

Heterochromatin und „Gene silencing“

Sandro Lein, Gunter Reuter

Institut für Genetik, Biologicum
Martin-Luther-Universität
Halle/Saale

Zusammenfassung

*Gensilencing durch Heterochromatisierung stellt ein wesentliches Prinzip der Genregulation bei Eukaryoten dar. Dabei spielen postranslationale Modifizierungen an den N-terminalen Regionen der Histone neben der DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle bei der Etablierung heterochromatischer Chromatindomänen. Diese Prozesse sind jedoch zunächst an eine Entfernung bereits vorhandener euchromatischer Histonmodifizierungen geknüpft. Positioneffekt-Variation (PEV) ist ein genetisches Testsystem bei *Drosophila melanogaster*, welches die Identifizierung von Faktoren ermöglicht, die Heterochromatisierung und Gensilencing kontrollieren. Die Histonmethyltransferase (HMTase) SU(VAR)3-9 methyliert Lysin 9 im Histon H3 und hat eine zentrale, evolutionär konservierte Schlüssel-funktion bei der Etablierung von heterochromatischem „gene silencing“. Trimethylierung von Lysin 20 im Histon H4 wird durch SUV4-20 vermittelt und stellt ebenfalls eine heterochromatische Modifizierung dar. Neue Untersuchungen zeigen darüberhinaus, dass Veränderungen in Histonmodifikationen auch in Krebszellen auftreten welche die Bedeutung epigenetischer Prozesse bei der Krebsentstehung veranschaulichen.*

Schlüsselwörter

Histonmethyltransferase, postranslationale Modifizierung, Positionseffekt-Variation (PEV), Heterochromatisierung, Gensilencing

Abstract

*Gene silencing by heterochromatization represents a basic mechanism of gene regulation. Postranslational modifications at the N-termini of core histones play beside DNA methylation a crucial role in differentiation of heterochromatichromosomal domains. The removal of euchromatic histone modifications precedes assembly of heterochromatichromosomal structures. Position-effect variegation (PEV) represents a genetic test system in *Drosophila melanogaster* which allows identification of factors controlling processes of heterochromatization. The histone methyltransferase (HMTase) SU(VAR)3-9 methylates histone 3 at lysine 9 and plays a central role in establishment of heterochromatichromosomal gene silencing. Trimethylation of lysine 20 in histone H4 is mediated by SUV4-20 and represents another heterochromatichromosomal histone modification mark. Recent studies indicate significant changes of histone modifications in cancer cells highlighting the importance of epigenetic processes during malignant transformation.*

Keywords

histone methyltransferase, postranslational modifications, position-effect variegation (PEV), heterochromatization, gene silencing

Einleitung

Euchromatin und Heterochromatin stellen strukturell und funktionell getrennte chromosomale Domänen eukaryotischer Organismen dar. Euchromatin enthält aktiv transkribierte Gene und liegt weitgehend dekondensiert in der Interphase vor. Im Gegensatz dazu bleiben heterochromatische Regionen während des gesamten Zellzyklus kondensiert. Bedingt durch den hohen Kondensationsgrad sind heterochromatische Regionen zytologisch als stark anfärbbare Chromosomenregionen erkennbar. Diese werden als perizentrische Heterochromatinblöcke an den Nukleolus-Organisatorregionen und an den Telomeren der Chromosomen gefunden. Diese permanent kondensierten und transkriptionell inerten Regionen stellen das konstitutive Heterochromatin dar, enthalten nur wenige Gene und sind in der Regel aus repetitiver DNA aufgebaut. Heterochromatin ist in der Regel spät replizierend. Es spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Paarung und der regulären Segregation von Chromosomen sowie bei der Kontrolle meiotischer Rekombination.

Der Anteil an konstitutivem Heterochromatin im Genom ist bei verschiedenen Arten oft sehr unterschiedlich. Bei *Drosophila melanogaster* entfallen etwa 40% des Genoms auf konstitutives Heterochromatin, während beim Menschen der Anteil von konstitutivem Heterochromatin auf etwa 7% geschätzt wird. Innerhalb der Genome können jedoch euchromatische Bereiche eine heterochromatische Struktur annehmen, z.B. bei Männ-

