

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekularbiologie
Vorstand: Prof. Dr. Peter Becker

**ANALYSE VON
HISTONMETHYLTRANSFERASEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Volker Thomas Friedrich Seitz
aus
München

2007

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Axel Imhof

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. K. Walli

Mitberichterstatter: PD Dr. A. Giese

Prof. Dr. M. Götz

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26 .04. 2007

FÜR MEINE ELTERN UND FÜR INGO

*Nachts war Regen gefallen, und nun wandern Wolken über den Himmel – ab und zu sprüht Nässe herab. Ich stehe unter einem Apfelbaum, der zu verblühen beginnt, und atme. [...]
Solange man noch unter einem Apfelbaum nach dem Regen atmen kann – so lange lässt es sich auch leben.*

Alexander Solschenizyn

Die *Ergebnisse* der vorliegenden Dissertation führten zu folgenden Publikationen:

Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A and Pirrotta V:

Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites

Cell, Vol 111, 185-196, October 2002

Imhof A, Seitz V:

Histon Methyltransferasen – Textmarker des Genoms?

Bioforum, Vol. 26, 212-214, 2003

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG.....	2
2.1.	Chromatin.....	2
2.1.1.	Aufbau und Struktur des Chromatins.....	3
2.1.1.1.	Das Oktamer, das Nukleosom und eine höhere Verpackungsordnung	3
2.1.1.2.	Euchromatin und Heterochromatin	6
2.2.	Die Histone.....	12
2.2.1.	Die Histonvarianten	15
2.2.2.	Posttranslationale Histonmodifikationen	17
2.2.2.1.	Acetylierung.....	18
2.2.2.2.	Deacetylierung.....	20
2.2.2.3.	Phosphorylierung.....	21
2.2.2.4.	Ubiquitynylierung.....	22
2.2.2.5.	ADP-Ribosylierung.....	22
2.3.	Die Histonmethylierung.....	23
2.3.1.	Die SET-Domäne	26
2.3.2.	Darstellung einiger Funktionen verschiedener Histonmethylierungen	29
2.4.	Gibt es einen Histon-Code?	32
2.5.	Histonmethylierung und Epigenetik	33
2.6.	Polycomb- und Trithorax-Gruppen-Proteine.....	35
2.6.1.	Enhancer of Zeste (E(z)) und der 600kDa E(z)-ESC-Komplex	39
2.6.2.	PcG-vermitteltes <i>silencing</i> durch den PRC1- und E(z)-Esc-Komplex.....	41
2.7.	PRset7 und die Histon H4 K20-Methylierung	44
2.8.	Zellidentität, Neoplasie und Histonmethylierung.....	46
2.9.	Aufgabenstellung.....	50
3.	ERGEBNISSE.....	51
3.1.	Untersuchungen zur Histonmethyltransferase E(z).....	51
3.1.1.	Klonierung und rekombinante Expression von E(z) als Inteinusionsprotein.....	51
3.1.2.	Bakteriell exprimiertes E(z) zeigt keine Histonmethyltransferaseaktivität	52
3.1.3.	Konstruktion der Mutante E(z)mut durch eine Punktmutation	53
3.1.4.	Expression von E(z)mut.....	54
3.1.5.	Vergleich der mit E(z) und mit E(z)-mut assoziierten Komplexe nach Trax-Inkubation	55
3.1.5.1.	Nachweis von spezifisch gebundenem Rpd3 in E(z)-Proteinkomplex	55
3.1.5.2.	Positiver Histondeacetylase-Versuch bestätigt den Rpd3-Antikörpernachweis.....	56
3.1.6.	Transfektion von E(z) in <i>Drosophila</i> -Sf4-Zellen.....	57
3.2.	Untersuchungen zur Histonmethyltransferase PRset7	58
3.2.1.	Expression von PRset7 als Inteinusionsprotein	59
3.2.2.	PRset7 methyliert fast ausschließlich rekombinante Nukleosomen	60
3.2.3.	PRset7 methyliert spezifisch H4 in rekombinanten Nukleosomen	62
3.2.4.	PRset7 methyliert keine aus (nativen) <i>Drosophila</i> -Oktameren rekonstituierten Nukleosomen.....	64
3.2.5.	PRset7 methyliert keine H4-N-Terminus-Peptide – auch nicht in Anwesenheit von DNA.....	67
3.2.6.	Nukleosomales H4 wird von PRset7 an Lysin 20 dimethyliert	68
3.2.7.	Aktivität von PRset7 an rekombinanten Nukleosomen mit N-terminalen Deletionen an H4	70
3.2.8.	Säulenchromatographische Aufreinigung von PRset7.....	72

3.2.8.1.	Superdex200-Aufreinigung von PRset7 (Gelfiltration)	72
3.2.8.2.	MonoQ-Aufreinigung von PRset7 (Anionenaustauscher)	73
3.2.8.3.	HMTase-Aktivitätstestung der gereinigten PRset7-Proteine	75
3.3.	Beziehung zwischen H4-Acetylierung und H4-Methylierung	76
3.3.1.	Expression der Histonacetyltransferase MOF als Inteinusionsprotein	77
3.3.1.1.	Superdex200-Aufreinigung von MOF (Gelfiltration)	77
3.3.1.2.	Aktivitätstestung von MOF an rekombinanten Nukleosomen	79
3.3.2.	Acetylierung von rekombinanten Nukleosomen mit MOF und MSL 1, 2 und 3	80
3.3.3.	Rekombinante und native Oktamere können von MOF acetyliert werden	81
3.3.4.	K20-methylierte H4-Peptide werden von MOF acetyliert	82
3.3.5.	Methylierung von H4 K16- und H4 K12-acetylierten Nukleosomen durch PRset7	83
3.3.5.1.	Herstellung von H4 K16- und H4 K12-acetylierten Oktameren	84
3.3.5.2.	Assemblierung von H4 K16- und H4 K12-acetylierten Nukleosomen	85
3.3.6.	HMTase-Versuch mit PRset7 an H4 K16- und H4 K12-acetylierten Nukleosomen	86
3.3.7.	HMTase-Versuch in Anwesenheit präacetylierter und unmodifizierter Nukleosomen	89
3.3.8.	Die Deacetylierung von H4-Peptiden ist nicht vom Methylierungsstatus abhängig	90
3.3.9.	Anti-H4-K20-dimethyl und Anti-H4-K16-acetyl an acetylierten H4-N-Terminus-Peptiden	91
3.3.9.1.	Untersuchung zur Spezifität von Anti-H4-K16-acetyl	92
3.3.9.2.	Untersuchung zur Spezifität von Anti-H4-K20-dimethyl	93
4.	DISKUSSION	94
4.1.	Interpretation der mit E(z) erzielten Ergebnisse	94
4.2.	PRset7, die H4 K20-Methylierung und die H4 Acetylierung	95
4.2.1.	Die nukleosomale Spezifität der PRset7-vermittelten H4-Methylierung	95
4.2.2.	Eine mögliche nukleosomale Erkennungsstruktur für PRset7?	96
4.2.3.	PRset7 methyliert nur teilweise rekombinante H4-N-terminal deletierte Nukleosomen	97
4.2.4.	Reduzierte enzymatische Aktivität von PRset7 an nativen Nukleosomen	98
4.2.5.	Nachweis der nukleosomalen H4 K20-Di-Methylierung durch PRset7	99
4.2.6.	Der „autoinhibitorische“ N-Terminus und die SET-Domäne von PRset7	100
4.2.7.	Gegenseitige Beeinflussung der H4-K20-Methylierung und H4-K16- (bzw. -K12-) Acetylierung?	101
4.2.8.	Eine Neubewertung der H4 K20 Methylierung	104
4.3.	Histon(de)methylierung – aktuelle Entwicklungen	107
4.3.1.	Die zentrale Rolle von E(z) und PcG-Proteinen für das <i>silencing</i>	107
4.3.2.	Die differenzierte H4 K20 Methylierung	109
4.3.3.	Die Lysin-Demethylasen	111
5.	MATERIAL UND METHODEN	115
5.1.	MATERIAL	115
5.1.1.	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	115
5.1.2.	Vektoren und Konstrukte	116
5.1.3.	Oligonukleotide	117
5.1.4.	Peptide	117
5.1.5.	Bakterienstämme	117
5.1.6.	Zelllinien	117
5.1.7.	Antikörper	117
5.1.8.	Enzyme und Kits	118
5.1.9.	Geräte	118
5.2.	Methoden	119
5.2.1.	Grundlegende molekularbiologische Methoden	119

Inhaltsverzeichnis

5.2.1.1.	PCR für Klonierungen	119
5.2.1.2.	Gelelektrophorese von Agarosegelen	120
5.2.1.3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	121
5.2.1.4.	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	121
5.2.1.5.	Ligation von DNA	121
5.2.1.6.	Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i>	121
5.2.1.7.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	122
5.2.1.8.	Transformation von <i>E. coli</i>	122
5.2.1.9.	Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab.....	123
5.2.1.10.	Restriktionsanalysen	124
5.2.1.11.	Präparation von Plasmid-DNA im Maxi- bzw. Giga-Maßstab	124
5.2.2.	Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen.....	124
5.2.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	125
5.2.4.	Proteinfärbemethoden	125
5.2.4.1.	Coomassiefärbung.....	125
5.2.4.2.	Silberfärbung (nach Blum).....	126
5.2.5.	Western Blot	126
5.2.6.	Fliegenhaltung.....	127
5.2.6.1.	Ansetzen von Larvenboxen.....	128
5.2.6.2.	Transfer der neu geschlüpften Fliegen in die Käfige	129
5.2.6.3.	Tägliches Füttern der Fliegen und Sammeln der Embryos	129
5.2.6.4.	Herstellung von Agarplatten und Hefepaste (Futter)	129
5.2.7.	Herstellung von <i>Drosophila</i> Embryo-Extrakt (“TRAX”)	130
5.2.8.	Kultur von <i>Drosophila</i> -Zellen.....	131
5.2.9.	Stabile Transfektion von <i>Drosophila</i> Zellen.....	132
5.2.10.	Affinitätsreinigung von E(z)-FLAG aus transfezierten Sf4-Zellen.....	133
5.2.11.	BL21 Expression von Proteinen mit Intein-Tag.....	133
5.2.12.	Punktmutation von E(z) zu E(z)mut	135
5.2.13.	Assemblierung von Oktameren und DNA zu Nukleosomenarrays mit der Salzdialyse.....	135
5.2.14.	Mikrokokkus-Nuklease-Verdau nach Assemblierung von Nukleosomenarrays	136
5.2.15.	HDAC-Versuch.....	137
5.2.16.	Aktivitätsversuche: HMTase- und HAT-Versuch.....	138
5.2.17.	Proteinreinigung (von PRset7 und MOF)	139
5.2.17.1.	Superdex 200	139
5.2.17.2.	Mono Q.....	139
6.	LITERATURVERZEICHNIS	140
7.	ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE	158
8.	DANKSAGUNG	160
9.	LEBENS LAUF	161

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgelegten Arbeit wurden Histonmethyltransferasen untersucht. Die beiden SET-Proteine, Enhancer of Zeste (E(z)) und PRset7 methylieren jeweils spezifische Lysine in den N-Termini der Histonmoleküle H3 bzw. H4 und wurden zu Beginn in *E. coli* exprimiert.

In Histonmethyltransferase-(HMTase)-Versuchen konnte mit E(z) keine Aktivität erzielt werden. Mit einer eingeführten Mutation des aktiven Zentrums („E(z)mut“) und mit E(z) konnte nach der Inkubation mit *Drosophila*-Kernextrakten an beiden Proteinen die Histondeacetylase Rpd3 nachgewiesen werden, die enzymatisch aktiv war. Unsere Arbeitsgruppe konnte die HMTase-Aktivität eines E(z)-Komplexes bestätigen, die von einer (nicht-mutierten) SET-Domäne abhängt (Czermin et al., 2002).

Die Untersuchungen zur Histonmethyltransferase PRset7 begannen mit Aktivitäts- und Spezifitätsversuchen an verschiedenen Substraten. Die nukleosomale Spezifität von PRset7 bestätigte sich gemäß den Ergebnissen von Fang et al. und Nishioka et al. (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b). PRset7 unterschied klar zwischen *rekombinanten* Nukleosomen (Histone rekombinant in *E.coli* exprimiert) und *nativen* Nukleosomen (Histone aus *Drosophila*-Embryos gereinigt), wobei letztere deutlich vermindert methyliert wurden. An rekombinanten, mit PRset7 methylierten Nukleosomen, konnte mit einem H4 K20-methyl-Antikörper eine H4 K20-Methylierung detektiert werden. Mit Hilfe verschiedener, rekombinanter Nukleosomen, deren H4-Moleküle N-terminal unterschiedlich lang waren, konnte die Substraterkennung bzw. -bindung von PRset7 auf maximal 9 Aminosäuren vor Lysin 20 eingegrenzt werden. Durch die Reinigung des Proteins wurde deutlich, dass kürzere Degradationsprodukte von PRset7 den wesentlichen Anteil der detektierten HMTase-Aktivität ausgemacht hatten, ohne die hohe nukleosomale Substratspezifität zu verlieren. Für die Substratherstellung weiterer *in vitro*-Versuche zur Beziehung zwischen H4-Acetylierung (K12 bzw. K16) und H4-Methylierung (K20) wurde die Histonacetyltransferase MOF rekombinant hergestellt, gereinigt und die enzymatische Aktivität bestätigt. Es ergab sich keine eindeutige positive oder negative gegenseitige Beeinflussung der beiden Modifikationen. Abschließend wurden die verwendeten Antikörper bezüglich ihrer Spezifität untersucht, welche gegeben war.

Die Ergebnisse wurden im rasch fortschreitenden Feld der Histonmodifikationen erbracht. Eine Zusammenfassung der neuesten Erkenntnisse gewährt der Abschnitt 4.3.

2. EINLEITUNG

2.1. Chromatin

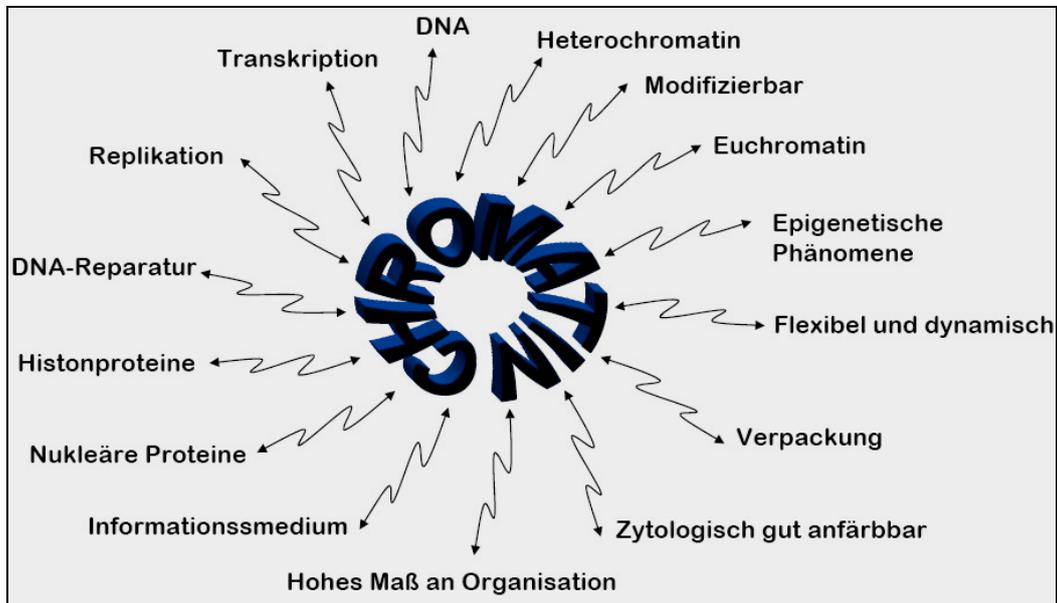


Abbildung 1: Eigenschaften von *Chromatin*: Mehr als lediglich die „Verpackung der DNA“

Alle Lebewesen teilen eine Gemeinsamkeit: Die „Erbsäure“ oder Desoxyribonukleinsäure bzw. DNA codiert die Information für ihren „Bauplan“ - den Phänotyp - in Form von Genen. Prokaryote Mikroorganismen besitzen keinen Zellkern. Das Genom von Bakterien ist in einem großen ringförmigen Chromosom organisiert, das im Zytoplasma schwimmt. Hingegen kondensieren eukaryote Zellen von Tieren oder Pflanzen ihr Erbgut in einem vom Zytoplasma membranös abgegrenzten Kompartiment, dem Nukleus. Im Zuge der stetigen Verbesserung der Lichtmikroskope wurden bestimmte Zellen nach ihren charakteristischen, teils bizarren Zellkernformen benannt. Beispiele hierfür sind die Plasmazellen mit der sog. „Radspeichenstruktur“ ihrer Zellkerne (spezialisierte, antikörperproduzierende B-Lymphozyten) oder die sog. „segmentkernigen Granulozyten“ (auch „*polymorph nuclears*“ oder *PMNs* genannt), die einen stark segmentierten Zellkern aufweisen (Phagozyten aus der Reihe der Granulopoese). Die gute Anfärbbeeigenschaft des Chromatins und der Chromosomen führte letztlich zu deren Bezeichnung als „Farbkörperchen“, Farbe (*griech.*: *chroma/ chromo*) und Körper (*griech.*: *soma*). Dass diese komplexen Grundbausteine dieser einst nur phänomenologisch benannten Zellkernstrukturen heute ein wichtiges Gebiet in der molekularbiologischen Grundlagenforschung einnehmen würden, war damals nicht absehbar. Die DNA des humanen Genoms in seiner linearen Gesamtlänge von ca. 2m befindet sich in einem Zellkern von ca. 10 µm Durchmesser. Der hohe Organisationsgrad der Verpackung des

Erbguts, an dem auch viele Zellkernproteine beteiligt sind, wird deutlich, wenn man für den Nukleus eine Metapher bemüht: Man stelle sich vor, eine 10000 Meilen lange Spaghetti in einen Basketball packen zu müssen. Es solle danach trotzdem noch möglich sein, einen definierten, 2cm langen Bereich der Spaghetti zügig in dem Gewirr auffinden zu können (Peterson and Laniel, 2004).

Der am höchsten kondensierte Zustand eukaryonter DNA findet sich in den Metaphase-Chromosomen, deren Entdeckung ebenfalls auf zytologischen Beobachtungen beruhte (die Chromosomen sind in der Metaphase lichtmikroskopisch sichtbar). Vergleicht man die lineare DNA-Doppelhelix einer bestimmten Basenpaaranzahl mit demselben DNA-Abschnitt in Metaphasechromosomen während der Mitose, so hat eine ca. 8000-fache Kondensation stattgefunden. In sich nicht-teilenden Zellen liegt die chromosomale DNA hingegen weitgehend entfaltet vor, damit die Zelle genetische Informationen nutzen kann, während verbleibende kondensierte Bereiche des Erbguts überwiegend genetische Informationen enthalten, die diese Zelle momentan nicht für ihre Funktionen benötigt.

Die enorme Verpackungsleistung gepaart mit der Dynamik und Flexibilität in der Organisation und Utilisation des Genoms in eukaryonten Zellen beruht auf *Chromatin* (Wolffe, 1998). Doch aus was besteht *Chromatin* und wie „funktioniert“ es?

2.1.1. Aufbau und Struktur des Chromatins

2.1.1.1. Das Oktamer, das Nukleosom und eine höhere Verpackungsordnung

In den Nuklei aller eukaryonten Zellen liegt die genomische DNA zusammen mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen als hochgradig gefaltetes und verdichtetes, jedoch dynamisches Polymer vor, genannt Chromatin. Die humane DNA hat beispielsweise ca. 3×10^9 Basenpaare, welche im Zellkern jeder somatischen Zelle untergebracht werden müssen. Der negativ geladenen DNA lagert sich ein scheibenförmiger Proteinkomplex, das *Histonoktamer* an, das sich aus jeweils zwei der stark positiv geladenen Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4, den sog *Core*-Histonen, (s. 2.2) zusammensetzt. Die DNA ist auf einer Länge von ca. 146 Basenpaaren (bp) mit knapp zwei linksgängigen, superhelikalen Windungen um dieses Histonoktamer geschlungen. Diese aus DNA und Histonoktamer bestehende kleinste, sich wiederholende Verpackungseinheit des Chromatins bezeichnet man als *Nukleosom* (auch „*Core-Particle*“ genannt). Diese 1974 von Kornberg et al. beschriebene Struktur hat einen Durchmesser von ca. 10nm (Kornberg, 1974). Das Nukleosom konnte 1997 erstmals von Luger et al. kristallisiert und mit dem Verfahren der Röntgenstrukturanalyse in einer Auflösung von 2,8Å dargestellt werden (Luger et al., 1997), s. Abbildung 2.

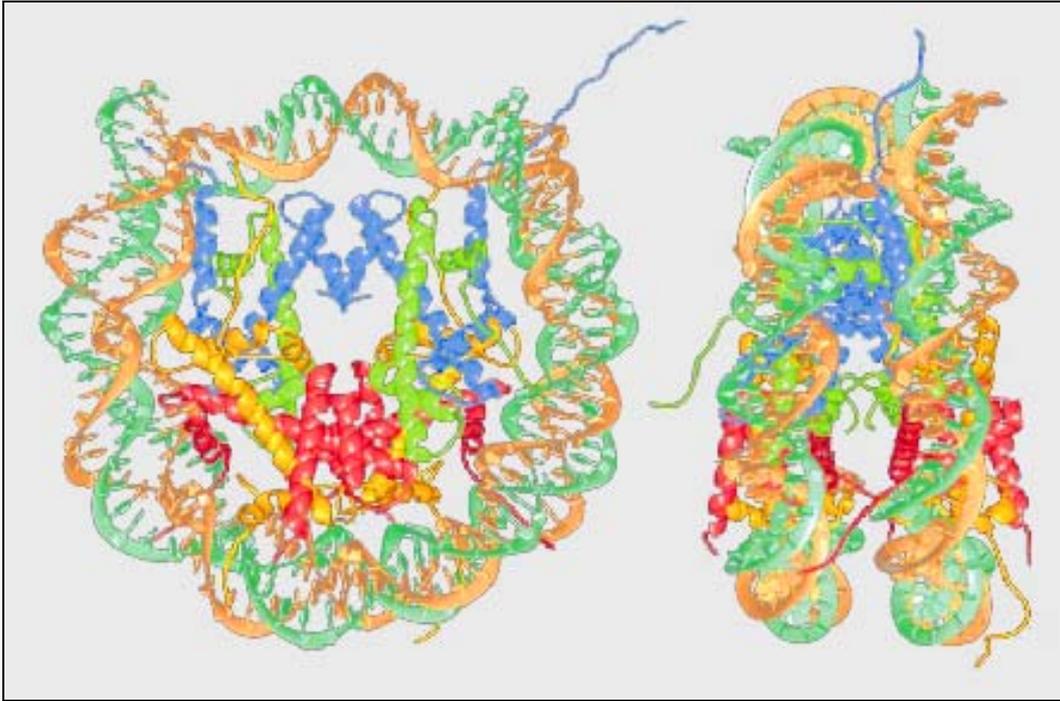


Abbildung 2: Das Nukleosom in einer Auflösung von 2,8Å (Luger et al., 1997). Im linken Bild erkennt man in der Frontalansicht das Histon-Oktamer (zahlreiche alpha-Helices) um das die DNA-Helix gewunden ist. Im rechten Bild ist in der Seitenansicht die scheibenartige Form des Nukleosoms erkennbar. In beiden Bildern ist angedeutet, daß die (nicht in voller Länge dargestellten) N-Termini der Histone über die Nukleosomenebene hinausragen. Die tatsächliche Orientierung der N-Termini ist mangels ihrer Kristallisationsfähigkeit nicht bekannt. Das Histon H1 und die Verbindungs-DNA (s.u.) sind nicht dargestellt.

Das Histon H1 nimmt eine Sonderstellung unter den Histonen ein, da es nicht Teil des Histonoktamers und somit kein *Core*-Histon ist. Es lagert sich jedem Nukleosom an der Ein- und Austrittsstelle der aufgewickelten DNA an.

