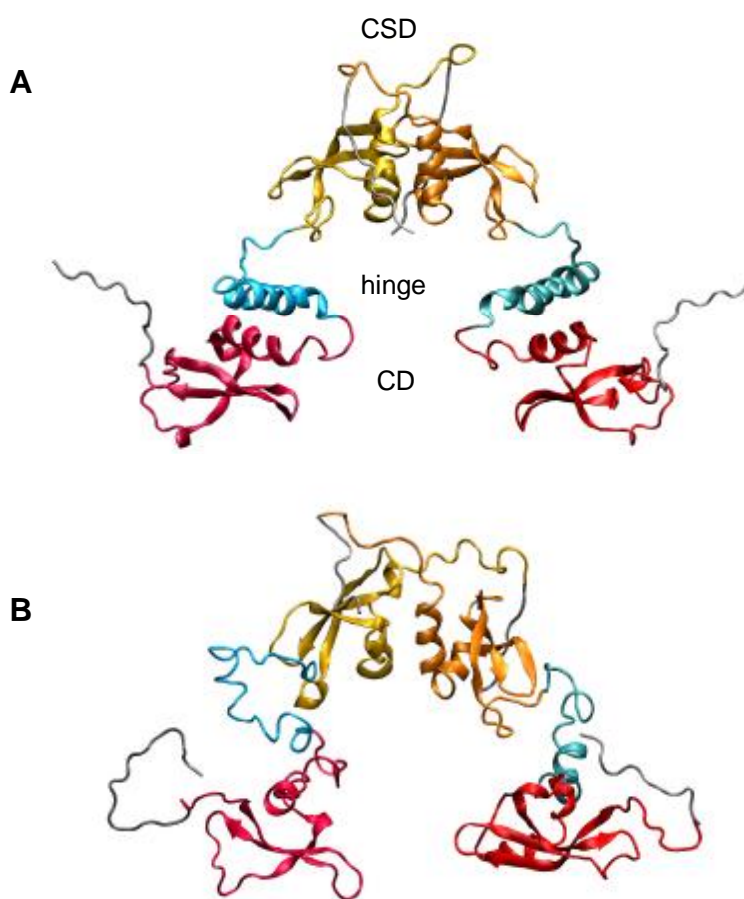


Abbildung 3.7: Strukturmodell des HP1-Dimers.

Aus den publizierten Strukturen der CD (rot) und CSD (gelb) wurde ein Modell des HP1-Dimers erstellt. Die Konformation der *hinge*-Region (blau) wurde nach Homologie-Modellierung als α -Helix dargestellt. (A) zeigt die Struktur vor der Molekulardynamik-Simulation. Durch diese Simulation wird die α -Helix der *hinge*-Region aufgelöst, wie in (B) gezeigt. Die Chromodomänen bewegen sich aufeinander zu. Grau gezeichnet sind die N – und C-Termini in zufälliger Konformation.

Wie die Molekulardynamik-Simulation zeigte, bewegen sich die beiden Chromo-Domänen aufeinander zu, wohingegen die Chromoshadow-Domänen nahezu unverändert bleiben. Die α -Helix der *hinge*-Region löst sich weitgehend auf. Diese klammerartige Beweglichkeit des Gesamtmoleküls liefert einen wichtigen Hinweis auf die Funktionalität von HP1.

Die aufgestellten Strukturmodelle wurden wie auch die publizierten Strukturen der Einzeldomänen zur Berechnung theoretischer Sedimentationskoeffizienten mit HYDROPRO verwendet. Tabelle 3.1 fasst die experimentellen (AUZ) und theoretischen Werte zusammen. Für das Gesamtprotein wurde im Experiment ein Sedimentationskoeffizient von 2.7 S ermittelt, dies ist in guter Übereinstimmung mit dem s-Wert von 2.8 S, der für das Modell des HP1-Dimers berechnet wurde. Dadurch wird zum einen nochmals bestätigt, dass HP1 als Dimer vorliegt; zum anderen liefert diese Übereinstimmung einen Hinweis auf die Validität des entwickelten Strukturmodells. Für das Ergebnis der hydrodynamischen Berechnungen war es unerheblich, ob die Struktur vor oder nach der Molekulardynamik-Simulation als Input verwendet wurde. Für die Chromo-Domäne ist ebenfalls eine hohe Übereinstimmung zwischen gemessenem und berechnetem s-Wert zu verzeichnen. Auch hier wird die bereits anhand der Experimente getroffene Aussage bestätigt, dass es sich bei der CD um ein Monomer handelt. Für die Chromoshadow-Domäne wurde experimentell ein s-Wert von 1.9 S bestimmt, der in HYDROPRO berechnete Wert liegt bei 2.6 S. Der Grund dieser Abweichung konnte nicht abschließend geklärt werden.

3.4 Interaktion von HP1 mit DNA

Um eine mögliche Bindung von HP1 an DNA zu untersuchen, wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Alexa-488 Protein kovalent markiert und mit DNA-Fragmenten in steigender Konzentration inkubiert. In der anschliessend durchgeführten Elektrophorese konnte eine Verschiebung der Banden hin zu höheren Molekulargewichten weder im Fluoreszenzsignal von HP1 noch nach der Ethidiumbromidfärbung beobachtet werden (s. Abbildung 3.8). Es wird daher davon ausgegangen, dass HP1 keine spezifische DNA-Bindeaktivität aufweist.

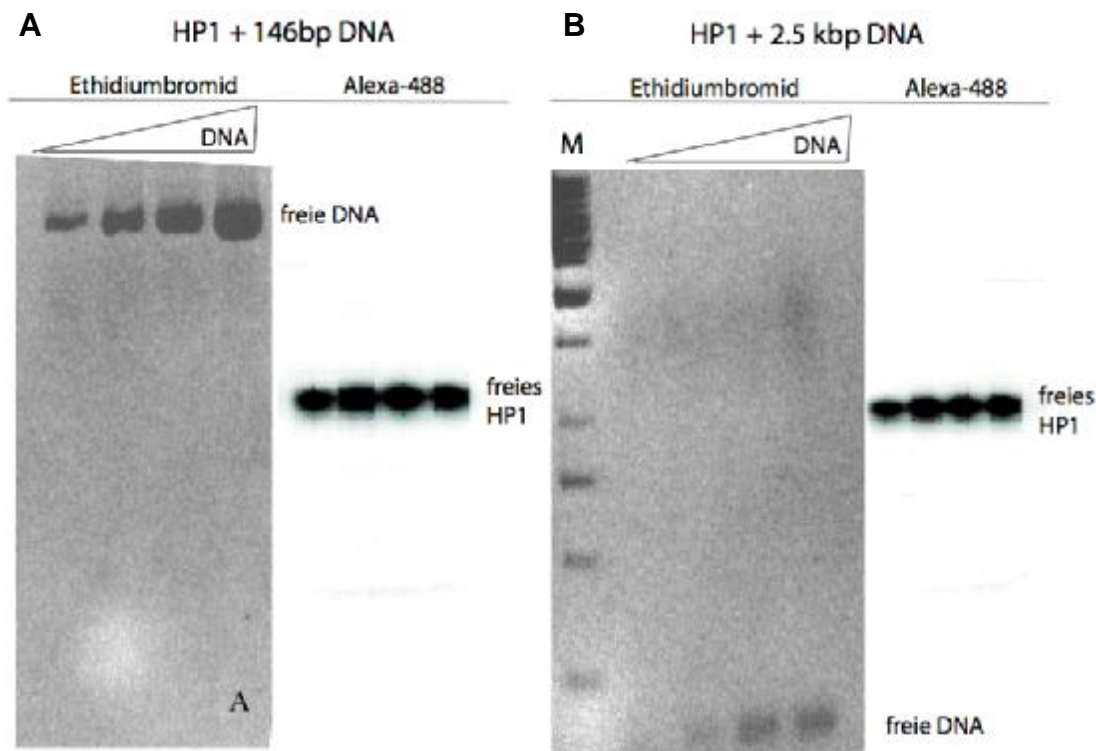


Abbildung 3.8: Native Gelelektrophorese zur DNA-Bindeaktivität von HP1. Fluoreszenzmarkiertes HP1 wurde mit steigenden Mengen von DNA-Fragmenten zwei verschiedener Längen ((A) 146 bp, (B) 2.5 kbp) inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Gezeigt sind jeweils links das Ethidiumbromidsignal (DNA) und rechts das vorher aufgenommene Fluoreszenzsignal des Proteins. Durch Zugabe von HP1 wird die Höhe der DNA-Banden nicht verändert, eine Bindung von HP1 an DNA wurde somit nicht nachgewiesen. Als Größenmarker für die DNA-Fragmente wurde der 1kb-Marker von Fermentas verwendet.

3.5 Interaktion von HP1 mit core - Histonen

Da für HP1 eine Bindung an methyliertes Histon H3 als zentrale Eigenschaft postuliert wird, sollte zunächst untersucht werden, ob ein Komplex zwischen HP1 und fluoreszent markiertem H3^f·H4-Dimer beobachtet werden kann. HP1 wurde mit steigenden Mengen des Histon-Heterodimers inkubiert. Bis zu einem 10-fachen Überschuss wurde jedoch keine fluoreszierende Bande im Gel beobachtet. Das Fluoreszenzsignal war lediglich in den Taschen des Gels sichtbar. Dies ist zu erwarten, wenn kein Komplex gebildet wird, da das H3^f·H4-Dimer positiv geladen ist und nicht ins Gel wandert. Somit wurde hier keine Bindung von HP1 an H3^f·H4 nachgewiesen. Es ist jedoch zu beachten, dass die

Histone in Bakterien exprimiert wurden und daher keine posttranslationalen Modifikationen tragen. Abbildung 3.9 zeigt das analoge Experiment mit dem H2A^fH2B -Dimer. Auch hier ist ein Fluoreszenzsignal nur in den Geltaschen nachzuweisen, auch an dieses Heterodimer erfolgt nach den durchgeführten Experimenten keine Bindung von HP1. Zur Kontrolle wurde das H2A^fH2B -Dimer mit NAP1 inkubiert; für dieses Histon-Chaperon ist eine Interaktion mit H2A·H2B publiziert (Fejes Toth *et al.*, 2005).

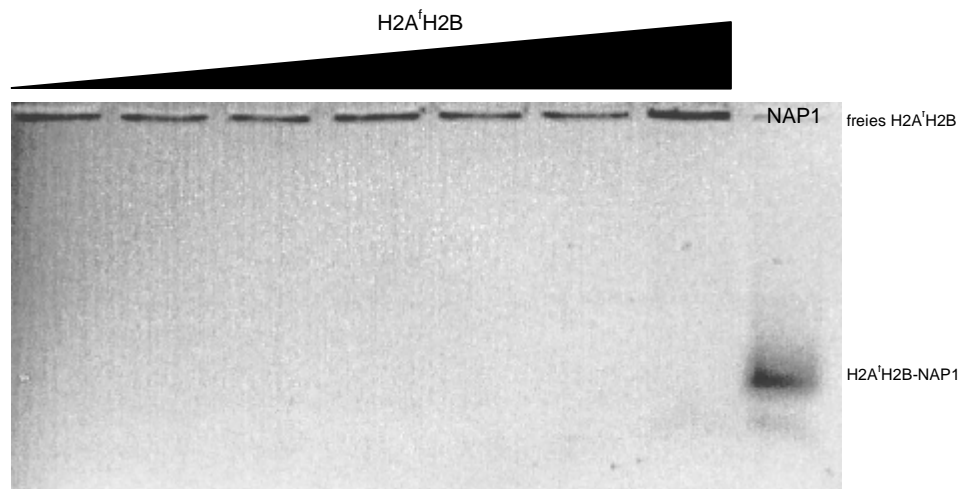


Abbildung 3.9: Native Gelelektrophorese von HP1 mit H2A^f·H2B.

