

Molekulare Analyse der differentiellen Funktionen von  
Linkerhiston Isoformen bei *Caenorhabditis elegans*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg- August- Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Monika Jedrusik-Bode

aus Sosnowiec (POLEN)

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. U. Grossbach

Korreferent: Prof. Dr. W. Engel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2001

## Danksagung

Herrn Professor Dr. U. Grossbach danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten im Labor und für seine wissenschaftliche Unterstützung.

Herr Dr. E. Schulze hat mich in vielerlei Hinsicht tatkräftig unterstützt. Ich danke ihm für die Anregung zu diesem Thema, für stete Hilfsbereitschaft, für die Diskussionen und für vielfältige Anregungen.

Frau S. Pitzel danke ich für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima, das die Arbeit in einer freundlichen Umgebung ermöglichte.

Frau Dr. S. Steinhoff danke ich für die engagierte Durchführung der DNA-Sequenzierung und ihrer Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. R. Schwanbeck danke ich für die Einführung in die chromatografischen Arbeitsmethoden und für anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Baumeister (Universität München) danke ich für die Einführung in Injektionstechniken bei *C. elegans* und der Möglichkeit in der Firma EleGene GmbH in Martinsried die Deletionsbibliothek auf Vorliegen der Deletionsmutationen zu testen.

Herrn Prof. Schnabel (Universität Braunschweig) danke ich für den *pha-1(e2123)* III Stamm, für die Plasmide und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. A. Coulson (The Sanger Center, England) und Dr. Y. Kohara (National Institut of Genetics, Mishima, Japan) danke ich für die Cosmide und die cDNA Klone, Herrn Dr. A. Fire für das pBK48.1 Plasmid sowie Prof. Dr. K. Weber (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) für die IFA Antikörper.

Den Mitarbeitern des III.-Zoologischen Instituts – Entwicklungsbiologie danke ich für die vielfältige Unterstützung und ihrer Bereitschaft, mir jederzeit hilfreich zur Seite zu stehen. Insbesondere aber danke ich Frau E. Blabusch, Frau B. Rossi und Herrn M. Bahrami für ihre Hilfsbereitschaft.

Zuletzt aber nicht weniger herzlich möchte ich meinen Eltern, meinem Ehemann Thomas Bode und Aneta Oleksy für ihre Unterstützung danken. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1. EINLEITUNG .....	9
2. MATERIAL UND METHODEN .....	19
2.1 Material.....	19
2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.1 Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	19
2.2.2 Isolierung der Cosmid-DNA.....	20
2.2.3 In vivo Umwandlung der $\lambda$ ZAP II Klonen .....	21
2.2.4 In vivo Umwandlung des $\lambda$ SHLH2 Klones .....	22
2.2.5 Bestimmung der Konzentration der DNA und der RNA.....	23
2.2.6 Restriktionsverdau von DNA.....	23
2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	23
2.2.8 Klonierung von Restriktionsfragmenten .....	24
2.2.9 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	24
2.2.10 Herstellung der Transformationskompetenten <i>E. coli</i> .....	25
2.2.11 Herstellung der DNA-Fragmente mit überhängenden Enden oder mit stumpfen Enden.....	25
2.2.12 Sequenzierung der Plasmid DNA .....	26
2.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.2.13.1 Standardansatz .....	27
2.2.13.2 Amplifikation von RNA, RT-PCR .....	29
2.2.14 Herstellung der doppelsträngigen RNA (dsRNA) .....	30
2.2.15 Herstellung der H1 'green fluorescence' Reportergene .....	31
2.3 Allgemeine proteinchemische Methoden .....	33
2.3.1 Herstellung der rekombinanten H1 Proteine.....	33
2.3.2 Gewinnung der Antiseren und Antikörper.....	35



2.3.3	Reinigung der Immunglobulin G-Fraktionen.....	35
2.3.4	Reinigung der polyklonalen Antikörper durch Affinitätschromatographie .....	36
2.3.5	'Reversed-Phase' HPLC-Trennungen.....	37
2.3.6	SDS-PAGE-Gelelektrophorese.....	37
2.3.7	Analyse der Antikörper durch den dot-blot und den western-blot.....	38
2.4	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	40
2.4.1	Umgang mit <i>C. elegans</i> .....	40
2.4.1.1	Vorbereitung der Platten.....	40
2.4.1.2	Dekontamination von <i>C. elegans</i> .....	40
2.4.1.3	Aufbewahrung von <i>C. elegans</i> .....	41
2.4.1.4	dsRNA Interferenz durch Fütterung mit <i>E. coli</i> .....	41
2.4.2	Herstellung der transgenen <i>C. elegans</i> Stämme.....	42
2.4.2.1	Herstellung des Stammes EC107 ( <i>let-858::gfp</i> ) für die Beobachtung der Derepression in Keimbahnzellen.....	42
2.4.2.2	Mikroinjektion von <i>C. elegans</i> und die Herstellung der transgenen Tiere.....	42
2.4.2.3	Injektion von linearisiertem Marker-pRF4 ( <i>rol-6</i> ), <i>H1.X::gfp</i> und genomischer DNA .....	44
2.4.3	'Screening' der Deletionsbibliothek von <i>C. elegans</i> .....	45
2.4.4	Präparation der Gesamt-DNA, -RNA und Proteine aus <i>C. elegans</i> .....	48
2.4.4.1	Isolierung der genomischen DNA .....	48
2.4.4.2	Isolierung der Gesamt-RNA .....	48
2.4.4.3	Präparation der Gesamt-Proteine aus <i>C. elegans</i> .....	49
2.4.5	X-Gal-Färbung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bei <i>C. elegans</i> .....	50
2.4.6	Immuncytologie bei <i>C. elegans</i> .....	51
2.4.6.1	Immuncytologie der Embryonen .....	51
2.4.6.2	Immuncytologie der adulten Tiere und Larven .....	52
2.5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
2.5.1	Molekularbiologischen Methoden bei <i>S. cerevisiae</i> .....	53
2.5.1.1	Herstellung der kompetenten Hefezellen, <i>S. cerevisiae</i> .....	53
2.5.1.2	Transformation in kompetenten Hefezellen .....	54
2.5.1.3	Herstellung der sieben H1-Expressionsklone.....	54

2.5.1.4 Messung der Überlebensrate der H1-exprimierenden Hefe-Stämme auf Selektiv- und FOA-Platten .....	55
2.5.1.5 GFP-Fusionen mit H1.1 und H1.4 Histonen in den Hefevektoren pYX142 und pYX242.....	55
2.5.2 Proteinchemische Methoden bei <i>S. cerevisiae</i> .....	57
2.5.2.1 Protein-Extraktion aus Hefen .....	57
2.5.2.2 Immunofluoreszenz von Hefetransformanten .....	57
2.6 Mikroskopie .....	59
2.7 Verwendete Computerprogramme.....	59
2.8 Medien und Lösungen .....	60
2.9 Verwendete primer.....	68
3. ERGEBNISSE .....	72
3.1 Die vollständige Linkerhiston Genfamilie von <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	72
3.1.1 Identifikation der sechs neuen Histon H1-Isoformen .....	72
3.2 Vergleich der Linkerhiston Sequenzen von <i>C. elegans</i> .....	75
3.2.1 Vergleich der Promotorsequenzen .....	75
3.2.2 Vergleich der kodierenden DNA-Sequenzen.....	76
3.2.3 Vergleich der Primärstrukturen der Histon H1-Isoformen .....	78
3.2.4 Besondere Sequenzmotive in einzelnen H1-Isoformen .....	81
3.3 Einfluß des Histons H1.1 auf Chromatin silencing und die Entwicklung der Keimbahnzellen .....	85
3.3.1 Expressionsmuster des Histons H1.1 .....	85
3.3.1.1 Charakterisierung des polyklonalen Antiserums gegen H1.....	85
3.3.1.2 Präsenz aller H1-Isoformen in den gesamten Proteinen (Totallysat) von <i>C. elegans</i> .....	87
3.3.1.3 Immundetektion des Histons H1 in somatischen Zellen und Keimbahnzellen .....	87
3.3.1.4 Expressionsmuster des <i>H1.1::GFP</i> .....	88
3.3.2 Cytologische Effekte nach der H1 dsRNA Injektion.....	89
3.3.3 Einfluß des Histons H1.1 auf die Gen-Repression in der Keimbahn.....	93
3.3.4 Translationskontrolle des Histons H1.1 durch die 3'UTR Sequenz .....	98

3.4 Histon H1.2 ist ein starker Repressor in Dauerlarven.....	99
3.5 Einfluß des Histons H1.4 auf die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen .....	101
3.5.1 Expressionsmuster des <i>H1.4::gfp</i> -Reportergens.....	101
3.5.2 H1.4 dsRNA Injektion arretiert die Entwicklung der männlichen Schwanzstrukturen .....	102
3.5.3 SON-1 und H1.4 wirken synergistisch in der Morphogenese der männlichen Schwanzstrukturen .....	106
3.6 Expressionsmuster des Histons H1.X und seine subzelluläre Lokalisation .....	108
3.6.1 dsRNA Phenotyp von H1.X.....	110
3.7 Beeinflussung der Telomer-Positionseffekt-Variegation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durch die Expression von <i>C. elegans</i> Histon H1-Isoformen.....	112
3.7.1 Verschiedenen Überlebensraten der sieben H1-exprimierenden Hefe-Stämme ..	112
3.7.2 Einfluß des SIR2 Proteins auf die Gen-Repression in den Keimbahnzellen von <i>C. elegans</i> .....	116
3.8 Effekte nach der Trichostatin Injektion im Reporterstamm EC107 ( <i>let-858::gfp</i> ).....	117
4. DISKUSSION.....	118
4.1 Die Histon H1-Gen Familie von <i>C. elegans</i> ist eine 'replacement' Histon-Typ- Genfamilie .....	118
4.2 Das Histon H1.1 ist das erste Beispiel im Metazoen Reich für ein Linkerhiston, welches für die Entwicklung der Keimbahn essentiell ist .....	119
4.2.1 Hinweise für die Translationskontrolle der Histon-Isoform H1.1 .....	125
4.3 Das Histon H1.4 hat einen Einfluß auf die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen .....	127
4.4 Die H1.X-Isoform ist ein cytoplasmatisches Protein.....	132
4.5 Homologe-Repressionsmechanismen in <i>C. elegans</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	137
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	142
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	144
7. ALIGNMENT UND ABBILDUNGEN.....	167

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CAP-Struktur	Eine 5'-5' Triphosphat-Bindung an das 5'-Ende von eukaryontischen mRNAs mit der Sequenz m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CELK Gruppe	Eine Gruppe, die sämtliche ESTs für ein Gen enthielt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothrietol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOA	Fluorooroticsäure
GFP	'green fluorescence protein'
h	Stunden
hPa	Hektopascal
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphat
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
min	Minute

mRNA	Messenger-RNA
N-terminal	Aminoterminal
NBT	4-Nitro blau tetrazolium chlorid
NZY	NZ Amin Yeast Extract-Medium
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu/ml	Menge der Plaques in Einheiten pro Milliliter
pKS	pBluescript® II, wo Polylinker von <i>Sac</i> I bis <i>Kpn</i> I Schnittstelle orientiert ist
pSK	pBluescript® II SK(+/-)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Polymerase Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-Leu	'Synthetic Complete' Medium ohne Leucin
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Seite
s	Sekunden
SH	Essigsäure/Harnstoff
SHT	Essigsäure/Harnstoff/Triton
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-Tween	TBS mit 0,5% Tween-20
TE	Tris-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N, N, N, N-Tetramethyldiamin
TPEV	Die Telomer-Positionseffekt-Variation
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTB	Tris-Triton Puffer

Vol.

v/v

w/v

X-Gal

Yac

Volumen

Volumen/Volumen

Gewicht pro Volumen

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galactosid

Yeast artificial chromosomes

## 1. EINLEITUNG

In pro- und eukaryontischen Zellen bildet die DNA mit Proteinen (Nukleoproteinen) einen Chromatin-Komplex. Histone stellen die Hauptmasse der Chromatinproteine dar. Sie teilen sich in zwei Gruppen — 'core' und Linkerhistone.

Die 'core' Histone formen ein Oktamer (Nukleosom) (KORNBERG, 1977). Das Nukleosom entsteht aus einem Tetramer (zwei H4-H3-Dimeren) und zwei Dimeren-H2A und H2B (EICKBUSH und MOUDRIANKIS, 1978). Die DNA ist zweimal um das Nukleosom gewickelt. Nukleosomen sind durch Linker-DNA verbunden und bilden eine Nukleosomenkette. Die Nukleosomenkette wurde in eine 30 nm-Fibrille überführt (VAN HOLDE, 1989).

Jedes 'core' Histon besitzt N- und C-terminale Domänen. Die dynamische Änderung der Struktur des Chromatins geschieht durch Modifikationen der 'core' Histone in der N-terminalen Domäne. Die 'core' Histone sind hoch konserviert (ISENBERG, 1979) und in fast jeder eukaryontischen Zelle vorhanden. Sie sind wahrscheinlich vom DNA-bindenden Protein Hmf evoluiert, das beim thermophilen Archaeon *Methanofermus fervidus* gefunden wurde (SANDMAN et al., 1990; KASINSKY et al., 2001).

Das Linkerhiston (Histon H1) der Eukaryonten besitzt drei Domänen. Die zentrale, globuläre Domäne ist von N- und C-terminalen Domänen flankiert. Die globuläre-Domäne bindet das Nukleosom, und die terminalen Domänen interagieren mit der Linker-DNA. Die globuläre Domäne allein ist nicht in der Lage, die Fibrille zu kondensieren (ALLAN et al., 1980). Die C-terminale Domäne faltet dagegen mit der globulären Domäne die polynukleosomale Fibrille besser als das native H1-Protein mit allen drei Domänen (ALLAN et al., 1986). Daraus folgert man, dass die C-terminale Domäne für die Faltung der Fibrillen notwendig ist.

Die kristallografische Struktur der globulären Domäne wurde als ein charakteristisches 'winged helix' Motiv bestimmt (RAMAKRISHNAN et al., 1993). Die Bindungsstelle der zentralen Domäne ist asymmetrisch in der Nähe der Asymmetrie-Achse des Nukleosomes lokalisiert.

Im Vergleich mit den 'core' Histonen sind die Linkerhistone eine divergente Gruppe. Die N- und C-terminalen Domänen unterscheiden sich in der Länge und in ihrer

Aminosäurereste-Komposition erheblich. Nur die Sequenz des 'winged helix' Motives ist relativ konservativ.

Zum ersten Mal wurde die Sequenz des 'winged helix' Motives bei divergenten Gruppen der Protisten (Chlorophyta und Mycetozoa) beschrieben. Bei einigen Protisten (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Tetrahymena*, *Euplotes*) und Prokaryonten (*Chlamydia*, *Bordetella*) wurden nur lysinreiche Proteine ohne eine zentrale Domäne gefunden (TORO und GALANTI, 1988; BURRI et al., 1993). Diese Proteine waren den Histon-H1-Proteinen der Eubacteria und der C-terminalen Domäne der H1 Proteine der Tiere und Pflanzen ähnlich, welche die Eigenschaft haben, Linker-DNA zu binden. Bei Archaeobacteria wurden keine Linkerhistone gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die Histon-H1-Proteine schon bei Eubacteria erschienen sind, aber dass das typische konservative 'winged helix' Motiv erst später bei Protisten entstanden ist, unabhängig von der Abwesenheit der 'core' Histone bei Archaeobacteria (KASINSKY et al., 2001).

Die bisher gültigen Theorien und Vorstellungen über das Linkerhiston H1 der letzten Jahre sind als veraltet und überholt zu bezeichnen. Die H1-Knockouts ohne den Phenotyp haben die Vorstellung über die Bedeutung des Linkerhistons stark verändert (SHEN und GOROVSKY, 1996).

Es wurde auch gezeigt, dass das Protein nicht nur mit der Linker-DNA und dem Nukleosom verbunden wurde, sondern auch mit anderen Strukturen: Beim Seeigel ist das Protein mit dem Spermien-Flagellum, bei Paramecium und Chlamydomonas mit Cilien assoziiert (MULTIGNER et al., 1992). Im Vergleich mit den 'core' Histonen wird das H1 Histon nicht mehr als eine statische Komponente des Chromatins betrachtet. Es ist ein dynamischer Teil des Chromatins, das im 'stop-and-go' Mechanismus mit Euchromatin sowie Heterochromatin, unabhängig vom Zellzyklus oder der Fibrille-Fibrille Interaktion, assoziiert ist (LEVER et al., 2000). Das Photobleaching-Experiment (FRAP) wurde verwendet, um die Mobilität des Linkerhistons H1 in lebenden Zellen zu beobachten. Die H1 Moleküle bewegten sich von der ungebleichten Region zur gebleichten Region, was darauf hinweist, dass H1 dissoziiert, durch das Nukleoplasma diffundiert und dann mit Chromatin reassoziert (LEVER et al., 2000). Das Fluoreszenz-Signal des *H1.1::GFP* Proteins wurde in der gebleichten Region innerhalb 200-250 s wiederhergestellt (MISTELI et al., 2000). Dieser Prozeß war unabhängig vom ATP-Energie-Transfer, könnte aber durch Phosphorylierung des Proteins (H1) moduliert sein. Daraus folgert man, dass die



Phosphorylierung des Linkerhistons H1 die Bindung zum Chromatin reduziert und die transkriptionelle Aktivität erleichtert. Die dynamischen Eigenschaften des Linkerhistons H1 können essentiell für die Funktion des H1 als Regulator der Chromatin-Formation und der Struktur des Chromatins sein (MISTELI et al., 2000).

Das Histon H1 tritt in eukaryontischen Zellen in mehreren Varianten auf. Zum Vergleich mit den 'core' Histonen ist es eine sehr divergente Familie mit vielen Varianten. Die H1-Isoformen verschiedener Organismen können sich in folgenden Eigenschaften unterscheiden:

- Sie erscheinen in bestimmten Momenten der Entwicklung des Organismus,
- sind gewebespezifisch (RISLEY und ECKHARDT, 1981; BERS et al., 1992),
- unterscheiden sich durch die Verteilung im Chromatin und in Interphase-Chromosomen (HOYER-FENDER und GROSSBACH, 1988; MOHR et al., 1989, BERS et al., 1992;),
- besitzen verschiedene Fähigkeiten, das Chromatin zu kondensieren (LIAO und COLE, 1981a) und die DNA (bzw. bestimmte Sequenzen der DNA) zu binden (LIAO und COLE, 1981b),
- sie können einen spezifischen Einfluß auf die DNA Methylierung haben (STROM et al., 1995).

Man unterscheidet abhängig von den Zelltypen: Testes H1 (H1t), somatisches H1, Differenzierungs-H1 (H5 und H1<sup>0</sup>), stadienspezifisches, embryonales H1 (B4/H1M).

Bei Säugetieren wurden sieben somatische Isoformen identifiziert und beschrieben. Fünf von sieben wurden als H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 und H1.5 bezeichnet (DOENECKE et al., 1988). Die Ähnlichkeit der Primärstruktur zwischen den H1-Isoformen ist sehr hoch und beträgt 60 bis 85%. Das Histon H1t wurde gewebespezifisch und nur in primären Pachytän-Spermatocyten in der Prophase I der Meiose exprimiert (DRABENT et al., 1998). Das Histon H1<sup>0</sup> ist dem H5 Histon der Vögel ähnlich (DOENECKE et al., 1997) und kommt in differenzierten Säugetier-Zellen vor, die sich nicht mehr teilen. Das Histon H5 wird nur in den Erythrocyten der Vögel und Reptilien exprimiert, wo das Chromatin stark kondensiert und die Transkription inaktiv ist (AFFOLTER et al., 1987). Bei anderen Tieren wurden H1-Isoformen beschrieben, die nur in bestimmten Zellstadien und/oder Keimbahnzellen exprimiert wurden. So sind oocytenspezifische Histone (B4/H1M) bei

*Xenopus laevis*, 'cleavage-stage' cs-H1 bei Seeigel und H1<sub>oo</sub> bei Säugetieren (TANAKA et al., 2001) beschrieben worden.

Sämtliche oocytenspezifische mRNAs der H1-Isoformen sind im Gegensatz zu den somatischen H1-Isoformen polyadenyliert. Dies bedeutet, dass sie vom Zellzyklus unabhängig exprimiert sind ('replacement histones'). Somatische Histon-mRNAs haben dem gegenüber eine 3'-terminale Haarnadelstruktur und sind Zellzyklus-abhängig exprimiert (OSLEY, 1991; HEINTZ, 1991; BIRNSTIEL et al., 1995).

Die Modifikation der Histone durch Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung und Methylierung hat einen regulatorischen Einfluß auf die Genaktivität (VAN HOLDE, 1989).

Die Rolle der Modifikationen des Linkerhistons H1 in der Organisation des Chromatins ist unzureichend geklärt (ZLATANOVA und VAN HOLDE, 1992; WOLFFE, 1991).

Die Phosphorylierung ist mit der Teilung der Zellen korreliert. Sie findet langsam in der G1-Phase statt und erreicht in der S- und G2-Phase das Maximum. Am Ende der Mitose werden die Phosphat-Gruppen entfernt. Es werden Serin und Threonin in den N- und C-terminalen Domänen durch einen Komplex von p34cdc2 und Cyklin B (ARION et al., 1988) phosphoryliert. Die Funktion der Phosphorylierung ist noch nicht genau geklärt. Während der Apoptose wurde die DNA fragmentiert, die Linkerhistone wurden dephosphoryliert (KRATZMEIER et al., 2000). Man vermutet, dass die Histon H1-Phosphorylierung zur Kondensierung der Chromosomen und zur transkriptionellen Regulation führt.

Andererseits wurde durch die Substitution der Phosphorylierungs-Stelle (Threonin und Serin) in *Tetrahymena thermophila* im Makronukleus bewiesen, dass die Phosphorylierung des Linkerhistons H1 für die Lebensfähigkeit in diesem Organismus keine Rolle spielt (MIZZEN et al., 1999).

Die ADP-Ribosylierung kann nicht nur mit der DNA-Reparatur sondern auch mit der Apoptose verbunden sein (YOON et al., 1996). Dieser Prozeß erleichtert den Zugriff der Nukleasen zur DNA zwischen den Nukleosomen.

Zum Vergleich mit dem Linkerhiston sind die 'core' Histone nicht nur phosphoryliert und ADP-ribosyliert, sondern sie werden auch acetyliert, ubiquitiniert und methyliert (VAN HOLDE, 1989).

Die Modifikationen der N- und C-terminalen Domänen der 'core' Histone haben einen Einfluß auf die DNA-Bindung zum Nukleosom, was auf die regulatorische Funktion des Nukleosomes hinweist (ARENDS und MOUDRIANAKIS, 1995).

Das Histon H3 ist durch Acetyltransferasen in den Lysin-Positionen Lys-9 und Lys-14 modifiziert, das H4 Histon in den Positionen Lys-5, Lys-8, Lys-12 und Lys-16 der N-terminalen Domäne. Das acetylierte Histon Isoform H4 ist in der Lysin-Position Lys-16 mit transkriptionell hochaktivem X-Chromosom der männlichen Zellen von *Drosophila* verbunden. Das 'core' Histon H4 des inaktiven X-Chromosoms bei Säugetieren ist kaum acetyliert (JEPPESEN und TURNER, 1993). Das gilt auch für die GpC-Inseln in der Nähe der 'housekeeping'-Gene (BROWNELL et al., 1996). Die Acetylierung führt dazu, dass das Chromatin nicht stark kondensiert ist und die Proteine sowie die Transkriptionsfaktoren einen leichteren Zugriff zur DNA haben. Diese Modifikationen sind durch kooperative Funktionen der Histon Acetyltransferasen (HAT) und Deacetylasen (HDAC) kontrolliert.

Für die Acetylierung sind Acetyltransferasen verantwortlich. Sie teilen sich in zwei Gruppen: HAT-A und HAT-B. Die HAT-A-Gruppen sind in den Nuklei lokalisiert und regulieren die Expression der Gene. Zur HAT-A-Gruppe gehören die Proteine HAT-A (bei *Tetrahymena*) und der ähnliche HATA-A Transkriptionsfaktor der Hefe-Gcn5 (BROWNELL et al., 1996; KLEFF et al., 1995). Die Proteine HAT-B befinden sich im Cytoplasma und acetylieren die neu entstandenen 'core' Histone (NAKAYAMA und TAKAMI, 2001).

Bei Menschen sind die Proteine p300/CBP, PCAF ('cellular p300/CBP associated factor'), TAFII 230/250 — ein Teil des Transkriptionsfaktors TFIID (MIZZEN, 1996) — und ACTR/SRC-1 ('activator of retinoid receptors') für die Acetylierung der 'core' Histone notwendig.

Zu den Histon-Deacetylasen gehören bei Säugetieren HDAC-1, HDAC-2 und bei Hefen die transkriptionellen Corepressoren Sin3 und Rpd3.

Die Inhibitoren für die Aktivität des HDAC sind Trichostatin (TSA), Trapoxin und Natrium-Butyrat (NAKAYAMA und TAKAMI, 2001).

Die oben beschriebenen Mechanismen haben nicht allein Einfluß auf die Expression der Gene. Es ist aber bekannt, dass die Genregulation in Eukaryonten ein sehr komplexes Wechselspiel zwischen unspezifischen und spezifischen Faktoren, Proteinen und Proteinkomplexen ist. Es gibt Proteine, die die Struktur des Chromatins destabilisieren und

den Zugriff der Transkriptionsfaktoren zur DNA erleichtern. Für diesen 'remodeling'-Prozeß werden Proteinkomplexe benötigt. Gut beschrieben sind die Proteine, die durch die SWI/SNF Gene von *S. cerevisiae* kodiert sind (WINSTON und CARLSON, 1992). Ohne den SWI/SNF Komplex werden folgende Gene nicht transkribiert: HO (HO kodiert die Endonuklease), INO1 (ein Enzym, das verantwortlich für den Metabolismus der Inozytol ist) und SUC2 (eine Invertase) (CARLSON et al., 1984).

Die SWI/SNF Komplexe interagieren mit den Proteinen des Chromatins und destabilisieren deren Struktur. Ähnliche Eigenschaften haben die menschlichen Gene Brg1 und hBm (KENNISON und TAMKUN, 1988). Als weitere Chromatin-'remodeling'-Faktoren sind bekannt: NURF Komplex (**N**ukleosom **R**emodelling **F**actor), CHRAC Komplex (**C**hromatin **A**ccessibility **C**omplex) und ACF (remodeling factor); dieser ist ATP-abhängig und wurde bei *Drosophila melanogaster* beschrieben (KRUDE und ELGIN, 1996). Die Änderung der Struktur des Chromatins wirkt nicht nur Gen-aktivierend. Es gibt auch viele Proteine, die auf das Chromatin wirken und die Gene reprimieren. 1947 wurde bei *Drosophila* eine Gen-Familie entdeckt, welche als Polycomb-Group-Protein (Pc-G) bezeichnet wurde, mit der Funktion, homeotische Gene zu reprimieren.

Die Pc-G Familie entsteht aus ca. 40 Genen (z.B.: Psc-Posterior sex combs, Su(2)Z-Suppressor 2 of zeste, Pc-Polycomb, Ph-Polyhomeotic) (EPSTEIN, 1992). Funktionell vergleichbare Gene wurden bei Mäusen (Gen *bmi-1*) und bei Menschen (Gen *Bmi-1*) entdeckt (VAN der LUGT et al., 1994). Die Zerstörung der *bmi-1* Funktion bei Mäusen führt zu verschiedenen entwicklungsbiologischen Anomalien (ALKEMA et al., 1995).

Die Repressions-Mechanismen sind sehr gut bekannt und beschrieben bei *S. cerevisiae*.

Die Regulation der zwei jeweils alternativ aktiven Paarungseloci, welche den Paarungstyp der Hefen bestimmen, wird von der Struktur des Chromatins geregelt.

Die Repression der Transkription des Genes findet in SML (silent mating locus) und in der Nähe der Telomere statt.

Das Silencing der Gene in der Nähe der Telomere hängt von den Histonen H3, H4 und auch von den Proteinen SIR3 und SIR4 ab ('silent information regulator'). Diese Proteine binden die N-terminalen Domänen der Histone H3, H4, mit Proteinen RAP1 und dem ORC-Komplex ('origin recognition complex') (BUCHMAN et al., 1988).

Das Linkerhiston H1 ist seit einigen Jahrzehnten als genereller Repressor der Transkription *in vitro* bekannt und ist wahrscheinlich auch an der Regulation der spezifischen Klassen der Promotoren von Genen beteiligt (CAIRNS, 1988).

Andererseits beweisen viele Untersuchungen an dem Linkerhiston H1, dass das H1 Histon kein genereller Repressor der Transkription *in vivo* ist (PRYMAKOWSKA-BOSAK et al., 1996; SHEN und GOROVSKY, 1996; STEINBACH et al., 1997).

Die elektronenmikroskopische Antikörper-Dekoration hat gezeigt, dass das Chromatin eines hochtranskriptionsaktiven Gens eine vergleichbare Dichte von H1-Molekülen besitzt wie die inaktive 30 nm Fibrille (ERICSSON et al., 1990).

Nach Knockout der H1-Gene von *Tetrahymena*, *Aspergillus nidulans* und der H1<sup>0</sup>-Isoform bei Mäusen wurden keine Effekte auf die Proliferation und die Differenzierung der Zellen beobachtet (SHEN und GOROVSKY, 1996; SIROTKIN et al., 1995; RAMON et al., 2000). Andererseits wird bei *Tetrahymena* das Linkerhiston H1 für die Repression des ngoA Gens in wachsenden Zellen und die Expression des CyP Gens in 'starved'-Zellen benötigt (SHEN und GOROVSKY, 1996). Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde das Hho1p Protein, das dem H1 Protein ähnlich ist, untersucht (ESCHER und SCHAFFNER, 1997; PATTERTON et al., 1998; PUIG et al., 1999). In dem Knockout-Stamm (ohne HHO1 Gen) wurden keine Effekte beobachtet. Das Protein wird nicht für das 'silencing' der Telomere, der transkriptionellen Repression oder für die Sporulation benötigt.

Auch bei Zerstörung des H1t Gens (anwesend in späten Spermatozyten und frühen Spermatozyten) bei Mäusen (FANTZ et al., 2001) war kein Phänotyp festzustellen. Die Null-Mutanten waren fertil, ohne Änderungen der strukturellen chromosomalen Proteine während der Spermiogenese. Die Menge der Proteine Protamin 1 und 2 hatte sich im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Das Chromatin (ohne H1t) war funktionell dem Chromatin mit H1t ähnlich, weil die somatischen H1-Isoformen stärker exprimiert wurden. Auch bei der Überexpression des Histons H1<sup>0</sup> bei Mäusen wurden keine Effekte beobachtet (TONJES et al., 1997; STEIN und SCHULTZ, 2000).

PRYMAKOWSKA-BOSAK hat durch die Überexpression der somatischen Typen von H1 in Tabak gezeigt, dass die Kondensation des Chromatins durch die doppelte Menge von H1 stark zunimmt — jedoch ohne Erscheinen deutlicher phänotypischer Effekte (PRYMAKOWSKA-BOSAK et al., 1996). Ein geringer Einfluß des Linkerhistons H1 wurde nur in der Morphologie (in Bezug auf die Größe der Zellen) und der Ultrastruktur bei

*Arabidopsis thaliana* beschrieben (SLUSARCZYK et al., 1999). In BY-2 Suspensionszellen von Tabak bei der Überexpression des Linkerhistons H1 von *Arabidopsis thaliana* beobachtete man eine Änderung der Zellgröße, die mit der Organisation der corticalen Mikrotubuli korreliert (CALIKOWSKI et al., 2000).

Andererseits spielt eine der Histon H1-Isoformen bei Tomaten (H1-S) eine potentielle Rolle für die Gen-Regulation und -Expression, die für die Reaktion auf ein Wasserdefizit verantwortlich sind (SCIPPA et al., 2000). In *Ascobolus immersus* wurde gezeigt, dass das Histon H1 einen Einfluß auf die Lebensspanne hat (BARRA et al., 2000).

In transgenem Tabak ersetzten PRYMAKOWSKA-BOSAK et al. (1999) die Menge der am höchsten exprimierten Histone H1A und H1B durch H1C und H1F, trotzdem war der Effekt auf die Kondensation des Chromatins sichtbar. Der transgene Tabak ist normal gewachsen. Der beobachtete Einfluß wurde in der Blüten-Entwicklung und bei der männlichen Meiose im Pollenkern detektiert. Die Morphologie der Blüten ändert sich und in der männlichen Gametogenese kommen Aberrationen vor.

Bei *Xenopus* (BOUVET et al., 1994; TOMASZEWSKI und JERZMANOWSKI, 1997) wurde eine spezifische Regulation von Genen durch H1 für die 5SrRNA während der früheren Entwicklung des Frosches nachgewiesen. Das Linkerhiston H1 wurde als Genrepressor für Oocyte-Typen 5SRNA Gene identifiziert (BOUVET et al., 1994; KANDOLF, 1994).

In vitro wies man nach, dass sich das Histon H1 an die AT-reichen-Sequenzen im Chromatin bindet, die Nukleosomen-Entfernung vergrößerte, wodurch die Verteilung der Nukleosomen stabilisiert wurde. Diese stabilisierten Nukleosomen schützten die 5SRNA Gene der Oocyte und führten zur Repression ihrer Transkription in vitro. Die somatische 5SRNA besitzt keine AT-reichen-Sequenzen und ist nicht reprimiert (TOMASZEWSKI und JERZMANOWSKI, 1997).

Da viele Organismen und Zelltypen mehrere Isoformen von H1 besitzen, ist auch die Frage interessant, ob die einzelnen gleichzeitig in einem Zellkern vorhandenen H1-Isoformen verschiedene Funktionen besitzen, oder ob die Heterogenität der H1 Proteine nur anzeigt, welche Variationen der Struktur des Proteins dessen (einheitliche) Funktion zuläßt. Diese Frage ist systematisch bei der Diptere *Chironomus* untersucht worden. Die Zuckmücke *Chironomus thummi* hat vier H1-Isoformen, die sich durch die Divergenz einer Variante (H1 I-1) in zwei Klassen einteilen lassen. Es wurde gezeigt, dass diese Isoform eine N-

---

terminale Insertion der Form (KAP)<sub>n</sub> besitzt und eine differenzielle Verteilung in den Polytänchromosomen zeigt (SCHULZE et al., 1992; GROSSBACH, 1995; TRIESCHMANN et al., 1997). Ihr Vorkommen ist mit kondensiertem Chromatin korreliert, in dem die repetierte DNA liegt (MOHR et al., 1989). Dieser Dualismus wird auch durch ein anderes, ähnliches Sequenzmotiv (SPAK) konstituiert (SCHULZE et al., 1994). Eine Beteiligung von diesen strukturell andersartigen H1-Isoformen an der Bildung eines kondensierten Chromatinsubtyps wird daher angenommen (SCHULZE et al., 1993; WISNIEWSKI und GROSSBACH, 1996).

Die bisherigen Ergebnisse haben die biologische Funktion des Linkerhistons H1 bis jetzt nicht sicher geklärt. Im Gegensatz zu 'core' Histonen, die essentiell für das Leben sind (HAN et al., 1987), ist das Linkerhiston H1 offenbar entbehrlich.

Die Funktion der eukaryontischen Histone H1 wird in der Kondensierung des Chromatins und der Blockierung des Zuganges anderer Proteine zur nukleosomalen DNA vermutet. Das Linkerhiston H1 könnte die DNA-Ladung neutralisieren und dynamisch mit Chromatin assoziiert sein, um die Verpackung der DNA und ihre Zugänglichkeit zu ändern.

Um die Rolle des Linkerhistons H1 besser kennenzulernen, wurden die H1-Familien bei *Caenorhabditis elegans* untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden sieben H1-Isoformen untersucht mit dem Ziel, die biologische Bedeutung der Linkerhiston Isoformen zu erarbeiten. Zu Beginn der Untersuchung wurde ein '*C. elegans*-Laboratorium' mit umfangreichen, neuartigen Methoden etabliert.

Die zwei Histon H1-Proteine H1.1 und H1.2, wie auch das H1.1 kodierende Gen, wurden schon früher beschrieben (VANFLETEREN et al., 1988; VANFLETEREN et al., 1990; SANICOLA et al., 1990). Die anderen H1 Proteine werden hier zum ersten Mal beschrieben. Die Rolle des Histon H1 im lebenden Organismus wurde in diesen früheren Publikationen nicht untersucht.

Der Wurm *C. elegans* eignet sich als Modellsystem für entwicklungsbiologische Studien besonders gut, da der Zellstammbaum (SCHIERENBERG und CASSADA, 1986), wie auch das Genom vollständig bekannt ist. Die kurze Generationszeit (3 Tage) auf Platten, welche mit dem *E. coli* Stamm OP50 beschichtet sind, die minimale Länge (ca. 1,5 mm) sowie viele

Nachkommen (300-350) machen den Wurm als biologisches Objekt sehr attraktiv und ermöglichen eine schnelle und vielfältige Suche nach der Funktion des Histons H1.

In dieser Arbeit werden alle H1-Gene und Proteine von *C. elegans* vergleichend beschrieben. Die Analysen der Funktionen mehrerer einzelner H1-Isoformen wurde vor allem mit der dsRNA-Interferenz durchgeführt. Es wurde herausgefunden, dass H1.1 am Chromatin-kontrollierten silencing von Genen in der Keimbahn beteiligt ist. H1.4 ist für die Entwicklung der Strukturen des männlichen Sexualdimorphismus mit erforderlich und wird auch für die Organogenese benötigt. H1.2 ist ein starker Repressor der genetischen Aktivität in Dauerlarven.

Die Histon H1.X-Isoform wurde als überwiegend cytoplasmatisches Protein identifiziert, das mit den Tonofilamenten der Marginalzellen co-lokalisiert ist. H1.X ist nicht mit den kondensierten Chromosomen im Gegensatz zum Histon H1.1 und H1.4 verbunden.

Linkerhiston-Isoformen von *C. elegans*, deren Funktion oben beschrieben wurde, wurden auch in dem Telomer-Positionseffekt-Variegation-System der Hefen getestet. Es wurde herausgefunden, dass sie in diesem System funktionieren. Daraus kann man schließen, dass bestimmte molekulare Mechanismen zwischen den Hefen und *C. elegans* übereinstimmen.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

In dieser Arbeit wurden folgende *Caenorhabditis elegans* Stämme verwendet:

N2 (Bristol, UK) als Wildtyp (BRENNER, 1974), *pha-1(e2123)* III (von R. Schnabel), *him-8(e1489)* IV, *mes-2(bn11) unc-4(e120) / mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444)* II, *mes-3(bn21)* I, *mes-6(bn66) dpy-20(e1282)* IV / *nT1[unc(n754) let]* (IV, V), *lin-17(n698)* I, *egl-17(e1313)* X, *Oscheius myriophila*, *daf-2(e1370)* III, *ccls4251* I; *dpy 20(e1282)* IV, *lep-1(bx42)* (von *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC)), *dpy-20(e1282)*; *syIs20 him-5(e1490)* mit *gpa-1::lacZ* Fusion, *dpy-20(e1282)*; *syIs33*; *him-5(e1490)* mit *gpa-1::gfp* Fusion, *son-1(sy549)*; *dpy20(e1282)*; *syIs20 him-5(e1490)* (von P. W. Sternberg).

Es wurden während der Doktorarbeit folgende *C. elegans* Stämme: EC100 (*H1.1::gfp*), EC101 (*H1.1::gfp::CeH1.1 3'UTR*), EC102 (*H1.4::gfp*), EC103 (*H1.X::gfp*), EC104 (*H1.X<sub>K</sub>::gfp*), EC105 (*H1.X<sub>K</sub>::gfp*), EC106 (*H1.X<sub>K</sub>::gfp*) und EC107 (*let-858::gfp*) hergestellt.

Es wurden folgende *Escherichia coli* Stämme: DH5 $\alpha$ , BL21(DE3), OP50, HT115(DE3), LE392, XL1-Blue MRF', SOLR™ verwendet. Die Sir2.1 cDNA (yk352g2) und H1 cDNA Klone (yk85b12, yk187f1, yk89f5, yk142d7, yk173g2, yk116f11) als Phagenlösungen kommen von Y. Kohara und  $\lambda$ SHLH2 Phagenlösung von A. Coulson. Der *Saccharomyces cerevisiae* UCC3505 Stamm wurde von D. E. Gottschling und der S35P-5A Stamm (Wildtyp) von D. Schmitt zur Verfügung gestellt.

### 2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde die alkalische Lysemethode (modifiziert nach BIRNBOIM und DOLY, 1979) verwendet. Dabei wurde die Plasmid-DNA aus jeweils 3 ml Kulturflüssigkeit präpariert (Miniprep): sterile Duran-Reagenzgläser wurden mit 4 ml LB-

Medium gefüllt, dem 16 µl Ampicillin (20 mg/ml) zugesetzt waren. Die Röhren wurden nach dem Animpfen mit einzelnen Bakterienkolonien mit Aluminiumkappen verschlossen und über Nacht auf dem Schüttler bei + 37°C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei RT ausgeführt. In 1,5 ml Eppendorfgefäßen wurden zweimal jeweils 1,5 ml Zellsuspension 1 min in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette sorgfältig entfernt und erneut kurz zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,3 ml P1-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 400 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert und mit 0,3 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS - frisch angesetzt) 5 min bei RT lysiert. Danach wurde P3-Puffer (2,55 M KaAcetat, pH 4,8) hinzupipettiert, kräftig geschüttelt und 15 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, dort mit 0,8 Vol. Isopropanol versetzt und die DNA durch 15 min Zentrifugation gefällt. Das DNA Pellet wurde zweimal mit kaltem 70% Ethanol gewaschen, in der Vacuumzentrifuge getrocknet und in 60 µl TE-Puffer gelöst. Für Mikroinjektion und Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA mittels eines Kits von Genomed, Qiagen oder Machery & Nagel nach den Vorschriften des Herstellers isoliert.

### 2.2.2 Isolierung der Cosmid-DNA

Das Protokoll ist dem Handbuch eines EMBO-Kurses entnommen und modifiziert worden (HODGKIN, J.; KUWABARA, P.; COULSON, A.; Manual for 1998 EMBO Practical Course on Molecular, Genetic and Informatic Methods for *C. elegans*; S. 35-36).

Eine einzige Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei + 37°C im Schüttler inkubiert. Zwei mal 1,5 ml Zellsuspension wurden im Eppendorfgefäß kurz (45 s) abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl Lösung I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. 250 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1% SDS; frisch angesetzt) wurden dazugegeben, 15 mal vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 200 µl Lösung III (3 M NaAcetat pH 4,8) zugegeben, 15 mal vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert und ab und zu gemischt. Das Pellet wurde 8 min bei RT abzentrifugiert und 600 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß übertragen, mit 0,9 ml kaltem Ethanol gemischt und 10 min bei – 20°C inkubiert. Das Pellet wurde 8 min abzentrifugiert und dann in 200 µl 0,3 mM NaAcetat, 1 mM EDTA resuspendiert, im Vortex gemischt, 15 min

bei RT belassen und dann erneut gemischt. Es wurden 400  $\mu$ l kaltes Ethanol zum Resuspendat gegeben, 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und 8 min bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in kaltem 70% Ethanol gewaschen, in der Vacuumzentrifuge getrocknet und mit TE resuspendiert. Die quantitative Lösung der Cosmid-DNA erfolgt über Nacht bei RT. Ungünstige Herstellungsverfahren können Deletionen im Cosmid verursachen. Die enzymatisch verdaute DNA wurde auf einem Agarose-Gel analysiert um festzustellen, ob das Cosmid vollständig war.

### 2.2.3 In vivo Umwandlung der $\lambda$ ZAP II Klonen

Es wurden in 4 Röhren je 200  $\mu$ l von einer Übernachtskultur des *E. coli* Stammes LE392 (Lambda ZAP II Predigested EcoRI/CIAP – Treated Vector Kit (Stratagene)) pipettiert, dazu 200  $\mu$ l Magnesiumchlorid (Endkonzentration 10 mM) und jeweils 1  $\mu$ l, 3  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l Phagensuspension hinzugefügt. Die Röhren wurden 30 min bei  $+37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml NZY-TopAgar wurde die Suspension auf NZY-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei  $+37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert, um die Phagen zu vermehren. Dann wurden auf die Platten 1 ml SM Puffer und 40  $\mu$ l Chloroform gegeben und einige min inkubiert, um die Phagen zu eluieren. Zuletzt wurde die Mischung von Phagen, SM Puffer und Chloroform in ein Eppendorfgefäß pipettiert, 1 min am Vortex gemischt und 1 bis 2 h bei RT oder über Nacht bei  $+4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 250  $\mu$ l dieser Phagensuspension wurde direkt weiter verwendet während der Rest mit DMSO (Endkonzentration 7%) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurde.

Eine zweite Methode (SCHULZE, pers. Mittlg.) wird weiter unten beschrieben. Vom *E. coli* Stamm LE392 wurde eine Übernachtskultur angesetzt, 1 ml aus der frischen Übernachtskultur zu 50 ml LB gegeben und 6 h bei  $+37^{\circ}\text{C}$ , bei 220 rpm im Schüttler inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen bei  $5000 \times g$  und  $+4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert und in 25 ml 10 mM Magnesiumchlorid aufgenommen. 250  $\mu$ l dieser kompetenten Zellen wurden mit 1  $\mu$ l Phagensuspension versetzt, 30 min bei  $+37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, dann 3 ml LB zugegeben und über Nacht bei  $+37^{\circ}\text{C}$  im Schüttler inkubiert. Wenn eine gute Lyse sichtbar war, wurden die Zellen bei  $12000 \times g$  abzentrifugiert, ansonsten weitere 4 h bei  $+42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Überstand mit Lambda Phagen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit einem kleinen Tropfen Chloroform konserviert. Die Phagensuspension wurde 30 s bis

1 min am Vortex gemischt, um die verbliebende LE392 Zellen abzutöten. 40 µl Phagensuspension davon wurden mit 1 ml LB verdünnt.

Die XL1-Blue MRF' und SOLR Zellen wurden in LB mit 0,2% Maltose und 10 mM Magnesiumsulfat angeimpft und bei + 30°C, mit 220 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden bei 1000 x g abzentrifugiert und mit 10 mM Magnesiumsulfat auf eine optische Dichte von OD 600 nm = 1,0 gebracht. In ein 15 ml Falcon-Röhrchen wurden folgende Komponenten pipettiert:

200 µl XL1-Blue MRF' Zellen (OD 600 nm = 1,0 )

250 µl Phagensuspension ( 40 µl Phagen in 1 ml LB verdünnt)

1 µl ExAssist helper Phagen ( $> 1 \times 10^6$  pfu/µl)

und 15 min bei + 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB wurden die Falcon-Röhrchen 2,5 bis 3 h bei + 37°C geschüttelt, anschließend 3 h bei + 65-70°C, 20 min im Wasserbad inkubiert und 15 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit pBluescript phagemid wurde in ein neues Röhrchen übertragen und bei + 4°C aufbewahrt. Je 200 µl der frisch gewachsenen SOLR-Zellen (mit 10 mM Magnesiumsulfat auf eine OD 600 nm = 1,0 verdünnt) wurden in zwei Eppendorfgefäße gegeben, dazu 10 µl bzw. 100 µl pBluescript phagemid-Suspension gegeben und bei + 37°C für 15 min inkubiert. 200 µl aus jedem Eppendorfgefäß wurden auf Ampicilin Platten ausplattiert und über Nacht bei + 37°C inkubiert. Eine einzige Kolonie wurde in LB mit Ampicilin angeimpft, über Nacht bei + 37°C geschüttelt und Miniprep und enzymatischer Verdau gemacht, um das Insert in pBluescript® II SK(-) nachzuweisen. Die positiven Klone wurden eingefroren bei - 80°C, Midiprep gemacht und das Insert sequenziert. Nach dieser Methode wurden die cDNA Klone der Phagenbibliothek von Y. Kohara isoliert.

#### **2.2.4 In vivo Umwandlung des λSHLH2 Klones**

Die pop-out Phagensuspension wurde über Nacht bei + 37°C in LB mit 10 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin inkubiert. Danach wurde 10 µl λSHLH2 Phagensuspension (von A. Coulson) mit 100 µl pop-out Phagensuspension und 20 µl M13K07 helper Phagensuspension zusammen gemischt. Nach 75 min Inkubation bei RT wurden 2 ml 2 x YT und 90 µg/ml Ampicilin zugegeben und über Nacht bei + 37°C inkubiert. 1,2 ml der Übernachtskultur wurde 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert. 5 µl vom

Überstand wurden mit 100 µl XL1-blue Zellen, die über Nacht in LB mit 15 µg/ml Tetracyclin inkubiert wurden, gemischt und weiter 75 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde auf Ampicilin (90 µg/ml) / Tetracyclin (15 µg/ml) Platten ausplattiert und über Nacht bei + 37°C inkubiert. So wurde H1.4 cDNA Klon isoliert.

### 2.2.5 Bestimmung der Konzentration der DNA und der RNA

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bestimmt oder fluorometrisch auf einem Agarose-Gel durch Vergleich mit einem Mengenstandard (Lambda-DNA Marker) abgeschätzt. Zur genauen Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Menge wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Proben wurden mit Wasser verdünnt; die Messung wurde mit einem Spektralphotometer (Uvicon) durchgeführt. Die

$$C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD } 260 \text{ nm} \times \varepsilon \times V$$

OD 260 nm = optische Dichte bei 260 nm

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient (ds DNA= 0,05 oder RNA=0,04 )

V = Verdünnungsfaktor

### 2.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Für analytische Zwecke wurde DNA mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen geschnitten (BROOKS, 1987) und anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Eingesetzt wurden jeweils bis 2 µl DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl, 1 µl 10 x Puffer (je nach Enzym und Hersteller), ein oder mehrere Restriktionsenzyme und H<sub>2</sub>O. Verdaut wurde für 1 h bis 2 h bei + 37°C bzw. bei + 25°C (*Sma* I).

### 2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

DNA-Fragmente aus Restriktionsverdau-Ansätzen bzw. PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (SAMBROOK et al., 1989) getrennt. Verwendet wurde Agarose in einer Konzentration von 0,7%-1,5% in 1 x TAE-Puffer (abhängig von der Produktgröße); die auf ca. + 55°C abgekühlte Gellösung wurde vor dem Gießen 1 µg/ml Ethidiumbromid (Stocklösung) hinzugefügt. Die Proben wurden mit Bromphenolblau-

Lösung (50% Glycerin in TE und 0,2% Bromphenolblau) zur Markierung der Lauffront versetzt. Als Größenstandard diente mit *EcoR* I / *Hind* III geschnittene Lambda-DNA. Die Trennung erfolgte bei 108 V in TAE Puffer. Die Analyse des Gels wurde auf einem UV-Transilluminator (254 nm) vorgenommen. Für präparative Zwecke (Ligation) erfolgte eine Elektrophorese in 0,7% Gelen mit niedrigschmelzender Agarose (Peqgold Low Melt Agarose, Peqlab). Die Banden wurden in diesem Fall unter einer UV-Lampe bei 350 nm aus dem Gel herausgeschnitten und zur Ligation verwendet.

### 2.2.8 Klonierung von Restriktionsfragmenten

Die DNA wurde in low-melting-point Agarose-Gel prepariert, die entsprechende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und bei + 65°C geschmolzen. Die Bande wurde auf + 37°C abgekühlt, davon 6 µl mit 3 µl Vektor (z.B.: pBluescript® II SK (+/-), pUC18, pET3a) gemischt und zu 11 µl Ligationsansatz (2 µl 1 Unit/µl T4-DNA-Ligase, 2 µl 10 x Ligationspuffer, 7 µl steriles H<sub>2</sub>O) gegeben. Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei + 14-18°C inkubiert; anschließend in kompetenten *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) transformiert. Für einige Ligationen wurde eine Dephosphorylierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase durchgeführt: Nach dem enzymatischen Verdau des Vektors wurden 1 µl alkalische Phosphatase und entsprechender Puffer in der Verdünnung 1:250 hinzugefügt und 30 min bei + 37°C inkubiert. Nach Trennung im low-melting-point Agarose-Gel wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und für die Ligation verwendet.

### 2.2.9 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Die kompetenten Zellen *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) wurden auf Eis aufgetaut. Die Gel-Bande aus der Ligationsreaktion wurde bei + 65°C geschmolzen und auf + 37°C gebracht, mit 100 µl Bakteriensuspension auf Eis gemischt und 40 min darauf belassen. Für den Hitzeschock wurden die Zellen 2 min bei + 42°C im Wasserbad erwärmt, anschließend 10 min bei RT gelassen und mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika bei + 37°C inkubiert. Durch 30 s Zentrifugation bei 12000 x g wurden die *E. coli*-Bakterien

konzentriert und 200 µl entweder auf X-Gal-, Ampicilin- oder auf Kanamycin-Platten ausplattiert (Vektor abhängig).

### **2.2.10 Herstellung der Transformationskompetenten *E. coli***

1 ml einer frischen Übernachtskultur wurde in 50 ml LB-Medium in sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen angeimpft. Nach Erreichen einer OD 600 nm von 0,3 wurden die *E. coli* Bakterien mit 3000 x g bei + 4°C in vorgekühlter Hettich-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 mM autoklaviertem CaCl<sub>2</sub> (+ 4°C) aufgenommen: zuerst vorsichtig mit 1 ml auf Eis resuspendiert und dann auf 25 ml verdünnt, nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 10 min mit 3000 x g bei + 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und mit 10-15% sterilem Glycerin (Endkonzentration) versetzt. Aliquots von 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C für mehrere Monate gelagert. Kompetenz (Transformation pro µg Vektor pUC18) und Hintergrund (Transformation ohne Vektorzugabe) jeder Charge wurden auf Ampicilin-Platten überprüft.

### **2.2.11 Herstellung der DNA-Fragmente mit überhängenden Enden oder mit stumpfen Enden**

Für die Umklonierung oder Klonierung von PCR-Produkten in Vektoren wurden zwei verschiedene Techniken benutzt, mit überhängenden Enden (die Restriktionsenzyme schneiden so, daß an den Insert-Enden die freien Einzelstrang-Überhänge bleiben) oder mit stumpfen Enden (die Enden des Inserts sind stumpf). Das PCR-Produkt wurde mit Taq-Polymerase inkubiert und danach gereinigt. Dafür wurden 50 µl des fertigen PCR-Reaktion-Ansatzes mit 1 Unit Polymerase und 8 µl 0,25 mM dNTP gemischt und 5 min bei + 72°C im Wasserbad inkubiert, anschließend mit 20 µl Chloroform/Isoamylalkohol (96:4) extrahiert, 1 min am Vortex gemischt, die wässrige Phase 1 min abzentrifugiert bei RT, der klare Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und mit 5 µl NaAcetat 3 M pH 5,5, 100 µl EtOH 100% 3 h bei – 20°C präzipitiert. Das Pellet wurde mit 12000 x g für 30 min abzentrifugiert, mit 70% Ethanol (- 20°C) gewaschen und in der Vacuumzentrifuge getrocknet. Das PCR-Produkt wurde in sterilem Wasser oder TE (20 bis

50 µl, abhängig von der Pelletmenge) gelöst. Für blunt-end-Klonierungen wurden 16 µl des PCR-Produkts in ein neues Eppendorfgefäß übertragen, mit 4 µl T4-DNA-Polymerase-Puffer (5 x Konz.), 2 µl 0,25 mM dNTP und 1 Unit T4-DNA-Polymerase versetzt und bei + 12°C 15 min im Wasserbad inkubiert. Zur Inaktivierung der Polymerase wurde 10 min bei + 75°C inkubiert. Der Vektor wurde mit anderen Enzymen, die stumpfe Enden machen - z.B.: *Ecl136 II*, *Sma I*, *Stu I* – verdaut.

Für Klonierungen mit überhängenden Enden wurde das PCR-Produkt und auch der Vektor mit entsprechenden Enzymen z.B. *BamH I*, *Kpn I*, *Hind III* 3 h bei + 37°C verdaut. Das PCR-Produkt - wie auch der geschnittene Vektor - wurden auf einem 0,7% Agarose-Gel (low-melting-point Agarose, Peqlab) bei 108 V elektrophoretisch gereinigt. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und für die Ligation verwendet.

### 2.2.12 Sequenzierung der Plasmid DNA

Die Methode ist nach SANGER (SANGER et al., 1977) durchgeführt.

Für die Sequenzierung wurden Plasmid-Minipreps mit dem Kit der Firma Genomed durchgeführt. Die DNA wurde in sterilem Wasser gelöst und spektrophotometrisch bestimmt. Pro Sequenzierungsreaktion wurden 0,5-3 µg DNA verwendet und mit dem Kit 'Sequenase Version 2.0' von United States Biochemical (Cleveland) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Pro Reaktion wurden 50000 Bq <sup>35</sup>S-dATP (Amersham, Braunschweig) eingesetzt. Die primer wurden in der Konzentration von 5 pmol/µl eingesetzt. Für die Inserts in pUC18 wurden die primer revers

5' AACAGCTATGACCATG 3' und – 40

5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3', in pSK die primer T3

5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3' und T7 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3' und in pET3a der primer pET7-3a

5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' verwendet.

Zur Sequenzierung der GFP-Konstrukte (Vektor pEGFP-N1 rückwärts) wurde der primer ESSEQ06 5' CCAGCTCGACCAGGATG 3' verwendet. Der primer ESSEQ07

5' AA(A,C)TACA(A,C)(G,T)(G,C)T(T,C)GGAGA 3' bindet in der konservierten Region der Histone H1-Gene und erlaubt eine Sequenzierung der N-terminalen Domänen .



Die Elektrophorese wurde in einer S2-Kammer von BRL (Eggenstein) durchgeführt. Eine Glasplatte wurde mit 2% Dichlordimethylsilan in Trichlorethan hydrophobisiert, die zweite mit einer Haftsilanlösung behandelt. Dann wurde zwischen die beiden Platten die Polyacrylamid-Gellösung gegossen, die vorher filtriert und zum Starten der Polymerisations-Reaktion mit 100 µl TEMED und 175 µl 25% Ammoniumperoxodisulfat (APS) versetzt worden war. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 Watt und wurde ca. 30 min vor dem Laden der Proben gestartet. Nach einer Laufzeit von 1-6 h wurden die Glassplatten mit dem Gel in 5% Methanol und 5% Essigsäure inkubiert, um den Harnstoff zu eluieren, und im Brutschrank 1 h bei + 130°C getrocknet. Die Exposition auf X-Omat-AR-Röntgenfilm (Kodak) erfolgte über Nacht. Der Film wurde 5 min entwickelt und 5 min fixiert. Während eines langen Laufs wurden ca. 800 bp von einer Sequenzierungsseite gelesen. Für Inserts, die länger als 1500 bp waren, wurden Subklone gebaut, um das ganze Insert im Vektor abzulesen.

### **2.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

#### **2.2.13.1 Standardansatz**

Die Polymerase-Kettenreaktionen (MULIS and FALOONA, 1987) wurden entweder mit der thermostabilen Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, Fa. Fermentas) oder mit zwei gemischten Polymerasen durchgeführt: thermostabile Taq-Polymerase und Pwo DNA Polymerase (Expand™ Long Template PCR System oder Expand™ High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim); die Wahl der Methode war abhängig vom Zweck (analytische oder präparative PCR) und von der Länge der zu amplifizierenden DNA. Es wurde für einen PCR-Ansatz in folgender Reihenfolge in ein Eppendorfgefäß pipettiert:

8 µl dNTP (Endkonzentration 0,25 mM)

5 µl 10 x Konz. Puffer für verwendete Polymerase

2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 µl primer (Endkonzentration 1 pmol/µl)

0,1-1 µg DNA1 Unit Polymerase

ad 50 µl steriles Wasser

überschichten mit 30 µl Öl (Sigma, Qualität Molekularbiologie)

Der Standardansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Spezifität und Produktmenge einer PCR sind u.a. stark abhängig vom verwendeten Puffersystem. Der Puffer der Fa. Amersham zeigte in dieser Hinsicht die besten Ergebnisse. Die Schmelzpunkte der primer wurden nach RYCHLIK und RHOADS (RYCHLIK und RHOADS, 1989) berechnet. Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock (Fa. Biometra) ausgeführt. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen und primersequenzen wurden variiert. Zur Überprüfung des PCR-Produktes wurden je 5 µl mit 5 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl Proben Puffer auf Parafilm gemischt (Mineralöl bleibt auf dem Parafilm zurück) und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

So wurden die Gene von Histone H1.2 und H1.4 aus der gesamten DNA von *C. elegans* mit den primern ESMG27/ESMG28 (für H1.2) und ESMG29/ESMG30 (für H1.4) amplifiziert. Die Sequenzen sind unten angegeben:

ESMG27 5' GGAATTCTGTCCACGCATCGTTCTACA 3'

ESMG28 5' GGAATTCGGTACCAGTACTCAAGGCATGAG 3'

ESMG29 5' GGAATTCCTACTACTCATCCGTTCAACA 3'

ESMG30 5' GGAATTCGGTACCATTAATTTGATTATTCACACAATGTG 3'

Für die Amplifikationen:

-von genomischer H1.2 DNA wurde folgendes Programm verwendet:

94°C 1 min

51°C 2 min

72°C 1 min

35 Zyklen

-von genomischer H1.4 DNA das PCR-Programm:

94°C 1 min

51°C 2 min

72°C 1 min

35 Zyklen

Die genomische H1.2 DNA wurde mit Expand Polymerase und Expand Puffer amplifiziert und im Vektor pSK in der *EcoR* I Schnittstelle inkloniert. Die H1.4 genomische DNA wurde mit Expand Polymerase und Fermentas Puffer amplifiziert und in der *Ecl136* II Schnittstelle des Vektors pUC18 inkloniert.

### 2.2.13.2 Amplifikation von RNA, RT-PCR

Um die gewünschte cDNA aus der Gesamt-RNA zu amplifizieren wurde RT-PCR mittels SUPERSRIPT II (Gibco) in 5 µl Endvolumen durchgeführt. Es wurden in ein Eppendorfgefäß in dieser Reihenfolge folgende Komponenten pipettiert:

1 µl RNAsin  
0,50 pmol spezifischer primer  
0,63 mg Gesamt-RNA  
ad 3 µl mit DEPC-Wasser

Das Eppendorfgefäß wurde 10 min bei + 70°C inkubiert, schnell auf Eis übertragen und kurz zentrifugiert. Dann wurden die nächsten Komponenten zugegeben:

1 µl first strand-Puffer  
0,50 µl 0,1 M DTT  
0,25 µl 10 mM dNTP, pH 7,0

und bei + 42°C 2 min inkubiert.

Danach wurde 1 µl (200 Units) SUPERSRIPT II hinzugegeben, gut gemischt und 50 min bei + 42°C inkubiert. Das Enzym wurde bei + 70°C 15 min inaktiviert.

Um die komplementäre RNA zur cDNA zu zerstören, wurden 1 µl (1 Unit) DNase-freie RNase (Promega) und 10 x Transkriptionspuffer (40 mM TRIS-HCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 2 mM Spermidin und 10 mM DTT) dazugegeben und 15 min bei + 37°C inkubiert. Es folgte eine Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Phenol, eine zweite mit 1 Vol. Chloroform und die Fällung der RNA mit Ethanol. Die entstandene cDNA wurde als Matrize für PCR benutzt und amplifiziert. Für eine PCR-Reaktion wurde nur 0,2 µl Matrize verwendet. So wurde die fehlende H1.X cDNA aus der gesamten RNA vom *C. elegans* mit folgenden primern amplifiziert:

ESMG18 5' CCATCGATGGTGGGAAATCTAAACTACAGGTGTC 3' und ESG19  
5' GGATCCAGCATATGACCACTTCGCTCATCCACATGG 3'

und das folgende Programm für PCR verwendet:

94°C 1 min

52°C 2 min

72°C 2 min

45 Zyklen, Expand Polymerase mit Expand Puffer.

Das PCR Produkt war 782 bp lang und wurde in der *Ecl136* II Schnittstelle des Vektors pUC18 einkloniert.

### 2.2.14 Herstellung der doppelsträngigen RNA (dsRNA)

Für die dsRNA-Synthese wurde der 'MEGAscript™ in vitro Transcriptions Kit for Large Scale Synthesis of RNA' (Ambion) verwendet. Die vollständige cDNA von allen H1-Isoformen und die cDNAs von HMG1/2 (KURZ, 1999) und Sir2.1 wurde durch in vivo excision in pBluescript® II SK(-) verwandelt. Die durch RT-PCR erhaltene H1.X cDNA wurde aus pUC18 in pBluescript® II SK (-) zwischen *Bam*H I und *Cla* I umklontiert. Für Herstellung der spezifischen H1.1, H1.4, H1.5 dsRNAs wurden Subklone in pBluescript II SK gebaut (die Enzyme sind im Ergebnissteil angegeben). Für die spezifische H1.2 dsRNA wurde eine PCR mit dem primer ESMG71

5' CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGCCCTCACTAAAGGGA 3'

zusammen mit dem Standard T7 primer von Stratagene durchgeführt. Als Matrize wurde yk187f1 verwendet. Die cDNA Plasmidklone wurden so verdaut, daß ein linearisierte Konstrukt entstanden war. Der 10 x Transkriptionspuffer, die Nukleotide und Nuklease-freies Wasser wurden aufgetaut und kurz zentrifugiert. Die Komponenten wurden in folgender Reihenfolge in ein Eppendorfgesäß (DEPC behandelt) bei RT gegeben (Endvolumen betrug 20 µl):

2µl Reaktion Puffer

2µl jeweils ATP, CTP, GTP, UTP Lösungen

x µl linearisierte Matrize, Menge 1 µg

2 µl Enzym MIX (Mix von T3 und T7 Polymerase)

ad 20 µl Nuklease-freies Wasser

Alle Komponenten wurden gut gemischt und zentrifugiert. Die Reaktion wurde im Thermocycler (Biometra) bei + 37°C 6 h inkubiert. Um die DNA zu zerstören, wurde 1 µl RNAse –freie DNase I (2 U/µl) hinzugegeben, gemischt, kurz zentrifugiert und 15 min bei + 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 115 µl nukleasefreiem Wasser und 15 µl Ammoniumacetat-Stop-Solution gestoppt und die Lösung mit 1 Vol. wassergesättigtem Phenol (pH 4,0)/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) extrahiert, gemischt, abzentrifugiert; der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalcohol nachextrahiert. Die dsRNA wurde mit 1 Vol. Isopropanol präzipitiert und 15 min bei – 20°C inkubiert. Dann wurde die dsRNA 15 min mit 12000 x g abzentrifugiert, das Pellet kurz in der Vacuumzentrifuge getrocknet und in nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt und anhand der Fluoreszenz in einem Agarose-Gel überprüft.

### 2.2.15 Herstellung der H1 'green fluorescence' Reportergene

Um die *gfp*-Reportergene herzustellen, wurden die H1.1, H1.4, H1.X DNA mit folgenden primer amplifiziert: die H1.1 DNA aus Cosmid M163 mit primer MJ05/MJ08, die H1.4 DNA aus der Gesamt-DNA von *C. elegans* mit primer MJ01/ESMG30 und H1.X DNA aus Cosmid C30G7 mit primer ESGM34/MJ12. Unten sind die Primersequenzen angegeben:

MJ01 5' CGGGATCCGTCATTTGGTAACAACACTATGTTGCG 3'

MJ05 5' GGGGTACCCCAGCCACCCACCGC 3'

MJ08 5' GGAATTCGTCTAGCGCACGCCTCATTG 3'

MJ12 5' CGGGATCCCGACAATAGCTCTTTCTGGTCCGG 3'

ESMG30 5' GGAATTCGGTACCATTAATTTGATTATTCACACAATGTG 3'

ESMG34 5' CGGGATCCCGTTCGTTCGGTCTCCCAGTC 3'

Es wurden folgende PCR-Programme verwendet:

-für H1.1 DNA Amplifikation

94°C 2 min    dann    94°C 10 s

58°C 30 s                      60°C 30 s

68°C 5 min                      68°C 5 min

5 Zyklen                              25 Zyklen

-für H1.4 DNA Amplifikation:

95°C 5 min

51,5°C 2 min 30 s

68°C 8 min

35 Zyklen

-für H1.X DNA Amplifikation:

94°C 1 min dann 94°C 30 s

56°C 2 min 56°C 2 min

72°C 4 min 72°C 4 min

5 Zyklen 30 Zyklen.

H1.1, H1.4 und H1.X DNA wurden mittels Expand™ Long Template PCR System und Puffer Nr 2 amplifiziert. Es wurde 1,75 µl 10 mM dNTP pro 50 µl Reaktion verwendet und die 'hot start' Methode benutzt.

Das H1.1 Produkt (4,727 kb) enthielt sowohl den Promotor H1.1 wie auch der 3'UTR Sequenz des Histon H1 Gens und es wurde in der Schnittstelle *Ecl136* II des Vektors pUC18 inkloniert. Dann wurde es mit den Enzymen *EcoR* I und *Stu* I ausgeschnitten und in pEGFP-N1 Vektor in *EcoR* I und *Sma* I Schnittstellen umklont. Die *Stu* I Schnittstelle des H1.1 Gens wurde mit der *Sma* I Schnittstelle vom pEGFP-N1 Vektor verbunden. Durch diese Umklonierung wurde 486 bp vom 4,727 kb H1.1 Produkt abgeschnitten. Das *H1.1::gfp* Konstrukt enthielt deshalb nicht die 3'UTR Sequenz und das Stopcodon.

Es wurde auch ein zweites Konstrukt *H1.1::gfp::CeH1.1 3'UTR* konstruiert (von T. Kurz), wo die kodierende GFP-Protein-Sequenz mit den Enzymen *Sma* I und *Not* I aus dem pEGFP-N1 Vektor ausgeschnitten wurde und in pSK Vektor in den *Sma* I und *Not* I Schnittstellen inkloniert wurde. Dann wurde die GFP-Sequenz mit den Enzymen *Sma* I und *Ecl136* II aus dem pSK Vektor ausgeschnitten und in H1.1 pUC18 Plasmid in der dephosphorylierten *Stu* I Schnittstelle inkloniert. Die *Stu* I Schnittstelle des H1.1 pUC18 Plasmides wurde mit den *Sma* I und *Ecl136* II Schnittstellen vom pSK Vektor verbunden.

Das H1.4 Produkt (3,2 kb) wurde in der Schnittstelle *Ecl136* II des Vektors pUC18 inkloniert und mit den Enzymen *Kpn* I und *Stu* I ausgeschnitten und in pEGFP-N1 zwischen den Schnittstellen *Kpn* I und *Sma* I inkloniert. Die *Stu* I Schnittstelle des H1.4 Gens wurde mit der *Sma* I Schnittstelle vom pEGFP-N1 Vektor verbunden.

Das *H1.4::gfp* Konstrukt besaß weder das Stopcodon noch die 3'-nicht kodierende Fragment (3'UTR) von *C. elegans*.

