

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	v
1 Einleitung .....	1
1.1 Chromatin .....	1
1.2 Heterochromatin .....	2
1.3 Histon-Code-Hypothese .....	3
1.4 Heterochromatin Protein 1 .....	6
1.4.1 Domänenstruktur von HP1-Proteinen .....	6
1.4.2 HP1-Varianten in höheren Eukaryonten .....	7
1.4.3 Lokalisation der HP1-Proteine in Zellkernen .....	8
1.4.4 Interaktion von HP1 mit methyliertem Histon H3 .....	9
1.4.5 Genregulation durch HP1-Proteine .....	10
1.4.6 Interaktion von HP1 mit anderen Proteinen .....	11
1.4.7 Bindung von HP1-Proteinen an Nukleinsäuren .....	13
1.4.8 Regulation von HP1-Proteinen .....	14
1.5 Kinetische Mikroskopie .....	14
1.5.1 Entwicklung des grünfluoreszierenden Proteins .....	14
1.5.2 Kinetische Mikroskopie unter Benutzung von GFP-Fusionsproteinen .....	15
1.5.3 FRAP als Methode zur Messung von Proteindynamiken .....	16
1.5.4 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie .....	20
1.5.4.1 Theoretische Grundlagen .....	20
1.5.4.2 Emissionscharakteristika von GFP-Proteinen .....	23
1.6 Ziel der Arbeit .....	24
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Material .....	25
2.1.1 Reagenzien .....	25
2.1.2 Technische Geräte .....	25
2.1.3 Software zur Bildaufnahme und -verarbeitung .....	26
2.1.4 Software zur Datenkalkulation .....	26
2.1.5 Verwendete Bakterienstämme .....	26
2.1.6 Verwendete Zell-Linien .....	26
2.1.7 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	27
2.1.7.1 Primäre Antikörper .....	27
2.1.7.2 Sekundäre Antikörper .....	28
2.1.7.3 Fluoreszenz-Farbstoffe .....	28
2.1.8 Ausgangsplasmide .....	28
2.1.9 Klionierte Plasmide .....	29
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	29
2.2.1 Polymerasekettenreaktion .....	29

2.2.2 Anzucht von <i>E. coli</i> .....	30
2.2.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
2.2.4 Flachbettgelelektrophorese .....	30
2.2.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	31
2.2.6 Restriktion .....	31
2.2.7 Ligation .....	31
2.2.8 Isolierung hochreiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	31
2.2.9 Klonierung der EGFP- und GST-Fusionsvektoren.....	31
2.3 Zellbiologische Methoden .....	32
2.3.1 Anzucht von eukaryontischen Zellen .....	32
2.3.2 Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	32
2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz.....	33
2.3.4 Nukleäre Fraktionierung und Immunpräzipitation .....	33
2.4 Biochemische Methoden .....	34
2.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	34
2.4.2 Coomassie-Färbung.....	35
2.4.3 Western Blot.....	35
2.4.4 Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine.....	35
2.4.5 Gelretardations-Analyse (Gelshift, Electro mobility shift assay, EMSA) .....	36
2.5 Mikroskopische Methoden .....	37
2.5.1 Bildaufnahme und -verarbeitung .....	37
2.5.2 Durchführung der FRAP-Messungen .....	37
2.5.3 Durchführung der FCS-Messungen .....	39
2.5.3.1 Kalibrierung des Messaufbaus.....	39
2.5.3.2 Durchführung der Lebendzellmessungen .....	40
2.5.3.3 Auswertung der Messkurven .....	40
3 Ergebnisse .....	43
3.1 Charakterisierung der GFP-Fusionsproteine .....	43
3.1.1 Klonierung von GFP-HP1-Proteinen.....	43
3.1.2 Expression von GFP-HP1-Proteinen in HEp-2-Zellen .....	44
3.1.3 Subnukleäre Lokalisation von endogenen und GFP-HP1-Proteinen in HEp-2-Zellen.....	45
3.1.4 Charakterisierung der Variante HP1 $\gamma$ C59R.....	47
3.1.5 Expression von GFP-HP1 in stabil exprimierenden HEp-2-Zellen .....	50
3.2 Biochemische Charakterisierung der GFP-HP1-Proteine.....	51
3.2.1 Assoziation von GFP-HP1-Proteinen mit Chromatin <i>in vivo</i> .....	51
3.2.2 Interaktion von GFP-HP1-Proteinen mit Lysin 9-methyliertem Histon H3 und Heterodimerbildung <i>in vivo</i> .....	55
3.3 Dynamikmessungen von GFP-HP1-Proteinen .....	56
3.3.1 Bildung von dauerhaften und positionsstabilen Heterochromatin-Domänen durch GFP-HP1-Proteine .....	57

---

3.3.2 Identifizierung von mindestens drei unterschiedlichen mobilen HP1-Populationen durch FRAP-Messungen.....	57
3.3.2.1 Kinetisches Modellieren: Zwei unterschiedlich mobile HP1-Populationen .....	60
3.3.3 FCS-Messungen von GFP-HP1 exprimierenden Zellen.....	62
3.3.4 Unterschiedliche Mobilitäten von GFP-HP1-Proteinen unter Inhibitoren-Einfluss .....	67
3.3.4.1 Mobilitäten von GFP-HP1-Proteinen nach Trichostatin A-Behandlung .....	67
3.3.4.2 Mobilitäten von GFP-HP1-Proteinen nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung.....	71
3.3.5 Dynamik von GFP-HP1-Proteinen während der Mitose .....	75
3.3.6 Mobilität von HP1 $\gamma$ in PML-Kernkörperchen .....	77
4 Diskussion .....	80
4.1 Mobile HP1-Populationen .....	81
4.2 Langsame HP1-Multiproteinkomplexe .....	83
4.3 Mobil oder immobil: Unterschiedliche Mechanismen der Heterochromatin-Bildung .....	84
4.4 Mobile HP1-Fraktionen während der Mitose .....	86
4.5 HP1-Mobilität bei Dekondensation des Heterochromatins .....	87
4.6 FCS und FRAP: Zwei leistungsstarke Techniken in Kombination .....	88
5 Literaturverzeichnis .....	89
6 Anhang .....	98
6.1 Verzeichnis der Abbildungen .....	98
6.2 Verzeichnis der Tabellen.....	99
6.3 Abkürzungsverzeichnis .....	99
Danksagung .....	101
Lebenslauf.....	103
Veröffentlichungen.....	104
Selbstständigkeitserklärung.....	105