1 μ M HP1 wurde mit steigenden Mengen H2A^f·H2B inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Gezeigt ist das H2A^f·H2B -Fluoreszenzsignal. Eine fluoreszierende Bande ist nur in den Taschen zu sehen, da das Histondimer aufgrund seiner Ladung nicht in das Gel wandert. Eine Komplexbildung mit HP1 findet nicht statt. Als Positivkontrolle ist NAP1 gezeigt, welches einen Komplex mit H2A^f·H2B bildet. Dieser ist als fluoreszierende Bande im Gel zu sehen.

3.6 Interaktion von HP1 mit *Linker*-Histon H1

Neben der Interaktion mit *core*-Histonen wurde auch untersucht, ob HP1 an *Linker*-Histon H1 bindet. Dazu wurde zunächst ein *EMSA*-Assay mit fluoreszent markiertem H1 analog zum Vorgehen bei den *core*-Histonen durchgeführt. Auch H1 als positiv geladenes Protein wandert allein nicht zum positiven Pol. Im Gegensatz zu H2A·H2B und H3·H4 wurde hier eine fluoreszierende Bande im Agarosegel nachgewiesen (s. Abb. 3.10). Diese ist ab einem 5fachen HP1-Überschuss nachweisbar.

Auch ein *pull-down*-Assay lieferte Hinweise auf eine Interaktion von H1 und HP1. Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, sind sowohl H1 als auch HP1 in der Eluatfraktion. Diese Co-Elution zeigt, dass zwischen den beiden Proteinen ein Komplex gebildet wird.

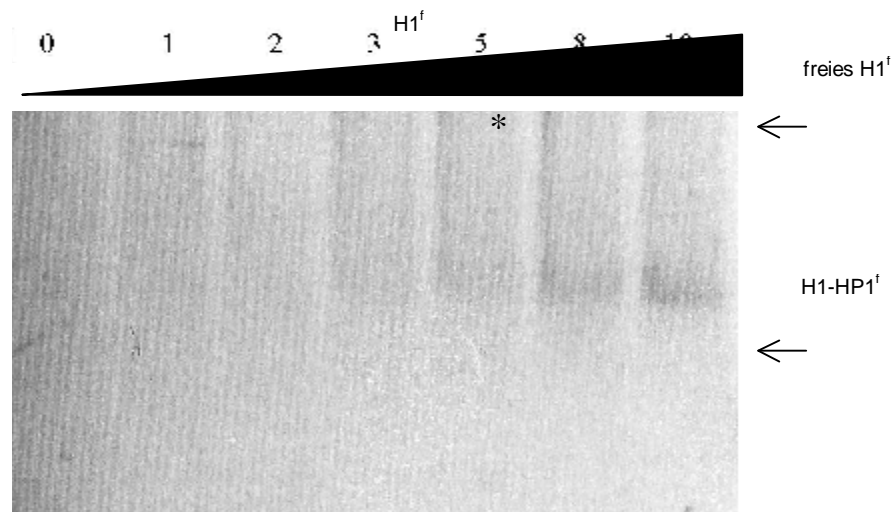


Abbildung 3.10: Native Gelelektrophorese von HP1 mit H1^f.

1 μ M H1^f wurde mit steigenden Mengen HP1 inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Gezeigt ist das H1^f-Fluoreszenzsignal. H1 als stark positiv geladenes Protein wandert allein nicht ins Gel. Daher ist in den ersten Spuren nur ein schwaches Fluoreszenzsignal in den Taschen zu sehen. Ab einem 5-fachen Überschuss von HP1 (siehe *) erscheint eine Bande im Gel, dies zeigt einen Komplex HP1-H1 an.

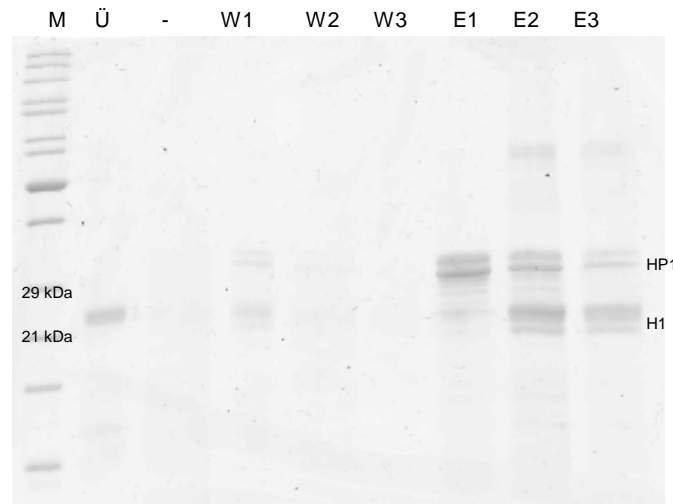


Abbildung 3.11: Pull-down-Experiment zur Interaktion von H1 und HP1.

SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung. Ni-NTA-*beads* wurden mit HP1 beladen und anschliessend mit H1 inkubiert. Nach drei Waschschritten wurde das gebundene Protein in drei Fraktionen eluiert. (Ü) zeigt den Überstand nach dem Binden der Proteine, somit ungebundenes Protein. (W) zeigt die Waschfraktionen und (E) die Eluatfraktionen. Sowohl HP1 als auch H1 sind in den Eluatfraktionen, dies ist ein erster Hinweis auf einen entstehenden Komplex. Als Marker (M) wurde der *low range*-Proteinmarker von Fermentas verwendet.

Diesen ersten Hinweisen auf eine Interaktion des *Linker* - Histons mit HP1 sollte mittels analytischer Ultrazentrifugation weiter nachgegangen werden. Es wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente mit HP1-H1-Mischungen in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen durchgeführt. Die aus den Daten ermittelte $c(s)$ -Verteilung ist in Abb. 3.12 gezeigt. Auch hier lässt sich die Bildung eines Komplexes zwischen H1 und HP1 zweifelsfrei nachweisen. Dieser weist einen Sedimentationskoeffizienten von 3.5 ± 0.1 S auf, ein Wert, der für einen Komplex von etwa 70 kDa zu erwarten ist. Mit Kenntnis der Molekulargewichte von H1 (20 kDa) und HP1 (2 x 24 kDa) lässt sich aus der gezeigten $c(s)$ -Verteilung eine Stöchiometrie von 1 H1 zu 1 HP1-Dimer ableiten. In den beiden Proben mit dem höchsten H1-Anteil (1:1 und 3:1) wurde auch eine Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten von ~ 1.5 S detektiert. Hierbei handelt es sich möglicherweise um ungebundenes H1. Dies liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass nicht mehrere H1-Moleküle an ein HP1-Dimer binden können. Ein größerer Komplex wurde auch bei 3-fachem Überschuss von H1 nicht beobachtet.

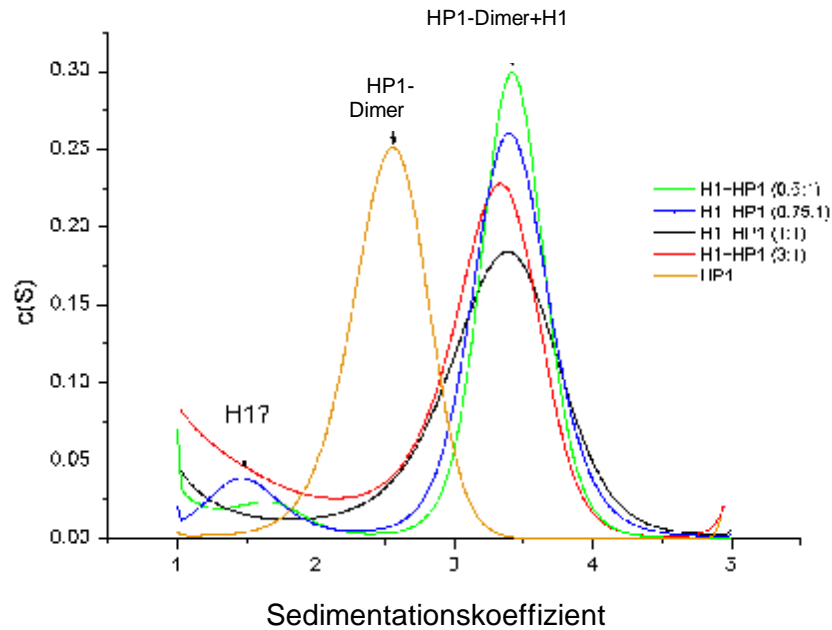


Abbildung 3.12: Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment zur Interaktion von H1 und HP1.

Linker-Histon H1 wurde in ansteigendem Verhältnis zu HP1 gegeben. Gezeigt ist die resultierende $c(s)$ -Verteilung. Unabhängig vom eingesetzten Verhältnis der Proteine entsteht nur ein höhermolekularer Komplex. Dieser weist eine Stöchiometrie von einem H1 zu einem HP1-Dimer auf.

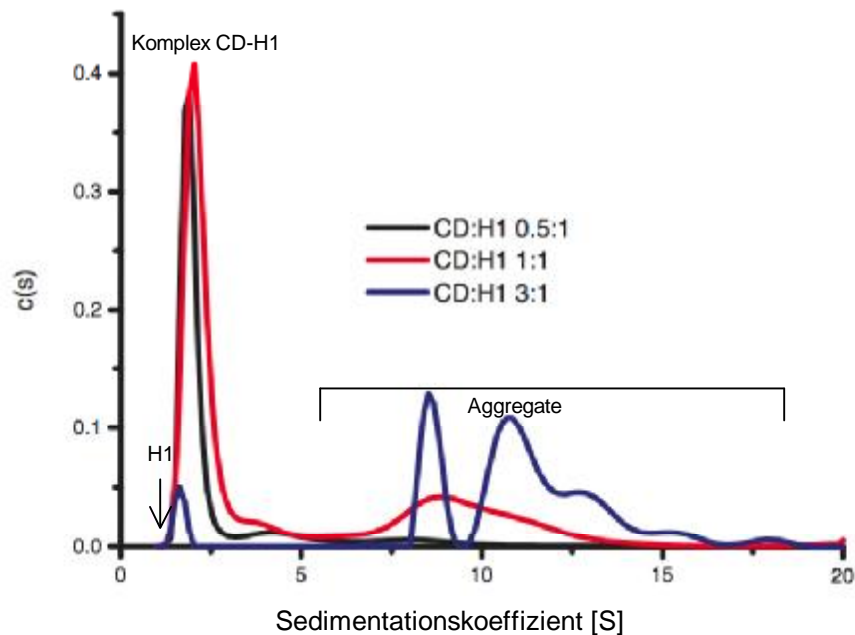


Abbildung 3.13: Sedimentationskoeffizientenverteilung der Chromo-Domäne mit H1. Gezeigt ist eine Titration der HP1-Chromo-Domäne zu H1. Ein Komplex von etwa 2 S entsteht. Der S-Wert von H1 ($c(s)$ -Verteilung nicht gezeigt) ist mit einem Pfeil markiert. Spezies mit höheren S-Werten sind vermutlich Aggregate von H1.