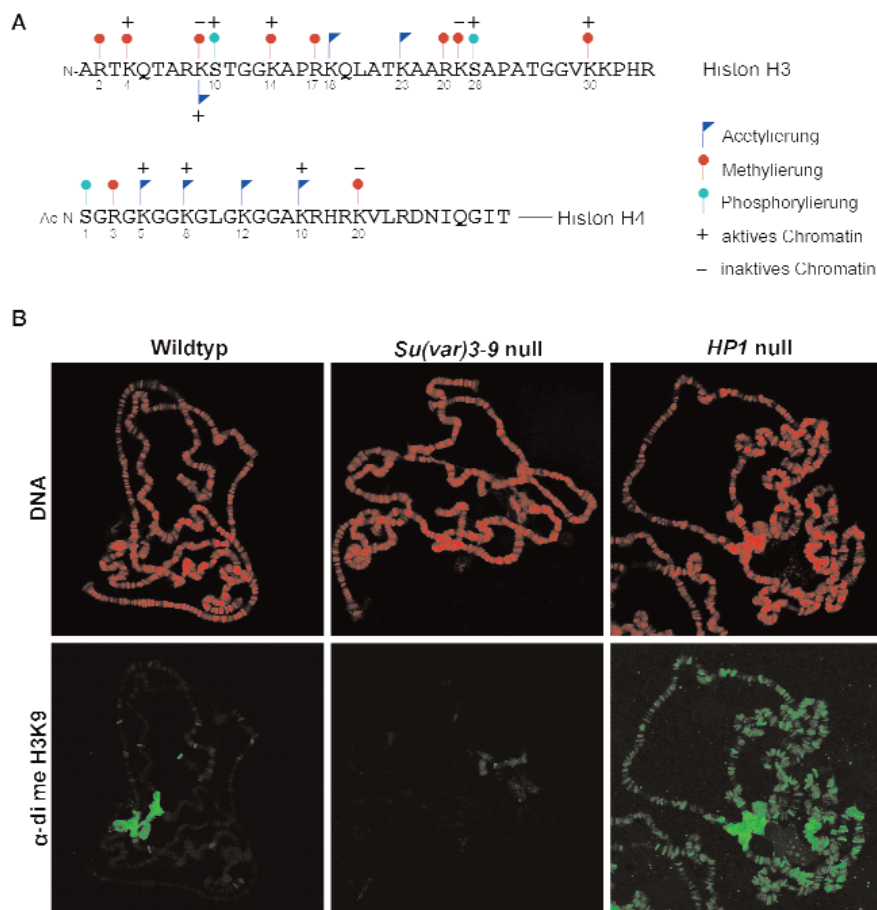


Abb 1 Posttranslationale Histon-Modifikationen

(A) Modifikationen am N-Terminus der Histone definieren den Zustand des Chromatins [Euchromatin (+), Heterochromatin (-)]. Die aufgeführten Modifikationen umfassen Acetylierung (blau), Methylierung (rot) und Phosphorylierung (hellblau).

(B) Verteilung von H3K9-Dimethylierung an polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster* im Wildtyp, in *Su(var)3-9*-Nullmutanten und in *HP1*-Nullmutanten (grün). Die DNA-Färbung erfolgte mit Propidiumjodid (rot).

Die Aufnahmen wurden dankenswerter Weise von Frau Anja Ebert zur Verfügung gestellt.

chen von Schildläusen ein gesamter Chromosomensatz oder bei Säugern ein X-Chromosom im weiblichen Geschlecht. Diese Genombereiche umfassen das fakultative Heterochromatin. Oft werden auch innerhalb des Euchromatins Bereiche gefunden, die infolge von Heterochromatisierung transkriptionell stillgelegt sind („gene silencing“). Heterochromatisierung ist ein zentraler epigenetischer Mechanismus, der zu transkriptioneller Inaktivierung von DNA-Sequenzen im Genom führt. Diese Prozesse betreffen nicht nur repetitive Sequenzen wie zum Beispiel transponible Elemente oder repetitive Transgene, sondern auch unikale Gene. Insgesamt sind mehr als 60% des Säugergenoms permanent stillgelegt.

Die molekularen epigenetischen Mechanismen, die heterochromatische Chromatindomänen definieren, sind evolutionär konserviert. Spezifische, kovalente Modifikationen in den N-terminalen Regionen der Histone stellen epigenetische Markierungen zur Differenzierung zwischen heterochromatischen und euchromatischen Domänen dar.

Allgemein ist Heterochromatin durch Hypoacetylierung der Lysinreste in den Histonen H3 und H4, durch Me-

thylierung von Lysin 9 und 27 im Histone H3 und von Lysin 20 im Histone H4 gekennzeichnet (Abb.1A). Mono-, Di- und Trimethylierung dieser Lysine erhöhen die Komplexität epigenetischer Histonmarkierungen. Bei Säugern ist H3K9-Trimethylierung im konstitutiven Heterochromatin konzentriert wohingegen H3K27-Trimethylierung im fakultativen Heterochromatin des inaktiven X-Chromosoms angereichert ist (Plath et al., 2003; Silva et al., 2003). Signifikante Zelllinien-abhängige Unterschiede in der Organisation von fakultativem Heterochromatin wurden ebenfalls beschrieben (Gilbert et al., 2003). Durch systematische Analysen im Mausgenom konnten selektive Muster von H3K9-, H3K27- und H4K20-Methylierungen für tandem-repetitive Satellitensequenzen, DNA-Transposons sowie LTR-, LINE- und SINE-Sequenzen nachgewiesen werden (Martens et al., 2005).