Die DNA zwischen den einzelnen Nukleosomen wird als Verbindungs-DNA („*Linker*-DNA“) bezeichnet und ist in ihrer Länge variabel (10-50 Basenpaare). Durch die alternierende Abfolge von Nukleosomen und Verbindungs-DNA entsteht bei niedrigen Salzkonzentrationen ein Gebilde, das elektronenmikroskopisch an eine Perlenkette erinnert („*beads on a string*“, (Olins and Olins, 1974)). Dieser ca. 10-11nm-dicke Chromatinfaden ist der niedrigste Verpackungsgrad des Genoms und wird bei physiologischen Salzkonzentrationen weiter kondensiert: In einem ca. 30nm-dicken „Solenoid“ ordnen sich pro Windung ca. 6-8 Nukleosomen schraubenförmig an. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass der Aufbau des 30nm-Faden womöglich nicht sehr regelmäßig sei, sondern auch „*zig-zag*“-Elemente zwischen einzelnen Nukleosomen existierten (Bednar et al., 1998; Woodcock and Dimitrov, 2001), (s. Abbildung 3).

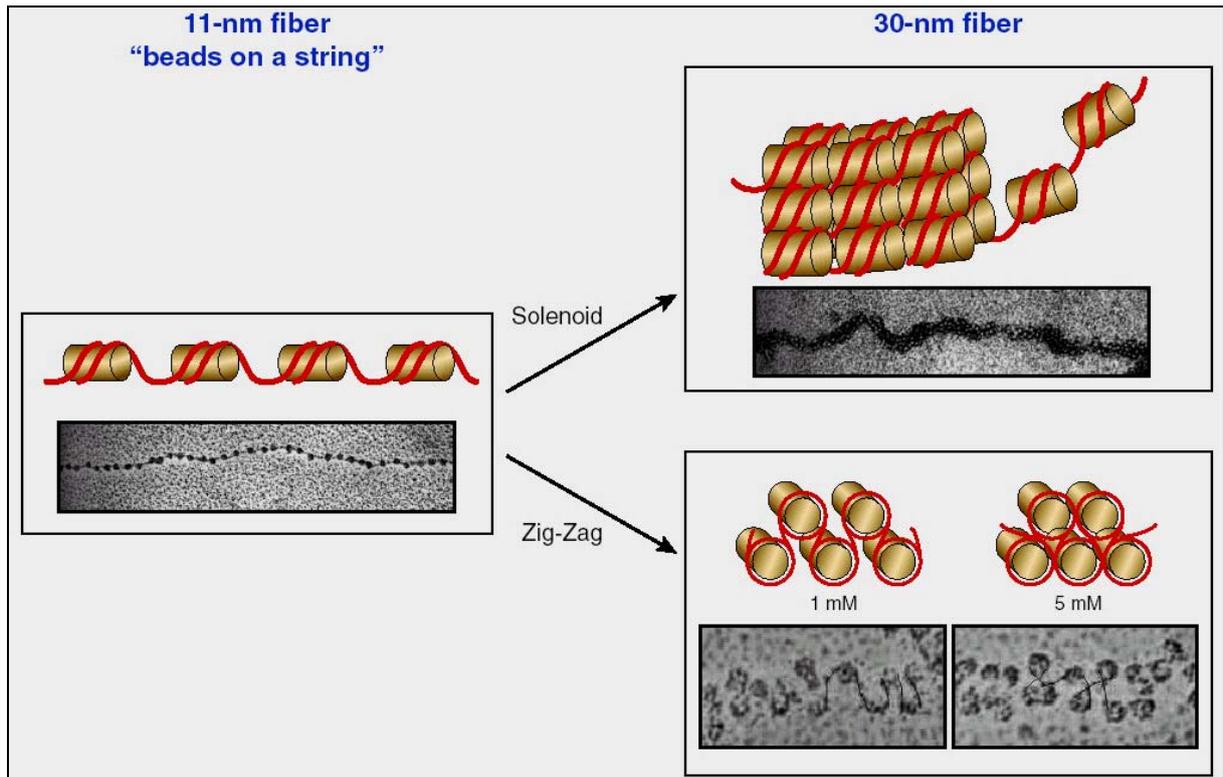


Abbildung 3 Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung von Chromatin-konfigurationen (Vaquero et al., 2003). Die *beads on a string* Struktur (Niedrigsalz) und die beiden Modelle für physiologische Salzkonzentrationen (Solenoid- bzw. *Zig-Zag*-Struktur). Die beiden *Zig-Zag*-Darstellungen sollen die Auswirkung unterschiedlicher Salzkonzentration auf die Verpackungsdichte veranschaulichen (je 1 mM bzw. 5 mM TEA-Cl (=Triethanolamin-HCl)).

Die Interaktionen verschiedener Nucleosomen untereinander werden insbesondere durch die N-Termini der Histone vermittelt (Carruthers and Hansen, 2000) und stabilisieren dadurch die ausgebildeten Faltungen der Solenoid- und *Zig-Zag*-Strukturen sowie noch unbekannte höhere Organisationsgrade des Chromatins.

Bei der Ausbildung aller höheren Verpackungsordnungen des Chromatins spielen das Histon H1 und die Nicht-Histonproteine (ca. 10% des Proteinanteils dieser Struktur, u.a. die *High Mobility Group* Proteine) ebenfalls eine wichtige Rolle. So konnten Thoma et al 1979 zeigen, dass H1 die Dichte des Chromatins bei konstanter Salzkonzentration erhöht, die Nucleosomenketten regelmäßiger werden und H1 die Ein- und Austrittsstellen der DNA im Nucleosom zu stabilisieren scheint (Thoma et al., 1979), s. Abbildung 4, A.

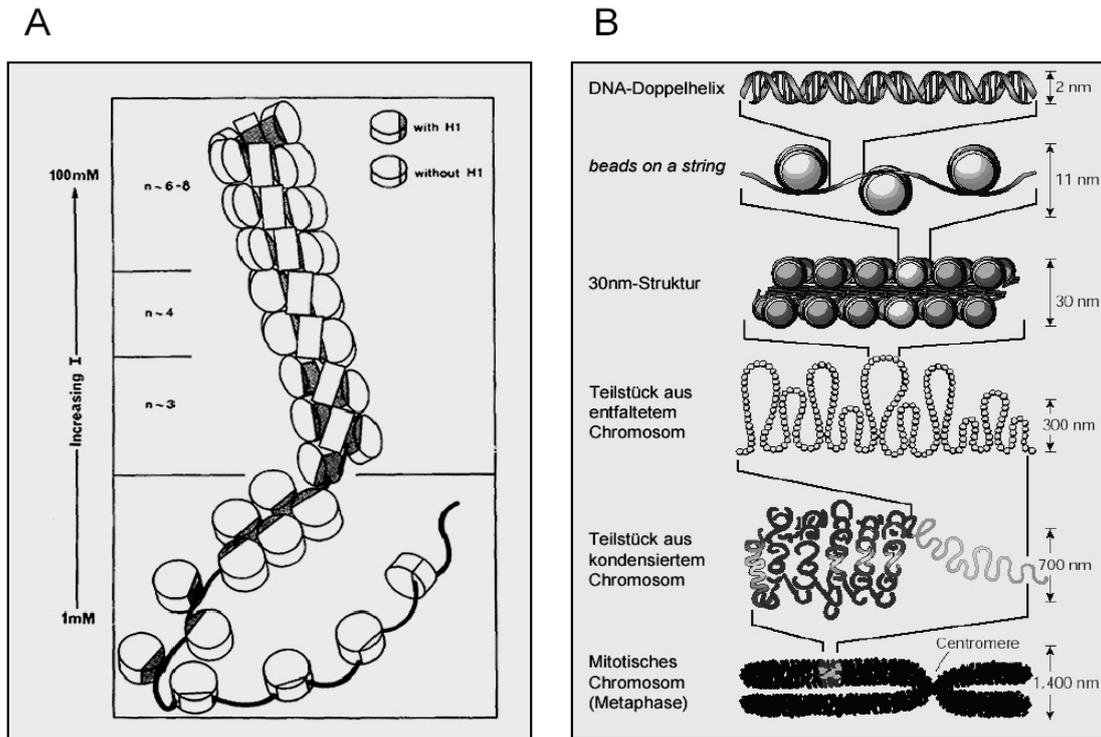


Abbildung 4: H1 fördert die Chromatinkondensation (A), die in (B) als schematisches Stufenmodell dargestellt ist.

A: H1 ist wichtig für Chromatinkondensation Dargestellt ist die Zunahme der Chromatinkondensation bei steigender Salzkonzentration (1mM - 100mM). Schon bei niedrigen Salzkonzentrationen spielt H1 für die regelmäßige Anordnung der Nucleosomen eine wichtige Rolle (Thoma et al., 1979).

B: Schematische Darstellung der Verpackungsgrade des Chromatins. Der lineare DNA-Faden kann hochgradig kondensiert werden, jedoch sind die detaillierten Strukturen ab dem 30nm-Faden bis heute noch weitgehend ungeklärt (Modifiziert nach Felsenfeld and Groudine, 2003).

Die 30nm-Faser ist noch weiter kondensierbar. Elektronenmikroskopisch wurden auch größere Anteile des Genoms in 60-130nm-dicken, sog. „Chromonema“-Fäden beobachtet (Belmont and Bruce, 1994). Die Verpackungsdichte der DNA findet ihre stärkste Ausprägung in Mitose-Chromosomen (ca. 10^4). Hingegen beträgt die Kompaktierung in der 11nm-Faser nur das 6-7-fache und in der 30nm-Faser das ca. 40-fache des linearen DNA-Moleküls. Die genaue Struktur der darüber hinausgehenden Chromatinkondensation ist ebenso wenig bekannt, wie das Zusammenspiel der Mechanismen, welche sie bewerkstelligt (s. Abbildung 4, B).

2.1.1.2. Euchromatin und Heterochromatin

In den meisten eukaryonten Zellkernen liegt das Genom in zwei (zytologisch) mikroskopisch unterscheidbaren „Chromatin-Dichtegraden“ vor. Es existiert zu etwa 90% das eher lockere, schwächer anfärbbare **Euchromatin** (welches vermutlich überwiegend durch den 30nm-Faden (s. 2.1.1.1) repräsentiert wird) und zu etwa 10% das dichtere, intensiver anfärbbare

Heterochromatin. Diese Einteilung hat Modellcharakter, da Chromatin ein sehr dynamisches und kein statisches Gebilde ist. Die Übergänge zwischen Euchromatin und Heterochromatin sind wahrscheinlich fließend (an der strikten Trennung zwischen einer heterochromatischen und einer euchromatischen Konfiguration in der 30nm-Struktur wurden bereits Zweifel geäußert (Gilbert et al., 2004)). Da diese Konfigurationen jedoch höhere und zugleich funktionale „Verpackungen“ des Chromatins darstellen, sollen sie an dieser Stelle erörtert werden.

Im Folgenden wird vorwiegend auf die Eigenschaften und die komplexe Organisation von Heterochromatin eingegangen. Mitunter müssen hierbei Themengebiete angesprochen werden, auf die erst im weiteren Verlauf detaillierter eingegangen wird.

Der deutsche Botaniker Emil Heitz beschrieb 1928 erstmals Heterochromatin, als er in Mooszellen mikroskopisch den Übergang von Mitose- zu Interphasechromosomen verfolgte (Heitz, 1928). Heitz hatte beobachtet, dass sich ein Chromosom der Mooszellen in der Telophase nicht dekondensierte (Zacharias, 1995). Er beobachtete auch, dass sich die hochkondensierten Metaphasechromosomen nicht gänzlich zu lockeren Interphasechromosomen entfalteten, sondern Regionen um das Zentromer und das Telomer in der dichter gepackten Chromatinkonfiguration bestehen blieben, während sich das Euchromatin in den Bereichen dazwischen befand. Aktuellere Daten können diese zytologischen Beobachtungen bestätigen: Die locker erscheinenden Bereiche enthalten auf nukleosomaler Ebene tatsächlich weniger stark kondensiertes Chromatin sowie eine höhere Gendichte (Gilbert et al., 2004).

Es werden zwei Arten des Heterochromatins unterschieden:

Als **konstitutives Heterochromatin** werden die perizentromeren Regionen und die Telomerregionen der Chromosomen bezeichnet. *Konstitutiv*, weil es in jeder somatischen Zelle eukaryonter Lebewesen an derselben Stelle in kondensierter Form bestehen bleibt. Es ist schon lange bekannt, dass diese heterochromatischen Bereiche in der Mitose für die korrekte Chromosomensegregation auf die Tochterzellen eine wichtige Rolle spielen (Brown, 1966).

Als **fakultatives Heterochromatin** bezeichnet man jenes Chromatin, das auch als Euchromatin vorliegen *kann* und nicht an eine bestimmte Lokalisation im Chromatin gebunden ist. Das „Paradebeispiel“ hierfür ist das inaktivierte X-Chromosom weiblicher Säugetiere (das *Barr*-Körperchen), welches hochkondensiert ist. Dabei scheint es dem Zufall überlassen, ob das maternale oder das paternale X-Chromosom inaktiviert wird. Ist dies jedoch einmal festgelegt, wird diese Entscheidung „klonal“ an mitotisch entstandene Tochterzellen weitergegeben (Elgin and Workman, 2000). Diesbezüglich stellen die weiblichen Säugetiere genetische Mosaik dar.

Am inaktivierten X-Chromosom werden einige Eigenschaften von Heterochromatin und dessen Entstehung deutlich. Spezifische DNA-Sequenzen sind offensichtlich nicht ursächlich,

denn beide X-Chromosome codieren für dieselben Gene, aber nur eines wird inaktiviert (Henikoff, 2000). Die über die Mitose hinweg weitergegebene Information, welches X-Chromosom inaktiviert wird, macht deutlich, dass sich heterochromatische Bereiche des Genoms nach erfolgter Replikation „wiederherstellen“. Wie die Entstehung von Heterochromatin *induziert* wird, ist noch nicht geklärt. Desweiteren macht diese Information deutlich, dass sie nicht in Form einer DNA-Sequenz codiert sein kann (s.o.), und folglich in Chromatin-assoziierten oder anderen, nicht an die DNA-Sequenz gebundenen Faktoren festgelegt sein muss (s. 2.5 und 2.6).

Für die perizentromeren und telomeren Chromatinregionen (konstitutives Heterochromatin) sind repetitive Satellitensequenzen (*repeats*) charakteristisch, jedoch sind sie für die Entstehung von heterochromatischen Zentromer- oder Telomerregionen keine unabdingbare Voraussetzung. Vielmehr scheint es, als würde die Entstehung von Heterochromatin durch solche *repeats* erleichtert. Da die *repeats* in der Länge variabel sind und mit humanen Krankheiten assoziiert werden (z.B. Friedreich-Ataxie, Chorea Huntington u.a.), geht man davon aus, dass Heterochromatin an der Genese dieser Erkrankungen eine Rolle spielen könnte (Debrauwere et al., 1997). Eine insbesondere bei kurzen *repeats* beobachtete genetische Instabilität könnte durch eine inkorrekte Chromosomensegregation erfolgt sein, welche die Folge von Veränderungen im Heterochromatin darstellt. Henikoff vermutet, dass Heterochromatin in der Mitose die Aufgabe übernimmt, das Zentromer „zu steuern“ und in der Interphase an der Genregulation beteiligt ist (Henikoff, 2000). Veränderungen im Heterochromatin könnten demnach u.a. zu einer korrumpierten Genregulation führen, die sich in einer fatalen Expression ursprünglich reprimierter Gene und einer Repression ursprünglich exprimierter Gene äußern könnte.

Das zytologische Erscheinungsbild des Heterochromatins hat ein funktionales Korrelat:

Verglichen mit Euchromatin ist Heterochromatin weniger empfindlich gegenüber Nukleasen. Dabei ist es nicht relevant ob diese spezifischer (z.B. Restriktionsenzyme) oder unspezifischer Natur sind (z.B. Dnase I). Vermutlich boykottiert die heterochromatische Konfiguration diese enzymatischen Vorgänge entweder auf internukleosomaler Ebene und/oder durch höhere Verpackungsordnungen: Charakteristisch für die DNA innerhalb des Heterochromatins ist die kürzere Verbindungs-DNA. Im Mikrokokus-Nuklease-Verdau (s. 5.2.14) resultieren deshalb in der Länge weniger variable, und schärfer voneinander abgrenzbare DNA-Fragmente, da weniger potentielle Angriffspunkte zwischen den einzelnen Nukleosomen zur Verfügung stehen (Sun et al., 2001). Diese Beobachtungen deuten auf eine Nukleosomenkette hin, die über einen längeren Abschnitt sehr regelmäßig zusammengesetzt sein muss.

Der enzymatische Prozess der DNA-Replikation erfolgt im Heterochromatin sehr spät. In der S-Phase des Zellzyklus wird das konstitutive Heterochromatin des Zentromers zuletzt repliziert. Bereits 1968 hatte Chambron et al. vermutet, dass die späte Replikation des

Zentromers für dessen Funktion essentiell sei (Chambon et al., 1968). Eine weitere mit dem Heterochromatin des Zentromers assoziierte Besonderheit ist der hohe Anteil der Histonvariante „CenpA“ (s. 2.2.1), welche die regulären H3-Histone in den Nukleosomen ersetzt. Dies führte zu der Theorie, dass die späte Replikation möglicherweise für den Einbau dieser Histonvariante nötig sein könnte (Shelby et al., 1997). Vielleicht spielt CenpA für die mitotische Weitergabe der Information über die Lokalisation von konstitutivem Heterochromatin eine wichtige Rolle (s. 2.2.1).

In den Jahren nach 1930 wurde erkannt, dass heterochromatische Chromatinbereiche einen reprimierenden Einfluss (nachfolgend als „*silencing*“ bezeichnet) auf die Genexpression haben (rezensiert in Weiler and Wakimoto, 1995). Die Anwesenheit von heterochromatischen Strukturen scheint sogar über einige Megabasen hinweg *silencing* induzieren zu können, ohne dass *enhancers* oder *suppressors* darauf Einfluss haben (Henikoff, 2000).

Wichtige Erkenntnisse über die Effekte von Heterochromatin konnten durch röntgenstrahlvermittelte Chromosomenstrangbrüche in *Drosophila*-Larven gewonnen werden (Zhimulev et al., 1989). Induzierte Inversionen inaktivierten Gene, die in Zellpopulationen nichtbestrahlter Larven aktiv transkribiert wurden. Nach weiterem Wachstum der einmalig bestrahlten Larven wiesen die umliegenden Tochterzellen der ursprünglich bestrahlten Zellen – phänotypisch einem genetischen Mosaik ähnlich – dieselben Charakteristika auf. Offenbar waren die induzierten Eigenschaften stabil durch die Mitosen an die Tochterzellen weitergegeben worden. Die Untersuchung der *Polytän*-Chromosomen („Riesenchromosomen“ aus den Speicheldrüsen von *Drosophila*) der veränderten Larven brachte hervor, dass die entsprechenden Gene nur dann inaktiv waren, wenn sie in der Nähe oder innerhalb stark kondensierter Chromatinbereiche zu finden waren. Auf dem Chromosom hatten sich durch die Inversionen die Abstände der Gene zum konstitutivem Heterochromatin sowie die Lokalisation möglicher „Begrenzungen“ für die Ausbreitung des Heterochromatins verändert. Demnach stellen die beobachteten Phänomene eine Kombination beider Effekte dar: Sie führen zu einer variablen Expression des Gens in den verschiedenen Zellen (sowie deren Tochterzellen) wobei ein geringerer Abstand zum Heterochromatin die Wahrscheinlichkeit der Repression eines Gens erhöht.

Der beobachtete Effekt wurde *Position Effect Variegation (PEV)* genannt und die wichtigsten Beobachtungen wurden anhand der Variabilität der Augenfarbe von *Drosophila melanogaster* mit dem Gen *white+* durchgeführt. Befand sich dieses Gen (verantwortlich für die rote Augenfarbe) in der Nähe des heterochromatischen Zentromers, wurde es nicht mehr stabil exprimiert und man erkannte die Fliegen an ihren weiss-rot-gesprenkelten bzw. weißen Augen. In zahlreichen genetischen Experimenten wurden Suppressoren (*su(var)* – *suppressors of PEV*) und Verstärker der *PEV* (*e(var)* – *enhancers of PEV*) identifiziert (Weiler and Wakimoto, 1995; Wallrath, 1998). Die genetischen und biochemischen

Untersuchungen legten nahe, dass es sich bei diesen *enhancers* und *suppressors* um regulatorische Chromatin-assoziierte Faktoren handelte, die das Chromatin strukturell und funktionell verändern könnten (Reuter and Spierer, 1992). Nebst anderen wurden die Gene *su(var)3-9* und *su(var)2-5* mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin assoziiert (Eissenberg et al., 1990; Eissenberg et al., 1992; Tschiersch et al., 1994).

Das Gen *su(var)2-5* codiert für das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) und war zuvor bereits von James et al. als ein an Heterochromatin assoziiertes Protein identifiziert worden (James and Elgin, 1986). Da Heterochromatin zu großen Teilen aus fremdem genetischen Material besteht (Pimpinelli et al., 1995), stellte Henikoff die Theorie auf, dass sich das eukaryote Genom vor der (*trans*-)Aktivierung solcher „parasitischer Elemente“ (z.B. Retroviren, Transposons) unter anderem durch die Ausbildung von heterochromatischen Strukturen schütze (Henikoff and Matzke, 1997). Diese Hypothese erhielt neue Nahrung als an Polytänochrosomen nachgewiesen wurde, dass HP1 an Transgene (bestehend aus Transposons) gebunden hatte (Fanti et al., 1998). Es blieb jedoch unklar, was genau zur Bindung von HP1 führte und die Ausbildung von Heterochromatin induzierte.

Mit der Entdeckung der ersten Histonmethyltransferase, die zugleich als *PEV*-Suppressor fungiert, gelang der entscheidende Durchbruch zum Verständnis der Etablierung von Heterochromatin (s. 2.3): *Su(var)3-9* methyliert das Histon H3 an Lysin 9 („H3 K9-methyl“) (Rea et al., 2000). Daraufhin wurde entdeckt, dass die Abwesenheit von H3 K9-methyl in *su(var)3-9*-Doppel-Null mutierten Zellen zu einer fehlenden Assoziation von HP1 an Heterochromatin führt, weil die sog. Chromodomäne von HP1 ein spezifisches Bindungsmotiv für das methylierte K9 von Histon H3 besitzt (Jacobs et al., 2001; Lachner et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Su(var)3-9* mit der Histondeacetylase HDAC1 assoziiert ist (s. 2.2.2.2). Offenbar kann so sichergestellt werden, daß an Lysin 9 acetylierte Histone zuerst deacetyliert werden, bevor sie von *Su(var)3-9* methyliert werden können (Czernin et al., 2001). Deacetylierte Histone sind somit ein weiteres Merkmal heterochromatischer Chromatinregionen.

In *wt*-Zellen (embryonale Stammzellen der *Maus*) wurde ein globales Methylierungsmuster nachgewiesen: Im perizentrischen Heterochromatin überwiegt die H3 K9 Trimethylierung und die H3 K27 Monomethylierung, während im Euchromatin eine unspezifischere Mono- und Dimethylierung von H3 K9 und K27 vorherrscht (Peters et al., 2003). Wahrscheinlich beruht deshalb die fehlende HP1 Bindung in *su(var)3-9*-Doppel-Null mutierten Zellen auf einer fehlenden H3 K9 Trimethylierung und einer hingegen vorhandenen H3 K27 Trimethylierung, die speziell für *fakultatives* Heterochromatin im inaktivierten X-Chromosom von Säugetieren charakteristisch zu sein scheint (Silva et al., 2003; Plath et al., 2003).

Die an der Entstehung von Heterochromatin beteiligten Mechanismen und Proteine wurden auch in anderen Eukaryonten nachgewiesen und sind in unterschiedlichen Spezies hoch

konserviert. Es ist sogar ein Austausch beteiligter Proteine (z.B. HP1) aus einem Organismus „A“ unter dem Erhalt der Funktion im Organismus „B“ möglich (Wang et al., 2000; Ma et al., 2001).

Ein weiteres, häufiges Merkmal heterochromatischer Bereiche ist die DNA-Methylierung. Diese häufig mit Geninaktivität assoziierte Modifikation der DNA wird jedoch nicht zwangsweise für eine Chromatinkondensation benötigt. Das stillgelegte, väterliche X-Chromosom bestimmter Insekten („*coccid insects*“) ist beispielsweise *hypomethyliert* (Bongiorni et al., 1999).

Die dem Heterochromatin zugeschriebenen Eigenschaften sind in einer Tabelle (s. Abbildung 5) zusammengefasst.