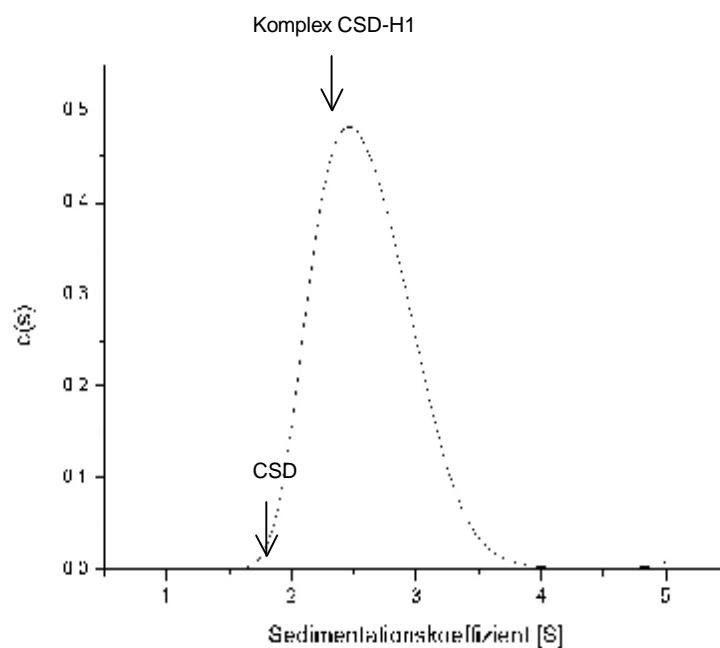


Abbildung 3.14: Sedimentationskoeffizientenverteilung eines Komplexes der HP1-Chromoshadow-Domäne mit H1.

Die CSD und H1 wurden in äquimolarem Verhältnis gemischt und zentrifugiert. Die $c(s)$ -Verteilung zeigt eine Spezies, die größer ist als die dimerisierte CSD (s. Pfeil). Auch die CSD ist daher an der Bildung des H1-HP1-Komplexes beteiligt.

3.7 qualitative Untersuchung der Interaktion von HP1 mit Suv3-9H1

Zahlreiche publizierte Studien zur Interaktion von HP1 und H3K9Met3 (u. a. Nielsen *et al.*, 2004; Fischle *et al.*, 2005) legen die Vermutung nahe, dass auch das für die Trimethylierung von H3K9 verantwortliche Enzym Suv3-9H1 ein Interaktionspartner von HP1 ist. Dies würde die Spezifität von HP1 für diese Modifikation weiter erhöhen. Da die im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Proteinmengen für biophysikalische Untersuchungen nicht ausreichen, können hier nur anhand von *pull-down*-Experimenten an Ni-NTA-*beads* Hinweise auf eine solche Interaktion gezeigt werden. Dazu wurden Ni-NTA-*beads* mit HP1 beladen und anschliessend mit Suv3-9H1 inkubiert. Die Wasch- und Elutionsschritte erfolgten analog zur Aufreinigung von HP1. Wie in Abbildung 3.15 in Spur E1 erkennbar, werden HP1 und Suv3-9H1 gemeinsam von Ni-NTA-Material eluiert. Das für das gezeigte Experiment eingesetzte Verhältnis der Proteine (1:1) sollte noch modifiziert werden, da das im Überstand noch sichtbare Suv3-9H1 darauf hindeutet

tet, dass nicht an jedes HP1 ein Suv3-9H1 gebunden hat. Eine Aussage zur Stöchiometrie der Interaktion lässt sich jedoch aus dem gezeigten Experiment nicht ableiten.

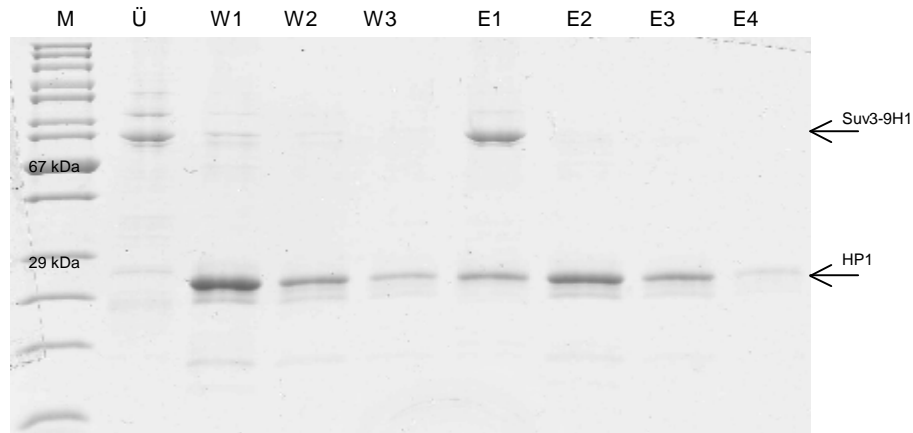


Abbildung 3.15: Pulldown-Experiment zur Interaktion von HP1 und Suv3-9H1.

Ni-NTA-*beads* wurden mit HP1 beladen und anschliessend mit Suv3-9H1 inkubiert. Das Gel wurde wie folgt beladen : (M) Proteinmarker von Serva, (Ü) Überstand nach Binden der Proteine, (W) Waschfraktionen, (E) Eluatfraktionen. In Eluatfraktion 1 sind sowohl HP1 als auch Suv3-9H1 vorhanden, diese Co-Elution deutet auf eine Interaktion hin.

3.8 Interaktion von HP1 mit Nukleosomen

Chromatinfasern lassen sich mit Hilfe von $MgCl_2$ präzipitieren. Diese Tatsache wurde zunächst genutzt, um die Bindung von HP1 an Chromatin qualitativ zu zeigen. Dazu wurden frisch isolierte Chromatinfasern mit HP1 in einem Verhältnis von 1 HP1-Dimer zu 2 Nukleosomen inkubiert. Das Präzipitat sowie der Überstand wurden mittels SDS-PAGE untersucht, wie in Abb. 3.16, in den mit (+HP1) gekennzeichneten Spuren gezeigt. In den darauf folgenden Spuren ist eine Kontrolle ohne HP1 gezeigt, anschliessend wurde nur HP1 mit $MgCl_2$ inkubiert. Die beiden letzten Spuren zeigen den Input, unbehandelte Chromatinfasern und HP1. Es wurde gezeigt, dass HP1 selbst nicht mit $MgCl_2$ ausfällt (s. Spuren (nur HP1)). Das durch $MgCl_2$ -Zugabe gefällte Proteingemisch enthält sowohl HP1 als auch *core*-Histone (s. erste Spur nach dem Marker). Dies weist darauf hin, dass HP1 in Anwesenheit von Chromatin mit präzipitiert wird. Anhand dieses Experimentes wird daher von einer *in vitro* - Bindung von HP1 an Chromatin ausgegangen. In weiteren Experimenten wurde diese Hypothese eingehender überprüft.

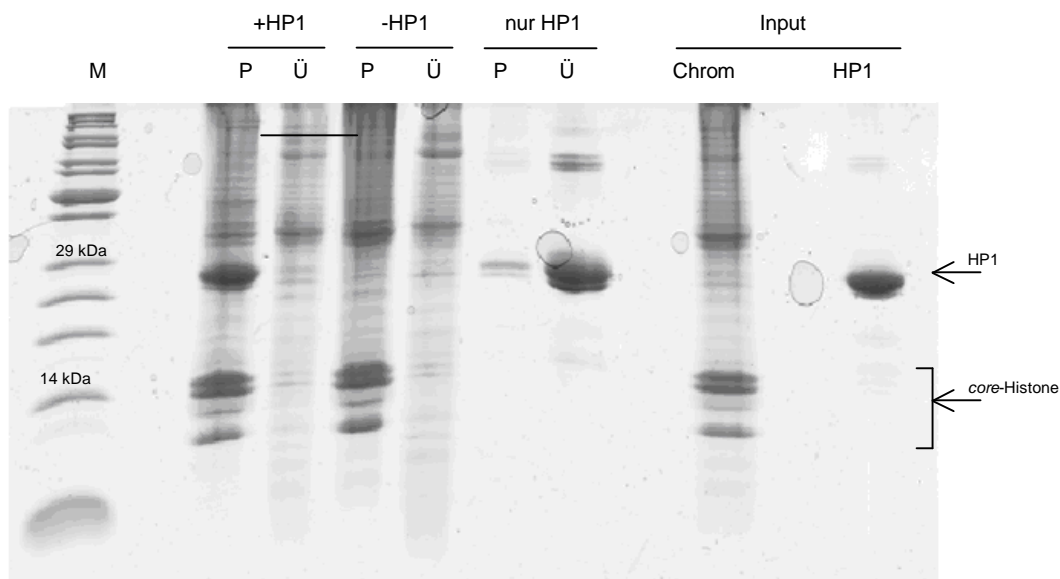


Abbildung 3.16: Copräzipitation von Chromatin und HP1 mit $MgCl_2$.

SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung einer Copräzipitation von Chromatin und HP1. In den mit (+HP1) bezeichneten Spuren wurden HP1 und Chromatinfasern zusammen inkubiert und anschliessend $MgCl_2$ zugegeben. (-HP1) zeigt das Kontrollexperiment ohne HP1 und (nur HP1) das Kontrollexperiment ohne Chromatin. (M) zeigt den low-range Proteinmarker von Fermentas. In den mit (P) bezeichneten Spuren ist jeweils das Präzipitat aufgetragen, (Ü) zeigt den Überstand. HP1 wird spezifisch im Anwesenheit von Chromatin (Histonen) durch $MgCl_2$ präzipitiert. In den Proben ohne Chromatin wird HP1 nicht präzipitiert und bleibt im Überstand.

Um die Spezifität der postulierten Interaktion zu zeigen, wurden *pull-down*-Experimente an Ni-NTA-*beads* durchgeführt. Bei einer spezifischen Bindung von HP1 an Chromatin wären eine HP1-Bande und Histonbanden im Eluat zu erwarten. Abb. 3.17 zeigt ein Experiment, für welches die Chromatinfasern mit DNase präpariert wurden, um die enthaltene RNA zu bewahren. Für das in Abbildung 3.18 gezeigte Experiment wurde Chromatin mit MNase aufgereinigt. Diese unspezifische Nuklease schneidet sowohl DNA als auch RNA. Auf jedem Gel ist zunächst der Überstand der Ni-*beads* und somit Protein aufgetragen, welches nicht an HP1 gebunden hat. Die nächsten Spuren (W) zeigen Waschfraktionen, die hier enthaltenen Proteine binden schwach oder unspezifisch an HP1. In den mit E gekennzeichneten Spuren sind die Eluatfraktionen aufgetragen, welche HP1 und gebundene Proteine enthält. Hier sind auch die Histonbanden deutlich erkennbar, sodass von einer spezifischen Bindung ausgegangen werden kann.