Im Vergleich zwischen den Organismen zeigt Histonmethylierung im Heterochromatin sowohl konservierte als auch artspezifische Komponenten. Zusätzlich wird bei den meisten Arten in heterochromatischer DNA eine Hypermethylierung von Cysteinen (5-Methylcystein) gefunden. Offensichtlich spielt dieser Prozess bei der stabilen Weitergabe (Maintenance) hete-

rochromatischer Chromatinzustände über mitotische Teilungen eine wichtige Rolle.

Enzyme wie Histon-Acetyltransferasen, Deacetylasen und Methyltransferasen sind evolutionär konservierte Proteine. Ihre Funktion wurde bei *Drosophila* und Maus zuerst aufgeklärt.

Identifizierung von Faktoren für heterochromatisches „gene silencing“ bei *Drosophila*

Beim Modellorganismus *Drosophila melanogaster* wurden nach Röntgenbestrahlung Chromosomenmutationen isoliert, die einen „variegated“ Mutantenphänotyp zeigen (Muller, 1930). Dieses als Positioneffekt-Variation (PEV) bezeichnete Phänomen eröffnete den experimentellen Zugang zur Isolation und molekularen Analyse von Genen, die heterochromatische Chromatinzustände und das „gene silencing“ kontrollieren. Bei PEV werden euchromatische Regionen, die in eine neue unmittelbare Nachbarschaft zu konstitutiven Heterochromatin verlagert wurden, variabel heterochromatisiert (Abb.2). In einem Anteil der Zellen wird zum Beispiel das *white*-Gen, das für die Ausprägung der roten Augenfarbe bei *Drosophila* verantwortlich ist, heterochromatisiert. „Gene silencing“ wird während der Entwicklung zu einem frühen Zeitpunkt klonal induziert und ist dann über die folgenden Mitosen zellerblich stabil. Durch Nukleaseverdau-Experimente konnten gezeigt werden, dass nach einer Heterochromatisierung euchromatischer Regionen signifikante