Eigenschaft	Euchromatin	Heterochromatin
Erscheinungsbild in der Interphase	relativ unkondensiert	kondensiert
Chromosomale Lokalisation	distal	perizentromer
Replikationszeit	gesamte S-Phase	späte S-Phase
Meiotische Rekombination	normal	wenig bis gar nicht
DNA-Sequenzeigenschaften	meist nicht-repetitiv	repetitiv
Gendichte	hoch	gering
Assoziierte Histone	überwiegend kanonisches H3	CENP-A (Histonvariante)
Assoziierte Proteine	<i>GAGA</i> Faktor	HP1
<i>Position effect variegation</i>	selten	häufig
DNA-Methylierungsstatus	CpG-Inseln hypomethyliert	durchgehend methyliert
Histonacetylierung	gering bis hoch	gering
Nukleosomen-Abstände	variabel	regelmäßig
Nuklease-Sensitivität	variabel	gering
Mikrokokus-Nuklease-Verdau	variable Fragmentlängen	einheitliche Fragmentlängen

Abbildung 5: Heterochromatin: Eine Übersicht über die zugeschriebenen Eigenschaften. (modifiziert und aktualisiert nach Henikoff, 2000).

Weitere Untersuchungen haben sich mit der Dynamik des Heterochromatins befasst. Messungen zur Rekrutierungsgeschwindigkeit von HP1 an heterochromatische Chromatinbereiche (Cheutin et al., 2003; Felsenfeld and Groudine, 2003) deuten darauf hin, dass Heterochromatin keine „statische, dichte Masse“ im eukaryonten Nukleus ist, sondern vielmehr einen „fluiden Zustand“ des Chromatins darstellt, der – ähnlich einem Fließgleichgewicht – ständig aktiv aufrechterhalten werden muss. Wahrscheinlich kann dadurch ein rascher Wechsel zwischen transkriptionell aktivem und inaktivem Chromatin gewährleistet werden (Straub, 2003).

2.2. Die Histone

Die Histone des Chromatins liegen in allen Tier- und Pflanzengenomen als Multigenfamilien vor und codieren für hoch konservierte Proteine: Auch in entfernter verwandten Spezies unterscheiden sie sich nur um wenige Aminosäuren. Zur Illustration: Erbsen und Kühe unterscheiden sich im 102-Aminosäuren langen Histon H4 nur um 2 Derivate. Die hohe Konservierung legt nahe, dass die Histone im Nukleus eukaryonter Organismen eine essentielle Aufgabe übernehmen.

Die *Core*-Histonproteine **H2A**, **H2B**, **H3** und **H4** sind relativ klein und haben ein Molekulargewicht zwischen 11kDa (H4) und 15kDa (H3), während Histon **H1** mit 19-23kDa das größte Histon darstellt. Alle Histone sind stark basisch und deshalb bei physiologischen Salzkonzentrationen und pH-Werten positiv geladene Moleküle. Der Grund hierfür liegt an dem hohen Anteil basischer Aminosäuren: H4 hat beispielsweise einen Arginingehalt von 15%, H2B einen Lysingehalt von 16% und H1 sogar einen Lysingehalt von 29%. Die positiven Ladungen sind für die Nukleosomenentstehung erforderlich: Die Histone interagieren mit dem negativ geladenen Ribose-Phosphat-„Rückgrat“ der DNA-Doppelhelix. Dabei berühren die kleinen Furchen der DNA-Doppelhelix ca. alle 10 bp das Histonoktamer und interagieren dort insbesondere mit den positiv geladenen Arginin-Seitenketten. Die großen Furchen sind dem Nukleosomenzentrum abgewandt und zeigen nach außen. Sie können dadurch von sequenzspezifischen Regulatorproteinen angegangen werden.

Den Histonmolekülen ist weiterhin gemeinsam, dass sie zentral einen globulären und überwiegend unpolaren Bereich aufweisen. Die N- und C-terminalen, flexiblen Enden besitzen einen höheren Anteil basischer Aminosäuren im Vergleich zu den globulären Domänen. Die globulären Bereiche der *Core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4 bestehen vorwiegend aus alpha-Helices (s. Abbildung 2) und bilden im Nukleosom das eigentliche *Core-Particle* aus, um welches die DNA gewickelt ist. Aus Abbildung 2 geht nicht hervor, dass die polaren N-terminalen Enden der Histone weit in die Umgebung des Nukleosoms hinausragen. Es wurde gezeigt, dass sie mit benachbarten Strukturen Kontakt aufnehmen (s. Abbildung 6) und dass sie für die Genomintegrität und für die Lebensfähigkeit eukaryonter Organismen essentiell sind (Megee et al., 1995; Luger and Richmond, 1998).

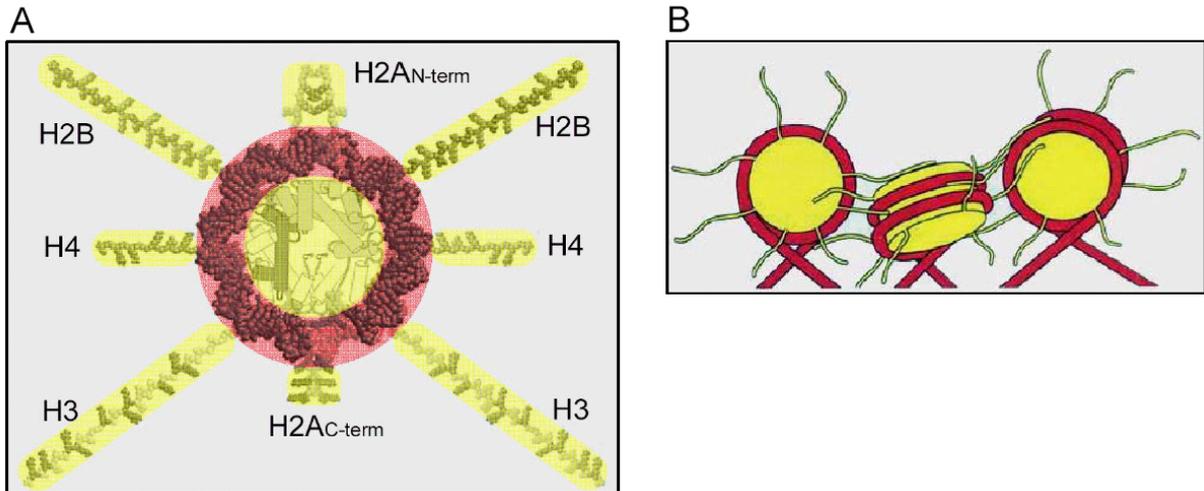


Abbildung 6: Die Histone im nukleosomalen Kontext: Histone sind gelb und DNA rot eingefärbt

A: Schematische Nukleosomendarstellung. Da die Nukleosomen meist „verkürzt“ dargestellt werden, ist hier ein Nukleosom abgebildet, das schematisch die Länge der Histon-N-Termini deutlich werden lässt (modifiziert nach Hayes and Hansen, 2002).

B: Schematische Darstellung einer Nukleosomenkette. Der kurze Nukleosomenverband verdeutlicht schematisch die Interaktionen der Histon-N-Termini mit der DNA und mit den Oberflächen der Oktamere benachbarter Nukleosomen (aus Alberts, 2002).

Für die Histon-N-Termini wurde weiterhin gezeigt, dass sie vorwiegend mit der Verbindungs-DNA interagieren (Angelov et al., 2001). Dies ist wahrscheinlich für höhere Verpackungsformen des Chromatins von großer Bedeutung (s. 2.1.1.1), da durch posttranslationale Modifikationen der N-Termini (s. 2.2.2) Veränderungen der Ladung und der Polarität resultieren. Dies beeinflusst wiederum die gegenseitige Affinität der Histon-N-Termini zur (Verbindungs-)DNA und zu den benachbarten Nukleosomen (Hong et al., 1993).

Entsprechend dem Bedarf der Zelle findet die Synthese der Histone größtenteils in der S-Phase statt. Die Replikation der DNA bedingt die Verpackung von zwei vollständigen Genomen, da nur die Hälfte der nun benötigten Histone zu Verfügung stehen. Mit Hilfe von verschiedenen sog. Histon-*Chaperonen* und *Remodeling*-Komplexen (s.u.) wird die replizierte DNA mit teils „neuen“ und teils „alten“ Histonen wieder zu Chromatin assembliert (Tyler, 2002): Unter epigenetischen Aspekten (s. 2.5) erscheint die Frage interessant, ob die „alten“ Histone während bzw. kurz nach der DNA-Replikation willkürlich oder geordnet auf das Chromatin beider Tochterstränge verteilt werden. Desweiteren wurde bezüglich der Histonsynthese nachgewiesen, dass die Transkription und Translation der „neuen“ Histone vom Vorliegen einer sich replizierenden DNA abhängt. Wenn die Replikation im Versuch unterbrochen wird, verschwinden die Histon-mRNAs aus dem Zytoplasma (Sittman et al., 1983; Osley, 1991).

Während in der S-Phase des Zellzyklus vorwiegend die *kanonischen* Histone (H1, H2A, H2B, H3 und H4) benötigt werden, exprimieren eukaryote Zellen während den Ruhephasen G1 bzw. G0 vorwiegend die Histonvarianten (s. 2.2.1). Mit Hilfe spezieller Histon-*Chaperone*

können in diesen Zellzyklusphasen die kanonischen Histone von den sequenzähnlichen Histonvarianten funktionspezifisch ersetzt werden (Korber and Horz, 2004).

Die Synthese der kanonischen, replikationsabhängigen Histone und die Synthese der replikationsunabhängigen Histone in höheren Eukaryonten unterscheidet sich. Die Gene, die für die replikationsunabhängigen Histone codieren, enthalten im Gegensatz zu den replikationsabhängigen Histogenen *keine* Introns (Wells, 1986) und ihre mRNA ist nicht polyadenyliert. Desweiteren existieren unterschiedliche Assemblierungsprozesse, die zwischen der replikationsassoziierten Assemblierung von Nukleosomen und der Assemblierung von Nukleosomen in aktiven Chromatinregionen differenzieren (Ahmad and Henikoff, 2002a; Ahmad and Henikoff, 2002b).

Histone werden direkt nach ihrer Synthese (posttranslational) im Zytoplasma von den dort ansässigen Histonacetyltransferasen an H4 K5, H4 K12 und H3 K14 acetyliert (s. 2.2.2.1) und gelangen in diesem Zustand in den Zellkern. Die posttranslationale Acetylierung der neu synthetisierten Histone scheint für die Histon-*Chaperone* von großer Bedeutung zu sein. Diese haben die Aufgabe, Histone zur DNA zu eskortieren und arbeiten mit Nukleosom-*Remodeling*-Komplexen (s.u.) zusammen, um eine geordnete und regelmäßige Abfolge von Nukleosomen entlang der DNA sicherzustellen. Zuerst werden je ein H3-H4-Tetramer mit je 2 H2A-H2B-Dimeren zu einem Histonoktamer zusammengesetzt und erst daraufhin mit DNA umwickelt. Es wurde gezeigt, dass der *Chromatin-Assembly Factor 1* (CAF1) mit acetylierten H3- und H4-Histonen assoziiert ist (Verreault et al., 1996). Daraufhin wurde beobachtet, dass die von CAF1 und RCAF1 (*replication coupled assembly factor 1*) benötigte Acetylierung von H4 von dem Enzym HAT1 abhängt (Chang et al., 1997): CAF1 und RCAF können ein (H3-H4)-Tetramer binden, wenn es an H4 Lysin 5 und 12 acetyliert ist. Nach der Assemblierung der acetylierten Histone zu Nukleosomen erfolgt rasch deren Deacetylierung.

Warum die zytoplasmatische, der Assemblierung vorrausgehende Histon-Acetylierung existiert, ist nicht bekannt (Tyler, 2002). Fehlt die Acetylierung der Histone experimentell, findet trotzdem eine Nukleosomenassemblierung statt, jedoch ist die entstandene Nukleosomenkette in der Abfolge der einzelnen Nukleosomen deutlich unregelmäßiger (Loyola et al., 2001). Dies weist darauf hin, dass die regelmäßige Positionierung der Nukleosomen entlang der DNA durch Histon-*Chaperone* nur im Zusammenwirken mit *Remodeling*-Faktoren bewerkstelligt werden kann. Von Ito et al. wurde beispielsweise ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*) entdeckt, das durch ATP-Hydrolyse den Chromatin-*Remodeling*-Faktoren zuzuordnen ist und zugleich bei der Nukleosomenassemblierung beteiligt zu sein scheint (Ito et al., 1997). Varga-Weisz et al. analysierten parallel den ACF-verwandten CHRAC-Komplex (*chromatin accessibility complex*), welcher diesbezüglich ähnliche Eigenschaften aufweist und dieselbe ATP-hydrolysierende Untereinheit Iswi besitzt (Varga-Weisz et al., 1997). Sowohl für ACF als

auch für CHRAC konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass sie in Anwesenheit des Histonchaperons NAP1 (*nucleosome assembly protein 1*) regelmäßig positionierte Nukleosomen entlang der DNA assemblieren können.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression des Histonchaperons CAF1 kurz vor der Replikation hochreguliert ist. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen exprimierten Untereinheiten von CAF1 und dem proliferativen Zustand einer Zellpopulation, weshalb sich aus CAF1 in der pathologisch-klinischen Diagnostik ein Marker für die Beurteilung der Proliferationsrate von Tumoren entwickeln könnte (Polo et al., 2004).

Ist die Assemblierung von Histonen und DNA zu einer Nukleosomenkette erfolgt, können diese kleinsten funktionalen Einheiten des Chromatins auf drei grundlegend verschiedene Arten *verändert* werden:

Die Position eines Nukleosoms kann durch sog. *Remodeling*-Komplexe unter Energieaufwand (Hydrolyse von ATP) verändert werden. Diese Aktivität spielt bei DNA-gebundenen Prozessen, wie z.B. der Transkription eine essentielle Rolle. Die DNA wird partiell mobilisiert und für Enzymkomplexe zugänglich gemacht. Deswegen ist u.a. die regelmäßige Anordnung der aneinandergereihten Nukleosomen nach der Replikation durch die Histonchaperone nur mit den beteiligten *Remodeling*-Aktivitäten möglich (s.o.). Eine Zusammenschau über die bisherigen Erkenntnisse im Bereich des Chromatin-*Remodelings* gewähren die Übersichtsartikel der Autoren Becker, Längst und Hörz (Langst and Becker, 2001; Becker and Horz, 2002; Langst and Becker, 2004).

Bereits assemblierte Nukleosomen können an den Histon-N-Termini mit *posttranslationalen Modifikationen* verändert werden, welche zu strukturellen und funktionellen Veränderungen führen. Dieser Themenkomplex wird ausführlich in den Kapiteln 2.2.2 und 2.3 besprochen.

Eine weitere mögliche Veränderung bergen die sog. *Histonvarianten*, welche außerhalb der Replikation in entstehende Nukleosomen inkorporiert werden. Sie ersetzen die *Core*-Histone, wodurch sie bestimmte Chromatinbereiche markieren (Henikoff et al., 2004) und werden im Folgenden skizziert.

2.2.1. Die Histonvarianten

Auch außerhalb der S-phase (also replikationsunabhängig) werden spezielle Histonproteine auf niedrigerem Niveau exprimiert und in Nukleosomen assembliert. Diese „Histonvarianten“ existieren für alle kanonischen Histone (außer für H4), zeichnen sich durch eine mäßig veränderte Aminosäuresequenz aus und markieren bestimmte Chromatinbereiche.

So ist beispielsweise für konstitutives Heterochromatin im Zentromer von Säugetierzellen charakteristisch, dass statt regulärem Histon H3 das Histon H3-ähnliche Protein CENP-A vorliegt (Palmer et al., 1991). Da diese H3-Varianten in zahlreichen eukaryonten Organismen am Zentromer vorkommen, werden sie auch kummulativ als „CenH3s“ bezeichnet. Die Position des Zentromers von Chromosomen kann durch diese Histonvarianten bei der Zellteilung weitergegeben werden, da sie ein spezifischeres Merkmal darstellen als die ebenfalls am Zentromer vorliegenden, repetitiven DNA-Sequenzen (Saffery et al., 2003), s. 2.1.1.2.

Eine andere Histonvariante von H3, H3.3 (lediglich 4 Aminosäuren sind verändert), findet sich vermehrt in Euchromatin während an Lysin 9 (tri)methyliertes H3 vorwiegend in heterochromatischen Bereichen vorhanden ist. Kurz nach der Replikation sind ausschließlich kanonische H3-Histone in den Nukleosomen nachweisbar, während die Inkorporation von H3.3 aktiv transkribierte Chromatinregionen markiert (Ahmad and Henikoff, 2002a).

Von H2A konnten bisher die meisten Varianten kanonischer Histonen identifiziert werden. Die Variante H2A.Z ersetzt H2A beispielsweise in transkriptionell aktiven Bereichen. Fan et al. hatten gezeigt, dass Nukleosomen, die statt H2A die H2A.Z-Variante enthalten, leichter zu neuen Nukleosomen assembliert werden können und zugleich die Ausbildung stärker kondensierten Chromatins durch eine verringerte nukleosomale Stabilität verhindert wird (Fan et al., 2002). Weiterhin können euchromatische Chromatinabschnitte, die H2A.Z enthalten die Ausbreitung von transkriptionell inaktivem Chromatin verhindern. So kann regional „aktives“ Chromatin erhalten bleiben und diese Information über die Histonvariante H2A.Z memoriert werden (Meneghini et al., 2003).

Eine weitere Histonvariante von H2A ist H2A.X, das im gesamten Chromatin vorhanden ist. Es wurde mit DNA-Schäden und -Reparaturprozessen assoziiert, nachdem beobachtet wurde, dass DNA-Doppelstrangbrüche an nahegelegenen H2A.X-Histonen eine Phosphorylierung induzieren (Rogakou et al., 1998).

Die MacroH2A-Histone ersetzen im inaktiven X-Chromosom von Säugetieren reguläres H2A und sind mit heterochromatischen Bereichen assoziiert (Chadwick and Willard, 2002). Passend zu den Attributen des Heterochromatins (s. 2.1.1.2) blockieren Nukleosomen mit MacroH2A-Histonen sowohl das Andocken von Transkriptionsfaktoren, als auch die für die Transkription benötigte *Remodeling*-Aktivität des sog. Swi/Snf-Komplexes (Angelov et al., 2003).

2.2.2. Posttranslationale Histonmodifikationen

Bereits 1963 hatte Phillips die Acetylierung von Histonen entdeckt (Phillips, 1963). Ein Jahr darauf verknüpften Allfrey et al. ihre Ergebnisse über die Histonmethylierung und Histonacetylierung mit der Hypothese, dass durch diese Histonmodifikationen die Synthese von mRNA während der Transkription vermindert würde. Damals gingen sie fälschlicherweise noch davon aus, dass die Histonmodifikationen eine direkte inhibitorische Wirkung auf die Ribonukleinsynthese hätten. Trotzdem wurden somit zum ersten Mal modifizierte Histone mit „Regulatoren chromosomaler Aktivität“ in Verbindung gebracht (Allfrey et al., 1964).

Schon länger ist bekannt, dass Histone an basischen Aminosäuren (Lysin und Arginin) acetyliert oder methyliert werden können (Honda et al., 1975; Davie and Candido, 1978). Der von Allfrey et al. geäußerte Verdacht, dass die Histonmodifikationen erst posttranslational eingeführt werden, war begründet (Allfrey et al., 1964). Doch erst Jahre darauf konnten die histonmodifizierenden, nukleären Enzyme aus eukaryonten Zellen identifiziert werden (Wang et al., 1997).

Obwohl die Acetylierung und die Methylierung von Lysinen die häufigsten Modifikationen darstellen, sind die posttranslationalen Histonmodifikationen nicht auf diese beiden chemischen Gruppen beschränkt. Es werden auch phosphorylierte, ADP-ribosylierte und ubiquitinylierte Aminosäuren in Histonen gefunden. Es können auch mehrere, unterschiedliche Modifikationen an demselben Histon vorhanden sein. Die posttranslationalen Modifikationen werden hauptsächlich an den basischen N-Termini der Histone enzymatisch gebunden. Angesichts der Konfiguration des Nukleosoms überrascht dies nicht, da diese Peptidketten im Gegensatz zum globulären Bereich der Histone über die Ebene der Nukleosomen in die Umgebung hinausragen (s. 2.2). Von allen genannten posttranslationalen Modifikationen ist die Histonmethylierung die langlebigste bzw. stabilste Form (s. 2.3).

Zunehmend gelingt es nicht nur, einzelne posttranslationale Histonmodifikationen, sondern auch das Zusammenspiel verschiedener Modifikationen untereinander in einem funktionalen Kontext zu verstehen (Strahl and Allis, 2000). Dabei ist allen Histonmodifikationen gemein, dass sie die „strukturelle Dynamik“ des Nukleosoms und somit den für etliche nukleäre Prozesse wichtigen Zugang zur DNA beeinflussen können (Sims, III et al., 2003; Imhof, 2003). Positive und negative Interaktionen der Modifikationen untereinander, sowie speziesspezifische und speziessübergreifende Modifikationsmuster werden unterschiedlichen funktionalen Zuständen einer Chromatinregion zugeordnet. Bereits vorhandene Histonmodifikationen müssen unter Umständen entfernt werden, um einer andersgearteten „Platz“ zu machen, da sie jeweils mit verschiedenen funktionalen Zuständen assoziiert sind. Erste Hinweise auf dieses Wechselspiel zwischen posttranslationalen Modifikationen

formulierten bereits Honda und Dixon 1975 in ihrer Untersuchung an Histonen aus Forellen (Honda et al., 1975). Ein aktuelleres Beispiel hierfür ist die heterochromatin-assoziierte Methylierung von H3 an Lysin 9 durch die Histonmethyltransferase Su(var)3-9 (Rea et al., 2000). Da Su(var)3-9 mit der Histondeacetylase HDAC1 *in vivo* interagiert (Czernin et al., 2001) konnte gezeigt werden, dass die Methylierung an Lysin 9 erst nach erfolgter Deacetylierung durchgeführt werden kann (s. 2.1.1.2).

Ferner existieren Proteine mit regulativen Eigenschaften, welche die spezifischen Histonmodifikationen oder Modifikationsmuster erkennen und infolgedessen an einen Abschnitt im Chromatin binden können, um dort ihre regulativen Funktionen auszuüben (Jenuwein and Allis, 2001), s. 2.3.2.

Diese funktionalen Implikationen der Histonmodifikationen im Sinne einer transkriptionell regulativen Wirkung des Chromatins erweitern die Komplexitätsebene der genetischen Information beträchtlich (s. 2.4). Da die Histonmethylierung diesbezüglich eine Schlüsselrolle einnimmt und das Hauptthema dieser Arbeit darstellt, wird diese Modifikation gesondert in 2.3 besprochen.

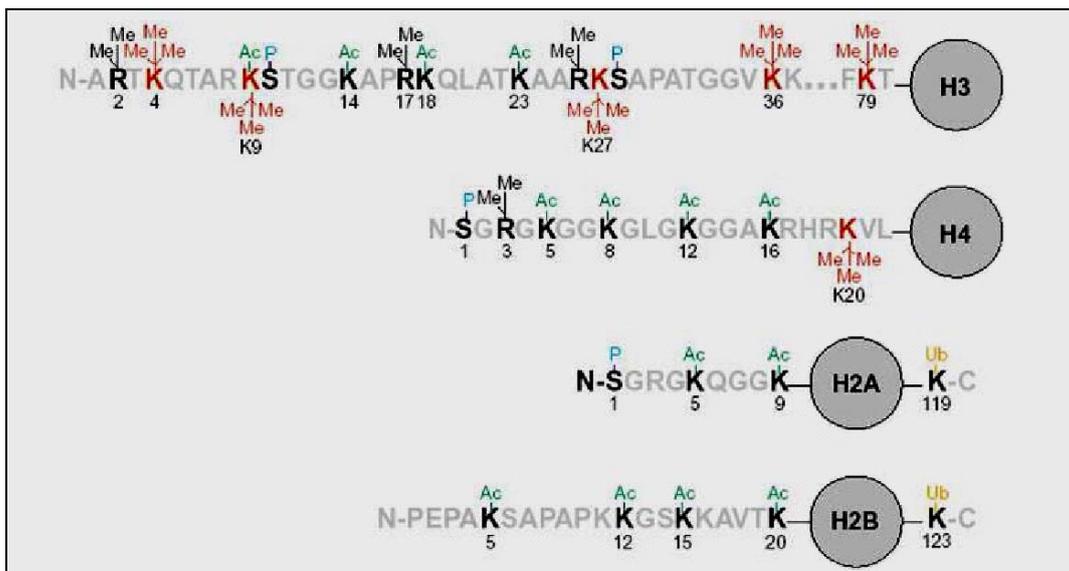


Abbildung 7: Schematische Darstellung bislang bekannter, posttranslationaler Histonmodifikationen. Die derzeit bekannten Modifikationen sind farblich markiert: Me (rot) = Methylierung an Lysinen; Me (schwarz) = Methylierung an Argininen; Ac = Acetylierung an Lysinen; P = Phosphorylierung an Serinen; Ub = Ubiquitinierung an Lysinen. Lysin 9 in Histon H3 kann posttranslational entweder methyliert oder acetyliert werden (aus Sims, III et al., 2003).