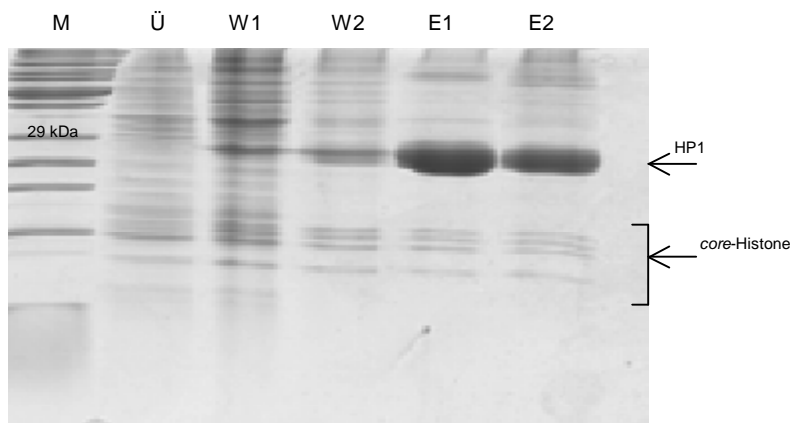


Abbildung 3.17: pull-down-Experimentes mit RNA-haltigen Chromatinfasern.

Ni-NTA-*beads* wurden mit HP1 beladen und anschliessend mit Chromatin (isoliert durch Verdau mit RNase-freier DNase) inkubiert. Als Größenmarker (M) wurde der *low range*-Proteinmarker von Fermentas verwendet. (Ü) zeigt die ungebundenen Proteine im Überstand. (W) zeigt die Waschfraktionen und (E) die Eluatfraktionen. Sowohl HP1 als auch Histone sind in den Eluatfraktionen. Dies zeigt eine Bindung von HP1 an native Chromatinfasern.

Mit Hilfe von Kontrollexperimenten wurde überprüft, dass Chromatinfasern selbst nicht an die Chromatographiematrix binden (Abb. 3.18 B). Die im Experiment eingesetzte HP1-Konzentration wurde so gewählt, dass alle Bindungsstellen des Chromatographie-materials besetzt sind und eine unspezifische Bindung anderer Proteine zu vernachlässigen ist. Das in Abbildung 3.17 gezeigte Experiment ergab ebenfalls eine Coelution von HP1 und Chromatin. Da dieser Befund sowohl mit RNA-freiem als auch mit RNA-haltigem Chromatin experimentell bestätigt wurde, ist zunächst nicht davon auszugehen, dass RNA für die Bindung von HP1 essentiell ist.

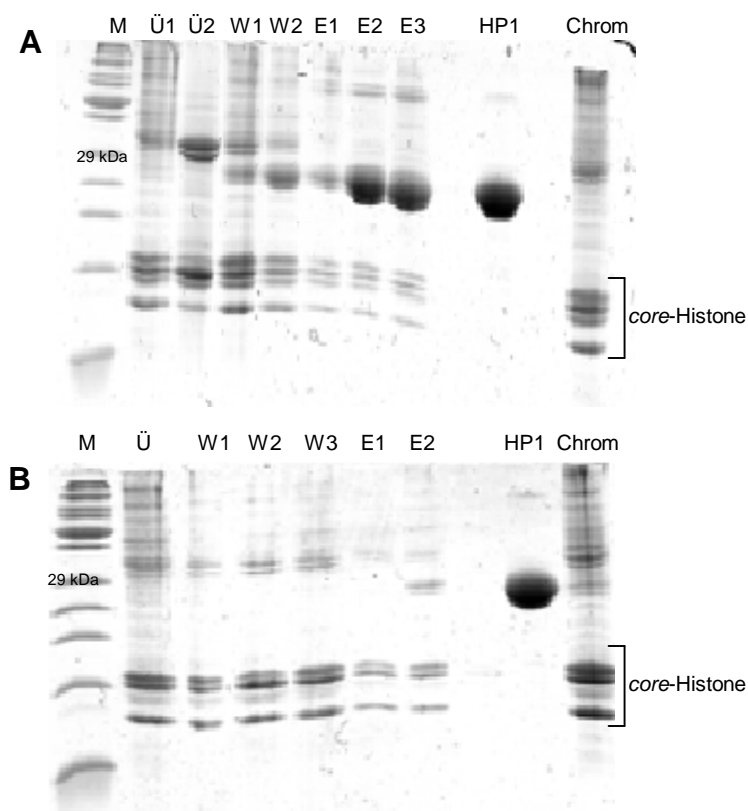


Abbildung 3.18: Pull-down-Experiment zur Interaktion von HP1 mit Chromatin.

(A) Ni-NTA-beads wurden mit HP1 beladen und mit Chromatin (isoliert durch MNase-Verdau) inkubiert. (Ü) zeigt die ungebundenen Proteine im Überstand nach dem Beladen der beads. (W) zeigt die Waschfraktionen und (E) die Eluatfraktionen. (B) zeigt das Kontrollexperiment ohne HP1.

Die mit Hilfe des Affinitätsassays gewonnenen Fraktionen wurden mittels AFM weiter untersucht, um zu überprüfen, ob es durch HP1-Bindung möglich ist, kompakte und weniger kompakte Chromatinfragmente zu fraktionieren. Abbildung 3.19 zeigt exemplarische Aufnahmen. Die Proben A und B entstammen dem Überstand der Ni-HP1-beads, die hier sichtbaren Chromatinfragmente haben nicht an HP1 gebunden. Hier sind eher kleiner Fragmente mit einer durchschnittlichen Höhe von ~ 5 nm sichtbar. Die in C und D dargestellten Fragmente sind der Eluatfraktion entnommen, sie zeigen auch eine HP1-Bande in der Coomassie-Färbung. Die in C und D aufgenommenen Chromatinfasern weisen deutlich größere (≥ 10 nm), höhere und kompaktere Strukturen auf als die Fraktionen des Überstandes sowie die Waschfraktion. Eine detaillierte statistische Auswertung

wurde für die hier gezeigten Aufnahmen nicht durchgeführt, da die Stichprobenzahl zu gering war.

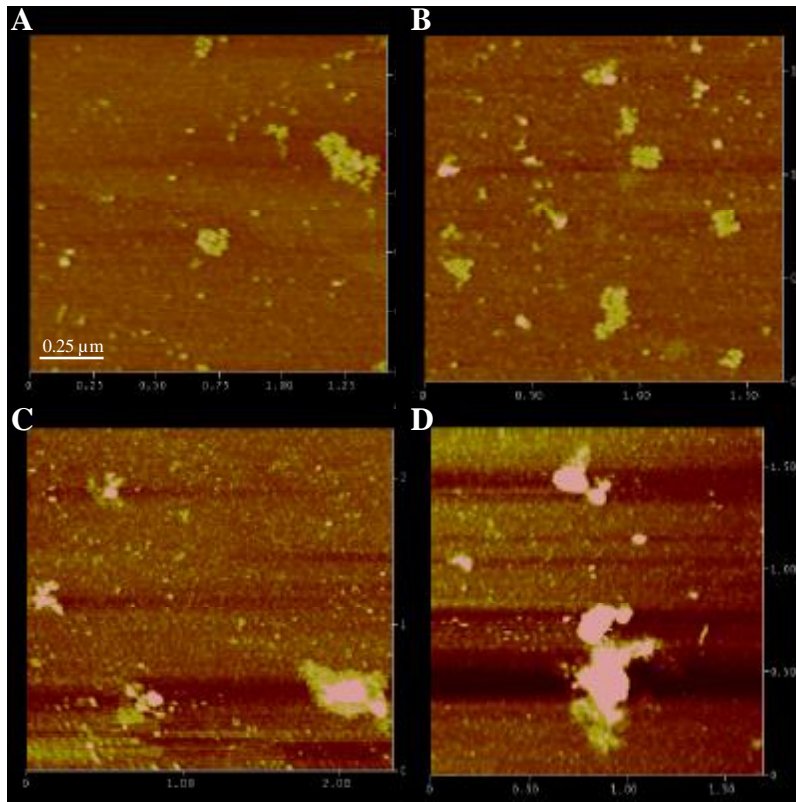


Abbildung 3.19: AFM-Aufnahmen der im *pull-down*-Experiment (Abb. 3.18) gewonnenen Chromatinfractionen.

Die Proben (A) und (B) wurden der Waschfraktion entnommen, (C) und (D) entstammten dem Eluat. Die Chromatinfasern im Eluat enthalten auch HP1, sie sind höher und kompakter als die Fasern in der Waschfraktion.

Weitere AFM-Experimente, die in Zusammenarbeit mit Jan-Phillip Stier durchgeführt wurden, konnten den oben gezeigten Effekt bestätigen und quantifizieren. Eine Auftragung der Anzahl von untersuchten Fasern gegen die Fläche pro Nukleosom zeigt, dass die Zugabe von HP1 und Suv3-9H1 zu Fasern eine Verringerung der Fläche pro Nukleosom zur Folge hat (Abb. 3.20; Stier, Kaltoven, Heuvelman & Rippe, nicht veröffentlicht).

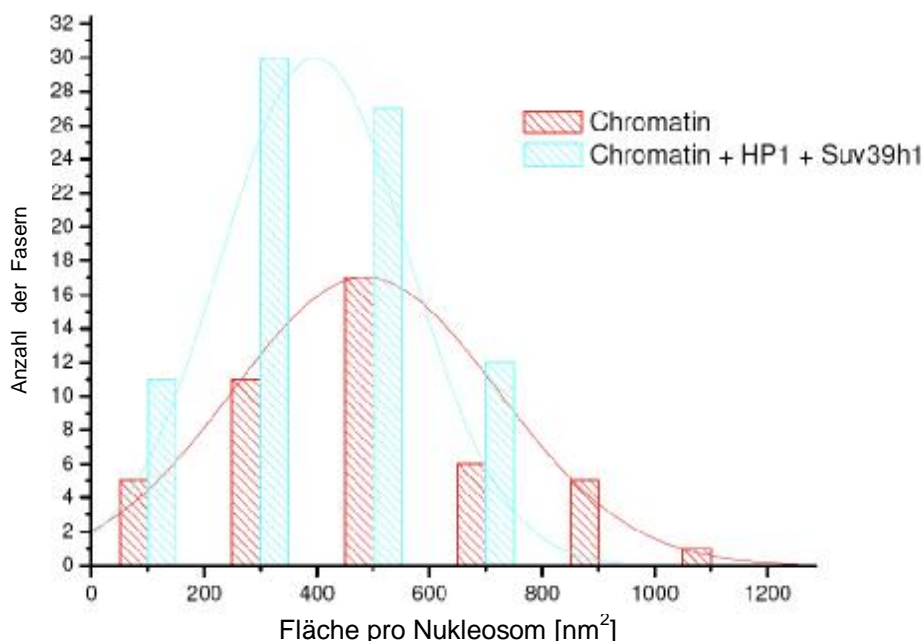


Abbildung 3.20: Histogramm der Auswertung von AFM-Aufnahmen.

Chromatinfasern wurden mit HP1 und Suv3-9H1 inkubiert (blau) bzw. unbehandelt verwendet (rot). Die Bestimmung der Fläche pro Nukleosom wurde mit Hilfe eines Skriptes für MATHLAB durchgeführt (Kepert *et al.*, 2005). Die schraffierten Balken zeigen die experimentellen Daten, die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassung an eine GAUSSsche Normalverteilung. Bei den behandelten Fasern liegt das Maximum der Verteilung bei einer kleineren Fläche pro Nukleosom, die Zugabe der beiden Proteine hat somit einen kompaktierenden Effekt.