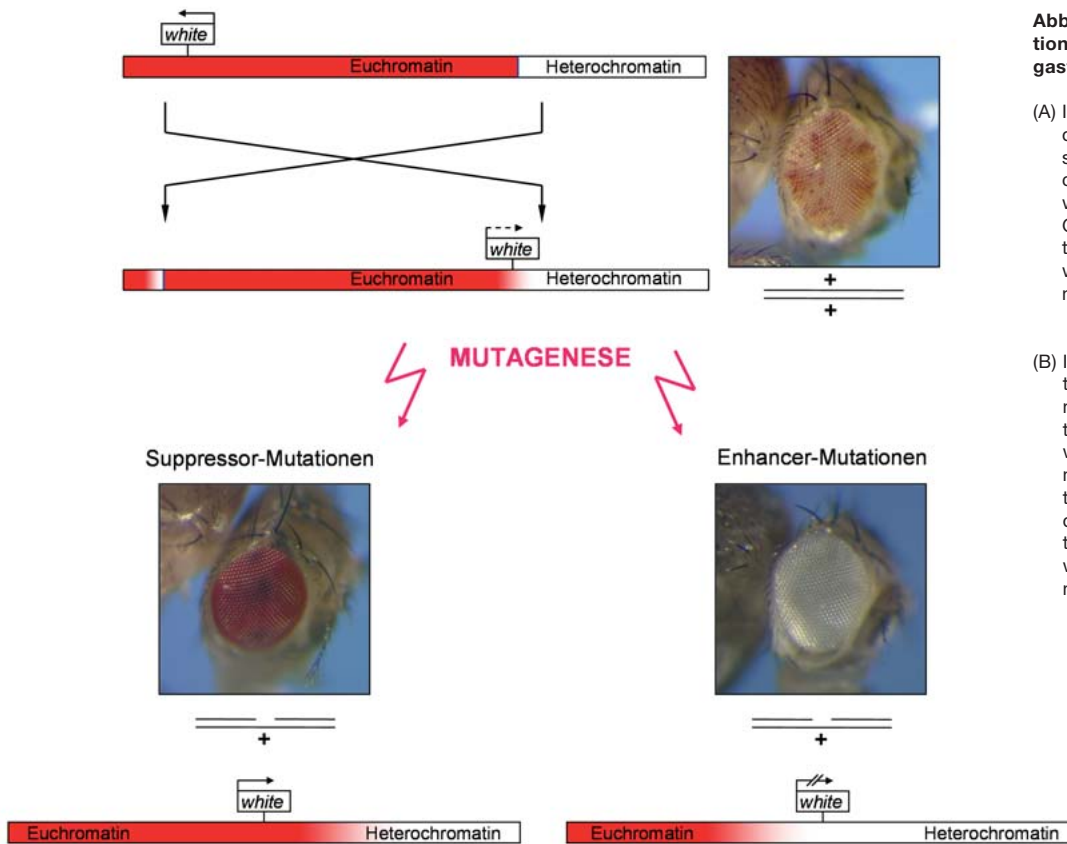


Abb 2 Positionseffekt-Variation (PEV) in *Drosophila melanogaster*

(A) Im Rearrangement In(1)wm4 ist das white-Gen durch eine Inversion in die Nähe des X-Heterochromatins verlagert. Eine teilweise Inaktivierung des white-Gens ist durch einen variierten Augenphänotyp (rote und weiße Facetten) gekennzeichnet.

(B) Isolation von Suppressor-Mutationen und Enhancer-Mutationen. Durch eine *Su(var)*-Mutation wird die Inaktivierung des white-Gens durch Heterochromatisierung (roter Augenphänotyp) unterdrückt. Im Gegensatz dazu verstärken Enhancer-Mutationen die Inaktivierung des white-Gens und führen zu einem weißen Augenphänotyp.

Veränderungen in der Positionierung von Nukleosomen auftreten. Anstelle einer offenen und unregelmäßigen Positionierung wird eine periodisch reguläre Anordnung von Nukleosomen gefunden (Wallrath und Elgin, 1995). Bei *Drosophila* können heterochromatisierte euchromatische Bereiche an polytären Riesenchromosomen zytologisch nachgewiesen werden. Diese Regionen zeigen starke Anfärbbarkeit, Verlust der Banden/Interbandenstruktur und sind unterrepliziert. Für genetische Analysen ist bedeutsam, dass eine Änderung der Chromatinstruktur (Euchromatin zu Heterochromatin) phänotypisch z.B. in bunt gestalteten Augen (variegated eyes) erkennbar ist. Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit, gezielt Mutationen zu selektieren, die Heterochromatinbildung und heterochromatisches „gene silencing“ zurückdrängen [*Su(var)*-Mutationen] oder verstärken [*E(var)*-Mutationen]. Mit Hilfe dominanter *Su(var)*- und *E(var)*-Mutationen konnten erstmals Gene identifiziert werden, deren Produkte heterochromatische bzw. euchromatische Chromatinstrukturen kontrollieren. In genetischen Screens wurden mehr als 500 dominante *Su(var)* und *E(var)* Mutationen isoliert (Wustmann et al., 1989; Schotta et al., 2003). Aufgrund

der umfangreichen genetischen Analysen konnte die Zahl der identifizierten Gene auf mehr als 150 geschätzt werden. Für die Identifizierung von Genen mit Schlüsselfunktionen im heterochromatischen „gene silencing“ waren genetische Befunde zur Wirkung verschiedener Gendosen entscheidend. Zusätzliche Genkopien (Überexpression) des *Su(var)3-9*-Gens führen zum Beispiel zu einer signifikanten Verstärkung von „gene silencing“ (Wustmann et al., 1989) und mit der Klonierung des *Su(var)3-9*-Gens (Tschiersch et al., 1994) konnte erstmals eine Schlüsselfunktion von heterochromatischem „gene silencing“ bei *Drosophila* identifiziert werden.

Eine sequenzielle molekulare Reaktionsfolge führt zur Bildung von Heterochromatin

Das SU(VAR)3-9-Protein gehört zur Gruppe von Chromatinproteinen, die eine SET-Domäne besitzen (Jenuwein et al., 1998). SU(VAR)3-9 ist ein evolutionär konserviertes Protein und Orthologe wurden bei *Schizosaccharomyces pombe* mit Clr4p (Ekwall und Ruusala, 1994; Ivanova et al., 1998), bei Säugern mit SUVH39H1 und SUVH39H1 (Aagaard et al., 1999; O’Carroll et al., 2000), bei *Neurospora crassa* mit DIM5 (Tamaru und Sel-