Das H1.X Produkt (3,8 kb) wurde in der *Ecl136* II Schnittstelle des pUC18 Vektors inkloniert und dann mit *BamH* I ausgeschnitten und in dem dephosphorierten Vektor pEGFP-N1 inkloniert.

Alle Konstrukten wurden sequenziert, um zu prüfen, ob der korrekte Leserahmen entstanden war.

## 2.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung der rekombinanten H1 Proteine

Um die rekombinanten Histone H1 Proteine herzustellen, mußte das Startcodon in eine *Nde* I Schnittstelle umgewandelt werden. Dies geschah durch PCR-Mutagenese mit den folgenden primern:

für H1.1 mit primer ASMG08

5' TTGCCCATCCATATGTGTGATCCGCTGTTGTTG 3',

für H1.2 mit primer ESMG31 5' GGATCCAGCATATGTCTGACGTCACCGTTG 3',

für H1.3 mit primer ESMG32 5' GGATCCAGCATATGTCCGACACCGTCGTTG 3',

für H1.4 und H1.5 mit primer ESMG33

5' GGATCCAGCATATGTCTGACGTCGCCGTTG 3',

für H1.Q cDNA mit primer ESMG49

5' GGATCCAGCATATGGCCGCGTCCAAAAAGC 3' und jeweils mit einem zweiten primer ExUniForward

5' TGAATTCGGATCCGACTCACTATAGGG 3'.

Bei Proteinen, gegen die Antikörper hergestellt werden sollten, wurden zusätzlich ein Cystein-Kodon mit primer ESMG62 (für H1.4)

5' GGATCCAGCATATGTGTTCTGACGTCGCCGTTG 3' und

ESMG54 (für H1.X Protein mit den letzten 101 Aminosäureresten der C-terminalen Domäne) 5' GGAATTCCATATGTCAGAAGTTCGTCAGAAGCTGG 3'

eingefügt. Das PCR-Produkt von jeder H1-Isoform wurde (außer dem Histon H1.X) in der Schnittstelle *Ecl136* II des Vektors pUC18 inkloniert und dann wieder in pET3a Vektor in den Schnittstellen *Nde* I und *EcoR* I umkloniert.

Die H1.X cDNA (die C-terminale Domäne) wurde in den Schnittstellen *Nde* I und *Hind* III des pET3a Vektors kloniert.

Die hergestellten Plasmide wurden in kompetenten Zellen *E. coli* BL21(DE3) transformiert und auf Ampicillin-Platten ausplattiert. Eine Kolonie wurde benutzt, um die Übernachtskultur (5 ml LB in einem Röhrchen) anzuimpfen. Am nächsten Tag wurden 2 ml von dieser Übernachtskultur in 200 ml LB (in einem 1000 ml-Erlenmeyerkolben) mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Das H1.2 Plasmid-Konstrukt, das sehr schlecht in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert wurde, wurde zuerst auf Ampicillin-Platten ausplattiert, über Nacht bei + 37°C inkubiert und dann mit einer Impföse als Tagkultur angeimpft. Die Tagkultur wurde bei + 37°C im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Die Kultur wurde ohne Unterbrechung bis OD 600 nm = 0,4 wachsen gelassen (ca. 3 bis 4 h); anschließend wurde 1 mM IPTG zugegeben um die bakterielle Expression zu induzieren. Nach weiteren 2 h bei + 37°C Schütteln wurden die Kolben auf wäßriges Eis (zum Schutz gegen Proteindegradation) gestellt und die Zellen in der vorgekühlten Hettich-Zentrifuge 10 min mit 5000 x g bei + 4°C abzentrifugiert. Die Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet noch einmal 1 min mit 5000 x g bei + 4°C abzentrifugiert, um das restliche LB-Medium abzutrennen. Das Pellet von allen H1-Isoformen (auch H1.X-101) wurde in 5% PCA (Endkonzentration) schnell und gründlich mit einer 1 ml Pipettenspitze auf Eis resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff 3 mal eingefroren und im Wasserbad bei + 37°C wieder aufgetaut. Die resuspendierte Zellen sollten nicht über + 4°C erwärmt werden. Das Suspendat wurde in vorgekühlter Eppendorf-Zentrifuge 1 min 12000 x g abzentrifugiert, der klare Überstand abgenommen und konzentrierte HCl (Endkonzentration 350 mM; 1/37 des Volumens) zugegeben. Dieser Schritt war bei TCA-Fällungen nicht nötig. Das Protein wurde aus dem klaren Überstand entweder mit 3,5 Vol. Aceton über Nacht bei - 20°C oder mit ¼ Volumen 100% TCA über Nacht bei + 4°C gefällt, dann in der vorgekühlten Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Um die Säure zu entfernen, wurde das Pellet 3 mal mit kaltem Aceton (- 20°C) gewaschen und am Ende im Wasser gelöst.



### 2.3.2 Gewinnung der Antiseren und Antikörper

Als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen wurde das gesamte rekombinante H1.4-Protein, der COOH-terminale Bereich des H1.X-Proteins ( $\alpha$ H1.X-101) und Peptid Glu-Leu-Arg-Thr-Gly-Thr-Arg-Lys-Ser-Tyr ( $\alpha$ H1.X-11) (von P. Claus) verwendet. Das synthetische Peptid wurde mit Hemocyanin gekoppelt. Hemocyanin wurde auch als Antigen für dieses synthetische Peptid verwendet.

Die Proteine wurden für die jeweils erste Injektion der Kaninchen in 1 ml PBS aufgenommen. Auch die zweite Injektion erfolgte mit 0,5-1 mg Protein. Die 3. und 4. Injektion erfolgte mit ca. 1 mg Protein. Die vier Injektionen wurden im Abstand von einem Monat gegeben. Die Antigen-Injektionen und die Blutentnahmen wurden von der Fa. Charles River (Kisslegg, Deutschland) durchgeführt. Von der zweiten Injektion an wurde Testblut je 10 Tage nach jeder Injektion abgenommen. Die Injektionen erfolgten alle subcutan und die Blutentnahmen aus einer Ohrvene (1-3 ml). Nach dot-blots Untersuchungen dieser Seren wurden die Kaninchen getötet und ausgeblutet. Das Serum der Tieren wurde aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.3.3 Reinigung der Immunglobulin G-Fractionen

Die Immunglobulin G(IgG) Fraktionen wurden mit Hilfe einer Sephadex SG-25 Säule und einem MabTrap GII Kit (Pharmacia) gereinigt. Die Sephadex SG-25 Säule wurde zur Entfernung von störenden Lipiden des Serums benutzt. Eine 5 ml Säule wurde mit PBS äquilibriert und mit Serum - 1:1 verdünnt mit PBS - beladen. Es wurde 2 ml Eluat gesammelt und anschließend mit dem MabTrap GII Kit aufgearbeitet. Das Eluat wurde mit Bindungspuffer 1:1 verdünnt und auf die HiTrap-Affinitäts-Protein G-Säule (gehört zum MabTrap GII Kit, Pharmacia) aufgetragen. Protein G ist ein 30-35 kDa-Protein, das aus der Zellwand von beta-hämolytischen Streptococccen der C- oder G-Stämme gereinigt werden konnte (HARLOW und LANE, 1988). Dieses Protein bindet mit hoher Affinität IgG-Moleküle aus dem Serum. Vor der Beladung wurde die HiTrap-Affinitäts-Protein-G-Säule mit sterilem Wasser gewaschen und mit Bindungspuffer äquilibriert. IgG wurden mit 10 ml Elutionspuffer in 1 ml/ Fraktion eluiert, die Proteinkonzentration bei 280 nm bestimmt und das Eluat mit je 40  $\mu\text{l}$  TRIS/HCl (1 M, pH 9,5) pro 1 ml-Fraktion auf neutralen pH-

Wert gebracht. Vor erneuter Verwendung wurden die Säulen mit 5 ml des Bindungspuffer und dann mit 10 ml 20% Ethanol gewaschen. Die Säulen wurden in 20% Ethanol aufbewahrt. Die Konzentration der IgG-Moleküle in den gesammelten Fraktionen wurde spektrophotometrisch bei 280 nm bestimmt. Eine OD bei 280 nm von 1,3 entspricht 1 mg/ml IgG Konzentration in der Probe (HARLOW und LANE, 1988).

### **2.3.4 Reinigung der polyklonalen Antikörper durch Affinitätschromatographie**

Folgende Schritte mußten durchgeführt werden, um die Proteine an die SulfoLink-Matrix zu koppeln: Kopplung des rekombinanten Proteins (HPLC gereinigt: H1.1, H1.4, H1.X-101) an das Gel, Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen des Gels und Waschen der Säulen. Erst nach diesen Vorbereitungen wurden die Antikörper über die Säulen gereinigt. Den Proteinen (rekombinantes H1.4, H1.1 und H1.X-101) wurde zu diesem Zweck ein Cysteinrest durch PCR-Mutagenese angehängt und über Cystein-Thiolgruppen an die Säulenmatrix gekoppelt (jeweils 1 - 2 mg von jedem Protein). Unbesetzte Bindungsstellen wurden mit einer 0,05 M Cysteinlösung blockiert. Die Jodacetatgruppen sind die reaktiven Gruppen des SulfoLink-Gels und an diese Gruppe kann ein Protein mit einer Thiogruppe (SH-R) gekoppelt werden. Dabei wird die Thiogruppe reduziert und es entsteht Jodwasserstoff (HJ). Da es sich um einen polyklonalen Antikörper aus einem mit H1.4 immunisierten Kaninchen handelte, enthielt das Serum viele mit anderen H1-Isoformen kreuzreaktive Antikörper. Zur Reinigung von spezifischen H1.4-Antikörpern wurde zuerst eine Affinitätsreinigung an einer H1.1-Säule vorgenommen, wobei die kreuzreaktiven Antikörper an die Matrix (in diesem Fall immobilisiertes H1.1) binden konnten. Zur weiteren Anreicherung der H1.4-bindenden Antikörper wurde das Eluat der H1.1 Säule über eine Säule mit immobilisiertem H1.4 geschickt. Nach der Elution erhielt man H1.4-bindende Antikörper mit einer minimalen H1.1-Kreuzreaktivität.

Um maximalkreuzreaktive Anti-H1-Antikörper zu erhalten, wurde eine einstufige Affinitätsreinigung durch eine Säule mit immobilisiertem H1.1 bzw. H1.X-101 vorgenommen.

Nach der Vorreinigung (HiTrap-Affinitäts-Protein G-Säule) wurden die IgG 1:1 mit PBS verdünnt, auf die mit entsprechendem Protein gekoppelte SulfoLink Säule aufgetragen und

mit Glycin (0,1 M, pH 2,8) eluiert. Zu den gesammelten Fraktionen (1 ml) wurden je 40  $\mu$ l TRIS/HCl (1 M, pH 9,5) gegeben und die Konzentration der Antikörper bei 280 nm bestimmt (HARLOW und LANE, 1988). Nach jeder Antikörperreinigung wurde die Säule mit 16 ml PBS gewaschen und bei + 4°C in 0,05% NaN<sub>3</sub> in PBS (entgast) aufbewahrt.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und gegen 1 x PBS dialysiert, dann aliquotiert und bei – 80°C aufbewahrt.

### **2.3.5 'Reversed-Phase' HPLC-Trennungen**

Die Reinigung der H1-Protein-Isoformen erfolgte mit einer Reversed-Phase HPLC 300 SB C18-Säule (4,6 mm innerer Durchmesser x 250 mm, Dupont-Zorbax) mit einem Acetonitril-Gradienten in 0,1% Trifluoressigsäure (Lsg. A : 0,1% TFA im Wasser; Lsg. B : 70% Acetonitril mit 0,1% TFA im Wasser; Gradient : 0 min, 0% B; 10 min, 25% B; 60 min, 67% B). Die Proben wurden erst auf die Säule aufgetragen, nachdem DTT (Endkonzentration 10 mM) hinzugefügt worden war, um die Proteine zu reduzieren und Dimere zu trennen. Die Flussrate betrug 1,4 ml/min. Die Proteine wurden mit einem UV-Spektraldiodendetektor bei 210 nm oder 226 nm (SM 5000, LDC) detektiert. Die Proben wurden in der Vacuumzentrifuge entgast und gefriergetrocknet.

### **2.3.6 SDS-PAGE-Gelelektrophorese**

Die Trennung der Proteine erfolgte mit dem SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System nach LAEMMLI (LAEMMLI, 1970) in 12,0% Acrylamid-Gelen (Midget-Gele: 1,5 mm dick mit ca. 7 cm Trennstrecke) oder bzw. 15% SDS-Polyacrylamid-Gelen (bessere Trennung der Proteine, Dicke 0,75 cm, Trennstrecke 13 cm).

Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt und in die Halterung gesetzt. Zum Giessen des Trenngels wurden 4,68 ml (bzw. 13,5 ml) Acrylamidlösung (39,9 g Acrylamid und 1,1 g N',N'-Methylenbisacrylamid ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O), 2,49 ml (bzw. 12 ml) Trenngelpuffer (13,6 g TRIS/HCl, 0,3 g SDS ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O, pH 8,8) und 4,53 ml (bzw. 10,5 ml) H<sub>2</sub>O gemischt, 5 min entgast, 5,8  $\mu$ l (bzw. 9  $\mu$ l) N,N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und 12,3  $\mu$ l (bzw. 90  $\mu$ l) 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) hinzugegeben, gegossen und mit H<sub>2</sub>O überschichtet.

Die Sammelgel-Lösung (5%) wurde gemischt aus 0,8 ml (bzw. 2,6 ml) Acrylamidlösung, 0,5 ml (bzw. 2 ml) Sammelgelpuffer (4,54 g TRIS/HCl, pH 6,8), 0,6 g SDS ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O, 3,6 ml (bzw. 7,4 ml) H<sub>2</sub>O, 3 µl (bzw. 5 µl) TEMED und 5 µl (bzw. 60 µl) 10% APS. Gel-Lösungen im Gießblock wurden mit Butanol-gesättigtem Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurden die Geltaschen mit Elektrodenpuffer (15,15 g Tris; 72,05 g Glycin, 5 g SDS, pH 8,3 ad 5 l mit H<sub>2</sub>O) gespült und die Proben mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen.

Alle Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer verdünnt (4 ml Sammelgelpuffer; 2 ml 50 % (v/v) Glycerin; 0,12 g SDS; 0,5 mg Bromphenolblau, 300 µl β-Mercaptoethanol) und 3 min gekocht. Die Trennung erfolgte bei konstanter Stromstärke im Sammelgel bei 10 mA, im Trenngel bei 20 mA/200 V mit einer Kühlung bei konst. auf + 10°C. Nach einer Stunde (bzw. 6 h) wurde das fertige Gel in 2 Teile geteilt, jeder Teil war mit den gleichen Proben beladen. Ein Teil wurde für Protein-blotting verwendet. Der Nachweis der Proteine im zweiten Teil des Gels erfolgte mit Anfärbung durch Coomassie Brilliant Blue R250 (0,2 g Coomassie Blue R250 in 45 ml H<sub>2</sub>O/ 45 ml Methanol/ 10 ml Eisessig) für eine Stunde auf dem Schüttler. Entfärbt wurde mit Entfärber - Lösung (10% Eisessig/ 20% Methanol/ 70% H<sub>2</sub>O) über Nacht auf dem Schüttler.

Als Molekulargewichtsstandard wurde mid-range protein molecular weight markers, 14,4 – 97,4 kDa (Fa. Promega) verwendet.

### **2.3.7 Analyse der Antikörper durch den dot-blot und den western-blot**

Um die Spezifität den polyklonalen Antikörpern nachzuweisen, wurden alle H1- Isoformen und BSA als Kontrolle auf Nitrocellulosestreifen (0,2 µm, Sartorius SM 11307) von 8 x 0,5 cm Größe in einer Konzentration von 100 ng/ 1 µl aufgetragen. Die Streifen wurden einzeln in Plastikschrälchen gegeben und während der folgenden Wasch- und Färbeschritte ununterbrochen auf einer Wippe bewegt. Die Streifen wurden 2 mal 5 min mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und anschließend 30 min in 1% BSA in PBS inkubiert. Als 1. Antikörper wurde ein affinitätsgereinigter Antikörper in verschiedenen Mengen (zwischen 0,03-5,0 µg) eingesetzt. Die Nitrocellulosestreifen wurden mit dem 1. Antikörper in PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20 über Nacht bei + 4°C inkubiert. Dann folgten mehrere Waschschriffe: 1 x 10 min mit 2 ml PBS und 2 x 20 min in PBS mit 0,3% BSA, 0,05% Tween-20 inkubiert.

Der 2. Antikörper – (Anti-Rabbit IgG-whole molecule) mit alkalischer-Phosphatase (Sigma, A-3687) gekoppelt – wurde in einer Verdünnung von 1:3000 mit PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20 eingesetzt und 1 h mit Nitrocellulosestreifen bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3 mal 10 min mit 2 ml PBS, 0,3% BSA, 0,05% Tween-20, einmal mit 2 ml PBS 10 min und einmal 10 min in 2 ml NBT-Puffer (10 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) gewaschen. Für den Nachweis der alkalischen Phosphatase wurde eine Farbreaktion durchgeführt: die Reaktion erfolgte in je 2 ml NBT-Puffer, dazu wurden 4 µl NBT (50 mg/ml in 70% DMF) und 3 µl BCIP (50 mg/ml in 100% DMF) pro 1 ml NBT-Puffer gegeben. Die Färbung wurde nach ca. 5 min sichtbar und wurde durch Entfernen der Farblösung und Zugabe von Wasser und EDTA (0,25 M, pH 7,5) gestoppt. Für die Durchführung von western-blots wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf Nitrocellulose übertragen. Der Transfer erfolgte entweder mit einem semi-dry-Blotgerät (Fa. Sartorius ) oder in der Naßkammer (Fa. Serva) bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> 1 h bei RT. Die Blot-Einheit hatte folgenden Aufbau: zwei Lagen Blotting-Papier (Schleicher und Schüll, GB 003) in Kathodenpuffer (25 mM TRIS, 40 mM Aminocaprinsäure (Fa. Sigma, A-2504), 20% Methanol, 0,1% SDS, pH 9,4) getränkt und auf die Kathode gelegt, das SDS-Gel, die Nitrocellulosefolie – gespült mit dest. H<sub>2</sub>O – eine Lage Blotting-Papier getränkt in Anodenpuffer II (25 mM TRIS, 20% Methanol, 0,1% SDS, pH 10,4) und eine Lage Blotting-Papier, getränkt in Anodenpuffer I (0,3 M TRIS, 20% Methanol, 0,1% SDS, pH 10,4). Die überschüssige Pufferlösung wurde mit Filterpapier aufgenommen, die Anodenplatte aufgelegt und der Transfer gestartet. Für den Transfer in der Naßkammer wurde die Nitrocellulose in sterilem H<sub>2</sub>O, dann in Towbin-Puffer gespült und auf Blotting-Papier, das mit Towbin-Puffer getränkt war gelegt. Dann wurde das Gel auf die Nitrocellulose gelegt und anschließend die zweite Lage Blotting Papier in Towbin Puffer getränkt. Alle Lagen wurden zwischen 2 Gittern fixiert und in der Naßkammer, die mit Towbin Puffer gefüllt wurde, so gesteckt, daß keine Blasen zwischen dem Gel Blotting Papier und Gitter entstanden waren. Nach 1 h Transfer bei 1 mA/ cm<sup>2</sup> wurde die NC-Membran zuerst in dest. Wasser dann in Ponceau S8 (5% in 1% Essigsäure) gefärbt, zur quantitativen Überprüfung des Blot-Verfahrens. Danach wurde die NC-Membran sorgfältig in H<sub>2</sub>O gewaschen, bzw. mit 0,01 M NaOH entfärbt. Der blot wurde 1 h mit blocking-Puffer inkubiert, dann 4 mal 5 min mit Waschpuffer gespült und mit dem 1. Antikörper in blocking-Puffer 1 h bei RT oder + 4°C über Nacht

inkubiert. Die Konzentrationen der 1. Antikörper werden im Teil Ergebnisse beschrieben. Die NC-Membran (der blot) wurde wieder 4 mal 5 min mit Waschpuffer gewaschen, gespült und mit dem 2. Antikörper ('HRP-conj. secondary antibody BIOLABS') 1 h bei RT in blocking-Puffer in der Verdünnung 1:5000 inkubiert. Danach wurde der Blot (wie oben) mit Waschpuffer gewaschen und gespült. Um die Reaktivität und Spezifität des 1. Antikörpers nachzuweisen, wurde die NC-Membran nach dem letztem Waschschrift sehr kurz mit blotting-Papier trockengetupft und 1 min in folgender Lösung:  
9,4 ml H<sub>2</sub>O + 0,4 ml LUMIGLO (BIOLABS) + 0,4 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BIOLABS)  
unter Schütteln inkubiert, mit blotting-Papier abgetupft, sofort in Folie verpackt und in eine Film-Kassette eingelegt. Der Blot wurde 30 s bis 2 min auf einem Reflection TM NEF-485-Film (Kodak) exponiert.

## **2.4 *Caenorhabditis elegans***

### **2.4.1 Umgang mit *C. elegans***

#### **2.4.1.1 Vorbereitung der Platten**

*Caenorhabditis elegans* wurde auf NGM Platten, beschichtet mit *E. coli* OP50, kultiviert (BRENNER, 1974). Die *E. coli* OP50 wurden in LB-Rörchen angeimpft und über Nacht bei + 37°C bei 220 rpm im Schüttler inkubiert, dann auf NGM-Platten ausplattiert und entweder 5 h bei + 37°C wachsen gelassen oder den ganzen Tag bei RT. Die *C. elegans* wurden auf die Platten gesetzt und bei verschiedenen Temperaturen (abhängig vom Stamm) gehalten.

#### **2.4.1.2 Dekontamination von *C. elegans***

Kontaminierte Würmer mußten gereinigt werden. Es wurden neue Platten, beschichtet mit OP50 genommen und an den Rand, wo keine *E. coli* OP50 wachsen, wurde bleaching solution – 5 µl 2 M NaOH mit 5 µl NaClO in H<sub>2</sub>O (13% Cl, höchstens 6 Monate alt) – gegeben und dazu die kontaminierten, adulten Hermaphroditen. Nur die Embryonen konnten überleben und durch diese wurde eine neue Population entwickelt.

### 2.4.1.3 Aufbewahrung von *C. elegans*

Die NGM-Platten, gut bewachsen mit *C. elegans*, wurden mit 1 ml M9 Puffer und 1 ml Einfrierlösung (Freezing-Lösung: 5,85 g NaCl, 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 g Glycerin, 1 M NaOH mit H<sub>2</sub>O ad 1 l, autoklavieren) gespült und die Wurm suspension mit einer 1 ml Pipettenspitze in 1,5 ml-Eppendorfgefäße übertragen. Die beschrifteten Eppendorfgefäße wurden in einer Styropor-Einfrierbox während 24 h bei – 80°C Turm eingefroren. Zur Kontrolle wurde ein Eppendorfgefäß aufgetaut und die Würmer auf partiell mit *E. coli* OP50 beschichteten NGM- Platten unter der Sterilbank übertragen. Die Platten wurden bei verschiedenen Temperaturen (abhängig vom Stamm) gelagert und es wurde laufend beobachtet, ob die Würmer sich entwickeln und auf die andere Hälfte der Platte kriechen würden. Von diesem Teil wurde ein Stück NGM-Agar mit lebendigen Würmern ausgeschnitten und auf eine neue Platte umgesetzt. Falls die Würmer sich nicht weiter entwickelten, mußte die ganze Prozedur noch einmal wiederholt werden. Die eingefrorenen, lebende Tiere wurden weiter bei – 80°C aufbewahrt und aufgetaut, wenn sie gebraucht wurden.

### 2.4.1.4 dsRNA Interferenz durch Fütterung mit *E. coli*

Um den Phänotyp nach dsRNA-Injektion zu steigern, wurde eine neue Methode angewandt (TIMMONS, pers. Mittlg.). Das Konstrukt, aus dem dsRNA hergestellt worden war, wurde in ein Plasmid mit T7-Promotoren aus den beiden Seiten (entweder T7T7 Plasmid oder 'L4440 cloning vector') umkloniert und zuerst in DH5 $\alpha$  und dann in BL21(DE3) oder HT115(DE3) transformiert und auf Ampicillin oder Tetracyclin/Ampicillin-Platten ausplattiert. Es wurden auch die NGM-Platten mit Ampicillin (50  $\mu$ g/ml), Tetracyclin (12,5  $\mu$ g/ml) und IPTG (0,4 mM) vorbereitet. Die Kolonie mit dem Konstrukt in BL21(DE3) oder HT115(DE3) wurde in 5 ml LB mit Ampicillin oder Ampicillin/Tetracyclin angeimpft und über Nacht bei + 37°C im Schüttler inkubiert. 1 ml von dieser Übernachtskultur wurde in 100 ml 2 x YT mit Ampicillin/Tetracyclin dazugegeben und bis OD 595 nm = 0,4 wachsen gelassen. Dann wurde sterile IPTG-Lösung zugefügt (Endkonzentration 0,4 mM) und 4 h bei + 37°C geschüttelt. Am Ende wurden Ampicillin (100  $\mu$ g/ml), Tetracyclin (12,5  $\mu$ g/ml) und IPTG (0,8 mM Endkonzentration) dazugegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert

und auf NGM-Platten mit IPTG ausplattiert und unter der Sterilbank getrocknet. *C. elegans*, denen die entsprechende, doppelsträngige RNA injiziert worden war, wurden auf diese Platten umgesetzt. Diese Methode ist effizienter als die Methode, bei der man sofort die Übernachtskultur aus den Ampicillin-Platten in M9 Puffer resuspendiert und auf den NGM-Platten mit IPTG und Ampicillin ausplattiert und 2 h bei + 37°C wachsen läßt.

## 2.4.2 Herstellung der transgenen *C. elegans* Stämme

### 2.4.2.1 Herstellung des Stammes EC107 (*let-858::gfp*) für die Beobachtung der Derepression in Keimbahnzellen

Der Reporter-Stamm pBK48 wurde nach KELLY und FIRE (KELLY und FIRE, 1998) konstruiert. Das *let-858::gfp*-Reporter-Plasmid wurde zusammen mit dem Marker-Plasmid pBX, das ein natives *pha-1*-Gen trägt, in *pha-1(e2123)*-Hintergrund (SCHNABEL und SCHNABEL, 1990; GRANATO et al., 1994) injiziert. Der Stamm *pha-1(e2123)* alleine vermehrt sich bei + 25°C nicht weiter. Mit nativem Gen *pha-1* wächst er normal bei + 25°C. Die bei + 25°C überlebenden Würmer tragen beide Gene – natives *pha-1* und *let-858::gfp*, die überall, in allen somatischen Zellkernen exprimiert sind, aber nicht in den Zellkernen von Keimbahnzellen.

In diesen Stamm (EC107) wurde dsRNA von allen H1-Isoformen injiziert. Für die Beobachtung der Derepression in Keimbahnzellen von Männchen wurde der EC107 Stamm mit *him-8(e-1489)* gekreuzt.

### 2.4.2.2 Mikroinjektion von *C. elegans* und die Herstellung der transgenen Tiere

Den adulten Hermaphroditen oder Würmern im L4 Stadium wurde pRF4 Marker (*rol-6* (su1006)); KRAMER et al., 1990) oder *HMGI.β::gfp* (von T. KURZ) mit der Konzentration von 80-90 ng/µl mit einem Konstrukt in pEGFP-N1 (10-20 ng/µl) in eine oder beide Gonaden co-injiziert.

Für die Mikroinjektion wurde DNA über Säulen (Fa. Qiagen oder Machery&Nagel, AX 100) gereinigt, um möglichst saubere DNA herzustellen.

Das Konstrukt wurde mit dem Marker im M9 Puffer gemischt und für lange Injektionstage auf Eis gestellt, um die DNase-Aktivität zu minimieren.



Einen Tag vorher wurden die Agarose-Pads für die Würmer vorbereitet. Die Deckgläser (24 x 40 mm; Fa. Menzel-Gläser) wurden ausgelegt; 0,15-2% Agarose (NEEO Ultra-Qualität, Art. 2267.4, Fa. Roth) wurde in H<sub>2</sub>O aufgeköcht und möglichst schnell mit einer 1 ml Pipettenspitze auf die Deckgläser getropft und über Nacht bei RT gelassen. Die Pads können bis zu einem Monat aufbewahrt werden. Die Glaskapillaren für die Mikroinjektion (Borosilikatglas, 1,0 mm Dicke, Innendurchmesser 0,75 mm, mit Filament; Fa. Hilgenberg, Art. 14 052 01) wurden an einem Gerät der Fa. Sutter Instrument Co., Model P-87 (Flamig/Brown Micropipette Puller) gezogen. Es wurden zwei verschiedene Programme benutzt, abhängig davon, welche Sorte von Mikrokapillaren (lang und spitz oder kurz) für die Injektion benötigt wurde.

Die Programme:

01 Heat=900, Pull=70, Vel=50, Time=250

02 Heat=800, Pull=85, Vel=60, Time=100

und

01 Heat=900, Pull=75, Vel=50, Time=250

02 Heat=800, Pull=95, Vel=60, Time=100

Die gezogenen Nadeln wurden zum Schutz vor Staub in Petrischalen aufbewahrt. Vor der Injektion wurden die Kapillaren mit 'Microloadern' (Fa. Eppendorf, Art. 5242 956.003) von hinten mit DNA (1-3 µl) beladen. Die evt. entstandenen Blasen wurden vorsichtig ausgeschüttelt, die beladene Nadel in einen Nadelhalter eingesetzt und zur Objektivmitte hin justiert. Die jungen adulten Hermaphroditen oder L4 Stadien (geben bessere Ausbeute, sind aber anfälliger gegen postoperativen Tod) wurden für die Mikroinjektion ausgewählt und in einem Tropfen Mineralöl (Sigma) auf die vorbereiteten Agarose-Pads gelegt. Die Mikroskopoptik wurde justiert, der Polarisator im Strahlengang eingestellt und es wurde das Objektiv 5 x ausgewählt, das Deckglas mit dem Wurm auf dem Agarose-Pad in den Strahlengang geschoben und scharfgestellt. Die Nadel wurde zum Wurm hin justiert. Dann wurde das Objektiv auf 40 x umgeschaltet, auf die Wurmgonaden scharfgestellt und die Nadelspitze in die Gonade eingeführt. Dann wurde die 'Druckpistole' gedrückt (3 hPa Druck) und der Inhalt der Nadel in die Gonaden eingespritzt. Falls keine Flüssigkeit aus der Nadel austrat, wurde sie mehrmals eingestochen oder mit Hochdruck durchgeblasen.

Es wurde in eine oder beide Gonaden injiziert. Nach der Injektion wurde der Wurm sofort mit einem Tropf M9 Puffer rehydriert, 5-10 min gewartet bis der injizierte Wurm sich bewegt und auf NGM-Platten (mit OP50 beschichtet) umgesetzt. Abhängig vom Stamm wurde der Wurm im Brutschrank bei + 16, + 25 oder + 20°C weiter gezüchtet, jeden Tag beobachtet und auf eine neue Platte umgesetzt, wenn er viel Nachkommen produziert hatte. Die Würmer (F1), die rollen und Fluoreszenz unter dem Fluoreszenz Binokular zeigten, wurden einzeln auf eine Platte umgesetzt. Von den Wümmern (F2) wurden die transgenen Linien entstanden. Bei 'guten' transgenen Linien wurden mehr als 10% transgene Würmer produziert.

Bei der dsRNA-Injektion (der Konzentration von 5 mg/ml) wurde dasselbe Vorfahren angewandt; die dsRNA die ganze Zeit auf Eis gestellt und die injizierten Würmer auf einzelne Platten gesetzt und entweder nach 6, 12 oder 24 h auf eine neue Platte umgesetzt. Es wurde sorgfältig F1 (Embryonen, Phänotyp, Bewegung, Verhalten) beobachtet. Es wurde auch F2 beobachtet, aber nie ein Effekt nach der dsRNA-Injektion beobachtet.

#### **2.4.2.3 Injektion von linearisiertem Marker-pRF4 (*rol-6*), *H1.X::gfp* und genomischer DNA**

Um die Expression von H1.X in den Keimbahnzellen (auch in Oocyten und Spermien) zu beobachten, wurde eine neue Methode – die sogenannte 'Keimbahntechnik' (FIRE, <http://ciw1.ciwemb.edu>) - angewandt. Die genomische DNA aus *Caenorhabditis elegans* wurde nach dem Protokoll von R. PLASTERK isoliert. Die verschiedenen DNAs wurden 'blunt-end' geschnitten: genomische DNA (1,2 mg/ml) mit Enzym *Pvu* II (~ 200 units) 6 h (Endvolumen: 360 µl), Marker pRF4 (*rol-6*) (0,75 mg/ml) mit Enzym *Sca* I 3 h und das Konstrukt *H1.X::gfp* (0,7 mg/ml) mit *Stu* I 3 h (alles bei + 37°C). Danach wurden 20 µl 20% SDS, 10 µl 0,5 M EDTA, pH 7,5 und 20 µl Protease K (20 mg/ml in TE, pH 7,4) dazugegeben. Die Komponenten wurden auch zu den anderen Verdau-Ansätzen gegeben (entsprechend dem Endvolumen); inkubiert wurde 2 h bei + 65°C und am Ende wurden 40 µl 10 M (für genomische DNA, für andere entsprechend dem Endvolumen) Ammoniumacetat gegeben. Danach wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und die DNA durch das Wizard DNA Clean-Up System (Promega) gereinigt, um kleine RNA-Fragmente zu entfernen. Mit einem Agarose-Gel wurde der Verdau überprüft und die Konzentration bestimmt. Die DNAs hatten folgende Konzentrationen:

50 µg/ml genom. DNA, 0,5 µg/ml pRF4, 1,9 µg/ml *H1.X::gfp* und wurden in beide Gonaden von jungen Hermaphroditen oder L4 Stadium injiziert.

### 2.4.3 'Screening' der Deletionsbibliothek von *C. elegans*

Es wurde in der EleGene GmbH (Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried) die Deletionsbibliothek auf Vorliegen der gesuchten Deletionsmutationen getestet. Wie die vollständige Deletionsbibliothek entstanden ist wurde nicht beschrieben (Geheimnis der Firma). Es wurde ca. 7000 nested PCRs durchgeführt (nur für den primären library screen), um den Deletionsmutant(-en) in der Original-Wurmkulturplatte zu indentifizieren.

Die primer wurden durch ein Program bestimmt ([www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) so, dass die Schmelztemperatur bei + 58°C war, typische PCR Produktgröße für äussere primer 3,5 kb, für innere ca. 3,0 kb. Es wurden 17 verschiedene primer und Deletionsbanken M1-8, M9-16, M17-24 getestet. Es wurden von jeder Deletionsbank (1 Modul) 96 DNA Proben (Pools) von jeweils etwa 4000 unterschiedlichen Tieren für nested PCR eingesetzt. Es wurde Taq Polymerase von der Fa. Boehringer Mannheim verwendet. Die amplifizierten Genabschnitte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert. In den Deletionsbanken M1-8 wurde mit den äußeren Primerpaar MJ05M/MJ11M und mit den inneren Primerpaar MJ09M/MJ10M 1 Hit gefunden, in M17-24 mit mit den äußeren Primerpaar MJ14M/MJ11M und mit den inneren Primerpaar MJ09M/MJ10M 1 Hit, in M1-8 mit mit den äußeren Primerpaar MJ12M/MJ11M und mit den inneren Primerpaar MJ12M/MJ02 2 Hits, in M17-24 mit den äußeren Primerpaar MJ12M/MJ15M und mit den inneren Primerpaar MJ16M/MJ17M 2 Hits. Unten sind die Sequenzen der primer angegeben:

MJ02M 5' CTTAATCCCATCGACCTCCA 3',

MJ05M 5' GAACAGTTGCCGATTTTCGAT 3',

MJ09M 5' GCGCTCATTTCTCACACTCA 3',

MJ10M 5' CTTTTCCCGCTGTGAACACT 3',

MJ11M 5' CGAAGTCATCCCCGAGAATA 3',

MJ12M 5' TTAATGGATCGCTCCCAAAG 3',

MJ14M 5' TCTTCAACGCGTCTGTCATC 3',

MJ15M 5' CTTCTTCAACAACGGCTTGC 3',

MJ16M 5' CGCGCAAATACCTTGTAGC 3',

MJ17M 5' GACAGTTCGAGAGCTCGAC 3'.

Die folgenden PCR-Programme wurden verwendet:

-für äußere primer MJ05M/MJ11M:

96°C 5 min    dann            92°C 20 s

56°C 1 min                    56°C 40 s

72°C 55 s                      72°C 1 min

5 Zyklen                      30 Zyklen , letzte 5 Zyklen 72°C 5 min

-für innere primer MJ09M/MJ10M:

96°C 5 min    dann            92°C 20 s

56°C 50 s                      56°C 30 s

72°C 30 s                      72°C 1 min

5 Zyklen                      30 Zyklen , letzte 5 Zyklen 72°C 2 min

Das erhaltene PCR-Produkt (Hit) war 800 bp lang

-für äußere primer MJ14M/MJ11M:

96°C 5 min    dann            92°C 20 s

56°C 50 s                      56°C 50 s

72°C 1 min 30 s                72°C 2 min

5 Zyklen                      30 Zyklen , letzte 5 Zyklen 72°C 5 min

-für innere primer MJ09M/MJ10M:

96°C 5 min    dann            92°C 20 s

56°C 50 s                      56°C 20 s

72°C 30 s                      72°C 1 min

5 Zyklen                      30 Zyklen , letzte 5 Zyklen 72°C 2 min

Das PCR-Produkt (Hit) war ca. 600 bp lang

-für äußere primer MJ12M/MJ11M:

96°C 5 min    dann            92°C 20 s

56°C 55 s                      56°C 30 s

72°C 1 min 10 s                72°C 2 min

5 Zyklen                      30 Zyklen

-für innere primer MJ12/MJ02:

96°C 5 min	dann	92°C 20 s
56°C 20 s		56°C 20 s
72°C 40 s		72°C 1 min
5 Zyklen		30 Zyklen , letzte 5 Zyklen 72°C 5 min

Das PCR-Produkt (Hit) war 1800 bp lang

-für äußere primer MJ12M/MJ15M:

96°C 5 min	dann	92°C 20 s
56°C 50 s		56°C 50 s
72°C 1 min 30 s		72°C 2 min
5 Zyklen		30 Zyklen , letzte 5 Zyklen 72°C 5 min

-für innere primer MJ16M/MJ17M:

96°C 5 min	dann	92°C 20 s
56°C 1 min		56°C 1 min
72°C 55 s		72°C 55 s
5 Zyklen		30 Zyklen , letzte 5 Zyklen 72°C 5 min

Die Größe der PCR-Produkte betrug 1200 bp und 1400 bp.

Die Wildtyp-Größe des entsprechenden Genabschnittes war ca. 3000 bp und die Größe des Genabschnittes bei einer Deletion wäre dann kleiner als 3000 bp (so genannte Treffer). Pro Gel wurden 96 Proben untersucht. Dann wurde zum Treffer gehörige Genomic Pools identifizieren. Ein genomischer Pool entspricht 2 x 96 wells der Original-Wurmkulturplatten und es wurden well-Lysate aus den beiden zugehörigen Wurmkulturplatten hergestellt. Es wurde pro Pool 4 ml Lysis-Puffer (20 mM TRIS, 50 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,5% SDS, pH 7,5) und Proteinase K (Stammlösung: 10 mg/ml in TE) zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml gegeben und gemischt. Die well-Lysate wurden 20 min bei - 80°C und dann 5 bis 6 h bei + 56°C inkubiert. Pro indentifiziertem Treffer wurde von je zwei Lysat-Platten durch nested PCR analysiert, um eine positive Probe von 2 x 96 Proben auszusuchen. In dieser Reaktion wurde aber kein Signal erhalten. In dieser Deletionsbibliothek wurde die Deletionsmutante leider nicht gefunden.

## 2.4.4 Präparation der Gesamt-DNA, -RNA und Proteine aus *C. elegans*

### 2.4.4.1 Isolierung der genomischen DNA

Die genomische DNA aus *Caenorhabditis elegans* wurde nach dem Protokoll von R. PLASTERK ([www.nki.nl/nkidep/h8/protocols/display.html](http://www.nki.nl/nkidep/h8/protocols/display.html)) isoliert. *C. elegans* (N2 - adulte Würmer) wurde von drei Platten (Durchmesser 9 cm) mit kaltem (+ 4°C) M9 Puffer ab gespült und 3 min bei 1500 x g im Eppendorfgefäß pelletiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet (ca. 100 - 200 µl) für weitere Zwecke entweder eingefroren oder es wurden 400 µl Lysis Puffer hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 30 min bei + 65°C inkubiert. Dann wurden 10 µl Proteinase K (10 mg/ml in TE, pH 7,4) hinzugegeben und 30 min bei + 65°C inkubiert. Nach 30 min wurden 5 µl RNase A (10 mg/ml in TE, pH 8,0) hinzugefügt und 30 min bei + 37°C inkubiert. Am Ende wurde eine Phenolextraktion durchgeführt: 500 µl TRIS-equilibriertes Phenol (pH 7,6 – 8,0) wurden dazugegeben, kräftig gemischt, 30 min bei RT gelassen, 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) hinzugefügt, alles kräftig ca. 30 min geschüttelt und nach 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt und nach weiteren 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und 500 µl Chloroform/Isoamylalcohol (96:4) wurden hinzugefügt, 30 min geschüttelt und nach 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und die DNA durch Zugabe von 1 ml 96% Ethanol (RT) über Nacht bei RT gefällt. Das Präzipitat wurde 15 min bei 12000 x g abzentrifugiert, mit 70% kaltem Ethanol (- 20°C) gewaschen, in der Vacuumzentrifuge getrocknet und in 200 µl sterilem Wasser gelöst (5 h bei RT). Die Konzentration wurde fotospektrometrisch bestimmt.

### 2.4.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus *C. elegans* wurde ein Protokoll von MACDONALD (MACDONALD et al., 1987) angewendet. Eine Kultur-Platte (Durchmesser 9 cm) mit adulten Würmern N2 (Wildtyp) wurde mit kaltem (+ 4°C) M9 Puffer ab gespült (Ausbeute: ca. 200 mg Würmer), 3 min bei 1500 x g abzentrifugiert, der Überstand dekantiert.

Ca. 200 µl Pellet wurden mit am Ende abgeschnittener Pipettenspitze (Vol. von 1 ml) in einen Mörser mit flüssigem Stickstoff übertragen, 1 ml 7,5 M Guanidinium-HCl mit frisch angesetztem DTT (Endkonzentration 10 mM) dazugegeben und homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 15 µl 35% Natrium-Lauryl-Sarcosinate versetzt, 1 min am Vortex gemischt und anschließend 5 min bei 5000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen, 50 µl 2 M KAcetat pH 5,5 und 80 µl 1 M Essigsäure hinzugefügt, gemischt und 0,5 ml Ethanol langsam unter ständigem Rühren am Vortex dazugegeben. Die langsame Zugabe von Ethanol minimalisiert die Präzipitation von DNA. Die RNA wurde 2 bis 16 h in kaltem Ethanol (- 20°C) gefällt, durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g gesammelt und das Pellet in 0,5 ml 7,5 M Guanidinium-HCl pH 7,0 (mit NaOH eingestellt), 10 mM DTT resuspendiert. Durch Zugabe von 25 µl 2 M KAcetat pH 5,5 und 250 µl Ethanol wurde die RNA 2 h bei - 20°C gefällt. Ab diesem Schritt wurden ausschließlich RNase-freie Materialien benutzt und ständig die Handschuhe gewechselt (RNA-Degradationsgefahr), die Pipettenspitzen, steriles H<sub>2</sub>O, Eppendorfgefäße wurden mit DEPC behandelt. Das Präzipitat wurde 10 min mit 10000 x g bei + 4°C abzentrifugiert, das RNA Pellet in kaltem Ethanol gewaschen, kurz bei 10000 x g zentrifugiert und in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA wurde mit 2 Vol. Chloroform/n-Butanol 4:1 für 5 min am Vortex nachextrahiert. Die wässrige Phase wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit 0,1 Vol. 2 M NaAcetat pH 7,0 und 2,5 Vol. Ethanol versetzt und die RNA 2 h bei - 20°C gefällt. Das Präzipitat wurde 30 min bei 10000 x g abzentrifugiert und das Pellet in DEPC-Wasser resuspendiert. Die Konzentration wurde im Spektralphotometer bei OD 260 nm und OD 280 nm gemessen und der Reinheitsgrad aus dem Verhältnis OD 260 nm : OD 280 nm (bei einem Wert von 1,9 bis 2,0 ist die RNA sauber) bestimmt. Am Ende wurde die RNA mit 0,1 Vol. 2 M NaAcetat pH 7,0 und 2,5 Vol. Ethanol repräzipitiert und bei - 80°C gelagert. Die RNA wurde für RT-PCR benutzt.

#### **2.4.4.3 Präparation der Gesamt-Proteine aus *C. elegans***

Das Gesamt-Protein aus *C. elegans* wurde mit zwei Methoden isoliert. Für die erste Methode wurden 2 bis 3 Platten Wildtyp N2 mit M9 Puffer gewaschen und im Mörser mit flüssigem Stickstoff, M9 Puffer und Extraktionspuffer (TRIS/HCl 20 mM, Glycerin 4 mM, SDS 1,66 mM, Bromphenolblau 29,9 µM, pH 6,8) homogenisiert. Das Verhältnis Würmer zu Puffer betrug 1,5 g : 1 ml. Die zweite Methode wurde nach EPSTEIN und LIU (EPSTEIN

und LIU, 1995) durchgeführt. Drei NGM-Platten mit adulten, nicht hungernden Tieren wurden mit M9 Puffer (+ 4°C) gespült und 3 bis 5 mal mit M9 gewaschen. Dann wurde das Pellet (ca. 150 - 250 µl) in Probenpuffer resuspendiert, 3 bis 5 min gekocht und die warme Lösung sofort auf die SDS-Gele aufgetragen, um die Proteolyse zu minimieren.

#### **2.4.5 X-Gal-Färbung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bei *C. elegans***

Für die X-Gal Färbung wurde neue Methode von KOELLE (KOELLE, pers. Mittlg.) angewendet. Der transgene Stamm *syIs20 him-5(e1490)* mit *gpa-1::lacZ* Fusion wurde von drei Platten (Durchmesser 9 cm) mit kaltem (+ 4°C) M9 Puffer abgespült und 3 x 3 min bei 1500 x g im Eppendorfgesäß pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet (ca. 200-300 µl Würmer) wurde im flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Vacuumzentrifuge ca. 45 min entwässert.

Dann wurde 250 µl kaltes Aceton dazugegeben und das Pellet 5 min in der Vacuumzentrifuge getrocknet. Es wurde die Lösung (Vol. 1 ml) für  $\beta$ -Galactosidase-Färbung vorbereitet. Es wurden in ein Eppendorfgesäß in dieser Reihenfolge folgende Komponenten pipettiert:

620 µl H<sub>2</sub>O

250 µl 0,8 M Na-Phosphat Puffer, pH 7,5

1 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>

4 µl 1% SDS

100 µl 100 mM Redox-Puffer (immer frisch einsetzen; 1 Vol. 100 mM Kalium Ferricyanid mit 1 Vol. 100 mM Kalium Ferrocyanid)

2 µl 1 mg/ml DAPI

8 µl 5% X-Gal in Dimethylformamid (lichtgeschützt !).

Die Komponenten wurden kurz gevortex und 200 µl davon wurde auf das Würmer-Pellet gegeben. Nach 2 h wurden die Würmer auf dem Objektträger mikroskopiert, um zu sehen, ob die Farbe gut entwickelt war. Die beste X-Gal Färbung wurde nach 24 h bei RT beobachtet.



## 2.4.6 Immuncytologie bei *C. elegans*

### 2.4.6.1 Immuncytologie der Embryonen

Ein Tropfen Polylysinlösung wurde auf einem Objektträger mit einer 100 µl Pipettenspitze ausgestrichen und auf einer angewärmten Metalscheibe getrocknet. Die Würmer wurden im destilierten Wasser auf dem Polylysin - beschichteten Objektträgern zerschnitten oder zerquescht. Dazu wurde M9 Puffer gegeben. Für die Färbung von Massen von Embryonen wurden zwei Platten (Durchmesser 9 cm) mit adulten Hermaphroditen ausgewählt, mit M9 gewaschen, das Pellet 2 min bei 1500 x g abzentrifugiert, 2 mal mit M9 Puffer gewaschen und das Pellet auf den Polylysin-beschichteten Objektträger übertragen und mit einem Deckglas gequescht. Die Objektträger mit Würmern wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Deckglas wurde danach mit einer Rasierklinge abgesprengt und sofort in eine Küvette mit eiskaltem Methanol gegeben. Die Präparate wurden 20 min in eiskaltem Methanol auf Trockeneneis und 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Zuletzt wurden sie an der Luft getrocknet und 1 h bei RT mit PBS, 0,1% Tween und 5% Milchpulver oder TBS und 1,5% BSA in einer feuchten Kammer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Nach 1 h wurde PBS mit Tween und Milchpulver oder TBS mit BSA mit Kim-Wipes abgesaugt und der 1. Antikörper in PBS ( $\alpha$ H1.X-11 mit der Konzentration von 60 µg/ml,  $\alpha$ H1 von 2,65 µg/ml) zugegeben und über Nacht bei + 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Präparate wurden 1 h in PBS mit 0,1% Tween oder TBS gewaschen (jede 5 min wurde der Puffer gewechselt). Danach wurde der 2. Antikörper hinzugefügt in der Verdünnung 1:800 (Cy2-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub> fragment (Jackson ImmunoResearch Laboratories)) und 1 h bei + 37°C inkubiert. Zuletzt wurden die Präparate gründlich 1 h in PBS/ Tween oder TBS gewaschen (jede 5 min Pufferwechsel), 10 min in Hoechst 33342-Lösung 1,6 µM (die Verdünnung in PBS oder TBS) inkubiert, gewaschen, mit einem Tropfen UV-Inert versetzt und das Deckglas darauf mit Nagellack versiegelt. Die Präparate wurden mit dem LSM-510 Konfokal-Mikroskop ausgewertet. Es wurden auch co-Lokalisationsexperimente mit Intermediärfilament-Proteine und  $\alpha$ -Tubulin durchgeführt. Die Behandlung der Präparate wurde wie oben beschrieben durchgeführt; nur der Antikörper gegen IFA (Überstand der Zellkultur) (BARTNIK et al., 1986; FRANCIS und WATERSON, 1991) wurde unverdünnt (nach Klaus

Weber) und anti- $\alpha$ -Tubulin in der Verdünnung 1:400 (Sigma, T9026) zugegeben. Der 2. Antikörper, gegen Anti-Maus-IgG-Cy3-conjugate (Sigma, C-2181), wurde in der Verdünnung 1:100 verwendet, 1 h bei + 37°C inkubiert, gewaschen, 10 min in Hoechst 33342-Lösung inkubiert, gewaschen, versiegelt und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### **2.4.6.2 Immuncytologie der adulten Tiere und Larven**

Das Protokoll wurde von MILLER und SHAKES (MILLER und SHAKES, 1995) entnommen. Nicht hungernde Tiere von 10 Platten (Durchmesser 9 cm) wurden mit M9 Puffer (+ 4°C) abgespült und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt, bei 1500 x g 3 min abzentrifugiert (vorgekühlte Hettich-Zentrifuge) und mehrmals mit M9 gewaschen. Das Pellet wurde in ein Eppendorfgefäß übertragen (Endvolumen 250  $\mu$ l) und 2 x Ruvkun Fixation Buffer (RFB) bis 1 x konzentriert dazugegeben. Es wurde 20 % frisches Formaldehyd hinzugefügt bis zu einer Endkonzentration von 2%. Das Endvolumen betrug ca. 1 ml. Der Inhalt wurde kräftig gemischt und in flüssigem Stickstoff dreimal eingefroren und im Wasserbad bei + 25°C wieder aufgetaut. Dann wurden die Würmer 1 h auf Eis (ab und zu mischen) inkubiert, nach 1 Stunde zweimal mit TRIS-Triton-Puffer (TTB) gewaschen und bei 1500 x g, 2 min abzentrifugiert. Das Wurmpellet wurde in TTB und 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und bei + 37°C 2 h oder über Nacht auf der Schaukel (Rocky) inkubiert. Um die Reduktion der Disulfidbrücken, die die Cuticula zusammenhalten zu beenden, wurden die Tiere 1 x in 10-15 fachem Volumen 1 x Borat-Puffer ( $\text{BO}_3$  Puffer) und 0,01% Triton gewaschen und anschließend in Borat-Puffer, 0,01% Triton und 10 mM DTT 15 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Triton verhindert, daß die Würmer zusammenkleben. Dann wurde die Oxidation durchgeführt. Die Würmer wurden 1 mal in 10-15 fachem Vol. 1 x Borat-Puffer und 0,01% Triton gewaschen und 1 mal in 1 x Borat-Puffer, 0,01% Triton und 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Dann wurden die Würmer 1 mal im 10 - 15 fachen Vol. 1 x Borat-Puffer und 0,01% Triton gewaschen und mindestens 15 min mit Antikörper-Puffer-B gewaschen. Die Würmer im Antikörper- Puffer-A können bei + 4°C bis zu 1 Monat aufbewahrt werden. Etwa 25  $\mu$ l Wurmssuspension wurde mit ca. 250  $\mu$ l Antikörper-Puffer-A gemischt ( $\alpha$ H1-Endkonzentration von 2,65  $\mu$ g/ml,  $\alpha$ H1.X-11-Endkonzentration von 60  $\mu$ g/ml, anti-GFP (4  $\mu$ g/ml), anti- $\alpha$ -Tubulin in der Verdünnung 1:400 (Sigma, T9026)) und über Nacht bei

+ 4°C auf der Schaukel (Rocky) inkubiert. Die IFA und  $\alpha$ H1.X –101 Antikörper wurden ohne Verdünnung mit 25  $\mu$ l Wurm-Suspension zusammengemischt. Dann wurden die Würmer 2-3 h mit Antikörper-Puffer-B gewaschen und anschließend 2 h oder über Nacht mit dem 2. Antikörper im Antikörper-Puffer-A–Cy2-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 1:500 verdünnt oder Anti-Mouse-IgG (whole molecule)-Cy3-conjugate (Sigma, C-2181), in der Verdünnung 1:100 für IFA auf der Schaukel inkubiert. Am Ende wurden die Tiere 2 bis 3 h im Antikörper-Puffer-B gewaschen, 3-5  $\mu$ l Würmer auf Agarose-Pads 2% in PBS gegeben und mit 3  $\mu$ l Lösung von n-Propyl-Gallat mit Hoechst 33342 versetzt. Die Präparate wurden mit einem Deckglas und Nagellack verschlossen und das Signal unter dem Konfokal-Mikroskop mikroskopiert. Es wurde auch Immunfärbung mit anti-green fluorescent protein (anti-GFP, Serum) (MoBiTec) in der Verdünnung 1:500 durchgeführt. H1.1 dsRNA behandelte Würmer des Stammes EC107 wurden mit anti-GFP über Nacht bei + 4°C inkubiert; der zweite Antikörper (Cy2, Jackson ImmunoResearch Laboratories) wurde 1:100 verdünnt und 2 h bei RT inkubiert.

## ***2.5 Saccharomyces cerevisiae***

### **2.5.1 Molekularbiologischen Methoden bei *S. cerevisiae***

#### **2.5.1.1 Herstellung der kompetenten Hefezellen, *S. cerevisiae***

Es wurde 100 ml YPAD-Medium/ 3% Glycerin mit 5 ml Übernachtskultur angeimpft. Die Hefe-Zellen wurden bei + 30°C im Schüttler (240 rpm) bis zu einer OD 600 nm = 0,5-0,7 wachsen gelassen. Dann wurde die Kultur in 50 ml Röhrchen überführt, 5 min, 1500 x g bei RT abzentrifugiert und das Pellet zuerst in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, dann auf 20 ml mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 900  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurde 100  $\mu$ l LiAc (Lithiumacetat), 1 M dazugegeben und vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert, danach 15 s abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 450  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden 15  $\mu$ l LiAc, 1 M gegeben, gemischt und 5 min bei

RT inkubiert. Der Inhalt wurde in 50 µl-Portionen aliquotiert und kann bei + 4°C 2 Wochen lang aufbewahrt werden.

### 2.5.1.2 Transformation in kompetenten Hefezellen

Eine 50 µl Portion wurde 15 s abzentrifugiert und der Überstand abgezogen. In dieser Reihenfolge wurden dazugegeben:

240 µl PEG 3350, 50%, am Vortex mischen

36 µl LiAc 1 M, am Vortex mischen

1-10 µg Plasmid-DNA in 25-50 µl, am Vortex mischen

Zuerst wurde der Inhalt 30 min bei + 30°C im Brutschrank und anschließend 25 min bei + 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Portion wurde 15 s bei 3000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl H<sub>2</sub>O vorsichtig resuspendiert. Das Resuspendat wurde auf Selektiv-Platten (SC-Leu) vorsichtig ausplattiert und über Nacht (manchmal 2 bis 3 Tage lang) bei + 30°C inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht transformierte Zellen.

### 2.5.1.3 Herstellung der sieben H1-Expressionsklone

Die sieben cDNAs der H1-Isoformen (H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.Q, H1.X) wurden in zwei Hefe-Expressions-Vektoren pYX142 (7794 bp) und pYX242 (9469 bp) (R&D Systems) kloniert. Die beiden Hefe-Vektoren haben in der Hefe unterschiedlich hohe zelluläre Plasmidzahlen (pYX142-high copy vector, pYX242-low copy vector), einen sehr starken, Hefe-spezifischen Promotor des TPI-Gens und enthalten eine Ampicillin-Resistenz (zur Selektion in *E. coli*) und einen selektierbaren Marker (*LEU2*) für die Hefe-Genetik.

Die cDNA von sieben H1-Isoformen wurden jeweils mit *EcoR* I und *Xho* I verdaut und in die beiden Hefe-Vektoren ligiert, dann in den kompetenten *E. coli* Stamm DH5α transformiert und auf Ampicillin-Platten ausplattiert. Die positiven Kolonien wurden gepickt und über Nacht im LB-Medium wachsen gelassen. Am Ende wurde eine DNA-Minipräparation durchgeführt, die DNA-Konzentration gemessen und 1-10 µg DNA für die Transformation in kompetente Hefezellen der Stämme UC3505 und S35P-5A verwendet. Die Selektion erfolgte auf Leucin- Mangelmedium (SC-Leu-Platten).

#### **2.5.1.4 Messung der Überlebensrate der H1-exprimierenden Hefe-Stämme auf Selektiv- und FOA-Platten**

Um die Überlebensrate der H1-Klone zu messen, wurden die positiven Kolonien (gewachsen auf die SC-Leu-Platten) in SC-Leu-Medium angeimpft und bei + 30°C 1-2 Tage wachsen gelassen. Dann wurden dekadische Verdünnungsreihen der Hefe-Kulturen in H<sub>2</sub>O angesetzt (Kontrolle -unverdünnte Hefe-Kulturen, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 usw.) und je 10 µl-Tropfen auf YPAD (Voll-Medium)-und SC-Leu (Selektion-Medium)-Platten aufgetragen. Die Verdünnungsreihe wurde bei + 4°C aufgehoben für spätere Zwecke.

Die ausgewählten Hefeklone wurden für western-blot in SC-Leu-Medium angeimpft und bei + 30°C bis OD 600 nm = 1,0-1,5 angezogen. Dann wurden die SC-Leu-Platten und YPAD-Platten mit dekadischen Verdünnungsreihen unter dem Binokular angeschaut und die Kolonien gezählt. Die Verdünnungsreihe, in der man 30 bis 50 Kolonien zählen konnte, wurde weiter verwendet und für statistische Zwecke mehrfach (5 bis 10 Tropfen pro Platte) auf SC-Leu- und FOA-Platten ausplattiert.

Es wurde darauf geachtet frisch gevortexte Zellen zu nehmen. Die Platten wurden für 1-3 Tage bei + 30°C gelassen und die Kolonien dann unter einem Binokular ausgezählt und ausgewertet. Es wurde das Verhältnis: der Anzahl der Kolonien auf FOA / und der Anzahl der Kolonien auf SC-Leu-Platten x 100 berechnet.

Für die western-blot Analyse wurden die ausgewählten Hefe-Klone angezogen und die Proteine der H1-Isoformen aus *C. elegans* isoliert, um nachzuweisen, dass die Proteine in der Hefe exprimiert worden sind.

#### **2.5.1.5 GFP-Fusionen mit H1.1 und H1.4 Histonen in den Hefektoren pYX142 und pYX242**

Um GFP-Fusionen mit H1.1 und H1.4 in Hefektoren zu klonieren, wurde eine sogenannte 'multiplex' PCR durchgeführt. Die 'multiplex-PCR' Reaktion wurde jeweils für H1.1 und H1.4 Histone mit folgenden primern eingesetzt, um die Promotoren und Introns von H1.1 und H1.4 in pEGFP-N1-Reportergene zu entfernen. Die PCR für H1.1 Histon wurde mit folgenden primern durchgeführt: ESMG64

5' GCTGATTATAATCTAGAGTCGCGGCC 3' und ESPCR54

5' GGAGCCAACGGACGTTTCCGTGTGC 3'.

Als Matrize diente H1.1 in pEGFP-N1 Vektor. Die zweite 'Multiplex-PCR' für H1.4 Histon wurde mit folgenden primern durchgeführt: ESMG64 (wie oben) und ESPCR55

5'GGAGCCAACGGACGGTTCCGTCTTG 3'. Als Matrize diente H1.4 in pEGFP-N1.

Die PCR-Produkte wurden sorgfältig aus der low-melting-Agarose ausgeschnitten und als Matrizen für die nächsten PCRs verwendet. Die nächsten PCRs wurden mit folgenden

primern erfolgen: für H1.1- ESMG65

5' GGAATTCACCATGTCTGATTCCGCTGTTGTTG 3' und ESMG64 (wie oben), für

H1.4-ESMG66 5' GGAATTCACCATGTCTGACGTCGCCGTTG 3' und ESMG64 (wie oben). Als Matrize dienten die PCRs Produkten und die entsprechenden den H1-Isoformen cDNA Klone in pBluescript® II SK.

Das PCR-Programm war für primer ESMG65/ESMG64 (31 Zyklen) und für primer ESMG66/ESMG64 (26 Zyklen) folgendes:

95°C	5 min	dann	94°C	60 s
55°C	60 s		55°C	60 s
68°C	120s		68°C	120 s
1 Zyklus			30 Zyklen	(oder 25 Zyklen)

Um eine gleiche Expression zu erzielen, waren die Regionen der Startcodon für beide Konstrukte identisch.

Die PCR-Produkte wurden isoliert und in der *Ecl*136 II Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Dann wurden die Inserts (jeweils *H1.1::gfp* und *H1.4::gfp* ohne Promotor und Intron) mit den Enzymen *EcoR* I und *Xba* I aus dem pUC18 Vektor ausgeschnitten und in pYX142 und pYX242-Hefevektoren inkloniert. Die pYX142- und pYX242-Vektoren wurden mit *EcoR* I und *Avr* II geschnitten. Der 5'-Einzelstrang-Überhang von *Avr* II ist kompatibel mit dem 3'-zurückgesetzten Überhang von *Xba* I.

## 2.5.2 Proteinchemische Methoden bei *S. cerevisiae*

### 2.5.2.1 Protein-Extraktion aus Hefen

Die Proteine wurden isoliert (nach ALBIG, pers. Mittlg.), um herauszufinden, ob die Hefezellen in der Lage waren die H1-Proteine zu exprimieren

Die Hefe-Zellen wurden bei + 30°C in 100 ml Endvolumen bis OD 600 nm = 1,2 eingezogen und dann bei 2900 x g, 10 min bei + 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, abzentrifugiert und in 10 ml PTB (1 M Sorbitol, 4,25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 43,75 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) mit 20 mM DTT wieder resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min bei + 37°C inkubiert und dann 5 min bei 2900 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml DB (1 M Sorbitol, 1 mM EDTA) mit 10 mg Zymolyase T20 (Sigma) resuspendiert, 30 min bei + 37°C inkubiert und 10 min bei 4300 x g abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit DB noch einmal gewaschen, 1 Vol. glass beads (Sigma) dazugegeben, PCA ad 5% Endkonzentration hinzugefügt und alles 1 min am Vortex gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert, der Überstand aufbewahrt und das Pellet nochmals in DB gewaschen, mit 1 Vol. glass beads in PCA versetzt, 1 min gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die gesammelten Überstände wurden mit konzentrierter HCl versetzt (1/37 des Volumens) und die Proteine mit 3,5 Vol. kaltem Aceton (- 20°C) bei - 20°C ausgefällt. Nach 24 h wurde die Mischung bei 12000 x g 3 min abzentrifugiert, das Pellet mit kaltem Aceton gewaschen und in H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Proteine wurden auf SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen und gebloftet. Es wurde als 1. Antikörper Antiserum gegen H1.4 mit der Konzentration von 54 µg/ml verwendet.

### 2.5.2.2 Immunofluoreszenz von Hefetransformanten

Es wurde 5 ml SC-Leu-Medium mit Hefetransformanten (H1-Isoformen in pYX142 und pYX242) angeimpft und 2-3 Tage bei + 30°C und 150 rpm so lange geschüttelt, bis eine OD 600 nm von 0,5-1,0 erreicht war (nach ALBIG, pers. Mittlg.). Dann wurden 250 µl 0,5 M KPP (Kaliumphosphat), pH 7,4 und 3 ml Paraformaldehyd (immer frisch in 25 mM KPP, pH 7,4 angesetzt) dazugegeben, vorsichtig geschüttelt und 30 min bei + 25°C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden 3 min bei RT, 1500 x g abzentrifugiert und das

Pellet mit 3,15 ml 0,1 M KPP, pH 6,5 und 1,85 ml 10% Paraformaldehyd gewaschen und 3 min, 1500 x g bei RT abzentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 1,26 ml 0,1 M KPP, pH 6,5 und 740 µl 10% Paraformaldehyd gewaschen, dabei vorsichtig geschüttelt und 90 min bei + 25°C im Schüttler inkubiert. Dann wurden die Zellen 3 min bei 1500 x g, RT abzentrifugiert und das Pellet 4 x mit 5 ml 0,1 M KPP, pH 6,5 gewaschen (zwischen den Waschsritten 3 min bei 1500 x g zentrifugiert) und am Ende 1 x mit 5 ml 1,2 M Sorbitol in 0,1 M KPP, pH 5,9 gewaschen - dabei vorsichtig geschüttelt - und 3 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 1,2 M Sorbitol in 0,1 M KPP, pH 5,9, 10 µl Glucuronidase/Arylsulfatase (Boehringer, Mannheim) und 20 µl Zymolyase 20.000 Units/ml (Fa. Sigma) in Zymolyase-Puffer aufgenommen, vorsichtig geschüttelt und 90 min bei + 30°C im Wasserbad inkubiert.

Dann wurden die Zellen 3 min bei RT mit 1500 x g abzentrifugiert und das Pellet 2 x mit 5 ml 1,2 M Sorbitol in 0,1 M KPP, pH 5,9 aufgenommen, vorsichtig geschüttelt und 3 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Am Ende wurden die Zellen in 200 µl 1,2 M Sorbitol in 0,1 M KPP, pH 5,9 aufgenommen und für die Antikörpermarkierung verwendet.

Die Zellen können ca. 1 Monat bei + 4°C aufbewahrt werden. Für die Antikörpermarkierung wurde die Zellsuspension 1:5 mit 1,2 M Sorbitol in 0,1 M KPP, pH 5,9 verdünnt und auf die frisch vorbereiteten, mit Polylysin beschichteten Objektträger pipettiert. Die Suspension wurde 5-10 min bei RT zum Antrocknen belassen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde am Rand mit einem Kleenextuch abgesaugt und der Objektträger für weitere 20 min bei RT belassen. Dann wurden die Zellen fixiert: 6 min in kaltem Methanol (- 20°C), 30 s in kaltem Aceton (- 20°C) und für ca. 20 min bei RT trocknen gelassen. Die Zellen wurden zur Kontrolle mikroskopiert und dann mit 25 µl des 1. Antikörpers ( $\alpha$ H1 in der Verdünnung 1:20 in PBS mit 4% Milchpulver, von 2,65 µg/ml Endkonzentration) versetzt.

Die Kontrolle wurde nur mit PBS mit 4% Milchpulver inkubiert. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei + 4°C entwickelt. Dann wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette mit 1 ml PBS/ 4% Milchpulver gespült und 3 x in einer Küvette in PBS mit 4% Milchpulver gewaschen. Die Objektträger wurden mit einem Kleenextuch getrocknet und mit 25 µl vom 2. Antikörper Cy2-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Jackson ImmunoResearch Laboratories) in der Verdünnung 1:500 in PBS mit 4% Milchpulver versetzt. Die Präparate wurden 2 h bei + 37°C in einer feuchten Kammer



entwickelt und anschließend wurde der 2. Antikörper mit 1 ml PBS/ 4% Milchpulver vom Objektträger gespült, 4 x mit PBS mit 4% Milchpulver und 3 x mit PBS gewaschen.

Die Objektträger wurden mit dem Kleenextuch getrocknet und es wurde 1 Tropfen DAPI Lösung auf die Zellen gegeben. Dann wurde vorsichtig das Deckglas auf die Zellen gelegt, die Flüssigkeit abgesaugt und mit Naggellack luftdicht verschlossen.

## 2.6 Mikroskopie

Für die Dokumentation der Ergebnisse wurde ein Zeiss Axioplan 2 Mikroskop mit Zeiss Konfokal scanning module LSM-510 verwendet sowie eine Spot RT-CCD-Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA). Der Farbstoff Cy-2 und GFP wurden mit 488 nm, Cy-3 mit 514 nm angeregt. Für die Emission wurde entweder ein Langpass-Filter (LP) mit 505 nm, ein Bandpass-Filter (BP) mit 505-550 nm oder 505-530 nm verwendet. Für die Beobachtung der Hoechst-Färbung wurde folgende Kombination gewählt: Anregung 351 nm oder 364 nm und das Emissionsfilter mit 385-470 nm (BP).

Das Mikroskop wurde so eingestellt, daß die Bilder mit 12 bit/Pixel und einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel erzeugt wurden. Für die Aufnahmen von dreidimensionalen Bildern wurden optische Schnitte durch die Präparate gelegt. Die aufgenommenen Bilder wurden im Tiff-Dateiformat gespeichert und sind in allen verwendeten Bildverarbeitungsprogrammen lesbar.

## 2.7 Verwendete Computerprogramme

Es wurde das PC-Gene Programm Version 6.70 (Intelligenetics) eingesetzt, um die Sequenzen (Translation, Restriktionsschnittstellen) zu bearbeiten.