Der Einfluss von HP1 auf die Konformation von Chromatinfasern wurde auch mit analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Es wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente mit Chromatin durchgeführt, welchem entweder keine zusätzlichen Proteine zugegeben wurden oder HP1 bzw. HP1 und Suv3-9H1. Die resultierende $c(s)$ -Verteilung ist in Abbildung 3.21 gezeigt. In allen drei Fällen ist die Form der Verteilung gleich, es treten Spezies mit Sedimentationskoeffizienten von ~ 4 , ~ 12 und ~ 20 S auf. Durch die Zugabe von HP1 zu den Fasern ist eine Verschiebung hin zu etwas größeren Sedimentationskoeffizienten zu finden. Wurden den Fasern sowohl HP1 als auch Suv3-9H1 zugegeben, erhält man eine weiter nach rechts verschobene Verteilung, die auf eine dichtere und kompaktere Struktur der Fasern hinweist. Die relativen Verschiebungen liegen im Mittel bei 20%.

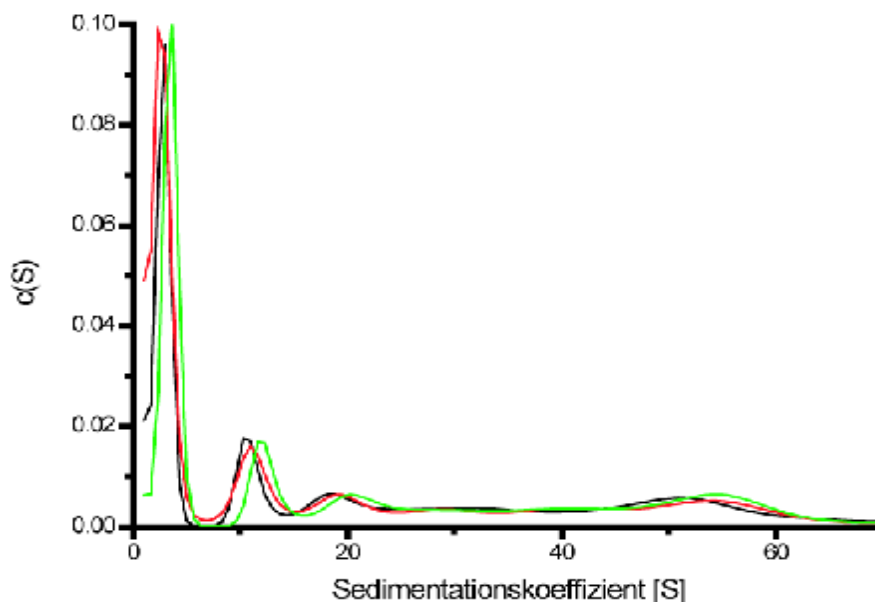


Abbildung 3.21: c(s)-Verteilung von Chromatin.

Mit nativ aufgereinigten Chromatinfasern wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment durchgeführt. Die schwarze Kurve zeigt die aufgereinigten und nicht weiter behandelten Chromatinfasern. Die Hauptspezies liegen bei 4 S, 12 S und 20 S. Durch Zugabe von HP1 (rote Kurve) werden die Spezies 12 S und 20 S etwas nach rechts verschoben. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von Suv3-9H1 noch verstärkt. Die Zugabe von HP1 und Suv3-9H1 (grüne Kurve) kompakteren Konformationen.

Bei den hier beobachteten Spezies handelt es sich jedoch um kurze Chromatinfragmente. Berechnungen der Sedimentationskoeffizienten mit HYDROPRO zeigen für ein Dinukleosom einen Wert von 5.7 S. Längere Fasern von > 20 Nukleosomen würden deutlich höhere Sedimentationskoeffizienten aufweisen. In diesem Bereich konnten jedoch keine einzelnen Spezies aufgelöst werden. Daher wurde keine weitere Quantifizierung der Daten vorgenommen.

Die experimentellen Befunde sollen gemeinsam mit den theoretischen Erkenntnissen zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise von HP1 beitragen. Hierfür war es nach der Untersuchung einiger relevanter Interaktionspartner von HP1 wichtig, weitere theoretisch-strukturelle Informationen zu gewinnen. Daher wurde die 2004 publizierte Struktur des Tetranukleosoms (Schalch *et al.*, 2004) um die Arme der H3-Moleküle erweitert (Kaltoven, Kepper & Rippe, nicht veröffentlicht) und anschließend verwendet, um ein Modell der Bindung eines HP1-Dimers an ein Tetranukleosom zu etablieren.

Verschiedene Modi wurden zunächst als gleichberechtigte Hypothesen angenommen: (I) beide Chromo-Domänen binden an die beiden H3-Arme eines Nukleosoms, (II): das HP1-Dimer bindet zwei Arme von gegenüber liegende Nukleosomen und (III): es werden die Arme von Histonen zweier gestapelter Nukleosomen gebunden (siehe Abbildung 3.22). Die erste Möglichkeit wurde verworfen, da eine solche Bindung im Verlauf der Modellierung zu einer Kollision des HP1-Dimers mit dem Histon-Oktamer führte. Beide andere Modi sind prinzipiell vorstellbar, da der Abstand der Histon-Arme im Bereich des Abstandes der Chromo-Domänen liegt. Bevorzugt wird nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit das Modell (III), nachdem das HP1-Dimer an zwei gestapelte Nukleosomen bindet. Im Hinblick auf die Kompaktierung durch HP1 ist die Bindung zweier gestapelter Nukleosomen besser vorstellbar.

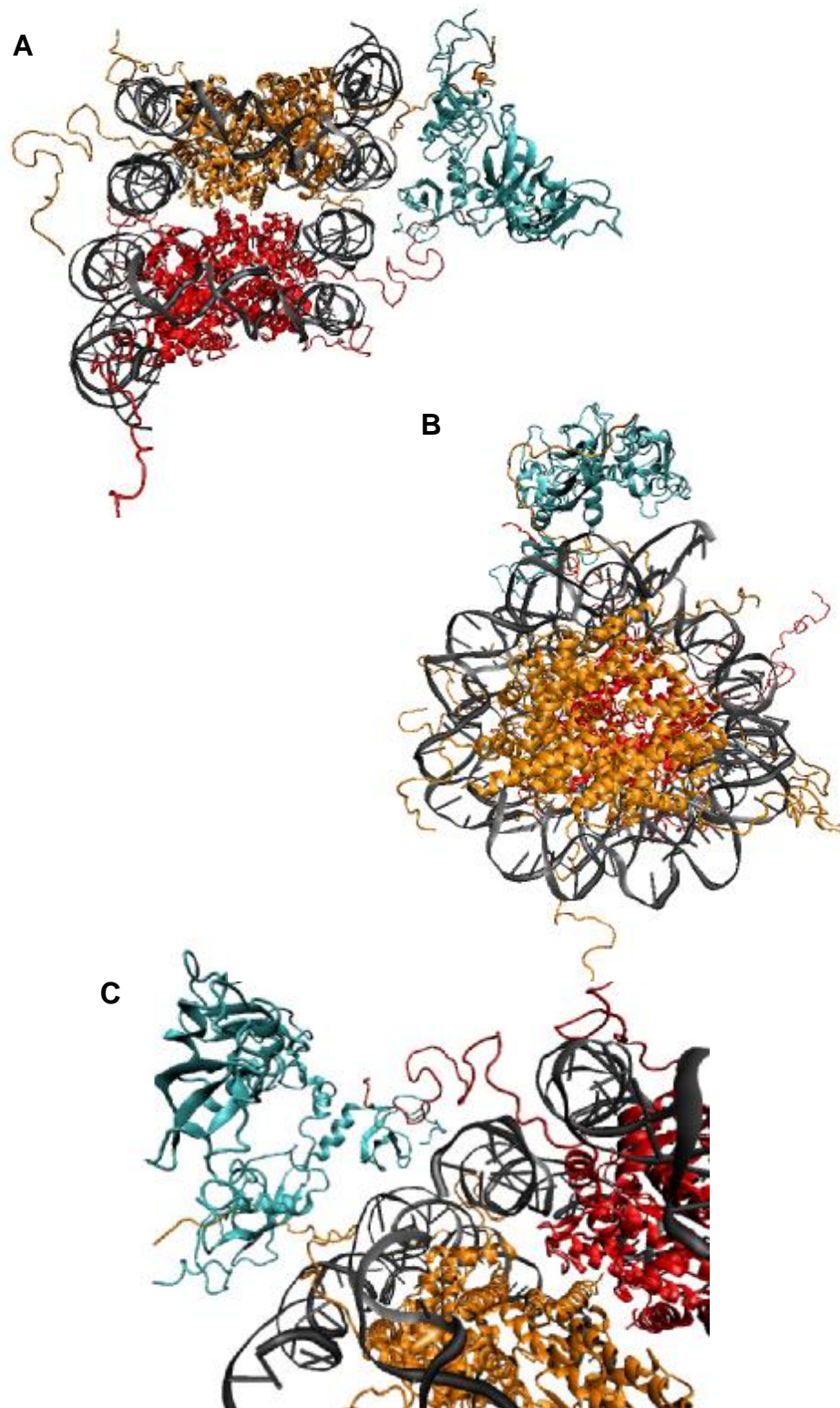


Abbildung 3.22: Modell zur Nukleosomenbindung von HP1.

(A) zeigt eine Seitenansicht zweier gestapelter Nukleosomen. Die Chromo-Domänen binden die methylierten H3-Arme. (B) zeigt eine um 180° gedrehte Ansicht. In (C) ist eine vergrößerte Darstellung der Bindung der H3-Arme an die Chromo-Domänen gezeigt. Die *core*-Histone sind in rot bzw. orange dargestellt, HP1 in blau. Die DNA ist schematisch in grau gezeigt.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Heterochromatinbildung durch HP1 besser zu verstehen. Zunächst wurde die rekombinante Expression und Aufreinigung von rekombinantem HP1 aus *Mus musculus* etabliert. In einem zweiten Schritt wurde die Selbstassoziation des Proteins untersucht. Anschliessend wurde die Interaktion von HP1 mit Linker-Histon H1 und Suv3-9H1 charakterisiert. Es wurden räumliche Modelle von HP1 und seiner Bindung an Nukleosomen entwickelt. Ebenso wurde die Kompaktierung nativer Chromatinfasern durch HP1 untersucht.

4.1 Expression und Aufreinigung von HP1 und Suv3-9H1

HP1 und die Chromoshadow-Domäne konnten wie in der Literatur beschrieben mit hohen Ausbeuten exprimiert werden (Murzina *et al.*, 1999). Die Chromo-Domäne wurde nach Umklonierung in einen anderen Vektor ebenfalls ausreichend exprimiert. Durch Affinitätschromatographie und anschliessende Größenausschlusschromatographie ließ sich das Protein zur gewünschten Reinheit aufreinigen.

Auch mSuv3-9H1 bzw. das homologe Protein aus *D. melanogaster* sollten nach dem Standardprotokoll exprimiert werden (Yamamoto & Sonoda, 2003; Eskeland *et al.*, 2007). Mit diesem Protokoll konnte jedoch nicht die gewünschte Überexpression erreicht werden. Auch durch die Variation von Expressionsstamm, Expressionstemperatur, zur Induktion verwendeter IPTG-Konzentration, Induktionszeitpunkt und Expressionsdauer ließen sich keine wesentliche Verbesserung der Ausbeuten erzielen. Daher wurden die Bedingungen gewählt, unter denen die höchste Zelldichte und damit auch die höchste Gesamtproteinmenge erreicht werden konnte. Aufgrund der geringen Expressionsrate war ein effizientes Aufreinigungsprotokoll besonders wichtig. Da das Protein als GST-Fusionsprotein exprimiert wurde, erfolgte als erster Aufreinigungsschritt eine Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose. Das hierbei aufgetretene Problem der Anreicherung von GST in der Elution konnte nur unzureichend beseitigt werden. Daher konnte das aufgereinigte Protein nicht für biophysikalische Untersuchungen mit AUZ verwendet

werden, da diese einen hohen Reinheitsgrad erfordern und die hergestellten Mengen nicht ausreichend waren.