ker, 2001) und bei der *Arabidopsis thaliana* mit der SUVH-Proteinfamilie (Baumbusch et al., 2001; Jackson et al., 2002) identifiziert. Alle diese Proteine sind Heterochromatin-assoziiert (Melcher et al., 2000; Nakayama et al., 2001; Schotta et al., 2002; Naumann et al., 2005). SU(VAR)3-9-Proteine sind Histonmethyltransferasen (HMTasen), die spezifisch Lysin 9 von Histon H3 methylieren (Rea et al., 2000; Schotta et al., 2002; Jackson et al., 2002). Bei *Drosophila* ist SU(VAR)3-9 die wesentliche, aber nicht die einzige H3K9-HMTase. Sie bindet an alle heterochromatischen Regionen, kontrolliert aber nur im perizentrischen Heterochromatin H3K9-Methylierung (Abb. 1B). Für die Bindung an heterochromatische Sequenzen sind sowohl die SET-Domäne als auch die Chromodomäne von SU(VAR)3-9 essentiell. Die Kontrolle der Bindung an heterochromatische Sequenzen ist noch nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass bestimmte Zinkfingerproteine wie SU(VAR)3-7 (Delattre et al., 2000) und RNAi-Mechanismen (Maison et al., 2002; Pal-Bhadra et al. 2004) in diese Prozesse involviert sind. Bei *Drosophila* führt SU(VAR)3-9 zu Dimethylierung von H3K9 im Heterochromatin (Ebert et al., 2004). An diese Methylierungs-

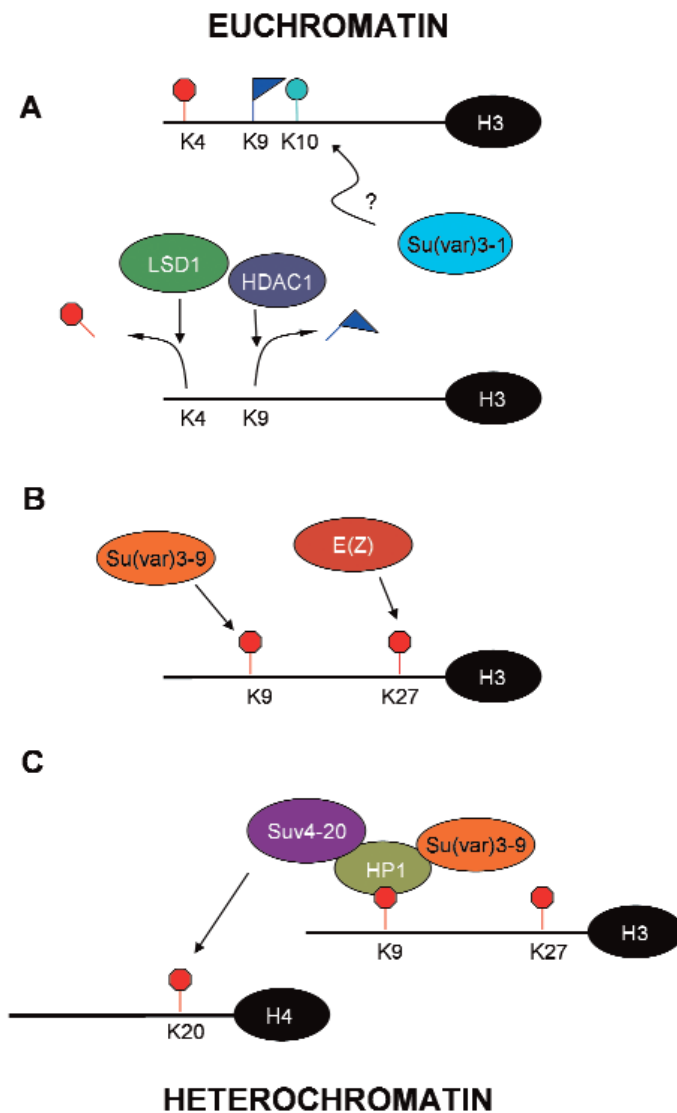


Abb 3 Molekulare Reaktionsfolge zur Etablierung von Heterochromatin

- (A) Histonmodifizierungen, die den aktiven Chromatinzustand definieren, werden durch LSD1 (H3K4-Methylierung) und HDAC1 (H3K9-Acetylierung) entfernt.
- (B) Die Methylierung von H3K9 wird durch SU(VAR)3-9 vermittelt.
- (C) HP1 bindet an methyliertes H3K9 und rekrutiert SUV4-20. SUV4-20 methyliert Lysin 20 von Histon H4.