Die folgenden Programme wurden verwendet: CLUSTAL X (1.64b), Genfinger, Software für LSM-510 Zeiss-Konfokal-Mikroskop Version 2.50, Software für Spot RT-CCD-Kamera Version 3.1, Microsoft PowerPoint Version 97, Adobe Photoshop Version 5.0 für die Bearbeitung der Fotos, TblastN (ALTSCHUL et al., 1990), ACEDB Version 4\_71 (Datenbank WS 33) und Datenbanken: Genbank und dbEST.

## 2.8 Medien und Lösungen

### Antikörper-Puffer A ( A<sub>ba</sub>)

1 x PBS

1% Albumin aus Kälberserum (BSA)

0,5% Triton X-100 oder Nonidet P-40

0,05% Natriumazid

1 mM EDTA

### Antikörper-Puffer B ( A<sub>bb</sub>)

A<sub>ba</sub> mit 0,1 % BSA statt 1% BSA

### Bleaching solution

2 Vol. 4 M NaOH

3 Vol. 10-20% NaOCl

### Blocking-Puffer-für blot

1/10 Vol. Stammlösung: 10 x TBS, pH 7,6, autoklaviert

0,1% Tween-20

5% Magermilchpulver ( Reformhaus)

24,2 g TRIS

80 g NaCl

### 20 x B<sub>0</sub><sub>3</sub> Puffer

1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0,5 M NaOH

### 1 x B<sub>0</sub><sub>3</sub> Puffer

Immer frisch ansetzen, mit NaOH auf pH 9,5 einstellen

**Chloroform/Isoamylalkohol:** 96:4 (v/v)

**DAPI-Lösung**

0,125 M n-Propyl-Galat

0,5 µg/ml DAPI in 90% Glycerin

**Entwickler**

4,4 g Foto-Rex

144 g Nasulfit

17,6 g Hydrochinon

96 g Natriumcarbonat

8 g KBr ad 2 l

**Fixierer**

106 g/l saures Fixierbad, Agfa

**FOA-Platten**

Wie SC-Leu Platten aber nach dem Autoklavieren auf + 50°C abkühlen lassen, dann

1 g/l FOA lösen

**10% Formaldehydlösung**

0,5 g festes para-Formaldehyd in 5 ml H<sub>2</sub>O

1 Tropfen 2 N NaOH 15 min bei + 55-60°C lösen

**Guanidin-HCl für RNA Isolation - gepuffert**

7,5 M Guanidin-HCl

1 M TRIS/HCl, pH 7,0 filtriert

immer frisch Dithiothreitol (DTT) bis Endkonzentration 10 mM dazugeben

**Höchst 33342 Lösung:** 1,6 µm Höchst 33342 in TBS

**Lambda Marker**

90 µl λ-DNA (Fa. Fermentas, Konz. 0,3 mg DNA/ml)

10 µl Puffer Rot (Fa. Fermentas)

4  $\mu$ l *Hind* III

4  $\mu$ l *EcoR* I

bei + 37°C 2-3 h im Brutschrank inkubieren

mit EDTA 10 mM Endkonzentration behandeln

### **LB-Medium ohne Antibiotika**

10 g Peptone (Roth)

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl ad 1 l mit dest. H<sub>2</sub>O und mit NaOH auf pH 7,2 einstellen

### **LB-Agar**

LB-Medium

15 g Agar ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, autoklavieren

### **Lysis Puffer für DNA Isolation aus *C. elegans***

0,2 M NaCl

0,1 M TRIS-HCl, pH 8,5

50 mM EDTA

0,5% SDS

### **M9 Puffer-1 Liter**

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 g NaCl

0,25 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O

### **NGM Platten**

3 g NaCl

17 g Agar

2,5 g Pepton ad 973 ml H<sub>2</sub>O

autoklavieren und anschließend Zugabe der einzeln autoklavierten Lösungen

1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>

1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>  
25 ml 1 M Kaliumphosphat, pH 6,0  
+ 1 ml Cholesterol (Stammlösung: 5 mg/ml in Ethanol)

**N-Propyl-Gallat-Lösung**

20 mg N-Propyl-Gallat  
0,7 ml Glycerin  
ad100 ml H<sub>2</sub>O

**N-Propyl-Gallat-Lösung mit Hoechst 33342**

100 µl obige Lösung  
10 µl 1 M TRIS, pH 9,5 ( pH wichtig!)  
1 µl 1 mg/ml Hoechst 33342  
immer frisch ansetzen

**NZY-Topagar, 1 Liter**

5 g NaCl  
2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
5 g Hefe Extrakt  
10 g NZ-Amin  
0,7% Agarose pH 7,5 mit NaOH einstellen

**NZY Platten, 1 Liter**

5 g NaCl  
2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
5 g Hefe Extrakt  
10 g NZ-Amin ( Kasein hydrolysiert) pH 7,5 mit NaOH einstellen  
15 g Agar

**10 x PBS**

1,4 M NaCl

27 mM KCl

80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Polylysinlösung**

200 ml Wasser auf + 60°C erwärmen

400 mg Gelatine zugeben

auf + 40°C abkühlen

40 mg CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12 H<sub>2</sub>O zugeben

zu 75 ml der Lösung 75 mg Polylysin hinzufügen

**2 x Ruvkun Fixierungs Puffer ( RFB)**

160 mM KCl

140 mM NaCl

20 mM Dinatriumäthylenglycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N'-tetra-Essigsäure  
(Na<sub>2</sub>EGTA)

10 mM Spermidin-HCl

30 mM Na-1,4-Piperazindiethansulfonsäure ( Pipes), pH 7,4

50% Methanol

**Sequenz-Gel**

1 x TBE-Puffer

7 M Harnstoff

6% Acrylamid

0,2% Bisacrylamid

**SM-Puffer (Standard Medium für Phagen)**

5,8 g NaCl

2,0 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O

50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)

5 ml 2% (w/v) Gelatine  
ad H<sub>2</sub>O 1 l, autoklavieren

**SC-Leu mix**

2 g Adenin Hemisulfat  
2 g Arginin HCl  
2 g Histidin HCl  
2 g Isoleucin  
2 g Lysin HCl  
2 g Methionin  
3 g Phenylalanin  
2 g Serin  
2 g Threonin  
3 g Tryptophan  
2 g Tyrosin  
1,2 g Uracil  
9 g Valin

**SC-Leu-Selektiv-Medium**

7 g Yeast-Nitrogen base (Difco)  
0,7 g SC-Leu Mix  
20 g Glucose am Vortex mischen, pH 5,6 einstellen, ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, autoklavieren

**SC-Leu Platten**

15 g Agar  
1000 ml SC-Leu-Medium, autoklavieren

**TAE**

40 mM TRIS-Acetat, pH 8,0  
1 mM EDTA

**TBS:** 150 mM NaCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,3

**TE pH 7,4**

10 mM TRIS/HCl pH 7,4

1 mM EDTA

**TBE (Puffer für Sequenz-Gel)**

90 mM Tris

90 mM Borsäure

1,25 mM EDTA, pH 8,8

**TRIS-Triton Puffer (TTB)**

100 mM TRIS/HCl, pH 7,4

1% Triton X-100 oder Nonidet P-40

1 mM Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)

**UV-inert:** 5% n-Propylgallat in TBS

**Waschpuffer-für blot**

1 x TBS, pH 7,6

0,1% Tween-20

**X-Gal, Ampicilin, Kanamycin Platten**

Zu sterilem, flüssigen LB-Agar auf + 50°C abgekühlt (im Wasserbad) werden je 100 ml

Für Ampicillin Platten:

500 µl Ampicillin (Stammlösung: 20 mg/ml in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, - 20°C)

Für X-Gal Platten:

500 µl Ampicillin (500 µl Ampicillin (Stammlösung: s.o.)

100 µl 0,1M IPTG (Stammlösung: 500 mM in dest. H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, - 20°C)

100 µl 2% X-Gal (in Dimethylformamid, lichtgeschützt, steril)

Für Kanamycin-Platten:



33,3 µl Kanamycin (Stammlösung: 30 µg/ml in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, - 20°C)

Für Tetracyclin-Platten:

1 ml Tetracycline in 70% Ethanol (schützen vor Licht, Stammlösung: 12 mg/ml)

### **2 x YT-Medium**

16 g Bacto-Trypton

10 g Bacto-Yeast Extract

5 g NaCl ad 900 ml mit H<sub>2</sub>O, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

### **YPAD-Medium**

10 g Yeast-Extract (Fa. Roth)

20 g Pepton 185 (Gemisch aus Pepton 100 und 140, Fa. Roth)

100 mg Adenin

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, autoklavieren

dann 20 g Glucose in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

### **Zymolyase Puffer**

50 mM TRIS-HCl, pH 7,5

10 mM MgCl<sub>2</sub>

1 M Sorbitol

30 mM DTT

## 2.9 Verwendete primer

Standardprimer für den Vektor pUC18:

**Revers** 5' AACAGCTATGACCATG 3'

**-40** 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

Standardprimer für den Vektor pBluescript® SK II:

**T3** 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'

**T7** 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

Standardprimer für den Vektor pET3a:

**T7** 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Standardprimer ExUniForward für den Vektor pSK:

5' TGAATTCGGATCCGACTCACTATAGGG 3'

**ASMG08**-für H1.1 Start-Mutagenese, mit *Nde* I-Schnittstelle

5' TTGCCCATCCATATGTGTGATTCCGCTGTTGTTG 3'

**ESSEQ06**-für Sequenzierung des Vektors pEGFP-N1; sequenziert EGFP rückwärts, bindet im N-term. Region

5' CCAGCTCGACCAGGATG 3'

**ESSEQ07**-sequenziert *C. elegans* H1-Isoformen von H1.1 bis H1.5 aber nicht H1.X, vorwärts

5' AA(A,C)TACA(A,C)(G,T)(G,C)T(T,C)GGAGA 3'

AAMTACAMKSTYGGAGA

**ESMG18**- für H1.X cDNA rückwärts, mit *Cla* I-Schnittstelle

5' CCATCGATGGTGGGAAATCTAAACTACAGGTGTC 3'

**ESMG19-** für H1.X cDNA Start-Mutagenese, mit *Nde* I-Schnittstelle

5' GGATCCAGCATATGACCACTTCGCTCATCCACATGG 3'

**ESMG27-**für genomische H1.2 DNA, mit *EcoR* I-Schnittstelle

5' GGAATTCTGTCCACGCATCGTTCTACA 3'

**ESMG28-** für genomische H1.2 DNA, mit *EcoR* I-Schnittstelle

5' GGAATTCGGTAGCAGTACTCAAGGCATGAG 3'

**ESMG29-** für genomische H1.4 DNA, mit *EcoR* I-Schnittstelle

5' GGAATTCCTACTCATCCGTTCAACA 3'

**ESMG30-** für genomische H1.4 DNA, mit *EcoR* I-Schnittstelle

5' GGAATTCGGTACCATTAATTTGATTATTCACACAATGTG 3'

**ESMG31-** für H1.2 Start-Mutagenese, mit *Nde* I-Schnittstelle

5' GGATCCAGCATATGTCTGACGTCACCGTTG 3'

**ESMG32-** für H1.3 Start-Mutagenese, mit *Nde* I-Schnittstelle

5' GGATCCAGCATATGTCCGACACCGTCGTTG 3'

**ESMG33-** für H1.4 und H1.5 Start-Mutagenese, mit *Nde* I-Schnittstelle

5' GGATCCAGCATATGTCTGACGTCGCCGTTG 3'

**ESMG34-** für H1-X Promotor vorwärts, mit *BamH* I-Schnittstelle

5' CGGGATCCCGTTCGTCGGTCTCCCAGTC 3'

**ESMG49-** für H1.Q Start-Mutagenese, mit *Nde* I-Schnittstelle

5' GGATCCAGCATATGGCCGCCGTCCAAAAAGC 3'

**ESMG54-** für H1.X-101 Expression, mit *EcoR* I-Schnittstelle

5' GGAATTCCATATGTCAGAAGTTCGTCAGAAGCTGG 3'

**ESMG62-** für H1.4 und H1.5 Start-Mutagenese, mit *Nde* I-Schnittstelle

5' GGATCCAGCATATGTGTTCTGACGTCGCCGTTG 3'

**ESMG64-** für pGPN-1 Vektor rückwärts, mit *Xba* I-Schnittstelle

5' GCTGATTATAATCTAGAGTCGCGGCC 3'

**ESMG65-** für *H1.1::gfp* Fusion in Hefevektoren, mit *EcoR* I-Schnittstelle

5' GGAATTCACCATGTCTGATTCCGCTGTTGTTG 3'

**ESMG66-** für *H1.4::gfp* Fusion in Hefevektoren, mit *EcoR* I und *Nco*-Schnittstellen

5' GGAATTCACCATGTCTGACGTCGCCGTTG 3'

**ESMG71-** für spezifische H1.2 dsRNA

5' CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGCCCTCACTAAAGGGA 3'

**ESPCR54-** für *H1.1::gfp* Fusion in Hefevektoren, post Intron vorwärts

5' GGAGCCAACGGACGTTTCCGTGTGC 3'

**ESPCR55-** für *H1.4::gfp* Fusion in Hefevektoren, post Intron vorwärts

5' GGAGCCAACGGACGGTTCCGTCTTG 3'

**MJ01-** für H1.4 Promotor vorwärts, mit *BamH* I-Schnittstelle

5' CGGGATCCGTCATTTGGTAACAACACTATGTTGCG 3'

**MJ05-** für H1.1 Promotor rückwärts, mit *Kpn* I-Schnittstelle

5' GGGGTACCCCCAGCCACCCACCGC 3'

**MJ08-** für H1.1 Promotor mit *EcoR* I-Schnittstelle

5' GGAATTCGTCTAGCGCACGCCTCATTG 3'

**MJ12-** für H1.X Promotor rückwärts, mit *BamH* I-Schnittstelle

5' CGGGATCCCGACAATAGCTCTTTCTGGTTCCGG 3'

**Für H1.4 knock-out:****MJ02M** 5' CTTAATCCCATCGACCTCCA 3'**MJ05M** 5' GAACAGTTGCCGATTTCGAT 3'**MJ09M** 5' GCGCTCATTTCTCACACTCA 3'**MJ10M** 5' CTTTTCCCGCTGTGAACACT 3'**MJ11M** 5' CGAAGTCATCCCCGAGAATA 3'**MJ12M** 5' TTAATGGATCGCTCCCAAAG 3'**MJ14M** 5' TCTTCAACGCGTCTGTCATC 3'**MJ15M** 5' CTTCTTCAACAACGGCTTGC 3'**MJ16M** 5' CGCGCAAATACCTTGTAGC 3'**MJ17M** 5' GACAGTTCCGAGAGCTCGAC 3'

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 Die vollständige Linkerhiston Genfamilie von *Caenorhabditis elegans*

#### 3.1.1 Identifikation der sechs neuen Histon H1-Isoformen

Zwei Histon H1-Proteine (entsprechende genomische DNA im Cosmid-M163.3 und im Yac-Y73B6BL.u-Tabelle 1) und das H1.1 kodierende Gen waren schon früher beschrieben worden (VANFLETEREN et al., 1988; VANFLETEREN et al., 1990; SANICOLA et al., 1990). Mit Hilfe dieser Primärstrukturen und dem Software-Programm TblastN (ALTSCHUL et al., 1990) wurden die Datenbanken dbEST (database of expressed sequence tags) und GenBank durchsucht. Dabei wurden sechs vollständige H1 cDNA Klone gefunden und für weitere Untersuchungen bestellt.

Diese cDNAs wurden sequenziert, um die Primärstruktur der H1-Isoformen zu ermitteln. Die Prozedur ist in Abb. I dargestellt.

Die sechs neuen H1-Isoformen wurden H1.3, H1.4, H1.5, H1.6, H1.X und H1.Q genannt. Die entsprechenden Gene der *C. elegans* Cosmid-Klone sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Die cDNAs waren bei Y. Kohara (National Institut of Genetics, Mishima, Japan) als Phagen cDNA Klone erhältlich (H1.1: yk85b12, H1.2: yk187f1, H1.3: yk89f5, H1.4: yk142d7, H1.5: yk173g2, H1.Q: yk116f11) und wurden in pBluescript® II SK(-) Derivat durch in vivo excision umgewandelt.

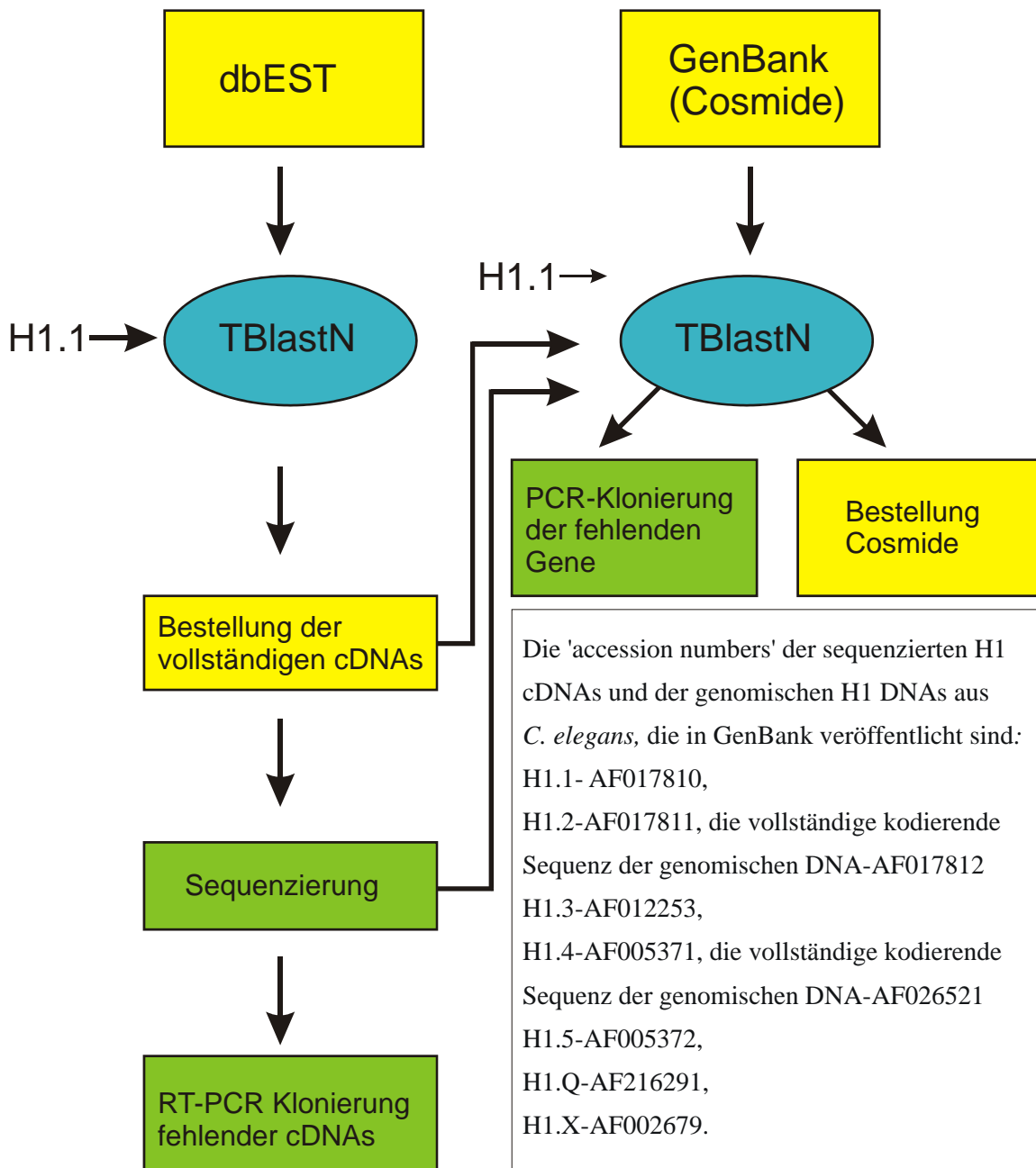
Die H1.4 cDNA war als  $\lambda$ SHLH2 Phagensuspension von A. Coulson (The Sanger Center) erhältlich und wurde in den Ampicillin-resistenten Plasmidklon pRATII Derivat umgewandelt. Um die H1.4 cDNA mit den Standardprimern sequenzieren zu können, wurde ein Subklon von der H1.4 cDNA mit dem *Hind* III Enzym hergestellt.

Die fehlende H1.X cDNA wurde durch RT-PCR aus der gesamten RNA von *C. elegans* mittels SUPERSRIPT II (Gibco) revers transkribiert, mit primer ESMG18 und ESMG19 amplifiziert und in der *Ecl136* II Schnittstelle des Vektors pUC18 inkloniert.

**Abb. I**

Darstellung der Identifikationsprozedur der Histon H1-Genfamilie.

## Die Analyse der Histon H1 Genfamilie von *Caenorhabditis elegans*



Alle cDNAs der Histon H1-Isoformen wurden mit den Standardprimern für Vektoren pUC18 und pBluescript® II SK sequenziert.

Für einige cDNAs, deren ganze Sequenz nicht in einem langen Lauf abgelesen werden konnte, wurden Subklone gebaut. Für die H1.X cDNA in pUC 18 wurde eine *EcoR*-I-Deletion durchgeführt, für die H1.4 cDNA im pKS eine *Pst*-I-Deletion.

Die cDNA-Sequenzen aller H1-Isoformen wurden in die Datenbank GenBank eingegeben (die 'accession numbers' sind in Abb. I angegeben).

Zwei der acht H1 Gene (H1.2 und H1.4) waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht bekannt und sind deshalb hier zum ersten Mal sequenziert worden. Die kodierenden Regionen der H1.2 und H1.4 Gene wurden aus der gesamten DNA von *C. elegans* mit den primern ESMG27/ESMG28 (für H1.2) und ESMG29/ESMG30 (für H1.4) amplifiziert.

Im EST Projekt von Y. Kohara sowie auch in GenBank wurde keine Histon-H1.6-cDNA gefunden (Stand der Information: Januar 2001). Versuche, die H1.6 cDNA durch RT-PCR zu amplifizieren, waren ebenfalls erfolglos.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *C. elegans* acht Histone H1 Gene besitzt, sechs davon sind hier erstmalig bearbeitet.

### Tabelle 1

Zusammenstellung der allgemeinen Informationen über die H1-Genfamilie aus dem *C. elegans* Genom-Projekt und aus dem EST Projekt von Y. Kohara ([http://www.ddbj.nig.ac.jp/htmls/c-elegans/html/CE\\_INDEX.html](http://www.ddbj.nig.ac.jp/htmls/c-elegans/html/CE_INDEX.html)).

	Lokal. in Chrom.	Cosmid	Komplette cDNA	CELK Gruppe
H1.1	Chromosom X	M163.3	yk85b12	01761
H1.2	Chromosom IV	Y73B6BL.u	yk85b12	02001
H1.3	Chromosom X	F22F1.1	yk89f5	02597
H1.4	Chromosom V	C18G1.5	Cm9F4, yk142d7	03581
H1.5	Chromosom I	B0414.3	yk173g2	02311
H1.6	Chromosom V	F59A7.4	nicht verfügbar (Stand:Jan.2001)	
H1.X	Chromosom V	C30G7.1	pC1819, yk480h7.5	-
H1.Q	Chromosom IV	C01B10.5	yk116f11	02040



Alle H1-Isoformen von *C. elegans* sind Einzelkopiegene (WOOD, 1988) im Gegensatz zu den 'core'-Histon-Genen H2A, H2B, H3 und H4.

## 3.2 Vergleich der Linkerhiston Sequenzen von *C. elegans*

### 3.2.1 Vergleich der Promotorsequenzen

Die nicht kodierenden 5'-Regionen der 8 H1-Isoformen sind in Alignment 1 dargestellt. Sie besitzen (von Histon H1.1 bis H1.5) konservierte Promotorelemente wie **A[C]AA[A,G]TT, ATTCGG**, die reich an AT-Nukleotiden sind. Jede Promotor hat eine TATA-Box. Die 5'-nicht-kodierenden Regionen der H1-Isoformen besitzen konservierte Promotorelemente, die reich an GC-Nukleotiden sind. Die Promotorelemente der H1-Gene anderer Organismen wie *Drosophila* oder *Chironomus* wurden nicht gefunden. Die H1 Gene dieser Organismen besitzen andere GC-reiche Promotorelemente, wie **TCCTCCTCGATTCTCA** — bei *Drosophila* oder **GAGGCTTCGTTTCCAT** — bei *Chironomus* (Tabelle 2, Alignment 1). Das konservierte Promotorelement H1-Box von *C. elegans* **ATGTGTCCCC[G]G[A]CAGG[A]GTGGTA** besteht aus 13 GC Nukleotiden (62%) bei insgesamt 21 Nukleotiden. Bei anderen Arten enthält das konservierte Promotorelement nur 50% GC Nukleotiden. Die H1-Box besitzen alle H1-Isoformen außer H1.6, H1.X und H1.Q. Dies sind Histone, die auch andere Promotorelemente der H1-Promotoren nicht enthalten.

Die mutmaßlichen CAP-Sequenzen kommen bei *Drosophila* und *Chironomus* vor. Bei den H1-Isoformen von *C. elegans* war eine eindeutige Identifizierung der CAP-Sequenzen nicht möglich.

Die mRNA der H1-Isoformen fängt mit **CAC** (H1.1) oder **CCA** (H1.2, H1.3, H1.4) - Trinukleotiden an. Im Gegensatz zu H1-Isoformen bei *Drosophila* und *Chironomus*, ist die Sequenz vor dem ATG-Startkodon bei *C. elegans* nicht Adenin-reich.

**Tabelle 2**

H1-Box verschiedener Arten: *Chironomus*, *Drosophila*, *Volvox* und *C. elegans*.

Durch Fettdruck sind die selben Basen in den Sequenzen markiert. Die Sequenzen von *D. melanogaster* und *D. hydei* sind von KREMER und HENNIG (1990), die Sequenzen von *Volvox carteri* von LINDAUER et al. (1993) und die Sequenzen von *Chironomus* von SCHULZE (1992).

<i>Caenorhabditis elegans</i>	H1-Box	AT <b>GTGTCCCCGC</b> AGGGTGGTA	62% GC
<i>Chironomus thummi</i>	H1-Box	GAGG <b>CTTCGTTTCCAT</b>	50% GC
<i>Chironomus tentans</i>	H1-Box	GAGG <b>CTTCGTTTCCAT</b>	50% GC
<i>Drosophila hydei</i>	H1-Box	TCCT <b>CCTCGATTCTCA</b>	50% GC
<i>Drosophila melanogaster</i>	H1	TCCT <b>CCTCGATTCTCA</b>	50% GC
<i>Volvox carteri</i>	H1 I-Box	GGG <b>GATCAGCG</b> GGCCA	75% GC
<i>Volvox carteri</i>	H1 II-Box	G <b>CGGGTCACCG</b> GGCCA	81% GC

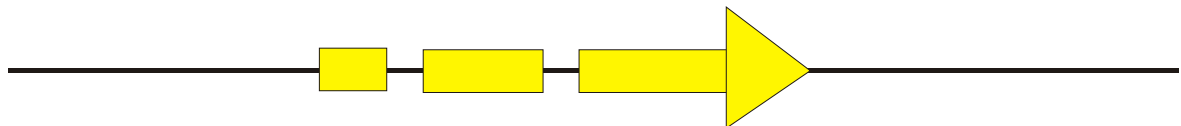
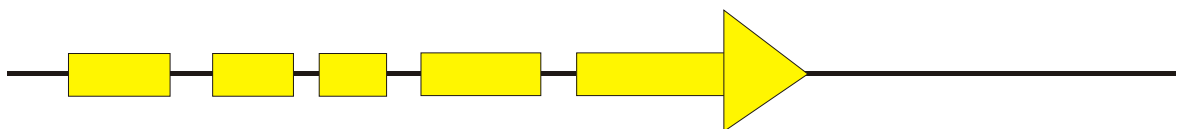
**3.2.2 Vergleich der kodierenden DNA-Sequenzen**

Die meistens Gene von *C. elegans* haben 2 bis 3 Introns, die kürzer als bei Vertebraten und auch bei Hefen sind (RIDDLE, 1997). Die Länge beträgt nur 44 bis 52 Nukleotide.

Im Gegensatz dazu besitzen alle H1-Gene von *C. elegans* — außer H1.Q und H1.X — nur ein einziges Intron (Abb. II) mit Längen von 56 bp (Intron von Histon H1.3 ) bis 246 bp (Intron von Histon H1.6). Das kleine H1.Q Gen, das nur 59 Aminosäurereste kodiert, besitzt zwei Introns und das ungewöhnliche H1.X Gen 4 Introns. Das kleinste Intron der Histon Isoform H1.X ist 51 bp lang, das längste hat 1577 bp. Gene mit so einem langen Intron kommen bei *C. elegans* selten vor. Die Intronlängen von einzelnen H1-Isoformen sind in der Tabelle 3 angegeben.

**Abb. II**

Die Struktur der H1-Genfamilie. Die Exons sind auf gelb markiert.

**Struktur der Gene****H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5:****H1.Q:****H1.X:**

**Tabelle 3**

Die Exon- und Intron-Längen (bp) mit 5' splice site consensus der H1-Genfamilie.

Die Exons und Introns sind mit Nummern und die Introns zusätzlich unterstrichen gekennzeichnet.

	1	<u>1</u>	2	<u>2</u>	3	<u>3</u>	4	<u>4</u>	5	5' splice site consensus
<b>H1.1</b>	237	<u>103</u>	387							GGT
<b>H1.2</b>	237	<u>220</u>	336							GGT
<b>H1.3</b>	237	<u>56</u>	387							GGT
<b>H1.4</b>	279	<u>186</u>	480							GGT
<b>H1.5</b>	237	<u>159</u>	438							GGT
<b>H1.6</b>	345	<u>246</u>	225							GGT
<b>H1.Q</b>	80	<u>58</u>	96	<u>87</u>	4					GGT GGT
<b>H1.X</b>	135	<u>51</u>	99	<u>1577</u>	60	<u>142</u>	135	<u>346</u>	267	GGT, GGT GGT, GGT

Die Introns fangen am 5' splice site consensus mit den drei Nukleotiden **GGT** an (Alignment 2 und Tabelle 3), was für *C. elegans* Gene sehr selten ist. Der 5' splice site consensus bei *C. elegans* stellt die Sequenz **CA-TC** dar (RIDDLE, 1997).

### 3.2.3 Vergleich der Primärstrukturen der Histon H1-Isoformen

Die Histon H1-Genfamilie ist eine archaische 'replacement' Histon-Typ Genfamilie. Neben der Polyadenylierung der mRNA und dem Vorkommen von Introns besitzt sie eine konservative globuläre Domäne.

Die Primärstruktur des Histons H1 gliedert sich in drei Domänen (Alignment 3): die N- und C-terminale Domäne, die divergent sind und zwischen den H1-Isoformen verschieden sind, und die zentrale, konservative globuläre Domäne.

Die N-terminale Domäne der Histon H1-Familie besitzt ca. 35 Aminosäurereste, ist Lysinreich und unstrukturiert. Sie läßt sich noch in einen Prolin- und Alanin-reichen, proximalen Abschnitt und einen Lysin-reichen, proximalen Abschnitt unterteilen. Die N-terminale

Domäne von H1.2 enthält eine repetitiven Tripeptid der Aminosäurereste: **KAP-KAP**, von H1.3: **PKA-PKA**, von H1.4 und H1.5: **TKA-SKA** (Alignmnet 3).

Die N- terminale Domäne der Histon Isoform H1.X ist ungewöhnlich. Sie enthält Methionin (M), Leucin (L), Tyrosin (Y) — sehr hydrophobe Aminosäurereste, und kein Lysin (K), das für Histon H1 typisch ist und bei H1-Isoformen so oft vorkommt.

Die gesamte Anzahl der negativen Ladungen (Asparaginsäure und Glutaminsäure) H1.X beträgt 17 (zum Vergleich H1.1: nur 8). Es existieren keine Proteine, welche der Sequenz der N-terminalen Domäne von H1.X entsprechen.

Die globuläre Domäne ist zur 'winged helix' gefaltet, besitzt ca. 75 Aminosäurereste und ist stark konservativ. Auch das H1.X Protein zeigt in diesem Bereich eine Übereinstimmung. Die Ähnlichkeit zwischen den cDNA H1-Isoformen beträgt in der zentralen Domäne 85% bis 55% (Tabelle 4).

#### **Tabelle 4**

Ähnlichkeit der cDNA der H1-Isoformen in Prozent (%). Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (THOMPSON et al., 1994) erstellt (JEDRUSIK und SCHULZE, 2001).

##### a) Vergleich aller cDNAs der H1-Isoformen

	H1.2	H1.3	H1.4	H1.5	H1.6	H1.X	H1.Q
H1.1	63	59	63	68	49	37	36
H1.2		62	58	70	62	37	33
H1.3			57	57	53	35	34
H1.4				67	47	38	32
H1.5					58	37	39
H1.6						36	32
H1.X							28

## b) Vergleich der globulären Domänen

	H1.2	H1.3	H1.4	H1.5	H1.6	H1.X
H1.1	73	77	69	71	71	57
H1.2		83	75	79	85	55
H1.3			72	73	77	55
H1.4				81	74	59
H1.5					78	55
H1.6						56

## c) Vergleich der C-terminalen Domänen

	H1.2	H1.3	H1.4	H1.5	H1.6	H1.X	H1.Q
H1.1	43	52	46	53	34	39	47
H1.2		63	51	62	62	35	52
H1.3			54	52	46	34	44
H1.4				62	39	37	41
H1.5					49	42	48
H1.6						29	47
H1.X							39

Die C-terminale Domäne enthält ca. 100 Aminosäurereste und 40% Lysin. Sie zeigt außerdem eine gleichmäßige Verteilung der positiven Ladungen. Jede H1 Variante hat nur eine cdc2-Kinase Erkennungssequenz (Alignment 3)- **SPKK**.

Die Histon Isoform H1.4 besitzt als einzige Variante ein Alanin (A)-, Lysin (K)-, Threonin (T)-reiches, repetitives Motiv mit der Sequenz **A[A]KKD[A]ATGEKKATTTV**.

Alle H1-Isoformen, außer H1.X und H1.Q, haben die gleichen konservativen Motive wie **KVKKA[V]K** und **V[I]AKP[S]A[T,P]A[V]KKV[A]A[T]K**.

Die gesamte Länge (59 Aminosäurenreste) des H1.Q Proteins entspricht einem Abschnitt der C-terminalen Domäne (Tabelle 5).

### **Tabelle 5**

Die Tabelle zeigt die Anzahl der Aminosäurereste (AA) aller H1-Isoformen und das Molekulargewicht (Da).

	Länge AA	Molekulargewicht (Da)
H1.1	207	21236
H1.2	190	19648
H1.3	207	21576
H1.4	252	25827
H1.5	224	23259
H1.6	189	19616
H1.Q	59	6081
H1.X	231	25231

Die C-terminalen Domänen der H1-Isoformen stimmen von 29% bis 63% überein (Tabelle 4).

Die C-terminale Domäne des H1.X Proteins ist Lysin- und Leucin-reich. In der Tabelle 4 ist die prozentuale Ähnlichkeit zwischen allen cDNAs von *C. elegans* angegeben. Sie liegt zwischen 28% und 70%. Das H1.X Protein ist das divergente Protein. Es weist eine Ähnlichkeit von 37% mit anderen H1-Proteinen auf.

### **3.2.4 Besondere Sequenzmotive in einzelnen H1-Isoformen**

Das Linkerhiston H1 in Eukaryonten gliedert sich in die zentrale, globuläre Domäne, die von N-terminalen und C-terminalen Domänen flankiert wird.

Bei allen multizellulären Eukaryonten ist die zentrale Domäne konserviert und zur 'winged helix' Struktur gefaltet. Nur die N- und C-terminalen Domänen sind bei Tieren, Pflanzen und Pilzen sehr heterogen, wenn es sich um die Längen- und Aminosäurereste-Komposition handelt (KASINSKY et al., 2001).

Meistens ist die N-terminale Domäne reich an Lysin (K), Alanin (A) und Prolin (P). Diese Aminosäurereste bilden bei der Diptere *Chironomus* ein repetitives Motiv **KAP-KAP** (SCHULZE et al., 1992). Durch diese Insertion unterscheiden sich die einzelnen H1-Isoformen bei *Chironomus*-Arten von den anderen Isoformen dieser Arten. Diese Insertions-enhaltenden Isoformen sind nur in bestimmten Chromatinregionen der Chromosomen von *Chironomus* vorhanden (Übersicht von GROSSBACH, 1995; WISNIEWSKI und GROSSBACH, 1996). Auch andere Arten wie *Volvox* (LINDAUER et al., 1993), *Triticum* (STEINHOFF, 1998) sowie die H1.2-Isoform von *C. elegans* enthalten dieses Motiv. Ebenfalls eine der H1-Isoformen von *Glyptotendipes* und *Mytilus* enthält ein verwandtes Motiv in einer SPAK Insertion (SCHULZE et al., 1994). Auch hier werden Funktionsunterschiede vermutet. Welche Rolle dieses Motiv bei *C. elegans* spielt, ist unklar. Es wurde aber in Kapitel 3.4 gezeigt, dass die H1.2-Isoform ein starker Repressor in der Dauerlarven ist.

Die terminalen Domänen verschiedener Spermien-H1-Histone von Seeigeln (STRICKLAND et al., 1982) enthalten ein mehrfach wiederholtes Peptidmotiv (**SPKK**), das sich an die kleine Grube der DNA-Doppelhelix bindet (SUZUKI, 1989). Die Lage des N-terminalen SPKK-Motiv, bezogen auf den konservierten Methioninrest, entspricht der Lage des KAP-repeats der H1 I-1 Isoform von *Chironomus* (Schulze, 1992).


In der Abb. III ist der Sequenzvergleich der N-terminalen Domänen der Histon Isoform H1.2 von *C. elegans* mit anderen Organismen dargestellt.



**Abb. III**

Sequenzvergleich des repetitiven Ausschnittes der N-terminalen Domänen zwischen Histon H1.2 von *C. elegans* und H1-Isoformen der anderen Organismen (Die Sequenzen von *C. thummi* kommen von SCHULZE et al. (1993); *C. tentans* von SCHULZE (1992), *Volvox* von LINDAUER et al. (1993), *Triticum* von STEINHOFF (1998), *Glyptotendipes* von Schulze et al. (1994), *Parachinus angulosus* von STRICKLAND et al. (1980) und *Paracentrotus* und *Mytilus* von HILL et al (1989)).

## Das KAPKAP-Motiv und verwandte Motive in H1.2 von *C. elegans* und einzelnen Isoformen anderer Organismen.



<b>KAP KAP</b> KS -	H1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>KAP KAP KAP</b> KSP KAE-	H1-I-1 <i>Chironomus th. piger</i>
<b>KAP KAP</b> KSP KAE-	H1-I-1 <i>Chironomus th. thummi</i>
<b>KAP KAP</b> KAE-	H1e <i>Chironomus tentans</i>
<b>KAP KAP</b> KAE-	H1e <i>Chironomus pallidivittatus</i>
<b>KAP KAP</b> KAE-	H1-I <i>Chironomus dorsalis</i>
<b>KAP KQP KAP KAP KEP KAP K</b> -H1-I <i>Volvox carteri</i>	
<b>KAP</b> KAA-	WH1A.1 <i>Triticum aestivum</i>
<b>KPA KAP</b> KAA-	WH1A.2 <i>Triticum aestivum</i>
<b>KAP</b> KAA-	WH1A.3 <i>Triticum aestivum</i>
<b>KPA KAP</b> KAA-	WH1A.4 <i>Triticum aestivum</i>

<b>SPAK SPAK SPGR-</b>	H1-I <i>Glyptotendipes barbipes</i>
<b>SPAK-</b>	H1-II <i>Glyptotendipes barbipes</i>
<b>SPAK-</b>	H1-III <i>Glyptotendipes barbipes</i>
<b>TPAK SPAK SPGR-</b>	H1-I <i>Glyptotendipes salinus</i>
<b>SPRK SPRK SPKK SPKK -</b>	H1 <i>Paracentrotus Spermien</i>
<b>SPRK SPRK SPKK SPRK -</b>	H1sp <i>Parechinus angulosus</i>
<b>SPKR SPAK-</b>	H1 <i>Mytilus Spermien</i>

Die C-terminale Domäne des H1.1 Gens von *C. elegans* besitzt das Motiv **KPK**, das auch bei *Volvox carteri* in der Anzahl 5 im Histon H1.I, 8 im Histon H1-II, bei *Chironomus thummi piger* in der Anzahl 3 im Histon HI-1 und 8 im Histon II-1 gefunden worden ist (SCHULZE, 1992). Diese Domäne ist bei vielen Arten, z.B.: *Volvox carteri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dictyostelium discoideum*, wie auch bei *C. elegans*, *Chironomus thummi thummi* reich an Alanin (A) und Lysin (K). Lysin macht mehr als 40% der Aminosäurereste in der C-terminalen Domäne aus (SCHULZE, 1992).

Bei *C. elegans* hat die H1.4-Isoform längere Insertionen **TKA-SKA** in der N-terminalen sowohl auch **A[A]KKD[A]ATGEKKATTTV** in der C-terminalen Domäne. Dieses Protein mit den längeren repetitiven Motiven unterscheidet sich von allen anderen H1-Isoformen von *C. elegans* (Alignment 3). Die Insertion TKA-SKA wiederholt sich dreimal in der N-terminale Domäne und die Insertion **A[A]KKD[A]ATGEKKATTTV** zweimal in der C-terminale Domäne. In den C-terminalen Domänen des Histons H1.4 und des Histons H1.6 befinden sich ein Motiv **KKAAAKPA**, das auch bei *Strongylocentrotus purpuratus* (H1.γ), *Chironomus tentans* (H1e), *Chironomus pallidivittatus*, *Glyptotendipes salinus* und *Glyptotendipes barbipes* (H1-I) gefunden wurde (KNOWLES et al., 1987; SCHULZE, 1992; SCHULZE et al., 1994).

Die mögliche Funktion der Insertionen in der N-terminalen Domäne sowie in der C-terminalen Domäne der H1.4-Isoform wurde nicht untersucht. Man kann aber vermuten, dass die zusätzlichen Lysin-Reste die Bindung an die DNA ermöglichen.

### **3.3 Einfluß des Histons H1.1 auf Chromatin silencing und die Entwicklung der Keimbahnzellen**

#### **3.3.1 Expressionsmuster des Histons H1.1**

##### **3.3.1.1 Charakterisierung des polyklonalen Antiserums gegen H1**

Die Funktion, sowie das Expressionsmuster der Histon Isoform H1.1 bei *C. elegans* war bisher nicht bekannt und wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht und beschrieben. Der erste Schritt, um die Expression des H1 Proteins kennenzulernen, war die Produktion von möglichst spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen das Histon H1. Mit großer Wahrscheinlichkeit konnte man bei der Herstellung des polyklonalen Antikörpers mit Kreuzreaktivität gegen alle H1-Isoformen rechnen, da die globuläre Domäne von H1-Isoformen hoch konservativ ist (Alignment 3). In der dargestellten Tabelle 4 beträgt die Ähnlichkeit der globulären Domänen der H1-Isoformen 59% bis 85%.

Zuerst wurden rekombinante Proteine von allen H1-Isoformen hergestellt und das Preimmunserum auf dot-blots getestet.

Mit allen H1 cDNA-Varianten wurde die PCR-Mutagenese durchgeführt und im Stamm *E. coli* BL21(DE3) die H1-Proteine exprimiert.

Das H1.1 Protein mit dem Molekulargewicht von 21,235 kDa wurde in *E. coli* BL21(DE3) gut exprimiert und ist auf dem SDS-Polyacrylamid Gel bis zur Höhe 31,0 kDa (Promega mid-range Marker) gelaufen, da die N- und C- terminalen Domänen des H1.1 Proteins lysinreich und positiv (+) geladen sind. Das Molekulargewicht von anderen H1-Isoformen ist in Tabelle 5 angegeben. Im 12,5% SDS-Polyacrylamid Gel (Abb. 2) sind die rekombinanten Proteine H1.3 und H1.5 auf derselben Höhe, unter dem H1.1 Protein gelaufen (der Unterschied ist sehr klein), das H1.4 über dem H1.1 Protein, das H1.2 Protein deutlich unter dem H1.1 Protein und das kleine H1.Q Protein ist bis zur Höhe von 11 kDa gelaufen. Von allen H1-Isoformen wurde das Protein der Histon Isoform H1.4 am besten exprimiert und deshalb zur Herstellung von polyklonalem Antiserum gegen H1 Proteine für die Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Die IgG-Fractionen des Antiserums wurden vorgereinigt und enthielten 16,7 mg/ml Protein.

Die Sulfolink™-Säulen der Firma Pierce wurden mit den rekombinanten Histonen H1.1 und H1.4 (Konzentration jeweils 1 mg) nach einem Reinigungsschritt über 'reversed-phase'- HPLC gekoppelt.

Die Sulfolink™-Säulen wurden mit 6 mg vorgereinigter IgG-Fraktion beladen. Die Konzentration des jeweils durch eine Säule affinitätsgereinigten Antiserums betrug für polyklonales Antiserum gegen das H1.4 Protein — gereinigt über H1.1-Säule — 53 µg/ml und für polyklonales Antiserum gegen das H1.4 Protein — gereinigt über H1.4-Säule — 15 µg/ml. Zusätzlich wurden H1.4-spezifische Antikörper zuerst mit einer H1.1-Säule und anschließend mit einer H1.4-Säule gereinigt. Die Konzentration der erhaltenen Antikörperfraktionen wurde für αH1 mit 14,9 µg/ml bestimmt. Nach der Reinigung des Antiserums wurde die Spezifität der einfach gereinigten αH1 (über H1.1 Säule), αH1-Antikörper (über H1.4 Säule) und des zweifach gereinigten αH1-Antikörpers auf dot-blots getestet (Abb. 1).

Die dot-blots ergaben für den affinitätsgereinigten αH1-Antikörper (über H1.1 Säule sowie über H1.4 Säule) eine hohe Spezifität für H1.4 und eine schwächere Reaktion mit H1.3 und H1.5. Die Histon Isoformen H1.1, H1.2 und H1.Q wurden mit diesem Antikörper nur sehr schwach nachgewiesen (siehe Abb.1 A und B). Das Signal war in der niedrigsten Verdünnung (1:15) für H1.4, H1.3 und H1.5 sehr deutlich, für die anderen Histon Isoformen H1.1, H1.2 und H1.Q dagegen sehr schwach. Bei der Verdünnung 1:75 wurde ausschließlich das Histon H1.4 nachgewiesen.

Diese Fraktionen, deren polyklonaler Antikörper gegen H1.4 über einer H1.1 und H1.4 Sulfolink-Säule gereinigt worden war, wurden mit allen sieben H1-Isoformen getestet und waren nicht reaktiv mit H1.X und BSA als Kontrolle. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Primärstruktur des Histons H1.X hoch divergent gegenüber anderen H1-Isoformen ist.

Die doppelte Reinigung des αH1 Antikörpers mit Eliminierung der kreuzreaktiven Antikörper auf der H1.1-Säule produzierte einen H1.4 spezifischen Antikörper, der im dot-blot fast keine Kreuzreaktivität mit anderen H1-Isoformen zeigte. Dafür ist das Signal schwächer als bei dem einfach gereinigten Antikörper und ebenfalls nur in der niedrigsten Verdünnung (1:15) nachzuweisen. Deshalb wurde dieser Antikörper nicht für die Immuncytologie von *C. elegans* verwendet.

### **3.3.1.2 Präsenz aller H1-Isoformen in den gesamten Proteinen (Totallysat) von *C. elegans***

Um die gereinigten Antikörper weiter zu charakterisieren und um ihren Einsatz für die Immunhistologie/Cytologie zu optimieren, wurde ein western-blot mit dem *C. elegans* Totallysat durchgeführt (Abb. 2).

Das polyklonale Serum gegen das Histon H1.4, auf der H1.1 Sulfolink-Säule gereinigt, wurde in der Konzentration von 53 µg/ml in der Verdünnung 1:100 verwendet.

Auf dem western-blot des Totallysats von *C. elegans* konnte man 4 Banden nachweisen, die dem Histon H1.2, der Mischung der Histone H1.3, H1.5, H1.1 entsprechen. Weiterhin war eine sehr deutliche Bande des Histons H1.4 und des Histons H1.Q zu erkennen. Als Marker für die Histon H1-Banden auf dem western-blot wurden die rekombinanten H1 Proteine verwendet.

Es wurde auf dem western-blot keine andere Bande außer den H1-Banden nachgewiesen.

Die hohe Präferenz für das H1.4 Protein stammt von dem polyklonalen Antiserum, das gegen die Histon Isoform H1.4 hergestellt wurde.

Das gereinigte polyklonale Antiserum war mit allen H1-Isoformen außer dem Histon H1.X reaktiv. Es wurde auch keine Reaktivität mit anderen *C. elegans* Proteinen nachgewiesen.

Für diesen Test wurde kein-rekombinantes Protein H1.6 verwendet (die cDNA ist nicht verfügbar; Stand: Januar 2001). Es ist aber wahrscheinlich, dass der Antikörper auch mit diesem Protein reaktiv wäre, wenn es exprimiert würde.

Die H1.6 DNA ähnelt denen von anderen H1-Isoformen und besitzt eine konservative, globuläre Domäne, wie andere Histon H1 Isoformen (Tabelle 4).

### **3.3.1.3 Immundetektion des Histons H1 in somatischen Zellen und Keimbahnzellen**

Das polyklonale Antiserum gegen das Histon H1 wurde in der Konzentration von 53 µg/ml in der Verdünnung 1:20 für die Immunocytochemie von *C. elegans* verwendet.

Es wurde ein Signal in allen Zellkernen – somatischen, sowie auch in den Keimbahnzellen (Abb. 3) – von Embryonen detektiert. Das Antiserum dekoriert im 4-Zell-Stadium-Embryo die Zellkerne der Zelllinien AB, MS, E und auch die P-Zelle, den Vorläufer der Keimzelllinie. Die DNA-Färbung entspricht der Dekoration des Antikörpers (Abb. 3, die Embryonen in verschiedenen Zellstadien).

Der Antikörper hat auch das frühe L4 Stadium mit undifferenzierten Keimbahnzellen, die ganze Gonade der adulten Hermaphroditen (Abb. 4) (die undifferenzierten Keimbahnzellen, sowie Spermien und Oocyten) und auch die ganze männliche Gonade (die undifferenzierten Keimbahnzellen in mitotischem und meiotischem Stadium, Spermatiden, Spermatocyten und Spermien) gefärbt.

Das polyklonale Antiserum war mit allen H1-Isoformen (außer dem H1.X Protein) reaktiv, deshalb kann man in der cytologischen Färbung nicht ableiten, von welcher H1-Isoform das Signal stammt. Man weiß aber, dass das Histon H1.1 am stärksten exprimierten Linkerhiston ist (VANFLETEREN et al., 1988; VANFLETEREN et al., 1990). Da die adulten Hermaphroditen von *C. elegans* neben seinen 959 somatischen Zellen (WOOD, 1988) mehr als 1000 Keimbahnzellen besitzen, ist das denkbar, dass H1.1 Protein in der Keimbahn exprimiert wird. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass in den betreffenden Keimbahnzellkernen mindestens eins der normalen H1 Histon Proteine vorhanden sein muß.

#### **3.3.1.4 Expressionsmuster des *H1.1::GFP***

Um das Expressionsmuster des H1.1 Proteins im lebendigen Organismus besser kennenzulernen, wurde ein transgener Stamm von *C. elegans* (EC 100) hergestellt.

Dazu wurde die H1.1 DNA mit den primern MJ08 und MJ05 aus dem Cosmid M163 amplifiziert. Es wurde das *H1.1::gfp* Konstrukt hergestellt, wobei das Stopcodon und die 3'UTR Sequenz des Konstruktes durch die Umklonierung mit *Stu I* abgetrennt wurden.

Deshalb wurde auch ein zweites Konstrukt *H1.1::gfp* hergestellt, welches das Stopcodon und die 3'UTR Sequenz erhalten hat. Zusätzlich wurde ein neuer transgener Stamm EC101 (*H1.1::gfp::CeH1.1 3' UTR*) erzeugt.

Die Konstrukte wurden als circuläre Plasmide in jeweils 21 Tiere des Wildtyps injiziert.

Das Signal des *H1.1::GFP* Konstruktes wurde schon ab dem 8-Zellstadium der Embryonen in allen somatischen Zellkernen beobachtet. Man konnte die kondensierten Chromosomen in jedem Zellkern erkennen (Abb. 5). In der P-Zelle (der Vorläufer der Keimzelllinie) wurde kein Signal beobachtet (Abb. 5). Es ist bekannt, dass in transgenen Linien mit extrachromosomalem Array das Protein nicht in Keimbahnzellen exprimiert wird (sogenannter 'silencing' Effekt).

Das Signal des *H1.1::gfp* Konstruktes wurde während der weiteren Entwicklung von *C. elegans* in allen somatischen Zellkernen sowie in den somatischen Zellkernen der Gonade (so genannter 'Christmas-tree', Abb. 6 C) beobachtet, aber fast nie in den Keimbahnzellen. Nur vier adulte Hermaphroditen von insgesamt 210 Tieren haben das GFP Signal in undifferenzierten Keimbahnzellen, Spermien und Oocyten gezeigt, trotz des silencing Effektes (Abb. 7 A und B). In diesen vier Tieren wurde das *H1.1::GFP* sehr stark in der Keimbahn und auch in den somatischen Zellen exprimiert.

Für die Beobachtung des GFP Signals in der männlichen Gonade wurde ein spezieller Stamm hergestellt. Es wurde der transgene Stamm EC100 (*H1.1::gfp*) mit *him-8(e1489)* gekreuzt und die männliche Gonade des F1 Nachwuchses analysiert. Das *H1.1::GFP* Signal wurde in männlichen Spermien und Spermatocyten beobachtet (Abb. 7 C und D) und sehr schwach in undifferenzierten Keimbahnzellen. Das *H1.1::GFP* Protein wurde sowohl in somatischen, wie auch in Keimbahnzellen exprimiert.

Ein anderes Ergebnis lieferte das Konstrukt *H1.1::gfp::CeH1.1 3'UTR* (Abb. 10). Es wurde nur ein Signal in den Nervenzellen beobachtet, das vom Marker *HMGL.β::gfp* stammt und ein sehr schwaches Signal in polyploiden Zellen des Darmes aufwies. Es wurde kein Signal in anderen somatischen Zellkernen, sowohl in Keimbahnzellen — als auch beim Konstrukt *H1.1::gfp* — gesehen.

Das fehlende Signal des Konstruktes *H1.1::gfp::CeH1.1 3'UTR* in den Keimbahnzellen kann man mit dem 'silencing' Effekt erklären.

### 3.3.2 Cytologische Effekte nach der H1 dsRNA Injektion

Zur Aufklärung der Funktion von H1 Proteinen wurde die doppelsträngige RNA (dsRNA) in beiden Gonaden des L4 Stadiums oder der adulten, jungen Hermaphroditen der Stämme N2 und *him-8* injiziert.

Es wurde von sieben H1-Isoformen die doppelsträngige RNA hergestellt und in der Konzentration von 5 mg/ml injiziert. Nach der Injektion wurden die Hermaphroditen einzeln auf NGM-Agar-Platten gehalten und alle 24 h umgesetzt. Dann wurde die Anzahl der toten Embryonen gezählt und die cytologischen Effekte und Verhalten, wie Bewegung des F1- und F2-Nachwuchses unter dem Binokular beobachtet.

Die Anzahl der toten Embryonen in der 'midproliferation'-Phase nach der H1.1 dsRNA Injektion war mit 4,6% nicht besonders hoch und nur viermal höher als bei der Kontrolle (dsRNA eines irrelevanten Gens). Bei anderen H1-Isoformen wurde ein Effekt beobachtet, der zweimal höher als bei der Kontrolle war. Die Anzahl der toten Embryonen war gering, deshalb scheint das Histon H1.1 oder scheinen andere H1-Histone keine essentielle Rolle für die Überlebensrate von Embryonen zu spielen.

Die doppelsträngigen RNAs von fünf H1-Isoformen zeigten keinen Einfluß auf die Anzahl und die Qualität der Kerne in der Keimbahn von *C. elegans*. Es wurde kein Effekt in allen Entwicklungsstadien (außer der Dauerlarven) von *C. elegans* beobachtet. Nur die dsRNA von H1.1 zeigte einen deutlichen Effekt auf die Anzahl und die Differenzierung der Keimbahn.

Die cytologischen Effekte und die embryonale Letalität aller H1-Isoformen sind in Tabelle 6 in Prozenten (%) zusammengestellt.

Von 726 F1 Hermaphroditen wurden 35 Hermaphroditen mit einer anormalen Struktur der Gonaden beobachtet (Abb. 8). Dies sind 5% der F1 Tiere mit dem dsRNA H1.1 Effekt.

Bei 95% der F1 Tiere wurde überhaupt kein Effekt in den Gonaden beobachtet, die Kerne in der Keimbahn sahen normal aus und die Anzahl der abgelegten Embryonen entsprach der des Wildtyps.

Bei 5% der F1 Tiere war die Anzahl der Kerne in der Keimbahn reduziert. Mit der DNA-Färbung wurden bei 35 F1 Tieren nur  $634 \pm 124$  Kerne in der Keimbahn gezählt. Zum Vergleich wurden bei neun jungen adulten Hermaphroditen vom Wildtyp  $989 \pm 123$  Kerne in der Keimbahn gezählt. Die Kerne der Keimbahn in betroffenen Tieren haben wie 'donuts' ausgesehen, es waren keine Oocyten zu erkennen. Die Fertilität dieser Tiere war drastisch reduziert. Der N2-Wildtyp legt etwa  $192 \pm 53$  Embryonen während des gesamten Lebens ab (5 N2 Tiere beobachtet); die F1 Tiere haben nur  $101 \pm 21$  Embryonen abgelegt (11 F1 Tiere beobachtet). Die Anzahl der Embryonen war fast um die Hälfte reduziert. Bei den abgelegten Embryonen der F1 Tiere konnte kein Effekt in den Kernen der Keimbahn beobachtet werden. Die dsRNA von H1.1 hat nur Einfluß auf die erste Generation der Tiere nach der Injektion.



**Tabelle 6**

Die cytologischen Effekte und die embryonale Letalität nach der Injektion der sieben H1 dsRNA Isoformen.

Die Prozente (%) der F1 Hermaphroditen und die Prozente (%) der toten Embryonen stammen von injizierten Wildtyp-Tieren, die Prozente (%) der F1 Männchen von injizierten Hermaphroditen aus dem *him-8* Stamm.

Bei dem F1 Nachwuchs wurden die cytologischen Effekte in der Keimbahn unter der Nomarski-Optik beobachtet, sowie die Anzahl der toten Embryonen gezählt. In der zweiten Zeile der Tabelle wurde die Anzahl der F1 Tiere angegeben, bei der im L1 und L2 Stadium ein zweites Mal dsRNA injiziert wurde. Von den 73 doppelt injizierten Tieren zeigten 8 Tiere die cytologischen Effekte in den Kernen der Keimbahnzellen. Davon waren 7 Tiere steril. In Klammern ist die Anzahl der beobachteten Tiere angegeben, (n) gibt die Anzahl der injizierten Hermaphroditen an, (nb) bedeutet nicht beobachtet.

RNAi	Prozent (%) F1 der Hermaphroditen	Prozent (%) F1 der Männchen	Prozent (%) der toten Embryonen
H1.1	4,7 ( 726, n=35)	0 ( 656, n=31)	4,6 (1296, n=34)
H1.1 injizierte L1/L2	11 ( , n=73)	nb	-
H1.2	0 ( 631, n=20)	0 ( 345, n=10)	2,3 ( 945, n=20)
H1.3	0 ( 735, n=20)	0 (2341, n=12)	1,3 ( 345, n=20)
H1.4	0 (1443, n=20)	0 (2341, n=20)	4,8 (1150, n=20)
H1.5	0 ( 567, n=20)	0 ( 732, n=12)	2,4 ( 989, n=20)
H1.X	0 ( 871, n=12)	0 ( 921, n=12)	4,7 (1453, n=32)
H1.Q	0 ( 531, n=11)	0 ( 248, n=10)	1,4 ( 897, n=18)
Mix von allen H1	0,6 ( 630, n=20)	nb	nb
Kontrolle	0 ( 433, n=16)	0 ( 345, n=16)	1,2 ( 727, n=16)

Der beobachtete Effekt war dem *mes*-Phenotyp ähnlich und wurde mit *mes-2*, *mes-3*, *mes-6* Tieren verglichen. Die *mes*-Gene werden für die Proliferation und Differenzierung der Keimbahn bei *C. elegans* benötigt (CAPOWSKI et al., 1991) und sind an dem silencing Effekt in der Keimbahn beteiligt (KELLY und FIRE, 1998).

Eine große Ähnlichkeit wurde zwischen den F1 Tieren und *mes-3* Tieren festgestellt, bei denen die Anzahl der Kerne in der Keimbahn reduziert ist und die Keimbahnzellen undifferenziert sind (PAULSEN et al., 1995).

Um nachzuweisen, daß dsRNA von H1.1 die Menge des Linkerhiston Proteins in Gonaden beeinflußt hat, wurde eine Immunfärbung mit dem Antikörper gegen H1-Isoformen durchgeführt. Als Kontrolle für die Antikörperpenetration wurde die Immunfärbung mit einem monospezifischen Antikörper gegen Intermediärfilamentproteine (IFA) (von K. Weber) gleichzeitig auf denselben Objekten (F1 Tiere und N2-Wildtyp Tiere) durchgeführt. Bei allen 32 F1 Tieren war das Signal im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert (Abb. 9 A und B). Das schwache Signal im Kern, das noch beobachtet werden konnte, könnte von anderen H1-Isoformen stammen, da der Antikörper nicht monospezifisch ist und die dsRNA H1.1 nicht alle H1-Isoformen eliminiert.

Die Immunfärbung durch die IFA Antikörper hat eine gute Penetration gezeigt. Daraus folgert man, dass das schwache Signal des H1 Antikörpers im F1 Tier nicht an der Permeabilisierung liegen kann, sondern die tatsächliche Menge des Histon H1 Proteins widerspiegelt (Abb. 9 G und H).

Das Experiment wurde modifiziert, um die Rate der Tiere mit dem H1.1 Phenotyp zu erhöhen. Es wurden die L1, L2 Tiere der injizierten Hermaphroditen noch einmal mit dsRNA H1.1 injiziert; der Effekt wurde an jungen, adulten, doppelinjizierten Tieren beobachtet. Die doppelinjizierten Tiere wurden auf 'feeding'-Platten gesetzt.

Der Prozentanteil der Tiere mit dem H1.1 Phenotyp hatte sich verdoppelt. Es wurde bei 11% von insgesamt 73 doppelinjizierten Tieren ein cytologischer Effekt in den Gonaden beobachtet. 7 von 8 Tieren waren steril. Sie hatten mehr geschwollene ('donuts' ähnliche) Kerne in der Keimbahn als nach der ersten Injektion (Abb. 11 C).

Ansonsten war die ganze Gonade bei adulten Hermaphroditen anormal, man konnte weder Oocyten noch Spermatheka (hier findet die Befruchtung statt) erkennen. Die Anzahl der Kerne in der Keimbahn wurde noch stärker reduziert; anschließend wurden mit DNA-Färbung nur noch  $214 \pm 36$  Kerne in der Keimbahn gezählt. Das ist ein Drittel der Menge der Kerne in der Keimbahn, verglichen mit dem Wert nach nur einer Injektion.

Der Effekt ähnelte noch mehr dem *mes-3* Phenotyp (Abb. 11 B).

Es wurden auch die Hermaphroditen des *him-8* Stammes injiziert, um zu beobachten, ob bei Männchen der cytologische Effekt des H1.1 eintritt. Es wurden insgesamt 31 Tiere

injiziert und 656 Männchen beobachtet, dabei wurde kein Effekt festgestellt. Alle Männchen haben normale, gesund aussehende Kerne in der Keimbahn gehabt, wie auch beim *mes-3* Phenotyp. Es wurde keine Reduktion der Kerne in der Keimbahn bzw. Sterilität ermittelt.

Es wurde eine Mischung der doppelsträngigen RNA der anderen H1-Isoformen benutzt, um den Einfluß von anderen H1-Isoformen auf die Keimbahn auszuschließen.

Die reduzierte Konzentration der H1.1 dsRNA in der Mischung der H1-Isoformen (H1.1 dsRNA Konzentration: 0,57 µg/µl) hat nur die Rate der beobachteten Tiere mit Effekt in der Keimbahn beeinflußt.

Es wurden nur 0,6% F1 Tiere mit dem H1.1 Phenotyp beobachtet.

In dieser Arbeit wurde damit erstmalig ein Einfluß des Linkerhistons H1 auf die Entwicklung und Differenzierung der Keimbahn im Metazoen-Reich nachgewiesen und beschrieben.

### **3.3.3 Einfluß des Histons H1.1 auf die Gen-Repression in der Keimbahn**

Das Ziel dieses Experiments war es, spezifisch die Expression einzelner H1 Isoformen auszuschalten und hinzuweisen, welche H1-Isoform für die Gen-Repression in der Keimbahn beteiligt ist.

Es wurden 12 Typen von dsRNA aus den sieben verschiedenen Histon H1 cDNA Sequenzen abgeleitet. 7 davon entsprachen der Volllänge der cDNA H1-Isoformen. Es wurden 3'-spezifische Fragmente für H1.2, H1.4, H1.5 und H1.1 hergestellt, um die Kreuzreaktion mit anderen H1-Isoformen auszuschließen. Für die Histon Isoform H1.1 wurde eine spezifisches 3'-nicht-kodierendes cDNA Fragment (269 bp) für die dsRNA hergestellt. Es wurde eine Deletion mit den Enzymen *Sma* I und *Stu* I durchgeführt. Das 650 bp-Fragment, das die N-terminale und globuläre Domäne enthalten hat, wurde in pSK in der *Stu* I Schnittstelle inkloniert. Das zurückbleibende 3'-Fragment wurde zur Herstellung einer H1.1 spezifischen doppelsträngigen RNA verwendet. Keine ähnliche Sequenz wurde durch TblastN in der Wurm-Genom-Datenbank gefunden. Dieses Fragment ist also für die Histon Isoform H1.1 spezifisch.

Zur Herstellung weiterer Isoformen spezifischer dsRNAs wurden Deletionen oder Umklonierungen durchgeführt. Das Ziel war, möglichst spezifische Konstrukte ohne

konservative, zentrale Domäne herzustellen, die nicht mit anderen H1-Isoformen reagieren würden. Es wurde eine Deletion für spezifische H1.4 cDNA mit dem Enzym *Pst* I durchgeführt. Das 3'-Fragment entsprach einer Länge von 524 bp. Für H1.5 wurde das 3'-Fragment (629 bp lang) mit den Enzymen *Hpa* I und *Xho* I aus der cDNA ausgeschnitten und in pSK in der *Stu* I Schnittstelle inkloniert. Für H1.2 wurde die dsRNA mit einer Länge von 394 bp, die der C-terminalen Domäne entsprach, durch PCR hergestellt.

Alle Konstrukte enthielten nur die Sequenz der C-terminalen Domäne, außer dem H1.5 Histon, das auch ein Stück der globulären Domäne enthielt.

In Tabelle 4 wurde der Vergleich zwischen den cDNAs aller H1-Isoformen dargestellt und die prozentuale Übereinstimmungen einzelner Basenpaaren, jeweils in den ganzen cDNAs, wurde nur in der globulären und nur in der C-terminalen Domäne aller H1-Isoformen im Vergleich bestimmt.

Die globuläre Domäne, 225 Nukleotide lang, war bei 69% bis 85% aller Nukleotiden identisch. Die 3'-Fragmente der cDNAs (welche die C-terminale Domäne kodieren) besitzen eine gemeinsame Ähnlichkeit von nur 29% bis 63%. Deshalb kann man die kleinen, spezifischen 3'-Fragmente von H1.1, H1.2, H1.4 als spezifisch ansehen, was zu sehr niedrigen Kreuzreaktionen mit anderen H1-Isoformen führen müßte.

Für dieses Experiment wurde ein transgener Stamm EC107 (*let-858::gfp*) (KELLY und FIRE, 1998) kreiert. Es wurde das *let858::gfp* Reportergen und das Plasmid pBX48 in den Stamm *pha-1* (GRANATO et al., 1994) injiziert und eine positive Selektion für transgene Tiere mit extrachromosomalem Array bei + 25°C durchgeführt. Das *let-858* Gen wird in allen Zellen des Tieres exprimiert. Normalerweise erfolgt das Gen dem Chromatin silencing in der Keimbahn, wenn Tandem-repetitive Strukturen in der Keimbahn vorliegen. Der *let-858::gfp* Reporterstamm wurde zum Testen der 12 dsRNA H1-Typen verwendet, und das desilencing des Reportergens wurde in der Keimbahn der F1 Tiere beobachtet. Die Resultate sind in Tabelle 7 angegeben.

### **Tabelle 7**

Die Derepression der Keimbahnzellen im *let-858::gfp* Reporterstamm

(JEDRUSIK und SCHULZE, 2001). Desilencing des Reportergens *let-858::gfp* wurde in der Keimbahn der F1 Tiere unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Der prozentuale Einfluß der dsRNAs, welche aus Vollängen der H1 cDNA oder aus den kleineren

Fragmenten hergestellt wurden, wurde auf der Derepression des *let-858::gfp* Gens in den Keimbahnzellen dargestellt. Das 3'-spezifische Fragment für H1.1 und die 3'- Fragmente für H1.2, H1.4, H1.5 wurden hergestellt, um die Kreuzreaktion mit der zentralen Domäne der anderen H1-Isoformen auszuschließen. In Klammern ist die Anzahl der beobachteten F1 Tiere eingeegeben. (nb) steht für nicht beobachtet. Das Signal, das in Männchen beobachtet wurde, war schwächer als bei F1 Hermaphroditen.

<b>dsRNA (die Länge (bp) )</b>	<b>Prozent (%) der F1 Hermaphroditen</b>	<b>Prozent (%) der F1 Männchen</b>
H1.1 (916 bp)	<u>84</u> (190)	<u>51</u> (51)
H1.1 spezifisch (269 bp)	<u>65</u> (200)	nb
H1.1 ohne 3'UTR (650 bp)	12 (330)	nb
H1.2 (747 bp)	10 (156)	4 (52)
H1.2 kleines Frag. (394 bp)	0 (156)	1,6 (63)
H1.3 (859 bp)	0 (100)	0 (67)
H1.4 (953 bp)	16 (200)	4,3 (46)
H1.4 kleines Frag. (524 bp)	0 (100)	nb
H1.5 (856 bp)	18 (200)	4 (25)
H1.5 kleines Frag. (620 bp)	0,5 (200)	nb
H1.X (834 bp)	0 (100)	nb
H1.Q (378 bp)	0 (100)	0 (65)
Die Mischung der H1-Var.	3 (95)	3,8 (52)
Die Kontrolle	0 (200)	nb

Die Derepression des *let-858::gfp* Gens wurde in F1 Hermaphroditen und in Männchen beobachtet. Die höchste Derepression wurde bei der dsRNA von H1.1 nachgewiesen. Es wurden 84% der Hermaphroditen und 51% der Männchen mit dem Signal des dereprimierten *let-858* Gens beobachtet.