4.2 Selbstassoziation von HP1 und Modellierung der Struktur

Zur Selbstassoziation von HP1 wurden viele Studien veröffentlicht. Dabei wird in den meisten Fällen eine Dimerisierung postuliert, z.B. in Untersuchungen von Nielsen *et al.* mittels NMR und analytischer Ultrazentrifugation (Nielsen *et al.*, 2004). Auch Ye *et al.* gehen nach GST-*pull-down*-Experimenten von einer Dimerisierung von HP1 aus (Ye *et al.*, 1997). Nicht zuletzt wurde die Chromoshadow-Domäne als Dimer kristallisiert (Brasher *et al.*, 2000). Wang *et al.* diskutieren jedoch auf der Grundlage von Daten aus analytischer Gelfiltration ein Tetramer-Modell (Wang *et al.*, 2000). In den genannten Arbeiten wurden jeweils die einzelnen Domänen von HP1 auf ihre Homo- und Heteroassoziation hin untersucht, jedoch nicht das Vollängenprotein. Die hier durchgeführten Experimente zeigen zweifelsfrei eine Homodimerisierung von HP1, welche durch die C-terminale Chromoshadow-Domäne vermittelt wird. Die Chromo-Domäne zeigt keinerlei Tendenz zur Selbstassoziation. Das von Wang *et al.* vorgeschlagene Modell einer kleeblattförmigen Assoziation von vier HP1-Molekülen unter Beteiligung der Chromo-Domänen konnte somit widerlegt werden.

Die Modellierung der HP1-Dimer-Struktur zeigte, dass es sich wahrscheinlich nicht um ein globuläres Protein handelt. Durch die beiden nach außen zeigenden Chromo-Domänen wird die Struktur aufgespannt und bezogen auf das Molekulargewicht resultiert daraus ein großer hydrodynamischer Radius. Dieser Sachverhalt führt zur einer Fehlinterpretation von Gelfiltrations-Daten, da das Molekül im Elutionsprofil bei einem größeren Molekulargewicht als dem tatsächlichen erscheint.

4.3 Untersuchungen zur Interaktion von HP1 mit chromosomalen Proteinen, DNA und RNA

Die Chromatinkonformation muß spezifisch und gleichzeitig dynamisch sein. Dies ist nur durch eine Kombination von Interaktionen zu erreichen. Neben HP1 sind unter anderem auch das *Linker*-Histon H1, Suv3-9H1 und die DNA-Methyltransferase Dmmt1 an diesem Netzwerk beteiligt, ebenso wie posttranslationale Modifikationen an DNA oder Histonen (v.a. spezifische Methylierungen, Maison & Almouzni, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von HP1 mit einigen wesentlichen Komponenten dieses Netzwerkes *in vitro* untersucht.

Für HP1 ist vielfach eine Interaktion mit Histon H3 beschrieben worden (Ball *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Fischle *et al.*, 2005). Diese Autoren postulieren in der Regel eine Bindung der Chromo-Domäne von HP1 an den trimethylierten Arm von H3 (H3K9Met3). Dies wurde vor allem mit *EMSAs* und anderen biochemischen Experimenten sowie einigen thermodynamischen Untersuchungen beobachtet (Nielsen *et al.*, 2001). In nahezu allen Fällen wurden die Experimente jedoch nicht mit Histonen sondern lediglich mit synthetischen Peptiden durchgeführt, die den methylierten H3-Arm repräsentieren. Die daraus abgeleiteten Aussagen zur Interaktion mit HP1 unterliegen der Annahme, dass die globuläre Domäne des Histons die Assoziation nicht beeinflusst. Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass auch die isolierte globuläre Domäne von H3 als Interaktionspartner fungieren kann (Dialynas *et al.*, 2006). Die für die hier durchgeführten Untersuchungen verwendeten Histone wurden heterolog in Bakterien exprimiert und tragen daher keine Methylierungen. Es wurde kein Komplex zwischen HP1 und dem H3·H4-Dimer beobachtet. Dies steht im Widerspruch zu den von Dialynas *et al.* veröffentlichten Daten. Bei der Aufklärung dieses Widerspruchs könnten die von Dialynas *et al.* verwendeten experimentellen Parameter nützlich sein. Die Interaktionen wurden bei sehr hohen Salzkonzentrationen beobachtet, die physiologische Bedeutung und Spezifität des Komplexes ist daher unklar. Für eine endgültige Aufklärung der Interaktion zwischen H3 und HP1 sind thermodynamische Untersuchungen mit *in vitro* methylierten oder nativ aufgereinigten Histonen nötig.

Hier wurde ein Expressions – und Aufreinigungsprotokoll für die Histonmethyltransferase Suv3-9H1 etabliert, welches jedoch weiterer Optimierung bedarf. Erste Studien zu einer möglichen direkten Interaktion von HP1 mit Suv3-9H1 wurden hier durchgeführt und zeigen Hinweise auf einen solchen Komplex. Auch in einer aktuellen Arbeit von Eskeland *et al.* wurde Suv3-9H1 als Bindungspartner von HP1 identifiziert (Eskeland *et al.*, 2007). Auch mit Hilfe von computerbasierten Methoden wie Chip-ChIP und DamID – Analysen konnte ein Zusammenwirken von HP1 und Suv3-9H1 gezeigt werden (Greil *et al.*, 2003). Neben der weitergehenden Untersuchung der Assoziationen zwischen HP1 und Suv3-9H1 muss nun die *in vitro* Methylierung etabliert werden (Eskeland *et al.*, 2004).

Neben der Bindung von H3 wird für HP1 auch eine Interaktion mit DNA bzw. RNA diskutiert, wobei vor allem RNA eine Rolle bei der Erhaltung von Heterochromatin spielen könnte. Die Nukleinsäurebindung wird vor allem dem *hinge*-Bereich zwischen den funktionellen Domänen zugeschrieben (Maison & Almouzni, 2004). Die hier durchgeführten Experimente widerlegen die These einer spezifischen DNA-Bindeaktivität von HP1. Die Frage der RNA-Bindung wurde im Rahmen dieser Arbeit nur am Rande betrachtet. Es wurden keine Hinweise gefunden, dass RNA an HP1 bindet. Dies steht im Widerspruch zu Arbeiten von z.B. Muchardt *et al.*, welche auf der Grundlage von *EMSA*-Experimenten RNA-Bindeaktivität von HP1 postulieren (Muchardt *et al.*, 2002). Jedoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die einzelnen HP1-Isoformen unterschiedliche RNA-Bindeaktivität haben. Dies bezieht sich sowohl auf die Stärke der Bindung als auch auf die Selektivität für bestimmte Sequenzen. Muchardt *et al.* argumentieren auch, dass HP1 RNA stärker bindet als DNA. In diesem Zusammenhang ist es wenig überraschend, dass in den hier durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen keine DNA-Bindung beobachtet wurde. Auch Maison *et al.* zeigten die Beteiligung einer RNA-Komponente an der Bildung höherer Chromatinstrukturen (Maison *et al.*, 2002). Hier wurde jedoch keine direkte RNA-Bindung von HP1 nachgewiesen. Aufgrund der komplexen Befunde liegt die Vermutung nahe, dass die Beteiligung von RNA an der Etablierung von Heterochromatin an das Vorhandensein spezifischer Proteine und Modifikationen gebunden ist. Möglicherweise findet eine kooperative Bindung von HP1, RNA und weiteren Kom-

ponenten an eine Chromatinregion statt, in welcher Heterochromatin etabliert werden soll.

Ein bisher wenig untersuchter Aspekt der Chromatindynamik ist die Rolle des *Linker*-Histons H1. Es gibt Hinweise auf eine Anreicherung von H1 in heterochromatischen Bereichen, sodass eine Interaktion mit HP1 wahrscheinlich ist. Zusätzlich wurde *in vitro* ein Komplex zwischen HP1 und H1 beobachtet, der ebenfalls für die Heterochromatinbildung relevant ist (Daujat *et al.*, 2005; Hale *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen sind jedoch qualitativ.

Hale *et al.* zeigen eine Kollokalisierung von CFP-HP1 und YFP-H1 in cotransfizierten Zellen (Hale *et al.*, 2006). Nach GST-*pull-down* – Experimenten gehen die Autoren von einer H1-Bindung an die *hinge*-Region von HP1 aus. Im Gegensatz dazu postulieren Daujat *et al.* auf der Grundlage von *pull-down* – Experimenten eine Bindung von H1 an die Chromo-Domäne von HP1 (Daujat *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung bestätigt. Es wurden zum ersten Mal Hinweise auf die Stöchiometrie des entstehenden Komplexes gewonnen. Die durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente zeigen deutlich einen 1:1-Komplex von H1 und HP1-Dimer. Eine Abschätzung des Molekulargewichtes des entstehenden Komplexes zeigt, dass es sich um ein HP1-Dimer mit einem gebundenen H1-Molekül handelt. Auch eine Erhöhung der H1-Konzentration um den Faktor 3 führte nicht zur Bildung höhermolekularer Komplexe. Um die Bindungsstelle von H1 an HP1 zu lokalisieren, wurden weitere Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente durchgeführt, in denen die isolierte Chromo – bzw. Chromoshadow-Domäne zusammen mit H1 zentrifugiert wurde. Sowohl für die Chromo – als auch für die Chromoshadow-Domäne wurde ein Komplex mit H1 gefunden. Daher wird hier davon ausgegangen, dass beide Domänen an der H1-Bindung beteiligt sind. Aufgrund der Form der entsprechenden $c(s)$ -Verteilung und des berechneten f/f_0 -Verhältnisses (0.98) kann ein schneller Austausch von H1 im Bereich der Chromoshadow-Domäne vermutet werden. Smothers & Henikoff konnten auf der Grundlage von *peptide library screen / phage display* – Experimenten eine Sequenz von fünf Aminosäuren definieren, welche in einer Vielzahl von CSD – Interaktionspartnern gefunden wurde und ein putatives Bindemotiv darstellt (Smothers & Henikoff, 2000). Dieses Motiv ist jedoch in H1 nicht enthalten. Möglicherweise wird die Bindestelle erst durch die Dimerisierung geschaffen.

4.4 Interaktion von HP1 mit nativen Chromatinfasern

In einem weiteren Komplex von Experimenten wurde die Bindung von HP1 an native Chromatinfasern untersucht und erste Versuche zum Einfluss des Proteins auf die Konformation der Fasern wurden durchgeführt. HP1 und Chromatinfasern konnten in verschiedenen Versuchsansätzen gemeinsam präzipitiert werden, was auf eine Interaktion hindeutet. Diese Resultate wurden unabhängig von der Anwesenheit von RNA erzielt, so dass diese wahrscheinlich für die Bindung selbst nicht notwendig ist. Um einen Eindruck von der Konformation der Chromatinfasern mit und ohne HP1 zu gewinnen wurden Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen gemacht. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von HP1 an Chromatin bereits *in vivo* gezeigt (Verschure *et al.*, 2005). Die Untersuchung von Verschure *et al.* ergab Hinweise auf eine Verdichtung der Fasern nach Zugabe von HP1. Eine Limitierung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsansatzes besteht darin, dass der Proteingehalt der aufgereinigten Chromatinfragmente unzureichend definiert ist. Es ist unklar, in welchem Umfang die enthaltenen Histone methyliert sind und wie viel HP1 bzw. H1 sich an den Fasern befindet. Die statistische Auswertung von rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zeigt eine eindeutige Verkürzung des internukleosomalen Abstandes und weist damit auf den kompaktierenden Effekt von HP1 hin. Dieser konnte mit Hilfe von analytischer Ultrazentrifugation bestätigt werden, insbesondere beim Zusammenwirken von HP1 und der Histonmethyltransferase Suv3-9H1. Nach Zugabe von HP1 und Suv3-9H1 wurden Verschiebungen der Sedimentationskoeffizienten von durchschnittlich 24 % beobachtet.