markierung bindet das HP1-Protein durch seine Chromodomäne (Abb. 3 A-C). Zwischen HP1 und SU(VAR)3-9 besteht eine direkte Wechselwirkung. Das SU(VAR)3-9-Protein wird durch Interaktion seines N-Terminus mit der HP1-Chromoshadow-Domäne im Heterochromatin gehalten (Schotta et al., 2002). Fehlt HP1, bindet SU(VAR)3-9 an alle Chromosomenregionen und führt infolge von ektopischer Heterochromatisierung und „gene silencing“ im gesamten Genom zu Letalität (Abb. 1B). Mit dem HP1-Protein interagiert auch die SUV4-20 HMTase, die für Trimethylierung von Lysin 20 im Histone H4 verantwortlich ist (Schotta et al., 2004). Mutationen für SUV4-20 manifestieren einen dominanten *Su(var)*-Effekt und unterdrücken heterochromatisches „gene silencing“. H4K20-Trimethylierung ist somit ebenfalls essentiell für „gene silencing“. Eine weitere Histonmodifizierung im Heterochromatin von *Drosophila* stellt die Mono-, Di- und Trimethylierung von H3K27 dar. Diese

Modifizierung wird von der HMTase Enhancer of Zeste [E(Z)] katalysiert. Die H3K27-Methylierung erfolgt unabhängig vom SU(VAR)3-9/HP1/SUV4-20 Reaktionsweg und besitzt offensichtlich nur eine begrenzte Rolle bei heterochromatischem „gene silencing“. Mutationen für *E(z)* manifestieren nur einen schwachen *Su(var)*-Effekt bei PEV. Eine Überexpression von E(Z) führt jedoch zu einer signifikanten Verstärkung von „gene silencing“ (Laible et al., 1997). H3K27-Methylierung besitzt jedoch eine zentrale Rolle beim Polycomb-abhängigen „gene silencing“ (Ringrose und Paro, 2004).

Die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin

Im Prozess des „gene silencing“ wird die Organisation euchromatischer Chromatindomänen grundlegend verändert. Dies ist auch mit einer Änderung der Histonmarkierungen verbunden. Euchromatische Markierungen bestehen in einer Hyperacetylierung von Lysinen in Core-Histonen und ei-

ner Methylierung der Lysine 4, 36 und 79 im Histon H3. Im Gegensatz dazu sind im Heterochromatin Core-Histone deacetyliert und die Lysine 9 und 27 in H3 sowie Lysin 20 in H4 methyliert (Abb.1A). Deacetylierung von Core-Histonen ist somit eine essentielle Voraussetzung für die Etablierung heterochromatischer Zustände im Chromatin (Abb. 3). Mutationen der Histondeacetylase HDAC1 unterdrücken dominant heterochromatisches „gene silencing“ (Mottus et al., 2000). Wird SU(VAR)3-9 in Zellen mit einer HDAC1-Mutation überexprimiert, erfolgt keine Verstärkung von „gene silencing“. HDAC1-Mutationen dominieren über den Enhancereffekt einer Überexpression von SU(VAR)3-9. Durch Immunoaffinitätsreinigung konnte nachgewiesen werden, dass beide Enzyme, SU(VAR)3-9 und HDAC1, *in vivo* assoziiert vorliegen (Czermin et al., 2001; Nakayama et al., 2001). Eine Deacetylierung von Lysin 9 in Histon H3 ist somit eine entscheidende Voraussetzung für die nachfolgende SU(VAR)3-9-abhängige H3K9-Methylierung. Im Euchromatin ist weiterhin eine Phosphorylierung von Serin 10 in H3 typisch. Diese Reaktion wird von der Kinase JIL1 kontrolliert (Wang et al., 2001). Mutationen im *JIL1*-Gen wurden identifiziert, die ein Ausbreiten (Spreading) von Heterochromatin in benachbartes Euchromatin nahezu vollständig ausschließen (Ebert et al., 2004). Offensichtlich ist auch die Dephosphorylierung von Serin 10 in H3 eine grundlegende Voraussetzung für nachfolgende H3K9-Methylierung durch SU(VAR)3-9. Kürzlich wurde mit LSD1

eine H3K4-Demethylase identifiziert (Shi et al., 2004). Mutationen in diesem Gen schließen ebenfalls bei *Drosophila* ein SU(VAR)3-9 bedingtes „gene silencing“ aus. Es ist wahrscheinlich, dass die Demethylierung von Lysin 4 in Histon H3 ebenfalls eine Grundvoraussetzung für die Etablierung heterochromatischer Zustände darstellt. Alle diese Ergebnisse verdeutlichen, dass zwischen euchromatischen und heterochromatischen Chromatindomänen eine kontrollierte Balance besteht. Die Beseitigung euchromatischer Histonmarkierungen ist somit ein Prozess, welcher Heterochromatisierung kontrolliert und begrenzt.