Bei der dsRNA von H1.2, H1.4 und H1.5 wurden nur 10 bis 18% der Tiere mit Derepression beobachtet. Es wäre möglich, dass die Volllänge von der dsRNA mit anderen H1-Isoformen (in dem Fall mit H1.1) kreuzreagiert hatte (Tabelle 4). Das Signal des *let-858::gfp* Gens wurde durch die spezifischen dsRNA-Konstrukte (H1.2, H1.4) in Keimbahnzellen eliminiert. Das Signal des *let-858::gfp* Gens nach der Injektion der spezifischen H1.5 dsRNA wurde nur bei 0,5 % der Tiere beobachtet. Diesen kleinen prozentualen Einfluß auf die Derepression des *let-858::gfp* Gens kann man damit erklären, dass die H1.5 dsRNA 47% von der zentralen Domäne besaß. Diese Domäne kann zur Kreuzreaktivität mit anderen H1-Isoformen führen.

Für H1.1 dsRNA, welche die N-terminale und zentrale Domäne (650 bp lang) enthielt, wurde die Derepression bei 12% der Tiere beobachtet (39 F1 von 330 Tieren). Für das 3'-nicht kodierende Fragment (269 bp lang) wurden 65% der F1 Hermaphroditen mit der Derepression in den Keimbahnzellen beobachtet. Dieses kleine, nicht kodierende 3'-Fragment hatte einen größeren Einfluß auf die Derepression des *let-858* Gens als das 650 bp lange dsRNA H1.1 Fragment. Das 3'-nicht-kodierende Fragment hat auch einen Einfluß auf die Expression des H1.1 Proteins (siehe die Expressionsmuster der Reporterstämme *H1.1::gfp* und *H1.1::gfp::CeH1.1 3'UTR*).

Das kleine 3'-Fragment von H1.1 (269 bp) war ausreichend für die Derepression in den Keimbahnzellen.

Die kleinen Fragmente der anderen H1-Isoformen H1.2 und H1.4 haben keinen 'desilencing' Effekt in den Keimbahnzellen gezeigt. Die Mischung sämtlicher Vollängen dsRNAs der H1-Isoformen haben die Derepression nur bei 3% bis 4% der F1 Hermaphroditen und Männchen des *let-858* Gens beeinflusst. Die dsRNA von anderen H1-Isoformen könnte die H1.1 mRNA durch Kreuzreaktivität eliminieren.

Die H1.1 dsRNA (Konzentration 0,57 µg/µl) führt bei 3% der F1 Hermaphroditen und bei 3,8% der F1 Männchen zu diesem Effekt.

In diesem Experiment wurde gezeigt, dass ein dsRNA Fragment unter 0,5 kb die cytologischen Effekte in F1 Tieren auslösen kann.

Die dsRNA Fragmente, wie das 269 bp Fragment des H1.1 oder das 394 bp Fragment des H1.2, haben den Promotor des *let-858::gfp* Gens beeinflusst.

Das *let-858::GFP* Signal im H1.1 dsRNA Experiment wurde in undifferenzierten Keimbahnzellen (in mitotischen und meiotischen Stadien), als auch in Oocyten beobachtet (Abb. 12 A und C). Die injizierte dsRNA hat keinen Einfluß auf das Signal in den somatischen Zellen gehabt. Es wurden 2185 Hermaphroditen und 425 Männchen beobachtet und die Signale mit der Kontrolle (Abb. 12 E und G) des *let-858::gfp* Reportergens verglichen. Bei Männchen war das Signal in den undifferenzierten Keimbahnzellen schwächer als in Spermien und als bei Hermaphroditen (der Effekt war ähnlich wie beim *mes*-Phenotyp). Das Signal war aber vergleichbar mit der Intensität des Signals in somatischen Zellen. Um das Signal in Männchen bei allen Entwicklungsstadien der Spermien deutlich sehen und registrieren zu können, wurde (Abb. 12 E) die Immunfärbung mit dem anti-GFP Antikörper durchgeführt. Zum Vergleich mit der Antikörper-Immunfärbung wurde die Gonade mit Hoechst gefärbt (Abb. 12 F). Alle Keimbahnzellen, sowohl die undifferenzierten wie auch die Spermien in verschiedenen Entwicklungsstadien, zeigten das Signal des *let-858::gfp*-Reportergens nach der H1.1 dsRNA Injektion. Als Kontrolle wurde eine dsRNA eines irrelevanten Gens in die Gonaden injiziert, in 200 beobachteten F1 Tieren wurde jedoch kein Signal in den Keimbahnzellen gesehen.

Es wurde ebenfalls der Frage nachgegangen, ob ein Wechsel zu niedrigeren Temperaturen als +25°C die Derepression des Promotor *let-858::gfp* Gens beeinflussen kann. Dazu wurde nur die H1.1 dsRNA injiziert. Die injizierten Tiere wurden statt bei +25°C bei +21°C und +16°C gezüchtet und die F1 Tiere anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Bei +21°C haben 80% der F1 Tiere das Signal des *let-858::gfp* Reportergens in den Keimbahnzellen gezeigt (20 Tiere wurden injiziert, 145 F1 der Hermaphroditen und 5 F1 der Männchen wurden beobachtet). Die Intensität des Signals war schwächer als bei den F1 Tieren, die bei +25 °C gezüchtet wurden. Bei +16°C wurde die Derepression bei 50% der F1 Tiere beobachtet (20 Tiere injiziert, 150 beobachtet), und das Signal war noch schwächer als bei den Tieren, die bei +21°C gezüchtet wurden.

Um zu untersuchen, in welchem Entwicklungsstadium das H1.1 Protein in den Keimbahnzellen gebraucht wird, wurde sowohl die Volllänge H1.1 cDNA als auch das

kleine 3'-Fragment des Histons H1.1 in das L1 und L2 Stadium injiziert. Mit voller H1.1 dsRNA haben 10 von 20 Tieren (50%) die Derepression gezeigt. Das kleine 3'-Fragment des H1.1 hat bei 5 von 15 der injizierten *let-858::gfp* Tieren (30%) in Oocyten und Spermien auch ein starkes Signal verursacht. Bei 3 von 3 Männchen wurde das Signal in der Gonade beobachtet (Abb. 13). Es wurden auch 10 Tiere im Stadium L1/L2 zur Kontrolle mit dsRNA eines irrelevanten Gens injiziert. Es wurde kein Signal in den Gonaden beobachtet.

Das H1.1 Protein wurde sowohl in den undifferenzierten als auch in den differenzierten Keimbahnzellen exprimiert und für die Entwicklung von Oocyten und Spermien gebraucht. Die Expression des H1.1 Proteins steigert deutlich die Oocyten- und Spermien-Differenzierung (Ergebniss nach H1.1 dsRNA-269 bp Injektion in L1/L2 Stadien des *let-858::gfp* Reportergens) und beeinflusst stark die Entwicklung der Keimbahnzellen.

### 3.3.4 Translationskontrolle des Histons H1.1 durch die 3'UTR Sequenz

Das H1.1 Protein ist in Keimbahnzellen (wie oben dargestellt) exprimiert. Die Translation wird wahrscheinlich von der Pentanukleotid Sequenz **UUUCU** (sogenannte TGE – 'translational control signal') im 3'-nicht-kodierenden Fragment der mRNA kontrolliert (HODGKIN et al., 1985). Dieses Fragment zeigt eine Pyrimidin-reiche Sequenz und ist dem 3'-nicht-kodierenden Fragment (3'UTR) vom *tra-2* Gen aus *C. elegans* und *C. briggsae* ähnlich (Alignment 4).

#### Alignment 4

Vergleich der 3'-nicht-kodierenden Fragmente (3'UTR) der Histon Isoform H1.1 mit den *tra-2* Genen aus *C. elegans* und *C. briggsae* (SCHULZE, pers. Mittlg. )

*C. elegans* H1.1 3'UTR

..CUCAUGUUGUUUCCAAUUUCUUCCCUGUAA-GUUCUCCGUGUUUCU..

*C. elegans tra-2* 3'UTR

..CUCAUAUU-----UAAUUUCUUAUCUACUCAUAUUCU..

*C. briggsae tra-2* 3'UTR

..CUCACU-----UUCCUACUUUCCUGCCU----AGUUUUCU..



Das 'TGE-translational control' Signal ist bekannt durch das *tra-2* Gen und für die weibliche Entwicklung entscheidend. Bei den *tra-2* Mutanten entwickeln die Hermaphroditen männliche Eigenschaften (z.B. männlichen Schwanz, keine Oocyten) (HODGKIN et al., 1985). Dieses Gen beeinflusst nicht die männliche Entwicklung.

Nach der H1.1 dsRNA Injektion wurden sterile Hermaphroditen ohne erkennbare Oocyten beobachtet. In diesen Tieren war die Anzahl der Kerne in den Keimbahnzellen reduziert. Der Effekt war nicht so stark wie bei *tra-2* Mutanten aber trotzdem zu beobachten. Ansonsten hat die H1.1 dsRNA nur die Entwicklung und Differenzierung der Keimbahnzellen bei Hermaphroditen beeinflusst. Die männliche Entwicklung verlief normal, die Gonade hatte normal aussehende Keimbahnkerne. Es wurde kein cytologischer Effekt bei Männchen festgestellt. Weiterhin hat die Injektion der H1.1 dsRNA mit 3'-nicht-kodierendem Fragment stark die Derepression des *let-858::gfp* Gens in den Keimbahnzellen beeinflusst. Das Konstrukt, welches die 3'UTR Sequenz enthält, ist viel schwächer in *C. elegans* exprimiert als das Konstrukt, welches die 3'UTR Sequenz nicht enthält.

In dem transgenen Stamm EC102 (*H1.1::gfp::CeH1.1 3'UTR*) wurde nur eine schwache Expression in den somatischen Zellen (Darmzellen) beobachtet (Abb. 10).

Diese Beobachtung läßt auf einen Einfluß der H1.1 3'UTR Sequenz auf die Expression von H1.1 schließen.

### **3.4 Histon H1.2 ist ein starker Repressor in Dauerlarven**

Der Einfluß von doppelsträngiger RNA (dsRNA) der Histon Isoformen H1.1, H1.2 und H1.4 wurde an den Dauerlarven von *C. elegans* getestet.

*C. elegans* kann unter schlechten Wachstumsbedingungen auf eine unter Nematoden nicht ungewöhnliche Entwicklungsvariante ausweichen. Nach dem L2 Stadium wird eine Dauerlarve gebildet, die eine besonders widerstandsfähige Kutikula besitzt und sich inaktiv verhält. So kann ein Tier mehrere Monate überleben (SCHIERENBERG und CASSADA, 1986). Es wurde ein Stamm CB1370 (Genotyp: *daf-2(e1370)III*), der bei +25°C Dauerlarven produziert, mit dem Stamm PD4251 (Genotyp: *ccls4251 I; dpy-20(e1282)IV*) gekreuzt. Der Stamm PD4251 besaß das *myo-3::gfp* Reporter gen, das in Kernen der Zellen und zusätzlich in Mitochondrien der Muskelzellen exprimiert wurde, in Dauerlarven jedoch nicht.

Bei homozygotem Nachwuchs wurde das Signal in Kernen und Mitochondrien der Körper- und der Vulva-Muskeln beobachtet. Der Nachwuchs hat sich bei +15°C vermehrt und bei +25°C die Dauerlarven produziert.

In jeweils 11 jungen Hermaphroditen wurde die Volllänge der dsRNA H1.1, H1.2, H1.4-Isoformen mit der Konzentration von 5 mg/ml in beide Gonaden injiziert.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefaßt.

### Tabelle 8

Die Stärke des Signales *myo-3::gfp* in Kernen der Zellen und in Mitochondrien der Muskelzellen nach der H1.1, H1.2, H1.4 dsRNA Injektion im Vergleich mit der Kontrolle. Die Stärke des Signals ist abhängig von dem Typ der injizierten DNA. In dieser Hinsicht zeigt die H1.2 dsRNA die größte Verstärkung des *myo-3::gfp* Signals in Dauerlarven im Vergleich mit der Kontrolle.

Typ der injizierten dsRNA	Anzahl der injizierten Tieren (n) und Anzahl der beobachteten Tiere in Klammern	Stärke des Signals (%) des <i>myo-3::gfp</i> -Reportergens im Vergleich mit der Kontrolle
H1.1 dsRNA	n=11 (43)	30% heller
H1.2 dsRNA	n=11 (49)	60% heller
H1.4 dsRNA	n=11 (30)	30% heller
Kontrolle (M9 Puffer)	n=7 (31)	entspricht 0%

Die injizierten Hermaphroditen wurden bei +15°C gezüchtet und die F1 Tiere bei +25°C aufbewahrt und beobachtet. Das Signal der beiden GFP-Reportergene wurde in Kernen und Mitochondrien der Muskeln beobachtet. Im Dauerlarven Stadium wurden die GFP-Reportergene reprimiert; da die Mehrheit der Gene nicht mehr exprimiert sind, um das Tier mehrere Monate am Leben zu erhalten.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die F1-Tiere, die 8 Wochen bei +25°C gehalten wurden, beobachtet (Abb. 14). Bei 31 F1-Tieren der Kontrolle (M9 Puffer) wurde ein sehr

schwaches Signal in Muskelzellkernen und Mitochondrien von Dauerlarven beobachtet. Die beiden GFP-Reportergene wurden reprimiert. Bei 43 F1-Tieren der H1.1 dsRNA Injektion und auch bei 30 F1-Tieren der H1.4 dsRNA Injektion wurde das Signal in Muskelzellkernen und Mitochondrien ca. 30% heller registriert.

Bei 49 F1-Tieren der H1.2 dsRNA Injektion wurde ein sehr starkes Signal der beiden GFP-Reportergene beobachtet. Die Stärke des Signals war mit den Tieren bei +15°C Zucht vergleichbar.

Also kann man folgern, dass der geringere Effekt der H1.1 und H1.4-Isoformen auf das Signal der beiden GFP-Reportergene von der hohen Ähnlichkeit der Linkerhistone H1 (Tabelle 4) zueinander stammen könnte. Die Ähnlichkeit der H1.1 cDNA und H1.2 cDNA bei Volllänge beträgt 63% und zwischen H1.4 cDNA und H1.2 cDNA 58%.

## **3.5 Einfluß des Histons H1.4 auf die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen**

### **3.5.1 Expressionsmuster des *H1.4::gfp*-Reportergens**

Das H1.4 Protein wurde in dem Totallysat von *C. elegans* mit dem Antiserum gegen H1-Isoformen nachgewiesen (Abb. 2). Das Expressionsmuster der Linkerhiston Isoform H1.4 wurde durch das *H1.4::gfp* Konstrukt an dem lebenden Organismus untersucht.

Aus der gesamten genomischen DNA wurde mit den Primer MJ01/ESMG30 das H1.4 Gen mit einem Promotor amplifiziert und ein *H1.4::gfp* Konstrukt hergestellt. Der Anteil des H1.4 Gens in *H1.4::gfp* Konstrukt endete kurz vor dem Stopcodon. Deshalb besaß das Fusionsgen kein 3'UTR Signal vom H1.4 Gen. Das Signal des *H1.4::gfp*-Reportergens in dem transgenen Stamm EC102 wurde etwa 65 min nach der Befruchtung und während der Gastrulation, bis zum L2 und L3 Stadium beobachtet. Das Signal zeigte sich jedoch weder im L4 Stadium noch bei den adulten Hermaphroditen. Das Signal wurde in E, D, MS und C-Zell-Linien (Abb. 15) und nicht in der AB-Zell-Linie (389 Zellen von 956) erfaßt. Aus diesen E, D, MS und C-Zell-Linien entstehen die Mesodermal- und die Hypodermalzellen. Die E-Zell-Linie ist ein Darmvorläufer und wandert als erste Zellgruppe ins Ei-Innere ein.

Am Aufbau der Körpermuskulatur sind alle 20 D-Zellen, 32 von 47 C-Zellen, 28 von 80 MS-Zellen beteiligt. 1 von 389 AB-Zellen tragen dazu bei (SCHIERENBERG, 1987). Die MS-Zellen bilden außerdem den somatischen Teil der Gonade und tragen wesentlich zum Pharynx bei (zusammen mit AB-Zellen). 15 von 47 C-Zellen zusammen mit der 72 Zellen der AB-Zell-Linie bilden die Hypodermis.

Im Brezel-Stadium (Abb. 16 A) wurde die *H1.4::GFP* Expression nur in bestimmten Bereichen (in Darmzellen und Muskelzellen) der Embryonen beobachtet, was den Zell-Linien E, D, MS und C entspricht.

Das H1.4 Protein wurde nur während der Frühentwicklung exprimiert. Während des L1, L2, L3 Stadiums wurde das Signal immer schwächer und im L2/L3 Stadium nur noch in polyploiden Zellen des Darms registriert (Abb. 16 C). Im L4 Stadium und in adulten Hermaphroditen wurde das Signal nicht mehr beobachtet. Das Signal wurde auch nicht in Keimbahnzellen der männlichen Tiere und der Hermaphroditen nach der Kreuzung EC102 mit *him-8* beobachtet. Daraus kann man folgern, dass das H1.4 Protein, im Vergleich mit dem H1.1 Protein wahrscheinlich nicht in der Keimbahn exprimiert ist.

Das Signal des *H1.4::gfp*-Konstruktes wurde in kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene (Abb. 15 E) des Metaphase-Stadiums (innerhalb der Kernhülle) beobachtet.

Wie die Histon H1.1 Isoform ist H1.4 ein chromosomales Protein. Im Gegensatz zum H1.1 ist es aber nur in bestimmten Zell-Linien und Lebensstadien exprimiert.

### **3.5.2 H1.4 dsRNA Injektion arretiert die Entwicklung der männlichen Schwanzstrukturen**

Die Funktion des H1.4 wurde durch die dsRNA Interferenz analysiert. Dazu wurde die Volllänge der H1.4 dsRNA mit der Konzentration von 5 mg/ml in beiden Gonaden des N2-Stammes injiziert. Die injizierten Tiere wurden auf die 'feeding'-Platten gesetzt, um den prozentualen Anteil der betroffenen F1-Tiere zu steigern.

Es wurden 4,8% tote Embryonen im Brezel-Stadium beobachtet (Tabelle 6). Sie besaßen keinen entwickelten Pharynx und Darm (Abb. 17) (SCHNABEL, pers. Mittlg.). Diese Organe bestehen aus MS- und E-Zell-Linien, bei der die *H1.4::GFP*-Expression nachgewiesen wurde.

Die überlebenden F1-Tiere haben sich weiter entwickelt: Aus dem L4-Stadium sind normale, adulte, gesunde Hermaphroditen entstanden. Insgesamt wurden 1906 Tiere beobachtet. Bei einem Anteil von 0,2% der Männchen im N2-Stamm wurden 5 Männchen im L4-Stadium beobachtet. 3 von 5 Männchen haben sich nicht weiter entwickelt. Die Entwicklung stoppte im L4-Stadium, der Schwanz ähnelte dem Schwanz der Hermaphroditen. Die Strahlen waren reduziert und der ganze Schwanz wurde feminisiert. Das Männchen besaß einen typischen Stachel (Abb. 18). Die 9 Strahlen waren kürzer und die Spiculae länger als bei dem N2-Stamm.

Die H1.4 dsRNA hat nur einen Einfluß auf die Morphologie des männlichen Schwanzes gehabt. Die männliche Gonade war normal entwickelt, mit normal aussehenden Spermatozyten und Spermien. Es wurde eine Kreuzung zwischen betroffenen Männchen und normalen Hermaphroditen des N2-Stammes eingesetzt. Die Männchen haben kein Interesse an den Hermaphroditen gezeigt, zudem haben sie sich sehr langsam im Kreis bewegt.

Die Form des Schwanzes, die kleineren Strahlen, die längere Spiculae könnten die Kopulation mit den Hermaphroditen behindert haben; was zur Verhinderung der Befruchtung führte.

Die Qualität der Spermien wurde nicht untersucht.

Um die Kreuzreaktivität zwischen der Volllänge der H1.4 dsRNA und anderen H1-Isoformen und den Einfluß auf die sexuelle Entwicklung von Männchen auszuschließen, wurden spezifische H1.4 dsRNA-Fragmente hergestellt und in den *him-8* Stamm mit der Konzentration von jeweils 5 mg/ml injiziert.

Es wurden zwei Subklone aus der Volllänge H1.4 cDNA (gesamt 960 bp) hergestellt. Mit den Enzymen *EcoR* I und *Stu* I wurde die H1.4 cDNA (ca. 800 bp) ausgeschnitten und in pSK (+) inkloniert. Der zweite Klon – ca. 200 bp – wurde mit den Enzymen *Stu* I und *Sma* I ausgeschnitten und in die *Sma* I Schnittstelle des pSK (+) Vektors kloniert. Dieses Konstrukt hat das Stopcodon und das 3' -nicht-kodierende Fragment (3'UTR) enthalten. Als Kontrolle wurde dsRNA eines relevanten Gens injiziert.

Nach der Injektion erschien der beobachtete Phenotyp der H1.4 dsRNAs viel schwächer als bei dem ersten Versuch, wo die Volllänge der H1.4 dsRNA injiziert wurde. Der H1.4-Phenotyp wurde nur bei Männchen beobachtet und sah bei allen 3 Konstrukten von H1.4

dsRNA gleich aus — nur mit einem geringeren prozentualen Anteil der betroffenen Männchen (Tabelle 9).

### Tabelle 9

Der prozentuale Anteil der F1-Männchen mit dem H1.4 Phenotyp nach der Injektion der verschiedenen H1.4 dsRNA Längen in *him-8* Tieren. Die Längen der Konstrukten sind in Klammern in bp angegeben.

Der H1.4-Phenotyp erschien bei allen 3 Konstrukten von H1.4 dsRNA gleich— nur mit einem geringeren prozentualen Anteil der betroffenen Männchen.

H1.4 dsRNA (bp)	Anzahl der injizierten Tiere von <i>him-8</i> (n)	Anzahl der beobachteten F1-Herm/Männchen	Prozent (%) der F1-Männchen mit dem H1.4 Phenotyp
H1.4 dsRNA (960 bp)	n = 16	732 / 568	7,4
H1.4 dsRNA (800 bp)	n = 21	932 / 754	4,1
H1.4 dsRNA (200 bp)	n = 27	1045 / 803	2,3
Kontrolle	n = 11	568 / 451	0

Durch die dsRNA wurde die Entwicklung der Männchen im L4-Stadium gestoppt. Der Stachel wurde nicht so deutlich und lang wie im vorher durchgeführten Experiment.

Die Männchen mit dem H1.4 Phenotyp wurden mit einer *lep-1(bx42)* Mutante und einer anderen Art von Nematoden – *Oscheius myriophila* – verglichen, um den Typ des Schwanzes ('leptoderan' oder 'peloderan') zu bestimmen. Der Schwanz war dem männlichem Schwanz der *lep-1(bx42)* Mutanten ähnlich. Die Strahlen waren kürzer als beim N2-Stamm. Die Spiculae sahen normal aus. Der 'leptoderan' Schwanz (der Name der *lep* -Mutanten) war nicht so lang wie bei *lep*-Mutanten (Abb. 19), konnte jedoch beobachtet werden. Die männlichen Gonaden waren normal mit gesund aussehenden Spermien entwickelt. Es wurde auch die Kreuzung mit jungen N2-Hermaphroditen eingesetzt. Die Männchen haben kein Interesse an den Hermaphroditen gezeigt. Die Qualität der Spermien wurde nicht untersucht.

Alle beobachteten F1 Hermaphroditen waren normal entwickelt, mit normal aussehenden Gonaden und haben sich weiter vermehrt. Daraus kann man folgern, dass der Effekt der H1.4 dsRNA nur bei den F1-Männchen beobachtet wurde – nicht jedoch bei Hermaphroditen oder F2.

Bei *fem*-Mutanten sind nur die Männchen betroffen, die Hermaphroditen jedoch nicht. Die Männchen entwickeln sich zu fruchtbaren Weibchen. Das FEM-Protein ist bei *fem*-Mutanten für die normale Entwicklung der Gonaden notwendig.

Bei der Suche nach anderen gemeinsamen Eigenschaften zwischen den *fem*-Mutanten und dem H1.4 Phenotyp, wurde in der Sequenz der H1.4 3'UTR ein PME-Signal entdeckt.

Das *fem-3* Gen besitzt eine sogenannte PME-Kontrollsequenz, das Pentanukleotid-UCUUG. Dieses Signal diene als Translationskontrolle und wurde auch in der 3'-untranslatierten Region der H1.4 mRNA gefunden (SCHULZE, pers. Mittlg.) (Alignment 5).

Die reprimierende Translationskontrolle des *fem-3* Gens findet in der Oogenese statt.

Dieses Signal könnte einen Einfluß auf die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen haben.

### Alignment 5

Das 3'UTR Fragment der H1.2 und H1.4 mRNA mit dem PME 'translational control signal' (rot) des *fem-3* Gens. Alle PME Sequenzen können als 'nanos response elements' (NRE, grün) interpretiert werden. Das NRE-Element ist vom *Drosophila* Gen 'hunchback' bekannt (LEHMANN und NUSSLEIN-VOLHARD; 1987; WHITE und LEHMANN, 1986; DRIEVER und NUSSLEIN-VOLHARD, 1989).

*C. elegans* PME (*fem-3*): UCUUG

*C. elegans* H1.2 3' UTR UCUUGU -----gugGUUGUU.. 97 bp UAUAAA

*C. elegans* H1.4 3' UTR UCUUGU -----aGGUGUC.. 64 bp AAUGAA

*D. melanogaster* hb 3' UTR CGUUGU ----ccagaAUUGUA.. 416 bp AAUAAA

*C. elegans fem-3* 3' UTR UCUUGU gucauucacUUUCGA.. 99 bp AAUAAA

Weiterhin wurde ein 'knock-out' des H1.4 Gens versucht, um den kleinen prozentualen Anteil des H1.4 dsRNA Phenotyps zu vermeiden und die H1.4 Mutanten darzustellen.

Dafür wurden die Deletionsbanken M1-8, M9-16, M17-24 der Firma EleGen GmbH gescreent. Es wurden 7000 'nested' PCRs mit 17 verschiedenen primer eingesetzt. In den Deletionsbanken M1-8 und M17-24 wurden mit den primer MJ09/MJ10 2 'Hits' gefunden, in M1-8 mit den primer MJ12/MJ02 2 'Hits', in M17-24 mit primer MJ16/MJ17 ebenfalls 2 'Hits'. In Well-Lysaten wurde kein Treffer gefunden, deshalb war es nicht möglich, die gewünschten H1.4 Mutanten zu identifizieren und zu isolieren. Bei einem Erfolg des Experimentes wären erstmals Mutanten dargestellt worden, deren Linkerhiston Isoformen einen Einfluß auf die sexuelle Entwicklung gehabt hätten.

### **3.5.3 SON-1 und H1.4 wirken synergistisch in der Morphogenese der männlichen Schwanzstrukturen**

Um den weiteren Einfluß des Linkerhiston H1.4 auf die Entwicklung des männlichem Schwanzes (z.B. auf SPD Neuronen der Spiculae) zu charakterisieren (JIANG und STERNBERG, 1999), wurden Mutanten von Paul Sternberg verwendet (*dpy-20(e1282); syIs20 him-5(e1490)* mit *gpa-1::lacZ* Fusion (PS1702), *dpy-20(e1282); syIs33; him-5(e1490)* mit *gpa-1::gfp* Fusion (PS2255), *son-1(sy549); dpy20(e1282); syIs20 him-5(e1490)* (PS2767)). Diese Mutanten (PS2767) waren entweder in der Entwicklung der Spiculae und SPD-Neuronen gestört oder in bestimmten Strukturen der Reporter exprimiert (PS1702, PS2255). Die Männchen der *son-1(sy549)*-Mutante besaßen anormale Strahlen (Kopulation mit Hermaphroditen war unmöglich), anormale Gonaden mit nur einem Schlauch und einer anormalen Vulva. Die doppelten Mutanten-Männchen *lin-17(n698)* und *son-1(sy549)* besaßen keine Strahlen, die Meiose der Keimbahnzellen hat im distalen Gonaden-Arm ('ectopic meiosis') stattgefunden (JIANG und STERNBERG, 1999). Das SON-1 Protein kodiert das HMG1/2-ähnliche DNA-bindende-Protein, das eine spezifische Bedeutung in Wnt-Signalweg hat (es kontrolliert die Zellspezifität, Polarität, Proliferation und die Entwicklung von Zellen). Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die Beziehungen zwischen den Mutanten zu untersuchen. Das WNT-Protein ist im L3- und L4-Stadium von *C. elegans* exprimiert, unter anderem wird es für die Entwicklung des männlichem Schwanzes benötigt. In dem *him-8* Stamm wurde die SON-1 dsRNA (mit der



Konzentration von 5 mg/ml), die Mischung SON-1/H1.4 dsRNA und SON-1/H1.1 dsRNA injiziert (die Konzentrationen der beiden Konstrukte beträgt jeweils 2,5 mg/ml), um den Phenotyp zu vergleichen, die prozentualen Anteile der betroffenen Männchen zu bestimmen und die Beziehungen zwischen den beobachteten Effekten und Mutanten festzustellen. Nach der SON-1 dsRNA Injektion (22 Tiere injiziert) sind die beobachteten F1-Tiere dem *son-1(sy549)* Phenotyp ähnlich gewesen.

Die Hermaphroditen konnten nicht die Embryonen ablegen, besaßen eine anormale, einarmige Gonade und eine anormale Vulva. Der Effekt wurde nur bei ca. 10% der 341 F1-Tiere beobachtet. Die Injektion der Mischung von SON-1 dsRNA mit der Volllänge H1.4 dsRNA (18 Tiere injiziert) hat den prozentualen Anteil der betroffenen F1-Tiere verdoppelt. Der Phenotyp war den doppelten Mutanten *lin-17(n698)* und *son-1(sy549)* ähnlich. 35% der 425 F1-Tiere besaßen einarmige, anormale Gonaden und eine anormale Vulva. Die Injektion der H1.1 und SON-1 dsRNA (19 Tiere injiziert) hat den Effekt nur bei 12% der Tiere ausgelöst (bei 48 von 401 Tieren). Die Hermaphroditen waren steril (Abb. 20) und die Keimbahnzellen der Männchen (der distale Gonadenarm) befanden sich im Meiose Stadium ('ectopic meiosis'), anstatt in der mitotischen Teilung. Der männliche Schwanz hat normal ausgesehen. Anschließend wurde der Einfluß des H1.4 Proteins auf die Anzahl der SPD-Neuronen pro Spicula untersucht. Die *son-1* dsRNA Injektion in *gpa-1::lacZ* (Stamm: PS1702) hat die Anzahl der SPD-Neuronen pro Spicula verdoppelt (2 SPD-Neuronen pro Spicula) (JIANG und STERNBERG, 1999). Die H1.4dsRNA Injektion (von der Volllänge der H1.4 cDNA, 12 Tiere injiziert) hat die Anzahl an einer Spicula bei 7,3% Tieren (von 641) verdoppelt; auf der anderen Spicula wurden keine SPD-Neuronen mit lacZ-Färbung nachgewiesen. Wahrscheinlich ist das SPD-Neuron von einer Spicula entweder zur anderen Seite gewandert oder auf der anderen Seite sind keine SPD-Neuronen entstanden. Bei der H1.1 dsRNA Injektion (12 Tiere injiziert) wurden zwei SPD-Neuronen an einer Spicula bei 6,1% Tieren (von 549) beobachtet und ein SPD-Neuron an der zweiten Spicula (Abb. 21). Der Effekt der 2:1 SPD-Neuronen pro Spicula könnte von der Kreuzreaktivität zwischen der H1.1 und der H1.4 dsRNA stammen. Die Kreuzreaktivität der H1.1 dsRNA mit der H1.4 dsRNA könnte diese Beobachtung und die Phenotypen eventuell erklären. Man kann auch nicht ausschließen, dass der beobachtete Effekt mit den Isoformen selbst etwas zu tun hat. Die Ähnlichkeit zwischen der H1.1 cDNA und der H1.4 cDNA beträgt 63%.

### 3.6 Expressionsmuster des Histons H1.X und seine subzelluläre Lokalisation

Das ungewöhnliche und nur bei *C. elegans* vorkommende H1.X Protein wurde mit zwei, auf Sulfolink-Säulen gereinigten Antikörpern,  $\alpha$ H1.X-11 und  $\alpha$ H1.X-101 in dem Totallysat von *C. elegans* nachgewiesen. Die beiden Antikörper ( $\alpha$ H1.X-11 gegen ein synthetisches hergestelltes Peptid und  $\alpha$ H1.X-101 gegen die C-terminalen 101 Aminosäurereste vom H1.X Protein) haben außer dem H1.X Protein mit anderen, aber nicht mit den selben Proteinen von *C. elegans* reagiert. Die einzige gemeinsame Bande für beide Antikörper war die Bande, die dem H1.X Protein entsprochen hat (Abb. 22). Der  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper reagierte zusätzlich mit rekombinantem Lamin (von K. Weber) und mit einer anderen Bande aus *C. elegans*. Der zweite Antikörper  $\alpha$ H1.X-101 reagierte wegen der große Ähnlichkeit zwischen den C-terminalen Domänen mit allen H1-Isoformen (Tabelle 4, Abb. 23) und mit einem anderen Protein aus *C. elegans*. Die 'cross'-Reaktion mit anderen H1-Isoformen war nur auf die dot-blot zu sehen. Sie ist weder auf den western-blot des Totallysats aus *C. elegans* noch in der Immuncytologie feststellbar. Beide Antikörper waren nicht monospezifisch, haben aber eine gemeinsame, auf der selben Höhe (ca. 31 kDa) H1.X-laufende Bande erzeugt.

Die Immuncytologie von *C. elegans* mit beiden Antikörpern hat – trotz fehlender Monospezifität gegen das H1.X Protein – die Tonofilamente in Marginalzellen des Pharynx gefärbt. Es wurde gezeigt, dass das H1.X Protein ein cytoplasmatisches Protein ist, das auch im Nukleoli und in Nukleoplasma nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu H1.1 und H1.4 Histone ist das H1.X Protein nicht mit der Hauptmasse des Chromatins assoziiert (Abb. 25).

Die Intermediärfilamente bauen die Tonofilamente, die radial durch die Marginalzellen laufen. Sie formen eine cytoskeletale Struktur in Marginalzellen. Zusätzlich hat der  $\alpha$ H1.X-11-Antikörper die Lamina in allen Zellen (in Embryonen, in polyploiden Zellen des Darms) aber nicht die Chromosomen gefärbt (Abb. 24). Das Signal des anderen Antikörpers  $\alpha$ H1.X-101 wurde im Nukleolus sichtbar, nicht jedoch im übrigen Chromatin. Es wurden zwei Punkte, die nicht der DNA-Färbung entsprochen haben, in polyploiden Zellen des Darmes beobachtet (Abb. 25). Das Ergebnis wurde mit dem *H1.X::gfp* Konstrukt wiederholt. In diesem transgenen Stamm EC103 wurden zwei deutliche Punkte

im Kern der Embryonen ab dem 32-Zellstadium beobachtet (Abb. 26). Das GFP-Signal wurde auch im Nukleoplasma nachgewiesen.

Das Linkerhiston H1.X wurde von beiden, verschiedenen Antikörpern in Fasern der Marginalzellen nachgewiesen. Die Analyse des *H1.X::gfp*-Reporterstammes bestätigt, dass dieses Protein in den Faserstrukturen der Marginalzellen erhalten ist. Es wurde mit einem anderen Protein, nämlich dem Intermediärfilamentprotein (IF) in Marginalzellen vom Pharynx co-lokalisiert (Abb. 27). Eine co-Lokalisation von H1.X und  $\alpha$ -Tubulin wurde nicht beobachtet (Abb. 28). Das GFP-Signal wurde in den Marginalzellen des Muskels m5 von Pharynx detektiert.

Um die große Menge des H1.X Proteins aus den Muskeln auszuwaschen, wurde eine Stunde mit Triton X-100 extrahiert und dann eine Immunfärbung mit dem IFA Antikörper durchgeführt. Dieses Experiment bestätigt die co-Lokalisation des *H1.X::GFPs* mit dem Intermediärfilamentprotein (Abb. 27 C).

Das Signal des *H1.X::gfp*-Konstruktes wurde auch in den Spermatheka der Hermaphroditen und den Spermatocyten der Männchen beobachtet, was auf einen aktiven H1.X-Promotor hinweist (Abb. 29, Tabelle 10). Um die Expression des *H1.X::gfp*-Reportergens in Keimbahnzellen besser darzustellen, wurde eine neue Technik angewendet (Injektion des stumpf geschnittenem Konstruktes, Markers und genomischer DNA). Drei transgene Stämme sind mit verschiedenen Expressionsmustern entstanden. Bei dem Stamm EC104 (*H1.X<sub>K</sub>::gfp*) wurde die *H1.X::GFP* Expression in Embryonen und Muskelzellen, in EC105 (*H1.X<sub>K</sub>::gfp*) in Marginalzellen von Pharynx, Embryonen und Vulva-Muskelzellen und in EC106 (*H1.X<sub>K</sub>::gfp*) in Embryonen, Marginalzellen vom Pharynx und Muskelzellen beobachtet.

Das Signal wurde in Spermatocyten und Spermatheka schwach detektiert, die Marginalzellen waren im Muskel m3, m4, m5, m6 jedoch sehr gut sichtbar. Die diagonal laufenden Muskelzellen und Vulva-Muskelzellen von *C. elegans* waren auch mit dem GFP-Signal sehr gut zu beobachten (Abb. 30).

Bei beiden Typen der DNA Injektionen – circuläre Plasmide und stumpf geschnittene Plasmide – wurden in den F1 und F2 Generation mehr Männchen beobachtet. In dem DNA Transformationsexperiment, in welchem 20 ng/ $\mu$ l Plasmid DNA injiziert wurde, wurden 16 Männchen in 1602 Tieren der F1 und F2 Generation beobachtet: Dies entspricht 1%.

Bei dem DNA Transformationsexperiment, in welchem DNA mit der Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l injiziert wurde, betrug der prozentuelle Anteil der Männchen 2% in 1236 ausgewerteten Tieren der F1 und F2 Generation. Dies kann man dadurch erklären, dass das silencing des Arrays in der Keimbahn dazu führt, dass während der Meiose das *H1.X::gfp* in späteren Generationen nicht mehr erzeugt wird.

### 3.6.1 dsRNA Phenotyp von H1.X

Es wurde die H1.X dsRNA mit der Konzentration von 5 mg/ml in beide Gonaden von 32 N2-Tieren injiziert. Von 1453 beobachteten F1-Tieren wurden innerhalb 24 Stunden 4,7% tote Embryonen von den injizierten Hermaphroditen abgelegt. Alle Embryonen waren im 'midproliferation' Stadium. Im zweitem Experiment, das zum Ziel hatte, den Effekt zu steigern, wurden die injizierten Hermaphroditen auf die dsRNA 'feeding' Platten umgesetzt. Der prozentuale Anteil der toten Embryonen hat sich dadurch nicht geändert (Abb. 31). Von den beobachteten 1351 Tieren waren 4,5% kleiner als die Wildtyp-Tiere; sie erreichten eine Länge von  $483 \pm 203,6 \mu\text{m}$  (Abb. 31). Zum Vergleich erreichen die Wildtyp-Tiere  $925 \pm 55 \mu\text{m}$  (es wurden 5 N2-Tiere gemessen). Die Messung wurde an adulten, etwa gleichaltrigen Tieren durchgeführt. Die betroffenen Tiere waren den 'dumpy' und 'uncoordinated' Tieren ähnlich. Die Bewegung wurde durch Muskeldefekte schwach beeinflusst.

Von 4,5% der Tiere wurden 2,1% als Hermaphroditen erkannt, die ihre Embryonen nicht ablegen konnten (Abb. 31). Die Embryonen haben sich in den Hermaphroditen entwickelt und sie von inneren heraus getötet ('egl'-Phenotyp). Die Hermaphroditen mit 'egl'-Phenotyp besaßen eine intakt entwickelte Vulva. Bei 3% der F1-Tiere (1351 F1-Tiere untersucht) war die Länge des Pharynx länger als bei Wildtyp-Tieren (Abb. 31). Die Länge betrug  $141,4 \pm 8,4 \mu\text{m}$  zum Vergleich mit N2-Tieren  $125,5 \pm 5,5 \mu\text{m}$  (Pharynx von 7 N2-Tieren gemessen). Die Messung wurde an adulten, etwa gleichaltrigen Tieren durchgeführt.

Um nachzuweisen, dass das H1.X Protein im Pharynx nach der H1.X dsRNA-Injektion in seiner Menge reduziert ist, wurde die Immunocytochemie an F1-Tieren mit dem  $\alpha$ H1.X-11-Antikörper in der Verdünnung 1:20 (60  $\mu\text{g/ml}$ ) durchgeführt. Zusätzlich wurde an den selben Tieren eine Doppelfärbung mit dem IFA-Antikörper (ohne Verdünnung) durchgeführt. Von 231 beobachteten F1 Tieren wurde bei 10 Tieren (4,5%) mit H1.X

Phenotyp ein reduziertes Signal des H1.X-Proteins registriert. Das Signal des IF-Proteins änderte sich nicht im Vergleich mit nicht-dsRNA-behandelten Tieren (Abb. 32). Andererseits wurde bei allen beobachteten H1.X dsRNA Tieren das Signal des H1.X Proteins um ca. 50% schwächer als bei den Kontroll-Tieren erfaßt.

### Tabelle 10

Zusammenfassung der Daten zum H1.X Protein von *C. elegans*. Es wurden die Organe und Strukturen angegeben, bei denen das H1.X Signal beobachtet wurde. Das H1.X Signal stammt von dem *H1.X::gfp*-Fusionsgen und den  $\alpha$ H1.X-11 und  $\alpha$ H1.X-101 Antikörpern. Es wurde der Prozentanteil der F1 Tiere mit dem H1.X Phenotyp angegeben; in Klammern die Anzahl der beobachteten Tieren, (n) stellt die Anzahl der injizierten Tiere dar.

	<i>H1.X::GFP</i> (20 µg/µl)	<i>H1.X::GFP</i> (100 µg/µl)	$\alpha$ H1.X-11 Antikörper	$\alpha$ H1.X-101 Antikörper	H1.X dsRNA (5 mg/ml, 'feeding' Platten)
Embryo	Kein Signal	2 Punkte entsprachen dem Nucleoli im Nucleoplasma; Nucleoplasma	Lamina; Nucleoplasma	2 Punkte entsprachen dem Nucleoli im Nucleoplasma; Nucleoplasma	4,7% (1453, n = 32) tote Embryonen im 'midproliferation' Stadium
Keimbahn	Spermatheka, Spermatozyten	Spermatozyten	Spermatozyten: Lamina und Nucleoplasma	-----	Kein Effekt
Pharynx	Marginalzellen im Muskel m5	Marginalzellen im Muskel m3, m4, m5 und m6	Marginalzellen im Pharynx	Marginalzellen im Pharynx	3% (1351, n =42) mit längerem Pharynx (141,4 ± 8,4 µm)
Körper- und Vulva-Muskulatur	-----	Körper- und Vulva-Muskulatur	-----	-----	'dumpy', 'unc' und 'egl' Phenotyp 4,5% (1351, n = 42) 'dumpy' und 'unc'; davon 2,1% 'egl'

Das H1.X Protein ist im Gegensatz zum H1.1 Protein ein Faserprotein, das in Nucleoli, Nucleoplasma und in Marginalzellen exprimiert ist (Abb. 33).

### **3.7 Beeinflussung der Telomer-Positionseffekt-Variegation in *Saccharomyces cerevisiae* durch die Expression von *C. elegans* Histon H1-Isoformen**

#### **3.7.1 Verschiedenen Überlebensraten der sieben H1-exprimierenden Hefe-Stämme**

Es wurden 7 H1-Isoformen aus *C. elegans* auf ihre Fähigkeit, Chromatin in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* zu modifizieren, untersucht. Die H1-Isoformen-Gene wurden in Hefe-Expressionsvektoren pYX142 und pYX242 kloniert und in den Hefestamm UCC3505 und den S35P-5A Wildtyp transformiert. In dem Hefestamm UCC3505 ist das Gen *ura3+* nahe dem Telomer VII-L integriert. Dagegen ist im Wildtyp-S35P-5A das Gen in der Nähe des Zentromers lokalisiert. Je nachdem, wie weit sich die Telomer-Chromatinregion in Richtung Zentromer ausbreitet, wird die Inaktivierung der URA3 Expression in mehr oder auch in weniger Zellklonen beobachtet.

FOA (Uridin-Analogon) ist ein Substrat für das URA3-Protein. Das Protein ist als Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase im Uridin-Stoffwechsel beteiligt. Die transformierte Hefe wurden auf FOA-Platten ausplattiert, um eine mögliche Veränderung ihrer Überlebensrate in Bezug auf Wachstum auf SC-Leu-Platten sichtbar zu machen. Die Hefe-Kolonien wurden unter dem Binokular auf FOA-Platten und SC-Leu-Platten jeweils dreimal gezählt.

Alle H1-Isoformen — außer dem Histon H1.1 — hatten keinen Einfluß auf die Telomer-Positionseffekt-Variegation (TPEV), da sie nichts an der *ura3*-Expression änderten.

Der prozentuale Anteil der Überlebensrate der H1-exprimierenden Hefe-Stämme (ohne dem Histon H1.1) beträgt 49% bis 58 % im Vergleich zur leeren Kontrolle (der Vektor ohne Insert) pYX142- 51% und 61% bis 68 % im Vergleich zur leeren Kontrolle pYX242 - 69% im Hefestamm UCC3505 (Tabelle 11)

**Tabelle 11**

Die Überlebensrate der sieben H1 und zwei *H1::gfp*-exprimierenden Hefe-Stämme.

In der linken Spalte wurde die Überlebensrate der H1-Isoformen im Hefevektor pYX142 und in der rechten Spalte im Hefevektor pYX242 dargestellt. Die Hefevektoren sind unterstrichen gekennzeichnet, beide sind in den Hefe-Stämmen UCC3505 und Wildtyp-S35P-5A transformiert.

Als Kontrolle wurden nur Hefe-Stämme mit Hefevektoren pYX142 und pYX242 ohne Insert (Leer) verwendet. Es wurde das Verhältnis

der Anzahl der **Kolonien auf FOA** zu der Anzahl der **Kolonien auf SC-Leu-Platten x 100** berechnet. Die Überlebensraten der H1-exprimierenden Hefe-Stämme wurde in Prozent (%) in Hefe Stamm UCC3505 und Wildtyp-S35P-5A angegeben. (nb) steht für nicht beobachtet.

	<u>pYX142</u> in UCC3505 / <u>pYX142</u> in Wildtyp-S35P-5A	<u>pYX242</u> in UCC3505 / <u>pYX242</u> in Wildtyp-S35P-5A
Leer	<b>51 / 49</b>	<b>69 / 60</b>
H1.1	<b>84 / 53</b>	<b>89 / 61</b>
H1.2	53 / 48	68 / 61
H1.3	50 / 49	63 / 59
H1.4	<b>58 / 51</b>	<b>67 / 62</b>
H1.5	50 / 53	61 / 59
H1.Q	51 / 50	65 / 61
H1.X	49 / 48	nb / nb
<i>H1.1::gfp</i>	<b>84 / nb</b>	<b>81 / nb</b>
<i>H1.4::gfp</i>	<b>56 / nb</b>	<b>65 / nb</b>

Nur das Histon H1.1 zeigte einen Effekt auf die Organisation des Chromatins und Kondensation der telomeren Region (das *ura3*-Gen ist abgeschaltet). Die Überlebensrate der Histon H1.1-exprimierenden Hefe-Stämme beträgt 84% im pYX142 Vektor und 89% im pYX242 Vektor im Hefestamm UCC3505. Die H1.1 Isoform hat das *ura3*-Gen

reprimiert, und das URA3-Protein (die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase) war nicht am Uridin-Stoffwechsel beteiligt. Deshalb wurde das FOA (Uridin-Analogon) nicht von der Decarboxylase zu einem giftigen Stoffwechselprodukt umgesetzt; mehr Zellen auf den FOA-Platten überlebten. Das Histon H1.1 hat die Verpackung des *ura3*-Gens durch das Telomer gefördert und dieses Gen in den Zellklonen mit den H1.1 Konstrukt inaktiviert.

Die Überlebensrate der H1-exprimierenden Hefe-Stämme in den Vektoren pYX142 und pYX242 in Wildtyp-S35P-5A ist vergleichbar mit den Kontrollen. Daraus kann man folgern, dass die Histon H1.1 Expression in einem Hefestamm, bei welchem das *ura-3* Gen nicht in der Nähe eines Telomeres lokalisiert ist, keinen Effekt auf die Expression dieses Gens ausübt.

Der beobachtete Effekt des H1.1 Histons hängt mit dem Telomer-spezifischen-Chromatin zusammen.

Damit wurde gezeigt, dass das Histon H1.1 auch in Hefen als ein Repressor der Transkriptionsaktivität wirken kann, so wie es zuvor in der Keimbahn von *C. elegans* gezeigt worden war (Kapitel 3.3.3).

Um zu beweisen, dass die H1-Proteine in Hefe exprimiert sind und der Telomer-Positionseffekt von H1-Isoformen stammt, wurde die Expression der H1-Proteine auf dem western-blot untersucht. Es wurden nur zwei Hefeklone H1.1, welches den Effekt verursacht, und H1.4, als Kontrolle ausgewählt.

Für den western-blot wurde als erster Antikörper das gereinigte Antiserum gegen das H1.4 Protein durch die IgG-HiTrap Säule (Pharmacia) in der Verdünnung 1:500 (Endkonz. 54 µg/ml) verwendet (Abb. 34).

Auf dem western-blot wurde nur das H1.4 Protein von H1.4 im pYX142 Vektor detektiert. Es zeigten sich keine Färbungen anderer Proteine. Das Histon H1.1 Protein wurde nicht auf dem western-blot nachgewiesen, obwohl Versuche mit verschiedenen Protein-Isolationsmethoden (mit Ammoniumsulfat, 'glass beads', 'glass beads' und Zymolyase) durchgeführt wurden.

Erklärt wird dies dadurch, dass das Antiserum gegen das H1.4 Protein stark mit dem H1.4 Protein reagiert, mit dem H1.1 Protein jedoch sehr schwach (western-blot von dem Totallysat aus *C. elegans*; schwache Bande der Mischung. H1.1, H1.3 und H1.5).

Wenn das H1.1 Protein sehr schwach exprimiert wäre (Abb. 34), könnte die Bande auf dem western-blot nicht nachgewiesen werden.



Als Kontrolle wurden die Hefestämme benutzt, die mit Hefevektoren pYX142 und pYX242 transformiert worden waren. Es wurde kein Protein von den Kontrollen nachgewiesen.

Für die Immunzytologie wurde als erster Antikörper  $\alpha$ H1, in der Verdünnung 1:20 (2,65  $\mu$ g/ml) durch Sulfolink-Säule gereinigt, verwendet.

Die beiden Proteine befanden sich lokalisiert in den Zellkernen der Hefezellen und konnten niemals außerhalb des Zellkerns detektiert werden.

Das Signal der Antikörper hat dem Signal der DNA-Färbung entsprochen (Abb. 35).

Es wurde auch die Fusion zwischen den Proteinen H1.1, H1.4 und GFP ('Multiplex'-PCR) durchgeführt, um die Linkerhistone-Lokalisation verfolgen zu können.

Um eine gleiche Expression zu erzielen, waren die Regionen des Startcodons für beide Konstrukte identisch.

Das GFP-Signal beider Konstrukte entsprach der DNA-Färbung und wurde nur in Zellkernen der Hefen beobachtet (Abb. 36).

Mit der GFP-Fusion und mit der Immunfärbung wurde das Signal des Histons H1.1 und des Histons H1.4 im Zellkern mit zwei verschiedenen Methoden (Immunfärbung und GFP-Fusionen) dargestellt.

Um die Überlebensrate zu messen und mit früher durchgeführten Experimenten zu vergleichen, wurden die *H1.1::gfp* und *H1.4::gfp* - Konstrukte in UCC3505 auf die FOA und SC-Leu-Platten ausplattiert. Die Überlebensrate des *H1.1::GFP*- exprimierenden Hefe-Stammes betrug 84% (im Hefevektor pYX142) und 81% (im Hefevektor pYX242). Im Vergleich für den *H1.4::GFP*- exprimierenden Hefe-Stamm betrug die Überlebensrate 56% (im pYX142) und 65% (im pYX242). Das Ergebnis ist dem früheren Experiment ohne GFP-Fusion ähnlich und weist darauf hin, dass nur das Histon H1.1 das *ura3*-Gen abschaltet und die GFP-Fusionen keinen Einfluß auf die Überlebensrate haben (Abb. 37).

Weiterhin ändert das Histon H1.4 nichts an der *ura3*-Gen Expression.

### 3.7.2 Einfluß des SIR2 Proteins auf die Gen-Repression in den Keimbahnzellen von *C. elegans*

SIR2 ist essentiell für die Chromatin Repression an den Telomeren und für die Repression der silent mating type loci der Hefe. In Hefen tritt dieses Protein in Zusammenhang mit epigenetischer Genregulation auf.

Es wurden die Gene, die dem Sir2 Gen ähnlich sind, im Genom-Projekt vom *C. elegans* gesucht. Dabei wurden bei *C. elegans* vier Sir2 ähnliche Gene gefunden.

Das *sir-2.1* Gen bei *C. elegans* hat die größte Ähnlichkeit gezeigt (31% Identität mit Sir2 bei Hefe in der konservierten, zentralen Domäne). Andere Gene (*sir-2.2*, *sir-2.3*, *sir-2.4*) haben nur 10 bis 20% Ähnlichkeit in der zentralen Domäne gezeigt.

Von diesen Genen wurde das dem Sir2 Protein aus Hefen am ähnlichste *sir-2.1* Gen (cDNA-Klon yk352g2 von Y. Kohara) ausgewählt. Mittels direkter Injektion der dsRNA in die Gonaden der jungen, adulten Hermaphroditen des Reporterstammes EC107 soll eine mögliche Beteiligung des *C. elegans* Homologs des SIR2 Proteins aus *S. cerevisiae* am Keimbahn-silencing untersucht werden.

Es wurden 7 Hermaphroditen des EC107 Reportestammes und 8 Hermaphroditen des Stammes, der durch die Kreuzung der EC107 und der *him-8* Stämme entstanden ist, injiziert.

Das Ziel war es, den Einfluß des SIR2 Proteins auf die Gen-Repression in den männlichen Keimbahnzellen sowie in Keimbahnzellen der Hermaphroditen zu untersuchen.

Nach der Injektion (Sir2 dsRNA mit der Konzentration von ca. 5 mg/ml) in die Gonaden wurden die Tiere bei + 25°C herangezogen, und die F1-Tiere auf eine aufkommende GFP - Fluoreszenz innerhalb der Gonaden untersucht.

Von 104 beobachteten Tieren wurden 41 (45,05%) Hermaphroditen und 13 Männchen (100%) mit schwachem Signal in undifferenzierten Keimbahnzellen, in Oocyten und Spermien beobachtet (Abb. 38).

Es wurde gezeigt, dass es nach der Sir2.1 dsRNA Injektion nur in den Gonaden des Reporterstammes *let-858::gfp* desilencing Effekt stattgefunden hat.

Das SIR2 Protein wurde also für den silencing Effekt in der Keimbahn von *C. elegans* benötigt.

### 3.8 Effekte nach der Trichostatin Injektion im Reporterstamm EC107 (*let-858::gfp*)

Es wurde der Einfluß des Histon-Deacetylase-Inhibitors (Trichostatin) auf die transkriptionelle Repression und das silencing in Keimbahnzellen des Reporterstammes EC107 untersucht. Nach FINNIN ist bekannt, dass Trichostatin (FINNIN, 1999) das Zellwachstum inhibiert, den Cyklin-abhängigen-Kinase-Inhibitor aktiviert und die Expression der Transgene induziert. Trichostatin als ein Histon-Deacetylase-Inhibitor bewirkt einen acetylierten Status der 'core'-Histone.

Trichostatin in der Konzentration von 500 µM im M9 Puffer (Stammlösung: 10 mM Trichostatin in EtOH) wurde in 11 Tieren der L3- und L4-Stadien des Stammes EC107 injiziert. Die Expression des Transgens wurde bei + 25°C herangezogenen Tiere nicht in Keimbahnzellen beobachtet. In somatischen Zellen wurde dagegen eine Verstärkung des Signals des Reportergens *let-858::gfp* beobachtet.

Als Kontrolle wurde ein M9-Puffer in 5 Tiere des Stammes EC107 injiziert (Abb. 39). Das Signal war vergleichbar mit dem Signal der nicht injizierten Tiere des EC107 Stammes. In der F1- und F2-Generation wurde kein Effekt beobachtet. Bei einer geringen Konzentration von 100 µM wurde ebenfalls kein Effekt bei den injizierten Hermaphroditen beobachtet.

Nach der Trichostatin Injektion wurde gezeigt, dass es zum Einen in den Gonaden nicht zu einer Reporter-Expression kommt und zum Zweiten, dass die Reporter-Expression in somatischen Zellkernen erhöht ist. Trichostatin hat im Gegensatz zu somatischen Zellen keine Wirkung auf das Keimbahn-silencing. Daraus kann man schließen, dass die Transgene in den somatischen Zellen von der Trichostatin-abhängigen-Deacetylase kontrolliert sind, was in der Keimbahn nicht der Fall ist.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Die Histon H1-Gen Familie von *C. elegans* ist eine 'replacement' Histon-Typ-Genfamilie

Die H1-Gen Familie besitzt acht H1-Gene, wovon zwei beschrieben sind (VANFLETEREN et al., 1988; VANFLETEREN et al., 1990; SANICOLA et al., 1990).

Sie gehört zur einer 'replacement'-Histon-Typ-Genfamilie. Dies belegen die Polyadenylierung der mRNA und das Vorkommen von Introns.

Das Polyadenylierungssignal besitzen auch die H1<sup>0</sup>, H5, H1M Histone der Vertebraten und das H1.D Histon von *Strongylocentrus purpuratus* (Invertebrat). Diese Histone sind unabhängig vom Zell-Zyklus exprimiert, so dass man dies auch für die gesamte H1-Gen Familie von *C. elegans* vermuten kann.

Jede H1-Isoform (außer den Isoformen H1.X und H1.Q) besitzt ein Intron. Das H1.Q Histon jedoch besitzt zwei Introns und das H1.X Histon vier Introns. Die Primärstruktur der H1-Isoformen gliedert sich in drei Domänen. Die zentrale globuläre Domäne ist konservativ und ist flankiert von der N-terminalen und C-terminalen Domäne. Die Ähnlichkeit zwischen den cDNA H1-Isoformen ist sehr hoch und beträgt maximal 70%. Die globuläre Domäne ist stark konserviert. Die N- und C-terminalen Domänen sind lysinreich (außer der N-terminalen Domäne des H1.X Histons), sie besitzen repetitive Motive wie PKA, KAP-KAP und eine cdc2-Kinase-Erkennungssequenz. Die H1-Isoformen sind 190 bis 252 Aminosäurereste lang, wobei die Histon Isoform H1.Q nur 59 Aminosäurereste lang ist und keine zentrale Domäne enthält.

Erstmalig bei einem mehrzelligen Lebewesen wurde eine Variante ohne zentrale Domäne gefunden, die bisher lediglich bei Ciliaten oder einigen Prokaryonten nachgewiesen wurde (KASINSKY et al., 2001).

## **4.2 Das Histon H1.1 ist das erste Beispiel im Metazoen Reich für ein Linkerhiston, welches für die Entwicklung der Keimbahn essentiell ist**

Das Histon H1 wird traditionell als transkriptioneller Repressor betrachtet.

Bei einzelligen Organismen (*S. cerevisiae* und *Tetrahymena*) produziert der Knockout von H1 keinen Phenotyp. Die Knockout-Mutanten waren lebensfähig. Bei mehrzelligen Organismen ist unbekannt, ob die Funktion des H1 Histons für das Leben essentiell oder nicht essentiell ist.

Deshalb wurde die biologische Funktion des Histons H1 in einem lebendigen mehrzelligen Organismus - *C. elegans*, untersucht und der Unterschied zwischen den somatischen Zellen und der Keimbahn für alle H1-Isoformen beobachtet.

Die Dichotomie zwischen den somatischen Zellen und den Keimbahnzellen ist schon seit dem 18. Jahrhundert aus der Arbeit von WEISMANN bekannt (WEISMANN, 1893). Zuvor wies schon BOVERI bei *Parascaris aequorum* auf den Unterschied der Chromatinmenge in somatischen Zellen und Keimbahnzellen hin ('Diminution'). Die Keimbahnzellen sind die einzigen, totipotenten und unsterblichen Zellen, aus denen ein neuer Organismus hervorgeht.

Um die Rolle des Histons H1 als Repressor in der Keimbahn zu untersuchen, wurde ein transgener Stamm EC107 (*let-858::gfp*) (KELLY und FIRE, 1998) mit einem extrachromosomalen Array hergestellt. Das GFP-Protein wurde in allen somatischen Zellkernen exprimiert — mit Ausnahme der Keimbahn. Es ist aber bekannt, dass in Keimbahnzellen fast die gesamte transgene DNA reprimiert ist. Dieser Prozeß des 'silencing' wurde bis jetzt nicht eindeutig geklärt und beschrieben.

Proteine aus der Polycomb-Gruppe (MES-Proteine) sind an dem 'silencing' Effekt beteiligt. Man unterscheidet 5 MES-Proteine (MES-1, MES-2, MES-3, MES-4 und MES-6). Zwei der fünf Proteine — MES-2 und MES-6 — gehören zur Polycomb-Gruppe, die Proteine enthält, die sich zu einem heterologen Komplex vereinigen, der als transkriptioneller Repressor dient (HOLDEMAN et al., 1998; KORF et al., 1998). In *mes*-Mutanten wurde das *let-858::gfp* Gen in der Keimbahn nicht mehr reprimiert. Es wurden viele cytologische Effekte in der Keimbahn der Hermaphroditen beobachtet.

Erstmals wurden die *mes*-Mutanten ('maternal effekt steril') im Laboratorium von Susan Strome identifiziert (CAPOWSKI et al., 1991). Dabei wurde festgestellt, dass der epigenetische 'silencing' Prozeß für die Funktion der Keimbahnzellen benötigt wird und die fehlenden Proteine der Polycomb-Gruppe die cytologischen Defekte in der Keimbahn verursachen.

Es ist weiterhin bekannt, dass bis zum 100-Zellstadium der Embryo das PIE-1 Protein besitzt, das die Transkription in den Keimbahnzellen reprimiert (MELLO et al., 1996; SEYDOUX et al., 1996). Die MES-Proteine sind während aller Lebensstadien in den Keimbahnzellen vorhanden. Ab dem 100-Zellstadium übernehmen sie wahrscheinlich die Funktion des PIE-1 Proteins, um die transgene DNA zu reprimieren. Die transgene DNA ist in somatischen Zellen und Keimbahnzellen vorhanden, aber nur in Keimbahnzellen reprimiert (OKKEMA et al., 1993; MELLO und FIRE, 1995). Dieser Effekt ist abhängig von der Organisation des Chromatins. Wenn eine Mischung aus der genomischen DNA und der transgenen DNA injiziert wurde, verschwand der 'silencing' Effekt aus den Keimbahnzellen (KELLY et al., 1997). KELLY weist darauf hin, dass die Keimbahnzellen ein einzigartiges System für die Organisation des Chromatins besitzen und dass der 'silencing' Effekt eine Folge dieser Mechanismen ist.

Nach der H1.1 dsRNA Injektion im transgenen *let-858::gfp*-Stamm wurden bei 85% der F1 Hermaphroditen und 51% der Männchen ein GFP-Signal in der Keimbahn beobachtet; dabei wurde keine Verstärkung der Expression in den somatischen Zellen der F1-Generation gesehen. Dann wurde eine spezifische H1.1 dsRNA injiziert, um die Kreuzreaktivität der dsRNA mit anderen H1-Isoformen auszuschließen und den Effekt nur auf H1.1 zu beziehen.

65% der F1-Hermaphroditen zeigten das GFP-Signal in der Keimbahn. Damit wurde gezeigt, dass das H1.1 Histon neben den MES-Proteinen essentiell für den 'silencing' Effekt in der Keimbahn ist. Der 'silencing' Effekt der anderen H1-Isoformen war deutlich schwächer (18%-H1.5, 16%-H1.4, 10%-H1.2 und 0% -H1.3, -H1.X und -H1.Q). Das schwache Signal stammt von der Kreuzreaktivität der dsRNA zwischen den H1-Isoformen. Die Ähnlichkeit zwischen der Volllänge der cDNA H1-Isoformen ist sehr hoch und beträgt maximal 70%. Mit spezifisch hergestellten Fragmenten der H1.5, H1.4, H1.2 Varianten konnte nur ein geringer Einfluß auf das 'silencing' der Keimbahnzellen gezeigt werden. Die Kreuzreaktivität wurde damit eliminiert. Nur die spezifische H1.5 dsRNA hat bei 0,5% der

Tiere den Effekt gezeigt. Das Fragment besaß jedoch einen Teil der zentralen Domäne, die bei H1-Isoformen sehr ähnlich ist und zur Kreuzreaktivität der dsRNAs führen kann. Eine Mischung der dsRNAs aller H1-Isoformen hat nur bei 3% der beobachteten F1 Tiere den Effekt in Keimbahnzellen gezeigt. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass nur die H1.1-Isoform für das 'silencing' in Keimbahnzellen verantwortlich ist und keine andere H1-Isoform.

MES-Proteine können auch den 'silencing' Effekt des *let-855::gfp* Gens verursachen. Dazu wurden andere Defekte bei *mes*-Mutanten in der Keimbahn beschrieben (CAPOWSKI et al., 1991). Es wurde der Frage nachgegangen, ob in der Keimbahn vom *C. elegans* cytologische Defekte entstehen, wenn man die Menge des Histons H1.1 durch die H1.1 dsRNA Anwendung vermindert. Wie im Ergebnis-Teil dargestellt, führt nur die Injektion der H1.1 dsRNA zu Defekten in der Keimbahn. Die Injektion der dsRNAs anderer H1-Isoformen H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.Q und H1.X verursachen keine Anomalien in der Keimbahn. Der geringe, nicht signifikante Anteil der toten Embryonen beträgt ca. 4,7%.

Auch bei *mes*-Mutanten sterben 4% der Embryonen (CAPOWSKI et al., 1991).

Die zweite Injektion der H1.1 dsRNA in L1- und L2-Stadium-Tieren, die von injizierten Hermaphroditen stammen, hat einen gesteigerten H1.1 Phenotyp gezeigt. Der prozentuale Anteil der Tiere mit dem cytologischen H1.1 Phenotyp war 11%. 7 von 8 der adulten, im L1- und im L2-Stadium injizierten Hermaphroditen waren steril, wobei der cytologische H1.1 Phenotyp die größte Ähnlichkeit zur *mes-3* Mutante gezeigt hat. Die cytologischen Effekte waren nur bei den Hermaphroditen zu beobachten und sind wahrscheinlich mit der Dosiskompensation verbunden. Nach der H1.1 dsRNA Injektion waren die Männchen mit einem X-Chromosom gesund, ohne die cytologischen Effekte in der Keimbahn und einem sehr schwachen Signal in den Gonaden des Reporterstammes *let-858::gfp*. Die Hermaphroditen mit zwei XX-Chromosomen hatten dagegen anormale Gonaden und waren steril. Der selbe Effekt in der Keimbahn wurde bei *mes*-Mutanten beobachtet. SEYDOUX und STROME (SEYDOUX und STROME, 1999) vermuten, dass die MES-Proteine die Struktur des Chromatins modulieren und die Expression der Gene auf einem X-Chromosom bei Hermaphroditen sowie auch auf den Autosomen reprimieren. Das Histon H1.1 könnte auch an der Repression der Gene auf einem X Chromosom bei Hermaphroditen beteiligt sein.

Die H1.1 dsRNA Injektion hat nicht nur die Derepression sondern auch cytologische Effekte verursacht. Dies weist darauf hin, dass nicht nur die Histon-Isoform H1.1 das 'silencing' in der Keimbahn beeinflusst, sondern auch, wie die *mes*-Gene, für die cytologische Entwicklung in der Keimbahn von Bedeutung ist. Zusätzlich wurden keine cytologischen Effekte in Männchen nach H1.1 dsRNA Injektion sowie bei *mes*-Mutanten beobachtet.

Daraus kann man folgern, dass das H1.1 entweder mit den MES-Proteinen oder alleine auf die Organisation des Chromatins wirkt, so dass die Abwesenheit des H1.1 Histons zu Derepression und Defekten in der Keimbahn führt.

Als Nächstes wurde der Frage nachgegangen, wie die H1.1-Isoform mit den MES-Proteinen interagiert.

Dazu gibt es zwei verschiedene Grundvorstellungen:

1. Es gibt eine Protein-Interaktion zwischen den MES-Proteinen und dem H1.1 Protein.
2. Die MES-Proteine haben einen Einfluß auf die Expression der H1.1 mRNA.

Zu 1:

LACHNER et al. (2001) haben bewiesen, dass ein SUV39H1 Protein mit HMTase-Aktivität das Histon H3 in der Position Lys-9 in der N-terminalen Domäne methyliert. Dies ermöglicht die Bindung des SUV39H-HP1-Komplexes zur DNA (LACHNER et al., 2001). Das SUV39H1 Protein markiert spezifisch das Histon H3 durch eine Methyl-Gruppe, die von dem HP1 Protein erkannt wird (BANNISTER et al., 2001). Die N-terminale Domäne des Histons H3 wurde an Lys-9 methyliert und bindet spezifisch als Folge dieser Methylierung das HP1-Protein — damit wurde das Heterochromatin inaktiviert.

Das SUV39H1 Protein besitzt eine SET-Domäne, die bei anderen Proteinen aus der Polycomb-Gruppe gefunden wurde. Andererseits interagieren die *Drosophila*-Polycomb-Gruppe-Proteine mit Histonen in vitro (BREILING et al., 1999).

Die MES-2 und MES-4 Proteine von *C. elegans* besitzen die SET-Domänen, wobei MES-2 zur Polycomb-Gruppe gehört. Das MES-2 Protein ist homolog zum 'Enhancer of zeste' Gen



und bildet zusammen mit MES-6 — homolog zum 'extra sex combs' Gen — einen Komplex. Die SET-Domäne wurde bei *Trithorax* (Trx), 'Enhancer of zeste' (E(z)) von *Drosophila* und im 'Supressor of position variagation' 3-9 (Su(var) 3-9) gefunden. Diese Proteine modulieren die Struktur des Chromatins und kontrollieren epigenetisch die Expression der Gene bei *Drosophila* oder bei Säugetieren (Suv39h1/SUV39H1) (AAGAARD et al., 1999). Die Proteine mit der SET-Domäne sind in der Positionseffekt-Variagation (PEV) und im 'silencing' der Gene beteiligt, die in der Nähe der Centromere und Telomere liegen. Sie gehören zu multifunktionalen Regulatoren des Eu- und Hetero-Chromatins (JENUWEIN et al., 1998). In Komplexen mit anderen Proteinen könnten bestimmte Regionen des Chromatins spezifisch reguliert werden.