4.5 Modelle der Nukleosomenbindung von HP1

Die vorgestellten atomaren Modelle zur Interaktion von HP1 mit Nukleosomen sollen helfen, eine Vorstellung von der Geometrie der Interaktion zu gewinnen und Hypothesen zur Wirkungsweise aufzustellen. Abbildung 4.1 zeigt stark vereinfacht verschiedene Möglichkeiten der Bindung von HP1 an ein Tetranukleosom. Dabei ist energetisch sowohl die Bindung an gestapelte (B) als auch an gegenüber liegende (C) Nukleosomen möglich. Die Bindung von zwei H3-Armen eines Nukleosoms (A) ist sterisch unmöglich. Es ist jedoch zu beachten, dass die Konformation der H3-Arme zufällig ist. Im Hin-

blick auf die Kompaktierung von Chromatin durch HP1 erscheint die mit (B) bezeichnete Bindung zweier gestapelter Nucleosomen wahrscheinlicher. Zwei gegenüber liegende Nucleosomen könnten prinzipiell auch gebunden werden, ein kompaktierender Effekt ist auf diese Weise jedoch schlecht vorstellbar, da der Abstand der beiden Nucleosomen durch die Länge der *Linker*-DNA relativ fest vorgegeben ist. Die in der MD-Simulation beobachtete klammerartige Bewegung der Chromo-Domänen erlaubt die Vorstellung, dass zwei gebundene H3-Arme und damit Nucleosomen auf diese Art aufeinander zu bewegt werden können und so eine kompaktere Anordnung der Nucleosomen erreicht werden kann. Die entstehende Anordnung legt die Vermutung nahe, dass die dimerisierte Chromoshadow-Domäne als Schnittstelle für verschiedene Interaktionspartner wie H1 und Suv3-9H1 dient. Auch ein kooperativer Mechanismus der Chromatinkompaktierung ist vorstellbar, bei dem zunächst Suv3-9H1 die Methylierung von H3K9 vornimmt und dadurch HP1 rekrutiert wird, welches wiederum die Affinität für H1 erhöht. Um dieser Frage weiter nachzugehen, müssen weitere quantitative Untersuchungen durchgeführt werden, um die Affinitäten der einzelnen Interaktionspartner zueinander zu bestimmen.

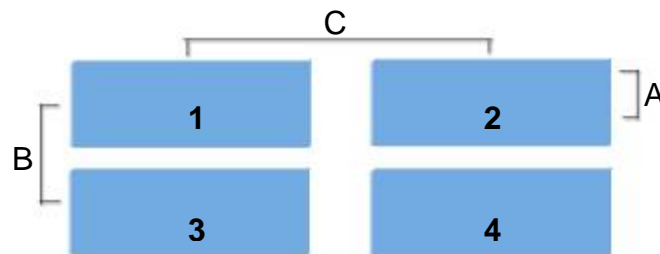


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung verschiedener Hypothesen zur Bindung von HP1 an ein Tetranucleosom.

(A) repräsentiert die Bindung von zwei trimethylierten Histon-Armen eines Nucleosoms. Diese ist aus sterischen Gründen nicht realisierbar. (B) zeigt die Bindung an gestapelte Nucleosomen, wodurch eine Kompaktierung der Nucleosomen vorstellbar ist. Die in (C) gezeigte Bindung an zwei aufeinanderfolgende Nucleosomen ist ebenfalls möglich, ein kompaktierender Effekt jedoch weniger wahrscheinlich, da der Abstand der Nucleosomen durch die *Linker*-DNA vorgegeben ist.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen experimentellen Daten können zusammen mit dem entwickelten Strukturmodell für das HP1-Dimer nun dazu dienen, auch geometrische Modelle für Proteininteraktionen über das Tetranukleosom hinaus zu erarbeiten. Zur Chromatinfaser existieren bereits einige Studien (Kepper *et al.*, 2008; Stehr *et al.*, 2008), die hierfür als Grundlage verwendet werden können. Es stellen sich zukünftig insbesondere Fragen nach der geometrischen Anordnung von Proteinkomplexen innerhalb der Chromatinfaser und nach dem Effekt solcher Komplexe auf die Stabilität der Faser. Zwischen den DNA-Strängen wirken abstoßende Kräfte, welche abgeschirmt werden müssen. Eine solche Abschirmung könnte durch angelagerte Proteine wie das stark positiv geladene H1 verbessert werden. HP1 wirkt als Klammer zwischen zwei Nukleosomen und verstärkt die internukleosomalen Interaktionen.

4.6 Ausblick

Neben dem theoretischen Ansatz ist eine ganze Reihe weiterer Experimente vorstellbar, um das hier vorgeschlagene Modell zur Wirkungsweise von HP1 weiter zu entwickeln. So sollten zusätzliche rasterkraftmikroskopische Aufnahmen gemacht werden. Hierzu wäre eine besser definierte Chromatinpräparation hilfreich, wie sie beispielsweise durch Befreiung von *Linker*-Histon H1 und anschließende definierte Zugabe geschaffen werden könnte. Auf diese Weise ließen sich weitere Daten über den HP1-H1-Komplex und seine Bedeutung für die Chromatinkompaktierung gewinnen. Auch die Frage der Bedeutung von Histonmethylierungen für die HP1-Bindung bedarf weiterer Untersuchungen. Wie oben erwähnt, wäre die Etablierung von *in vitro*-Methylierung hilfreich. Die so gewonnenen methylierten Histone sollten in biophysikalischen Messungen wie Isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht werden, um detaillierte Einblicke in die Kinetik der Bindung zu erhalten. Das Modell zur Architektur des Multiproteinkomplexes könnte auch durch weitere Studien zur Heteroassoziation der beteiligten Proteine verbessert werden. So könnte mittels analytischer Ultrazentrifugation aufgeklärt werden, welche der Domänen von HP1 die Bindung an H1 vermittelt und ob nur die globuläre Domäne von H1 beteiligt ist.

Die bisher etablierte Vorstellung zur Entstehung von Heterochromatin geht davon aus, dass zunächst H3K9 durch Suv3-9H1 methyliert wird, wodurch die Bindestelle für HP1 geschaffen wird. Durch die anschließende Bindung von HP1 wird das Chromatin verdichtet und ist für Transkriptionsfaktoren nicht mehr zugänglich. Eine Reihe neuerer Untersuchungen spricht jedoch gegen dieses starre Dogma. Vermutlich ist die Bildung von Heterochromatin ein wesentlich dynamischerer Prozess als bisher angenommen. Die Arbeiten von Misteli zeigen, dass der Bindung von HP1 eine schnelle Kinetik zugrunde liegt (Cheutin *et al.*, 2003). Die mittlere Verweildauer eines HP1-Moleküls an einem Chromatinlocus liegt im Bereich von wenigen Minuten. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Dissoziationskonstante an ein H3K9Met-Peptid im Bereich von $\sim 100 \mu\text{M}$ liegt (Jacobs *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2004). Für die Interaktion der Vollängenproteine HP1 und H3K9Met3 liegt die Dissoziationskonstante vermutlich etwa eine Größenordnung darunter (K. Rippe, pers. Mitteilung). Diese nicht sehr starke Interaktion weist zusammen mit dem schnellen Austausch bereits auf die Dynamik der Heterochromatinbildung hin.

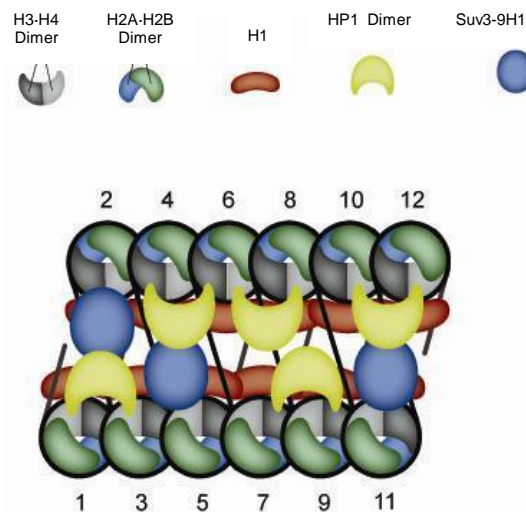


Abbildung 4.2: Modell zur Ausbreitung von Heterochromatin durch HP1 und Suv3-9H1.

Die Bindung von HP1 an Position i und $i+2$ kann die Methylierung von H3K9 an Position $i+1$ („vorwärts gerichtete Methylierung“) oder Position $i-1$ („rückwärts gerichtete Methylierung“) vermitteln. Durch die Bindung von HP1 an H3K9Met3 wird Suv3-9H1 rekrutiert. Dadurch werden weitere Loci methyliert und weitere HP1-Moleküle binden. Durch diesen positiven *feedback*-Mechanismus wird der heterochromatische Bereich ausgeweitet.

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergibt sich im Zusammenhang mit verschiedenen publizierten Ergebnissen das Bild eines komplexen Netzwerkes von Interaktionen. Statt des bisher etablierten starren Modells von der festen HP1-H3K9Met-Bindung findet man ein dynamisches Netzwerk aus Proteinen und Proteinmodifikationen. Ein solches Netzwerk ist schematisch in Abbildung 4.2 gezeigt. Im Zentrum steht dabei HP1, welches als Mediator für eine ganze Reihe von Wechselwirkungen mit Proteinen und vermutlich RNA dient und damit die Kompaktierung von Chromatin moderiert. Die Methylierung von H3K9 führt zur Bindung von HP1. Dieses rekrutiert weitere Suv3-9H1-Moleküle an den Locus. Angrenzende H3K9-Arme werden methyliert, was zu einer weiteren Bindung von HP1 führt. Diese positive Rückkopplung führt zur Ausbreitung von Heterochromatin, wobei sich die einzelnen Interaktionen in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken. Auch die Bindung von H1 an HP1 und Suv3-9H1 ist Teil dieses *feedback*-Mechanismus. Erst das Zusammenwirken vieler, an sich wenig spezifischer Interaktionen führt zu hoher Sensitivität des Systems gegenüber Veränderungen und damit einer fein modulierten Chromatindynamik.