DNA-Methylierung und Heterochromatin

Heterochromatische Histonmethylierung und DNA-Hypermethylierung stehen in einem unmittelbaren Zusammenhang. Mutationen, die entweder H3K9- oder DNA-Methylierung ausschließen, ermöglichen es, den kausalen Zusammenhang zwischen beiden Modifizierungen zu untersuchen. Gegenwärtige Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl DNA-Methylierung von H3K9-Methylierung abhängt aber auch DNA-Methylierung die heterochromatische H3K9-Methylierung bedingen kann. Bei Säugern wurden SUV39H1- und SUV39H2-Doppelnullgenotypen analysiert. Hier führt ein Verlust der H3K9-HMTasen zu DNA-Hypomethylierung (Lehnertz et al., 2003), was dafür spricht, dass H3K9-Methylierung die DNA-Methylierung im Heterochromatin kontrolliert. Bei Pflanzen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass H3K9-Methylierung im Heterochromatin von DNA-Methylierung abhängt (Johnson et al., 2002; Tariq et al., 2003; Naumann et al., 2005).

Methylierung von CpG-Motiven und globale Hypomethylierung im Genom sind spezifische epigenetische Eigenschaften von Krebszellen (Goelz et al., 1985; Herman und Baylin, 2003). Analysen der Modifizierungen im Histon H4 von Krebszellen konnten zeigen, dass DNA-Hypomethylierung in repetitiven Sequenzen mit einer signifikanten Reduktion der H4K16-Acetylierung und H4K20-Methylierung kor-

reliert ist (Frage et al., 2005). Diese vergleichenden Analysen von Histonmodifizierungen versprechen neue Einsichten in die epigenetischen Grundlagen der Krebsentstehung.

Konservierte und artspezifische Elemente heterochromatischer Histonmodifizierung

Die Heterochromatin-spezifische Histonmethylierung wurde bei verschiedenen Organismen umfassend analysiert. Unterschiede zwischen den Organismen werden insbesondere bezüglich der verschiedenen Methylierungsgrade einzelner Lysinreste gefunden. Bei *Drosophila* wird im Heterochromatin eine Anreicherung von Mono- und Dimethyl-H3K9 gefunden. Im Unterschied zu Säugern ist Trimethyl-H3K9 nicht die dominante Markierung, sondern wird nur im Bereich der Zentromere gefunden. Weiterhin ist im *Drosophila* Heterochromatin Mono-, Di- und Trimethyl-H3K27 nachweisbar. Diese Markierung ist auch im Euchromatin vorhanden und wird ausschließlich von E(Z) kontrolliert. In *Su(var)3-9* defizienten Zellen sind diese Markierungen unverändert (Ebert et al., 2004). Weiterhin ist im *Drosophila*-Heterochromatin Trimethyl-H4 K20 angereichert (Schotta et al., 2004).

Bei der Maus wird im Gegensatz zu *Drosophila* kaum Mono- und Dimethyl-H3K9 im perizentrischen Heterochromatin gefunden. In *Suv39h*-Doppelnullzellen kommt es zu einer ektopischen Konzentrierung von Monomethyl-H3K9. Bei Säugern ist Trimethyl-H3K27 im inaktiven X-Chromosom angereichert. Im perizentrischen Heterochromatin ist Monomethyl-H3K27 jedoch nicht Di- und Trimethyl-H3K27 nachweisbar. Trimethyl-H3K27 wird nur in *Suv39h*-Doppelnullzellen im perizentrischen Heterochromatin gefunden (Peters et al., 2003). Wenn das humane SUV39H1-Protein in *Drosophila* exprimiert wird, verhält es sich perfekt wie das *Drosophila* SU(VAR)3-9-Protein (Schotta et al., 2002), katalysiert vorrangig Dimethylierung von H3K9 und ersetzt komplett das fehlende *Drosophila*-Protein (Rettung von *Su(var)3-9*-Mutanten in *Drosophila*). Es ist somit wahrscheinlich, dass HMTasen in ihrer enzymatischen Spe-

zifität durch bisher noch unbekannte (artspezifische) Faktoren reguliert werden.

Bei *Arabidopsis thaliana* sind Mono- und Dimethyl-H3K9, Mono- und Dimethyl-H3K27 und Monomethyl-H4 K20 in heterochromatischen Chromozentren angereichert. Trimethyl-H3K9, Trimethyl-H3K27 und Di- und Trimethyl-H4K20 sind im Gegensatz zu tierischen Systemen nur im Euchromatin nachweisbar (Naumann et al., 2005).

Die signifikanten Unterschiede in der Markierung heterochromatischer Chromatindomänen bei verschiedenen Organismen machen deutlich, dass es nicht nur entscheidend ist, zu verstehen, wie diese epigenetischen Markierungen etabliert werden, sondern auch die Mechanismen aufzuklären, die in der Zelle eine exakte funktionelle Interpretation dieser Markierungen gewährleisten.