Diese Proteine (MES-2 und MES-4) könnten mit der H1.1-Isoform durch die SET-Domäne interagieren, das Linkerhiston H1.1 methylieren und die Bindung von anderen MES-Proteinen ermöglichen und damit einen MES-H1.1 Protein-Komplex bilden. Wie oben dargestellt, sind die Histon H1.1 Isoform und die MES-Proteine nicht nur an dem silencing in der Keimbahn beteiligt, sondern verursachen auch die cytologischen Effekte in der Keimbahn. Die *mes-2*, *mes-3*, *mes-4*, *mes-6* dsRNA Injektion sowie auch die dsRNA H1.1 Injektion führt zu sterilen F1 Tieren (GARVIN et al., 1998). Das H1.1 Histon könnte mit Mes-Proteinen einen Komplex bilden und das silencing sowie auch die Entwicklung der Keimbahn beeinflussen. Der Komplex aus MES-Proteinen und dem Histon H1.1 könnte die Struktur des Chromatins in der Keimbahn modifizieren und auf bestimmten Gene wirken, die für die Differenzierung und Proliferation der Keimbahn verantwortlich sind.

Zu 2:

Das MES-4 Protein mit der SET-Domäne (150 Aminosäuren Motiv) besitzt außerdem drei Zinkfinger (ein RING und 2 PHD Finger) und ein Kern-Lokalisierungssignal (FANG und STROME, pers. Mittlg.). Die Zinkfinger könnten der Protein-mRNA-Interaktion dienen. Das MES-4 Protein könnte die mRNA des Inhibitors, das an der Expression von H1.1 beteiligt ist, binden und damit die Expression von H1.1 beeinflussen.

Das MES-4 Protein und das H1.1 Histon sind an dem silencing sowie an der Entwicklung der Keimbahn beteiligt.

Die Proteine aus der Polycomb-Gruppe (MES-Proteine), die nicht direkt mit der DNA reagieren, würden durch die H1.1-Isoform die Expression der Gene beeinflussen, die an der Entwicklung der Keimbahn und des silencings beteiligt sind.

Die Immunfärbung nach der H1.1 dsRNA Injektion mit einem Antikörper gegen H1 wurde in injizierten Tieren (im Vergleich zum Wildtyp) sehr stark, aber nicht vollständig reduziert. Das schwache Signal könnte von anderen H1-Isoformen stammen, da der Antikörper nicht monospezifisch war und auch mit anderen H1 Proteinen reagieren könnte. Der Unterschied dieser Signale kann nicht durch die verschiedene Permeabilität der Objekte entstanden sein, da als Kontrolle in den selben Tieren die Immunfärbung mit dem IFA Antikörper durchgeführt wurde.

Das Histon H1.1 wurde in dem Totallysat aus *C. elegans* mit anderen H1-Isoformen (H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.Q) mit dem Antikörper gegen H1 nachgewiesen (Abb. 2). Nach VANFLETEREN (VANFLETEREN et al. 1988) ist H1.1 das am stärksten exprimierte Linkerhiston. Das immuncytologische Signal der polyklonalen Antikörper gegen H1 könnte daher auch von anderen H1-Isoformen stammen.

Das Signal des *H1.1::gfp* Reportergens zeigt in dem transgenen Stamm EC100 das Protein in den Keimbahnzellen. Dieses Signal wurde von 'silencing'-Phänomenen beeinflusst und ist wahrscheinlich im Vergleich mit dem endogenen H1.1 Gen reduziert. Die Immunfluoreszenz nach der H1-Antikörper Färbung ist in der P-Zelle (Vorläufer der Keimzelle) und in undifferenzierten und differenzierten Keimbahnzellkernen (Oocyten, Spermien) der Hermaphroditen und der Männchen detektierbar. Diese Antikörper sind leider nicht monospezifisch, man kann daher nicht ausschließen, dass auch andere H1-Isoformen in Keimbahnzellen exprimiert sein können. Es ist aber nachgewiesen, dass die H1.1-Isoform das Chromatin in Keimbahnzellen inaktiviert und für die Differenzierung und Proliferation der Keimbahnzellkernen verantwortlich ist. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist neben dem Histon H1.1 in Keimbahnzellen auch die Histon-H1.X-Isoform exprimiert (*H1.X::gfp* Reporter Tiere).

Das Protein H1.1 wurde für die Differenzierung der Keimbahnzellen benötigt. Die Injektion der spezifischen dsRNA H1.1 in das L1 und L2-Stadium der Tiere des Reporterstammes *let-858::gfp* hat gezeigt, dass bei den selben Tieren im adulten-Stadium

der 'desilencing' Effekt beobachtet werden konnte. Daraus folgert man, dass das H1.1 Protein während der Proliferation der Keimbahnzellen gebraucht wurde.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde festgestellt, dass die *mes*-Mutanten den Tieren mit dem H1.1 Phenotyp ähneln.

Man kann jedoch nicht ausschließen, dass andere H1-Isoformen in Keimbahnzellen exprimiert sind. Um diese Frage zu klären, benötigt man Knockout H1.1 Tiere, um diesen Anteil von anderen H1-Isoformen im Phenotyp abzugrenzen. Man kann ebenfalls nicht ausschließen, dass das H1.1 nach dem Knockout durch andere H1-Isoformen ersetzt werden kann (PRYMAKOWSKA-BOSAK et al., 1996).

Durch die H1.1 dsRNA Injektion ist gesichert, dass das H1.1 Protein für den 'silencing' Effekt sowie auch für die Entwicklung und Differenzierung der Keimbahn benötigt wird.

Das *H1.1::GFP* Expressionsmuster hat gezeigt, dass das H1.1 Protein in der Keimbahn und auch in somatischen Zellen exprimiert ist.

Die H1.1 dsRNA wurde nur in dem Reporterstamm *let-858::gfp* getestet. In anderen Reporterstämmen (*ama-1::gfp* oder *unc-37::gfp*) wurde nicht untersucht, ob die H1.1 dsRNA Injektion zur Derepression in der Keimbahn führt. Bei *mes*-Mutanten waren die beobachteten 'desilencing' Effekte in *ama-1::gfp* und *unc-37::gfp* dem Effekt des *let-858::gfp* Reporterstammes ähnlich. Daraus kann man folgern, dass auch H1.1 den selben Effekt in beiden Stämmen verursachen würde (KELLY und FIRE, 1998).

#### **4.2.1 Hinweise für die Translationskontrolle der Histon-Isoform H1.1**

Es gibt Hinweise, dass die Expression des Histons H1.1 von einem Motiv-UUUCU kontrolliert wird. Dieses Motiv (TGE Kontrolle) gehört zu regulatorischen Elementen in dem nicht kodierenden 3'-Fragment der mRNA und ist von Nematoden bis Säugetieren (das humane Oncogen GLI) nachgewiesen worden (KINZLER et al., 1987). Man nimmt an, dass das Motiv für die Bildung der embryonalen Achsen verantwortlich ist und einen Einfluß auf die maternale mRNA Expression und Geschlechtsbestimmung hat. Das GLI Onkogen gehört zur Krüppel-Familie der Transkriptionsfaktoren (KINZLER et al., 1987; RUPPERT et al., 1988). Bei *C. elegans* ist dieses Fragment Pyrimidin-reich, und es ist identisch mit dem 3' UTR Signal des *tra-1*, *tra-2* Gens aus *C. elegans* und *tra-2* von *C. briggsae*. Die Mutation des *tra-1(e1575sd)* Gens führt zu anormalen Hermaphroditen, die

vollständig maskulinisiert und fertil sind. Die Hermaphroditen mit der Mutation des *tra-2(e1095)* Gens sind nicht vollständig maskulinisiert.

Man unterscheidet zwei Klassen des *tra-2* Gens:

- *tra-2(gf)*, die dominante gain-of-function Mutation, feminisiert vollständig die Keimbahn in XX Tieren und schwach in XO Tieren. 'Gain-of-function' Mutation kann dadurch entstehen, dass die Translations-Kontrollstrukturen beschädigt werden (HODGKIN, 1986).
- *tra-2(mx)*, feminisiert die Keimbahn und maskulinisiert das Soma der XX Tiere (HODGKIN, 1986).

Die Translation der mRNAs mit dem 3'UTR Signal ist von Protein-Faktoren abhängig (mRNA-bindende Proteine: CPEB, FBF, GLD-1 *S. cerevisiae*), die das regulatorische Motiv im 3'UTR Fragment der mRNA binden und die Translation regulieren (HAKE und RICHTER, 1994). Die mRNA Translation wird entweder gestoppt oder durchgeführt (LUITJENS et al., 2000).

Welche Funktion das 3'UTR Signal in der H1.1 mRNA hat und welche Proteine das regulatorische Motiv binden ist nicht bekannt. Es wurde bei den Untersuchungen gezeigt, dass das Signal im Reporterstamm *H1.1::gfp::CeH1.1 3'UTR* im Vergleich zu dem *H1.1::gfp* Reporterstamm sehr stark reduziert wurde. Es wurde kein Signal in somatischen Zellen (außer dem schwachen Signal in polyploiden Zellen des Darmes) wahrgenommen. Ebenso wurde kein Signal in Keimbahnzellen detektiert. Hier könnte das Signal durch das keimbahnspezifische Chromatin silencing reprimiert sein.

Zwei verschiedene Fragmente der H1.1 dsRNA, die zwei verschiedene Teile der gesamten H1.1 mRNA darstellen, wurden in den Reporterstamm *let-858::gfp* injiziert.

Die Injektion der H1.1 dsRNA (650 bp), in der das 3'UTR Signal abgeschnitten wurde und die Injektion der H1.1 dsRNA (296 bp), die das 3'UTR Signal besaß, lieferte zwei verschiedene Ergebnisse: Die längere H1.1 dsRNA löste nur bei 12% der F1 Tieren das GFP-Signal in der Keimbahn aus. Das spezifische Fragment der H1.1 dsRNA mit dem 3'UTR Signal verursachte bei 65% einen 'desilencing' Effekt. Die Kerne der Keimbahnzellen sowie die Oocyten und Spermien erzeugten dagegen ein starkes Signal

des *let-858::gfp* Gens. Das weist darauf hin, dass die dsRNA dieses Abschnittes besonders wirksam ist.

Nun stellt sich die Frage, ob das Signal von der Faltung des 3' UTR abhängig ist und ob das 3' UTR Signal in der H1.1 mRNA die Expression des H1.1 beeinflusst

Nach SCHULZE (pers. Mitteil.) könnte sich die Wirkung des H1.1 dsRNA Fragmentes mit dem 3'UTR Signal aus der Sekundärstruktur der Ziel-mRNA ergeben, die mehrere große Schleifen zeigt, die in der H1.1 dsRNA ohne den 3'UTR-Abschnitt in dieser Weise nicht vorkommt. Diese Schleifen könnten besonders gut für die dsRNA Wirkung sein, wodurch der Effekt bei 65% der Tiere entsteht. Zusätzlich entspricht die Faltung der H1.1 3'UTR mRNA Sekundärstruktur der Faltung der *tra-2* 3'UTR mRNA Sekundärstruktur (ermittelt mit Hilfe des Computerprogramms [mFold]).

Auf die regulatorische Funktion des 3'UTR Signals der H1.1 mRNA könnte man nur schließen, wenn man gezielt Mutanten mit beschädigten Sequenzen hergestellt hätte.

### **4.3 Das Histon H1.4 hat einen Einfluß auf die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen**

Die Histon-Isoform H1.4 ist im Gegensatz zu der Histon-Isoform H1.1 nur in bestimmten Stadien und in bestimmten Zell-Linien von *C. elegans* exprimiert. Dies wurde mit dem *H1.4::gfp* Konstrukt dargestellt. Das Protein ist ab dem 16-Zellstadium des Embryos in den Zell-Linien E, MS, C und D exprimiert, nicht jedoch in der AB-Zelllinie und in der P-Zelle. Ab dem L2/L3 Stadium ist es nur in polyploiden Zellen des Darms sehr schwach beobachtbar und in adulten Tieren nicht mehr anwesend. In der P-Zelle, die ein Vorläufer für Keimzellen ist, ist die transgene DNA (unter anderem auch *H1.4::gfp*) nicht exprimiert ('silencing'-Effekt). Das GFP-Signal erscheint nicht. In Embryonen (morphogenetische Phase) ist das H1.4 Protein nur in bestimmten Bereichen exprimiert, aus der die Organe Darm, Pharynx und die Muskelzellen entstehen.

Die H1.4 dsRNA Injektion in N2 hat 4,8% tote Embryonen im Brezel-Stadium erzeugt, die keinen entwickelten Pharynx und keinen Darm besaßen.

Die Penetranz war gering, zeigte aber die Korrelation zwischen der H1.4::GFP Expression und der H1.4 dsRNA Injektion. Es waren nach der H1.4 dsRNA Injektion die Organe betroffen, die aus den E-, MS-, C- oder D-Zell-Linien entstanden sind.

Daraus kann man folgern, dass das H1.4 Protein eine wichtige Funktion für die Organdifferenzierung (Darm, Pharynx) haben muß. Vom L1 Stadium an wird das Protein abgebaut, da es vermutlich nicht mehr benötigt wird.

In der Literatur (TANAKA et al., 2001) sind H1-Isoformen bekannt, die in bestimmten Stadien exprimiert sind und eine wichtige Funktion ausüben. So z.B. die B4/H1M-Isoform, die in Oocyten von *Xenopus* exprimiert ist und die Expression derjenigen Gene ermöglicht, die oocytenspezifische 5S rRNAs kodieren.

Die Mesoderm-Zellen differenzieren sich erst aus den Ektoderm-Zellen, wo das Histon B4/H1M durch die somatische H1A-Isoform ersetzt wird (STEINBACH et al., 1997; VERMAAK et al., 1998).

Auch das H1.4 Protein ist in bestimmten Zell-Linien und in bestimmten Stadien exprimiert. Man kann vermuten, dass es die Struktur des Chromatins so ändern kann, dass nur bestimmte Transkriptionsfaktoren gebunden werden und so die Proteine für die Entwicklung des Darms oder des Pharynx exprimiert würden. Man kann auch vermuten, dass das H1.4 Protein mit anderen Proteinen, die für die Organentwicklung (Pharynx, Darm) verantwortlich sind, interagieren kann und ab einer bestimmten Zeit abgebaut wird oder durch andere Proteine (H1-Isoformen) ersetzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde belegt, dass eine Korrelation zwischen dem H1.4 Phenotyp und der *H1.4::GFP* Expression besteht.

Außerdem führt die H1.4 dsRNA Injektion in 7,4% der Männchen dazu, dass die Entwicklung der Männchen-spezifischen-Schwanzstrukturen, welche normalerweise im L4 Stadium beginnt, nicht zu Ende geführt werden kann. Die Männchen besaßen eine typische Stachelstruktur der Hermaphroditen an ihren Schwanzenden, wobei die Strahlen kürzer und die Spiculae länger waren.

Die männlichen Gonaden und die undifferenzierten und differenzierten Keimbahnzellkerne hatten einen normalen Phenotyp.

Um herauszufinden, ob der beobachtete H1.4 dsRNA Phenotyp spezifisch für dieses H1.4 Protein ist, wurden die verkürzten dsRNA H1.4 Konstrukte injiziert, mit dem Effekt, dass nur 2,3% der betroffenen Männchen einen schwachen Phenotyp ausbildeten. Vermutlich war das spezifische H1.4 dsRNA Konstrukt, das eine 3'-nicht translatierte Region besaß, zu

klein. Das Konstrukt bestand nur aus 200 bp, was nicht ausreichend ist, um den vollständigen Effekt auszulösen.

In der Folge stellt sich die Frage, wie der Schwanz bei männlichen Tieren von *C. elegans* entsteht und auf welchem Weg das H1.4 Protein die Entwicklung des Schwanzes der männlichen Tiere beeinflussen kann.

Der Schwanz der Männchen und der Hermaphroditen entsteht aus den selben hyp-Zellen: hyp-8, hyp-9, hyp-10 und hyp-11. Die Entwicklung der Schwänzchen findet schon ab dem späteren L3-Stadium statt. Für die männliche Morphogenese sind Hox-Gene verantwortlich, die die Anterior-Posterior-Richtungen bestimmen. Die interzelluläre Signalisation und Fusion der Zellen der Hypodermis gehört zu den nächsten Schritten der Entwicklung des Schwanzes.

Man unterscheidet zwei Typen von Schwänzen: 'peloderan', vorkommend bei Männchen von *C. elegans*, und 'leptoderan', mit kleinem Stachel, die den Hermaphroditen ähnlicher sind (*O. myriophila*, *lep-1*).

Die Morphogenese des Schwanzes der männlichen Tiere des N2 Stammes erfolgt durch die Fusion der hyp-Zellen und der 'adherens junction'. Die Flüssigkeit wird durch die Vakuole zur extrazellulären Umgebung der Zellen transportiert, dabei ändern die Zellen ihre Form und 'retraktieren'. Es werden die Strahlen und der Kopulationsbursa geformt. Bei den *lep*-Mutanten findet die Retraktion nicht statt, trotzdem ist das Verhalten den Wildtyp-Tieren ähnlich.

NGUYEN (NGUYEN et al., 1999) nimmt an, dass bei *lep*-Mutanten das Signal von den Nachbarzellen die Entwicklung des Schwanzes der männlichen Tiere auslöst und die Fusion der hyp-Zellen immer in Richtung Anterior-Posterior läuft.

Bei Männchen mit dem H1.4 Phenotyp wurde nur ein 'leptoderan' Schwanz mit anormalen Strahlen (kürzer als bei dem Wildtyp) beobachtet. Wie das H1.4 Protein die Entwicklung des Schwanzes beeinflussen könnte, ist bisher unklar.

Es wurden andere dem H1.4 Phenotyp ähnliche Mutanten gesucht, um die beteiligten molekularen Mechanismen besser zu verstehen. Die gemeinsamen Eigenschaften wurden zwischen dem H1.4 Phenotyp und den *fem-3*-Mutanten festgestellt.

Der Effekt trat bei beiden Phenotypen nur bei Männchen auf, niemals bei Hermaphroditen. Außerdem enthalten die 3'- nicht translatierten Fragmente (vom *fem* und H1.4 Gen) die selben Pentanukleotid-Sequenzen (UCUUG), die als die Translationskontrolle in der *fem*-

3-Mutante entscheidend sind. Der Abstand zwischen dem Polyadenylierungssignal und der Pentanukleotid-Sequenz ist bei dem H1.4 Gen sowie bei dem *fem-3* Gen von *C. elegans* bestimmt (Alignment 5). Außerdem kann das PME Signal als 'nanos response element' (NRE) von *Drosophila* interpretiert werden. Dieses NRE Element enthält das *hunchback* Gen bei *Drosophila*. Die Transkription des *hunchback* Gens wird auf zwei Wegen kontrolliert. Der Gradient des 'bicoid' Proteins im Anterior-Teil des Embryos aktiviert die Synthese der *hunchback* RNA und die Expression des Proteins. Da im posterioren Teil die Konzentration des bicoid-Proteins klein ist, reprimiert das 'nanos' Protein die Translation der *hunchback* mRNA. Die mRNA wird degradiert.

Das *hunchback* Gen determiniert die Anterior-Posterior Strukturen. Die Anwesenheit des *hunchback* Proteins im anterioren Teil löst die Entwicklung der anterioren Strukturen (Thorax-Region) aus, seine Abwesenheit im posterioren Teil wird für die Entwicklung der posterioren Strukturen benötigt.

Die Fusion der hyp-Zellen im Schwanz der männlichen Tiere ist auch in Richtung Anterior-Posterior gerichtet. Man nimmt an, dass dazu Hox-Gene benötigt werden. Es ist jedoch unklar, ob eventuell noch andere Gene beteiligt sind.

Bis jetzt wissen wir nicht, ob die Translationskontrolle mit dem 'nanos response element' von H1.4 überhaupt stattfindet und wenn sie stattfinden würde, welche biologische Bedeutung sie hätte. Ebenso ungeklärt bleibt die Frage, warum der H1.4 dsRNA Phenotyp nur bei Männchen im distalen Teil des Organismus (Schwanz) und nicht in den Gonaden auftritt. Bei *fem*-Mutanten ist das FEM-Protein für die normale Entwicklung der Gonaden notwendig.

Die reprimierende Translationskontrolle des *fem-3* Gens findet in der Oogenese statt. Bei *fem*-Mutanten gibt es zwei Klassen von Mutanten:

- bei dem Null-Allel werden die XO Tiere zu fruchtbaren Weibchen
- bei 'gain of function'-Allelen, entstehen die Mutanten dadurch, dass die Translationskontrolle beschädigt wird und es zur Überexpression kommt. Diese XX Tiere produzieren keine Spermien und Oocyten.

Bei Männchen mit dem H1.4 Phenotyp wurden Änderungen in den Gonaden hingegen nicht beobachtet. Es wurde nur festgestellt, dass der Schwanz von männlichen Tieren



feminisiert ist. Dieser Phenotyp wurde bei *fem-3/+* XO Männchen beobachtet, die von der *fem-3/fem-3* Mutter stammen (Hodgkin, 1986).

Die Gonaden sahen normal entwickelt aus und besaßen normal entwickelte Spermien. Es wurden keine Oocyten beobachtet. Die Qualität der Spermien wurde dabei nicht untersucht.

Das GFP-Signal des *H1.4::gfp*-Reportergens wurde bei Männchen ebenfalls nicht in der Gonade beobachtet. Andererseits besaß dieses Konstrukt das H1.4 Gen ohne die 3'-untranslatierte Region. Wie das Expressionsmuster vom *H1.4::gfp::CeH1.4 3'UTR* Konstrukt aussehen würde, wurde nicht untersucht.

Ob das H1.4 Protein in Keimbahnzellen exprimiert ist und auf welchem Wege der H1.4 Phenotyp beeinflußt wird, ist unklar.

Es gibt nur theoretische Hinweise darauf, dass die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen vom 3'- nicht translatierten Signal wie bei den *fem-3*-Mutanten abhängig sein könnte.

Es gelang nicht, einen Histon H1.4-Knockout-Stamm herzustellen.

Die weitere Suche nach der H1.4 Funktion im Schwanz des *C. elegans* Männchens hat zu einer Untersuchung der SPD-Neuronen geführt, welche sich in der Nähe der Spiculae befinden. Es wurde nachgewiesen, dass die Injektion der SON-1/H1.4 dsRNA die SON-1 Penetranz verdoppelt. Es wurden mehr betroffene F1-Tiere beobachtet als nach der SON-1 dsRNA Injektion. Die Injektion der SON-1/H1.1 dsRNA ändert im geringen Maße die Anzahl der betroffenen Tiere im Vergleich mit der SON-1 dsRNA Injektion. Die betroffenen Tiere besaßen anormale Gonaden.

Das SON-1 Protein kodiert das HMG1/2-ähnliche DNA-bindende-Protein, das eine spezifische Bedeutung im Wnt-Signal-Weg hat (JIANG und STERNBERG, 1999).

In diesem Experiment wurde nur gezeigt, dass die Proteine-H1.4 und SON-1-synergistisch auf die Entwicklung der Gonaden und der SPD- Neuronen der Spiculae wirken müssen.

Wie die Expression des H1.4 Proteins reguliert wird und auf welchem Weg die Entwicklung gesteuert wird, ist ungewiß. Um diese Frage zu klären, benötigt man weitere Untersuchungen. Der Phenotyp der dsRNA H1.1 und der H1.4 Injektion in den *dpy-20(e1282); syIs20 him-5(e1490)* Stamm mit einer *gpa-1::lacZ* Fusion hat keine klare

Antwort auf die Funktion des H1.4 Proteins gegeben. Der *gpa-1* Promotor war mit dem *lac-Z* fusioniert. Das *gpa-1::lacZ* Reporter-gen wurde in SPD Neuronen und Phasmiden des Schwanzes der männlichen Tiere exprimiert. Das Ziel dieses Experimentes war es, die Effekte nach der SON-1 dsRNA Injektion und H1.1, H1.4 dsRNA Injektion zu vergleichen und die Beziehung zwischen den Phenotypen zu untersuchen. Die SON-1 dsRNA Injektion hat zu 2 SPD-Neuronen pro Spicula geführt. Die H1.4 Injektion lieferte folgendes Ergebnis: 2 SPD Neuronen traten an nur einer Spicula auf. Die dsRNA H1.1 Injektion hat zu 2 SPD Neuronen an einer Spicula und 1 SPD Neuron an der anderen Spicula geführt. Ob die Phenotypen von der Kreuzreaktivität der dsRNAs stammen oder inwieweit der beobachtete Effekt mit den Isoformen überhaupt etwas zu tun hat, ist unklar. Man benötigt für weitere Untersuchungen die Injektion der spezifischen H1.1 und H1.4 dsRNAs, um die Kreuzreaktivität auszuschließen.

Ebenso sind weitere Untersuchungen nötig, inwieweit in dem Wnt-Signal-Transduktionsweg das H1.4 Protein involviert ist. So wurde z.B. das SON-1 für die Transkription von *lin-17* gebraucht, welches der Wnt-Rezeptor ist.

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass das H1.4 Protein nicht nur die Morphologie sondern auch das Nervensystem bei *C. elegans* beeinflusst.

#### **4.4 Die H1.X-Isoform ist ein cytoplasmatisches Protein**

Die Funktion der H1.X-Isoform wurde wegen ihrer für die Linkerhistone ungewöhnlichen Primärstruktur analysiert.

Die Unterschiede zwischen den H1-Isoformen und H1.X betreffen die Aminosäure-Komposition der terminalen Domänen. Dies ist im Alignment 3 ablesbar.

Die N-terminalen Domänen der Linkerhistone, außer von H1.X, sind Alanin-, Prolin- und insbesondere Lysin-reich. Die N-terminale Domäne von H1.X besitzt kein Lysin. Man kann in der N-terminalen Domäne des H1.X Histons fünf Leucin Aminosäurereste und Tyrosin finden.

Kein vergleichbares Protein wurde bei einem anderen Organismus bis dato gefunden.

Die *H1.X::GFP* Expression in dem transgenen Stamm EC103 wurde sowohl in Tonofilamenten des Cytoplasmas der Epithelialzellen, die als Marginalzellen bekannt sind, als auch in ihren Zellkernen beobachtet.

Die Marginalzellen sind im 120° Winkel radiär zueinander im Pharynx angeordnet. Man unterscheidet drei mc2 Marginalzellen und eine unbekannte Zahl von mc3 Marginalzellen. Nach ALBERTSON und THOMSON (1976) befinden sich im Pharynx insgesamt neun Marginalzellen. Die Tonofilamente laufen radial durch die Marginalzellen und sind aus Intermediärfilamenten aufgebaut, die eine cytoskeletale Struktur formen.

Die Intermediärfilamente sind durch elf Gene repräsentiert (DODEMONT et al., 1994).

Das GFP-Signal in axialer Orientierung der Tonofilamente des Pharynx wurde deutlich als Punkte in dem Cytoplasma der Marginalzellen beobachtet (Abb.33 G).

Die beiden Antikörper  $\alpha$ H1.X-11 und  $\alpha$ H1.X-101 haben auch die Tonofilamente der Marginalzellen im Pharynx gefärbt. Die Immunfärbung mit dem Intermediärfilament-Antikörper (IFA) war mit der Färbung des H1.X Antikörpers co-lokalisiert. Beide Antikörper haben die Tonofilamente gefärbt. Das H1.X Protein war mit Tonofilamenten der Marginalzellen assoziiert. Die Immunfärbung mit dem IFA im *H1.X::gfp*-Reporterstamm hat nochmals die co-Lokalisation mit dem H1.X Protein bestätigt.

Zusätzlich mit dem *H1.X::gfp*-Konstrukt sowie auch mit der Immunfärbung der H1.X-11 und H1.X-101 Antikörper wurden die Nukleoli in den Zellkernen beobachtet, und das Nukleoplasma wurde schwach gefärbt. Die zwei grünen Punkte in fast jedem Kern entsprachen den zwei Nukleoli, die auch mit dem Antikörper H1.X-101 beobachtet wurden. Die Färbung wurde dort beobachtet, wo weniger DNA vorhanden war. Diese Isoform, im Gegensatz zu den H1.1 und H1.4 Isoformen, ist nicht mit der Hauptmasse des Chromatins, sondern nur mit Nukleolus assoziiert.

Bei anderen Organismen (*Tulipa gesneriana*, *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *Vicia faba*, *Nicotiana tabacum*) ist eine neue Histon-Isoform H1 entdeckt worden, die nicht dem H1.X Protein ähnlich ist. Sie ist ebenfalls in den Nukleoli der Kerne anwesend und bindet stark die ribosomale DNA in vitro (TANAKA et al., 1998; TANAKA et al., 1999). Die Autoren vermuten, dass dieses Linkerhiston das Chromatin der Nukleoli zu organisieren hilft.

Welche Rolle das Histon H1.X in den Nukleoli spielt, ist unklar.

Man vermutet, dass im Nukleoli das Protein mit der ribosomalen DNA assoziiert werden kann.

Weiterhin wurde festgestellt, dass in zwei Generationen nach der *H1.X::gfp* Injektion mehr Männchen entstanden sind. Es stellt sich also die Frage, ob das Protein eine Funktion in der Meiose besitzt. Es könnte mit dem Spindelapparat assoziiert werden und die

Segregation der Chromosomen zwischen den Zellen beeinflussen. So wurden z.B die Intermediärfilamente bei Seeigeln als eine Komponente der Centrosomen beschrieben (SCHATTEN et al., 1987).

In anderen transgenen Stämmen, die durch eine andere Methode ('Keimbahntechnik') entstanden sind, wurde das GFP Signal in diagonal laufenden Muskelzellen des Körpers von *C. elegans* sowie auch in Vulva-Muskelzellen beobachtet.

In der Literatur (FRANCIS und WATERSTON, 1991) wurden die Intermediärfilament-Proteine in Vulva-spezifischen Muskelzellen, den Muskelzellen des Körpers und in den Körpermuskeln und der Hypodermis und des Pharynx der Nematode *Ascaris* nachgewiesen (BARTNIK et al., 1986).

Das *H1.X::GFP* Signal, mit Ausnahme der Hypodermis, entspricht wie oben dargestellt der Immunfärbung des IFA Antikörpers.

Zusätzlich wurde in den *H1.X::gfp*-transgenen Stämmen das Signal in Keimbahnzellen beobachtet — trotz des 'silencing' Effektes. Das Signal war schwach in Spermatozyten detektierbar. Der Spermatozyten-Cortex besitzt Actin-Mikrofilamente, und im Cytoplasma befinden sich die Mikrotubuli, die in späteren Stadien nicht mehr wahrnehmbar sind (WARD et al., 1981). Dies würde erklären, warum das GFP Signal nicht mehr in Spermien registriert wurde. Zusätzlich wurde mit dem  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper diese Beobachtung bestätigt. In Spermatozyten wurde ein schwaches Signal und in Spermien kein Signal detektiert (VOGT, pers. Mittlg.).

Die beiden Antikörper  $\alpha$ H1.X-11 und  $\alpha$ H1.X-101 waren nicht monospezifisch. Der H1.X-11 Antikörper hat zusätzlich mit Lamin und mit einem anderen, unbekanntem Protein reagiert (Abb. 22). Der H1.X-101 Antikörper hat mit anderen H1-Isoformen und einem anderen, unbekanntem Protein reagiert. Dies kann man damit erklären, dass die Kreuzreaktivität zwischen den  $\alpha$ H1.X-101 Antikörpern und anderen H1-Isoformen durch die große Ähnlichkeit der Linkerhistone entsteht. Die Reaktion mit unbekanntem Proteinen kann man damit erklären, dass die immunisierten Kaninchen mit Nematoden infiziert worden sein könnten und Antikörper gegen die Nematoden-Proteine herstellten.

Mit dem Antikörper  $\alpha$ H1.X-11 wurde zusätzlich das Nukleoplasma der Keimbahnzellen der Hermaphroditen sehr schwach gefärbt. Es wurde aber keine Immunfärbung der Muskelzellen durch die beiden H1.X Antikörper beobachtet. Dieses Protein ist löslich und könnte während der Inkubation aus den Muskeln herausgewaschen worden sein. Die Ergebnisse der H1.X Färbung könnten auch von den Fixierungsbedingungen abhängig sein. Verschiedene Fixierungsbedingungen liefern z.B. verschiedene Ergebnisse der IFA-Immunfärbung (FRANCIS und WATERSTON, 1991).

Auf der Suche nach der Funktion des H1.X Histons wurde die dsRNA injiziert. Es wurde festgestellt, dass der H1.X Phenotyp mit der *H1.X::GFP* Expression und mit der Immunfärbung korreliert. Der Pharynx der betroffenen Tiere war länger als normal, die Hermaphroditen waren kürzer ('dumpy'-Phenotyp) und uncoordinated ('unc'-Phenotyp). 2,1% der 'dumpy' Hermaphroditen konnten die Embryonen nicht ablegen ('egl'-Phenotyp). Daraus kann man folgern, dass nach der H1.X dsRNA Injektion in der Körpermuskulatur und in den Vulva-Muskeln der F1 Tieren Defekte eingetreten sind und das H1.X Protein eine Komponente im IF-Filamentsystem dieser Tiere ist.

Die Immunfärbung mit H1.X-11 und IFA Antikörpern nach der H1.X dsRNA Injektion hat gezeigt, dass die Menge des H1.X Proteins im Gegensatz zum IF Protein im Pharynx reduziert ist. Es wurde auch eine Mutante gefunden, die den Tieren mit dem H1.X Phenotyp ähnelte. Die *unc-65* Mutante hat dem Phenotyp 'unc' und 'egl' des H1.X Phenotyps entsprochen. Zusätzlich war die *unc-65* Mutante präzise an der Position kartiert, wo sich das H1.X Gen befindet.

Es wurde ein Totallysat aus dieser Mutante durch einen western-blot untersucht sowie auch die Färbung mit dem Antikörper H1.X-11 in der *unc-65* Mutante durchgeführt.

Auf dem western-blot wurde eine Bande, die dem H1.X Protein entsprochen hat, detektiert. Bei der Immunfärbung der Tiere wurden die Tonofilamente im Pharynx der *unc-65* Mutanten beobachtet. Diese Beobachtung schließt aber nicht aus, dass die *unc-65* Mutante eine Mutante für das H1.X ist. Durch die Substitutionen in dem H1.X Protein könnte ein Protein entstehen, das die Funktionen des richtigen H1.X Proteins verloren hat. Dieses so entstandene Protein könnte detektierbar sein, würde jedoch keine Funktion ausüben. Diese Substitution/Substitutionen könnte(n) demnach bei der *unc-65* Mutante stattgefunden haben.

In der Literatur (KACZANOWSKI und JERZMANOWSKI, 2001) wird behauptet, dass das Linkerhiston zuerst eine Komponente der Filamente gewesen ist und dann zur heutigen Funktion als Komponente des Chromatins evolviert ist. Folgende Argumente bestätigen diese Ansicht:

- bei Seeigeln ist das Linkerhiston mit dem Spermien-Flagellum assoziiert, bei *Paramecium* und *Chlamydomonas reinhardtii* ist das Linkerhiston mit cillia und Basalkörpern assoziiert (MULTIGNER et al., 1992)
- das Linkerhiston stabilisiert die axonemalen Mikrotubuli (SAOUDI et al., 1995)
- alle Tiere und Pflanzen, die Gameten mit Flagellum besitzen, haben die mRNAs der Linkerhistone mit einem poly-A-Schwanz (KACZANOWSKI und JERZMANOWSKI, 2001)
- die cdc2 Kinase, die das Histon H1 phosphoryliert (ARION et al., 1988), phosphoryliert auch Vimentin (TSUJIMURA et al., 1994) und Lamin (HEALD und MCKEON, 1990), die die Komponenten des Intermediärfilamenten-Systems im Cytoplasma und im Kern sind
- die cdc2 Kinase phosphoryliert auch Kaldesmon (YAMASHIRO et al., 1991). Kaldesmon bindet Tubulin (ISHIKAWA et al., 1992), die Komponente des Filamenten-Systems ist
- die PAT1-Mutante der Hefe wurde durch die Expression des menschlichen Linkerhistons zum Wildtyp. Bei der PAT1-Mutante wurde die Mitose verhindert sowie die Struktur der Mikrotubuli zerstört (LIN et al., 1996)
- in BY-2 Suspensionszellen von Tabak wurde bei der Überexpression des Linkerhistons H1 von *Arabidopsis thaliana* die Änderung der Zellengröße beobachtet, die mit der Organisation der kortikalen Mikrotubuli korreliert (CALIKOWSKI et al., 2000).

Ob das Histon H1.X bei *C. elegans* auch eine evolutiv ältere Struktur als die übrigen Linkerhistone ist oder ob es ein *C. elegans*- oder Nematoden-spezifisches Protein ist, ist unklar.

Folgende Argumente sprechen dafür, dass das H1.X Histon den übrigen H1-Isoformen ähnelt und eine evolutiv ältere Struktur sein könnte:

- die ungewöhnliche Sekundärstruktur – die hydrophoben Aminosäurereste in den terminalen Domänen, die man nicht bei anderen H1 Isoformen findet
- die zentrale Domäne mit der typischen Struktur, die konservativ für Linkerhistone ist

- der poly-A-Schwanz der mRNAs, der typisch für 'replacement' Typen der Linkerhistone ist und früher in der Evolution entstanden ist als die H1 Histone (SCHULZE und SCHULZE, 1995).

Das Histon-Isoform H1.X kann man als ein altes evolutionäres Linkerhiston betrachten, das bei *C. elegans* mit Intermediärfilamenten und nicht mit der Hauptmasse des Chromatins sondern mit den Nukleoli assoziiert ist.

#### **4.5 Homologe-Repressionsmechanismen in *C. elegans* und *S. cerevisiae***

Die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* wurden zur Untersuchung der Telomer-Positionseffekt-Variegation durch die Expression von *C. elegans* Histon H1-Isoformen benutzt.

Durch den Telomer-Positionseffekt bei *S. cerevisiae* wurde die Expression der Gene reduziert, die in der Nähe der Telomere liegen. Das Gen URA3 kann z.B. ein- oder ausgeschaltet werden, abhängig von der Entfernung zwischen dem URA3 Gen und den Telomeren (GOTTSCHLING et al., 1990). Wenn das URA3 in der Nähe der Telomere lokalisiert ist, würde die Transkription des Gens reprimiert. Diesen Effekt könnten die DNA-bindenden Proteine beeinflussen.

Die Proteine Sir2, Sir3, Sir4, die nicht direkt die DNA binden, können auch den Telomer-Positionseffekt modifizieren. So inaktiviert z.B. der Komplex aus Sir 2, Sir 3 und Sir 4 das Chromatin in der Nähe der Telomer-Regionen und der silent mating type loci (HML und HMR). Das SIR2 Protein bildet zusammen mit Net1 und Cdc14 einen sogenannten RENT Komplex (**r**egulator of **n**ucleolar silencing and **t**elophase exit), der die ribosomale DNA (rDNA) inaktiviert (MOAZED, 2001).

Das SIR2 Protein ist essentiell für die Repression des silent mating type loci der Hefen und für die Chromatin Repression an den Telomeren (GOTTSCHLING et al., 1990).

Die transkriptionelle Repression wurde in der Nähe der Telomere nicht beobachtet, wenn die Sir2, Sir3 und Sir4 Gene beschädigt worden waren (APARICIO et al., 1991).

Die epigenetischen Variationen der Gen-Expression wurden bei Pflanzen, Insekten, Säugetieren und *S. cerevisiae* entdeckt. In *Drosophila* wurde die Positionseffekt-Variegation beobachtet, wenn das entfernt liegende Gen, das normalerweise im

Euchromatin liegt, durch eine chromosomale Inversion in die Nähe des Heterochromatins geraten war (EISSENBERG, 1989).

Die SIR und RENT Komplexe interagieren mit den DNA-bindenden Proteinen (z.B. RAP), die spezifisch für die Regulation der Expression der Gene sind und sie so inaktivieren. Wichtig für die Inaktivierung des Chromatins sind zusätzlich die terminalen Domänen der Histone H3 und H4 (NAKAYAMA et al., 2001). Die Deacetylierung des Lysins in Position 16 in der N-terminalen Domäne des Histons H4 und des Lysins Lys-9, 4, 18 im Histon 3 ist für die Inaktivierung der Gene notwendig. In aktivem Chromatin sind die Lysine Lys-9 und 14 des Histons H3 sowie die Lys-5, 8, 16 des H4 Histons acetyliert und im inaktiven Chromatin hypoacetyliert. Die Deacetylierung des Lysins 16 des Histons H4 ist für die Bindung des Sir3 Proteins essentiell (IMAI et al., 2000)

Bei der Suche nach der Funktion des Histon H1.1 wurde festgestellt, dass von *C. elegans* H1-transgenen Hefestämmen nur das H1.1 Protein die Verpackung des *Ura3* Gens durch das Telomer gefördert hat und die Überlebensrate auf den FOA-Platten deutlich erhöht. Mit der Immunocytochemie-Färbung und den GFP-Fusionen wurde bewiesen, dass die H1.1 und H1.4 Proteine in Kernen der Hefe exprimiert wurden, wobei nur das H1.1 Protein einen Einfluß auf die Überlebensrate auf den FOA-Platten hat.

Es wurde nachgewiesen, dass der H1.1 Effekt nur mit dem Telomer-spezifischen Chromatin zusammenhängt, auf das *Ura3* Gen im Wildtyp (S35P-5A) jedoch keinen Einfluß hat.

Es wurde gezeigt, dass *S. cerevisiae* und *C. elegans* homologe Mechanismen für epigenetische Systeme der transkriptionellen Suppression verwenden, die in Zusammenhang mit der sexuellen Fortpflanzung stehen. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass das H1.1 Protein nicht nur am silencing in der Keimbahn von *C. elegans* beteiligt sondern auch für Repressions-Mechanismen der Hefe verantwortlich ist. Die Repressions-Mechanismen wurden für die sexuelle Differenzierung der Keimbahn von *C. elegans* sowie auch bei den Hefen benötigt. Andererseits wurden bei den Hefen ohne *Hho1* Gen, das dem H1 Histon ähnelt, keine Effekte beobachtet. Das Protein HHO1 ist nicht für das silencing der Telomeren und der transkriptionellen Repression benötigt worden. Dies weist darauf hin, dass bei Hefen und *C. elegans* die selben molekularen Mechanismen stattfinden, wobei das Histon H1.1 von *C. elegans* an der Repression beteiligt ist.



Es wurde bei *C. elegans* das SIR2.1 Protein getestet, das dem SIR2 Protein der Hefen ähnelt. Es wurde der Frage nachgegangen, ob das SIR2.1 Protein auch in *C. elegans* Gene inaktiviert und das silencing in der Keimbahn verursacht.

In der Literatur (MOAZED, 2001) ist das Sir2 Protein als konservatives Protein für die Inaktivierung der Gene beschrieben worden, das in Hefe die Histon-Deacetylierung mit einer Spaltung der NAD (nicotinamid adenin dinukleotid) zu einer O-acetyl-ADP-Ribose verbindet. Die Histon-Deacetylase-Aktivität des Sir2 Proteins ist vom NAD-hypoacetyliertem Zustand des inaktiviertem Chromatins abhängig.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass das Sir2.1 Protein auch bei *C. elegans* die Gene in der Keimbahn inaktiviert und den selben Effekt verursacht wie das Histon H1.1 im Reporterstamm *let-858::gfp*. Das GFP-Signal nach der H1.1 dsRNA Injektion sowie auch nach der Sir2.1 dsRNA Injektion wurde in den Keimbahnzellen detektiert, ohne einen Einfluß auf die somatischen Zellen zu haben. Nun stellt sich die weitere Frage, welche Funktion das Histon H1.1 von *C. elegans* bei Hefen hat.

Das Sir 2.1 Protein ist dem Sir2 Protein der Hefen ähnlich. Es reprimiert die Gene in der Keimbahn bei *C. elegans*. Die Histon Isoform (H1.1), die bei *C. elegans* das *let-858::gfp* Gen in der Keimbahn reprimiert, reprimiert ebenfalls das *ura3* Gen bei *S. cerevisiae*.

Es wurde gezeigt, dass die NAD-abhängige Histon Deacetylierung wichtig für die Inaktivierung des Chromatins bei *S. cerevisiae* sowie bei *C. elegans* ist.

TISSENBAUM und GUARENTE (TISSENBAUM und GUARENTE, 2001) haben bewiesen, dass das *sir-2.1* Gen bei *C. elegans* nicht nur bei Hefen die Lebensspanne kontrolliert (SINCLAIR et al., 1997). Das Gen bei den beiden Organismen kontrolliert diesen Prozeß auf folgenden unterschiedlichen Wegen: Bei *C. elegans* verlängert die Überexpression des *sir-2.1* Gens die *C. elegans* Lebensspanne um ca. 50%. Die Inaktivierung der Gene durch *sir 2.1* haben einen Einfluß auf die Verwendung des Insulin/IGF Weges.

In Knockout Hefen (ohne das Sir2 Gen) ist die Alterung verändert und die Überlebensrate ist im Vergleich mit dem Wildtyp kürzer.

Bei Hefen beeinflusst das Sir2 Protein die Rekombination des RDN1 Locus, der als ribosomale DNA in 100 bis 150 Kopien in jeder Zelle vorliegt. Die homologen Rekombinationen zwischen den rDNAs führen zur Entstehung extrachromosomaler rDNA-Ringe (ERC), die während der Mitose zwischen den Zellen asymmetrisch segregieren. Die

ERCs bleiben in der Regel in der Mutterzelle, wirken auf sie toxisch (SINCLAIR et al., 1997; BRYK et al., 1997; SMITH und BOEKE; 1997).

Das Sir2 Protein ist nicht nur für das transkriptionelle silencing verantwortlich sondern auch für die ERCs Entstehung und die Lebensspanne bei den Hefen. Bei den Knockout-Mutanten ist die Anzahl der Mitosen geringer, die Mutanten leben kürzer und die Kerne sind vergrößert.

Bei den *mes*-Mutanten bei *C. elegans* tritt an die Stelle der Proliferation der Keimbahnzellen der nekrotische Tod. Es wurden weniger Keimbahnzellen mit vergrößerten Kernen beobachtet. Im Vergleich mit den Knockout-Mutanten bei den Hefen und den *mes*-Mutanten bei *C. elegans* wurden nach der H1.1 dsRNA Injektion weniger Keimbahnzellkerne festgestellt. Es ist jedoch unklar, ob sie nekrotisch gestorben sind oder ob es ein programmierter Zell-Tod war. Zusätzlich wurde eine Vergrößerung der Kerne festgestellt.

Es stellt sich nun die Frage, ob das Histon H1.1 einen Einfluß auf die Lebensspanne bei *C. elegans* hat und auf welchem Wege die Überlebensrate beeinflusst werden kann.

Es gibt zwei verschiedene Grundvorstellungen, wie das H1.1 Histon mit Sir2 interagieren kann. Die erste Theorie besagt, dass es eine Protein-Interaktion zwischen dem Sir2-Protein und H1.1 Proteinen gibt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Sir-2-Protein mit Zinkfingern einen Einfluß auf die Expression der H1.1 mRNA hat.

Das SIR2 Protein besitzt zusätzlich zwei Paare des Cysteins, die Zinkfinger formen können.

Die Zinkfinger sind unter anderem für die Interaktion mit der mRNA verantwortlich. Daraus kann man folgern, dass das SIR2 Protein durch die Zinkfinger mit dem H1.1 mRNA interagieren und die H1.1 Expression beeinflussen kann (DEFOSSEZ et al., 2001).

Man kann auch annehmen, dass das SIR2.1 Protein das H1.1 Protein bindet und die Expression der Gene beeinflusst. In Hefen wurden die Histone durch das SIR2 Protein deacetyliert sowie das SIR3 und SIR4 Protein an deacetylierte Histone gebunden. Es wurde ein Komplex aus den Proteinen SIR2, SIR3 und SIR4 gebildet, welcher das DNA-bindende Protein RAP bindet und die Gene in Telomeren beeinflusst. Das RAP Protein bindet die Sequenz  $(TG_{1-3})_n$  der Telomeren in Hefen (BUCHMAN et al., 1988)

SIR2 sowie auch die MES-Proteine können nicht direkt die DNA binden sondern benötigen dazu ein DNA-bindendes Protein. Diese Funktion könnte das H1.1 Protein ausüben.

Das SIR2 Protein könnte das Histon H1.1 binden und durch die Deacetylierung der core Histone den silencing-Effekt in der Keimbahn beeinflussen.

IMAI (IMAI et al., 2000) hat festgestellt, dass das SIR2 Protein eine Deacetylase darstellt, die durch Trichostatin nicht inhibiert werden kann.

In dem durchgeführten Experiment im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Trichostatin bei *C. elegans* zu einer Erhöhung der Expression des Reportergens *let-858::gfp* in Soma, nicht jedoch in der Keimbahn, geführt hat. Daraus kann man schließen, dass die Transgene in Soma von einer Trichostatin-abhängigen Deacetylase reprimiert werden, während in der Keimbahn ein nicht-Trichostatin-abhängiger Mechanismus anzunehmen ist.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Linkerhiston wird traditionell als transkriptioneller Repressor betrachtet, der mit der Hauptmasse des Chromatins assoziiert ist. Zahlreiche Untersuchungen der biologischen Funktion des Linkerhistons H1 haben bis jetzt keine klare Antwort auf die Bedeutung des H1 gegeben.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die H1-Genfamilie von *C. elegans* acht H1 Gene besitzt. Sechs davon wurden hier erstmalig bearbeitet.

Alle H1-Isoformen wurden mit der Absicht, die biologische Funktion der H1 Histone von *C. elegans* zu verstehen, erarbeitet. Es wurde nachgewiesen, dass die Histon-Isoform H1.1 nicht nur das silencing in der Keimbahn beeinflusst, sondern ebenso wie die *mes*-Gene für die cytologische Entwicklung der Keimbahn von Bedeutung ist. Nach der H1.1 dsRNA Injektion wurden sterile Hermaphroditen mit reduzierter Anzahl der Kerne in der Keimbahn beobachtet, und es waren keine Oocyten zu erkennen. Die dsRNA-Inhibition der anderen fünf H1-Isoformen zeigten dagegen keinen Einfluß auf die Anzahl und die Qualität der Kerne in der Keimbahn von *C. elegans* und haben keinen Einfluß auf das silencing der Keimbahn gehabt.

Das Linkerhiston H1.1 ist das erste Beispiel im Metazoen Reich für ein Linkerhiston, welches für die Entwicklung der Keimbahn essentiell ist.

Weiterhin wurden die Funktionen der Linkerhistone H1.2, H1.4 und H1.X identifiziert. Das Linkerhiston H1.2 wurde als ein starker Repressor in somatischen Zellen der Dauerlarven erkannt. Aus dieser Arbeit geht hervor, dass das H1.4 Histon nicht nur einen Einfluß auf die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen hat, sondern auch das Nervensystem bei *C. elegans* beeinflusst. Es wurden theoretische Hinweise gefunden, dass die Entwicklung des Sexualdimorphismus in Männchen sowie auch die Expression des H1.1 Histons durch Translationskontrolle (3'UTR) erfolgen könnte.

Außerdem wurde in dieser Arbeit die H1.X-Isoform als cytoplasmatisches Protein beschrieben. Das H1.X Protein wurde sowohl im Cytoplasma als Bestandteil der Tonofilamenten der Epithelialzellen, als auch in ihren Zellkernen beobachtet. Im Gegensatz zu übrigen Histonen ist das H1.X Protein nicht mit der Hauptmasse des

Chromatins, sondern nur mit dem Nukleolus assoziiert und schwach im Nukleoplasma detektiert.

Es wurde gezeigt, dass Transgene in somatischen Zellen von einer Trichostatin-abhängigen Deacetylase reprimiert werden, während in der Keimbahn ein nicht Trichostatin-abhängiger Mechanismus anzunehmen ist.

Alle Linkerhiston-Isoformen von *C. elegans* wurden in dem Telomer-Positionseffekt-Variation-System der Hefe getestet. Man hat herausgefunden, dass nur das Histon H1.1 in diesem System einen Effekt auf die Organisation des Chromatins und der Kondensation der telomeren Region zeigte. Zusätzlich wurde festgestellt, dass das *C. elegans* Protein SIR2.1, welches dem SIR2 Protein der Hefen ähnelt, für den silencing Effekt in der Keimbahn von *C. elegans* benötigt wird. Daraus kann man schließen, dass bestimmte molekulare Mechanismen zwischen *S. cerevisiae* und *C. elegans* übereinstimmen.

Die biologische Funktion des Histons H1 hat man seit langem bei verschiedenen Organismen untersucht. Nur bei Pflanzen (Tabak) wurden Effekte des Linkerhistons in der Blüten-Entwicklung und bei der männlichen Meiose im Pollenkern beobachtet (PRYMAKOWSKA-BOSAK et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die vielfältige Rolle des Linkerhistons bei dem mehrzelligen Organismus *C. elegans* beschrieben.

Die Untersuchung hat gezeigt, dass die Linkerhistone eine größere Bedeutung haben als bisher angenommen. Dies sollte zu einer Motivation führen, weitere Arbeiten auf diesem Gebiet voran zu treiben.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

**AAGAARD, L.; LAIBLE, G.; SELENKO, P.; SCHMID, M.; DORN, R.; SCHOTTA, G.;  
KUHFITIG, S.; WOLF, A.; LEBERSORGER, A.; SINGH, P.B.; REUTER, G.;  
JENUWEIN, T. (1999)**

Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31.

*EMBO J* 18, 1923-1938

**AFFOLTER, M.; COTE, J.; RENAUD, J.; RUIZ-CARRILLO, A. (1987)**

Regulation of histone and beta A-globin gene expression during differentiation of chicken erythroid cells.

*Mol Cell Biol* 7, 3663-3672

**ALBERTSON, D.G.; THOMSON, J.N. (1976)**

The pharynx of *Caenorhabditis elegans*.

*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 275, 299-325

**ALKEMA, M.J.; van der LUGT, N.M.; BOBELDIJK, R.C.; BERNS, A.;  
van LOHUIZEN, M. (1995)**

Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice.

*Nature* 374, 724-727

**ALLAN, J.; HARTMAN, P.G.; CRANE-ROBINSON, C.; AVILES, F.X.; (1980)**

The structure of histone H1 and its location in chromatin.

*Nature* 288, 675-679

**ALLAN, J.; MITCHELL, T.; HARBORNE, N.; BÖHM, L.; CRANE-ROBINSON, C. (1986)**

Roles of H1-domains in determining higher order chromatin structure and H1 location.

*J Mol Biol* 187, 591-601

- 
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. (1990)**  
Basic local alignment search tool.  
*J Mol Biol* 215, 403-410
- APARICIO, O.M.; BILLINGTON, B.L.; GOTTSCHLING, D.E. (1991)**  
Modifiers of position effect Are shared between telomeric and silencing-type loci in *S. cerevisiae*.  
*Cell* 66, 1279-1287
- ARENTS, G.; MOUDRIANAKIS, E.N. (1995)**  
The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11170-11174
- ARION, D.; MEIJER, L.; BRIZUELA, L.; BEACH, D. (1988)**  
Cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF.  
*Cell* 55, 371-378
- BANNISTER, A.J.; ZEGEMAN, P.; PARTRIDGE, J.F.; MISKA, E.A.; THOMAS, J.O.; ALLSHIRE, R.C.; KOUZARIDES, T. (2001)**  
Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain.  
*Nature* 410, 120-124
- BARRA, J.L.; RHOUNIM, L.; ROSSIGNOL, J.; FAUGERON, G. (2000)**  
Histone H1 Is dispensable for methylation-associated gene silencing in *Ascomobolus immerus* and essential for long life span.  
*Mol Cell Biol* 20, 61-69
- BARTNIK, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. (1986)**  
Intermediate filaments in the muscle and epithelial cells of Nematodes.  
*J Cell Biol* 102, 2033-2041

- 
- BERS, E.P.; SINGH, N.P.; PARDONEN, V.A.; LUTOVA, L.A.; ZALENSKY, A.O.** (1992)  
Nucleosomal structure and histone H1 subfractional composition of pea (*Pisum sativum*) root nodules, radicles and callus chromatin.  
*Plant Mol Biol* 20, 1089-1096
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J.** (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
*Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
- BIRNSTIEL, M.L.; BUSSLINGER, M.; STRUB, K.** (1995)  
Transcription termination and 3' processing: the end is in site!  
*Cell* 41, 349-359
- BOUVET, P.; DIMITROV, S.; WOLFFE, A.P.** (1994)  
Specific regulation of *Xenopus* chromosomal 5S rRNA gene transcription in vivo by histone H1.  
*Genes Dev* 8, 1147-1159
- BREILING, A.; BONTE, E.; FERRARI, S.; BECKER, P.B.; PARO, R.** (1999)  
The Drosophila polycomb protein interacts with nucleosomal core particles in vitro via its repression domain.  
*Mol Cell Biol* 19, 8451-8460
- BRENNER, S.** (1974)  
The genetics of *Caenorhabditis elegans*.  
*Genetics* 77, 71-94
- BROOKS, J.E.** (1987)  
Properties and uses of restriction endonucleases.  
In *Methods Enzymol* 152, 113-129
- BROWNELL, J.E.; ZHOU, J.; RANALLI T.; KOBAYASHI, R.; EDMONDSON, D.G.;**  
**ROTH, S.Y.; ALLIS, C.D.** (1996)  
*Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation.  
*Cell* 84, 843-851



**BRYK, M.; BANERJEE, M.; MURPHY, M.; KNUDSEN, K.E.; GARFINKEL, D.J.;**

**CURCIO, M.J.** (1997)

Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast.

*Genes Dev* 11, 255-269

**BUCHMAN, A.R.; KIMMERLY, W.J.; RINE, J.; KORNBERG, R.D.** (1988)

Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol Cell Biol* 8, 210-225

**BURRI, M.; SCHLIMME, W.; BETSCHART, B.; KAMPFER, U.; SCHALLER, J.;**

**HECKER, H.** (1993)

Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in procyclic *Trypanosoma brucei brucei*.

*Parasitol Res* 79, 649-659

**CAIRNS, B.R.** (1988)

Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives.

*Trends Biochem Sci* 23, 20-25

**CALIKOWSKI, T.; KOZBIAL, P.; KURAS, M.; JERZMANOWSKI, A.** (2000)

Perturbation in linker histone content has no effect on the cell cycle but affects the cell size of suspension grown tobacco BY-2 cells.

*Plant Sci* 157, 51-63

**CAPOWSKI, E.E.; MARTIN, P.; GAVIN, C.; STROME, S.** (1991)

Identification of transcription dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains.

*J Cell Biol* 129, 287-298

**CARLSON, M.; OSMOND, B.C.; NEIGEBORN, L.; BOTSTEIN, D.** (1984)

A suppressor of SNF1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast.

*Genetics* 107, 19-32

**DEFOSSEZ, P.A.; LIN, S.J.; MCNABB, D.S. (2001)**

Sound silencing: the Sir2 protein and cellular senescence.

*Bioessays* 23, 327-332

**DODEMONT, H.; RIEMER, D.; LEDGER, N.; WEBER, K. (1994)**

Eight genes and alternative RNA processing pathways generate an unexpectedly large diversity of cytoplasmic intermediate filament proteins in the nematode

*Caenorhabditis elegans*.

*EMBO J* 13, 2625-2638

**DOENECKE, D.; TONJES, R.; KRESS, H. (1988)**

The H1 and core histone subtypes: differential gene expression and varied primary structures.

*Adv Enzyme Regul* 27, 107-120

**DOENECKE, D.; ALBIG, W.; BODE, C.; DRABENT, B.; FRANKE, K.; GAVENIS, K.; WITT, O. (1997)**

Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression.

*Histochem Cell Biol* 107, 1-10

**DRABENT, B.; BODE, C.; MIOSGE, N.; HERKEN, R.; DOENECKE, D. (1998)**

Expression of the mouse histone gene H1t begins at premeiotic stages of spermatogenesis.

*Cell Tissue Res* 291, 127-132

**DRIEVER W.; NUSSLEIN-VOLHARD C. (1989)**

The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo.

*Nature* 337, 138-143.

**EICKBUSH, T.H.; MOUDRIANAKIS, E.N. (1978)**

The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions.

*Biochemistry* 17, 4955-4964

**EISSENBERG, J.C.** (1989)

Position effect variegation in *Drosophila*: towards a genetics of chromatin assembly.  
*Bioessays* 11, 14-27

**EPSTEIN, H.** (1992)

Polycomb and friends.  
*Bioessays* 14, 411-413.

**EPSTEIN, H.F.; LIU F.** (1995)

Proteins and Protein Assemblies  
*Methods Cell Biol* 48, 437-450

**ERICSSON, C.; GROSSBACH, U.; BJORKROTH, B.; DANEHOLT, B.** (1990)

Presence of histone H1 on an active Balbiani ring gene.  
*Cell* 60, 73-83.

**ESCHER, D.; SCHAFFNER, W.** (1997)

Gene activation at a distance and telomeric silencing are not affected by yeast histone H1.  
*Mol Gen Genet* 256, 456-461

**FANTZ, D.A.; HATFIELD, W.R.; HORVATH, G.; KISTLER, M.K.; KISTLER, W.S.** (2001)

Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis.  
*Biol Reprod* 64, 425-431

**FINNIN, M.S., DONIGIAN J.R.; COHEN, A.; RICHON, V.M.; RIFKIND, R.A.;**

**MARKS, P.A.; BRESLOW, R.; PAVLETICH, N.P.** (1999)

Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors.  
*Nature* 401, 188-193

**FRANCIS, R.; WATERSTON R.H.** (1991)

Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*.  
*J Cell Biol* 114, 465-479

**GARVIN, C.; HOLDEMAN, R.; STROME, S. (1998)**

The phenotype of *mes-2*, *mes-3*, *mes-4* and *mes-6*, maternal-effect genes required for survival of the germline in *Caenorhabditis elegans*, is sensitive to chromosome dosage.

*Genetics* 148, 167-185

**GOTTSCHLING, D.E.; APARICIO, O.M.; BILLINGTON, B.L.; ZAKIAN, V.A. (1990)**

Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription.

*Cell* 63, 751-762

**GRANATO, M.; SCHNABEL, H.; SCHNABEL, R. (1994)**

Pha-1, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*.

*Nucleic Acids Res* 22, 1762-1763

**GROSSBACH, U. (1995)**

Selective distribution of histone H1 variants and high mobility group proteins in chromosomes.

*Semin Cell Biol* 6, 237-246

**HAKE, L.E.; RICHTER, J.D. (1994)**

CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation.

*Cell* 79, 617-627

**HAN, M.; CHANG M.; KIM, U.J.; GRUNSTEIN, M. (1987)**

Histone H2B repression causes cell-cycle-specific arrest in yeast: effects on chromosomal segregation, replication, and transcription.

*Cell* 48, 589-597

**HARLOW, E.; LANE, D. (1988)**

Antibodies a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory. New York: Academic Press

**HEALD, R.; MCKEON, F. (1990)**

Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis.

*Cell* 61, 579-589

**HEINTZ, N.** (1991)

The regulation of histone gene expression during the cell cycle.

*Biochim Biophys Acta* 1088, 327-339

**HILL, C.S.; MARTIN, S.R.; THOMAS, J.O.** (1989)

A stable  $\alpha$ -helical element in the carboxy-terminal domain of free and chromatin-bound histone H1 from sea urchin sperm.

*EMBO J* 8, 2591-2599

**HODGKIN, J.; DONIACH T.; SHEN M.** (1985)

The sex determination pathway in the nematode *Caenorhabditis elegans*: variations on a theme

*Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 50, 585-593

**HODGKIN, J.** (1986)

Sex determination in the nematode *C. elegans*: analysis of *tra-3* suppressors and characterization of the fem genes.

*Genetics* 114, 15-52

**HOLDEMAN, R.; NEHRT, S.; STROME S.** (1998)

MES-2, a maternal protein essential for viability of the germline in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to a *Drosophila* Polycomb group protein.

*Development* 125, 2457-2467

**HOYER-FENDER, S.; GROSSBACH, U.** (1988)

Histone H1 heterogeneity in the midge, *Chironomus thummi*. Structural comparison of the H1 variants in an organism where their intrachromosomal localization is possible.

*Eur J Biochem* 176, 139-152

**IMAI, S.; ARMSTRONG, C.M.; KAEBERLEIN, M.; GUARENTE, L.** (2000)

Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase.

*Nature* 403, 795-800

**ISENBERG, I.** (1979)

Histones.

*Ann Rev Biochem* 48, 159-191

**ISHIKAWA, R.; KAGAMI, O.; HAYASHI, C.; KOHAMA, K.** (1992)

Characterization of smooth muscle caldesmon as a microtubule-associated protein.

*Cell Motil Cytoskeleton* 23, 244-251

**JEDRUSIK, M.A.; SCHULZE E.** (2001)

A single histone H1 isoform (H1.1) is essential for chromatin silencing and germline development in *Caenorhabditis elegans*.

*Development* 128, 1069-1080

**JENUWEIN, T.; LAIBLE, G.; DORN, R.; REUTER, G.** (1998)

SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin.

*Cell Mol Life Sci* 54, 80-93

**JEPPESEN, P.; TURNER, B.M.** (1993)

The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenic marker for gene expression.

*Cell* 74, 281-289

**JIANG, L.I.; STERNBERG P.W.** (1999)

An HMG1-like protein facilitates Wnt signaling in *Caenorhabditis elegans*.

*Genes Dev* 13, 877-889

**KACZANOWSKI, S.; JERZMANOWSKI, A.** (2001)

Evolutionary correlation between linker histones and microtubule structures.

*J Mol Evol* in press

**KANDOLF, H.** (1994)

The H1A histone variant is an in vivo repressor of oocyte-type 5S gene transcription in *Xenopus laevis* embryos.

*Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7257-7261

**KASINSKY, H.E.; LEWIS, J.D.; DACKS, J.B.; AUSIO, J.** (2001)

Origin of H1 linker histones.

*FASEB J* 15, 34-42

**KELLY, W.G.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; FIRE, A. (1997)**

Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene.

*Genetics* 146, 227-238

**KELLY, W.G.; FIRE, A. (1998)**

Chromatin silencing and the maintenance of a functional germline in *Caenorhabditis elegans*.

*Development* 125, 2451-2456

**KENNISON, J.A.; TAMKUN, J.W. (1988)**

Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*.

*Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8136-8140

**KINZLER, K.W.; BIGNER, S.H.; BIGNER, D.D.; TRENT, J.M.; LAW, M.L.; O'BRIEN, S.J.; WONG, A.J.; VOGELSTEIN, B. (1987)**

Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma.

*Science* 236, 70-73

**KLEFF, S.; ANDRULIS, E.D.; ANDERSON, C.W.; STERNGLANZ, R. (1995)**

Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase.

*J Biol Chem* 270, 24674-24677

**KNOWLES, J.A.; Lai, Z.-C.; Childs, G.J. (1987)**

Isolation, characterization, and expression of the gene encoding the late histone subtype H1-gamma of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*

*J Mol Cell Biol* 7, 478-485

**KORF, I.; FAN, Y.; STROME S. (1998)**

The Polycomb group in *Caenorhabditis elegans* and maternal control of germline development.

*Development* 125, 2469-2478

- 
- KRAMER, J.M.; FRENCH, R.P.; PARK, E.C.; JOHNSON, J.J.** (1990)  
The *Caenorhabditis elegans* *rol-6* gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen.  
*Mol Cell Biol* 10, 2081-2089
- KRATZMEIER, M.; ALBIG, W.; HANECKE, K.; DOENECKE, D.** (2000)  
Rapid dephosphorylation of H1 histones after apoptosis induction.  
*J Biol Chem* 275, 30478-30486
- KREMER, H.; HENNING, W.** (1990)  
Isolation and characterization of a *Drosophila hydei* histone DNA repeat unit.  
*Nucleic Acids Res* 18, 1573-1580
- KORNBERG, R.D.** (1977)  
Structure of chromatin.  
*Annu Rev Biochem* 46, 931-954
- KRUDE, T.; ELGIN, S.C.** (1996)  
Pushing nucleosomes around. Chromatin.  
*Curr Biol* 6, 511-515
- KURZ, T.** (1999)  
Die High Mobility Group Proteine von *Caenorhabditis elegans*.  
Diplomarbeit, Göttingen
- LACHNER, M.; O'CARROLL, D.; REA, S.; MECHTLER, K.; JENUWEIN, T.** (2001)  
Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins.  
*Nature* 410, 116-120
- LAEMMLI, U.K.** (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* 227, 680-685
- LEHMANN R.; NUSSLEIN-VOLHARD C.** (1987)  
Hunchback, a gene required for segmentation of an anterior and posterior region of the *Drosophila* embryo.  
*Dev Biol* 119, 402-17



- 
- LEVER, M.A.; TH'NG, J.P.H.; SUN, X.; HENDZEL, M.J.** (2000)  
Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells.  
*Nature* 408, 873-876
- LIAO, L.W.; COLE, R.D.** (1981a)  
Condensation of dinucleosomes by individual subfractions of H1 histone.  
*J Biol Chem* 256, 10124-10128
- LIAO, S.W.; COLE, R.D.** (1981b)  
Differences among H1 histone subfractions in binding to linear and superhelical DNA. Sedimentation velocity studies.  
*J Biol Chem* 256, 11145-11150
- LIN, R.; ALLIS, C.D.; ELLEDGE, S.J.** (1996)  
PAT1, an evolutionarily conserved acetyltransferase homologue, is required for multiple steps in the cycle.  
*Genes Cells* 1, 923-942
- LINDAUER, A.; MULLER, K.; SCHMITT, R.** (1993)  
Two histone H1-encoding genes of the green alga *Volvox carteri* with features intermediate between plant and animal genes.  
*Gene* 129, 59-68
- LUITJENS, C.; GALLEGOS, M.; KRAEMER, B.; KIMBLE, J.; WICKENS, M.** (2000)  
CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*.  
*Genes Dev* 20, 2596-2609
- MACDONALD R.J.; SWIFT G.H.; PRZYBYLA A.E.; CHIRGWIN J.M.** (1987)  
Isolation of RNA Using Guanidinium Salts.  
*Methods Enzymol* 152, 219-227
- MATSUO, Y.; YAMAZAKI, T.** (1989)  
Nucleotide variation and divergence in the histone multigene family in *Drosophila melanogaster*.  
*Genetics* 122, 87-97

- MELLO, C.; FIRE, A. (1995)**  
DNA transformation.  
*Methods Cell Biol* 48, 451-482
- MELLO, C.; SCHUBERT, C.; DRAPER, B.; ZHANG, W.; LOBEL, R.; PRIESS J.R. (1996)**  
The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos.  
*Nature* 382, 710-712
- MILLER, D.M.; SHAKES, D.C. (1995)**  
Immunofluorescence microscopy  
*Methods Cell Biology* 48, 365-394
- MISTELI, T.; GUNJAN, A.; HOCK, R.; BUSTIN, M.; BROWN, D.T. (2000)**  
Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells.  
*Nature* 408, 877-881
- MIZZEN, C.A.; YANG, X.J.; KOKUBO, T.; BROWNELL, J.E.; BANNISTER, A.J.; OWEN-HUGHES, T.; WORKMAN, J.; WANG, L.; BERGER, S.L.; KOUZARIDES, T.; NAKATANI, Y.; ALLIS, C.D. (1996)**  
The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity.  
*Cell* 87, 1261-1270
- MIZZEN, C.A.; DOU, Y.; LIU Y.; COOK, R.G.; GOROVSKY, M.A.; ALLIS, C.D. (1999)**  
Identification and mutation of phosphorylation sites in a linker histone.  
phosphorylation of macronuclear h1 is not essential for viability in *Tetrachymena*.  
*J Biol Chem* 274, 14533-14536
- MOAZED, D. (2001)**  
Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing.  
*Curr Opin Cell Biol* 13, 232-238
- MOHR, E.; TRIESCHMANN, L.; GROSSBACH, U. (1989)**  
Histone H1 in two subspecies of *Chironomus thummi* with different genome sizes:  
Homologous chromosome sites differ largely in their content of a specific H1  
variant.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9308-9312

**MULIS, K.B.; FALOONA, F.A.** (1987)

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
*Methods Enzymol* 155, 335-350

**MULTIGNER, L.; GAGNON, J., van DORSSELAER A.; JOB, D.** (1992)

Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1.  
*Nature* 360, 33-39

**NAGEL, S.** (1996)

Vergleichende Analyse der Sequenzen von Histon H1-Genen der Dipteren  
*Chironomus tentans*, *C. pallidivittatus* und *Glyptotendipes barbipes* (Chironomidae).  
Diplomarbeit, Göttingen

**NAKAYAMA, T.; TAKAMI, Y.** (2001)

Participation of Histones and Histone-Modifying Enzymes in Cell Functions through  
Alterations in Chromatin Structure.  
*J Biochem* 129, 491-499

**NAKAYAMA, J.; RICE, J.C.; STRAHL, B.D.; ALLIS, C.D.; GREWAL, S.I.** (2001)

Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin  
assembly.  
*Science* 292, 110-113

**NGUYEN, C.Q.; HALL, D.H.; YANG Y.; FITCH, D.H.** (1999)

Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* male tail tip.  
*Dev Biol* 207, 86-106

**OKKEMA, P.; WHITE-HARRISON, S.; PLUNGER, V.; ARYANA, A.; FIRE, A.** (1993)

Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *Caenorhabditis  
elegans*.  
*Genetics* 135, 385-404

**OSLEY, M.A.** (1991)

The regulation of histone synthesis in the cell cycle.  
*Annu Rev Biochem* 60, 827-861

**PATTERTON, H.G.; LANDEL, C.C.; LANDSMAN, D.; PETERSON, C.L.;**

**SIMPSON, R.T. (1998)**

The biochemical and phenotypic characterization of Hho 1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*.