Literaturverzeichnis

Akey & Luger, Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13** : 6-14 (2003)

Allis et al., Epigenetics. *CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York* (2007)

Ainsztein et al., INCENP Centromere and Spindle Targeting: Identification of Essential Conserved Motifs and Involvement of Heterochromatin Protein HP1. *J. Cell Biol.* **143** : 1763-1774 (1998)

Arents et al., The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 10148-10152 (1991)

Ayyanathan et al., Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing : a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* **17** : 1855-1869 (2003)

Badugu et al., Novel Drosophila heterochromatin protein1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations. *J. Biol. Chem.* **278** : 34491-34498 (2003)

Ball et al., Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO Journal* **16** : 2473-2481 (1997)

Bednar et al., Nucleosomes, Linker DNA and Linker histones form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 14173-14178 (1998)

Berman et al., The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **28** : 235 (2000)

Bernstein & Allis, RNA meets Chromatin. *Genes & Development* **19** : 1635-1655 (2005)

Bird & Wolffe, Methylation induced repression-belts, braces and chromatin. *Cell* **99** : 451-454 (1999)

Bird, A, DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16** : 6-21 (2002)

Brasher et al., The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO Journal* **19** : 1587-1597 (2000)

Bustin & Reeves, High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **54** : 35-100 (1996)

Carruthers & Hansen, The core histone N- termini function independently of Linker histones during chromatin condensation. *J. Biol. Chem.* **275** : 37285-37290 (2000)

Case et al., AMBER 8. *University of California, San Francisco* (2004)

Cheutin et al., Maintenance of Stable Heterochromatin Domains by Dynamic HP1 Binding. *Science* **299** : 721-725 (2003)

Cheutin et al., In vivo dynamics of Swi6 in yeast : evidence for a stochastic model of heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* **24** : 3157-3167 (2004)

Chin et al., Catalytic properties and kinetic mechanism of human recombinant Lys-9 Histone H3 methyltransferase Suv3-9H1: participation of the chromodomain in enzymatic catalysis. *Biochemistry* **45** : 3272-3284 (2006)

Daujat et al., HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4 whereas simultaneous Ser27-Phosphorylation blocks HP1 binding. *J. Biol. Chem.* **280** : 38090-38095 (2005)

Demeler B, UltraScan A Comprehensive Data Analysis Software Package for Analytical Ultracentrifugation Experiments. *Modern Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods. Royal Society of Chemistry (UK)*: 210-229 (2005)

De Koning et al., Histone chaperones : an escort network regulating histone traffic. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14** : 997-1007 (2008)

Dialynas et al., Methylation-independent binding to Histone H3 and cell-cycle-dependent incorporation of HP1 β into heterochromatin. *J. Biol. Chem.* **281** : 14350-14360 (2006)

Dillon & Festenstein, Unravelling heterochromatin : competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* **2** : 584-596 (2001)

Dillon et al., The SET domain protein superfamily: protein lysine methyltransferase. *Genome Biology* **6** : 1-10 (2005)

Doenecke et al., Histones: Genetic diversity and tissue specific gene expression. *Histochem. Cell. Biol.* **107** : 1-10 (1997)

Duan et al., A point charge force field for molecular mechanics simulations of proteins. *J. Comput. Chem.* **24** : 1999-2012 (2003)

Eberharter & Becker, ATP-dependent nucleosome remodeling: factors and functions. *J. Cell. Sci.* **117** : 3707-3711 (2004)

El-Osta & Wolffe, DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression : basic biochemistry to human development and disease. *Gene Expr.* **9** : 63-75 (2000)

El-Osta A, DNMT cooperativity—the developing links between methylation, chromatin structure and cancer. *BioEssays* **25**:1071–1084 (2003)

Eskeland et al., The N-Terminus of Drosophila Su(var)3-9 mediates dimerization and regulates its methyltransferase activity. *Biochemistry* **43** : 3740-3749 (2004)

Eskeland et al., HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol. Cell. Biol.* **27** : 453-465 (2007)

Fejes Toth et al., Association States of Nucleosome Assembly Protein 1 and Its Complexes with Histones. *J. Biol. Chem.* **280** : 15690-15699 (2005)

Felsenfeld & Groudine, Controlling the double helix, *Nature* **421** : 448-453 (2003)

Festenstein et al., Modulation of Heterochromatin Protein 1 dynamics in primary mammalian cells. *Science* **299** : 719-721 (2003)

Fischle et al., Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15** : 172-183 (2003)

Fischle et al., Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438** : 1116-1122 (2005)

Flemming W, Zellsubstanz Kern & Zelltheilung. *Verlag FCW Vogel, Leipzig* (1882)

Fuks et al., DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics* **24** : 88-91 (2000)

Garcia de la Torre et al., Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic level structure. *Biophys. J.* **78** : 719-730 (2000)

Giannasca et al., Transitions between in situ and isolated chromatin. *J. Cell Sci.* **105** : 551-561 (1993)

Greil et al., Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes & Dev.* **17** : 2825-2838 (2003)

Hale et al., Phosphorylation of the Linker histone H1 by CDK regulates its binding to HP1 α . *Mol. Cell* **22** : 693-699 (2006)

- Hansen, JC**, The core histone N-termini: combinatorial interaction domains that link chromatin structure with function. *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.* **10** : 56-69 (1997)
- Hansen et al.**, Structure and function of the core histone N-termini : more than meets the eye. *Biochemistry* **37** : 17637-17641 (1998)
- Hansen, JC**, Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution : determinants, mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31** : 361-392 (2002)
- Hiragami & Festenstein**, Heterochromatin Protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell. Mol. Life Sci.* **62** : 2711-2726 (2005)
- Humphrey et al.**, VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics* **14** : 33-38 (1996)
- Ito et al.**, Drosophila NAP1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* **16** : 3112-3124 (1996)
- Jacobs et al.**, Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* **20** : 5232-5241 (2001)
- James & Elgin**, Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *D. melanogaster* and its gene. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 3862-3872 (1986)
- Jenuwein & Allis**, Translating the histone code. *Science* **10** : 1074-1080 (2001)
- Jones et al.**, Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays* **22** : 124-137 (2000)
- Kepert et al.**, NAP1 modulates binding of Linker histone H1 to chromatin and induces an extended chromatin fiber conformation. *J. Biol. Chem.* **280** : 34063-72 (2005)
- Kepper et al.**, Nucleosome geometry and internucleosomal interactions control the chromatin fiber conformation. *Biophys. J.*, im Druck (2008)
- Kourmouli et al.**, Dynamic associations of Heterochromatin Protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.* **19** : 6558-6568 (2000)
- Laue et al.**, Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK: 90-125 (1992)
- Lebowitz et al.**, Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science* **11** : 2067-2079 (2002)

Luger *et al.*, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389** : 251-260 (1997)

Luger & Richmond, The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8** : 140-146 (1998)

Luger *et al.*, Preparation of nucleosome core particles from recombinant histones. *Methods Enzymol.* **304** : 3-19 (1999)

Maison *et al.*, Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA-component. *Nature Genet.* **30** : 329-334 (2002)

Maison & Almouzni, HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature Reviews* **5** : 296-304 (2004)

Mazurkiewicz *et al.*, On the mechanism of nucleosome assembly by histone chaperone NAP1. *J. Biol. Chem.* **281**: 16462-16472 (2006)

Mc Bryant *et al.*, Chromatin architectural proteins. *Chromosome Res.* **14** : 39-51 (2006)

Meehan *et al.*, HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J.* **22** : 3164-3174 (2003)

Muchardt *et al.*, Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . *EMBO reports* **3** : 975-981 (2002)

Murzina *et al.*, Heterochromatin dynamics in mouse cells : interaction between chromatin assembly factor-1 and HP1 proteins. *Mol. Cell* **4** : 529-540 (1999)

Needleman & Wunsch, A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48** : 443 (1970)

Nielsen *et al.*, Heterochromatin Formation in Mammalian Cells : Interactions between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell* **7** : 729-739 (2001)

Nielsen *et al.*, Expression, Purification and biophysical studies of chromodomain proteins. *Meth. Enzymol.* **376** : 148-170 (2004)

Pennings *et al.*, Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 10275-10279 (1994)

Peters *et al.*, Loss of the SUV3-9 histone methyltransferase impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107** : 323-337 (2001)

Peterson *et al.*, Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Op. Gen. Dev.* **10** : 187-192 (2000)

Peterson, Chromatin remodeling enzymes : Taming the machine. *EMBO reports* **3** : 319-322 (2002)

Peterson & Laniel, Histones and histone modifications. *Current Biology* **14** : 546-551 (2004)

Ralston, Introduction to Analytical Ultracentrifugation. *Beckman Instruments Inc.* (1993)

Rippe *et al.*, Interactions of histones with DNA : Nucleosome assembly, stability, dynamics and higher order structure. *DNA Interactions with polymers and surfactants.* *John Wiley and Sons Inc.* 135-172 (2008)

Robertson *et al.*, DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature Genetics* **25** : 338-342 (2000)

Saha *et al.*, Chromatin remodelling : the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7** : 437-447 (2006)

Schalch *et al.*, X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436** : 138-141 (2005).

Schotta *et al.*, Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* **21** : 1121-1131 (2002)

Schuck P, Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and LAMM Equation Modeling. *Biophys. J.* **78** : 1606-1619 (2000)

Shareef *et al.*, *Drosophila* Heterochromatin Protein 1 (HP1)/Origin Recognition Complex (ORC) Protein Is Associated with HP1 and ORC and Functions in Heterochromatin-induced Silencing. *Mol. Biol. Cell* **12** : 1671-1685 (2001)

Sims *et al.*, Histone lysine methylation : a signature for chromatin function. *Trends Genet.* **19** : 629-639 (2003)

Smothers & Henikoff, The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Current Biology* **10** : 27-30 (2000)

Stehr *et al.*, The effect of the internucleosomal interaction on the folding of the chromatin fiber. *Biophys. J.* im Druck (2008)

Stewart *et al.*, Relationship between histone H3 lysine-9 methylation, transcription repression and heterochromatin protein1 recruitment. *Mol. Cell. Biol.* **25** : 2525-2538 (2005)

Strahl & Allis, The language of covalent histone modifications. *Nature* **403** : 41-45 (2000)

Taddei et al., Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nature Cell Biol.* **3** : 114-120 (2001)

Travers A, The location of the Linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem. Sci.* **24** : 4-7 (1999)

Tse & Hansen, Hybrid trypsinized nucleosomal arrays : identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fibre compaction. *Biochemistry* **36** : 11381-11388 (1997)

van Holde KE, Chromatin. *Springer Heidelberg* (1989)

van Holde & Zlatanova, What determines the folding of the chromatin fiber? *PNAS* **93** : 10548-10555 (1996)

van Leeuwen & Gottschling, The histone minority report : The variant shall not be silenced. *Cell* **112** : 591-593 (2003)

Verschure et al., In Vivo HP1 Targeting Causes Large-Scale Chromatin Condensation and Enhanced Histone Lysine Methylation. *Mol. Cell. Biol.* **25** : 4552-4564 (2005)

Vissel & Choo, Mouse major satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays : implications for recombination between nonhomologous chromosomes. *Genomics* **5** : 407-414 (1989)

Volpe et al., Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297** : 1833-1837 (2002)

Wang et al., Conservation of Heterochromatin Protein 1 function. *Mol. Cell. Biol.* **20** : 6970-6983 (2000)

Winston & Allis, The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nature Struct. Biol.* **6** : 601-604 (1999)

Yamamoto & Sonoda, Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **301** : 287-292 (2003)

Ye et al., Domain-specific Interactions of Human HP1-type Chromodomain Proteins and Inner Nuclear Membrane Protein LBR. *J. Biol. Chem.* **272** : 14983-14989 (1997)

Zhao et al., Phosphorylation site mutations in Heterochromatin Protein 1 reduce or eliminate silencing activity. *J. Biol. Chem.* **276** : 9512-9518 (2001)

Zlatanova & van Holde, The Linker histones and chromatin structure: new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **52** : 217-59 (1996)