2.2.2.1. Acetylierung

Die Histonacetylierung ist von allen posttranslationalen Histonmodifikationen bisher am ausführlichsten untersucht worden. Sie ist eine dynamische, durch Deacetylierung reversible und für die Transkription essentielle Modifikation.

Traditionell werden die Histonacetyltransferasen (HAT) in HAT-*A*- (nukleäre Lokalisation) und HAT-*B*-Enzyme (zytoplasmatische Lokalisation) unterteilt. Innerhalb dieser Einteilung werden verschiedene HAT-Familien unterschieden, die auf Sequenzhomologien beruhen. Detaillierte Übersichten zu den zahlreichen HATs finden sich in ausführlichen Übersichtsartikeln (Sterner and Berger, 2000; Roth et al., 2001).

Acetylierte Lysine, v.a. im N-Terminus von H3 und H4, führen zu einer biophysikalischen Mobilitätssteigerung eines Nukleosoms entlang des DNA-Fadens. Dieses Phänomen ist für die Dekondensation des Chromatins äußerst wichtig: Mit der Histonacetylierung geht eine Verminderung der positiven Ladungen der Lysine einher, wodurch sich die gegenseitige Anziehung zwischen den positiv geladenen Histonen und dem negativ geladenen Ribose-Phosphat-Gerüst der DNA vermindert (Hong et al., 1993; Lee et al., 1993; Workman and Kingston, 1998). Dieser Effekt ist allerdings insofern limitiert, als dass sich auch bei einer hypothetischen Acetylierung aller N-Terminus-Lysine keine vollständige Dissoziation von Histonen und DNA ereignen würde. Vereinfacht kann man in heterochromatischen Chromatinabschnitten von einem hypoacetylierten Zustand ausgehen, während euchromatisches bzw. transkriptionell aktives Interphasechromatin regelmäßig an den Histon-N-Termini acetyliert ist.

Da die Nukleosomen untereinander durch die basischen N-Termini eines Nukleosoms und den teils sauren Histonoktamercores der benachbarten Nukleosomen miteinander interagieren (Luger and Richmond, 1998), wird auch die Nukleosom-Nukleosom-Interaktion durch die Acetylierung negativ beeinflusst. Selbiges gilt für die Interaktion von Histon-N-Termini und der Verbindungs-DNA, welche sich zwischen den einzelnen Nukleosomen befindet (Angelov et al., 2001). Höhere Ordnungsstrukturen im Chromatin werden somit durch den Verlust oder die Abschwächung derartiger Interaktionen gelöst. Diese partielle Entfaltung des Chromatins und der somit geschaffene Zugang zur DNA ist für alle DNA-gebundenen Vorgänge essentiell: Eine Transkriptionssteigerung ist beispielsweise in diesem Bereich des Chromatins nun durch das Andocken von Transkriptionsfaktoren und des RNA-Polymerasekomplexes möglich (Lee et al., 1993). Es existieren außerdem funktionsgebundene Proteine, die nur dann an die Histon-N-Termini binden, wenn sie ihr Bindungsmotiv aus bestimmten acetylierten Aminosäuren erkennen können. Charakteristisch für diese Proteine ist die „Bromodomäne“, die beispielsweise in TAF-250 (ein für die Transkription wichtiges TBP-assoziiertes Protein) vorkommt (Mizzen et al., 1996).

Welche funktionale Bedeutung eine spezifische Histon-Acetylierung für eine Chromatinregion hat, hängt davon ab, an welchem Lysin im N-Terminus die Modifikation erfolgt. In *Drosophila* ist beispielsweise das X-Chromosom männlicher Fliegen überwiegend an Lysin 16 in H4 acetyliert. Diese Modifikation ist mit einer hohen Transkriptionsrate assoziiert und soll bei männlichen Fliegen das fehlende, zweite X-Chromosom der weiblichen

Fliegen kompensieren (genannt *dosage compensation*). Hingegen liegt die Acetylierung von Lysin 12 am selben Histon in *Drosophila* vorwiegend in Chromatinbereichen mit herabgesetzter transkriptioneller Aktivität vor. Interessanterweise findet man für die H4 K12 Acetylierung im humanen Genom keine Parallele, was ein Beispiel dafür ist, dass bestimmte Modifikationen vereinzelt speziesabhängig und mit unterschiedlichen funktionalen Zuständen assoziiert sein können (Turner et al., 1992).

Die Bedeutung der zytoplasmatischen HATs (HAT-B) ist für die Assemblierung neuer Nukleosomen entscheidend. Nach der replikationsgekoppelten Synthese der Histone in der S-Phase werden diese noch im Zytosol acetyliert (Ruiz-Carrillo et al., 1975). Erst im acetylierten Zustand werden sie in den Nukleus überführt. Charakteristisch ist dabei für viele Eukaryonten die Acetylierung von H4 an Lysin 5 und 12 (Sobel et al., 1995; Chang et al., 1997). Die Assemblierung von Histonen zu Nukleosomen ist von den Histon-*Chaperonen* wie CAF1 (*Chromatin assembly factor 1*) oder RCAF (*replication coupled assembly factor 1*) abhängig (Tyler et al., 1999). Für CAF1 konnte gezeigt werden, dass es mit acetylierten H3- und H4-Histonen vorliegt (Verreault et al., 1996). Im Nukleus werden neu synthetisierte Nukleosomenverbände nach dem Import aus dem Zytoplasma deacetyliert (Jackson et al., 1976). Bisher gibt es keine Erklärung für die vorläufige Acetylierung neu synthetisierter Histone.

2.2.2.2. Deacetylierung

Die Einteilung der verschiedenen Histondeacetylasen (HDACs) wird nach der Abhängigkeit von Kofaktoren getroffen. Klasse I und II HDACs benötigen für ihre Aktivität den Kofaktor Zink, während die Klasse III HDACs den Kofaktor NAD⁺ benötigen (Miller et al., 2003). HDACs sind zellulär ubiquitär und häufig mit anderen Proteinen oder Proteinkomplexen assoziiert, die DNA-Bindungen eingehen können oder transkriptionell regulatorisch wirken. Die dynamischen Eigenschaften der Histonacetylierung wären ohne die HDACs nicht vorhanden. Da die Histonacetylierung, wie in 2.2.2.1 beschrieben, zu einer Destabilisierung bzw. „Auflockerung“ der Chromatinstruktur führt, bewirkt die Deacetylierung eine Kondensierung des Chromatins. Die Ladungen der N-terminalen Lysine werden dadurch wieder positiver und die Anziehung zwischen DNA und Histonen, sowie internukleosomal nimmt zu. Die kompaktere Chromatinstruktur ist transkriptionell inaktiv. Die Assoziationen von HDACs mit reprimierend wirkenden Proteinen wurde an dem DNA-methylierenden Enzym *Dnmt3* (Fuks et al., 2001), an der Histonmethyltransferase Su(var)3-9 (Czermin et al., 2001), s. 2.3 und 2.5, sowie an Polycomb-Gruppen-Proteinen demonstriert (Vlag and Otte, 1999; Tie et al., 2001), s. 2.6.

Eine inkorrekte oder unvollständige Histondeacetylierung wurde mit der Entstehung von Neoplasien in Verbindung gebracht (Wade, 2001), s. 2.8. Es wird davon ausgegangen, dass im gesamten Genom in differenzierten Zellen ein Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung vorliegt (Waterborg, 2002), welches in maligne entarteten Zellen gestört ist. Man hat beobachtet, dass sog. HDAC-Inhibitoren (z.B. Butyrate, Valproat, Trichostatin A, u.a.) Klasse I und II HDACs *in vitro* inhibieren können. *In vivo* konnten HDAC-Inhibitoren Zellen in der G1-phase arretieren (Ogryzko et al., 1996) und möglicherweise vor der Transformation bewahren (Yoshida et al., 1990). Daraus erfolgte die Annahme, dass HDAC-Inhibitoren wichtige Signalwege für den Zellzyklus blockieren können (Cress and Seto, 2000). Wegen der transkriptionell reprimierenden Eigenschaften der Histondeacetylierung nimmt man bezüglich der Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren an, dass sie durch die Hemmung der HDACs zu einer „*Re*-Expression“ von Genen führen, die für eine ausreichende Differenzierung einer Zelle vonnöten sind (Marks et al., 2001). Die Differenzierung einer Zelle durch die Ausprägung spezifischer Merkmale ist eine entscheidende Fähigkeit, welche transformierten – also *entdifferenzierten* – Zellen verloren gegangen ist (s. 2.8). Nach ausführlichen Versuchen *in vitro* an humanen Tumorzelllinien haben HDAC-Inhibitoren in der Therapie bösartiger Erkrankungen (insbesondere bei Leukämien) bereits Erfolge in klinischen Studien erbracht (Kramer et al., 2001).

2.2.2.3. Phosphorylierung

Alle Histone können auch phosphoryliert werden, wobei diese Modifikation nicht an N-terminalen Lysinen oder Argininen sondern an Serinen erfolgt. Insbesondere sei hierbei auf die Phosphorylierung von S10 in Histon H3 hingewiesen, da diese Modifikation zellzyklusabhängig ist und bisher am besten untersucht wurde (Nowak and Corces, 2004). Schon länger ist bekannt, dass die H3 S10-Phosphorylierung ein in eukaryonten Genomen konservierter Marker für die Mitose ist. Ab der Prophase bis zur Metaphase nimmt phosphoryliertes H3 S10 zu, um dann zur Telophase hin wieder abzunehmen (Gurley et al., 1978). Mittlerweile konnte auch gezeigt werden, dass die H3 S10-Phosphorylierung für die korrekte Durchführung der Chromosomenkondensation und -segregation in der Mitose und der Meiose von Bedeutung ist (Wei et al., 1998; Hans and Dimitrov, 2001). Es gibt auch Hinweise, dass diese Modifikation mit einer Transkriptionsaktivierung in Eukaryonten zusammenhängt (Nowak and Corces, 2004): Der Anteil phosphorylierter H3-Histone in zuvor ruhenden Zellen steigt nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren sprunghaft an (Mahadevan et al., 1991).

Eine zur Formulierung des Histon-*Codes* führende Beobachtung (Jenuwein and Allis, 2001), s. 2.4, ist die gegenseitige Inhibition der Phosphorylierung von Serin 10 und der Methylierung von Lysin 9 in Histon H3. Diese Ergebnisse an Peptiden *in vitro* wurden durch die Doppel-Null-Mutation von *su(var)3-9* in embryonalen *Maus*-Fibroblasten untermauert, die vermehrt an Serin 10 in H3 phosphoryliert waren (Rea et al., 2000). Dagegen wird die Acetylierung von H3 Lysin 14 durch die Phosphorylierung von H3 S10 gefördert (Lo et al., 2000).

2.2.2.4. Ubiquitinylierung

Die Ubiquitinylierung wurde außer an H4 an allen Histonproteinen nachgewiesen und besitzt das größte Molekulargewicht aller Histonmodifikationen (ca. 8,5 kDa). Über die Bedeutung dieser Modifikation an Histonen ist allerdings noch nicht sehr viel bekannt. Normalerweise wird ein Protein durch Polyubiquitinylierung für den Abbau in einem Proteasomenkomplex gekennzeichnet. Die Monoubiquitinylierung von H2B wurde in Versuchen mit *Tetrahymena* mit Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht (Davie et al., 1991). Im Sinne eines Histon-*Codes*, (Jenuwein and Allis, 2001), s. 2.4, scheint die Ubiquitinylierung von H2B an Lysin 123 in Hefe für die Methylierung von H3 Lysin 4 durch die HMTase Set1 Voraussetzung zu sein (Sun and Allis, 2002). Der sog. E3 Ubiquitin Ligase Komplex ubiquitinyliert H2A an Lysin 119 (Wang et al., 2004). Wang et al. konnten in den Bestandteilen und den funktionellen Implikationen des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes erstaunliche Parallelen zwischen diesem Komplex und den sog. Polycomb Proteinen (s. 2.6) ausmachen, so dass der E3 Ubiquitin Ligase Komplex nun auch als „human Polycomb repressive complex-like“ (hPRC1L) bezeichnet wird.

2.2.2.5. ADP-Ribosylierung

Die ADP-Ribosylierung von Histonen ist bisher vor allem mit den Prozessen des Alterns, der DNA-Krümmung und der Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht worden. Der Rückschluss auf die Beeinflussung der Transkription erfolgte durch die Beobachtung, dass es offensichtlich eine Parallele zwischen der Histonacetylierung und der ADP-Ribosylierung gibt. Wie in 2.2.2.1 bereits erwähnt kann insbesondere die Acetylierung von Histon H4 mit einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität assoziiert sein. Steigt die H4-Acetylierung experimentell an, so nimmt auch die ADP-Ribosylierung am H4-Molekül zu (Golderer and Grobner, 1991). Die Histonmodifikation der ADP-Ribosylierung kann an einem Arginin bis zu 100 Moleküle ADP-Ribose betragen (Jacobson and Jacobson, 1999). Die hiermit an die positiv geladenen Histone angefügte, lange ADP-Ribose-Kette birgt eine hohe negative

Ladung, die die Assoziation mit einer offenen, bzw. transkriptionserleichternden Chromatinkonfiguration nachvollziehbar machen würde (de Murcia et al., 1988). Möglicherweise ist die im Alter beobachtete, reduzierte Histon-ADP-Ribosylierung in einer altersentsprechenden, reduzierten Transkriptionsrate der Zellen begründet (Mishra and Das, 1992). Die ADP-Ribosylierung wurde mit weiteren nukleären Prozessen wie der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Genomstabilität in Verbindung gebracht (Chiarugi, 2002). Das einzige bisher identifizierte ADP-ribosylierende Enzym PARP1 (Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1) wird durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert und führt zu einer lokalen Anhäufung ADP-ribosylierter Histone in diesem Bereich (de Murcia et al., 1988).

Da die Histonmethylierung den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt, soll auf diese Form der posttranslationalen Histonmodifikation detaillierter eingegangen werden.

2.3. Die Histonmethylierung

Bereits 1964 hat Murray als erster die Histonmethylierung entdeckt (Murray, 1964). Deren funktionale Bedeutung sowie die involvierten Enzyme blieben jedoch bis vor 10 Jahren weitgehend unklar. Heute weiß man, dass die Methylierung für die Struktur und die Funktion des Chromatins eine Schlüsselrolle unter den posttranslationalen Modifikationen einnimmt.

Der Verpackungsgrad des Chromatins in Eu- und Heterochromatin wird durch die Histonmethylierung wesentlich determiniert (s. 2.1.1.2). Durch die Histonmethylierung kann die transkriptionelle Aktivität einer ganzen Chromatinregion oder eines einzelnen Gens positiv oder negativ beeinflusst werden. Dieser Aktivitätszustand kann längerfristig aufrechterhalten und sogar über Zellteilungen vererbt werden. Darüberhinaus bestehen vielfältige Assoziationen spezifischer Histonmethylierungen mit chromatinbindenden Proteinen, mit der DNA-Methylierung und im Zusammenspiel mit anderen Histonmodifikationen (s. 2.2.2).

Bisher konnten Methylierungen vorwiegend an Histon H3 und H4, sowie später auch an H1 (Kuzmichev et al., 2004) nachgewiesen werden. Vergleichbar mit den in 2.2.2 besprochenen posttranslationalen Modifikationen werden auch Histon H3 und H4 vorwiegend an den Histon-N-Termini methyliert. In einer globulären Histonregion ist bislang nur methyliertes Lysin 79 in H3 entdeckt worden.

Die Histonmethylierung unterscheidet sich in wesentlichen Charakteristika von den übrigen posttranslationalen Histonmodifikationen. Sie findet sich beispielsweise nicht nur an Lysinen, sondern auch an Argininen. Die beiden Aminosäuren werden von Enzymen unterschiedlicher Spezifität modifiziert: Die HKMTs (Histon-**Lysin**-Methyl-Transferasen) methylieren

spezifisch Lysine und die PRMTs (Protein-**Arginin**-Methyl-Transferasen) spezifisch Arginine (s. Tabelle, Abbildung 8). Da die HKMTs den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellen, werden die PRMTs nur zusammenfassend vorgestellt.

HMTase-Typ	HMTase	Spezifität	Funktion
Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs)	PRMT 1	H4 R3	Transkriptions (Tx) -Aktivierung
	PRMT 2	<i>nicht bekannt</i>	Koaktivator des Östrogenrezeptors
	PRMT 3	<i>nicht bekannt</i>	Zytoplasmatisch (Mitose?)
	PRMT 4 / CARM 1	H3 R2, R17, R26	Tx-Aktivierung
	PRMT 5	H2A, H4	Tx-Repression
Histon-Lysin-Methyltransferasen (mit SET-domäne) (HKMTs)	Su(var)3-9	H3 K9	Heterochromatin-Formation, <i>silencing</i>
	G9a	H3 K9, K27	Tx-Repression (Embryogenese)
	Ash 1	H3 K4, K9, K20	Tx-Aktivierungsmuster, <i>silencing</i>
	Set 1	H3 K4	<i>silencing</i> , Tx
	Set 2	H3 K36	<i>silencing</i> , Tx
	PR Set 7 / Set 8	H4 K20	Entwicklungsprozesse, Altersprozesse?, <i>silencing?</i>
	Set 9	H3 K4	Tx Aktivierung
	Esc-E(z)	H3 K9, K27	Polycomb-vermitteltes <i>silencing</i>
	SETDB1	H3 K9	<i>silencing</i>
SMYD3	H3 K4	Zellzyklusregulation	
HKMT (ohne SET-domäne)	Dot 1	H3 K79	<i>silencing</i> in Hefe

Abbildung 8: Tabellarische Übersicht der bekannten Histonmethyltransferasen und ihrer Spezifität. Tx= Transkription bzw. mit der Transkription assoziiert. Auf die „SET-Domäne“ wird in 2.3.1 eingegangen (ergänzt und modifiziert nach Vaquero et al., 2003).

Beide Aminosäuren können in unterschiedlichem Maße methyliert werden, da an der ϵ -Aminogruppe des Lysins maximal drei (Mono-, Di- und Tri-Methylierung), und an der Guanidinogruppe von Arginin maximal zwei Methylgruppen (Mono- und Di-Methylierung) die Wasserstoffatome substituieren können (Zhang and Reinberg, 2001). Die Dimethylierung der Guanidinogruppe eines Arginins kann dabei entweder „symmetrisch“ oder „assymmetrisch“ erfolgen (s. Abbildung 9), wobei unklar ist, ob dies funktionelle Auswirkungen hat.

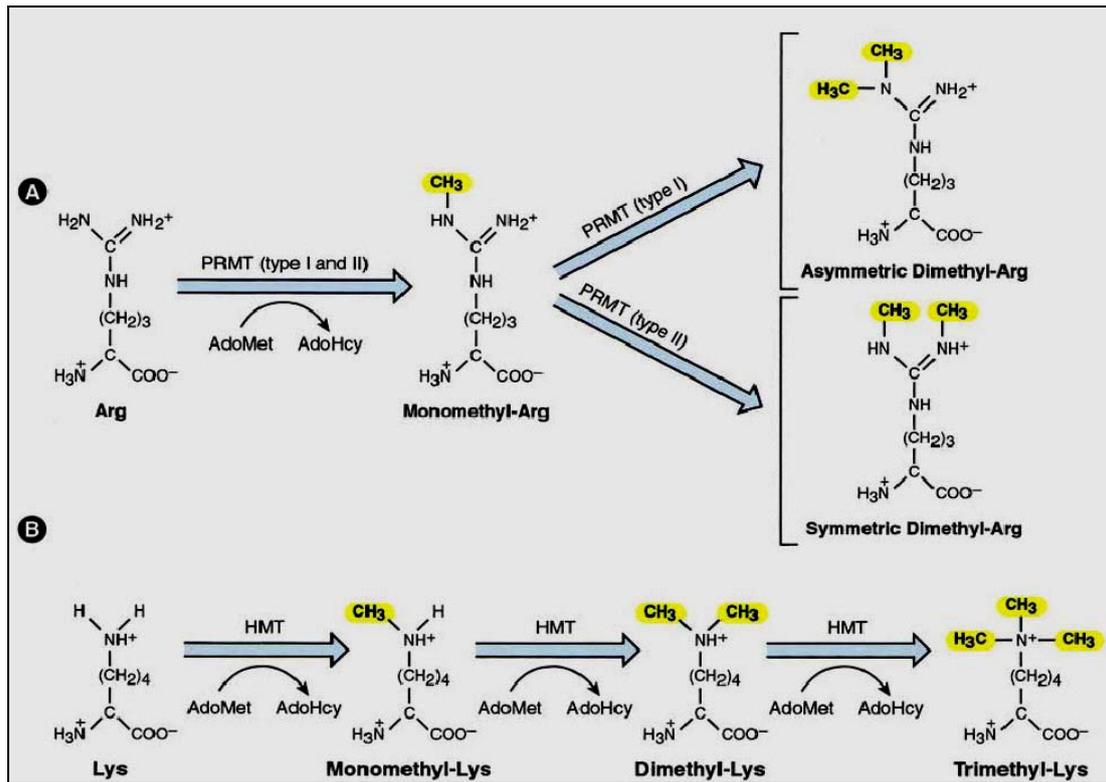


Abbildung 9: Methylierungsreaktionen von Lysinen durch HKMTs und von Argininen durch PRMTs

A: Arginine können mono- und dimethyliert werden

B: Lysine können mono-, di- und tri-methyliert werden

Bei der Methylierung von Argininen wird zwischen einer symmetrischen und einer asymmetrischen Methylierung unterschieden. *AdoMet* = S-Adenosyl-Methionin (SAM); *AdoHcy* = Adenosyl-Homocystein; (Aus Zhang and Reinberg, 2001)

Dieses zusätzliche Komplexitätsniveau der Histonmethylierung kann unterschiedliche Konsequenzen haben: Regulatorische Proteine können je nach Position und Anzahl der Methylgruppen spezifisch an bestimmte Chromatinregionen binden (s. 2.3.2).

Abgesehen von der Deimination monomethylierter Arginine durch die Deiminase PADI4 (Cuthbert et al., 2004) wird insbesondere die Lysinmethylierung als sehr langlebig erachtet (Bannister et al., 2002). Die Acetylierung kann beispielsweise rasch durch eine Deacetylierung wieder rückgängig gemacht werden, was für die dynamische Regulation des Chromatins essentiell ist (s 2.2.2.2). Wahrscheinlich werden deshalb zellspezifische, nicht in der DNA codierte Informationen durch spezifisch methylierte Histone weitergegeben und können nur durch die Inkorporation von neu synthetisierten, und noch nicht posttranslational modifizierten Histonen „gelöscht“ werden (Stichwort Epigenetik, s. 2.5).

Dot1 stellt insofern eine Ausnahme dar, weil sie die einzige HKMTase ist, die im *globulären* Bereich von H3 Lysin 79 methyliert und weil sie keine sog. SET-Domäne aufweist (Feng et al., 2002; Min et al., 2003a). Allen anderen bislang identifizierten HKMTs ist die konservierte SET-Domäne gemeinsam, die diesen HKMTs die enzymatische Aktivität verleiht.

2.3.1. Die SET-Domäne

Von Klein et al. wurde in Erbsen eine Methyltransferase identifiziert: „Rubisco large subunit lysine methyltransferase“ (Klein and Houtz, 1995). Diese Lysinmethyltransferase methyliert jedoch keine Histone, sondern das Pflanzenenzym Rubisco selbst (es ist an der CO₂-Assimilation in Pflanzen beteiligt). Da die Rubisco-Methyltransferase eine der SET-Domäne ähnliche Sequenz enthält, führte dieser Hinweis zur Entdeckung der ersten Histonmethyltransferase, Su(var)3-9, die das Substrat Histon H3 mit Hilfe des Kofaktors S-Adenosyl-Methionin (SAM) an Lysin 9 methyliert (Rea et al., 2000). Jedoch ist nicht jedes Protein mit einer SET-Domäne auch eine HMTase: Von den derzeit weit über 200 bekannten SET-Domänen-Proteinen besitzt die Mehrzahl keine HMTase-Aktivität.