Literaturliste

- Aagaard, L., Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebesorger A, Singh PB, Reuter G, Jenuwein T (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins that complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J* 18: 1923-1938.
- Baumbusch L, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R, Schultz I, Reuter G, Aalen RB (2001) The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins which can be assigned to four evolutionary conserved classes. *Nucl Acid Res* 29: 4319-4333.
- Czermin B, Schotta G, Hülsman BB, Brehm A, Becker PB, Reuter G, Imhof A (2001) Physical and functional interaction of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep* 2: 915-919.
- Delattre M, Spierer A, Tonka C-H, Spierer P (2000) The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*: Interaction between the heterochromatin-associated proteins *Su(var)3-7* and HP1. *J Cell Sci* 113: 4253-4261.
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* 18: 2973-2983.
- Ekwall K, Ruusala T (1994) Mutations in *rik1*, *cir2*, *clr3* and *clr4* genes asymmetrically derepress the silent mating-type locus in fission yeast. *Genetics* 136: 53-64.
- Frage MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chor-

- net M, Espade J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genet* 37: 391-400.
- Gilbert N, Boyle S, Sutherland H, de Las Heras J, Allan J, Jenuwein T, Bickmore WA (2003) Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *EMBO J* 22: 5540-5550.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP (1985) hypomethylation of DANN from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228: 187-190.
- Herman JG, Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042-2054.
- Ivanova AV, Bonaduce MJ, Ivanov SV, Klar AJS (1998) The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature Genet* 19: 192-195.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobson SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416: 556-560.
- Jenuwein T, Laible G, Dorn R, Reuter G (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Science* 54: 80-93.
- Johnson LM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol* 12: 1360-1367.
- Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebesorger A, Popkin D, Pillus L, Jenuwein T (1997) Mammalian homologs of Enhancer of zeste mediate position-effect variegation in *Drosophila* and restore telomeric silencing in *S. cerevisiae*. *EMBO J* 16: 3219-3232.
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 13: 1192-1200.
- Maison C, Bailly D, Peters AHFM, Quivy JP, Roche D, Taddei A, Lachner M, Jenuwein T, Almouzni G (2002) Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30: 329-334.
- Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* 24: 800-812.
- Melcher M, Schmid M, Aagaard L, Selenko P, Laible G, Jenuwein T (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation and mitotic progression. *Mol Cell Biol* 20: 3728-3741.
- Mottus R, Sobels RE, Grigliatti TA (2000) Mutational analysis of a histone deacetylase in *Drosophila melanogaster*: missense mutations suppress gene silencing associated with position effect variegation. *Genetics* 154: 657-668.
- Muller HJ, (1930) Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* 22: 299-334.
- Nakayama J, Rice JD, Stahl BD, Allis CD, Grenwal SIS (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292:110-113.
- Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, Hause G, Aurich AC, Dorn R, Jenuwein T, Reuter G. (2005) Pivotal role of At-SUVH2 in control of heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J*: 24, 1418-1429.
- O'Carroll D, Scherthan H, Peters AH, Opravil S, Haynes AR, Laible G, Rea S, Schmid M, Lebesorger A, Jerratsch M, Sattler L, Mattei MG, Denny P, Brown SD, Jenuwein T (2000) Isolation and characterization of Suvh39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 20: 9423-9433.
- Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, Elgin SC (2004) Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 303: 669-672.
- Peters AHFM, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan J, Derijck AAHA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JHA, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12: 1577-1589.
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300: 131-135.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun Z-W, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406: 593-599.
- Ringrose L, Paro R (2004) Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38: 413-443.
- Schotta G, Ebert A, Dorn R, Reuter G (2003) Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* 14: 67-75.
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* 21: 1121-1131.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 tri-methylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18: 1251-1262.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941-953.
- Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nestorova TB, Webster Z, Peters AH, Jenuwein T, Otte AP, Brockdorff N (2003) Establishment of histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* 4: 481-495.
- Tamaru H, Selker EU (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277-283.
- Tariq M, Saze H, Probst A, Lichota J, Habu Y, Paszkowski J (2003) Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8823-8827.
- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* 13:3822-3831.
- Wang Y, Zhang W, Jin Y, Johansen J, Johansen KM (2001) The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell* 105: 433-443.
- Wustmann G, Szidonya J, Taubert H, Reuter G (1989) The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 217: 520-527.

Korrespondenzadresse

Sandro Lein und Gunter Reuter
 Institut für Genetik, Biologicum
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Weinbergweg 10
 D-06120 Halle (Saale), Deutschland
 Reuter@genetik.uni-halle.de