*J Biol Chem* 273, 7268-7276

**PAULSEN, J.E.; CAPOWSKI, E.E.; STROME S. (1995)**

Phenotypic and molecular analysis of *mes-3*, a maternal-effect gene required for proliferation and viability of the germ line in *C. elegans*.

*Genetics* 14, 1383-1398

**PRYMAKOWSKA-BOSAK, M.; PRZEWLOKA, M.R.; IWASZKIEWICZ, J.;**

**EGIERSZDORFF, S.; KURAS, M.; CHAUBET, N.; GIGOT, C.; SPIKER, S.;**

**JERZMANOWSKI, A. (1996)**

Histone H1 overexpressed to a high level in tobacco affects certain developmental programs but has limited effect on basal cellular functions.

*Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10250-10255

**PRYMAKOWSKA-BOSAK, M.; PRZEWLOKA, M.R.; SLUSARCZYK, J.; KURAS, M.;**

**LICHOTA, J.; KILIANCZYK, B.; JERZMANOWSKI A. (1999)**

Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in *tabacco*.

*Plant Cell* 11, 2317-2329

**PUIG, S.; MATAALLANA, E.; PEREZ-ORTIN, J.E. (1999)**

Stochastic nucleosome positioning in a yeast chromatin region is not dependent on Histone H1.

*Curr Microbiol* 39, 168-172

**RAMAKRISHNAN, V.; FINCH, J.T.; GRAZIANO, V.; LEE, P.L.; SWETT, R.M. (1993)**

Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding.

*Nature* 362, 219-223

**RAMON, A.; MURO-PASTOR, M.I.; SCAZZOCCHIO C.; GONZALEZ, R. (2000)**

Deletion of the unique gene encoding a typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*.

*Mol Microbiol* 35, 223-233

**RIDDLE, D.L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER B.J.; PRIESS, J.R. (1997)**

*C. elegans* II.

Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

**RISLEY, M.S.; ECKHARDT, R.A. (1981)**

H1 histone variants in *Xenopus laevis*.

*Dev Biol* 84, 79-87

**RUPPERT, J.M., KINZLER, K.W.; WONG, A.J.; BIGNER, S.H.; KAO, F.T.; LAW, M.L.; SEUANEZ, H.N.; O'BRIEN, S.J.; VOGELSTEIN, B. (1988)**

The *GLI-Kruppel* family of human genes.

*Mol Cell Biol* 8, 3104-3113

**RYCHLIK, W.; ROADS, R.E. (1989)**

A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridisation, sequencing and in vitro amplification of DNA.

*Nucleic Acids Res* 17, 8543-8551

**SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989)**

Molecular cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

**SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. (1977)**

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467

**SANDMAN, K.; KRZYCKI, J.A.; DOBRINKI, B.; LURZ, R.; REEVE, J.N. (1990)**

HMf, a DNA-binding protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*, is most closely related to histones.

*Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5788-5791

**SANICOLA, M.; WARD, S.; CHILDS, G.; EMMONS, S.W. (1990)**

Identification of a *Caenorhabditis elegans* histone H1 gene family. Characterization of a family member containing an intron and encoding a poly(A)<sup>+</sup> mRNA.

*J Mol Biol* 212, 259-268

**SAOUDI, Y.; PAINTRAND, I; MULTIGNER, L.; JOB, D. (1995)**

Stabilization and bundling of subtilisin-treated microtubules induced by microtubule associated proteins.

*J Cell Sci* 108, 357-367

**SCHATTEN, H.; WALTER, M.; MAZIA, D.; BIESSMANN, H.; PAWELETZ, N.; COFFE, G.; SCHATTEN, G. (1987)**

Centrosome detection in sea urchin eggs with a monoclonal antibody against *Drosophila* intermediate filament proteins: characterization of stages of the division cycle of centrosomes.

*Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8488-8492

**SCHIERENBERG, E.; CASADA, R. (1986)**

Der Nematode *Caenorhabditis elegans*.

*Biologie in unserer Zeit* 1, 1-7

**SCHIERENBERG, E. (1987)**

Vom Ei zum Organismus.

*Biologie in unserer Zeit* 4, 97-106

**SCHNABEL, H.; SCHNABEL, R. (1990)**

An organ specific differentiation gene, *pha-1*, from *Caenorhabditis elegans*.

*Science* 250, 686-688

**SCHULZE, E. (1992)**

Histon H1 Varianten mit potentiell unterschiedlichen Funktionen: Eine vergleichende Charakterisierung der Histon H1-Gene und der von ihnen kodierten Proteine in der Gattung Chironomus (Diptera).

Dissertation, Göttingen

**SCHULZE, E.; TRIESCHMANN, L.; SCHULZE, B.; SCHMIDT, E.R.; PITZEL, S.;**

**ZECHEL, K.; GROSSBACH, U. (1993)**

Structural and functional difference between histone H1 sequence variants with differential intranuclear distribution.

*Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2481-2485

**SCHULZE, E.; NAGEL, S.; GAVENIS, K.; GROSSBACH, U. (1994)**

Structurally divergent histone H1 variants in chromosomes containing highly condensed interphase chromatin.

*J Cell Biol* 127, 1789-1798

**SCHULZE, E.; SCHULZE, B. (1995)**

The vertebrate linker histones H1 zero, H5, and H1M are descendants of invertebrate 'orphan' histone H1 genes.

*J Mol Evol* 41, 833-840

**SCIPPA, G.S.; GRIFFITHS A.; CHIATANTE, D.; BRAY, E.A. (2000)**

The H1 histone variant of tomato, H1-S, is targeted to the nucleus and accumulates in chromatin in response to water-deficit stress.

*Planta* 211, 173-181

**SEYDOUX, G.; MELLO, C.C.; PETTITT, J.; WOOD, W.B.; PRIESS, J.R.; FIRE, A. (1996)**

Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*.

*Nature* 382, 713-716

**SEYDOUX, G.; STROME S. (1999)**

Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells.

*Development* 126, 3275-3283

**SHEN, X.; GOROVSKY, M.A. (1996)**

Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo.

*Cell* 86, 475-483

**SINCLAIR, D.A.; MILLS, K.; GUARENTE, L. (1997)**

Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants.

*Science* 277, 1313-1316

**SIROTKIN, A.M.; EDELMANN, W.; CHENG, G.; KLEIN-SZANTO, A.; KUCHERLAPATI, R.; SKOULTCHI, I.A. (1995)**

Mice develop normally without the H1(0) linker histone.

*Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6434-6438

**SLUSARCZYK, J.; PRYMAKOWSKA-BOSAK, M.; PRZEWLOKA, M.; JERZMANOWSKI, A.; KURAS, M. (1999)**

Ultrastructural organization of leaves of transgenic tobacco overexpressing histone H1 from *Arabidopsis thaliana*.

*Ann Bot* 84, 329-335

**SMITH, J.S.; BOEKE, J.D. (1997)**

An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA.

*Genes Dev* 11, 241-254

**STEIN, P.; SCHULTZ, R.M. (2000)**

Initiation of a chromatin-based transcriptionally repressive state in the preimplantation mouse embryo: lack of a primary role for expression of somatic histone H1.

*Mol Reprod Dev* 55, 241-248

**STEINBACH, O.C.; WOLFFE, A.P.; RUPP, R.A. (1997)**

Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in *Xenopus*.

*Nature* 389, 395-399

**STEINHOFF, S. (1998)**

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Histon H1 Varianten aus tierischen und pflanzlichen Zellen.

*Doktorarbeit*, Göttingen



- STRICKLAND, W.N.; STRICKLAND, M.; BRANDT, W.F.; VON HOLT, C.; LEHMANN, A.; WITTMANN-LIEBOLD, B. (1980)**  
The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. 2. Sequence of the C-terminal CNBr peptide and the entire primary structure.  
*Eur J Biochem* 104, 567-578.
- STRICKLAND, W.N.; STRICKLAND, M.; VON HOLT, C. (1982)**  
A comparison of the amino acid sequences of histones H1 from the sperm of *Echinolampas crassa* and *Parechinus angulosus*.  
*Biochim Biophys Acta* 700, 127-129
- STROM, R.; SANTORO, R.; D'ERME, M.; MASTRONTONIO, S.; REALE, A.; MARENZI, S.; ZARDO, G.; CAIAFA, P. (1995)**  
Specific variants of H1 histone regulate CpG methylation in eukaryotic DNA.  
*Gene* 157, 253-256
- SUZUKI, M. (1989)**  
SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone.  
*EMBO J* 8, 797-804
- TANAKA, I.; ONO, K.; FUKUDA, T. (1998)**  
The developmental fate of angiosperm pollen is associated with a preferential decrease in the level of histone H1 in the vegetative nucleus.  
*Planta* 206, 561-569
- TANAKA, I.; AKAHORI, Y.; GOMI, K.; SUZUKI, T.; UEDA, K. (1999)**  
A novel histone variant localized in nucleoli of higher plant cells.  
*Chromosoma* 108, 190-199
- TANAKA, M.; HENNEBOLD, J.D.; MACFARLANE, J.; ADASHI, E.Y. (2001)**  
A mammalian oocyte-specific linker histone gene *H1oo*: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (*cs-H1*) of sea urchin and the *B4/HIM* histone of the frog.  
*Development* 128, 655-664

- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.** (1994)  
CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.  
*Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680
- TISSENBAUM, H.A.; GUARENTE, L.** (2001)  
Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*.  
*Nature* 410, 227-230
- TOMASZEWSKI, R.; JERZMANOWSKI, A.** (1997)  
The AT-rich flanks of the oocyte-type 5S RNA gene of *Xenopus laevis* act as a strong local signal for histone H1-mediated chromatin reorganization in vitro.  
*Nucleic Acids Res* 25, 458-466
- TONJES, R.R.; PAUL, D.; DOENECKE, D.** (1997)  
Transgenic mice transcribing the human H1 zero histone gene exhibit a normal phenotype.  
*Eur J Biochem* 245, 97-102
- TORO, G.C.; GALANTI, N.** (1988)  
H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*.  
*Exp Cell Res* 174, 16-24
- TRIESCHMANN, L.; SCHULZE, E.; SCHULZE, B.; GROSSBACH, U.** (1997)  
The histone H1 genes of the dipteran insect, *Chironomus thummi*, fall under two divergent classes and encode proteins with distinct intranuclear distribution and potentially different functions.  
*Eur J Biochem* 250, 184-196
- TSUJIMURA, K.; OGAWARA, M.; TAKEUCHI, Y.; IMAJOH-OHMI, S.; HA, M.H.; INAGAKI, M.** (1994)  
Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis.  
*J Biol Chem* 269, 31097-31106

**WARD, S.; ARGON, Y.; NELSON, G.A.** (1981)

Sperm morphogenesis in wild-type and fertilization-defective mutants of  
*Caenorhabditis elegans*.

*J Cell Biol* 91, 26-44

**WEISMANN, A.** (1893)

*The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*.

(Translated by W. Newton Parker and H. Ronnfeld. London: Walter Scott Ltd.)

**WHITE RA.; LEHMANN R.** (1986)

A gap gene, hunchback, regulates the spatial expression of Ultrabithorax.

*Cell* 47, 311-21

**WINSTON, F.; CARLSON, M.** (1992)

Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection.

*Trends Genet* 8, 387-391

**WOLFFE, A.P.** (1991)

Developmental regulation of chromatin structure and function.

*Trends Cell Biol* 1, 61-66

**WOOD, W.B.** (1988)

The Nematode *Caenorhabditis elegans*.

Cold Spring Harbor Laboratory, 61

**WISNIEWSKI, J.R.; GROSSBACH, U.** (1996)

Structural and functional properties of linker histones and high mobility group proteins in polytene chromosomes.

*Int J Dev Biol* 40, 177-187

**VAN DER LUGT, N.M.; DOMEN, J.; LINDERS, K.; VAN ROON, M.;**

**ROBANUS-MAANDAG, E.; TE RIELE, H.; VAN DER VALK, M.; DESCHAMPS, J.;**

**SOFRONIEW, M.; VAN LOHUIZEN, M.** (1994)

Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene.

*Genes Dev* 8, 757-769

**VAN HOLDE, K.E.** (1989)

Chromatin

Springer-Verlag. New York

**VANFLETEREN, J.R.; VAN BUN, S.M.; VAN BEEUMEN, J.J.** (1988)

The primary structure of the major isoform (H1.1) of histone H1 from the nematode *Caenorhabditis elegans*.

*Biochem J* 255, 647-652

**VANFLETEREN, J.R.; VAN BUN, S.M.; DE BAERE, I.;**

**VAN BEEUMEN, J.J.** (1990)

The primary structure of a minor isoform (H1.2) of histone H1 from the nematode *Caenorhabditis elegans*.

*Biochem J* 265, 739-746

**VERMAAK, D.; STEINBACH, O.C.; DIMITROV, S.; RUPP, R.A.W.; WOLFFE, A.P.** (1998)

The globular domain of histone H1 is sufficient to direct specific gene repression in early *Xenopus* embryos.

*Curr Biol* 8, 533-536

**VOGT, S.** (2001)

Investigations of immunolabelled structures in the cell nucleus by X-ray and light microscopy.

*Doktorarbeit*, Göttingen

**YAMASHIRO, S.; YAMAKITA, Y.; HOSOYA, H.; MATSUMURA, F.** (1991)

Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis.

*Nature* 349, 169-172

**YOON, Y.S.; KIM, J.W.; KANG, K.W.; KIM, Y.S.; CHOI, K.H.; JOE, C.O.** (1996)

Poly(ADP-ribosyl)ation of histone H1 correlates with internucleosomal DNA fragmentation during apoptosis.

*J Biol Chem* 271, 9129-9134

**ZLATANOVA, J.; VAN HOLDE, K.** (1992)

Histone H1 and transcription: still an enigma?

*J Cell Sci* 103, 889-895

## **7. ALIGNMENT UND ABBILDUNGEN**

Cae\_H1\_1PR -185 GGAGTATCCAAATTGTCAGCGCCCGA---CACCTCCTCC  
 Cae\_H1\_2PR -181 ·AGC··AGA··G··A·GTA·AATTT·GTAATG·CAT····  
 Cae\_H1\_3PR -183 ·CCTCCG·A··G··ACAGA··TTTC·GTAA·G·C····GA  
 Cae\_H1\_4PR -172 ·A·CCGAGA··G··A·GC·T·ATTT·GTCA·GTG··CT·  
 Cae\_H1\_5PR -177 ·A·C·GAG·······A·AT···ATTT·GTCA·GGC··C··  
 Cae\_H1\_6PR -181 AT·C·T····C·G··AAA·AT·TTTTGAT·-·G·ATT·TT  
 Cae\_H1\_XPR -181 TCGTCTCAGTGT·GACTT··A··TT·CCG··AGGATA·A  
 Cae\_H1\_QPR -179 ·TGTCCGGTC·GC··A·TT·CT··A·G··-···AAAGTG

DM\_H1\_1PR -161 TCAAGCAAACCTTTGACATAGTAAATGACTGATGTGTCAGTA  
 DH\_H1\_1PR -177 TC-----TGTGTAACG-----AACGTTCA-ATAGCAAAA  
 DV\_H1\_1PR -129 AC--GCATTGAGTAACA-----AACGTTCA-ATACCAAAA

C.tt\_II-1PR -186 ATTTTGAGATCGACACCGAAGTTTATGAAGGAAAATTTT  
 C.tp\_II-1PR -186 ATTTTGAGATCGACACCGAAGTTTATGAAGGAAAATTTT  
 C.tp\_II-2PR -187 ATTTTGAGATCAACACTGAAGATTATAACTGAATAATTT  
 C.tt\_III-1PR -190 ATTTTGAGATCGACGCGAGAAGTTTACGAGGGAAAATTTT  
 C.pp\_III-1PR -189 ATTTTGAGATCGACGCGAGAAGTTTACGAGGGAAAATTTT

Cae\_H1\_1PR -151 TTTTCGAGACCTGCTATCTTTATTCGGTGCAGTAAGGGAGAGGCGGGATGTGTCCCGCAGG  
 Cae\_H1\_2PR -144 CA.TTTC..GCCT.T...C.....C.TC.A.CAC....C.G.T.....G...A  
 Cae\_H1\_3PR -147 AAA···AC·GCCGAG···C······CGCA·TG·A···GC·G··T.....GA····  
 Cae\_H1\_4PR -136 AAGTTTCG·GCCA·T··GC······C··CAA·CAA·-----GA····  
 Cae\_H1\_5PR -141 AA·TTT·G·A·CA·T·GCC······A·GT·A·CAA·G·GC·G·AT.....GA····  
 Cae\_H1\_6PR -144 AG·TTTTGAG·TA··-··C··CG·AAAA·A···CAA·ATC·TCAA·AAAC·AAAA·TG·A  
 Cae\_H1\_XPR -144 ···G··C··GGTAACA···TGCT·AGAG·AA·GTT··A·AA·AAC··T·TG·A·G·TTTC  
 Cae\_H1\_QPR -143 GG·G···CTTACAAT·GGC·CA·T·CCA·A·GG·C·G·-·-·TCAT·AAAC·AGGG··TAA

DM\_H1\_1PR -122 GCATTGTTAAAGTGCTCTCCTCCTCGATTCTCATCAGAGCAAAGGAGGTTGG---TAG  
 DH\_H1\_1PR -138 ACATTCTCGGTAGCCTTCCTCCTCGATTCTCATCTGAAAC-----GGGTGACCAAAATG  
 DV\_H1\_1PR -90 ACATTCTCGTTTAGCCCTCCTCCTCGATTCTCATCTCAAAC-----GGGTGACC-----

C.tt\_I-1PR -148 CGCCA AAAAATTGTACGTGAGGCTTCGTTTCCATCAACATACAACATTCATGTGACC CCG  
 C.tp\_I-1PR -144 CGCCA AAAAATTATACGTGAGGCTTCGTTTCCATCAACATACAACATTCATGTGACC CCG  
 C.te\_H1ePR -142 CGCCA AAAAATTCTCATGAGGCTTCGTTTCCATCAACATGCAACATTCAGT CACC CCA  
 C.tt\_II-1PR -145 CCAAC AAAAATTAGCGTGAGGCTTCGTTTCCATTCACATCGCATAGTTGAGG GACC -TA  
 C.tp\_II-1PR -145 CCAAC AAAAATTAGCGTGAGGCTTCGTTTCCATTCACATCGCATAGTTGAGG GACC -TA  
 C.tp\_II-2PR -146 CCAAC AAAAATTGAGCGCGAGGCTTCGTTTCCATTCACATCGCATGTTAAGG GACC TTT  
 C.tt\_III-1PR -149 CCAAC AAAAATTGAGCGCGAGGCTTCGTTTCCATTCACATCGCATGTCAAGG GACC CTC  
 C.tp\_III-1PR -148 CCAAC AAAAATTGAGCGCGAGGCTTCGTTTCCATTCACATCGCATGTCAAGG GACC CTC

Cae\_H1\_1PR -91 GTGGTAGAAATTGGGTA-TATAAGAG-AACGAGAGGACTCGCACAGTCA TCACTTTTCAA  
 Cae\_H1\_2PR -84 .....GGCC.A.....G.TGG..G.TATT.A.CATTCAC...C...  
 Cae\_H1\_3PR -87 .....AGGCGA.C.....AG·AG·T··CGATT·A·C·CACAC·...C...  
 Cae\_H1\_4PR -85 .....GCGC·A·.....GATGG··C·C·CT·ATTTCTCACAC...C·C...  
 Cae\_H1\_5PR -81 .....GGA··A·.....A··G·TGG··CTC·CG·ATCATTCACT·.....  
 Cae\_H1\_6PR -85 TATC·TTTTGGCCA·C·C·G····GTTGG·AG·CA·C·A·CATTCAC·...C...  
 Cae\_H1\_XPR -84 TGT·A·TT·C·CTAC····T·TTCTAC·TTTTCTTG·AACATTT··TT··TT··AGA··  
 Cae\_H1\_QPR -85 CC·T··AGCTG··T·GGC·T·CG·TTTTCTC··TT····AA·TTT·G··TC··CACACC

DM\_H1\_1PR -42 GCAGCGC-GCGAGC -----CATTTTTAACAGAAA----AAAAGTGTTCCTC--AGT  
 DH\_H1\_1PR -84 CCAT-GCCGC-AGCTGGCAAATTTTC-GATTAACAACAAAACGTTGCATTTGTTTTTATAGT  
 DV\_H1\_1PR -67 -----TGGTATATTTCTGTTTTTAC-----ACCAAATAGTGTTCCTC--AGT

C.tt\_I-1PR -88 ACAAATTTCTACAAAAATTATCAAAAACTTAATTCATTCATTTA TCCAGTGAATAAAG  
C.tp\_I-1PR -84 ACAAATTTCTACAAAAATTATCAAAAACTTAATTCATTCATTTA TCCAGTGAATAAAG  
C.te\_H1ePR -82 ACAAATTTCAATTAATA-TTATCAAAAACTTAATTCATTCATTTA TCAAGTGAATAATA  
C.tt\_II-1PR -86 CACATTCTCTATATTTTCATAATATTTTCAGTTTGAAAATTATTTTAA-CACAAACGAAT  
C.tp\_II-1PR -86 CACATTCTCTATATAGCATAATATTTTCAGTTTGAAAATTATTTTAA-CACAAACGAAT  
C.tp\_II-2PR -86 ACATTTTGTATTTCTTATAAAATTTTCACTTTGAAA-TTATTTTAAACACGAAGCAAA  
C.tt\_III-1PR -89 GCATTTCTATATTTTCACATAATATTTTCAATTTGAAAATTATTTTAA--CACAAAGTAAAG  
C.tp\_III-1PR -88 GCATTTCTATATTTCTCATAATATTTTCAATTTGAAAATTATTTTAA--CACAAAGTAAAG

Cae\_H1\_1PR -33 GTGTCACCCAACCAACCAACCCGCGTCGAACGATG  
Cae\_H1\_2PR -24 ...CA.G-----A-TCGTT.TACA-----ATG  
Cae\_H1\_3PR -27 ...CA...T...CT.A.TCGTT.AT-----ATG  
Cae\_H1\_4PR -25 ...A.CA.T.CT...T...GTT.AA.A-----ATG  
Cae\_H1\_5PR -21 ...T---TGTT...T.-GTTTAA.A-----ATG  
Cae\_H1\_6PR -25 ...TGT.T...TC.T.GTT.AA.A-----ATG  
Cae\_H1\_XPR -24 CAAAG---TCCT...G.TTTGA.GAA-----ATG  
Cae\_H1\_QPR -25 C.ACTC-T.G...CTA.TT.TAAAA-----ATG

DM\_H1.1PR - 9 GAAAAA-----AAG-----ATG  
DH\_H1.1PR -27 GAAGAA--GTAAAGAAGTGC---TGAATAAAA-ATG  
DV\_H1.1PR -27 TCACAAAAGTAAAGTAAAGCGCACGAA-----ATG

C.tt\_I-1PR -28 AAGAAAAACAAAAAAAAAACTTAAAAA-----ATG  
C.tp\_I-1PR -24 AAGAAAAACAAAAAAAAA---CTTAAAAA-----ATG  
C.te\_H1ePR -23 AATTAATAAACTCAAAA---CTTAAAAA-----ATG  
C.tt\_II-1PR -27 CAAGCAAAAATAAAGAAATAAATCAAAT-----ATG  
C.tp\_II-1PR -27 CAAGCAAAAATAAAGAAATAAATCAAATA-----ATG  
C.tp\_II-2PR -27 TCAAGAAATATAAAGAAAAAATCAAAA-----ATG  
C.tt\_III-1PR -31 CAAGAAAAATAAAAAAAAAATAA-TCAAAAACAAA-ATG  
C.tp\_III-1PR -30 CAAGAAAAATAACAAA-TAA-ACAAAACAAA-ATG

## Alignment 1

der 5'-nichtcodierenden DNA der Histon H1-Gene

a) von *C. elegans* (Cae; alle H1-Isoformen),

b) von *D. melanogaster* - DM\_H1.1PR (MATSUO und YAMAZAKI, 1989), *D. hydei* - DH\_H1.1PR (KREMER und HENNIG, 1990), *D. virilis* - DV\_H1.1PR (NAGEL, 1996),

c) von *C. thummi thummi* (C. tt) und *C. thumi piger* (C. tp) sowie von H1e von *C. tentans* (C. te) (SCHULZE, 1992).

Die Histon H1-Isoformen von *C. thummi* heißen H1-I-1, H1-II-1, H1-II-2 und H1-III-1. Abkürzung: PR-Promotor.

Die Sequenzen enden mit dem Startcodon ATG. Die Numerierung bezieht sich mit -1 auf die Base davor. Die

consensus Sequenz für Cae\_H1-Isoformen bezieht sich auf die Cae\_H1.1 Isoform. Bei den H1-Isoformen von *C.*

*elegans* sind die selben Basen durch ein (•) gekennzeichnet. Zur Herstellung des Alignments eingefügte

Zwischenräume sind als (-) dargestellt. Die bei den Histon H1-Genen von *C. elegans*, *Drosophila* und *Chironomus*

zwischen allen Varianten konservierte Promotorelemente (GC-reich) sind rot und durch einfache Unterstreichung

markiert. Es gibt kein ähnliches konserviertes Promotorelement zwischen den angegebenen Organismen. Die

vermuteten CAP-Sequenzen sind blau und durch einfache Unterstreichung kenntlich gemacht. Die ebenfalls

vermuteten TATA-Box Sequenzen bei *C. elegans*, *Drosophila* und *Chironomus* sind durch blaue Farbe markiert.

Andere kleine konservierte Promotorelemente sind in rot dargestellt.

Die H1.X, H1.6 und H1.Q Histone von *C. elegans* besitzen kein H1-Box Motiv.

Der Beginn der cDNA Sequenz ist durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet.

H1\_XDNA **ATGACCAC**TT**CGCTCATCC**ACAT**TGGCAAATCATT**TGGTTGCT**TGA**ACC**GAGGAGATTT**CG + 60  
H1\_XDNA **C**TT**AACTACGTTCTT**CT**TGGGTCATCCACATCATGAACGAGCTCAACATCATCCCAGCTAC** +120  
H1\_XDNA **ATGGATATGATCA**AGGTTTGGAGAATTTTTGAGTTTTTAAAGTTCAAATTTGTTTTTATTT +180  
H1\_XDNA **CTCAGGGAGCAATTCAAGCA**ATCG**ACAATGGAAACCGGAAGCAGCAAGGCGGCAATTCTCA** +240  
H1\_XDNA **AGTATATTGCTCAAAACTATCATGTTGGAGAGAATCTTCCAAA**GGTATGCTGTTAGAATT +300  
H1\_XDNA **AGTTATCACAAAAATCAAGCAGGAAAGCACATCATCTAACAGCTTAAATTTAGATCTGA** +360  
H1\_XDNA **AATTTAATCAGTCAGAGCATT**TTCTCACAGACCTCGGAGCACATAAAAATAGCTCCTCAGA +420  
H1\_XDNA **CAGGTGCGAGTCACGGCTAACCGACTCAAATCACTGCTAATTAGCTTTTTGACCAGGGA** +480  
H1\_XDNA **TAGAGTCAACCTGGCTAGCTCTGGTTTTCTCGCTAATTAGCTCTGGTTTTTTGCTAATTAG** +540  
H1\_XDNA **CTCTGGTTTTTTGATACCGAAAATGAAAACTTTTTTTTTTTGACAGTGTCTGTCCCCGCAG** +600  
H1\_XDNA **TTGTTCCCACCTATTATAACCCTGCCGTCCCATTTCTGGGATACCGCGTCTCCACATCTT** +660  
H1\_XDNA **GCTCTTCTGTTCATGTCCGGCTCTGTTTTCTGCTCCCAACCCGCTCTTGTCAAATCAAATG** +720  
H1\_XDNA **TACTTACTGGGATTGAACCCGCATTGCTTTCACACCGAACGCCGACGCCTTACCCATTGC** +780  
H1\_XDNA **CGTCGCGCCTCGTGTGAGGCTTCTATCGAAAGAACTTGAATAACGAGATAATTCTCGTG** +840  
H1\_XDNA **GAACACAGCATCTACTCCACCATCCAAAATTTGTTTGCCTCCGATTTTGTATGTTCATCGA** +900  
H1\_XDNA **TACAAATTGAGCGACACCATTTCTGAAAAGCATTTTGGAGAACTCCTTCTCCGAACATTT** +960  
H1\_XDNA **TGTTCACTATAGTGTCTGTGATAAATAAAACACCAGATAGCTCTACCTTTACAAGTGGA** +1020  
H1\_XDNA **GCCGTCTTTGAAGGGTGAAATGAGTTTCTGCACAATTGAGGATTTTCGTTGATTTTTCCG** +1080  
H1\_XDNA **CATTAGCCGAACAAACATCTGTAGTTTTCTTCTCTTTTTCTTCTTTGAGTTGTTTCGTGG** +1140  
H1\_XDNA **CTGGCGGCATGAATTCTCCATCGTCTAGAGGAACTTCCTTTTCCCATTTGAAAATTTAGA** +1200  
H1\_XDNA **ATTATACAAAAAATTTTAAAAAGTTGAGCAAGTTCAATACCACACGGTAATTATGAAT** +1260  
H1\_XDNA **AAACAATAAAAAATAAATAAATAAGTTATTTAAAAATCAGGTTTCATAAAAATCAAATGAAA** +1320  
H1\_XDNA **AAACAAAAATCAATATTAATTGCTAATTAGCACGGATTTTCTGCTAATTAGCAATGGTTT** +1380  
H1\_XDNA **GCTAATTAGCCGTGGTTTTAAGCTAATTAGTTCTGGTTTTTTGGTGTTTTGCTAATTAGC** +1440

H1\_1DNA **ATGTCTGATTCCGCTGTTGTTGCCGCCG**-----**TGTCGAGC**----- +37  
H1\_2DNA **ATGTCTGACGTCACCGTTG**---**CCGAGAC**-----**TCCAGC**----- +32  
H1\_3DNA **ATGTCCGACACCGTCTGTTGCTTCCGCTGC**-----**AGTTCAGG**----- +35  
H1\_4DNA **ATGTCTGACGTCGCCGTTGCCGCCGACAC**CCACCGAA**CTCCAGC**AGCCCCAACGAAAGCT +60  
H1\_5DNA **ATGTCCGACGTCGCCGTTG**---**CCGAGAC**-----**TCCAGC**----- +32  
H1\_6DNA **ATGTCTGACGTCGCCGTTG**---**CCGAGAC**-----**TCCAGC**----- +32  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA **ATTGATTTT**GAGT**CGGTTAGT**CGT**GACTCGCACCTGTCTGAGTCCAAGTAAAATTTTTAA** +1500

H1\_1DNA -CAAAG**GTCCCAAGGCT**-----**AAGGCCGCAAGGCC**-----**GCCAAGCCA** +78  
H1\_2DNA -----**AGTCAAGACCCA**-----**ACCAAGGCTCAAAAGCTCCAAAGTCCAAGACT** +78  
H1\_3DNA -CTCCAG**CCAAGACTGT**C-----**AAGTCTCAAAGGCC**-----**GCCAAGACC** +76  
H1\_4DNA TCAAAAG**GCTACGAAGGCTT**CAAAAGCTAC**GAAGGCTTCAAAGCTACGAAGGCCAAGACT** +120  
H1\_5DNA -----**AGTCAAGACCCA**-----**ACCAAAGCTTCAAAGGCCACGAAGGCCAAGGCT** +78  
H1\_6DNA -----**TGTGAAGACCCA**-----**ACCAAGGCTCAAAGC**-----**CAACGCT** +69  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA **AACA**ACT**GTT**CATTATTCT**AAAATAATTTAGAGTAAACAAACATCTTGGGA**ACTTT**AAAA** +1560

H1\_1DNA **ACCAAAGTTGCCAAGGCCA**-AGGCTCCAGT**CGCTCACCCACC**--**ATACATCAACATGATC** +135  
H1\_2DNA **ACCAAAGAGCCAAAGGCTA**-AGG**TCGCTGCTGCTCATCCACC**--**ATTCATCAACATGGTT** +135  
H1\_3DNA **ACCAAAGTTCCAAAAGCCA**-AGA**AGCCAGTTGCCCATCCACC**--**ATACATTAACATGGTC** +133  
H1\_4DNA **ACCAAAGGTCCAATGGTCA**-AGG**CCGATGCCGCCCATCCACC**--**ATTCATCAATATGGTC** +177  
H1\_5DNA **ACCAAAGATTCCGAAGGTGA**-AGG**TCGTTGCCGCCCATCCGCC**--**ATTCATCAACATGATC** +135  
H1\_6DNA **ACCAAAGGTGCCAAAGGTTA**-AG**ACCGCTGCTGCTCATCC**-----**ATTCATCAATATGGTC** +123  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA **AAAATCCACAAAAAAGTTTTAAAAAGTCA**-CTGAACAAATTTCAAATCAAAA-**ATTCTTT** +1620

H1\_1DNA **AAGGAGGCCATCAAGCAGCTCAAGGACCGCAAAGGAGCTT**----**CCAAGCAGGCAATCCT** +191  
H1\_2DNA **ACCGCTGCCATCAGCAGCCTCAAGGAGCGCAAAGGGATCCT**----**CCAAGATCGCCATCTT** +191  
H1\_3DNA **ACTGCCGCCATCAATGGTCTTAAGGAACGCAAAGGATCTT**----**CCAAGATCGCCATCCT** +189  
H1\_4DNA **ACCGAAGCCATCAGCAGC**AT**CAAGGACCGCAAAGGACCTT**----**CCAGAGCCGCAATTCT** +233  
H1\_5DNA **ACCGAAGCCGTCAGCAACCTCAAGGACCGCAAAGGGATCAT**----**CCAGGGTCGCCATTTT** +191  
H1\_6DNA **ACTGCCGCTATCAGCAGCCTCAAGGAGCGCAAAGGGATCCT**----**CGAAGATTGCTATCCT** +179  
H1\_QDNA -----



H1\_XDNA TATGATAACTTTATGAAAAACGTCTCATCTGCGGGAAAAACTTCCCTGATATTA-CATTT +1680

H1\_1DNA CAAGTTCATCTCCCAAAA--CTACAAGCTCGGAGACAATGTCATC-CAGGTAAAT----- +243  
H1\_2DNA GAAGTACATCACCGCCAA--CTACAAGGTCGGAGATCAGCTCACC-AAAGGT-----TGTT +243  
H1\_3DNA CAAGTACATCACCAAGAA--CTACAATGTTGGAGATCAAATCATC-AAAGGTATGT----- +241  
H1\_4DNA CAAGTATATCACTACAAA--ATACACGCTTGGAGATCAGGCTAAC-AAAGGTATGTGTTTT +290  
H1\_5DNA CAAGTTCATCACTGCCAA--ATACACGCTTGGAGATCAAGTTAAC-AAAGGTAAATATGCA +248  
H1\_6DNA GAAATACATCACCGCCAA--CTACAAGCTCGGAGATCAAGTTAAA-AAAGGTATGT-TTTT +235  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA AGATTGAAGTTAAATTTTTCTCATCCTTGATCAAGGCGACACAAATATGTAGAATTGGAA +1740

H1\_1DNA -TTCAATTCATT----A----TTATTCTTAGTCAAAACTTG-----CCAAC +280  
H1\_2DNA TTTAAATTTAAA----TATA-AT-TTTCAAATACAAAATT--TCGACTTTC----TAAAA +291  
H1\_3DNA -TTCAAA-----ATGCAAAATT-----ATC +309  
H1\_4DNA ATTTAAAGCAGA----AAAGCTAAATTCAAATCAATTTTTTC-----TGAAA +332  
H1\_5DNA TTTTATTTTAAA----GAGAGTGGTTTTGAATCGATTTTTTC-----CAAAA +290  
H1\_6DNA TTTAAATTTAAA----TAAAGATATTTTGAATAGAAATTTAATTGATTTTTGGATTAAAA +291  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA AAATAATATAA-TATGCTATTATTTTCCCAGCGTAAATTTGTGAGCTCTGATATTCTAA +1800

H1\_1DNA AA-----TTTCGA-----ATAATTTTATCTCACA----- +304  
H1\_2DNA T--TGG--TCTCTGGATCGATAAT-GT-AAACCTATTGAATCTATAGAATTACATTATT +344  
H1\_3DNA TA-----TGACGA-----AT-----TC----- +333  
H1\_4DNA AA-----TTTTGACCAGGTTTTT-GA--TTACAATAACTTCATTTTTTAA----- +373  
H1\_5DNA AA-----TATATAAACCTGATTT-TT--GAACAAT---TCTTCCAAAA----- +327  
H1\_6DNA TAATTGAAATGTCCACATGGATAAAAAGTCAAAATTTATCGATTTTTTCCCTTTGCCGACGTG +351  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA TGCTCAAATATCAAAAACCTAAATGTTTACAGAATAATCCCTCTAATTCTAGTTTCTATT +1860

H1\_1DNA -GTTCTTATTTCTTTAAA----- +321  
H1\_2DNA GATTCCAGAGACCAAATGCTCAATCTAGGGCTGTGCGGGACCTTACAAATTATGAATTTTT +404  
H1\_3DNA -----TAATTTTATCTA----- +344  
H1\_4DNA -CCTAAAAATTTCTTAAATAATAAATTGCCG-----AACAGAAAAGCAGAAAAAAAAAAC +425  
H1\_5DNA -CGTTGACAATATTAATAGATTTTTCCCTGA-----AAATTAACCA-----A--- +309  
H1\_6DNA GCATTCACTTTTTTAAAAAATTTTCTCGGAC-GTCACAGGGACAAAAGTTATCGATTTTC +410  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA TCTAGGTGAACAATCATCTCCGCAGTGTCTCAAAAAGGCCGTGACTCTGGTGACATTG +1920

H1\_1DNA -----CT-----TATAATT-----TTAATTTCA +339  
H1\_2DNA TA--TATTTTTGAAAATCGCTATCA----ATTTAAATT--AAATTTTAATTTTAATTTCA +456  
H1\_3DNA -----A-----T--TTCA +350  
H1\_4DNA TA-----TGTAGAGATGACGTTCCC-----TAAATTT-----ACCTTTCTTTCA +464  
H1\_5DNA -----CCTTAC-----TAAATGC-----ATCTTAATTTCA +335  
H1\_6DNA TCGCTAATTTTTAAGCCAGCATTCACTAAATTTATTTTTAAAAATAAAAATTTTATTCGA +470  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA AACAGGTAGGAAATTAATTCAAAAGTGAGATGGGGGAGTATCAATAGTCATGTGCACTTT +1980

H1\_1DNA GATCAATGCTCATCTCCGTCAGGCTCTCAAGCGTGGTGTACCAGCAAGGCCCTTGTTC +399  
H1\_2DNA GATCAACTCTCGCTCCGCGCCGCACTCAACAAGGGAGTCGCCAGCAAGGCACTCGTCCA +516  
H1\_3DNA GATTAATGCTCGTCTCCGTGACACTCTCAACAAAGGAGTGTGTCAGCAAGGCACTCGTTC +410  
H1\_4DNA GATCAACGCTCACCTCCGCAAAGCTCTTAACAAGGGCTTGAAAGTAACGCCTTCGTCCA +524  
H1\_5DNA GACCAACGCTCACCTTCGCTCTGACTTAAAAAAGGAGTGTGTCAGCAAGGTCCTCGTCCA +395  
H1\_6DNA GATTAACCTCAACCTCCGATCTGCCTCAAAAAGGGAGTTGCCAGCAAGGCCCTCGTCCA +530  
H1\_QDNA -----  
H1\_XDNA TTGTTTTTCTCTTTTGTACCCTCGACTATTTTTTAGAAAGTTGATCTATGATTTTTTT +2040

H1\_1DNA AGCCGCCGGATCCGGAGCCAACGGACGTTTCCGTGTGCCAGAGAAG---GCCGCCGCCG +456  
H1\_2DNA ATCCGTGCGAAATGGAGCCAGTGGACGATTCCGTGTTGCTGAGAAGGCTGCCGCCACC-- +574  
H1\_3DNA ATCCGTGCGAACTGGAGCCAGTGGACGCTTCCGTGTTACTGAGAAGAAGGCCGCCGCCG +470  
H1\_4DNA GGCTAGCGGAAATGGAGCCAACGGACGGTTCCTGCTTGGCCGAGAAGACAGCCTCCGTGGC +584  
H1\_5DNA GACTAACCGAATCGGAGCCAACGGACGATTCCGTCTT-----GCCGTTGC +440  
H1\_6DNA AACCGTCGGAATGGAGCCTCCGGGCGATTCCGTGTGCTGAGAAGACTGCCGCCACCGC +590  
H1\_QDNA -----ATGGCCGCCGCT +8  
H1\_XDNA TTTTGTGAAATTATTAAGTATTTTGAGACTCGCGGACATGGTGCACCCGGAAGTTTCCGC +2100

H1\_1DNA CAAGAAGCCAGC---AGCAGCCAAGAA-GCCAGCAGC-----AGCCAAGAAACCAGC +504  
H1\_2DNA -AAGAAACCAGT---A-----GCAAAGAAGCCAGT +600  
H1\_3DNA AAAGAAGCCAGT---AGCCAAGAAGGCCGCCAACCAGGAGAGAAGAAAGCAAAGAAGCCAGT +527  
H1\_4DNA CAAGTCGCCAGCTGCAGCAAAGAAGGACGCCACTGGAGAGAAGAAAGGCTACGACGACCGT +644  
H1\_5DNA CGAGAAGCCACCAGCAGTGAAGAAGGCTGCCACTGGAGAGCAAAGGTTATGAAGACCGT +500  
H1\_6DNA CAAGAAGCCAAC---G-----GTGAAAAAGGCCGC +617  
H1\_QDNA CCAAAAAGCCAAGAAAGTCGCTAAGACC---AAGAAG----- +42  
H1\_XDNA ATGGGAAAAGAAATGCGAGA-AGAAGTTGCAAGTTGGAATTCCGGTTCAGACCAAACCAAT +2160

H1\_1DNA AGCCGCCAAGAAAGCCACTGGAGAGAAGAAGGC-----AAAGAAGCCAGC +549  
H1\_2DNA CGCCAAGAAAGCTGCTACAGGAGAGAAGAAGGC-----CAAGAAACTAC +645  
H1\_3DNA TGCCAGAAAGGCCGCCACCGGAGAAAGAAGGC-----CAAGAAGCCAC +572  
H1\_4DNA CGCCAAGAAGGCCGCCACTGGAGAGAAGAAGGCTACGACGACCGTCGCCAAGAAGGCCGC +704  
H1\_5DNA CGCCAAGAAGGCTGTCAGCGGAGACA---AGGCTAAGAAAAGTGTGCCAAAAAGCCCGG +557  
H1\_6DNA CACCGGGAGAA--GGTTAAGAAGACAGT--TGT-----CAAGAAAC--- +655  
H1\_QDNA -----GTTGCTGCCAAGCCAAAGGCTCCAAAGGTC---- +72  
H1\_XDNA GCTAATGCTCAAAG--AAGTTTCGTGAGAAGCTGGAGAATATCTCGGTTAGTGAGAGGTA +2220

H1\_1DNA C-----GCTGCCAAGCCA-----AAGAAGGCCGCCACCGGAGATAAG-- +586  
H1\_2DNA -----AGTTG---CAAAGAAGACCG-----GAGAC +667  
H1\_3DNA T-----GCCACCAAGACC-----AAGAAGACTG---C-----TGAT-- +600  
H1\_4DNA CACTGGAGAGAAGAAGGCTACGACGACCGTCCGCAAGAAGGCCGCCGCTGGAGACAAGGC +764  
H1\_5DNA A---GACAAGGTGAAGAAGGTCAAGTCAACCGAAGAGGATCGCTAAGCCAGCTGTCAAG-- +612  
H1\_6DNA -----AGTCG---CCAAGAAGACCG-----GAGAC +675  
H1\_QDNA -----AAGAAGGTTAGATTTTTTATTTATCTCATTATTGAAAAATTTAAGTATT +122  
H1\_XDNA CTGTAGTTTGAATTGTGAAACTAACAGACCGACTAACGTGGGAAAAGAGGGGGGGGGTAT +2280

H1\_1DNA -----AAGGTCA---AGAAGGCCAAGAGCCCAAAGAAG---GTTGCCAA +624  
H1\_2DNA -----AAGGTCA---AGAAAGCCAAGTCAACAAAGAAG---ATTGCCAA +705  
H1\_3DNA -----AAGGTCA---AGAAGGTCAAGTCTCAAAGAAG---ATCGCCAA +638  
H1\_4DNA CAAGAAGACTGAAGTCAAGGTGA---AGAAGGTCAAGTCGCCGAAGAAG---ATCGCCAA +818  
H1\_5DNA -----AAGGTCACTAAGAAAGCCGCCGCTCCAACGAAGTCTGCTGCCAA +656  
H1\_6DNA -----AAGGTGA---AGAAGGCCAAGTCAACAAAGAAG---ATCGCCAA +713  
H1\_QDNA TTTTAAAGATTCAAGCCCTCACCAAGAAGGCTGCTGCT--CCAAAGGCCA-AGAAGCCA- +178  
H1\_XDNA ATAGTTAGATAGGGGAAATTGTGAGGAAAATACCTCAAAATTTGAACTTTGGACATTGG +2340

H1\_1DNA GCCAGCTGCCAAGAAGGTCGCCAAGTCTCCAGCCAAGAAGGCCGC-----TCCA---AA +675  
H1\_2DNA GCCAGCTGCCAAGAAGGTCGCCAAGTCAACGGCAAGAAGGCTGC-----TCCA---AA +756  
H1\_3DNA GCCAACCGCCAAGAAGGTTGCCAAGTCTCCAGCAAGAAGTCCGC-----TCCA---AA +689  
H1\_4DNA GTCTCCAGTCAACAAGGTCACCAAGTCTCCAGTCAAGAAGATCGCCAAGTCTTCATCCAT +878  
H1\_5DNA TGAAACCGCTCCAAG-----AAGGCTGCTGCCACTGAAGCCGC-----TCCA---AA +701  
H1\_6DNA GCCAGCAGCCAAGAAGGCCACCAAGTCCCATCCAAGAAGGTTGC-----TCCA---AA +764  
H1\_QDNA GTGAAGAAGGCCGCCGCCAAGAAA-TCTCCAGCCAAGAAGGCCGC-----ACCA---AA +228  
H1\_XDNA AAAACATGTCTTTTGTCCACTTCTGCGAAGTAAAATGCTGAAAAGCGCCGACTAGTCAAT +2400

H1\_1DNA GAAGATCGCCA-----AGCCAGCTGCCAAG-----AAGGCCGCCAAGCCA-----GC +731  
H1\_2DNA GAAGGCT-----CCAGCCAAGAAGGCC-----GC +780  
H1\_3DNA GAAGGCAGCT-----GCTGCCAAG-----CCAGCCAAGAAAGCT-----GT +725  
H1\_4DNA GAAAGCCGCTCCAAGAAGGCCGCTGCCAAG-----CCAGCCAAGAAAGCTCCCGCCGC +932

H1_5DNA	GAAGGCTGCTGTCACGAAAGCT <b>GCTACA</b> AAAGAAGACTCCTGCCAGGA <b>AAGG</b> CCGTTGGT <b>AC</b>	+761
H1_6DNA	GAAGGCTGCT----- <b>GCCAAG</b> -----CCAGCCAAA <b>AAGACC</b> ----- <b>GC</b>	+797
H1_QDNA	<u>GAAGGTTTGTCTGAATTTATTTTTTTCCTTTAAACTCTATTACATTTTAGTTTTTCCTT</u>	+228
H1_XDNA	<u>GGCGCTGGGAAACTTTAATCAAATACTGAAAATCTCGAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAC</u>	+2460
H1_1DNA	CGCC--- <b>AAGGCCTAAA</b> -----	+745
H1_2DNA	T <b>GCT</b> CCAAA <b>AAGCATA</b> ATTATCTTGTGTGGTTGTTAAAATCCCATTTTCGATCTCACTACTG	+840
H1_3DNA	TGCCCCA <b>AAGACATAA</b> -----	+741
H1_4DNA	CGCCCA <b>GAGGCCTAA</b> -----	+948
H1_5DNA	TGCCCCA <b>AAAGCCTAA</b> -----	+777
H1_6DNA	T <b>GCT</b> CTAA <b>ACGGTAAT</b> ACCATTGTGTGATTTATCAAATTTAATT-CGATCTCACCATTT-	+856
H1_QDNA	<u>GACTTATCTTTACAAAAATTGAATATTTTCAGAAGTAAA</u> -----	+266
H1_XDNA	<u>ATTTTCGCTACTTGAGATAAATATACTGCATGTTTTGGAGTGAACATCTTAAAAGTTTTGA</u>	+2520
H1_1DNA	-----	
H1_2DNA	TATTATACCTCCTCATCCTCCTCATGCCTTGAGTACTGGTTAA	+883
H1_3DNA	-----	
H1_4DNA	-----	
H1_5DNA	-----	
H1_6DNA	TAGTATACCTCCCTCTCTTTAA-----	+878
H1_QDNA	-----	
H1_XDNA	<u>CTTATATGTTAAAAAATTATTTAAACTCCAGAAGGCTGAAAAAACCAAACCATCTACCAG</u>	+2580
H1_XDNA	CTCCATGTCCACCAATAAGAAGGGAAAACCAATTTCAACAATGAAAAAGCGTGGAGTTAT	+2640
H1_XDNA	GAGCAAGAAACGTTTCCTCAAAGAACAAAATGGCTCCAAAGGCCAAAAGCCACGGGCTCAA	+2700
H1_XDNA	AAAGAAGGGACCAGCCACGAAGAGCTCTGGATTGGTGCACAAGGCTGCTGGAGCAAAGAA	+2760
H1_XDNA	CGAAGCAGCTCCAACAACCAAGATGGAACCTTCGTACCGGAACCAGAAAGAGCTATTGTTA	+2820
H1_XDNA	AA	+2822

## Alignment 2

Das multiple Alignment der H1-Gene von *C. elegans*.

Die Sequenzen beginnen mit dem Startcodon ATG und enden mit dem Stopcodon. Die Numerierung bezieht sich mit +1 auf die erste Base. Die Introns wurden durch Unterstreichung kenntlich gemacht. Die konservierten Elemente sind rot markiert, die Unterschiede zwischen den einzelnen Basen sind durch roten Fettdruck hervorgehoben. Zur Herstellung des Alignments eingefügte Zwischenräume sind als (-) dargestellt.

Alle H1-Gene – außer den H1.Q und H1.X Genen- besitzen nur ein einziges Intron. Das H1.Q Gen hat zwei Introns und das H1.X Gen besitzt 4 Introns. Die Introns fangen mit drei Nukleotiden GGT an. Die Exon- und Intron-Längen sind in der Tabelle 3 angegeben. Die Struktur der H1.6 Gen basiert nicht auf der Kenntnis der H1.6 cDNA. Das Intron der H1.6 Gen sowie seine Länge wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Genfinger bestimmt.

## N - terminal domain

```
H1.1 SDSAVVAAAVEPKVPKA.....KAAKAAKP..TKVAKAKAPV
H1.2 SDVTVA...ETPAVKT.....PTKAPKAPKSKTTKEPKAKVAA
H1.3 SDTVVASAAVQAPAKTVK.....SPKAAK..TTKVPKAKKPV
H1.4 SDVAVAADTTETPAAPTKASKATKASKATKASKATKAKTTKVPMVKADA
H1.5 SDVAVA...ETPAVKT.....PTKASKATKAKATKIPKVKVVA
H1.6 SDVAVA...ETPAVKT.....PTKAPKAN...ATKVPKVKTA
H1.X TTSLIHMANHLVASTE.....EISLNYVLLGHPHHERAQ
```

## Zentrale, globuläre Domäne

```
H1.1 AHPPYINMIKEAIKQLLKDRKGASKQAILKFISQNYKLGDNVIQINAHLRQALKRGVTSKALVQAAGSGANGRFRV
H1.2 AHPPFINMVTAAISSLKERKGSSKIAILKYITANYKVGDQLTKINSRLRAALNKGVASKALVQSVGNGASGRFR.
H1.3 AHPPYINMVTAAINGLKERKGSSKIAILKYITKNYNVGDQIIKINARLRDTLNKGVVSKALVQSVGTGASGRFRV
H1.4 AHPPFINMVTAAISSIKDRKGPSRAAILKYITKYTLGDQANKINAHLRKALNKGLESNAFVQASGNGANGRFRL
H1.5 AHPPFINMITEAVSNLKDRKGSSRVAIFKFITAKYTLGDQVNKTNAHLRSALKKGVVSKVLVQTNGIGANGRFRL
H1.6 AHPPFINMVTAAISSLKERKGSSKIAILKYITANYKLGDQVKINSNLRSALKKGVASKALVQTVGTGATGRFRV
H1.X HHPSYMDMIKGAIQAIDNGTGSSKAAILKYIAQNYHVGENLPKVNNHLRSVLKKAVDSGDIEQTRGHGATGSFRM
```

## C - terminale Domäne

```
H1.1 P.....EK·AAAAKPAAAAKPAAAAKPAAAAKKATGEK.....KAKPAAAAKPK.....KAATGDK.....KVKKAKSPKKVAKPAAKKVAK.....SPAKKAAPKIAKPAAKKAAPAKA
H1.2 .....VAEKAAATKKP·VAKPVAKKAATGE.....KKAKKTTVAK·KTGD.....KVKKAKSPKKIAKPAAKKVAK.....SPAKKAAPKKAPAKKAAPKA
H1.3 TEKKAAAAKK·PVAKKAATGEK·KAKPVAQKAATGEK.....KAKTTATKTK·KTAD.....KVKKVKSPKKIAKPTAKKVAK.....SPAKKSAPKKAAAAKPAKKAVAPKT
H1.4 AEKTASVAKS·PAAAKKDATGEK·KATTTVAKKAATGEKATTTVAKKAATGEKKATTVAK·KAAGDKAKKTEVKVKKVKSPKKIAKSPVNKVTKSPVKKIAKSSMKAAPKKAAAKPAKKAPAAPEA
H1.5 AV.....AEK·PPAVKKAATGEQ·KVMKTVAKKAVSGD.....KAKKTVAK·KTGD.....KVKKVKSPKRIAKPAVKKVTKAAAPTK·SAANETAPKKAAATEAAPKKAAVTKAATKKTPARKAVGTAPKA
H1.6 .....AEKTAAT.....AKKPTVKKAATGEK.....VKKTVVKKTVAK·KTGD.....KVKKAKSPKKIAKPAAKKATK.....SPSKKVAPKKAAAKPAKKTALKA
H1.X GKECEKNLQVGIPVQTKPMLMLKEVRQLENISKAEKTKPSTSSMSTN·KKGKPISTMKK·RGVMS·KKRSSKNKMAPKAKSHLKKK·GPATKSSGLVHKAAGAKNEAAPTTKMELRTGTRKSYC
H1.Q .....AAVQKAKVAKT·KK.....VAAKPKAPKVKKASP·KKAAAP·KAKPVKKAAAKK.....SPAKKAAPKKK
```

## Alignment 3

Alignment der Primärstrukturen der H1-Gen Familie. Identische Aminosäuren in den Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben. Punkte (.....) markieren zur Herstellung des Alignments eingefügte Leerzeichen. Die hydrophoben Aminosäuren sind rot markiert. Die repetitiven Motive sind in brauner und blauer Farbe dargestellt.

Der konservierte Block von H1.1 bis H1.6 Histon-Isoformen ist grün markiert, die angenommene cdc2-Kinase Erkennungssequenz ist in pink angegeben. Das H1.6 Protein basiert nicht auf der Kenntnis der H1.6 cDNA sondern auf der Kenntnis des H1.6 Gens. Die Primärstruktur des H1.6 Gens wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Genfinger bestimmt.

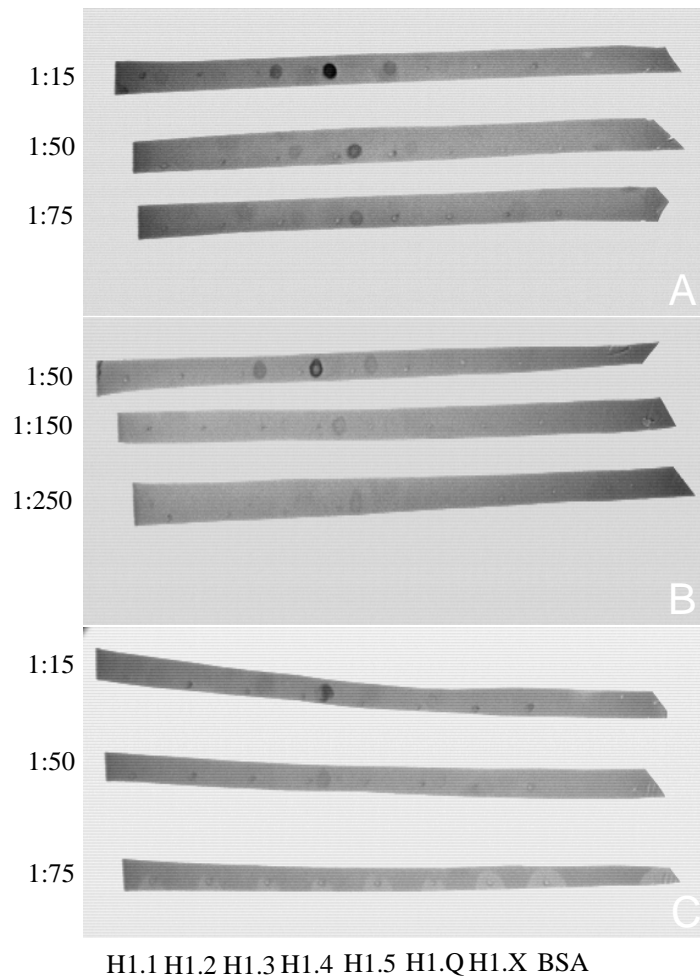


Abb. 1: Dot-blots: Test der  $\alpha$ H1 Antikörper. Dotvolumen: 1  $\mu$ l/dot: ca. 100 ng.

(A) affinitätsgereinigte Antikörper anti-H1 (H1.1 Säule) (Konz. 53  $\mu$ g/ml),

(B) affinitätsgereinigte Antikörper anti-H1 (H1.4 Säule) (Konz. 15  $\mu$ g/ml),

(C) affinitätsgereinigte Antikörper anti-H1 (Preabsorption auf der H1.1 Säule und Affinitätsreinigung auf der H1.4 Säule) (Konz. 14,9  $\mu$ g/ml).

Die kleinen schwarzen Punkten sind handschriftliche Eintragungen und entsprechen nicht der Immunreaktivität. Links: die Verdünnung des anti-H1 Antikörpers; unten: die aufgetragenen Proteine.

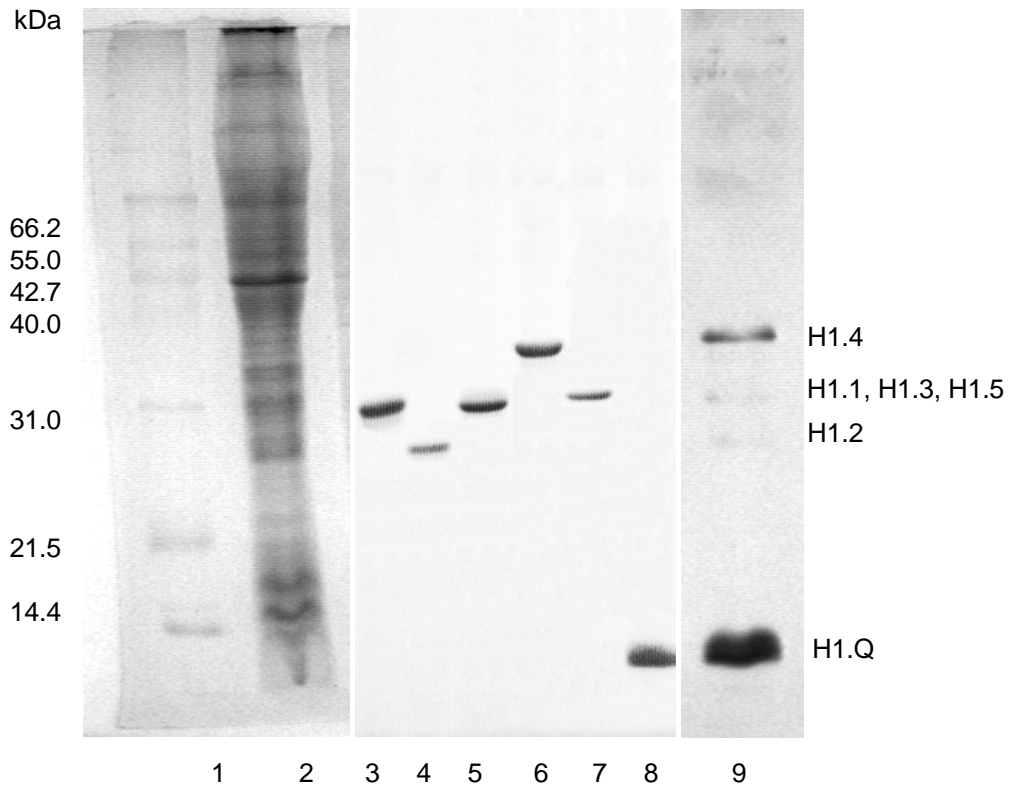


Abb. 2: Western-blot der H1-Proteine. Die Zahlen 1-8 entsprechen der Coomassie-Blau-Färbung von:

1. molecular weight marker (Promega),
2. Totallysat aus *C. elegans*,
- 3.-8. rekombinante H1 Proteine  
(3 - H1.1, 4 - H1.2, 5 - H1.3, 6 - H1.4, 7 - H1.5, 8 -H1.Q),
9. die Histone H1 Proteine detektiert mit  $\alpha$ H1 Antikörper in dem Totallysat aus *C. elegans*.

Der  $\alpha$ H1 Antikörper hat eine hohe Präferenz für das H1.4 Protein und für das H1.Q Protein.

Die Stärke des Antikörpersignals entspricht nicht der Menge der Proteine.

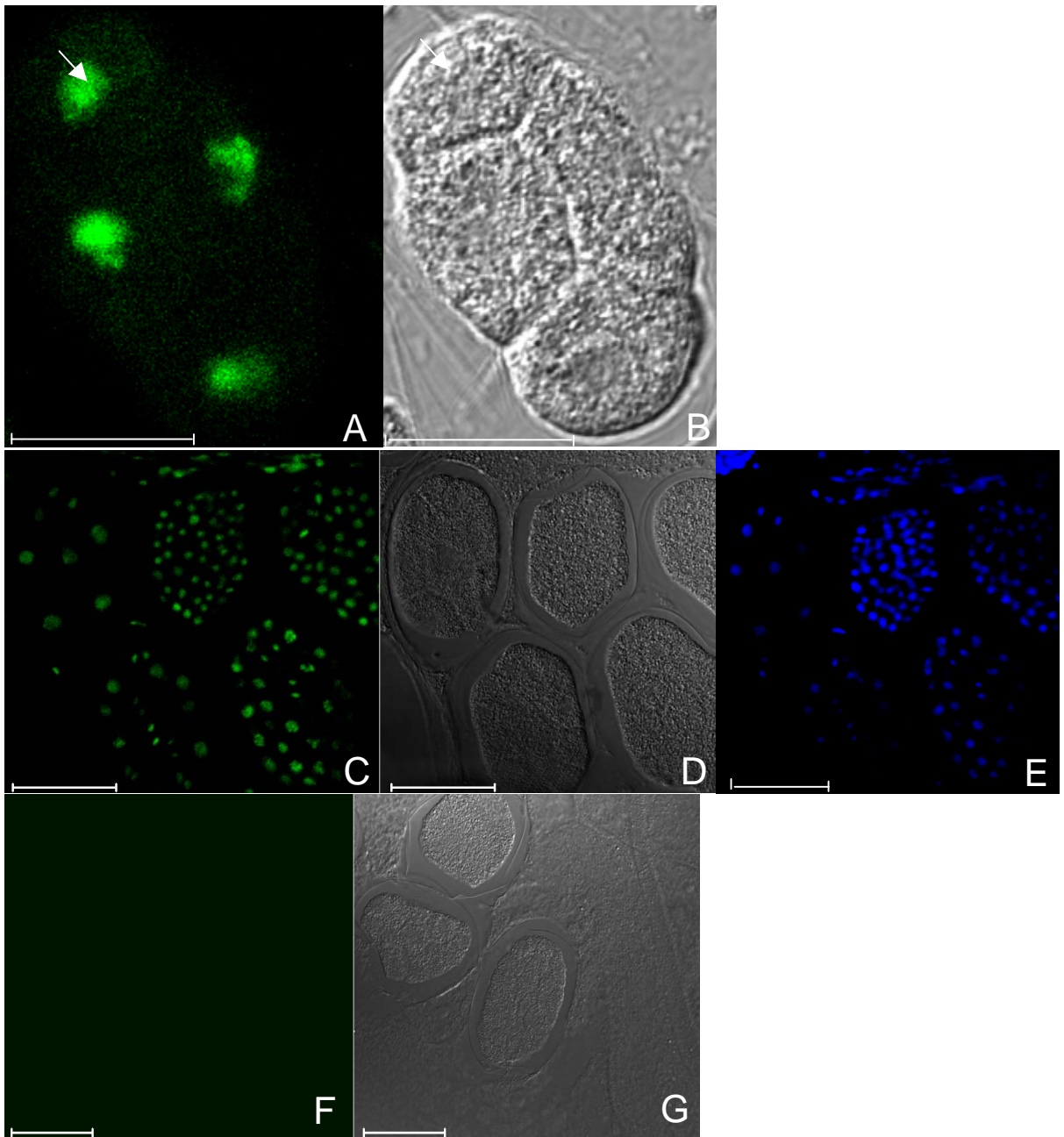


Abb. 3: Immunfärbung der Embryonen mit dem  $\alpha$ H1 Antikörper.

(A) 4-Zellstadium Embryo (der Pfeil zeigt die P-Zelle),

(B) das entsprechende Nomarski-Durchlichtbild,

(C) Embryonen in verschiedenen Stadien,

(D) das entsprechende Nomarski-Durchlichtbild und

(E) DNA-Färbung mit Hoechst.

(F) die Kontrolle (Färbung mit dem Cy-2 Antikörper);

es wurde kein Signal detektiert,

(G) das entsprechende Nomarski-Bild.