Die SET-Domäne ist ein von der Hefe bis zum *Mensch* konserviertes Motiv, das aus 130 Aminosäuren besteht. Es wurde als erstes in den Proteinen **S**u(var)3-9 (Tschiersch et al., 1994), **E**(z) (Jones and Gelbart, 1993) und **T**ritorax (Stassen et al., 1995) beschrieben (Jenuwein et al., 1998). Die konservierten Aminosäuresequenzen der SET-Domäne konzentrieren sich vorwiegend auf das N- und C-terminale Ende (SET-N bzw. SET-C), während der dazwischen liegende Bereich variabel und auch unterschiedlich lang sein kann (SET-I). Der C-terminale Bereich der SET-Domäne SET-C erreicht den vergleichsweise höchsten Konservierungsgrad (Xiao et al., 2003) durch die Asparagin-Histidin-(Serin)-Sequenz (N-H(S)), die am unmittelbarsten mit der enzymatischen Aktivität der HMTasen in Verbindung steht (s. Abbildung 10).

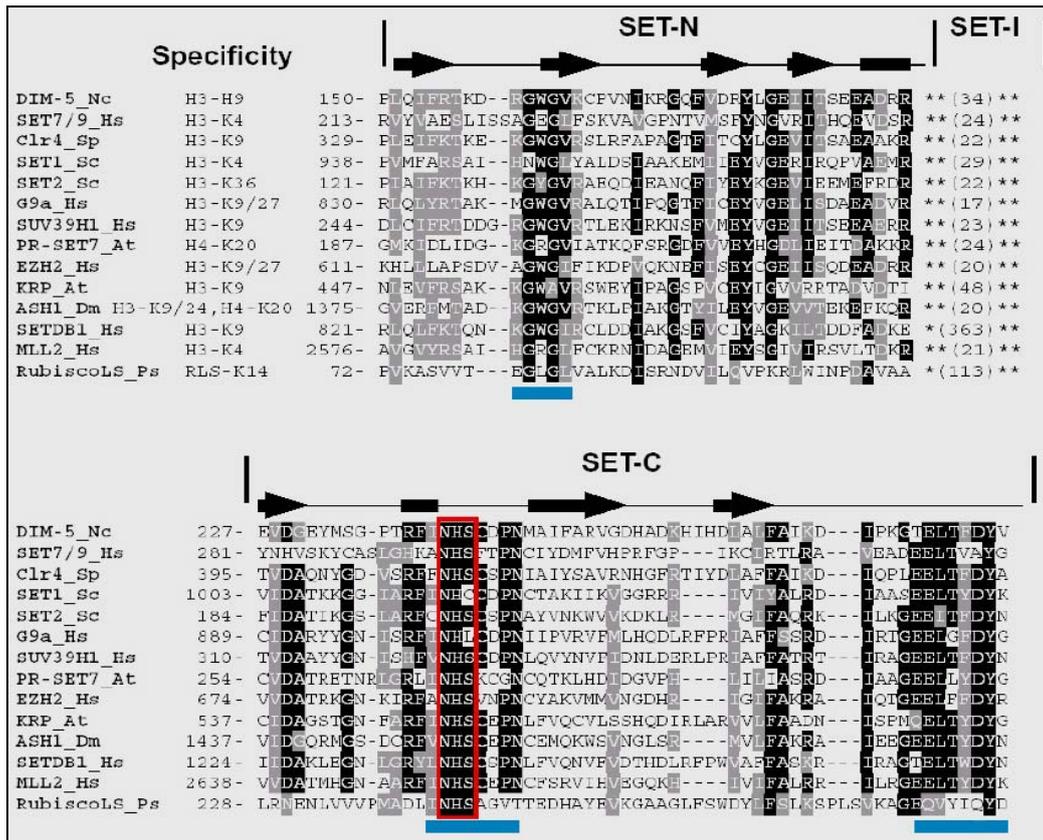


Abbildung 10: Die Aminosäuresequenzen verschiedener SET-Domänen-Proteine. Sequenzvergleich verschiedener HMTasen mit einer SET-Domäne und der Proteinmethyltransferase aus Pflanzen (Rubisco LS = *large subunit*, bzw. große Untereinheit). Die Sequenzvergleiche der SET-N- und SET-C-Bereiche der SET-Domänen sowie die Längen der variablen SET-I-Bereiche sind gekennzeichnet. Identische Aminosäuren sind schwarz und konservative Veränderungen sind grau unterlegt. Die Spezifität (*Specificity*) der Enzyme ist vor der Sequenz angegeben. Die annähernd konservierten Sekundärstrukturen sind überhalb der Sequenzen angedeutet (SET-I besitzt keine konservierten Strukturelemente). Die am höchsten konservierten Bereiche sind unter den Sequenzen blau markiert (die letzteren beiden bilden die sog. „Pseudo-Knoten“-Struktur aus, s.u.). Der rote Kasten markiert die für die enzymatische Aktivität kritischen Aminosäuren.

Abkürzungen: At: *Arabidopsis thaliana*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Hs: *Homo sapiens*; Nc: *Neurospora crassa*; Ps: *Pisum sativum*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Sc: *Schizosaccharomyces cerevisiae* (modifiziert nach Marmorstein, 2003)

Die hoch konservierte *N-H(S)*-Sequenz innerhalb der SET-Domäne ist entlang eines „Pseudo-Protein-Knotens“ des aktiven Zentrums angeordnet, der für die HKMTs charakteristisch ist (Taylor et al., 2003), s. Abbildung 11. Dabei nimmt die positiv geladene Seitenkette des Histidins eine Schlüsselrolle für die enzymatische Aktivität ein. Insgesamt ist die Ladung des aktiven Zentrums jedoch negativ und die Umgebung der SET-Domäne ist relativ neutral geladen. Wahrscheinlich ist es den HKMTasen aufgrund dieser molekularen Anordnung möglich, die Deprotonierung und die darauffolgende Methylierung der Lysine in den Substraten zu katalysieren. Interessanterweise ist die einzige HKMT *ohne* SET-Domäne, Dot1, hinsichtlich der Ladungsverhältnisse seines aktiven Zentrums den SET-HKMTs recht ähnlich und besitzt somit möglicherweise einen ähnlichen Methylierungsmechanismus (Min et al., 2002; Grzymiski, 2003).

Erste Deletionsanalysen an HKMTs führten zu der Annahme, dass nicht nur die SET-Domäne, sondern auch Cystein-reiche Abschnitte vor und nach der SET-Domäne (sog. prä- und post-SET-Domänen) für die Methylierung der Histone nötig seien (Rea et al., 2000). Da diese in einigen SET-Domänen-Proteinen auftreten, war der Verdacht begründet. Zunehmend wurden jedoch auch HKMTasen *mit* einer SET-Domäne, jedoch *ohne* Cystein-reiche prä- und post-SET-Domänen identifiziert (Zhang and Reinberg, 2001). Heute spricht man deswegen von heterogenen, nicht sehr konservierten „Flankendomänen“ mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen, die aber dennoch für die enzymatische Aktivität von großer Bedeutung sind. Die N-flankierende Domäne der SET-Domäne besitzt eine strukturell stabilisierende Funktion für die SET-HKMTasen während die C-flankierende Domäne die Vollständigkeit und die korrekte Funktion des aktiven Zentrums gewährleistet. Alle bisher analysierten Enzymstrukturen von SET-HKMTasen bilden durch die an die SET-Domäne angelagerte C-flankierende Domäne einen Tunnel aus, der dem Substrat den exakten Zugang ermöglicht (Xiao et al., 2003), s. Abbildung 11.

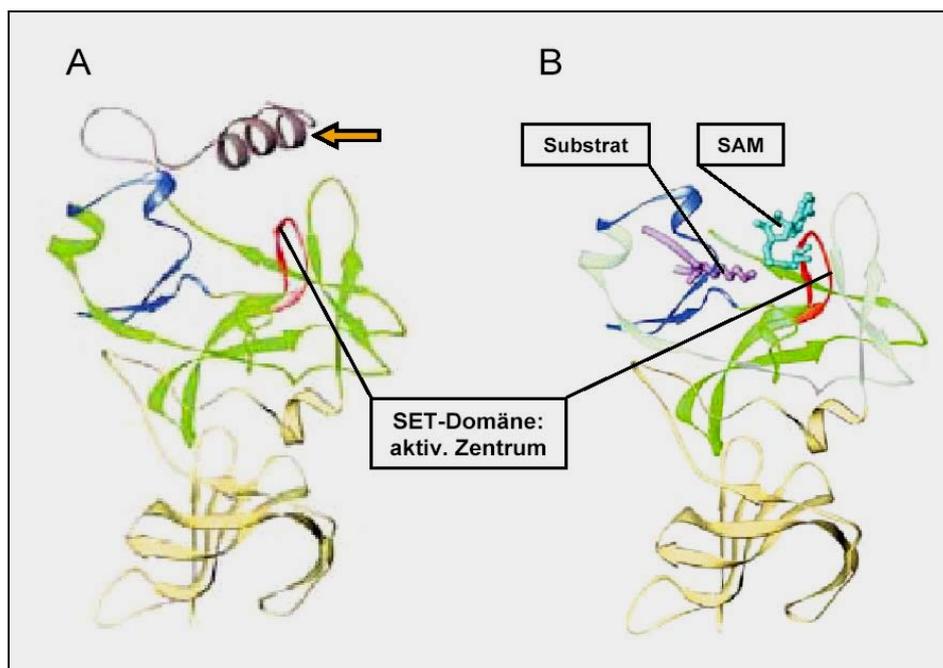


Abbildung 11: Struktur der SET-Domäne am Beispiel der HKMTase Set7/9 (mit Flankendomänen).

A: SET-Struktur mit C-flankierender Domäne (oranger Pfeil).

B: s. A), ohne C-flankierende Domäne mit direkt an der Methylierungsreaktion beteiligten Molekülen.

Die Strukturdarstellungen verdeutlichen, dass die C-flankierende Region der SET-Domäne (oranger Pfeile) für die Konfiguration des aktiven Zentrums eine wichtige Rolle spielt.

SET-Domäne (SET-N und SET-C): grün; variable Region innerhalb der SET-domäne (SET-I): blau; Aktives Zentrum in SET-C: rot; N-flankierender Bereich der SET-Domäne: gelb; C-flankierender Bereich der SET-Domäne: lila. (modifiziert nach Xiao et al., 2003)

Nach Darstellung der Histonmethylierung und der SET-Domäne der HKMTasen, soll auf einige funktionale Aspekte der Histonmethylierung eingegangen werden.

2.3.2. Darstellung einiger Funktionen verschiedener Histonmethylierungen

Bislang konnte keine andere posttranslationale Histonmodifikation mit vergleichbar vielen und unterschiedlichen Zuständen im Chromatin verknüpft werden, wie dies für die Histonmethylierung der Fall ist. Dies gilt vor allem für die insgesamt besser untersuchte Methylierung von Lysinen, auf die der folgende Abschnitt beschränkt ist. Die verschiedenen Zustände sind durch die unterschiedlichen Lokalisationen im Histon-N-Terminus und die variable Anzahl von Methylgruppen (Mono-/ Di-/ Tri-Methylierung) je Lysin-ε-Aminogruppe denkbar vielfältig. Die resultierenden, strukturellen und funktionalen Konsequenzen lassen sich meist nicht voneinander trennen, da sie im unmittelbaren Zusammenhang stehen. Einen Überblick bezüglich der schnellen Entwicklungen auf dem Gebiet der Histonmethylierung gewährt der Artikel *An epigenetic Roadmap* (Lachner et al., 2003).

Das Chromatin soll hinsichtlich bekannter Lysinmethylierungen und deren Implikationen im folgenden Abschnitt abstrahiert werden. Bei der Skizzierung des Chromatins mittels vier verschiedener, „funktionaler Modi“ wird zur Vereinfachung bewusst von Übergangsstadien und von der Dynamik zwischen diesen Zuständen abgesehen:

Konstitutionelles Heterochromatin (1; primär an Zentromer und Telomer lokalisiert),
silencing einzelner Gene und von Chromatinregionen (2),
transkriptionsbefähigtes Chromatin (3; vorwiegend euchromatische Regionen) und
aktiv transkribiertes Chromatin (4; gegenwärtige Transkription).

(1)

Zu Beginn wurde bereits das dicht gepackte Heterochromatin und in diesem Zusammenhang auch das *PEV* dargestellt (Reuter and Spierer, 1992), s. 2.1.1.2. Rea et al. hatten erstmals die HMTase-Aktivität des *PEV*-Suppressors Su(var)3-9 identifiziert, die Histon H3 an Lysin 9 methyliert (Rea et al., 2000). Diese Histonmethylierung führt zur spezifischen Bindung des HP1-Proteins (s.u.) und dadurch zur Induktion von Heterochromatin. Dieser konservierte und durch die Methylierung von H3 K9 initiierte, reprimierende Prozess involviert ein Zusammenspiel aus HMTasen, HP1, HDACs, und DNA-methylierenden Enzymen.

(2)

Die spezifische Repression einzelner Gene ist noch nicht so gut verstanden, wie die Entstehung des konstitutiven Heterochromatins und dessen reprimierender Effekt (Sims, III et al., 2003). Die bislang am besten untersuchte Methylierung an H3 K9 spielt auch hierbei eine zentrale Rolle. In euchromatischen Promotorsequenzen kann ebenfalls HP1 an methyliertes H3 K9 rekrutiert werden. Auf diese Weise wird eine Repression des betroffenen Gens ohne ein sich ausbreitendes Heterochromatin induziert. Die Inaktivierung des Gens kann über Zellteilungen hinweg memoriert werden (Ayyanathan et al., 2003), s. 2.5.

Die Methylierung von K20 in H4 wurde ebenfalls mit transkriptionell inaktivem Chromatin assoziiert (Sims, III et al., 2003; Vaquero et al., 2003), wobei die Charakterisierungen teils widersprüchliche Ergebnisse erbrachten. Da mit der H4 K20 Methylierung viele Ergebnisse für diese Arbeit erbracht wurden, wird in 2.7 und 4. näher auf diese Histonmodifikation und die ausführenden Enzyme eingegangen.

Ein weiterer durch Histonmethylierung vermittelter, von HP1 jedoch unabhängiger *silencing*-Mechanismus für einzelne Gene wird durch die Polycomb-Gruppen-Proteine (PcGs) repräsentiert. Anders als HP1, das spezifisch an trimethyliertes H3 K9 bindet, erkennt das PcG-Protein Polycomb (PC) trimethyliertes H3 K27. Daraufhin kann sich an PC ein Komplex mit reprimierender Wirkung formieren (s. 2.6).

Das Andocken von HP1 bzw. PC an charakteristisch methylierte Lysine in H3 erlaubt folglich beiden *silencing*-Mechanismen ihre Funktion auszuüben. Es ist bemerkenswert, dass diese trimethylierten H3-Lysine, K9 und K27, innerhalb eines sehr ähnlichen Sequenzmotivs vorliegen: Alanin – Arginin – Lysin – Serin (ARKS). Fischle et al. konnten anhand von Strukturanalysen jedoch zeigen, dass PC und HP1 jeweils mit ihrer konservierten Bindungsdomäne (die sog. Chromodomäne (Paro and Hogness, 1991)) die unterschiedlichen Lysine sehr genau diskriminieren können (Fischle et al., 2003). Wird beispielsweise ein HP1-Protein mit der Chromodomäne aus PC konstruiert, so ist das chimere HP1 an PcG-Bindungsstellen in Polytänchromosomen nachweisbar (Platero et al., 1995). Interessanterweise findet durch das chimere HP1 auch eine Rekrutierung von PcG-Proteinen an Heterochromatin statt. Dort werden sie normalerweise nicht vorgefunden und hängen von dem Vorhandensein von E(z) ab (Platero et al., 1996), s. 2.6.1.

Skizziert man grob den Unterschied zwischen beiden *silencing*-Mechanismen, so wirkt sich die Bindung von HP1 an trimethyliertem H3 K9 vorwiegend auf die Struktur aus und in der Folge kommt es zu einer möglichen Repression. Die Bindung von PC an trimethyliertes H3 K27 scheint hingegen direkt mit der Repression von Genen in euchromatischen Bereichen verbunden zu sein, während ein kausaler Zusammenhang mit einer Strukturveränderung bisher nicht aufgezeigt werden konnte (Sims, III et al., 2003), s. 2.6.2.

Die konservierten PcGs sind ferner für die Embryonalentwicklung essentiell und an der Inaktivierung des X-Chromosoms (fakultatives Heterochromatin) beteiligt und sollen aufgrund des Stellenwerts für diese Arbeit in 2.6 gesondert vorgestellt werden.

(3)

Die bereits besprochene Histonacetylierung (2.2.2.1) liegt überwiegend im *dekondensierten* und aktiv transkribierten Chromatin vor. Irrtümlich wurde vormals die Histonmethylierung ausschließlich als Modifikation des „inaktiven“ Chromatins und des Heterochromatins

angesehen. Doch auch das für die Transkription bereitstehende (als „transkriptionspermissiv“ bezeichnete) Chromatin ist mit charakteristischen Histonmethylierungen versehen.

Den ersten Hinweis auf eine transkriptionsassoziierte Rolle von methyliertem Lysin 4 in H3 erbrachten Untersuchungen in *Tetrahymena* (Strahl et al., 1999). In Hefe konnte daraufhin gezeigt werden, dass methyliertes H3 K4 hauptsächlich in euchromatischen Bereichen und von H3 K9-methylierten, heterochromatischen Bereichen abgegrenzt vorliegt. Ferner wird die H3 K4 Methylierung von bereits bestehendem, methyliertem H3 K9 gehemmt (Noma et al., 2001). Hingegen kann Su(var)3-9 Lysin 9 nicht mehr effizient methylieren, wenn zuvor eine Methylierung von Lysin 4 durch die HMTase Set9 stattgefunden hat (Nishioka et al., 2002a), was einer Entstehung von Heterochromatin entgegenwirkt. Entsprechend kann die Bindung des mit transkriptioneller Repression assoziierten *Remodeling*-Komplexes NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylation*, s.2.5) an den H3-Terminus nur erfolgen, wenn Lysin 9 methyliert ist, nicht jedoch wenn Lysin 4 methyliert ist (Nishioka et al., 2002a; Zegerman et al., 2002). Die geringe Entfernung von nur 5 Aminosäuren entlang des H3-N-Terminus zwischen methyliertem K4 und methyliertem K 9 überrascht angesichts der entgegengesetzten Wirkung auf den strukturellen und transkriptionellen Zustand des Chromatins.

Eine weitere HMTase, das Trithorax-Gruppen-Protein Ash1 (s. 2.6) kann ebenfalls eine H3 K4 Methylierung ausführen (Beisel et al., 2002). Die TrxGs werden mit der Aufrechterhaltung embryonal aktivierter Gene verbunden (s. 2.6). Diese Ash1-vermittelte H3 K4 Methylierung könnte ihre transkriptionsfördernde Wirkung möglicherweise durch die inhibierte Bindung des CAF-1 Komplexes erreichen (s. 2.2), der die Nukleosomenassemblierung kanonischer Histone nach der Replikation bewerkstelligt. Dadurch könnte der replikationsunabhängige Einbau der Histonvarianten H3.3 bevorzugt werden, die aktiv transkribiertes Chromatin markiert, s. 2.2.1 (Ahmad and Henikoff, 2002b; Vermaak et al., 2003).

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die HMTase Dot1 und deren K79 Methylierung in der globulären Domäne von H3 (s. 2.3). Die K79 Methylierung kann in Hefe die Ausbreitung von Heterochromatin verhindern und so die Assoziation von Hefe-spezifischen *silencing*-Proteinen (sog. Sirs) verhindern (Feng et al., 2002; van Leeuwen et al., 2002).

Folglich können sowohl methyliertes K4 als auch methyliertes K79 in H3 das Ausbreiten von Heterochromatin verhindern und kennzeichnen somit bestehende euchromatische Regionen, die eine Initiation der Transkription erleichtern oder ermöglichen.

(4)

Kürzlich wurde herausgefunden, dass nicht nur „transkriptionspermissives“, sondern auch gegenwärtig transkribiertes Chromatin von spezifischen Histonmethylierungen markiert wird. Dabei wird der funktionelle Unterschied zwischen den verschiedenen Methylierungsgraden an

derselben Aminosäure deutlich: Die H3 K4 Di-Methylierung findet sich global im Euchromatin, während die von der HMTase SET1 ausgeführte H3 K4 Tri-Methylierung aktiv transkribierte Gene im frühen Initiationsstadium der Transkription kennzeichnet (Ng et al., 2003; Santos-Rosa et al., 2002). Die HMTase SET2, die H3 an Lysin 36 methyliert, wird ebenfalls mit aktiver Transkription verbunden. Es wird ihr die Rolle eines Elongationsfaktors zugeschrieben, denn Sie bindet an das phosphorylierte Carboxy-terminale Ende der größten Unterheit der RNA-Polymerase II (RNAP2). Deletiert man SET2, resultiert ein defekter Elongationsprozess (Li et al., 2002; Li et al., 2003; Krogan et al., 2003).

Ein interessantes und plausibles Modell besagt, dass die SET1-vermittelte H3 K4 Tri-Methylierung eine Signalwirkung hat, gegenwärtig transkribierte Gene nur an den Nukleosomen der Initiationsstelle der Transkription zu markieren, während SET2 als RNAP2-assoziiertes Elongationsfaktor alle Nukleosomen des transkribierten Gens an H3 K36 methyliert (Hampsey and Reinberg, 2003). Die involvierten Histonmethylierungen scheinen epigenetische Markierungen gegenwärtiger oder vorausgegangener transkriptioneller Aktivität zu sein (s. 2.5).

In der Zusammenschau wird deutlich, dass die Histonmethylierung für wesentliche Prozesse innerhalb des Chromatins von großer Bedeutung ist. Viele Fragen hinsichtlich dieser posttranslationalen Histonmodifikation sind jedoch noch unbeantwortet, wovon hier nur einige genannt seien: Was bewirkt ursächlich die Etablierung spezifischer Histonmethylierungen? Wie können bereits bekannte Histonmethylierungen besser charakterisiert werden und welche Methylierungen sind womöglich noch gar nicht entdeckt worden? Welche Mechanismen sind für die postreplikative Aufrechterhaltung der Methylierung verantwortlich (Assemblierung und Methylierung von *de-novo* inkorporierten Histonen)? Wie ist es um die Halbwertszeiten und Erneuerungsraten unterschiedlicher Histonmethylierungen bestellt?

2.4. Gibt es einen Histon-Code?

Neben dem genetischen *Code*, der durch die DNA-Sequenz des Genoms verkörpert wird, soll der propagierte *Histon-Code* durch unterschiedliche und charakteristische Muster verschiedener posttranslationaler Histonmodifikationen die übergeordnete Regulation von Chromatinregionen übernehmen (Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002; Hampsey and Reinberg, 2003). Dies geschieht über regulatorische Faktoren (wie z.B. HP1) durch gezielte Assoziationen mit den modifizierten Histonen. Auf Chromatinebene wird

ein struktureller und genregulatorischer Effekt auf das Erbgut einer Zelle in einem eukaryonten Organismus ausgeübt.

Neben dem „kombinatorisch-statischen“ Histon-*Code*-Modell existiert ein weiteres Konzept, das Parallelen zur inter- und intrazellulären Signaltransduktion herstellt. Der Entwurf einer „vernetzten Signaltransduktion innerhalb des Chromatins“ interpretiert das Zusammenspiel der zahlreichen Histonmodifikationen als primär sequentielles, fluides Ereignis und spricht einzelnen Modifikationen und festen Modifikationskombinationen exklusive Funktionen ab (Schreiber and Bernstein, 2002). Möglicherweise entstehen durch die Histonmodifikationen unterschiedliche „Oberflächen“, die für bestimmte Chromatinregionen charakteristisch sind.

In beiden Konzepten zur Interpretation posttranslationaler Histonmodifikationen geht es um memorierbare und vererbare Formen genetischer Information in eukaryonten Zellen, die nicht in einer DNA-Sequenz des Genoms festgelegt ist und deren Auswirkungen sich neben der DNA-Reparatur und -Replikation insbesondere auf die Regulation der Transkription erstrecken (Schreiber and Bernstein, 2002).

2.5. Histonmethylierung und Epigenetik

Nachdem die in 2.4 angesprochene genetische Information des Histon-*Codes* nicht in Form einer DNA-Sequenz im Genom verankert ist und diese Merkmale trotzdem memoriert (in ruhenden Zellen) und vererbt (in sich teilenden Zellen) werden können, wurde der Begriff **Epigenetik** geprägt (Turner, 2002; Wolffe and Matzke, 1999). Die Verpackung der DNA in Form von Chromatin kann das Expressionsmuster einer Zelle regulieren, was zu einem bestimmten, stabilen Phänotyp führt. Im Gegensatz zur klassischen Vererbung von Genen ist die epigenetische Vererbung jedoch plastischer, da sie modifizierbar und reversibel ist. Diese langfristige und trotzdem dynamische Form der Genregulation wird auch als „transkriptionelles Zellgedächtnis“ bezeichnet (Turner, 2002; Turner, 2003). Ein illustratives Beispiel für Epigenetik und dessen von der DNA-Sequenz unabhängige Memorierung stellt die bereits erwähnte Inaktivierung nur eines der beiden X-Chromosome in Säugetieren dar, welche klonal in Tochterzellen memoriert wird (s. 2.1.1.2).

Die Mechanismen der epigenetischen Memorierung sind vielfältig und erstrecken sich neben den posttranslationalen Histonmodifikationen unter anderem auf die Nukleosomenassemblierung (2.2), die Histonvarianten s. 2.2.1, die *Remodeling*-Faktoren sowie auf die DNA-Methylierung. Als integratives Beispiel für epigenetische Genregulation soll die Verzahnung dieser Mechanismen zur Etablierung, Memorierung und Weitergabe einer reprimierten Chromatinregion dargestellt werden.

Ein weiteres Merkmal des Heterochromatins (ähnlich der H3 K9 Methylierung) ist die Cytosin-Methylierung der DNA. Die DNA-Methylierung wird schon lange mit Repression in Verbindung gebracht (Riggs, 1975; Holliday and Pugh, 1975; Jaenisch and Bird, 2003). In neueren Erkenntnissen über die gegenseitige Abhängigkeit von DNA-Methylierung und Histonmethylierung konnte demonstriert werden, dass die Histonmethylierung von H3 K9 in der Lage ist, die DNA-Methylierung in *Arabidopsis thaliana*, in *Neurospora crassa* und in Säugetieren zu dirigieren. Dies stellt eine kausale Verknüpfung zwischen beiden Heterochromatinattributen her, die auf der Histonmethylierung fußt (Jackson et al., 2002; Tamaru et al., 2003; Lehnertz et al., 2003).

Eine weitere, schon zuvor gemachte Beobachtung passt gut in das Bild einer mit DNA-Methylierung einhergehenden Repression: Der NuRD-Komplex (*nucleosome remodeling and deacetylation*) kann in methylierten DNA-Bereichen an das Chromatin rekrutiert werden. Vermutlich kann der NuRD-Komplex durch eine kombinierte *Remodeling*- und HDAC-Aktivität eine Mobilisation der regionalen Nukleosomenverbände bewirken und dadurch sehr effektiv die Histone deacetylieren (Zhang et al., 1999; Becker and Horz, 2002). Die Histondeacetylierung ist meist mit *silencing* verbunden und es ist wahrscheinlich, dass die Deacetylierung von Lysinen anschließenden Histonmethylierungen den Weg bereitet, indem Lysine zuerst von vorhandenen Acetylgruppen befreit werden. Dieser Mechanismus wurde bereits für Su(var)3-9 und dessen assoziierte Histondeacetylase HDAC1 bzw. Rpd3 gezeigt (Rea et al., 2000; Czermin et al., 2001), s. 2.2.2.2 und 2.6.1. Nach der erfolgten H3 K9 Methylierung eines deacetylierten Nukleosoms könnte dieses wiederum als propagierender Faktor für die DNA-Methylierung im umliegenden Chromatinbereich fungieren. Letztlich würde dies in einem memorierbaren und selbstverstärkenden Kreislauf zur Induktion von Heterochromatin und zur Inaktivierung von Genen münden, dessen Ausbildung und Aufrechterhaltung die Histonmethylierung und die DNA-Methylierung gewährleisten. Da die Histonmethylierung die stabilste aller posttranslationalen Histonmodifikationen ist, muss angenommen werden, dass die Unterbrechung dieses Vererbungsmodells eines reprimierten Zustandes am wahrscheinlichsten durch den Einbau von *de novo* synthetisierten, nicht-modifizierten Histonen möglich ist.

Für die mitotische Weitergabe des geschilderten *silencings* könnte die DNA-Methylierung essentiell sein, um eine korrekte Platzierung der H3 K9 Methylierungen im Chromatin zu bewerkstelligen: Eine DNA-Methylase gleicht nach der Replikation die Methylgruppen des Matrizenstranges mit dem neu synthetisierten Strang ab und ersetzt die fehlenden Cytosinmethylierungen (Wolffe and Matzke, 1999). Die Aufteilung methylierter Histone aus der mütterlichen Zelle nach der Replikation auf beide Genome ist zwar wahrscheinlich, doch ist nicht bekannt, ob die jeweiligen Histone mit einer spezifischen Systematik für eine lokal gezielte Nukleosomenassemblierung eingesetzt werden (s. 2.2). Möglicherweise teilen sich

auch die verschiedenen Abläufe die Aufgabe der Weitergabe desselben epigenetischen Merkmals (Schreiber and Bernstein, 2002).

Die epigenetisch memorierbare Form der Repression durch DNA- und insbesondere durch Histon-Methylierungen (s.o.) ist ebenso unter medizinischen Gesichtspunkten relevant, wie Untersuchungen zum Prader-Willi-Syndrom ergeben haben. In embryonalen *Maus*-Zellen konnten die spezifischen DNA-Methylierungen im maternalen „Prader-Willi-Syndrom Imprinting-Center“ ohne die vorhandene Aktivität der H3 K9 HMTase *G9a* nicht aufrechterhalten werden. Hingegen ist die H3 K9 Methylierung im Bereich des *Imprinting-Centers* nicht beeinträchtigt, wenn die DNA-Methylierung durch Deletion der DNA-Methylase *Dnmt1* verhindert wird (Xin et al., 2003), was die Bedeutung der Histonmethylierung für die Initiation und Aufrechterhaltung des transkriptionellen Aktivitätszustandes eines Chromatinbereiches unterstreicht.

2.6. Polycomb- und Trithorax-Gruppen-Proteine

Die nukleären PcG-Proteine sind seit Jahrzehnten für die Repression und die TrxG-Proteine für die Aufrechterhaltung der Aktivierung der transkriptionellen Aktivität in *Drosophila melanogaster* bekannt. Sie wurden als ein „uraltetes epigenetisches Memorierungssystem“ bezeichnet, dessen Wirkungsweise seit einigen Jahren durch die funktionale Assoziation mit bestimmten Histonmethylierungsmustern zunehmend besser verstanden wird (Lund and van Lohuizen, 2004).

Durch revolutionäre Erkenntnisse in Untersuchungen zur Embryonalentwicklung in *Drosophila melanogaster* von Nüsslein-Volhard et al. wurde gezeigt, dass in der unbefruchteten Oozyte räumlich geordnete sog. maternale, „morphogene Gradienten“ vorliegen (Nüsslein-Volhard et al., 1987; St Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992). Dabei handelt es sich um noch in der Oozyte transkribierte Gene, deren Produkte sich lokal im Zytoplasma anreichern. Die entstandenen oozytären Gradienten maternaler Genprodukte legen durch eine Transkriptionsmodulation zygotischer Gene somit bereits vor der Befruchtung morphologische Informationen für den Embryo fest. Auf der Grundlage der von den maternalen Morphogenen vorgegebenen Gradienten wird die anterior-posterior Achse durch die zygotischen *gap*-Gene grob untergliedert. Unter dem Einfluss einer aus zygotischen *gap*-, *pair-ruled*- und *segment-polarity*- Genen bestehenden Regulationskaskade werden entlang der anterior-posterior Körperachse noch vor der Gastrulation des Embryos 14 sog. Parasegmente ausgebildet. Die Identität jedes einzelnen Parasegments (die sich zu den Segmenten der adulten Fliege weiterentwickeln werden), wird dabei von einem oder mehreren sog. *homeotischen Genen* (*hox*-Gene) determiniert, deren spezifische Aktivität

initial von den maternalen Genen etabliert wird. Bemerkenswerterweise werden die jeweiligen *hox*-Gene nur in jenem Körpersegment exprimiert, in welchem sie als globale Transkriptionsfaktoren fungieren. Die konservierten *hox*-Gene, die durch ihre gemeinsame „Homeobox“-Domäne definiert sind (Lewis, 1978), kontrollieren somit die segmentspezifische Expression von Genen (Simon, 1995). Die Expression von *hox*-Genen wird bereits 2h nach Beginn der Embryogenese beobachtet. Sie gewährleisten somit während der darauffolgenden Tage die stabile, segmentspezifische Genexpression.

Da jedoch die maternalen Faktoren nur in sehr frühen Entwicklungsphasen vorliegen, muss wiederum der aktive oder inaktive Zustand von *hox*-Genen in der weiteren Entwicklung zuerst festgelegt und daraufhin im adulten Organismus aufrechterhalten werden. Nur so kann die von *hox*-Genen kontrollierte, segmentspezifische Genexpression gewährleistet werden. Hierfür sind die PcG- und TrxG-Proteine verantwortlich (Francis and Kingston, 2001), deren funktionale Homologe im Kontext ähnlicher, übergeordneter Mechanismen auch in anderen höheren Eukaryonten existieren. Die Aufgabe der PcG-Proteine besteht in der fortwährenden Repression inaktivierter *hox*-Gene, während die TrxG-Proteine die Transkription aktivierter *hox*-Gene wahren (s. Abbildung 12).

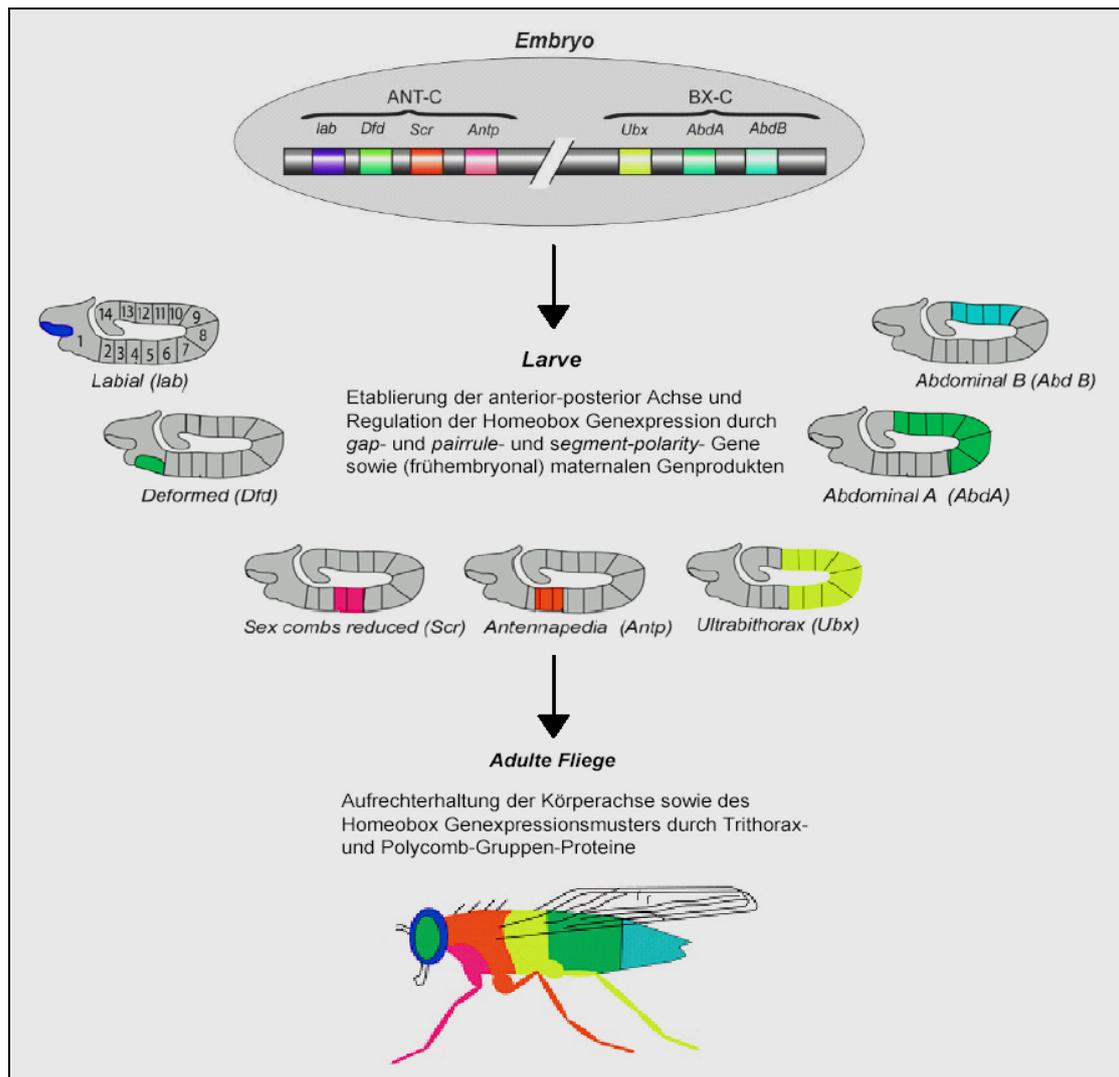


Abbildung 12: Embryonalentwicklung bei *Drosophila melanogaster* (schematisch).

Oben: Schematische Darstellung der Anordnung der homöotischen Gene in *Drosophila*. Diese sind unterteilt in den Antennapedia-Komplex (ANT-C) sowie den Bithorax-Komplex (BX-C).

Mitte: Expression der einzelnen Proteine in den verschiedenen Segmenten.

Unten: Kontrolle der Fliegen-Körperteile durch die einzelnen homöotischen Gene.

(aus Imhof and Seitz, 2003)

PcG-Mutationen führen in *Drosophila* zur De-Repression von *hox*-Genen und in der Folge zu schweren, segmentalen Transformationen entlang der Körperachse. Auch in Wirbeltieren sind die PcG-Proteine für eine normale Embryonalentwicklung essentiell (Faust et al., 1998; O'Carroll et al., 2001), s. 2.6.1.

Die TrxG-Proteine sind im Vergleich zu den PcG-Proteinen bisher weniger intensiv untersucht worden. Es gibt Hinweise auf einen „repressiven Normalzustand“ durch die Dominanz von PcG-Proteinen. Wird die zelluläre Konzentration eines TrxG-Proteins reduziert, resultiert eine inadäquate Steigerung der Genrepression. Offensichtlich können TrxG-Proteine die Dominanz der PcG-vermittelten Repression durchbrechen und dadurch transkriptionsaktivierend wirken, ohne selbst an der Initiation der transkriptionellen Aktivität beteiligt zu sein (Poux et al., 2002). Untersuchungen zum TrxG-Protein Ash1 brachten ein

spezielles Methylierungsmuster hervor (H3 K4, H3 K9 und H4 K20), das dieses SET-Domänen Protein bewerkstelligen kann. Ash1 kann durch diese Histonmodifikationen eine Bindungsstelle für *Remodeling*-Faktoren (*Brahma* und *Moira*) herstellen und zugleich eine Bindung von reprimierenden Proteinen wie HP1 oder PC verhindern (Beisel et al., 2002). Indem sie die Bindung von PcG-Komplexen boykottieren und transkriptionsassoziierten Faktoren den Zugang erleichtern, könnten TrxG-Komplexe mit Ash1 den aktiven Zustand von Genen quasi *passiv* aufrechterhalten.

Die multiplen PcG-Proteine sind in eukaryonten Zellen in mehreren Komplexen organisiert (s. Abbildung 13). Die beiden wichtigsten identifizierten Komplexe heißen **Polycomb repressive complex 1 (PRC1)** (Shao et al., 1999; Levine et al., 2002), sowie **Enhancer of Zeste–Extra sex combs Komplex (E(z)-Esc- oder PRC2-Komplex** genannt) (Czermin et al., 2002; Cao et al., 2002; Muller et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002).

<i>Drosophila</i> Proteine		Humane Proteine	Maus Proteine
PRC2-/ E(z)-Esc-Komplex („Initiations-Komplex“)			
Esc	Extra sex combs	EED	Eed
E(z)	Enhancer of Zeste	EZH1	Ezh1/Enx2
		EZH2	Ezh2/Enx1
Su(z)12	Suppressor of Zeste 12	SUZ12	
PRC1-Komplex („Aufrechterhaltungs“-Komplex)			
Pc	Polycomb	CBX2/HPC1 CBX4/HPC2 CBX8/HPC3	Cbx2/M33 Cbx4/Mpc2
Ph	Pleiohomeotic	EDR1/HPH1 EDR2/HPH2 EDR3/HPH3	Edr1/Mph1/Rae28 Edr2/Mph2
dRING		RING1/RNF1/RING1A RNF2/RING1B	Ring1/Ring1a Rnf2/Ring1b
Psc	Posterior sex combs	BMI1 RNF110/ZFP144 ZNF134	Bmi1 Rnf110/Zfp144/Mel-18 Znf134/Mblr
Pho	Pleiohomeotic	YY1	Yy1
Pho-like	Pleiohomeotic-like		
Scm	Sex combs on midleg	SCML1 SCML2	Scmh1 Scmh2
Pcl	Polycomb-like	PHF1	

Abbildung 13: Die PcG-Komplexe PRC1 und E(z)-Esc (bzw. PRC2) in verschiedenen Eukaryonten. Aufgelistet sind die Proteine, aus welchen sich die PcG-Komplexe PRC1 bzw. E(z)-Esc zusammensetzen. Für in *Drosophila* identifizierte Proteine konnten in höheren Eukaryonten konservierte Homologe identifiziert werden. (Modifiziert nach Valk-Lingbeek et al., 2004)

Genetische und biochemische Untersuchungen zeigten, dass der PRC1- und der E(z)-Esc-Komplex bei der PcG-vermittelten Repression von *hox*-Genen zusammenwirken, auch wenn die jeweiligen Proteine beider Komplexe in ihrer Zusammensetzung mäßig variieren können (Otte and Kwaks, 2003; Tie et al., 2003).

Da die Ergebnisse dieser Arbeit zum Teil mit E(z) erbracht wurden, sollen im folgenden Abschnitt E(z) und der E(z)-Esc-Komplex dargestellt werden, bevor auf das funktionale Zusammenspiel der beiden PcG-Proteinkomplexe PRC1 und E(z)-Esc näher eingegangen wird (s. 2.6.2).

2.6.1. Enhancer of Zeste (E(z)) und der 600kDa E(z)-ESC-Komplex

Das PcG-Protein E(z) ist ca. 87kDa groß, besitzt eine C-terminale (für HKMTasen charakteristische) SET-Domäne und wurde erstmals von Jones et al. als chromosomales Protein charakterisiert (Jones and Gelbart, 1993). Desweiteren sind zwei konservierte sog. SANT-Domänen enthalten, die häufig in Chromatin-assoziierten Komplexen vorkommen und für die Interaktion mit den Histon-N-Termini verantwortlich sein sollen (Boyer et al., 2002). Es sind Homologe in anderen Eukaryonten bekannt, z.B. MES2 in *C. elegans*, EZH2 bzw. ENX und EZH1 in Säugetieren. Das Homolog Ezh1 wird dabei vorwiegend in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien, und Ezh2 vorwiegend während der Embryonalphase exprimiert. Jedoch bleibt die Expression von E(z) im Gegensatz zum PcG-Protein Extra-Sex-Combs (Esc; s.u.) in allen Entwicklungsstufen von *Drosophila* nachweisbar. Die Überexpression von E(z) bewirkt eine Verstärkung der *PEV* in *Drosophila* (Laible et al., 1997). Das ist insofern interessant, da E(z) offensichtlich an zwei unterschiedlichen *silencing*-Mechanismen beteiligt ist: Die *PEV*, welche durch die Chromatinstruktur des Heterochromatins *silencing* bewirkt, und die PcG-Proteine, welche über die Rekrutierung von PRC-Komplexen *silencing* bewerkstelligen (s. 2.3.2 2).

Eine Deletion des E(z)-Homologs Ezh2 in Mäusen führt zum Absterben der Embryonen in frühen Entwicklungsstadien (embryonal lethal), was eine essentielle Rolle von E(z) während der Embryonalentwicklung belegt (O'Carroll et al., 2001).

Die HMTase-Aktivität von E(z) war bereits länger vermutet worden, doch mit rekombinantem E(z) scheiterte der Nachweis einer HMTase-Aktivität (Rea et al., 2000). Diese konnte erst später nachgewiesen werden, da E(z) nur im Komplex mit den anderen Proteinen des E(z)-Esc-Komplexes HMTase-Aktivität entwickeln kann. Relativ zeitgleich wiesen vier Arbeitsgruppen unabhängig voneinander nach, dass der E(z)-Esc-Komplex spezifisch H3 an Lysin 27, und teilweise an Lysin 9 methyliert (Czermin et al., 2002; Cao et al., 2002; Muller et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002). Die wahrscheinlich methodisch bedingten, geringgradig voneinander abweichenden Zusammensetzungen der identifizierten E(z)-Esc-Komplexe, spiegeln sich möglicherweise in den teils unterschiedlichen Substrataffinitäten und den unterschiedlichen Ergebnissen zur H3 K9 Methylierung wieder. Jedoch methylieren alle E(z)-Esc-Komplexe H3 K27 und enthalten die folgenden vier Proteine:

E(z), Esc, p55 und Suppressor of Zeste 12 (Su(z)12) (s. Abbildung 13).

Da in unserem Labor mit dem 600kDa-E(z)-Esc-Komplex gearbeitet wurde (Tie et al., 2001), welcher zusätzlich das Protein Rpd3 enthält, sollen diese fünf Proteine nun kurz dargestellt werden.

Esc:

Esc ist ein 55kDa großes, konserviertes Protein, für welches Homologe in *C. elegans*, *Maus* und *Mensch* bekannt sind. Die propagierte, propellerartige Struktur dieses Proteins (Ng et al., 1997) kommt durch die ca. 7 sog. WD40-Domänen zustande, die dem Protein eine hohe Proteaseresistenz verleihen (Tie et al., 1998) und für die effektive Wechselwirkung mit anderen Proteinen verantwortlich gemacht wird. Die Interaktion von E(z) mit Esc ist in *Drosophila*, *Maus* und *Mensch* konserviert (Jones et al., 1998). Interessanterweise und untypisch für PcG-Proteine wird Esc offensichtlich nur während der Embryogenese für das initiale *silencing* von *hox*-Genen benötigt, da es in späteren Entwicklungsphasen nicht mehr nachweisbar ist (Struhl and Brower, 1982; Gutjahr et al., 1995; Ng et al., 1997).

Eine durch Esc vermittelte dynamische Substratspezifität von E(z)-Esc-Komplexen wurde von Peters et al. aufgedeckt. Je nach Länge unterschiedlicher Esc-Isoformen (durch unterschiedliche Transkriptions-Startpunkte derselben Esc-mRNA) werden E(z)-Esc-Komplexe gebildet, die sich in der Methylierung von H1 K26 und H3 K27 unterscheiden. Der E(z)-Esc-Komplex mit der längsten Esc-Isoform (PRC2) methyliert bevorzugt Histon H1 an Lysin 26 und kann H3 nur dann methylieren, wenn es nicht in einem Nukleosomenverband vorliegt. Kürzere Esc-Isoformen im E(z)-Esc-Komplex (genannt: „PRC3“) hingegen methylieren auch nukleosomales H3 an K27 und werden durch die Anwesenheit von H1 sogar inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass die H1 K26-Methylierung für das von E(z) vermittelte *silencing* benötigt wird (Kuzmichev et al., 2004).

Su(z)12:

Dieses ca. 100kDa große PcG-Protein ist in Pflanzen und Wirbeltieren hoch konserviert und besitzt eine sog. Zinkfinger-Domäne (ein häufiges DNA-Bindungsmotiv). Ähnlich wie E(z) spielt auch Su(z)12 in dem PcG-unabhängigen *silencing*-Prozess der Heterochromatin-assoziierten *PEV* eine wichtige Rolle (Birve et al., 2001). Eine biochemische Erklärung hierfür liefert die nachgewiesene Interaktion von Su(z)12 sowohl mit EZH2 (E(z)-Homolog in Säugetieren), als auch mit HP1 (HP1 α).

Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein zusammen mit E(z) und Esc für die katalytische Aktivität des E(z)-Esc-Komplexes essentiell ist. Wird Su(z)12 in humanen Zellen genetisch unterdrückt (*knockdown*-Experiment), resultiert eine reduzierte H3 K27 Methylierung und eine Expression zuvor reprimierter *hox*-Gene (Cao and Zhang, 2004a).

p55:

Wie auch Esc ist p55 ein hochkonserviertes Protein mit 7 WD40-*repeats* und spielt in vielen chromatinassoziierten Komplexen eine Rolle, z.B. als Bestandteil von CAF-1 (Tyler et al., 1996) s. 2.2, HAT1 und NURF (ein Iswi-enthaltender Nukleosomen-Remodelling-Faktor)

(Martinez-Balbas et al., 1998). Die beobachtete Fähigkeit von p55 an Chromatin zu binden, beruht vor allem auf der Assoziation mit den Histonen H4 und H2A (Martinez-Balbas et al., 1998; Verreault et al., 1998). Nur 5% des ubiquitär nukleären Proteins sind im E(z)-Esc-Komplex enthalten (Tie et al., 2001). Durch ausgeprägte Protein-Protein-Interaktionen kann p55 gut mit den Histonen interagieren (s.a. Interaktion von Esc mit E(z)). Wahrscheinlich können p55 und Esc auf diese Weise zur Methylierung von H3 K27 beitragen, indem sie die SET-Domäne von E(z) gezielt an das Substrat heranführen.

Rpd3:

Die Histondeacetylase Rpd3 findet sich in mehreren nukleären Komplexen. Homologe kommen in vielen Eukaryonten vor. Rpd3 gehört zu den Klasse 1-HDACs (s. 2.2.2.2) und wurde bei der Suche nach *PEV*-beeinflussenden Mutationen entdeckt (De Rubertis et al., 1996). Zusammen mit p55, Esc und E(z) wurde Rpd3 erstmals in einer wichtigen Komplexcharakterisierung von Tie et al. identifiziert (Tie et al., 2001).

Rpd3 kann durch die Deacetylierung von Promotoren sowohl einzelne Gene reprimieren (Kadosh and Struhl, 1997), als auch zu einer Repression größerer chromosomaler Abschnitte führen (Vogelauer et al., 2000). Bei der Analyse Rpd3-depletierter Hefezellen wurden im gesamten Genom zusätzlich vorhandene Acetylgruppen detektiert. Man nimmt deswegen an, dass Rpd3 genomweit deacetylieren kann (Robyr et al., 2002). Die Repression nach der Deacetylierung wird im komplexen Zusammenspiel aus Histon- und DNA-Methylierungen zusammen mit chromatinassoziierten Proteinen bewerkstelligt (s. 2.3.2 und 2.5).

2.6.2. PcG-vermitteltes *silencing* durch den PRC1- und E(z)-Esc-Komplex

Der Nachweis der E(z)-vermittelten HMTase-Aktivität des E(z)-Esc-Komplexes vorwiegend an H3 K27 (s. 2.6.1) hat für das Verständnis des PcG-vermittelten, epigenetischen *silencing*-Mechanismus und dessen Memorierung eine Schlüsselrolle gespielt.

Seit längerem war bekannt, dass sich die Zielgene für die PcG-Komplexe in *Drosophila* durch sog. Polycomb response elements (*PRE*) auszeichnen (Simon et al., 1993; Lyko and Paro, 1999). An den *PREs* wurde das PcG-Proteins Polycomb (PC) entdeckt, das an der Aufrechterhaltung der *hox*-Genexpression mitbeteiligt ist (Strutt et al., 1997). Welche Eigenschaft auf molekularer Ebene für die Bindung des PRC1-Proteins PC an die heterogenen *PREs* verantwortlich ist, war damals jedoch nicht bekannt.

Dafür wurde schon länger spekuliert, warum das PcG-Protein Pho (Bestandteil von PRC1) ebenfalls an den *PREs* nachweisbar ist. Wahrscheinlich bindet es mit seinem DNA-Bindungsmotiv an das *PRE* und spielt eine Rolle bei der Rekrutierung des E(z)-Esc-

Komplexes (Poux et al., 2001). Wie in 2.3.2 2 bereits detailliert besprochen, kann der E(z)-Esc-Komplex durch die Trimethylierung von H3 K27 eine hochspezifische Bindungsstelle für PC herstellen, das ein wichtiger Bestandteil des PRC1-Komplexes ist (s. Abbildung 13). Anschließend kann sich der PRC1-Komplex an dem gebundenen PC assemblieren und so die PcG-Zielgene in *Drosophila* reprimieren. Kirmizis et al. gelang es erstmals auch in *humanen* Zellen PcG-Zielgene durch die H3 K27 Methylierung zu identifizieren (Kirmizis et al., 2004). In einer weiteren Publikation wird gezeigt, dass an aktiven Promotoren fast kein E(z) und kein PC nachweisbar ist und in reprimierten Regionen ein hoher Anteil von trimethyliertem H3 K9 und K27 vorliegt (Breiling et al., 2004).

Der Trimethylierung von H3 K27 scheint ein epigenetischer Mechanismus zugrunde zu liegen, in welchem der E(z)-Esc-Komplex eine *initiierende* Rolle und der PRC1-Komplex eine *propagierende* Rolle zu spielen scheint (Lund and van Lohuizen, 2004). Der geschilderte PcG-silencing-Mechanismus durch die PRC1- und E(z)-Esc-Komplexe wird durch die Beobachtung gestützt, dass die PC-Proteine über deren Chromodomänen zur Dimerisierung tendieren (Min et al., 2003b): Das an trimethyliertes H3 K27 gebundene PC-Protein könnte durch die Dimerisierung und die darauffolgende Anlagerung der restlichen PRC1-Komponenten zu einem regelmäßigen und kondensierteren Nukleosomenverband führen (s. Abbildung 14).

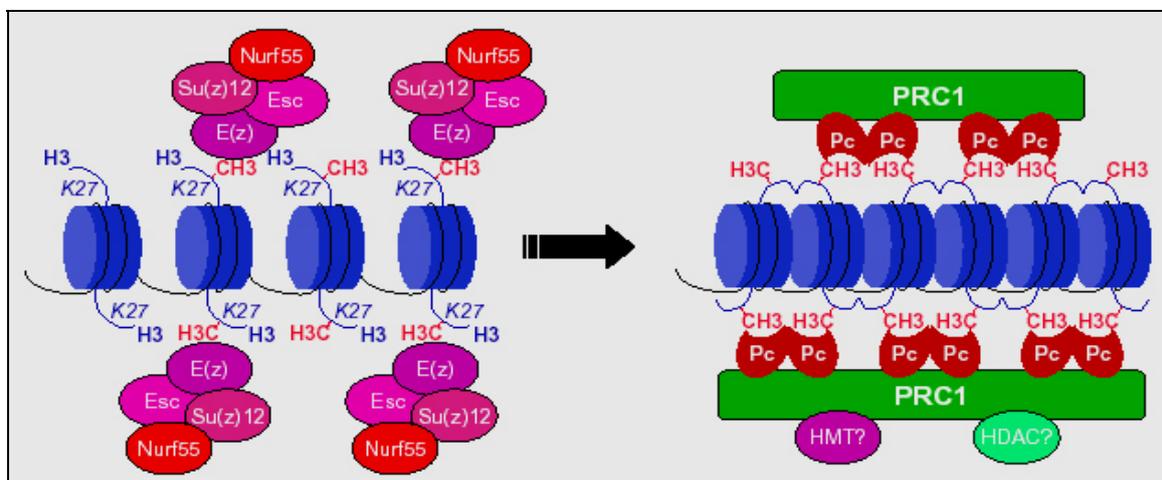


Abbildung 14: Modell für PcG-vermittelte Repression durch den E(z)-Esc- und den PRC1-Komplex. In den frühen Entwicklungsstadien (und möglicherweise nach der Zellteilung) wird der E(z)-Esc-Komplex an die PcG-Zielgene im Genom rekrutiert und trimethyliert dort vorwiegend Histon H3 an K27 (*links*). Diese Methylierung stellt eine Markierung für die Bindung von PC und somit für die Rekrutierung der PRC1-Komplexproteine dar. Die PRC1-Komplexassemblierung wird zusätzlich durch sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine unterstützt. *Rechts* ist die Dimerisierung von PC angedeutet, die mutmaßlich die kompakte Chromatinstruktur fördert. (Aus Lund and van Lohuizen, 2004).

Mutationsversuche im Rahmen der Charakterisierung des E(z)-Esc-Komplexes unterstützen ebenfalls dieses PcG-silencing-Modell: Wenn die HMTase-Aktivität von E(z) durch eine Mutation in der SET-Domäne erlischt, ist kein PC-Protein mehr an den *PREs* nachweisbar

(Czermin et al., 2002). Die darauffolgende „*De-Repression*“ zuvor stillgelegter *hox*-Gene passt gut zu diesem Modell des PcG-vermittelten *silencing*-Mechanismus (Muller et al., 2002).

Während die Deletion von E(z) in Mäuseembryonen lethal ist (O'Carroll et al., 2001), kann die Deletion von PRC1-Proteinen (aufgrund von teilweise funktionaler Redundanz) bis zur Geburt überlebt werden (van der Lugt et al., 1994; Takihara et al., 1997; Bel et al., 1998). Auch diese Resultate legen die Rolle des E(z)-Esc-Komplexes als Initiations-Komplex im PcG-vermitteltem *silencing* nahe.

Durch welche Mechanismen bewirkt das Zusammenspiel von PRC1 und E(z)-Esc die Repression? Die Rekrutierung von HDACs erscheint im Zusammenhang mit *silencing* plausibel. Am E(z)-Esc-Komplex (600kDa-E(z)-Esc-Komplex) konnte die Assoziation der Deacetylase Rpd3 nachgewiesen werden (Tie et al., 2001; Czermin et al., 2002), jedoch herrscht noch Uneinigkeit darüber, an welchem der beiden PcG-Komplexe Rpd3 nun tatsächlich assoziiert ist (Otte and Kwaks, 2003).

Untersuchungen *in vitro* mit PRC1 aus *Drosophila* ergaben, dass an Nukleosomen gebundene PRC1-Komplexe das *Remodeling* durch Swi/Snf-Proteine blockieren (Shao et al., 1999). Die Nukleosomen können somit nicht entlang der DNA mobilisiert werden, was einer transkriptionellen Aktivität entgegenspricht. Ein aus humanen Zellen isolierter PRC1-Komplex teilt diese Eigenschaft und illustriert die hohe Konservierung der PcG-Proteine sowie deren Aufgaben (Levine et al., 2002). Desweiteren ist denkbar, dass andere, transkriptionserleichternde Faktoren (z.B. TrxG-Proteine wie Ash1) nicht an H3 K27 trimethyliertes, PRC1-bekleidetes Chromatin andocken können (Lund and van Lohuizen, 2004). Diese Struktur ließe die Bindung der RNA-Polymerase II zwar noch zu, aber eine Initiation der Transkription von Zielgenen wäre nicht mehr möglich (Dellino et al., 2004).

Da die PcG-Proteine bestimmte *hox*-Gene (und damit die Aufrechterhaltung segmentaler Expressionsmuster) von der Embryonalphase bis zu adulten Organismen reprimieren, muss die Information in einer epigenetisch memorierten Form über Zellteilungen hinweg konserviert werden. Die PRC1-Bindung vermittelnde H3 K27 Methylierung könnte nach der Replikation (ähnlich der DNA-Methylierung) durch eine von Tagami et al. vorgeschlagene, semikonservative Nukleosomenassemblierung aufrechterhalten werden (Tagami et al., 2004). Diese Hypothese propagiert die Aufteilung eines „elterlichen“ H3-H4-Tetramers in zwei H3-H4-Dimere, die sich noch vor der Zellteilung symmetrisch an beide DNA-Fäden anlagern. Somit würde auf jedem Strang eine „Schablone“ mit dem Muster des *epigenetischen Gedächtnisses* der Vorläuferzelle für die neu synthetisierten, nicht-modifizierten H3-H4-Dimere in beiden Tochterzellen vorliegen (Lund and van Lohuizen, 2004). Möglicherweise spielen bei der Aufrechterhaltung des PcG-*silencings* aber auch direktere Interaktionen

zwischen Histonmethylierung und DNA-Methylierung eine Rolle, wie sie beispielhaft in 2.5 dargestellt wurden.

Noch nicht sehr lange ist bekannt, dass die PcG-Proteine ferner für die Inaktivierung *eines* X-Chromosoms in somatischen Säugetierzellen benötigt werden (s. 2.1.1.2): Interessanterweise sind an der Induktion des *fakultativen* Heterochromatins im inaktivierten X-Chromosom weder die HMTase Su(var)3-9 noch das HP1-Protein beteiligt (Peters et al., 2001; Peters et al., 2002). Im schrittweisen Prozess der X-Chromosom-Inaktivierung bindet der E(z)-Esc-Komplex (kurz nach der Ausbreitung der sog. *Xist*-RNA) transient an das zu inaktivierende X-Chromosom und hinterlässt dabei eine globale H3 K27 Trimethylierung (Plath et al., 2003; Silva et al., 2003). Wahrscheinlich beruht die epigenetische Memorierung und die Inaktivierung dieses X-Chromosoms folglich auf denselben Prozessen, wie das oben geschilderte PcG-vermittelte *silencing* im übrigen Genom (Heard, 2004).

Weiterhin wurde E(z) mit der frühen B-Zell-Entwicklung und der korrekten Produktion von Immunglobulinen in Mäusen in Verbindung gebracht (Su et al., 2003). Weitere wichtige Erkenntnisse über die Beteiligung von E(z) an der Zelldifferenzierung und Zelltransformation werden übergreifend in 2.8 behandelt. Verwiesen sei zusätzlich auf einen guten Übersichtsartikel zum E(z)-Esc-Komplex (Cao and Zhang, 2004a).

2.7. PRset7 und die Histon H4 K20-Methylierung

Die posttranslationale Methylierung von Lysin 20 in H4 war schon länger bekannt und es ist wahrscheinlich, dass sich die Lysinmethylierung im Histon H4 auf das Lysin 20 beschränkt (van Holde, 1989; Strahl et al., 1999). Zeitgleich haben zwei unabhängige Arbeitsgruppen ein bislang unbekanntes, nukleäres SET-Domänen-Protein identifiziert. Das Polypeptid benötigt für die spezifische Methylierung von Nukleosomen an H4 K20 keine Komplexpartner. Diese HMTase (Molekulargewicht ca. 40kDa) wurde von Nishioka et al. aus humanen *HeLa*-Zellkernen aufgereinigt und PRSet7 genannt (Nishioka et al., 2002b). Ein in der Aminosäuresequenz sehr ähnliches Protein erhielt von Fang et al. den Namen Set8 (Fang et al., 2002). Das ebenfalls aus *HeLa*-Zellkernen isolierte Set8 ist N-terminal ca. 30 Aminosäuren länger als PRSet7 (Molekulargewicht ca. 45kDa). Bisher ist über die HMTase PRSet7 bzw. Set8 und deren Modifikation an H4 K20 verhältnismäßig wenig bekannt. Im Folgenden wird der Name PRset7 für diese HMTase benutzt werden, es sei denn, es wird explizit auf das von Fang et al. aufgereinigte und benannte Protein Set8 Bezug genommen.

Die SET-Domäne liegt in PRset7 verglichen mit anderen SET-Proteinen sehr weit C-terminal. Die von (Rea et al., 2000) mit Experimenten zu Su(var)3-9 aufgestellte Vermutung, alle HMTasen mit einer SET-Domäne benötigten für ihre katalytische Aktivität eine Cystein-

reiche prä- und post-SET-Domäne, findet in PRset7 keine Entsprechung (s. 2.3.1 und Abbildung 15).

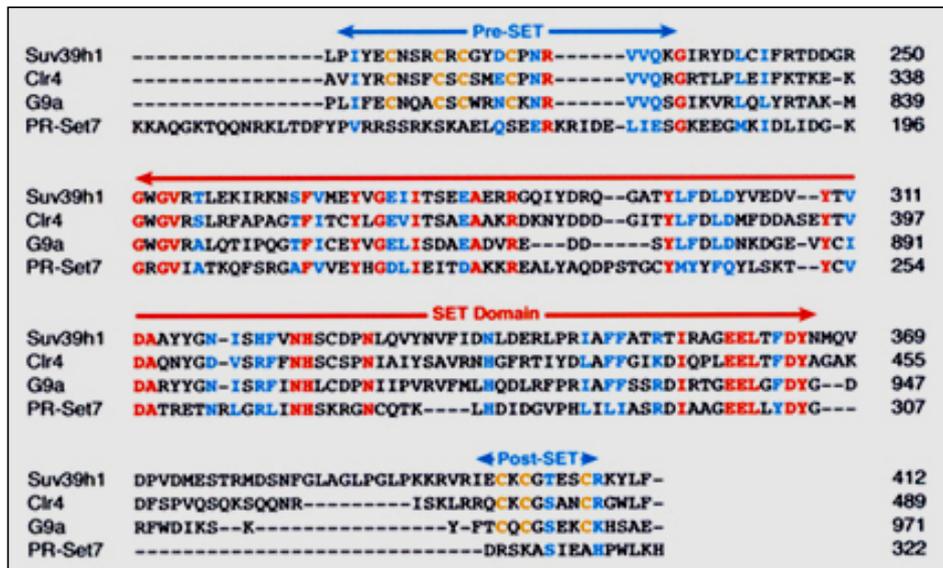


Abbildung 15: Vergleich von SET-Domänen: PRset7 ohne Cystein-reiche prä- bzw. post-SET-Domäne. Der Sequenzvergleich der Aminosäuren verschiedener SET-Domänen-HKMTasen zeigt, dass PRset7 keine Cystein-reiche (orange) Prä- oder Post-SET-domäne enthält. Diese Bereiche wurden vormalig als Voraussetzung für die enzymatische Aktivität aller SET-Domänen-HKMTasen erachtet. Aus der Abbildung geht außerdem hervor, dass die SET-Domäne von PRset7 weit C-terminal liegt.

(Aus Nishioka et al., 2002b; online suppl. data: <http://www.molecule.org/cgi/content/full/9/6/1201/DC1>)

Unabhängig vom Cystein-Gehalt der an die SET-Domäne angrenzenden Aminosäuren konnte jedoch von Fang et al. gezeigt werden, dass die wenigen C-terminalen Aminosäuren im humanen PRset7 für die enzymatische Aktivität von großer Bedeutung sind. Eine N-terminale Verkürzung des Proteins führt hingegen nur zu einem mäßigen Verlust der nukleosomalen Spezifität des Enzyms und sogar zu einer Steigerung der Methylierung von Nucleosomen an H4 K20 (Fang et al., 2002).

In *Drosophila* existiert ein dem humanen PRset7 homologes Protein (ca. 75kDa), das sich bei Deletion beider Allele lethal auf die Embryonen auswirkt (Nishioka et al., 2002b; Fang et al., 2002). Offensichtlich ist PRset7 für die Entwicklung und Lebensfähigkeit von *Drosophila* essentiell. Allerdings herrscht bezüglich der funktionalen (oder einer möglichen epigenetischen) Bedeutung der H4 K20 Methylierung durch PRset7 noch Unklarheit. Die Gruppe um D. Reinberg vertritt die Ansicht, dass die H4 K20 Methylierung reprimierte Chromatinregionen und dichte Chromatinstrukturen markiert, die mit der Acetylierung von H4 K16 im Sinne des Histon-Codes (s. 2.4) konkurriert (Nishioka et al., 2002b; Sims, III et al., 2003). In Versuchen zur Zellzyklusabhängigkeit dieser Modifikation finden Rice et al. die H4 K20 Methylierung verstärkt an mitotischen Chromosomen (Rice et al., 2002). Fang et al. finden im Widerspruch zu den Ergebnissen von Rice et al. eine zellzyklusabhängige Steigerung der H4 K20 Methylierung in der S-Phase von *HeLa*-Zellen und beobachten

weiterhin *keine* Konkurrenz zwischen der H4 K16 Acetylierung und der H4 K20 Methylierung an Polytäanchromosomen. Die H4 K20 Methylierung wird sowohl von Fang et al. als auch von Nishioka et al. als eine posttranslationale Modifikation höherer Eukaryonten interpretiert, da in *S. cerevisiae* weder die H4 K20 Methylierung, noch ein PRset7-Homolog identifizierbar ist (Nishioka et al., 2002b; Fang et al., 2002).

Die überwiegenden Untersuchungen dieser Arbeit wurden zur HMTase PRset7 aus *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Weitere Aspekte zu diesem Enzym und zur H4 K20 Methylierung werden im Anschluss an den Ergebnisteil diskutiert (s. 4).

2.8. Zellidentität, Neoplasie und Histonmethylierung

Im Laufe der vorangegangenen Kapitel wurde geschildert, wie die transkriptionelle Aktivität bzw. die Repression von Genen durch Veränderungen im Chromatin festgelegt, aufrechterhalten und weitergegeben werden kann. Verschiedene chromatinmodifizierende Mechanismen vermitteln diese Information - posttranslationale Histonmodifikationen, Histonvarianten, Nukleosomen-*Remodeling*, Nukleosomen-Assemblierung, DNA-Methylierung. Die Veränderungen im Chromatin gehen jedoch nicht mit Veränderungen in der DNA-Sequenz einher und sind somit *epi*-genetischer Natur (s. 2.5). Ausfälle oder fehlerhafte Funktionen epigenetischer Mechanismen können folglich in einer unangemessenen (möglicherweise fatalen) Aktivierung ursprünglich inaktivierter Gene bzw. in einer Inaktivierung ursprünglich aktiver Gene resultieren. Daraus erklärt sich die hohe Relevanz dieser Mechanismen für den richtigen Zelldifferenzierungsprozeß, die Zellidentität und die Zellfunktion und somit letztendlich für den gesamten Organismus. Das Genom einer eukaryonten Zelle kann nicht ohne den zusätzlichen Informationsgehalt des „Chromatinkontextes“ funktionell verstanden werden, da das Chromatin ein sich aufrechterhaltendes „molekulares Zellgedächtnis“ (Turner, 2002) für die Utilisation des Genoms beherbergt.

Im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* werden lebenslang zelluläre Expressionsmuster mithilfe von PcG- und TrxG-Proteinen sowie den spezifischen Histonmethylierungsmustern aufrechterhalten (s. 2.6). Vereinfacht ausgedrückt ist die Identität und Funktion einer differenzierten Zelle durch die Auswahl an Genen determiniert, die in ihr exprimiert werden (Cao and Zhang, 2004b). Kontrolliert durch genregulierende Faktoren entwickeln somatische Zellen innerhalb eines Organismus somit ihre Identität, die sich in einer spezifischen, zellulären Differenzierung, Migration, Proliferation und Funktion ausdrückt (Caldas and Aparicio, 1999). Es verwundert daher nicht, dass die mit zellulärer *Entdifferenzierung*, Proliferationssteigerung und Metastasierung einhergehende, neoplastische

Transformation zu Tumorzellen mit der *Deregulation von Expressionsmustern* einhergeht, die ihren Ursprung im Funktionsverlust von PcG-, TrxG-Proteinen und in fehlerhaften, spezifischen Histonmethylierungen haben kann.

Unter den epigenetischen Mechanismen spielt die Histonmethylierung für die Aufrechterhaltung und Memorierung funktionaler Zustände einer Zelle eine besondere Rolle. Einerseits liegt dies an den besonderen Eigenschaften dieser posttranslationalen Histonmodifikation (s. 2.3; Stabilität, Mono-, Di- und Tri-Methylierung), andererseits kann die Histonmethylierung sowohl für *aktives* (z.B. H3 K4) als auch für *inaktives* Chromatin (z.B. H3 K27) kennzeichnend sein (Lachner et al., 2003), s. 2.3.2. Es ist noch nicht geklärt, wie der Mechanismus der Aufrechterhaltung dieser Modifikationen detailliert funktioniert, doch wird die Involvierung von Histonassemblierungsprozessen diskutiert (Vermaak et al., 2003), s. 2.2.

Verluste epigenetischer Information durch die Auflösung oder Veränderung von Histonmethylierungen resultieren zum Teil in einem Verlust der Zellidentität und spezifischer Differenzierungsmerkmale. Die folgenden Beispiele illustrieren die Tragweite der epigenetischen Mechanismen, insbesondere der Histonmethylierung.