Das Signal ist in allen Zellkernen detektiert. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

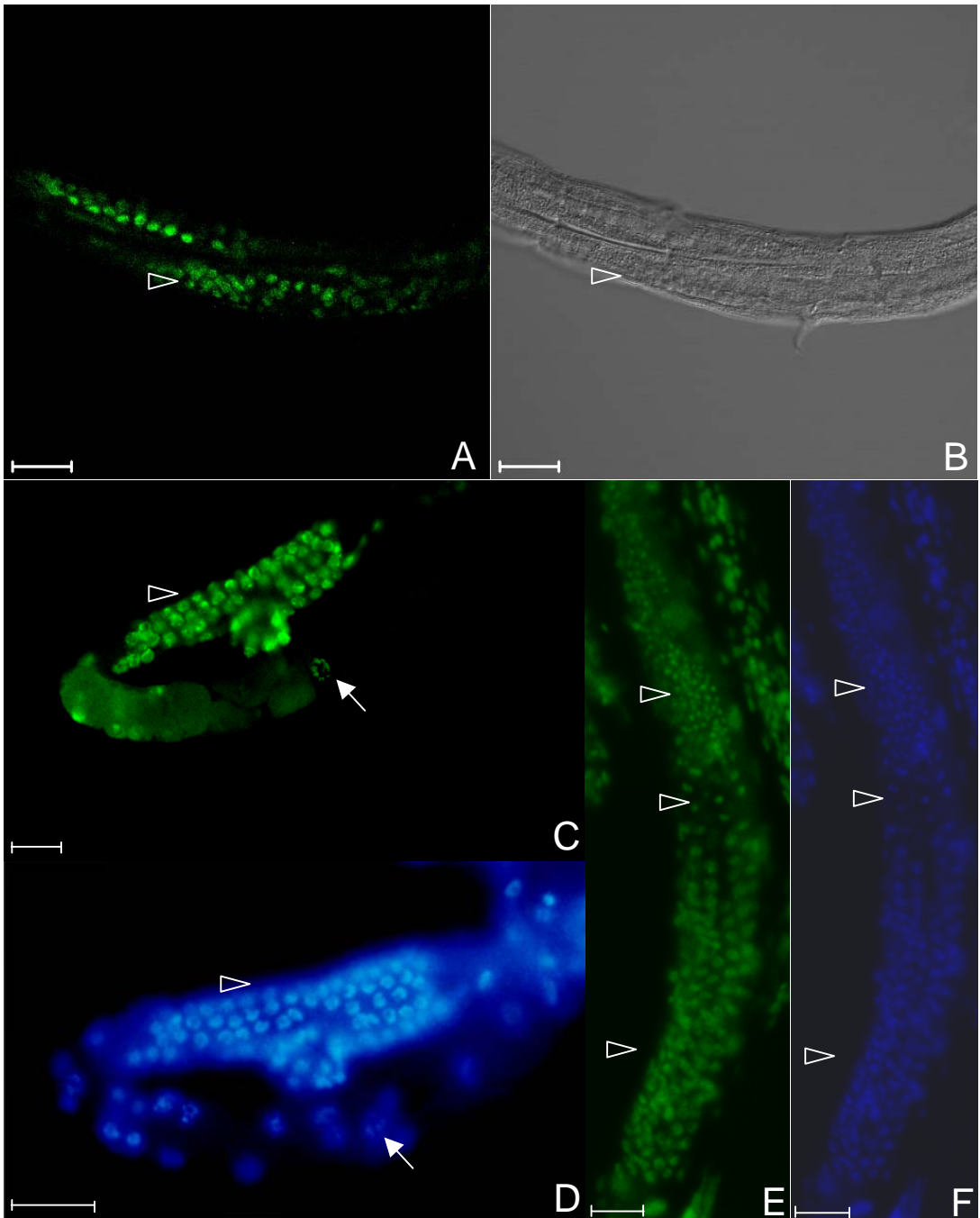


Abb. 4: Immunfärbung der Gonaden mit dem  $\alpha$ H1 Antikörper.

(A) L4-Stadium (das Dreieck zeigt die gefärbten undifferenzierten Keimbahnzellkerne,

(B) das entsprechende Nomarski-Durchlichtbild,

(C) die Gonade der Hermaphroditen (der Pfeil zeigt die Oocyte, das Dreieck die undifferenzierten Keimbahnzellkerne),

(D) die entsprechende DNA-Färbung mit Hoechst,

(E) die Gonade der Männchen (Die Dreiecke von oben nach unten zeigen Spermien, Spermatocyten und undifferenzierte Keimbahnzellkerne),

(F) die entsprechende DNA-Färbung mit Hoechst.

Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.



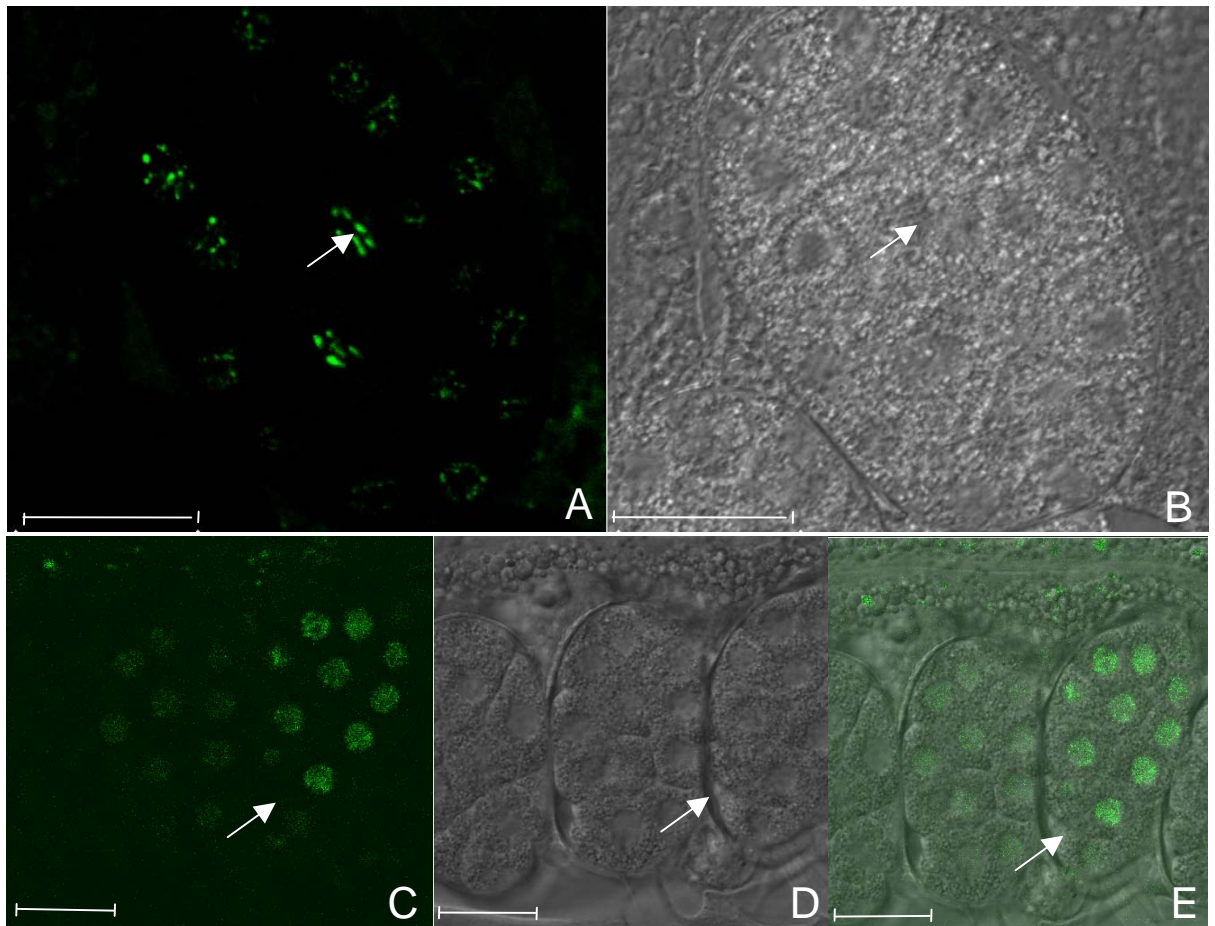


Abb. 5: Das *H1.1::gfp* Reporter gen. Das Signal ist in allen Zellkernen außer der P-Zelle detektiert. (A) der Embryo im 32-Zellstadium (der Pfeil zeigt die kondensierten Chromosomen), (B) das entsprechende Nomarski-Durchlichtbild, (C) der Embryo im 16-Zellstadium (der Pfeil zeigt die P-Zelle; Kein Signal ist detektiert), (D) das entsprechende Nomarski-Durchlichtbild, (E) Überlagerung der Bilder (C, D). Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

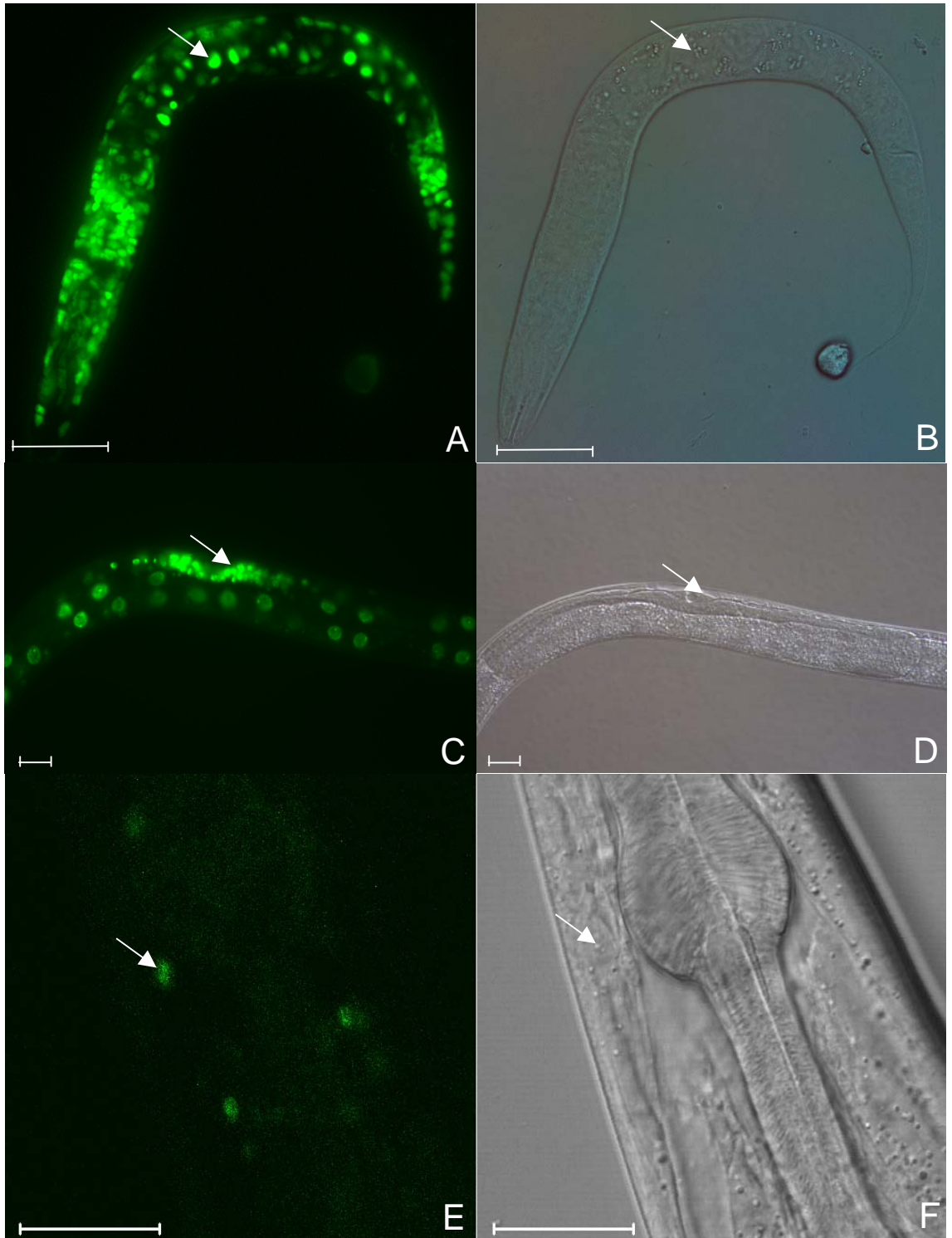


Abb. 6: Das Signal des *H1.1::gfp* Reportergens in somatischen Zellkernen von *C. elegans*.  
 (A) L2-Stadium (der Pfeil zeigt das Signal in polyploiden Zellen des Darms),  
 (C) L3/L4-Stadium (der Pfeil zeigt die somatischen Zellen der Gonade-'Christmas-tree'),  
 (E) Kopfregion eines adulten Hermaphroditen (der Pfeil zeigt das Signal in Zellkernen der Hypodermis).  
 (B, D, F) die entsprechenden Nomarski-Durchlichtbilder.  
 Der Balken entspricht: 20  $\mu\text{m}$ .

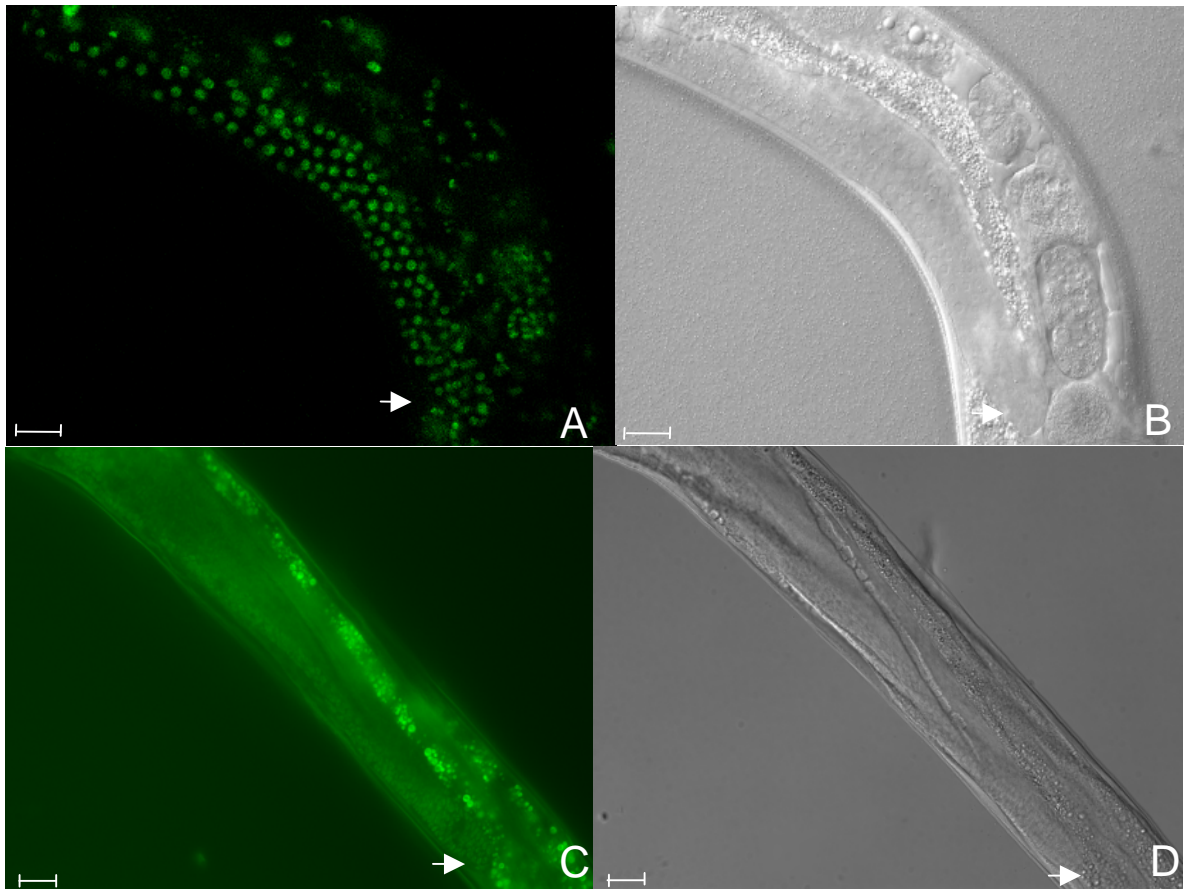


Abb. 7: Das Signal des *HL-1::gfp* Reportergens in den Gonaden eines Hermaphroditen (A, B) und eines Männchens (C, D). Das Signal ist in undifferenzierten Keimbahnzellkernen, Oocyten und Spermien detektierbar. Der Pfeil zeigt den distalen Teil des Gonaden-Arms. (B, D) die entsprechenden Nomarski-Durchlichtbilder. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

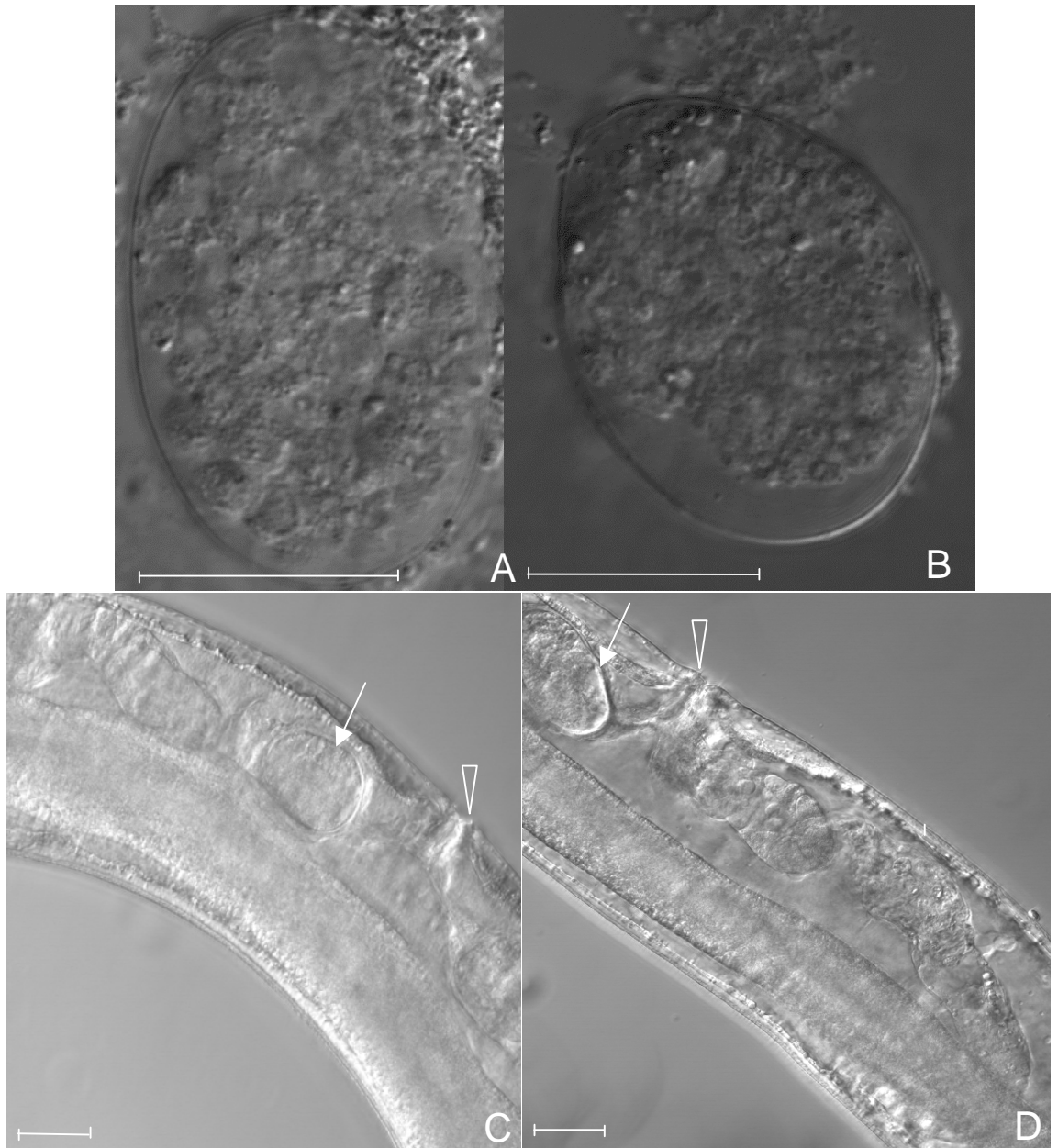


Abb. 8: Der Phenotyp nach der H1.1 dsRNA Injektion.

(A, B) die toten Embryonen in der 'midproliferation'-Phase.

(C, D) die anormale Gonade der F1 Hermaphroditen. Die Oocyten sind nicht erkennbar, die Anzahl der Keimbahnzellkernen und der Fertilität ist reduziert (der Pfeil zeigt den Embryo, das Dreieck die Vulva). Der Balken entspricht: 20  $\mu\text{m}$ .



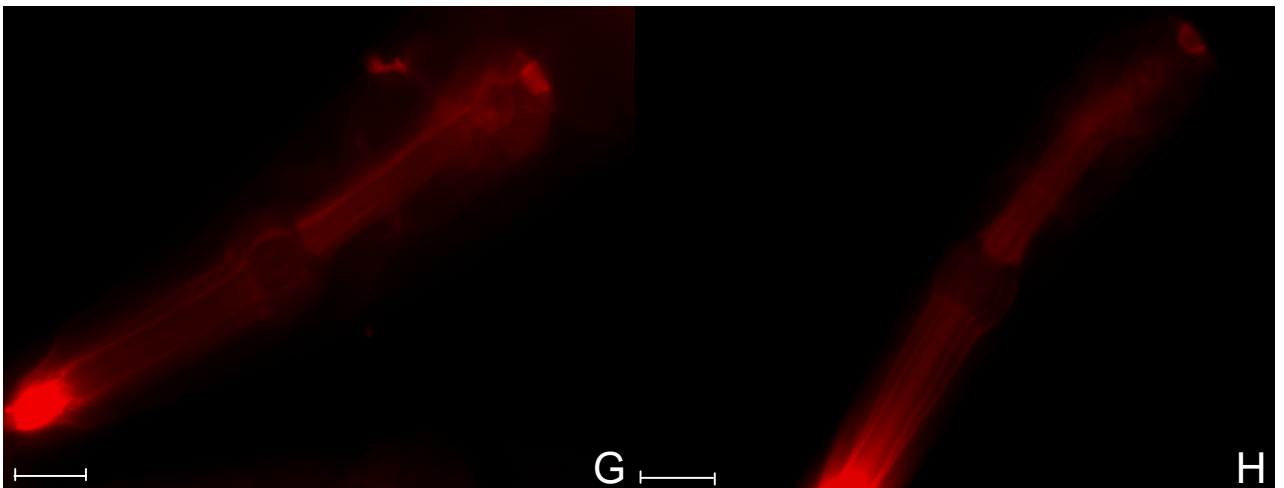
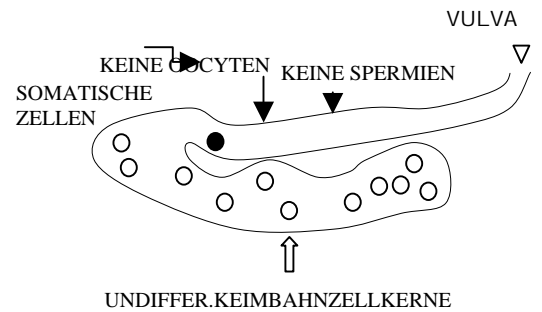
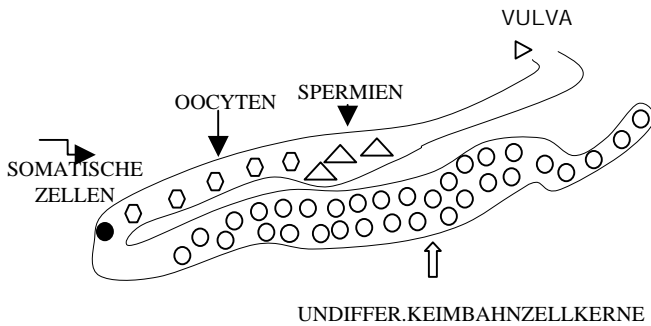
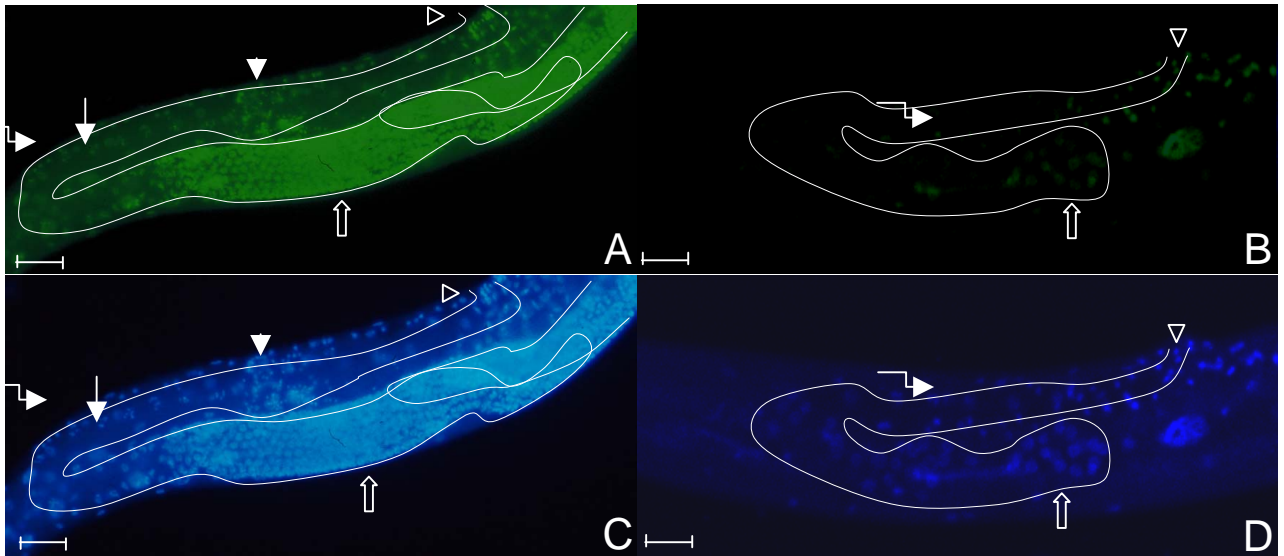


Abb 9: Die Immunfärbung eines Wildtyp-Hermaphroditen (linke Spalte) und des Tieres mit dem H1.1 Phenotyp (rechte Spalte) mit dem  $\alpha$ H1 Antikörper (A, B) und mit dem IFA Antikörper (G, H). (B) das Immunsignal sowie die Anzahl der Keimbahnzellkernen nach H1.1 dsRNA Injektion ist stark reduziert, (A) zum Vergleich die Immunfärbung mit dem Wildtyp Tier. (C, D) die entsprechende DNA-Färbung mit Hoechst. (E, F) schematische Zeichnungen der oberen Aufnahmen, (G, H) IFA-Immunfärbung des Pharynx (die Färbung mit den selben Tieren wie (A, B); gute Antikörperpenetration). Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

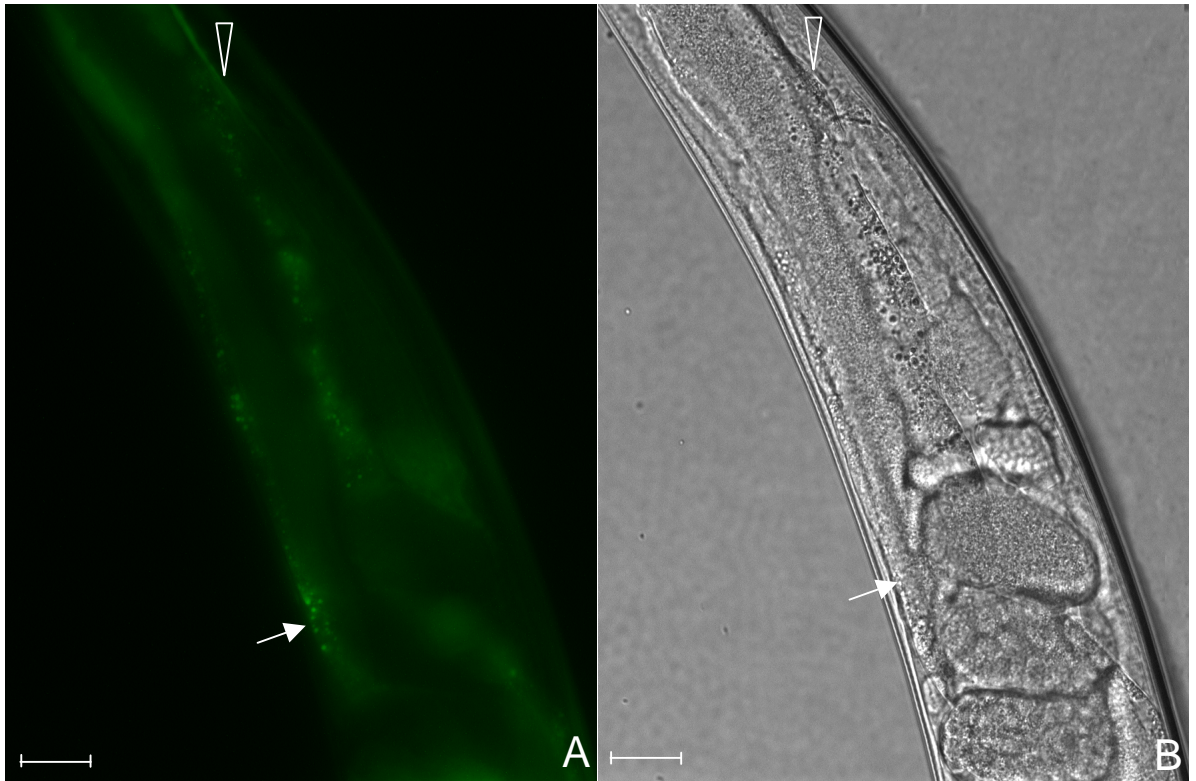


Abb. 10: Der *HL.1::gfp::CeHL.1 3'UTR* Reporterstamm.

Das Signal ist nicht in den Embryonen und Kernen der somatischen Zellen im Vergleich mit dem *HL.1::gfp* Reporterstamm detektiert. Das Dreieck zeigt das Signal in den Nervenzellen, das vom *HMGI.β::gfp* Marker stammt. Der Pfeil zeigt die Autofluoreszenz des Darmes.

Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

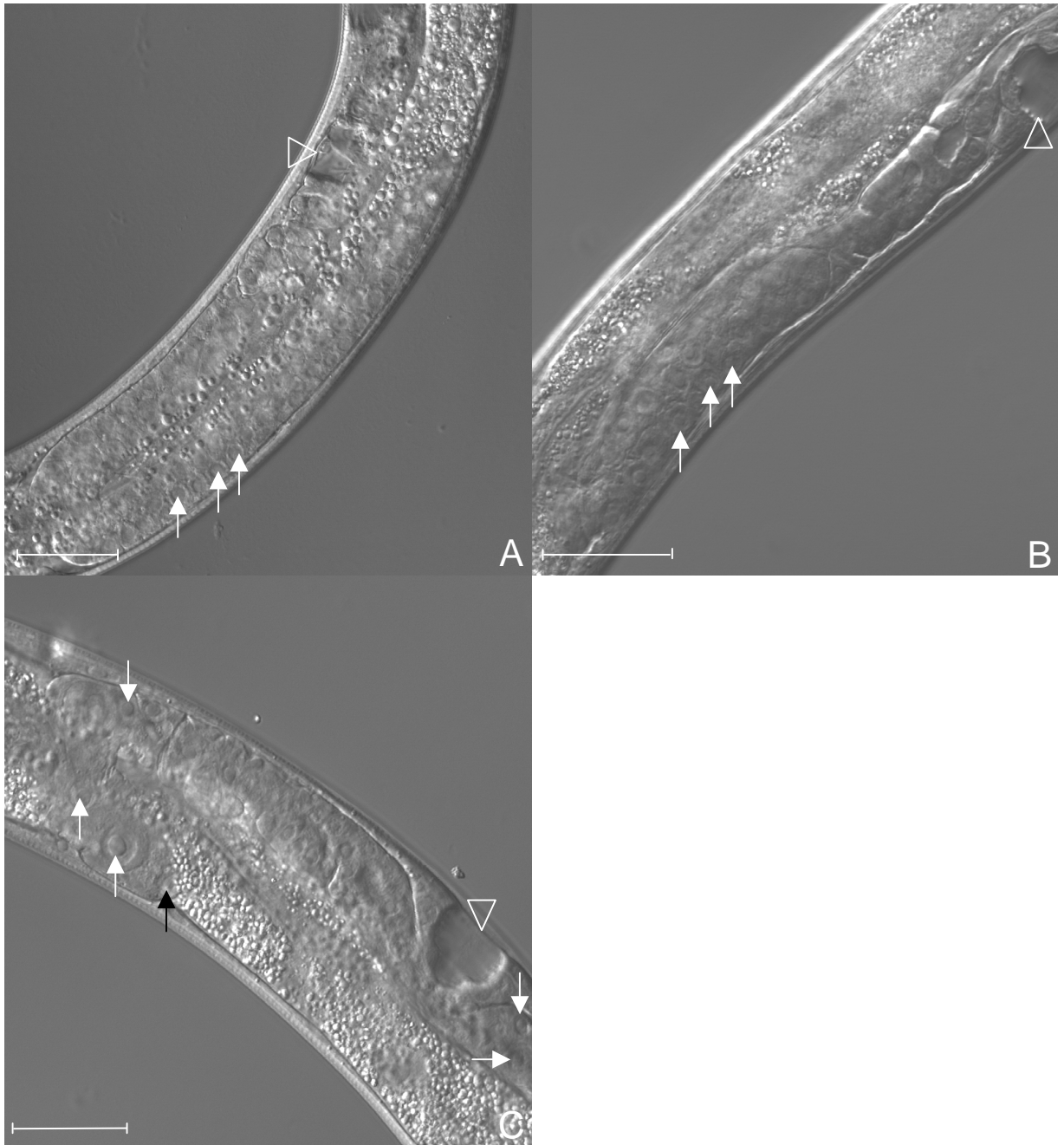


Abb. 11: Der H1.1 Phenotyp der F1 Tiere (der injizierte Mutter) nach der H1.1 dsRNA Injektion.  
 (A) L4 Wildtyp-Tier mit normal aussehenden Keimbahnzellkernen (Pfeile),  
 (B) L4 *mes-3* Mutant mit anormaler Gonade und 'donuts'-ähnlichen Keimbahnzellkernen (Pfeile),  
 (C) L4 mit dem H1.1 Phenotyp, die anormal aussehenden Keimbahnzellkerne (wie bei (B),  
 weiße Pfeile), anormale Gonade. Die Dreiecke zeigen die Vulva, der schwarzen Pfeil die DTC-Zelle.  
 Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

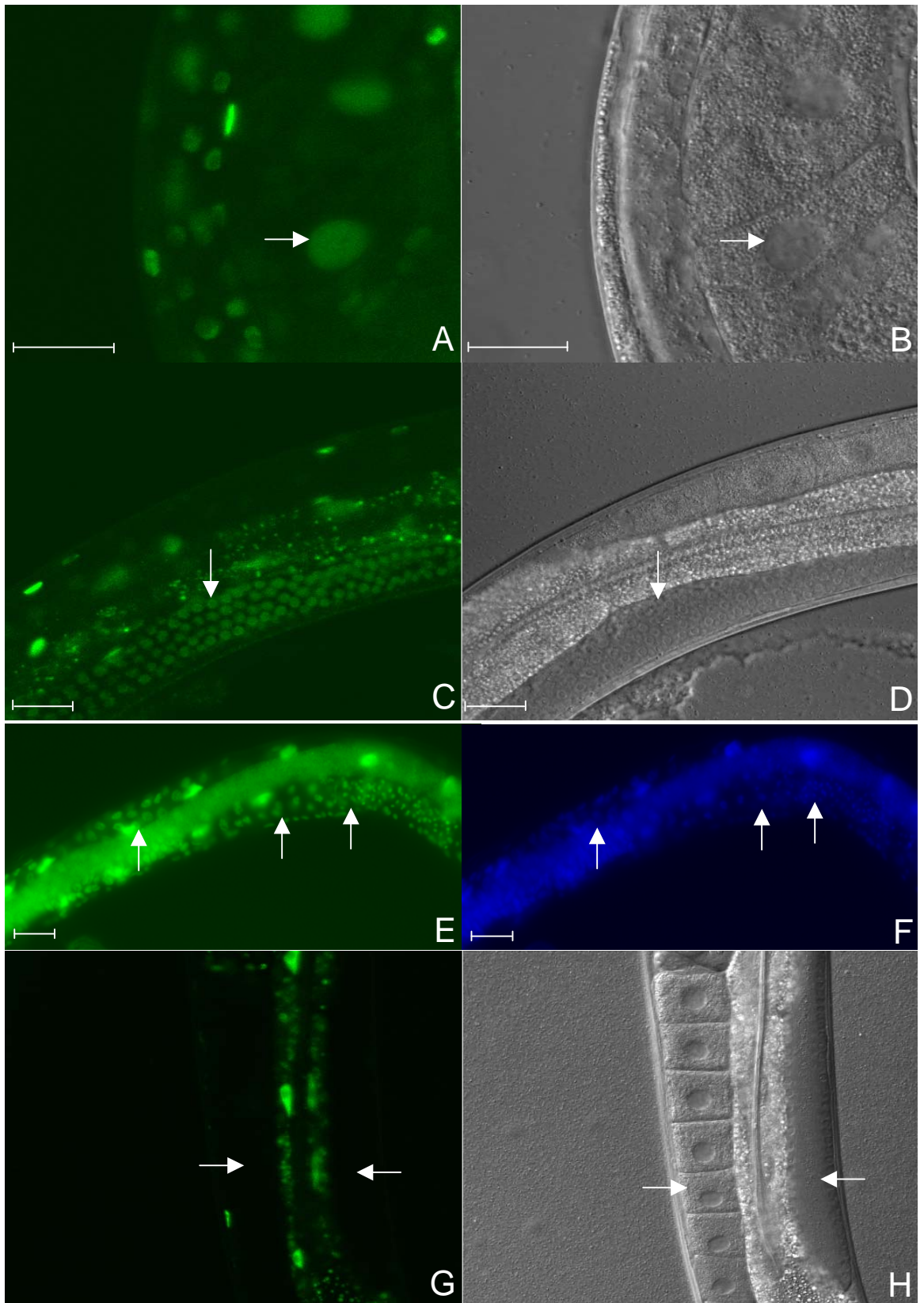


Abb. 12: Das GFP-Signal des Reporterstammes *let-858::gfp* nach der H1.1 dsRNA Injektion. Das Signal ist in Oocyten detektierbar (A; siehe Pfeil), in undifferenzierten Keimbahnzellkernen der Hermaphroditen (B; siehe Pfeil), in allen Stadien der männlichen Keimbahnzellkern-Entwicklung (E; die Pfeile von links nach rechts: undiffer. Keimbahnzellkerne, Spermatocyten und Spermien). Das Signal ist in Männchen mit der anti-GFP-Färbung verstärkt. (G) die Kontrolle: In Keimbahnzellkernen (Pfeile) ist kein Signal nach der Injektion der irrelevanten dsRNA detektiert. (B, D und H) die entsprechenden Nomarski-Durchlichtbilder. (F) die DNA-Färbung mit Hoechst. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



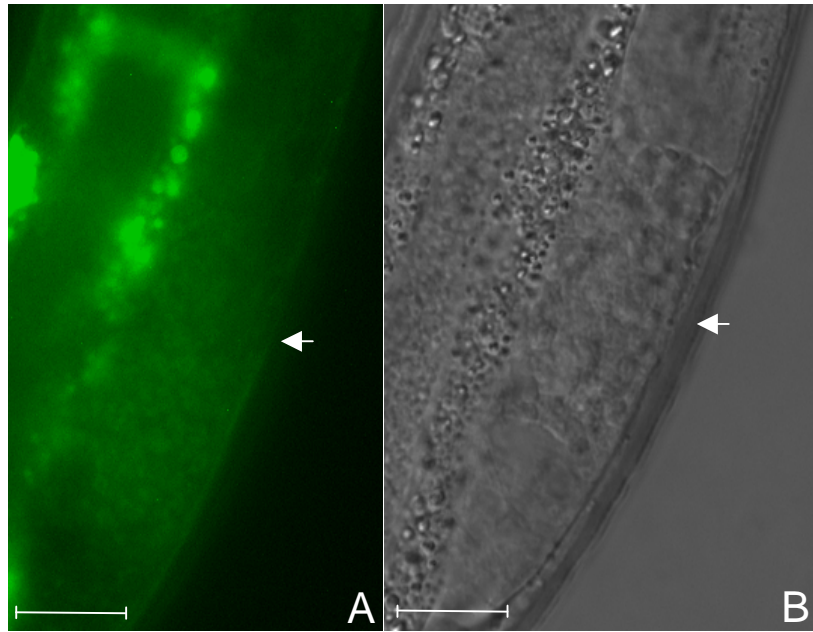


Abb. 13: Das GFP Signal des Reporterstammes *let-858::gfp* in Spermatocyten nach der H1.1 dsRNA Injektion.  
(A, B) der Pfeil zeigt die GFP-Expression in Spermatocyten in einem adulten Männchen, welches in L1 oder L2 Stadium injiziert worden war,  
(B) das entsprechende Nomarski-Durchlichtbild.  
Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

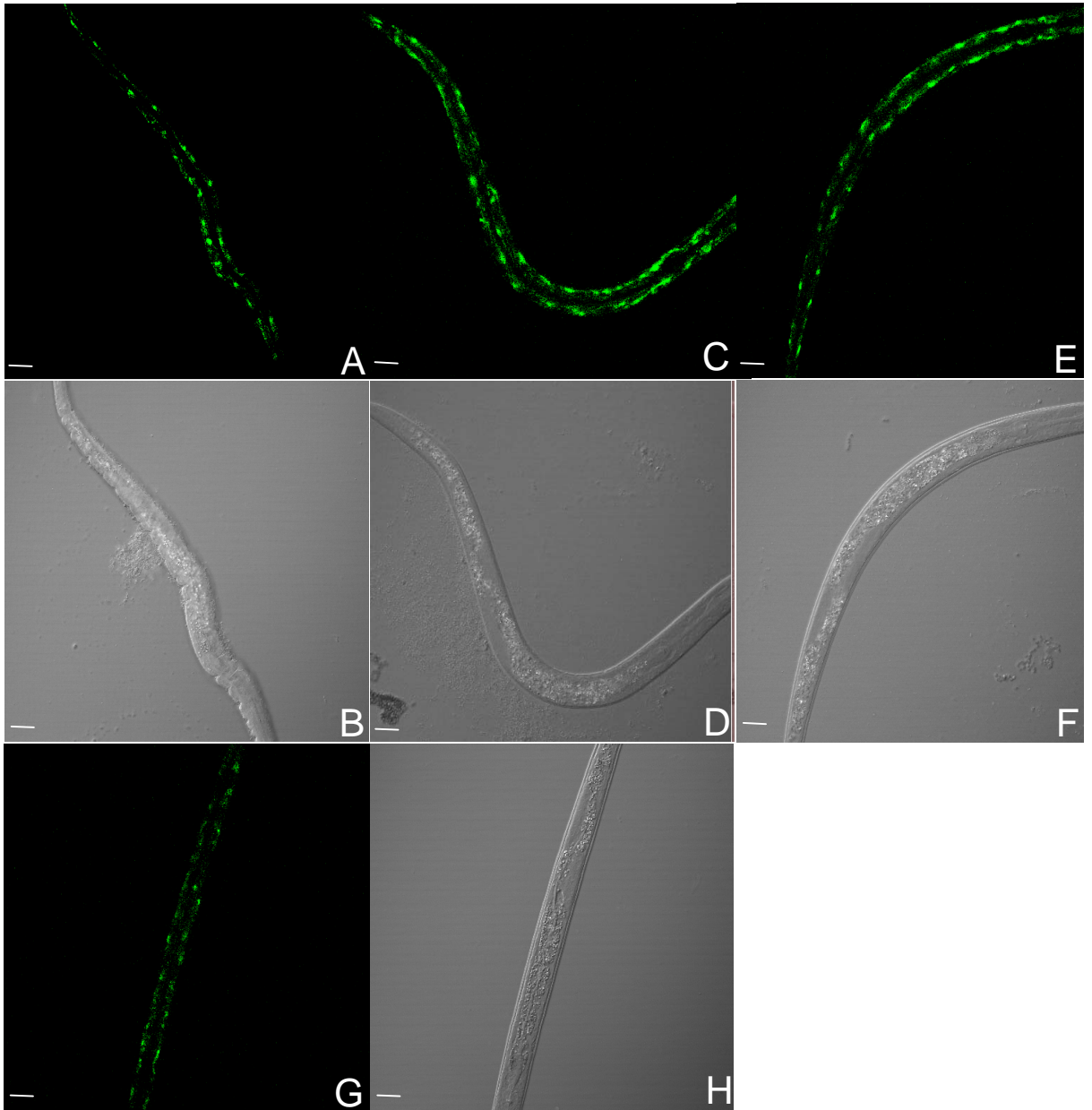


Abb. 14: Das GFP-Signal in Kernen und Mitochondrien der Dauerlarven nach 8 Wochen dsRNA Injektion  
 (A) nach der H1.1 dsRNA,  
 (C) nach der H1.2 dsRNA,  
 (E) nach der H1.4 dsRNA Injektion,  
 (G) Kontrolle,  
 (B, D, F und H) die entsprechenden Nomarski-Durchlichtbilder.  
 Die Stärke des Signals ist abhängig von dem Typ der injizierten dsRNA.  
 Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

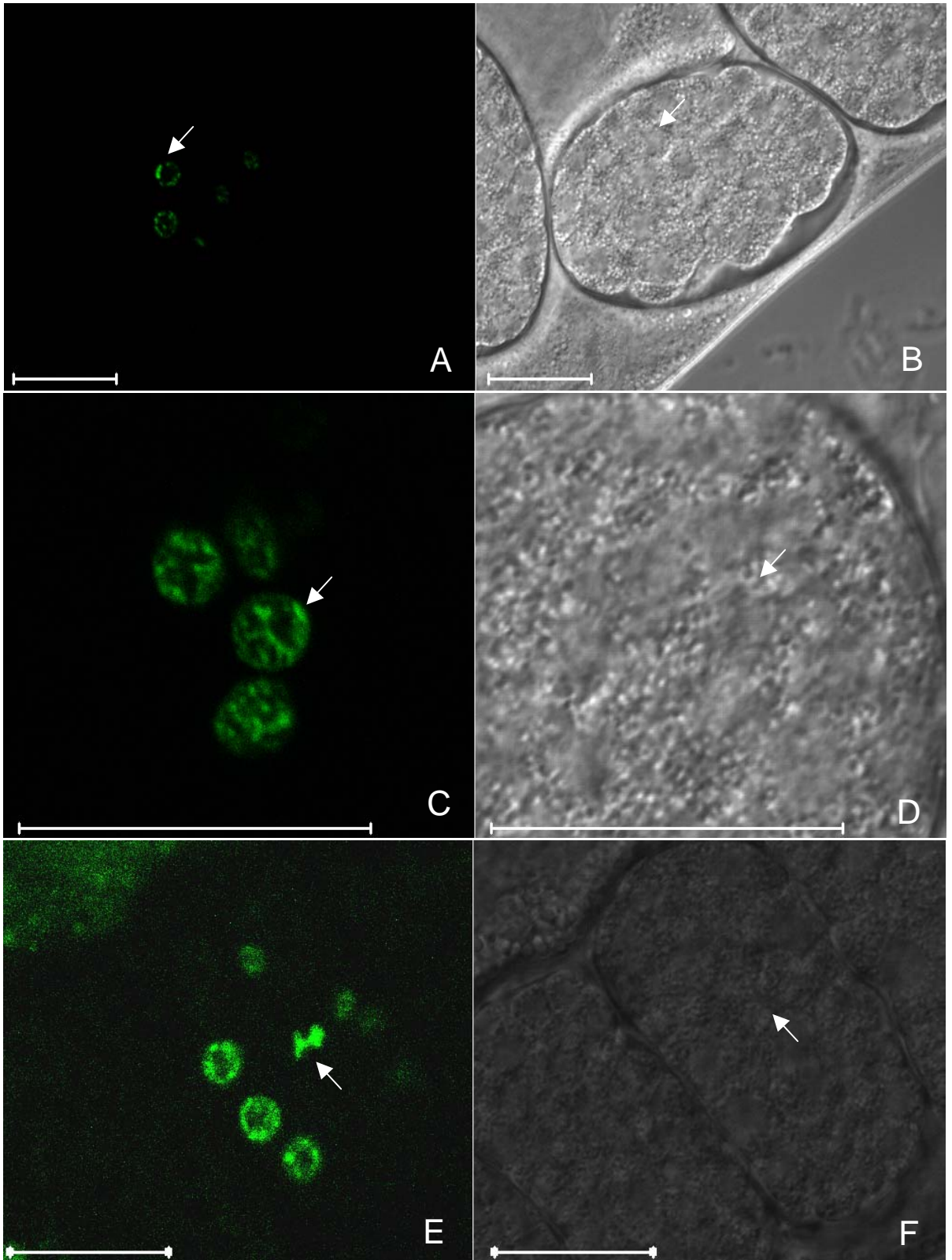


Abb. 15: *H1.4::gfp* Reporterger. Das Signal ist in C, D, MS und E- Zell-Linien der Embryonen detektiert. (A,C) die Zellkerne in dem Prophase-Stadium (siehe Pfeil), (E) im Metaphase-Stadium. Chromosomen sind stärker kondensiert in der Äquatorialebene (siehe Pfeil) (B, D und F) die entsprechenden Nomarski-Durchlichtbilder. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

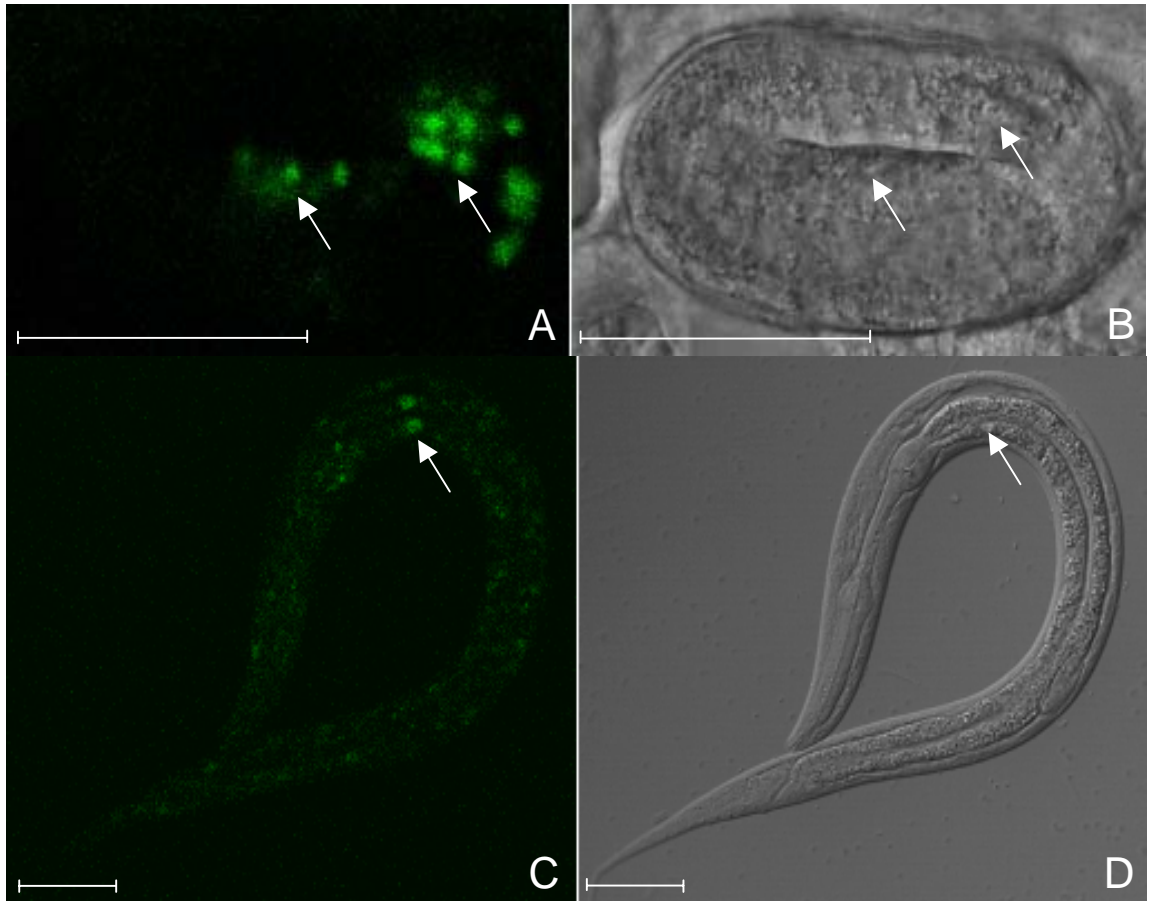


Abb. 16: *H1.4::gfp*-Reportergeren.

(A) Das Signal im Brezel-Stadium wurde in einigen bestimmten Zellen beobachtet

(der linke Pfeil zeigt die Zellen, aus denen Darm und Pharynx entstehen, rechter Pfeil: Muskelzellen).

(C) L2/L3 Stadium — ein sehr schwaches Signal wurde in polyploiden Zellen des Darms (siehe Pfeil) gefunden.

(B und D) die entsprechenden Nomarski-Durchlichtbilder.

Der Balken entspricht 20 µm.

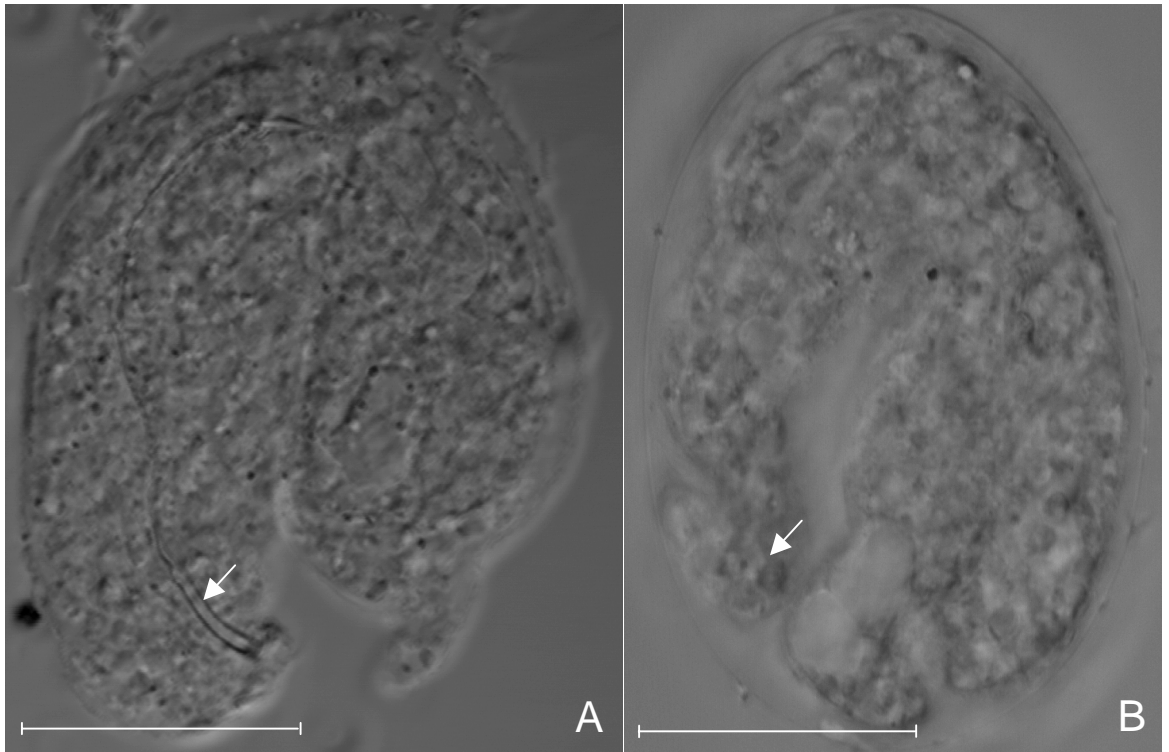


Abb. 17: H1.4 dsRNA Phenotyp.

(A, B) die Pfeile zeigen einen abnormalen, nicht entwickelten Pharynx.

Die Embryonen in Brezel-Stadien enthalten kein Darm.

Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



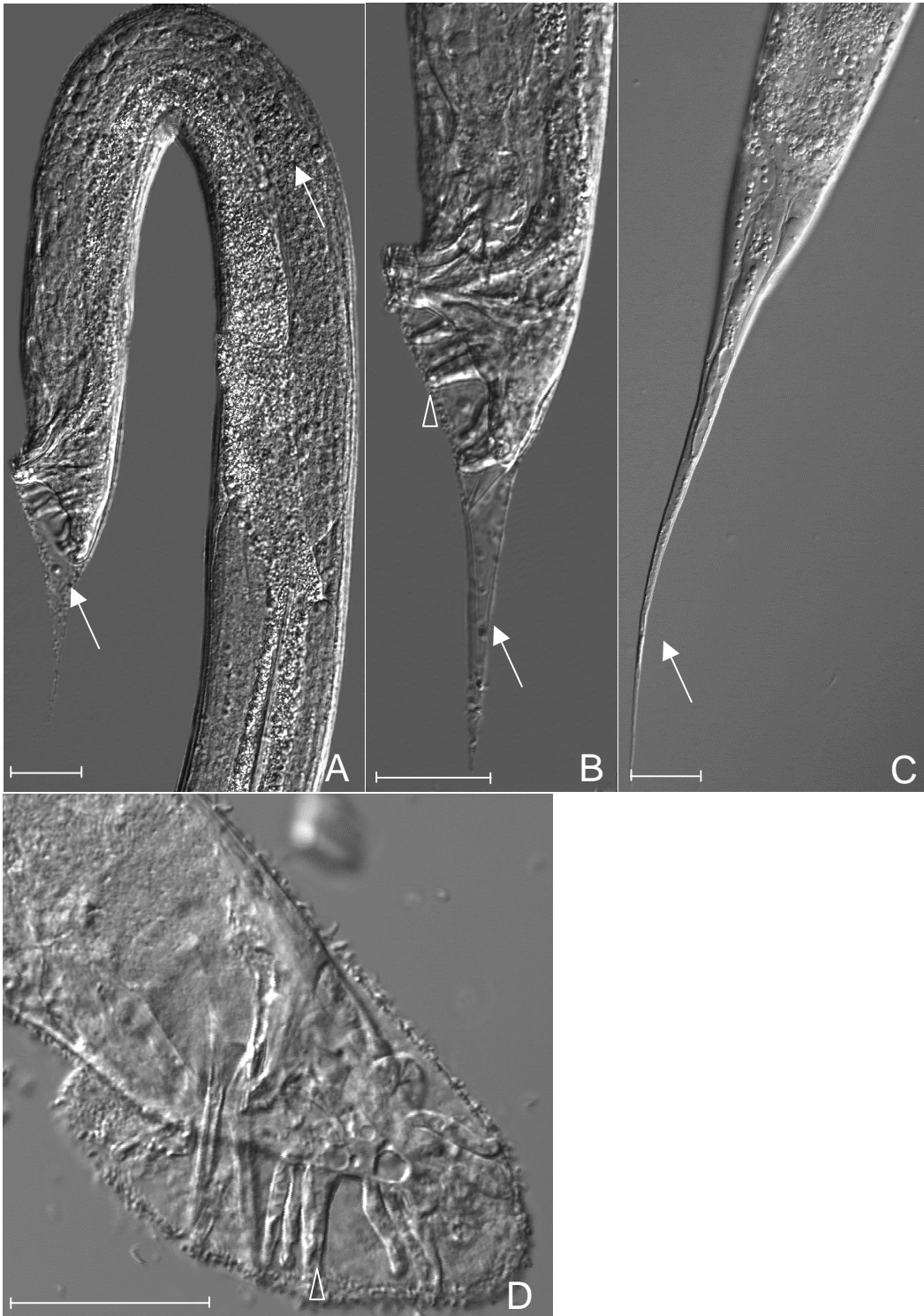


Abb. 18: (A) der männliche Schwanz mit dem H1.4 dsRNA Phenotyp (1. Versuch). Der typische, lange Stachel ist den Hermaphroditen ähnlich (siehe unterer Pfeil), kurze, nicht entwickelte Strahlen (siehe Dreieck). Normale Gonade (siehe oberer Pfeil), Lateralansicht. (B) Das Bild stellt die Ausschnitt-Vergrößerung von (A) dar. (C) der Schwanz des adulten Hermaphroditen, Ventralansicht. (D) der männliche Schwanz der *him-8* Tiere: Dorsalansicht. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

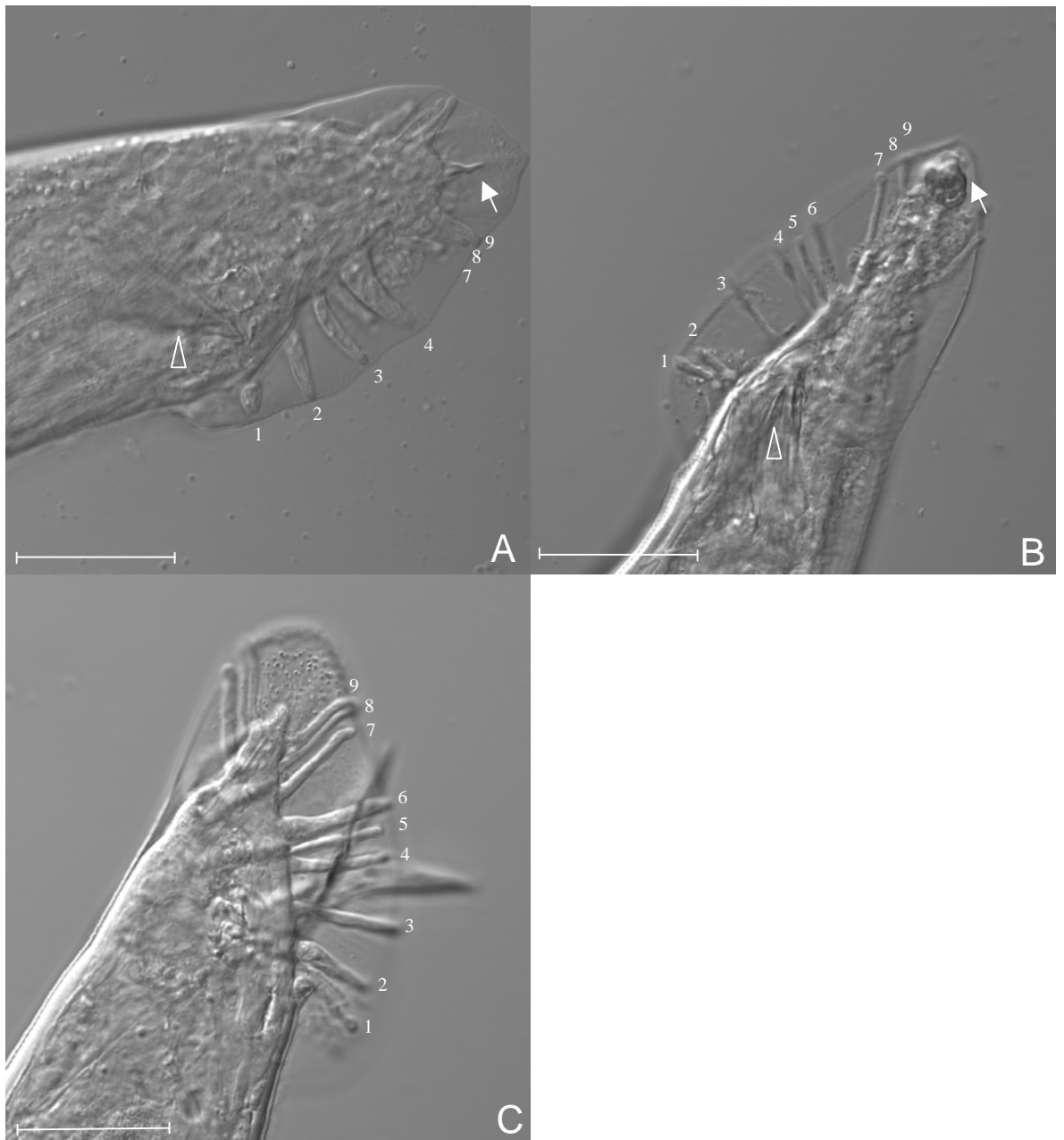


Abb. 19: (A, B) die männlichen Schwänze mit dem H1.4 dsRNA Phenotyp.

Die Strahlen sind nummeriert: Lateralansicht.

(A) die Strahlen 5 und 6 sind nicht sichtbar.

(C) die Kontrolle, männlicher Schwanz des F1 Tiers nach der Injektion einer irrelevanten dsRNA.

(A, B) der Pfeil zeigt den geformten Schwanz bei Männchen mit dem H1.4 dsRNA Phenotyp, der den *lep-1(bx42)* Mutanten ähnlich ist. Die Strahlen 7, 8 und 9 sind länger als die Strahlen 5 und 6 aber insgesamt kürzer als die Strahlen bei der Kontrolle (C). Der Blockpfeil zeigt die Spiculae. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



Abb. 20: Der Phenotyp bei den F1 Tieren nach der SON-1/ H1.4 dsRNA Injektion.

(A) anormale, kurze Gonade (siehe Pfeil), anormale Vulva, steril,

(B) kurze, einarmige Gonade der Hermaphroditen, wo sich die Zellkerne des distalen Gonaden-Arms in meiotischer Teilung befinden.

Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



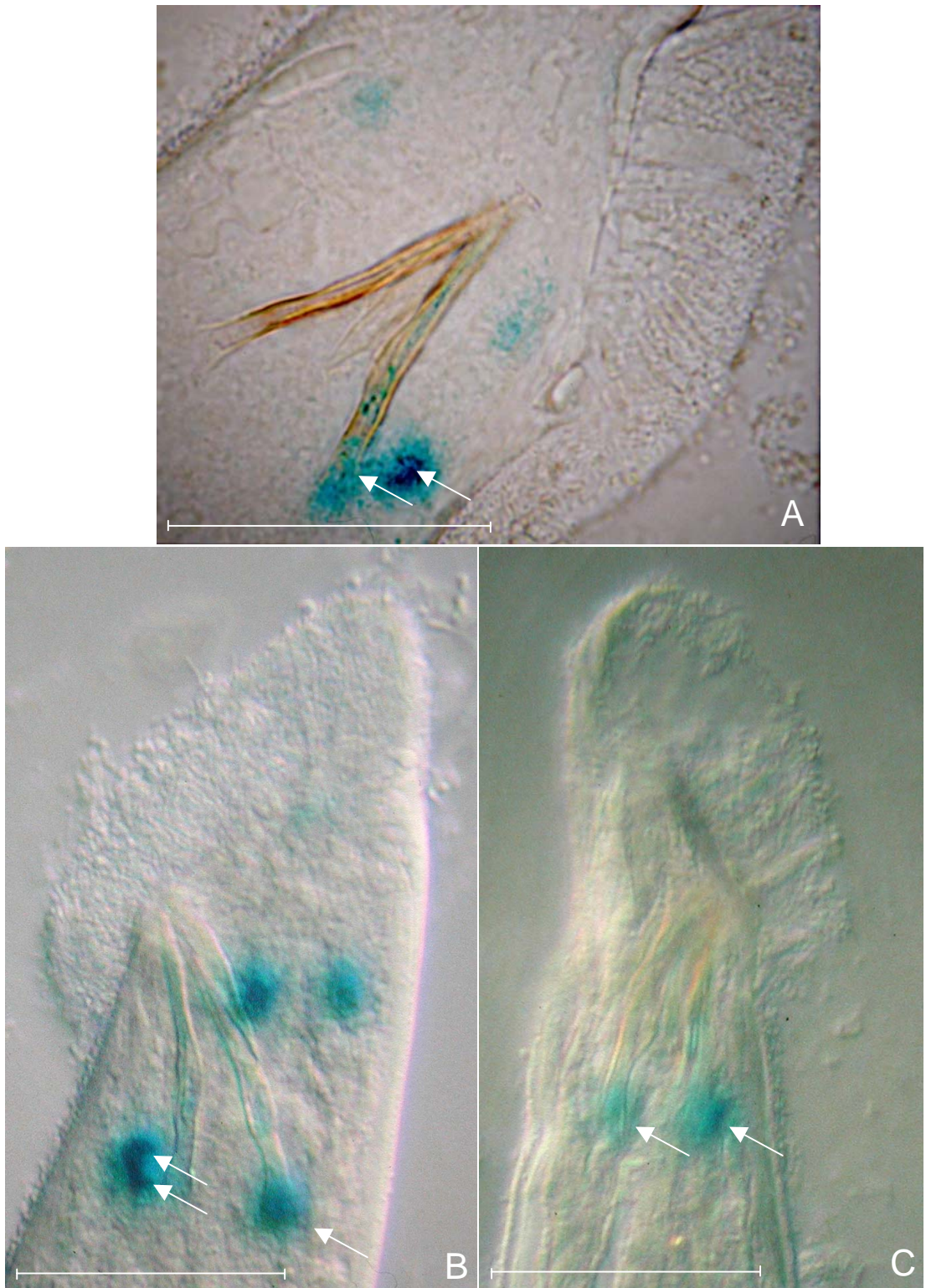


Abb. 21: Die Anzahl der SPD-Neuronen pro Spicula im Reporterstamm *dpy-20(e1282); syIs20 him-5(e1490)* mit *gfp::lacZ* Fusion nach der  
 (A) H1.4 dsRNA Injektion: 2 SPD-Neuronen an einer Spicula, kein SPD Neuron an der zweite Spicula (2:0),  
 (B) H1.1 dsRNA Injektion: 2 SPD-Neuronen an einer Spicula und ein-Neuron an der zweiten Spicula (2:1)  
 und (C) Kontrolle: nach der Injektion der irrelevanten dsRNA: 1 SPD-Neuron pro Spicula (1:1).  
 Die Pfeile zeigen die SPD Neuronen.  
 Der Balken entspricht 20 μm.

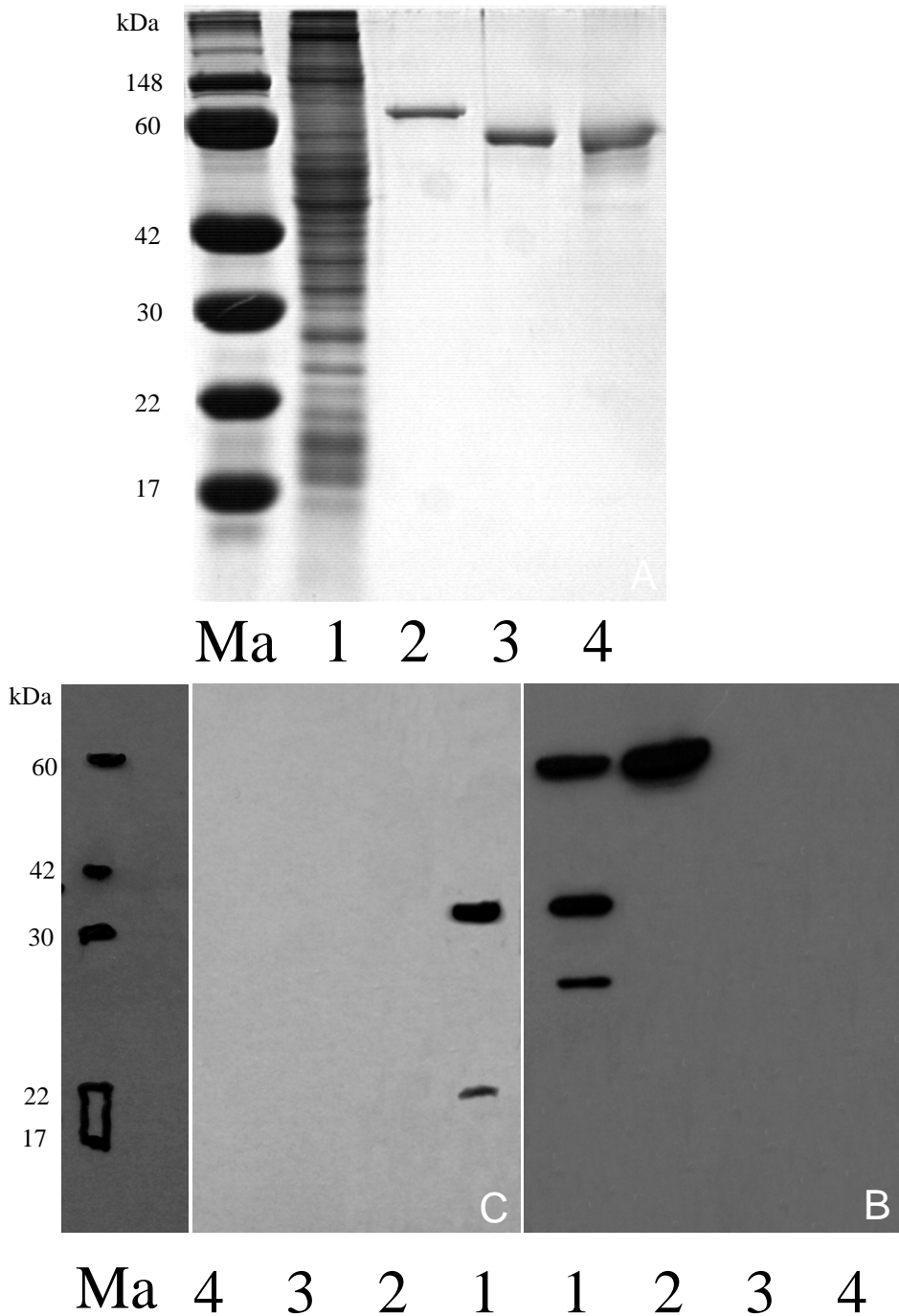


Abb. 22: Vergleich der Spezifität der  $\alpha$ H1.X-101 (B, 1:50) und  $\alpha$ H1.X-11 (C, 1:400) Antikörper auf dem western-blot des Totallysats von *C. elegans*.

(A) die Coomassie-Blau-Färbung,

(B, C) western-blots. Ma-Marker Promega mid-range-weight,

1. Gesamte Proteine (Totallysat) aus *C. elegans*,

2. Rekombinantes Protein Lamin,

3. und 4. Rekombinante Intermediärfilamentproteine: A1 (3) und B1 (4) (von K. Weber).

Beide Antikörper sind nicht monospezifisch, produzieren aber auf dem western-blot nur eine einzige gemeinsame Bande bei ca. 31 kDa, die dem H1.X Protein entspricht.

Der  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper reagiert zusätzlich mit Lamin.

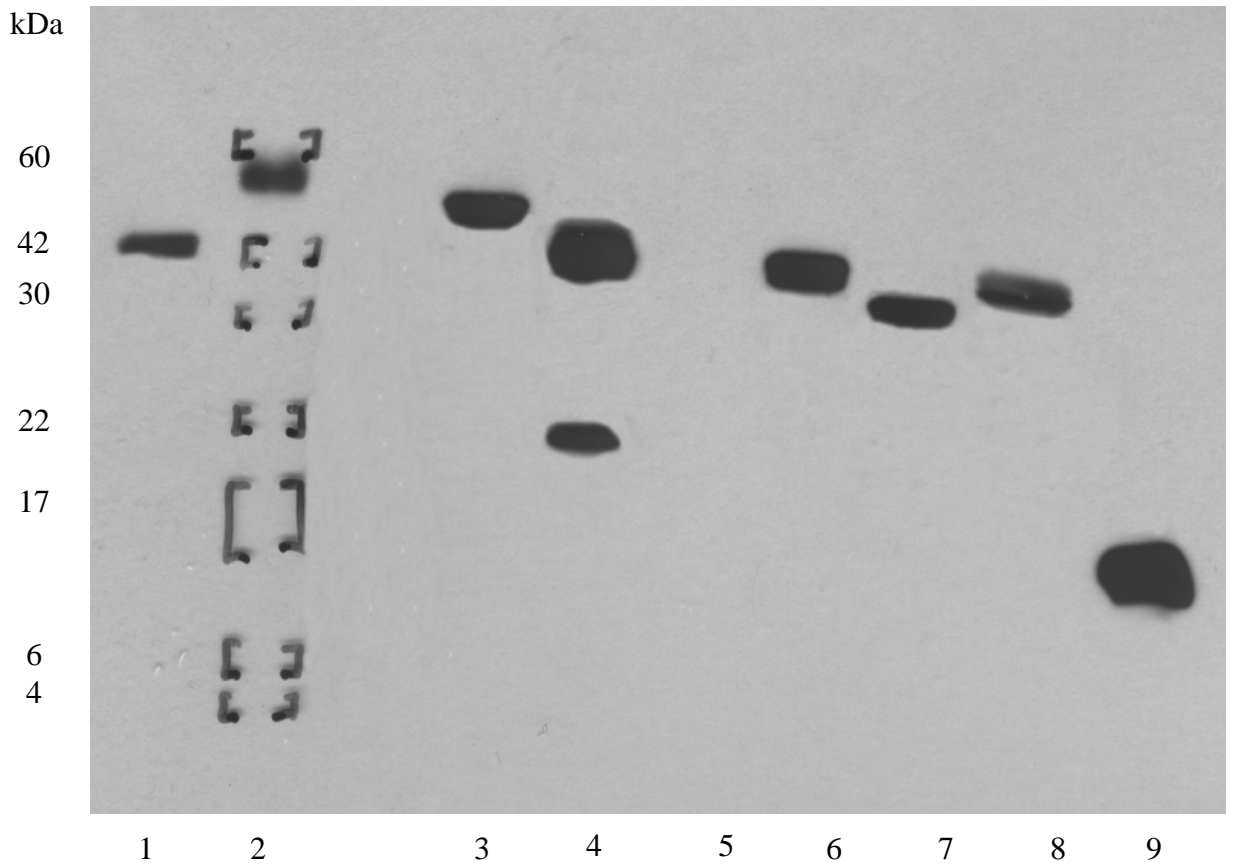


Abb. 23: Western-blot der H1 Isoformen und des Totallysats aus *C. elegans* mit dem Antikörper  $\alpha$ H1.X-101 (1:50).

Rekombinante Proteine 1-H1.5, 3-H1.4, 6-H1.1, 7-H1.2, 8-H1.3, 9-H1.Q,  
2-Protein Marker Promega mid-range-weight,

4-Totallysat aus *C. elegans*

5-Lamin (von K. Weber).

Der Antikörper  $\alpha$ H1.X-101 reagiert mit allen H1 Isoformen — aber nicht mit Lamin.

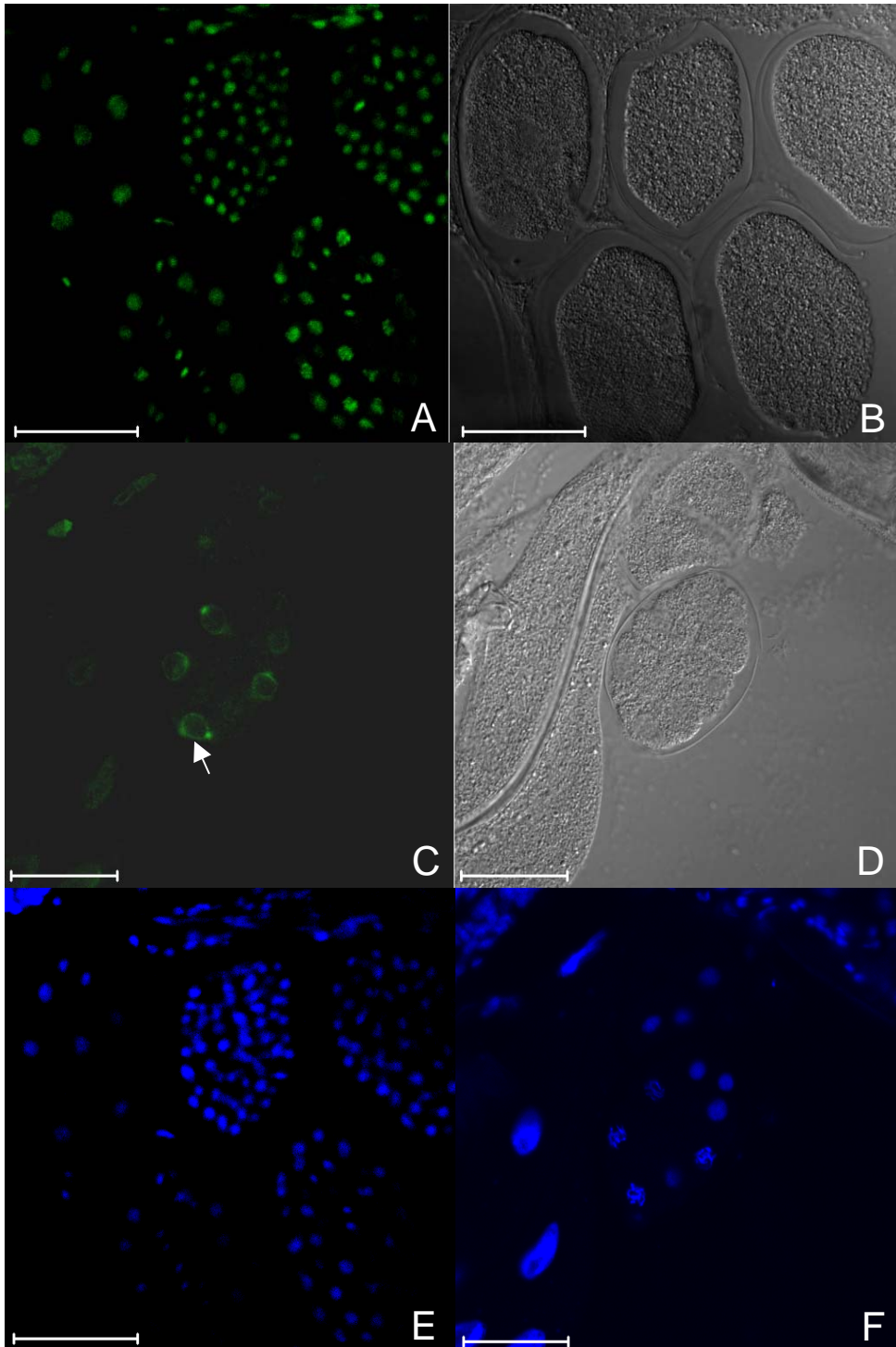


Abb. 24: Die Antikörper-Färbung  $\alpha$ H1 (A) und  $\alpha$ H1.X-11 (C). (B, D) die Nomarski-Durchlichtbilder. (E, F) die entsprechenden DNA-Hoechst-Färbungen. Der  $\alpha$ H1 Antikörper färbt die Chromosomen, was der DNA-Färbung mit Hoechst entspricht. Andererseits färbt der  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper die Lamina (siehe Pfeil) und zusätzlich zwei Punkte außerhalb der Chromosomen. Die DNA-Färbung mit Hoechst entspricht nicht der Antikörper  $\alpha$ H1.X-11 Färbung. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.



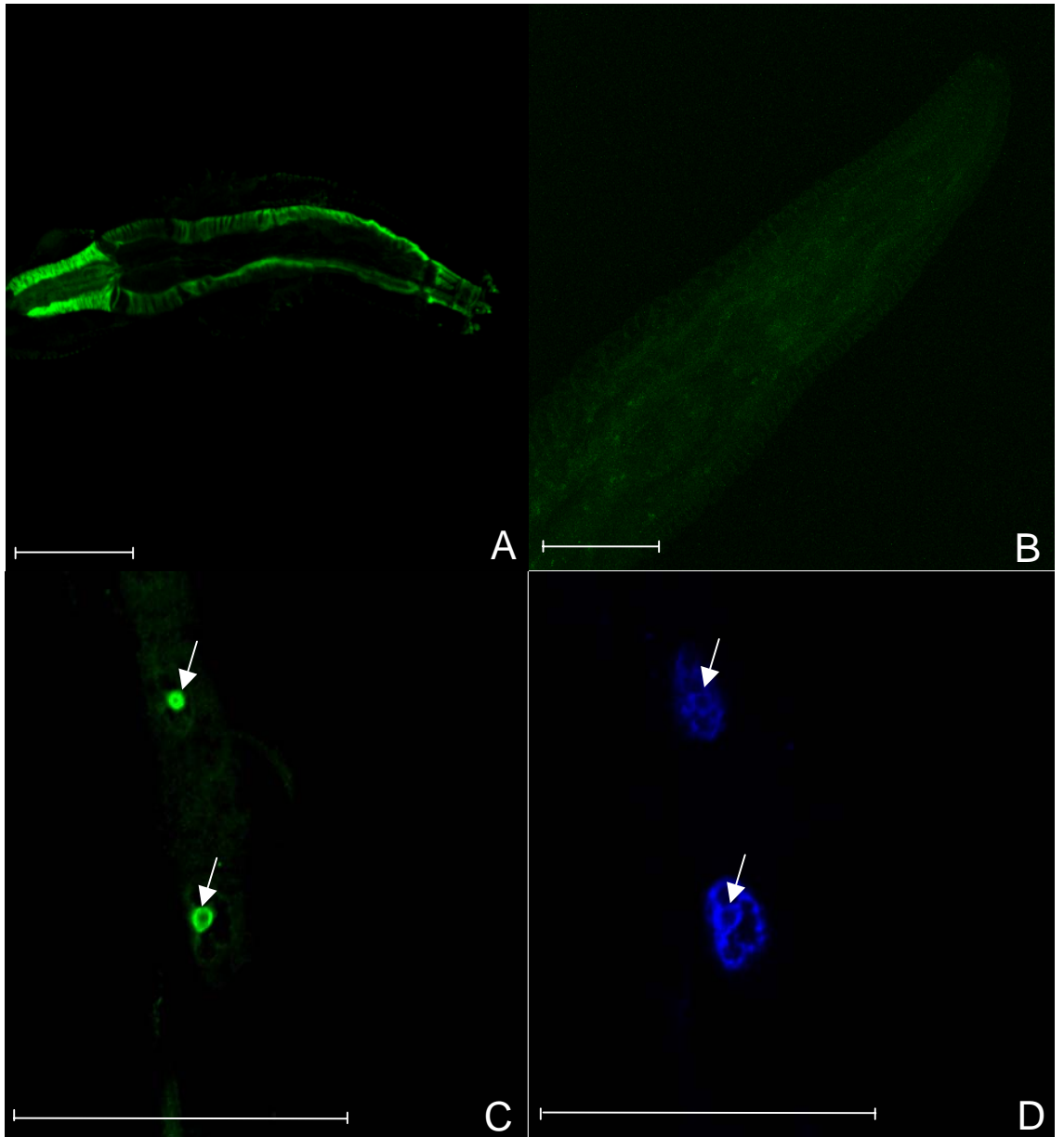


Abb. 25: Die Antikörper  $\alpha$ H1.X-101 Immunfärbung.

(A) Der Antikörper färbt die Tonofilamenten in den Marginalzellen vom Pharynx und

(C) die Nukleoli in polyploiden Zellen des Darms.

(B) die Kontrolle – Färbung mit dem Antikörper Cy-2; Kein Signal ist detektiert (VOGT, 2001).

(D) die DNA-Färbung mit Hoechst (die Pfeile zeigen die Nukleoli).

(A, B) Der Balken entspricht 20  $\mu$ m; (C, D) Der Balken entspricht 50  $\mu$ m.

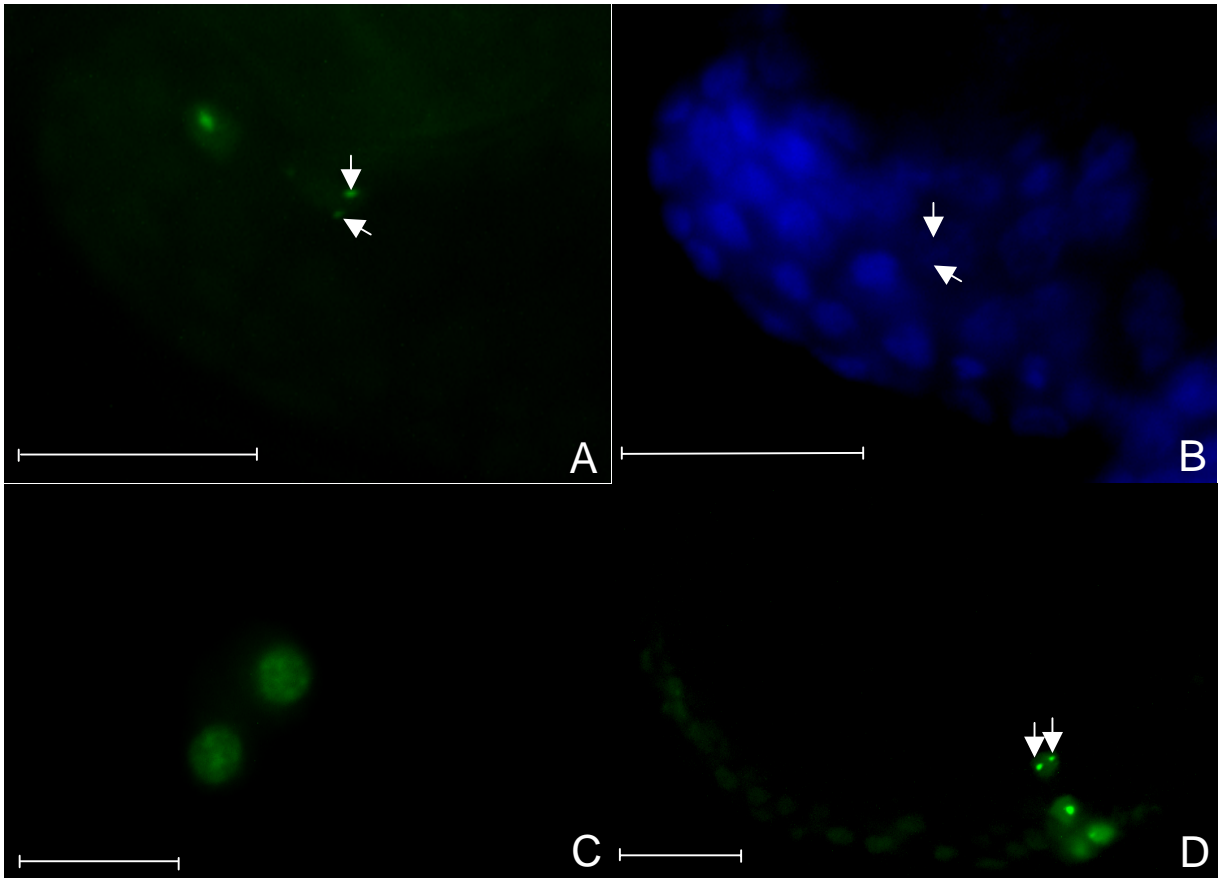


Abb. 26: Die Expression des *H1.X::gfp*-Reportergens in Embryonen.  
 (A, D) zwei deutliche Punkte im Zellkern entsprechen den Nukleoli (siehe Pfeile),  
 (B) die DNA-Färbung mit Hoechst (die Pfeile zeigen zwei schwarze Punkte,  
 die den Nukleoli entsprechen; Das Bild (B) entspricht dem Bild (A)).  
 (C) das Signal ist im Nukleoplasma beobachtet.  
 Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

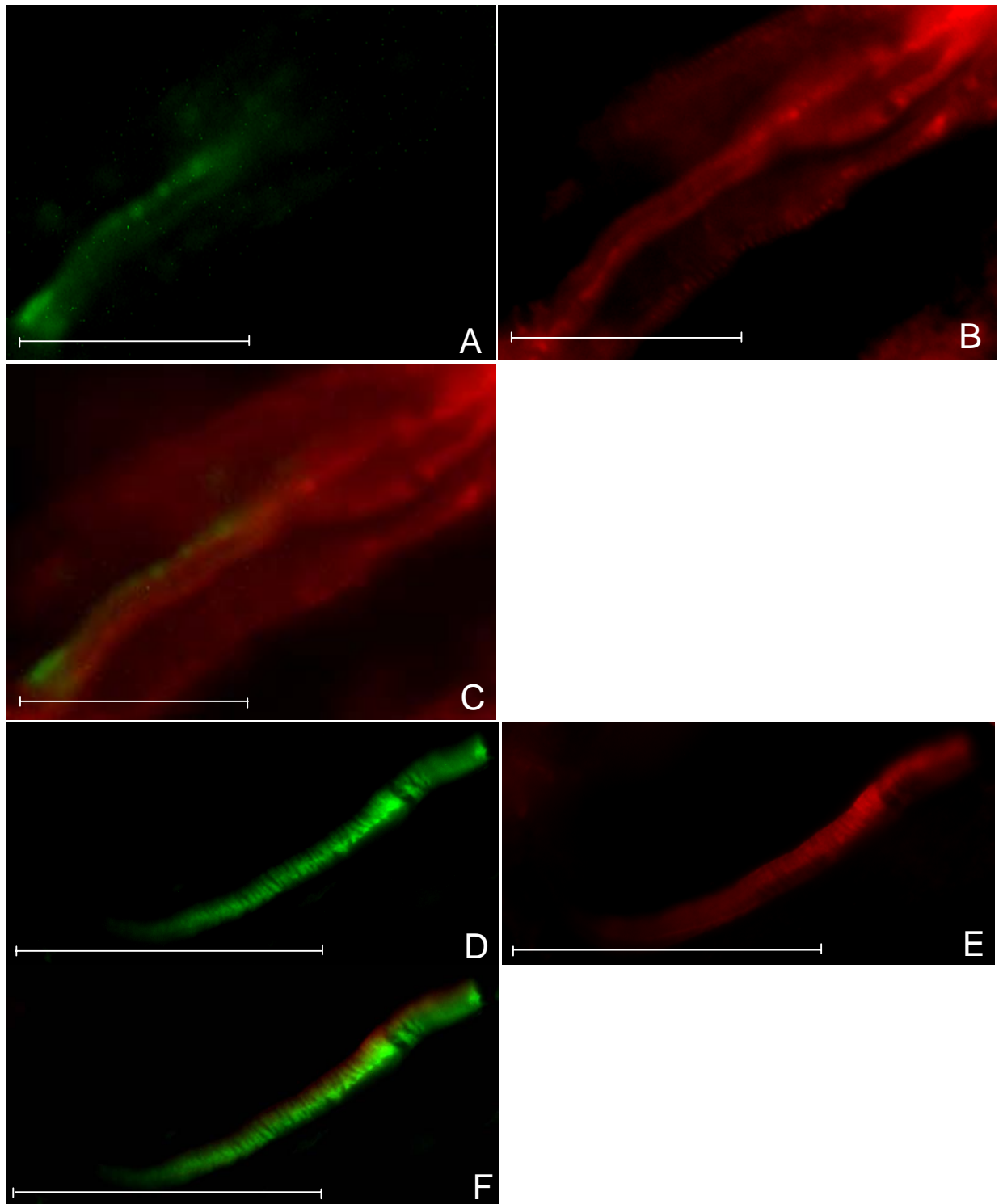


Abb. 27: Die co-Lokalisation von H1.X und Intermediärfilamentproteine (IF) der Marginalzellen durch Antikörper-Färbung.

(A) das *H1.X::GFP* Protein (grün; Die Expression vom *H1.X::GFP* ist in Tonofilamenten der Marginalzellen beobachtbar) und

(B) Immunfärbung mit IFA (rot; Antikörper IFA färben die Tonofilamenten),

(D) Immunfärbung mit Antikörper  $\alpha$ H1.X-11 ist in Tonofilamenten (grün) detektiert und

(E) Immunfärbung mit IFA Antikörper ist in Tonofilamenten (rot) beobachtbar

(C, F) Überlagerung der Bilder (A, B und D, E).

Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

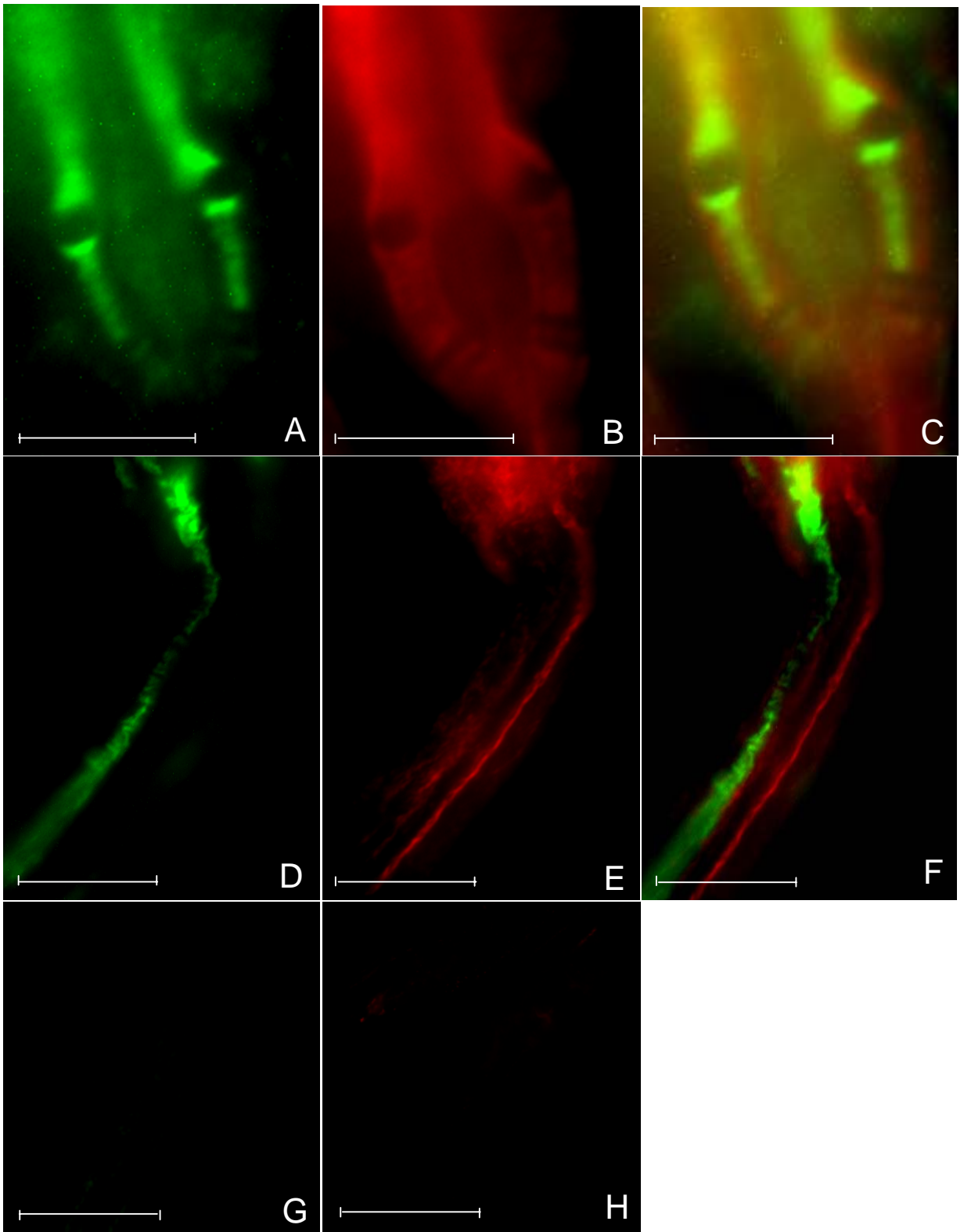


Abb. 28: Die co-Lokalisation von H1.X-, IF- und  $\alpha$ -Tubulin-Proteinen.

(A) Immunfärbung mit  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper. Das Signal (grün) in Tonofilamenten detektiert.

(B) Immunfärbung mit IFA. Das Signal (rot) ist in Tonofilamenten beobachtbar.

(C) Überlagerung der Bilder (A und B).

(D) Immunfärbung mit  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper. Das Signal (grün) in Tonofilamenten detektiert.

(E) Immunfärbung mit Antikörper anti- $\alpha$ -Tubulin. Das Signal (rot) ist in Muskelzellen des Pharynx beobachtbar.

(F) Überlagerung der Bilder (D und E). (G) Kontrolle mit dem Antikörper Cy-2,

(H) Kontrolle mit dem Antikörper Cy-3. Das H1.X Protein war nicht mit  $\alpha$ -Tubulin co-lokalisiert.

Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.



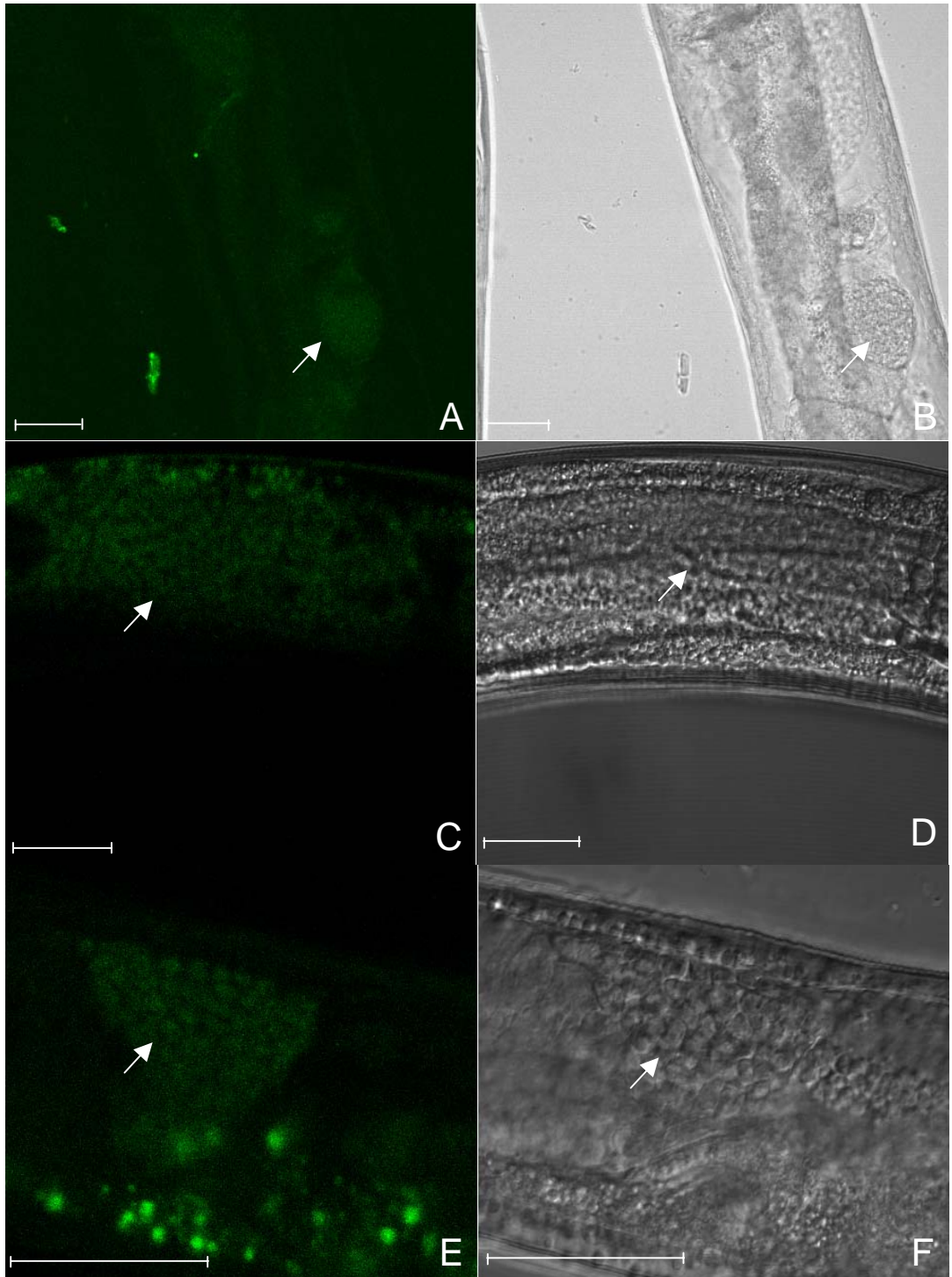


Abb. 29: Die Expression des *HLX::gfp*-Reportergens in Keimbahnzellen.  
 (A) in Spermatheka (siehe Pfeil),  
 (C) in undifferenzierten Keimbahnzellkernen (siehe Pfeil),  
 (E) in Spermatocyten (siehe Pfeil).  
 (B, D, F) die Nomarski-Durchlichtbilder.  
 Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

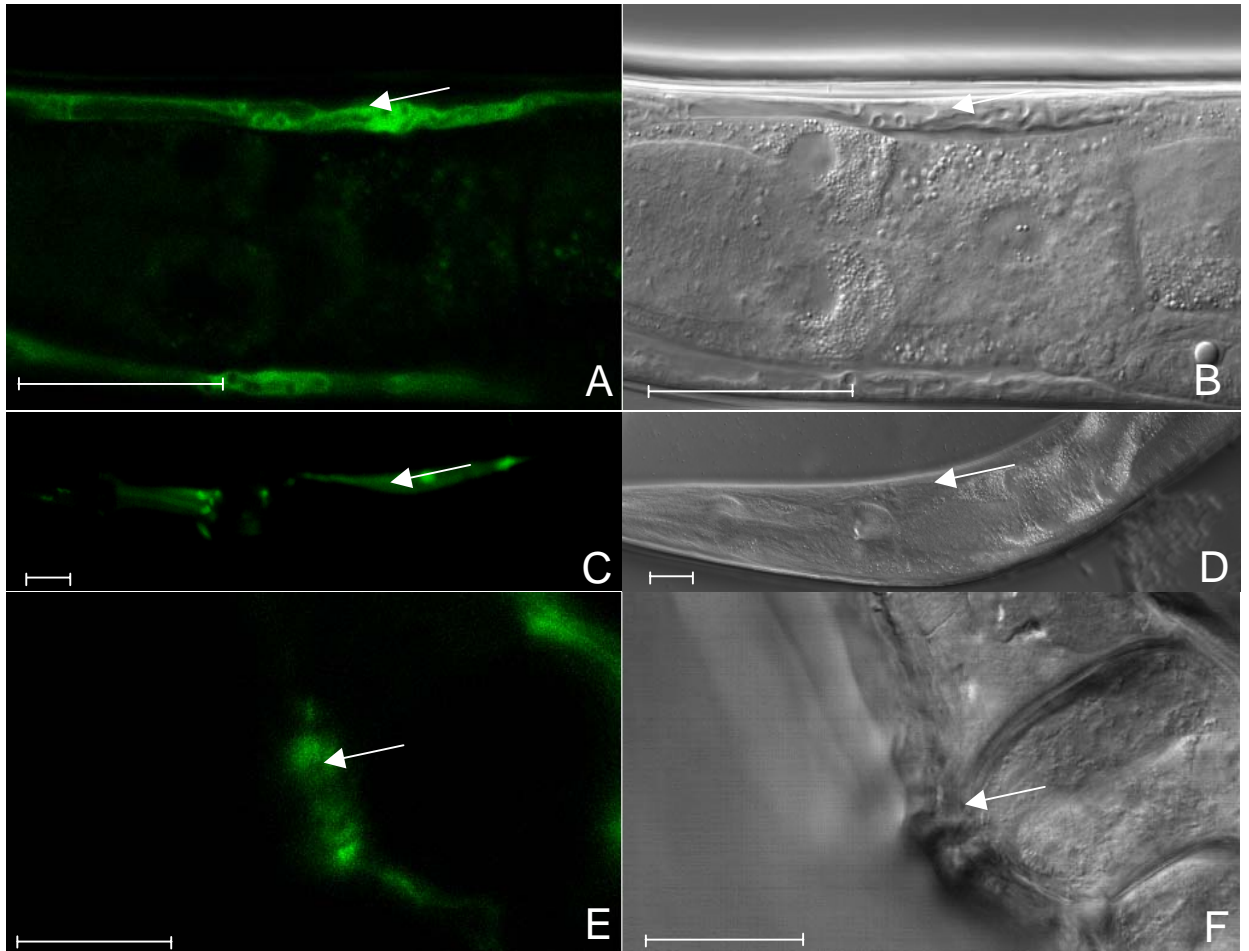


Abb. 30: Die Expression des *HLX::gfp*-Reporterstammes in diagonal laufenden Muskelzellen (A, C: siehe Pfeile) und in Vulva-Muskelzellen (E: siehe Pfeil). (B, D, F) die Nomarski-Durchlichtbilder. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

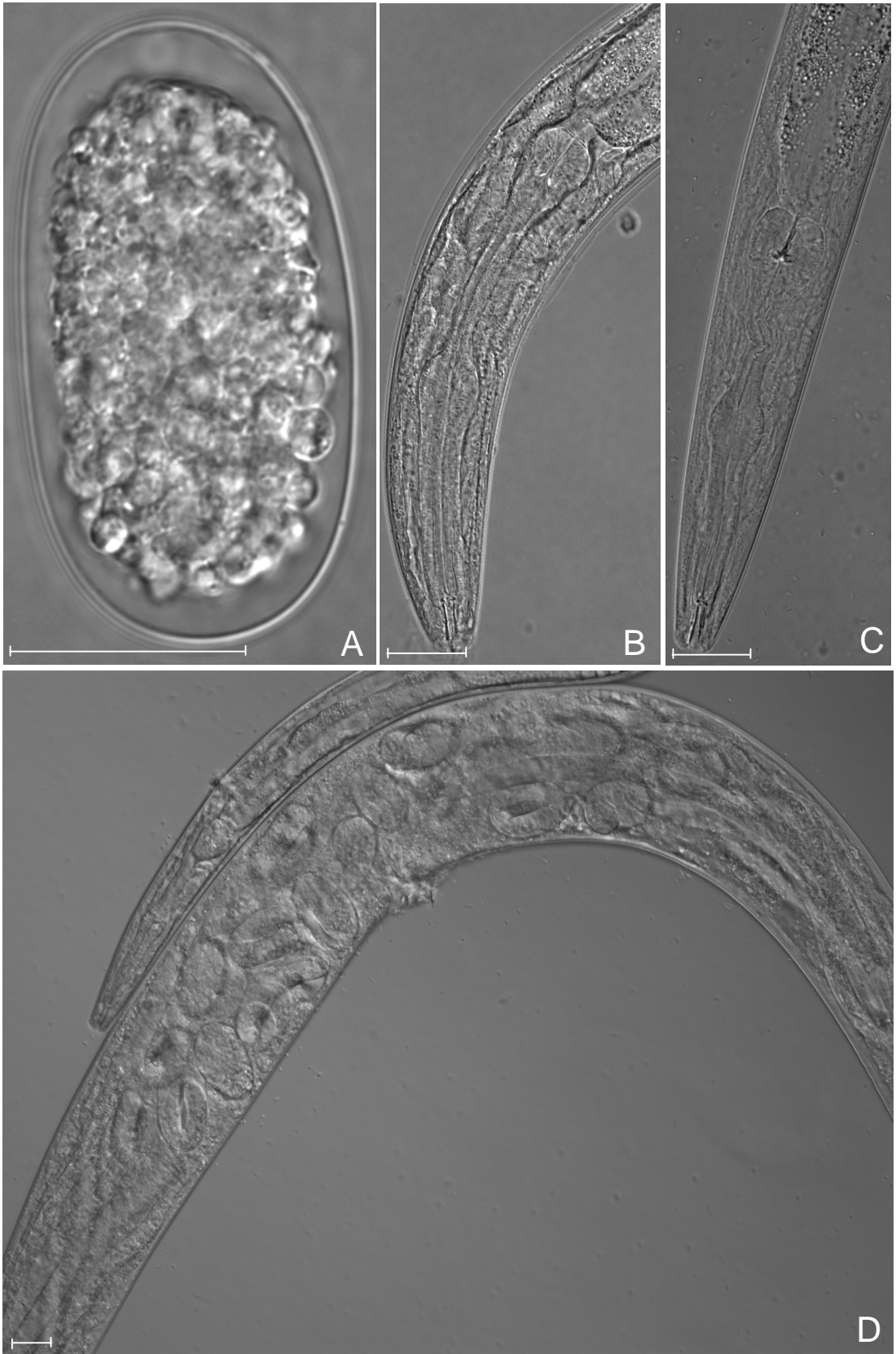


Abb. 31: Der Phenotyp nach der H1.X dsRNA Injektion.  
(A) tote Embryonen im 'midproliferation' Stadium,  
(B) der längere Pharynx im Vergleich mit dem Wildtyp (C),  
(D) 'dumpy' Hermaphroditen, die die Embryonen nicht ablegen können.  
Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

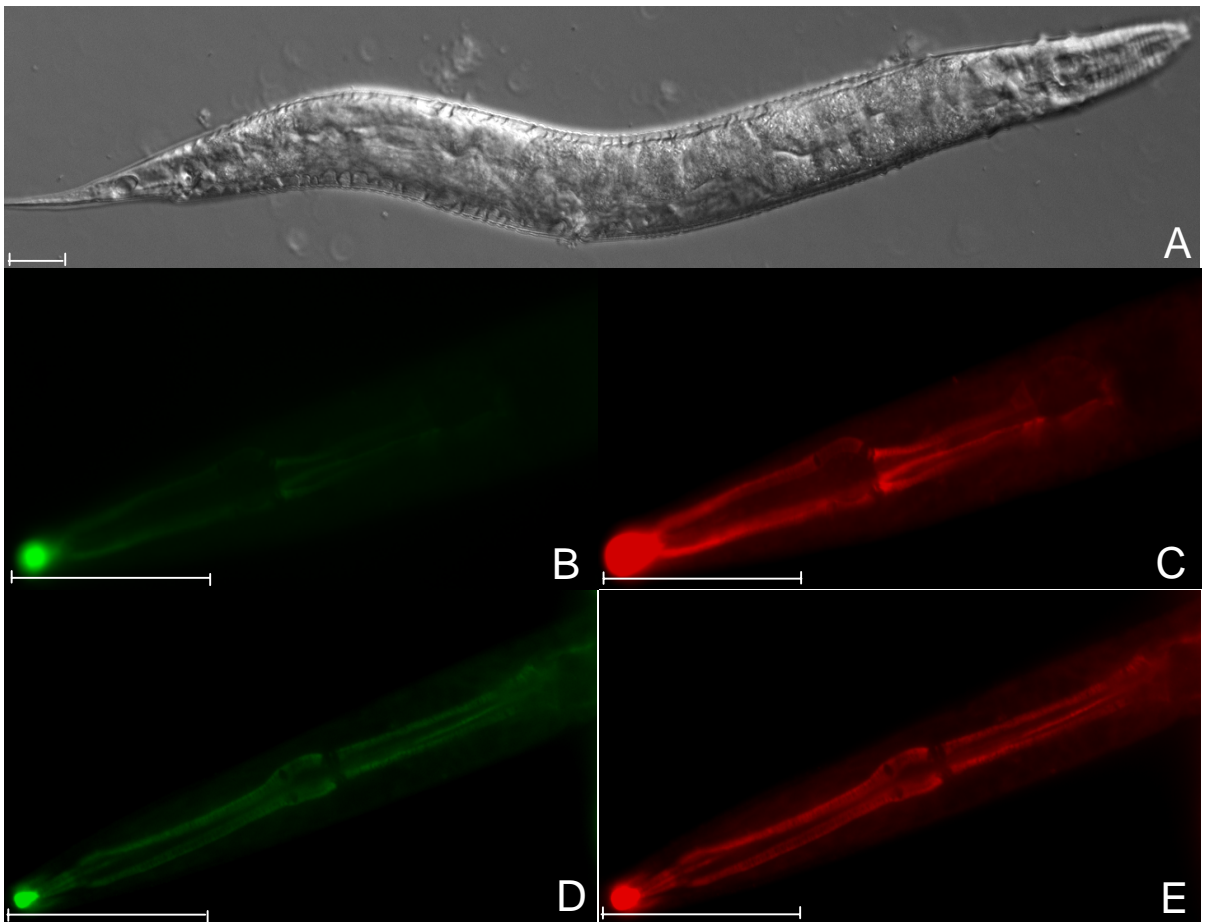


Abb. 32: Die  $\alpha$ H1.X-11 und IFA Antikörper-doppelt-Immunfärbung der Marginalzellen im Pharynx der Kontrolle und des Tieres nach der H1.X dsRNA Injektion.

- (A) 'dumpy' Phenotyp (L4 Stadium) nach der H1.X dsRNA Injektion,
- (B) die  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper Immunfärbung und
- (C) die IFA Immunfärbung des selben Tieres nach der H1.X dsRNA Injektion.
- (D) die  $\alpha$ H1.X-11 Antikörper Immunfärbung und
- (E) die IFA Immunfärbung der Kontrolle.

Das Signal des  $\alpha$ H1.X-11 Antikörpers in Marginalzellen des Tieres nach der Injektion ist deutlich reduziert im Vergleich mit der Kontrolle. Das Signal der IFA Färbung erscheint gleich.

Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.



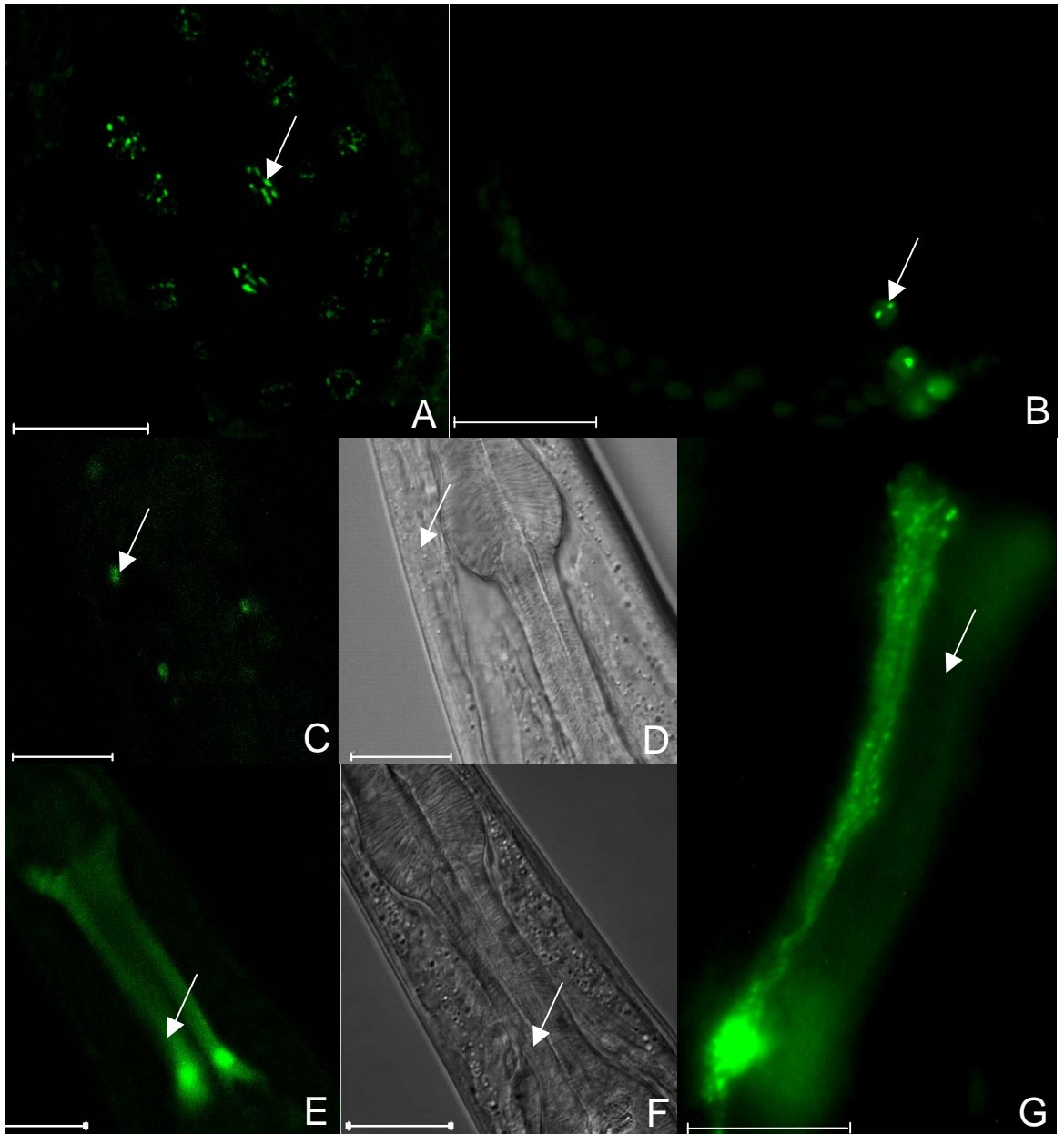


Abb. 33: Der Vergleich des *H1.1::gfp*- mit dem *H1.X::gfp*-Reportergen.  
 (A) das Linkerhiston H1.1 ist ein chromosomales Protein (das Signal entspricht den kondensierten Chromosomen, siehe Pfeil),  
 (B) das H1.X Protein wird im Nukleoplasma und Nukleoli detektiert (siehe Pfeile),  
 (C) H1.1 Histon in Zellkernen der Hypodermis (siehe Pfeil; kein Signal im Pharynx),  
 (E, G) H1.X Protein ist in den Marginalzellen des Pharynx beobachtbar,  
 (G) in Querschnitt sind sehr deutlich die Tonofilamenten in Marginalzellen als Punkten sichtbar (siehe Pfeil).  
 (D, F) die Nomarski-Durchlichtbilder.  
 Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



Abb. 34: Western-blot. Die Expression der H1.1 und H1.4 Proteine in Hefe.

Das H1.4 Protein ist mit dem Antiserum gegen H1.4 auf dem western-blot detektiert.

Das H1.1 Protein wurde nicht erkannt.

Die Zahlen 1-10 entsprechen der Expression der H1.1 cDNA oder der H1.4 cDNA in Hefevektoren pYX142, pYX142N oder pYX242.

- 1 cDNA H1.1 in pPYX142
- 2 cDNA H1.1 in pPYX142 (Ammoniumsulfat)
- 3 cDNA H1.1 in pPYX142N (glass beads)
- 4 cDNA H1.1 in pPYX142 (glass beads)
- 5 cDNA H1.1 in pPYX242 (glass beads, Zymolyase)
- 6 cDNA H1.4 in pPYX142 (glass beads, Zymolyase)
- 7 cDNA H1.4 in pPYX142 (glass beads)
- 8 Kontrolle pYX142
- 9 Kontrolle pYX142N
- 10 Marker Promega mid-range-weight

In Klammern sind die Versuche mit verschiedenen Protein-Isolationsmethoden angegeben.

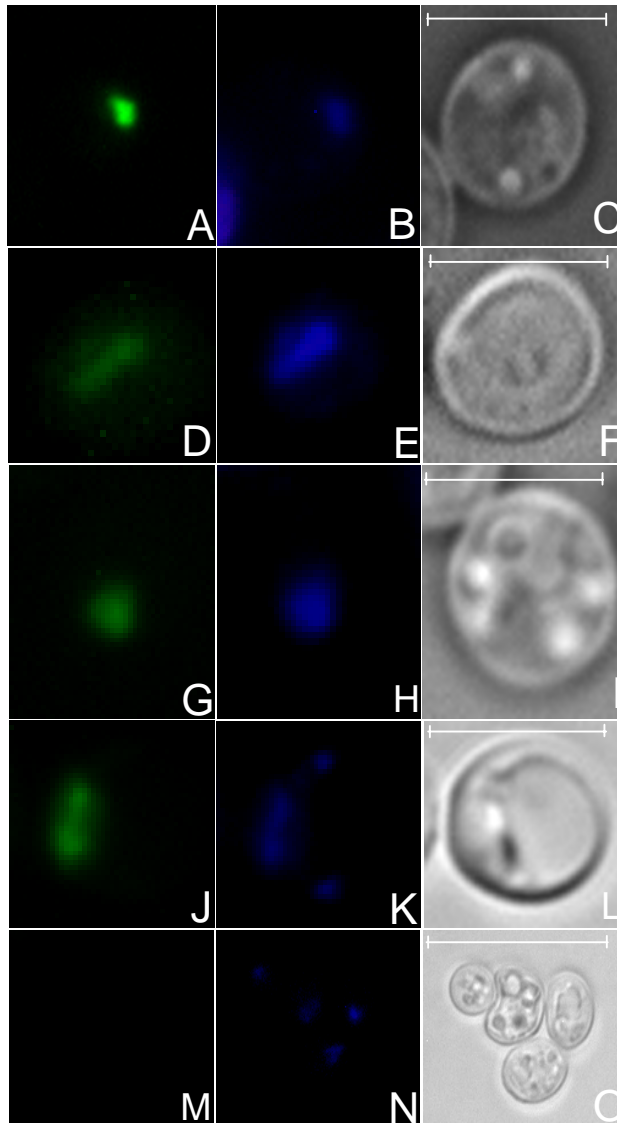


Abb. 35: Die  $\alpha$ H1 Antikörper-Färbung der Hefen. Die linke Spalte zeigt das Signal des Antikörpers, die mittlere Spalte zeigt die DNA-Färbung mit Hoechst, und die rechte Spalte zeigt das Durchlichtbild der Hefen. (A) H1.1 in pYX142, (D) H1.1 in pYX242, (G) H1.4 in pYX142, (J) H1.4 in pYX242. Der Balken entspricht 3  $\mu$ m. (M) H1.1 in pYX142-Kontrolle (die Färbung mit dem Antikörper Cy-2). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m. Das Signal der Zellkerne entspricht der DNA-Färbung mit Hoechst.

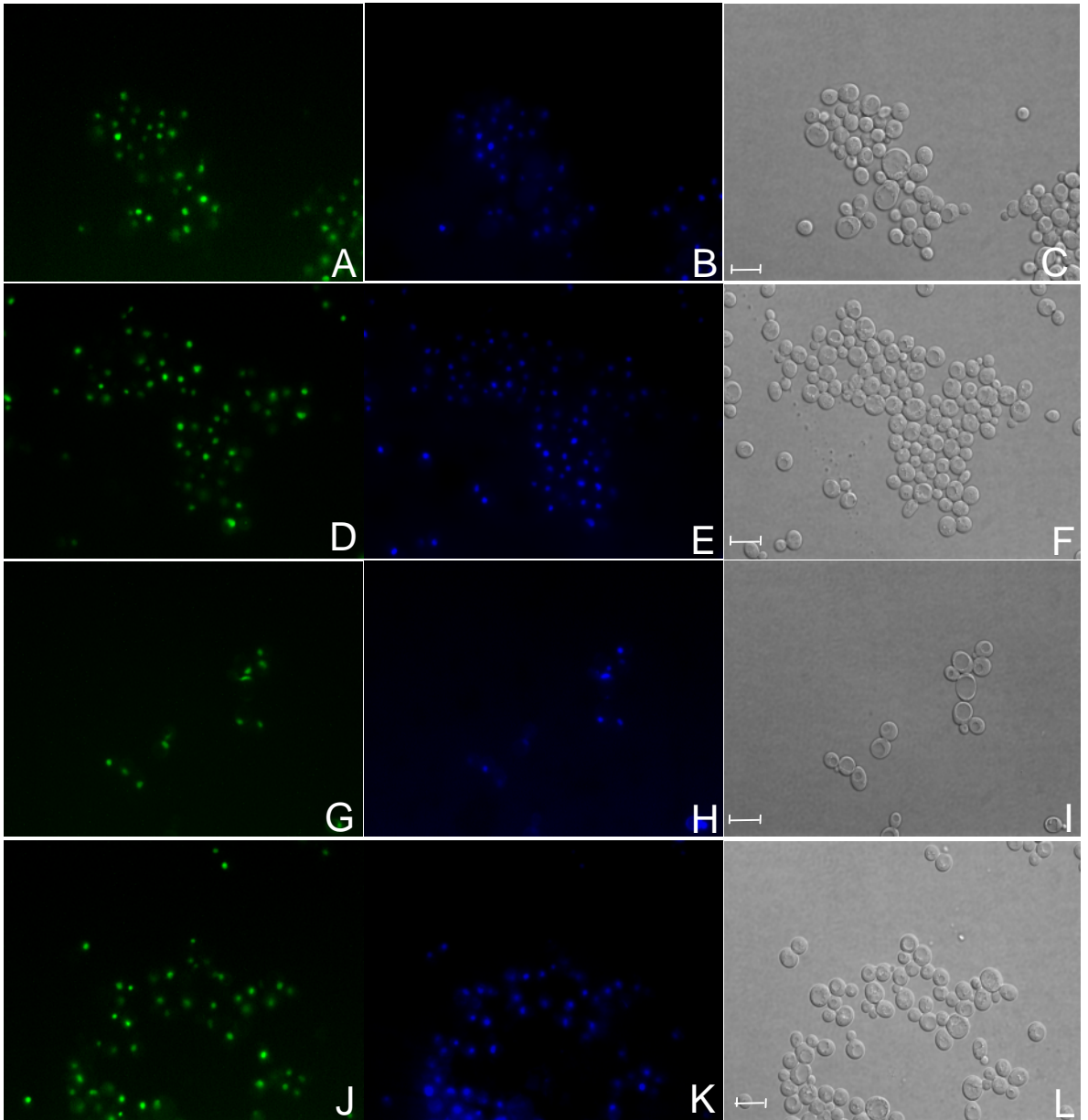


Abb. 36: Die *HI.1::gfp* und *HI.4::gfp*-Reportergene in dem Hefe-Stamm UCC3505.

(A) *HI.1::gfp* in pYX142,

(D) *HI.1::gfp* in pYX242,

(G) *HI.4::gfp* in pYX142,

(J) *HI.4::gfp* in pYX242;

(B, E, H, K) die DNA-Färbung mit Hoechst,

(C, F, I, L) die Nomarski-Durchlichtbilder.

Der Balken entspricht 1 µm.



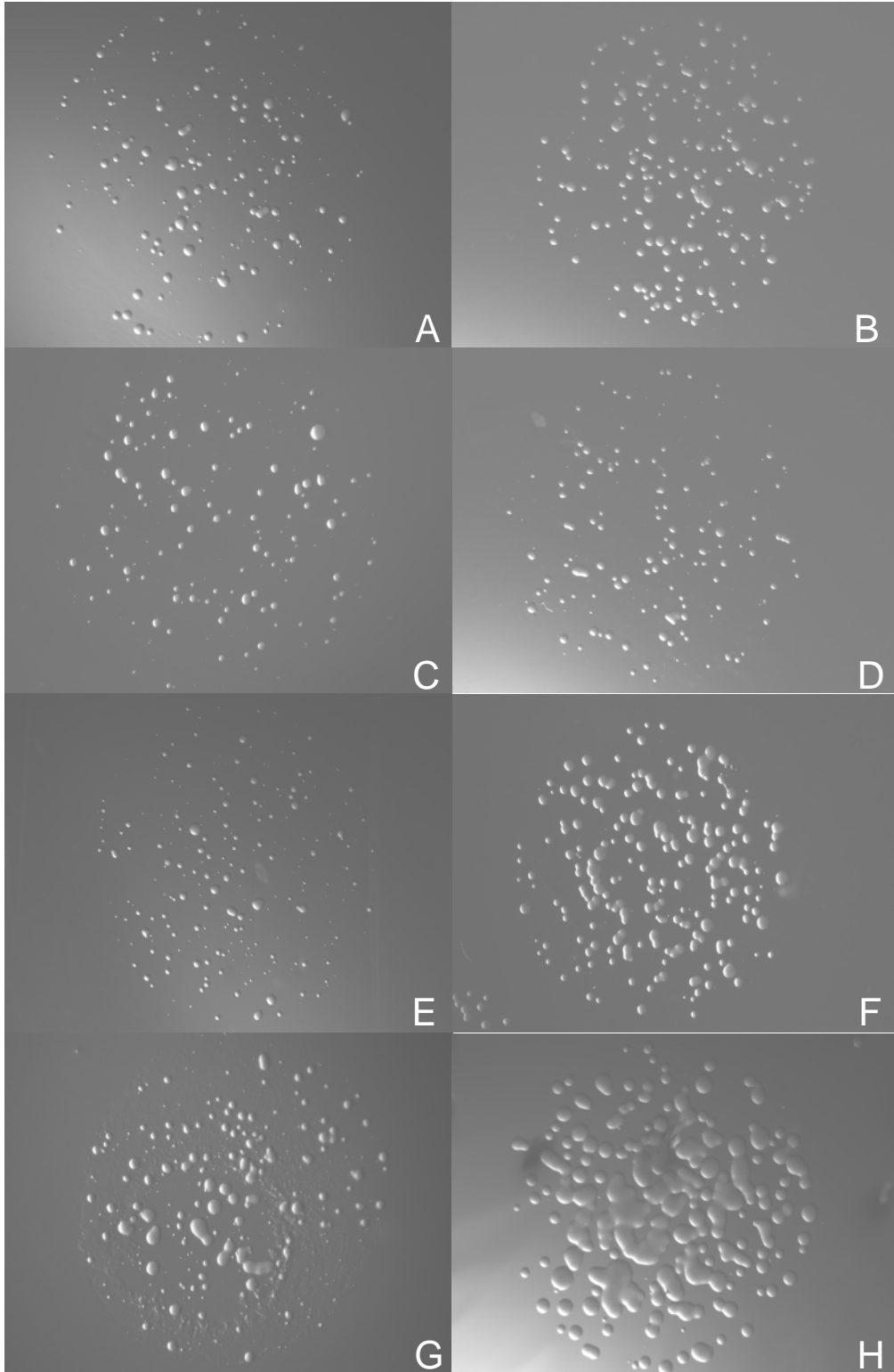


Abb. 37: Die Wachstum der *H1.1::gfp* und *H1.4::gfp*-Expressionsklone auf den FOA-Platten (links) und auf den SC-Leu Platten (rechts).

(A, B) *H1.1::gfp* in *pYX142*, (C, D) *H1.1::gfp* in *pYX242*, (E, F) *H1.4::gfp* in *pYX142*, (G, H) *H1.4::gfp* in *pYX242*.

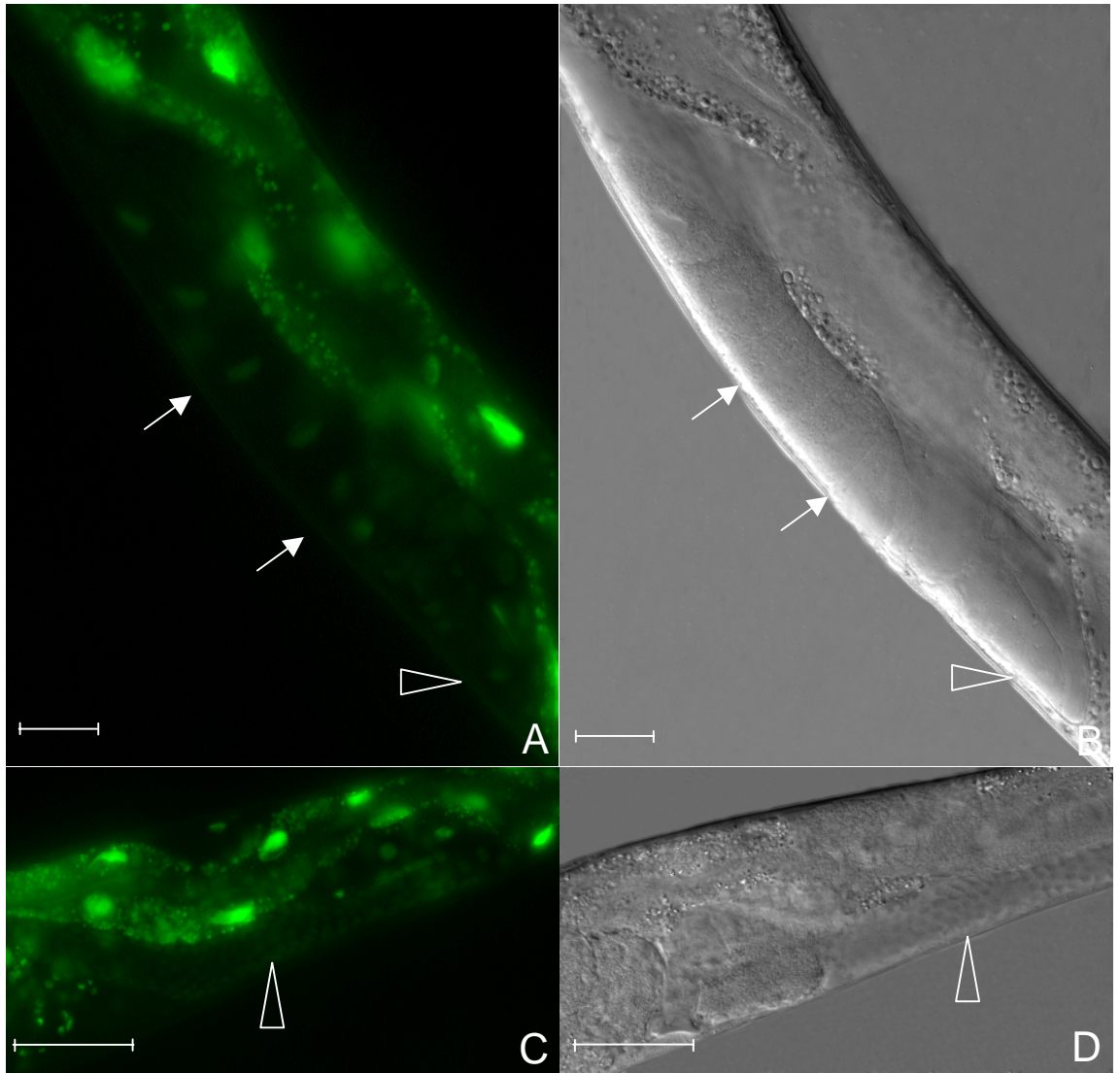


Abb. 38: Das GFP-Signal in Gonaden des *let-858::gfp* Reporterstammes nach der Sir2.1 dsRNA Injektion. (A, C) das Signal wurde in Oocyten (siehe Pfeile) und undifferenzierten Keimbahnzellkernen (Dreiecke) beobachtet. (B, D) die Nomarski-Durchlichtbilder. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

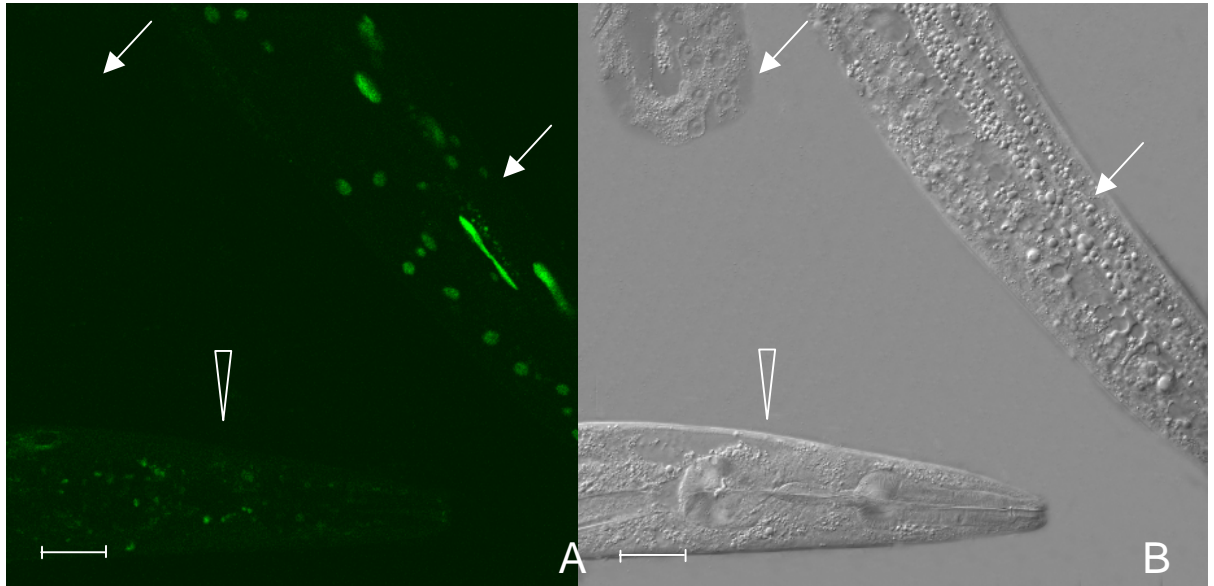


Abb. 39: Das Signal des *let-858::gfp* Reporterstammes nach der Trichostatin Injektion.  
(A) das Signal in somatischen Zellen (siehe Pfeile) ist stärker als in der Kontrolle (Dreieck).  
Auch in der Gonade des mit Trichostatin injiziertem Tieres ist kein Signal detektierbar (siehe linker Pfeil).  
(B) das Nomarski-Durchlichtbild.  
Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

# Lebenslauf

<b>Name</b>	Monika Jedrusik-Bode
<b>Geburtsdatum</b>	03. Februar 1974
<b>Geburtsort</b>	Sosnowiec (POLEN)
<b>Staatsangehörigkeit</b>	polnisch
<b>Schule</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 1980-1989 Grundschule (Sosnowiec)</li><li>- 1989-1993 II. Allgemeinbildende Oberschule (Emilia Plater in Sosnowiec)</li><li>- Mai 1993 Abitur</li></ul>
<b>Studium</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Oktober 1993 Beginn des Biologiestudiums an der Jagiellonen-Universität in Krakau</li><li>- Oktober 1995 Vordiplom</li><li>- Vom Oktober 1995 bis Januar 1997 Mitarbeit am Zoologischen Institut – Genetik bei Prof. Dr. J. Styrna (Jagiellonen-Universität in Krakau)</li><li>- 01.02.1997-31.07.1997 Erasmus-Stipendium im III. Zoologischen Institut – Entwicklungsbiologie bei Prof. Dr. U. Grossbach (Georg-August-Universität Göttingen)</li><li>- seit 01.08.1997 Mitarbeit am III. Zoologischen Institut – Entwicklungsbiologie bei Prof. Dr. U. Grossbach (Georg-August-Universität Göttingen)</li><li>- 15. 01. 1998 Diplom, angefertigt im Zoologischen Institut – Genetik bei Prof. Dr. J. Styrna (Jagiellonen-Universität in Krakau)</li><li>- Promotion ab Februar 1998 im III. Zoologischen Institut – Entwicklungsbiologie in der Arbeitsgruppe Dr. E. Schulze (Georg-August-Universität Göttingen)</li></ul>
<b>Heirat</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 02.03.2001 mit Thomas Bode</li></ul>

# Erratum

In Tabelle 11 auf Seite 113 sind die Angaben zum Kontrollhefestamm S35P-5A falsch.

Hier ist die korrigierte Form von Tabelle 11:

	pYX 142 in Wildtyp-S35P-5A	pYX242 in Wildtyp-S35P-5A
Leer	0	0
H1.1	0	0
H1.2	0	0
H1.3	1	0
H1.4	0	0
H1.5	0,5	1
H1.Q	0	0
H1.X	0,5	nb
H1.1::gfp	nb	nb
H1.4::gfp	nb	nb

Auf den Seiten 51, 52, 110 sind die Angabe des  $\alpha$ H1.X-11-Antikörpers falsch angegeben (60  $\mu$ g/ml sei durch 0,3  $\mu$ g/ml ersetzt).