Die Invasivität und damit die Neigung zur Metastasierung von Tumoren der Prostata und der Brustdrüse konnte in mehreren Untersuchungen mit der Überexpression von Su(z)12 und E(z) beobachtet werden (Varambally et al., 2002; Bracken et al., 2003; Kleer et al., 2003; Kirmizis et al., 2003). Da beide Proteine dem E(z)-Esc-Komplex angehören und für die Methylierung von H3 K27 essentiell sind (Cao and Zhang, 2004a), liegt eine erhöhte HMTase-Aktivität in diesen Tumorzellen nahe. Die Überexpression von E(z) in Prostatakarzinomzellen ist nicht nur mit einer schlechteren Prognose behaftet, sondern erhöht außerdem die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs nach einer Therapie (Varambally et al., 2002; Rhodes et al., 2003). Eine klinische Anwendbarkeit dieser Erkenntnisse wäre sinnvoll, da bisweilen niedrig-normale Werte des onkologischen Standardparameters *PSA* (Prostata-spezifisches Antigen, prostataspezifische Serin-Protease) bei Patienten mit bioptisch gesicherten Adenokarzinomen der Prostata vorkommen (Thompson et al., 2004). Würden die Probebiopsien hinsichtlich der quantitativen Expression von E(z) analysiert, könnten Hochrisikopatienten mit diagnostiziertem Prostata-Karzinom mit der gegenwärtig höchstmöglichen Sensitivität identifiziert werden (Rhodes et al., 2003). Die relativ sichere Einteilung der Prostatakarzinome in verschiedene Klassen gemäß der Aggressivität des Tumors, wäre für die Therapie (z.B. für die Radikalität einer chirurgischen Resektion) und für die Prognose der betroffenen Patienten von großer Bedeutung. E(z) könnte nicht nur als molekularer Marker dienen, sondern möglicherweise auch zur Entwicklung spezifischer Therapeutika auf der Ebene der Transkription führen (s.a. Sellers and Loda, 2002). In diesem Zusammenhang erscheint interessant, dass eine Überexpression von E(z) mit einer

gesteigerten zellulären Proliferationsrate verknüpft zu sein scheint; diese stellt ein weiteres Tumorzell-Charakteristikum dar (z.B. proliferierende Mantelzelllymphomzellen, s. Visser et al., 2001). Möglicherweise könnte ein spezifischer Inhibitor für den E(z)-Esc-Komplex die Therapie des Prostatakarzinoms revolutionieren.

Das TrxG-Gen MLL (*mixed lineage leukemia*; ein SET-Domänen-Protein) ist eine weitere, mit neoplastischer Transformation assoziierte HMTase. Das Ash1-Homolog methyliert Histon H3 an K4 (Milne et al., 2002; Nakamura et al., 2002) und ist häufig Ziel chromosomaler Translokationen in akuten lymphatischen Leukämien bei Erwachsenen und Kindern (Gu et al., 1992; Tkachuk et al., 1992; Ayton and Cleary, 2001). In den leukämischen Zellen werden Fusionsproteine des MLL1-Gens mit anderen Genen gefunden, welche alle die C-terminal gelegene SET-Domäne von MLL nicht mehr enthalten. Daher ist es wahrscheinlich, dass der Funktionsverlust der HMTase-Aktivität des TrxG-Proteins MLL (bzw. Ash1) an der Tumorgenese zumindest mitverantwortlich ist (Huang, 2002; Beisel et al., 2002). Sollte der Verlust der Histonmethylierung Auswirkungen auf die Regulation der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation haben, würde dies eine tumorsupprimierende Rolle von MLL1 bzw. Ash1 nahelegen. Es gibt darüberhinaus noch weitere SET-Proteine, die mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden. Der Übersichtsartikel von Schneider et al. gewährt hierzu einen Einblick (Schneider et al., 2002).

Für die katalytische Aktivität von E(z), MLL1 (bzw. Ash1) und allen anderen HMTasen spielt auch das SAM-SAH-Verhältnis eine Rolle (SAM: S-Adenosyl-Methionin; SAH: S-Adenosyl-Homocystein). Erhöhte Konzentrationen des SAM-Abbauprodukts SAH wurden in älteren Individuen gefunden und sowohl mit Atherosklerose, Demenz sowie mit Neoplasien assoziiert (Brattstrom et al., 1994; Tsai et al., 1994; Seshadri et al., 2002). Ein erniedrigtes SAM-SAH-Verhältnis könnte durch den vermindert vorhandenen Methylgruppendonator SAM zu einer indirekten Inhibition von (Histon-)Methyltransferasen führen und somit weitreichende Folgen haben. Die Verfügbarkeit von Methylgruppen durch die Zufuhr von Methionin, Cholin, Vitamin B6 und B12 ist demnach für die Funktion aller Methyltransferasen essentiell, weshalb diese Stoffe u.a. als protektiver Schutz vor neoplastischen Erkrankungen angesehen werden (Giovannucci et al., 1995; Wu et al., 1999). Dies ist nicht nur für die medizinische Präventionsarbeit von Bedeutung, sondern eröffnet auch Möglichkeiten für supportive Therapieansätze in der onkologischen Therapie mittels eines günstigen SAM-SAH-Verhältnisses (Huang, 2002).

In der Karzinogenese scheint die Histonmethylierung ebenfalls an der Tumorsuppressor-Kaskade des Retinoblastoma-Proteins (Rb) beteiligt zu sein. Mutationen innerhalb dieser Kaskade führen zu einer Deregulation der Zellzykluskontrolle und sind in über 90% aller soliden, humanen Tumore nachweisbar. Für Rb wurde gezeigt, dass es sowohl Su(var)3-9 und HP1, sowie das PC-Homolog HPC2 binden kann (Nielsen et al., 2001; Dahiya et al., 2001).

Es liegt deshalb nahe, dass sich Rb für die reprimierenden Eigenschaften neben der Deacetylierung auch der Methylierung von Histonen bedient.

Die Histonmethylierung durch PcG-Proteine erbrachte in der Stammzellforschung neue Einsichten. PcG-Proteine sind wohl nicht nur an der Aufrechterhaltung von Zelldifferenzierungsmerkmalen in somatischen Zellen beteiligt, sondern auch in der Lage, Stammzellen ihre spezifischen „Stammzell-Eigenschaften“ zu verleihen: Valk-Lingbeek et al. schreiben der HMTase-Aktivität des E(z)-Esc-Komplexes die Selbsterneuerungsfähigkeit embryonaler Stammzellen zu (Valk-Lingbeek et al., 2004).

Die epigenetischen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Zellidentität sind zwar recht stabil, jedoch sie sind nicht irreversibel. Das haben die Experimente von Ian Wilmut eindrucksvoll bestätigt, die zur Klonierung des Schafes *Dolly* führten (Wilmut et al., 1997). Der Zellkern einer adulten Zelle (folglich einer bereits hoch differenzierten Zelle mit spezifischen Eigenschaften) wurde hierbei in eine entkernte Oozyte transferiert, woraus ein gedeihender Embryo entstand. Offensichtlich stellen der Transfer des Zellkerns oder unbekannte Signale innerhalb der Oozyte eine Art „Reset-Knopf“ für das Chromatin aus einer bereits differenzierten Zelle dar. Andererseits darf dies nicht darüber hinweg täuschen, dass die Erfolgsraten der Klonversuche mit Säugetieren als sehr gering einzustufen sind und dass diese Tiere frühzeitig diverse Pathologien entwickeln. Diese könnten auf einer nicht vollständigen Reversibilität epigenetischer Informationen aus dem somatischen Spenderzellnukleus beruhen.

Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen epigenetischer Eigenschaften (z.B. die Reversibilität), sowie ein fundierteres Verständnis der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellidentität werden deshalb für eine effektive therapeutische Anwendung adulter (und unter Vorbehalt auch embryonaler) Stammzellen unerlässlich sein. Für die Aufklärung grundlegender Regulationsprinzipien in eukaryonten Organismen wird der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* auch weiterhin eine zentrale Rolle spielen.

2.9. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Histonmethyltransferasen E(z) bzw. PRset7 im Kontext des Kenntnisstandes von 2001 bzw. 2002 analysiert werden.

E(z) sollte rekombinant exprimiert werden und das Vorhandensein einer möglichen HMTase-Aktivität nachgewiesen werden. Mögliche Bindungspartner eines E(z)-Komplexes sollten identifiziert und hinsichtlich ihres Einflusses auf die enzymatische Aktivität von E(z) untersucht werden. E(z) sollte im mutmaßlichen aktiven Zentrum (innerhalb der SET-Domäne) mutiert werden. Mit diesem Protein (E(z)mut) sollten nach rekombinanter Expression vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden. Desweiteren sollte mit der Etablierung einer stabilen Zelllinie begonnen werden, um einen E(z)-Komplex in einem eukaryonten Expressionssystem (*Drosophila*-Zellen) herzustellen.

PRset7 sollte ebenfalls nach rekombinanter Expression auf enzymatische Aktivität an verschiedenen Substraten getestet werden. Als die experimentellen Untersuchungen durchgeführt wurden, war PRset7 (bzw. Set8) neben Ash1 die einzige bekannte Histonmethyltransferase, die H4 an K20 methylierte. Die bereits publizierte, nukleosomale Spezifität von PRset7 sollte bestätigt und genauer charakterisiert werden. Ferner sollte durch die Herstellung geeigneter Substrate und mit spezifischen Antikörpern überprüft werden, ob sich die H4 K20-Methylierung und Acetylierungen an H4 im Sinne eines Histon-Codes (s. 2.4) gegenseitig ausschließen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen zur Histonmethyltransferase E(z)

3.1.1. Klonierung und rekombinante Expression von E(z) als Inteinusionsprotein

Die cDNA von E(z) wurde mit Hilfe der Polymerase Ketten Reaktion (PCR; s. 5.2.1.1) mit geeigneten Restriktionsschnittstellen (NdeI – XhoI) versehen und als Zwischenschritt in den pT7blue-Vektor kloniert. Dies war wegen der niedrigen Effizienz der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI beim Verdau von endständigen Erkennungsstellen ratsam. Der Vektor pT7blue verfügt über eine Klonierungsstelle, die für die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten geeignet ist. Die cDNA von E(z) konnte anschließend wieder mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI herausgeschnitten und in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert werden.

Bei der Frage nach einem geeigneten Expressionssystem wurde der Expressionsvektor pMyb2 gewählt (s. 5.1.2). Die Klonierung einer cDNA in diesen Vektor erlaubte die Expression der cDNA als Fusionsprotein, bestehend aus einer Chitinbindungsdomäne und einer sog. Inteinprotease (s.u.). Nach der elektrischen Transformation (s. 5.2.1.8) des Konstrukts in BL21(DE3) *E.coli* wurde das Inteinusionsprotein exprimiert 5.2.11. Das Fusionsprotein konnte durch die Chitinbindungsdomäne spezifisch an eine Matrix, die sog. *Chitinbeads* binden, und anschließend auf einer Säule gewaschen werden. Die intrinsische Proteaseaktivität von Intein innerhalb des gebundenen Fusionsproteins wurde dabei durch die Zugabe von DTT aktiviert. Das E(z)-Protein wurde C-terminal abgespalten und konnte somit eluiert werden.

Nach einer gelelektrophoretischen Proteinauftrennung gelang mit Anti-E(z) (s. 5.1.7) der Expressionsnachweis von E(z) mit der Western Blot-Methode (s. Abbildung 16; s. 5.2.5).

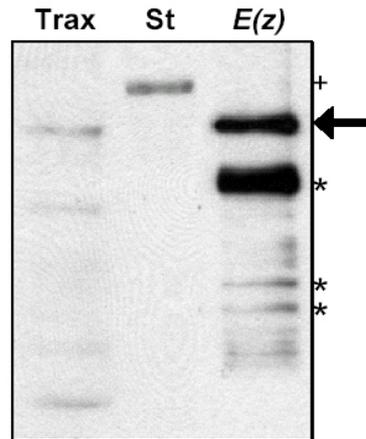


Abbildung 16: Expressionsnachweis von E(z) im Western Blot mit anti-E(z). Der Pfeil markiert E(z), ca. 90kDa. Die Sterne (*) markieren wahrscheinlich expressionsbedingte Degradationsprodukte von E(z)-protein.

Trax: Positivkontrolle mit Trax (s. 5.2.7; embryonaler *Drosophila*-Kernextrakt)

St: Unspezifische Antikörperbindung an MW-Standard (+)

E(z): Eluiertes E(z)-protein, ca. 90kDa

3.1.2. Bakteriell exprimiertes E(z) zeigt keine Histonmethyltransferaseaktivität

Es sollte untersucht werden, ob das bakteriell exprimierte SET-Domänen-Protein E(z) Histonmethyltransferaseaktivität (HMTase-Aktivität) besitzt. Dazu wurde eluiertes E(z) zusammen mit radioaktiv markiertem S-Adenosyl-Methionin (SAM*) und verschiedenen Substraten inkubiert (s. 5.2.16). Ungeachtet welche Substrate wir verwendeten (Nukleosomen, Oktamere, Histonmonomere) konnte mit bakteriell exprimiertem E(z) reproduzierbar keine HMTase-Aktivität erzielt werden (Rea et al., 2000; Czermin et al., 2002).

Um den Effekt möglicher E(z)-assoziierter Faktoren auf die HMTase-Aktivität zu untersuchen, entschieden wir uns, das E(z)-Protein an den Chitinbeads gebunden zu lassen. Vor der Abspaltung durch die DTT-aktivierte Inteinprotease sollten die E(z)-gebundenen Chitinbeads mit embryonalem Kernextrakt aus *Drosophila melanogaster* („Trax“; 5.2.7) inkubiert werden, um möglichen nukleären Co-Faktoren eines funktionalen E(z)-Komplexes eine Bindung an E(z) zu ermöglichen (sog. „pull-down“-Experiment, s. 3.1.5). Der Inkubation der Chitinbeads mit Trax folgten je zwei Waschschriffe (Puffer mit 100 mM und 500 mM Salzkonzentration), um unspezifische Bindungspartner zu eliminieren. Anschließend wurde E(z) mit den gebundenen Proteinen aus Trax eluiert und einem HMTase-Versuch unterzogen (s. 5.2.16). Die Aktivitätsmessung der eluierten Komplexe an Nukleosomen ergab, dass E(z) im Zusammenspiel mit den assoziierten Proteinen eine HMTase-aktivität entwickeln kann, jedoch war die HMTase-Aktivität variabel. Um herauszufinden, ob die detektierte Aktivität

auf E(z) zurückzuführen ist, sollte eine Mutation von kritischen Aminosäuren der SET-Domäne innerhalb des aktiven Zentrums von E(z) vorgenommen werden.

3.1.3. Konstruktion der Mutante E(z)mut durch eine Punktmutation

Um zu überprüfen, ob die HMTase-Aktivität des Komplexes von E(z) abhängt oder möglicherweise von einer anderen mit E(z) assoziierten HMTase ausging, sollte eine Mutante von E(z) hergestellt werden, die in der katalytisch aktiven Domäne defekt ist („E(z)mut“). Nach dessen Expression als Inteinusionsprotein sollte festgestellt werden, ob die Mutante ebenfalls in der Lage ist, einen katalytisch aktiven Komplex mit den in Trax enthaltenen Kofaktoren zu bilden. Danach sollten parallele HMTase-Aktivitätsversuche mit dem E(z)-Komplex und dem E(z)mut-Komplex durchgeführt werden.

Die SET-Domäne verleiht vielen HKMTasen ihre spezifische enzymatische Aktivität. Die Struktur und das aktive Zentrum mehrerer SET-Domänen wurde in den letzten Jahren weiter aufgeklärt (Marmorstein, 2003; Xiao et al., 2003), s. 2.3.1. Für die HMTase Su(var)3-9 wurde gezeigt, dass durch eine gezielte Mutation in der hoch konservierten SET-Domäne die enzymatische Aktivität des Proteins zerstört wird (Rea et al., 2000). Da E(z) ebenfalls die SET-Domäne enthält, erschien es wahrscheinlich, dass die Aminosäuresequenz *N-H-S* (722-724) *das* oder zumindest *ein* wichtiges aktives Zentrum der HMTase E(z) sein könnte, da sie in fast allen SET-Domänen-Proteinen konserviert ist.

Deshalb wurde die für E(z) codierende DNA so verändert, dass bei der rekombinanten Expression ein mutiertes E(z)-Protein entstand, welches an selbiger Stelle (Aminosäuren 722-724) die Sequenz *A-G-S* besitzt (s. 5.2.12). Eine entsprechende Mutation in der HMTase Su(var)3-9 führt zu einem katalytisch inaktivem Protein (Rea et al., 2000).

Die ursprünglichen Aminosäuren *Asparagin* – *Histidin* mit *Alanin* – *Glycin* zu ersetzen eignete sich deshalb, weil sie keine basische, saure oder verzweigte Seitenkette aufweisen und weil sie die beiden kleinsten Aminosäuren darstellen. Die genannten Eigenschaften machen eine Inaktivierung enzymatisch aktiver Bereiche im Molekül wahrscheinlich, ohne die Länge des Proteins durch eine Deletion zu verändern. Es lässt sich jedoch a priori nicht ausschließen, dass die Mutation zu einer Fehlfaltung des Proteins führt.

Die durch die Mutation entstandene Codon-Abfolge in der E(z)mut cDNA stellt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SacII dar. Nach der Klonierung von E(z)mut in den Expressionsvektor pMyb2 ermöglichte dies eine einfache Kontrolle, ob die Mutation erfolgreich war und erleichterte im weiteren Verlauf die sichere Unterscheidung zwischen E(z) und E(z)mut (s. Restriktionskontrolle, Abbildung 17).

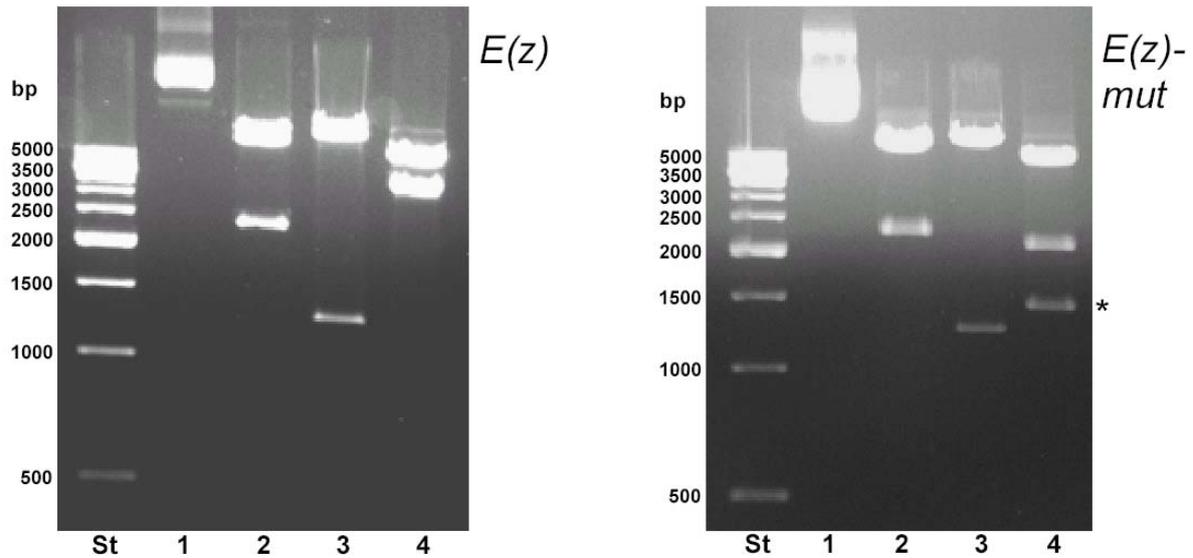


Abbildung 17: Paralleler Restriktionsverdau von E(z) und von E(z)mut in pMyb2. Eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle unterscheidet das klonierte E(z) von E(z)mut (vgl. Spur 4).

- St DNA-Standard (Roche MW XVII)
- 1 Nicht-linearisiertes E(z) bzw. E(z)mut Plasmid (pMyb2 und cDNA)
- 2 NdeI-XhoI-Verdau: Kleineres Fragment entspricht E(z) bzw. E(z)mut
- 3 SacII-XhoI-Verdau: Eine SacII-Schnittstelle ist auch im Vektor pMyb2 vorhanden
- 4 SacII-NdeI-Verdau: Zusätzliche SacII-Schnittstelle (*) in E(z)mut

3.1.4. Expression von E(z)mut

Die Expression von E(z)mut erfolgte identisch zu E(z) (s. 3.1.1). Für die folgenden Untersuchungen wurde die Inteinprotease nicht induziert und die Proteine E(z) und E(z)mut wurden an den Chitinbeads belassen. Auf diese Weise konnten vergleichende Versuche zu gebundenen Proteinen nach Trax-Inkubation und zur HMTase-Aktivität von E(z) und E(z)mut durchgeführt werden.

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen war nur bekannt, dass E(z) in *Drosophila* mit anderen Proteinen (Esc, p55, Rpd3) in mindestens einem Komplex vorliegt (Tie et al., 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte im weiteren Verlauf eine weitere Komponente (Su(z)12) identifizieren und die HMTase-Aktivität des 600kDa-E(z)-Esc-Komplexes bestätigen, die von einer (nicht-mutierten) SET-Domäne abhängt (Czermin et al., 2002), s. 2.6.1.

3.1.5. Vergleich der mit E(z) und mit E(z)-mut assoziierten Komplexe nach Trax-Inkubation

3.1.5.1. Nachweis von spezifisch gebundenem Rpd3 in E(z)-Proteinkomplex

Tie et al. haben beobachtet, dass u.a. die Histondeacetylase Rpd3 (s. 2.6.1) mit E(z) in einem Proteinkomplex in *Drosophila* vorliegt (Tie et al., 2001). Es erschien interessant, ob die Ausbildung eines Komplexes durch die gesetzte SET-Domänen-Mutation (E(z)mut) verhindert wird, was ein Indiz für eine strukturelle Veränderung des E(z)mut-Proteins wäre. Schließlich könnte dessen Faltung durch die mutierten Aminosäuren beeinträchtigt sein.

Für den Versuch wurde identisch zu 3.1.2 vorgegangen („pull-down“-Experiment). Die rekombinanten Fusionsproteine E(z) und E(z)mut beließen wir an den Chitinbeads und inkubierten diese mit Trax. Es folgten dieselben Waschschriffe (s. 3.1.2), um unspezifische Bindungspartner möglichst zu eliminieren.

Die anschließende DTT-induzierte Elution der Fusionsproteine E(z) bzw. E(z)mut mit den nun gebundenen Proteinen aus Trax wurden im Western Blot analysiert. Mit einem spezifischen Antikörper gegen die HDAC Rpd3 konnten wir nachweisen, dass sowohl E(z) als auch E(z)mut spezifisch Rpd3 aus dem Zellkernextrakt („Trax“) binden. Das erhaltene Ergebnis bestätigte die Beobachtungen von Tie et al. (Tie et al., 2001), s. Abbildung 18.

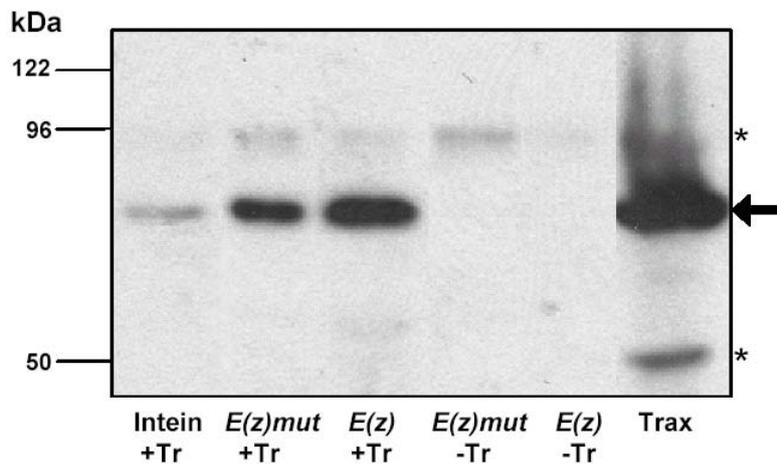


Abbildung 18: *In vitro*-Nachweis der Rpd3-Bindung an bakteriell exprimiertem E(z) und E(z)mut. Anti-Rpd3-Western Blot nach Trax-Inkubation (+Tr). Der Pfeil markiert Rpd3. Die Negativkontrollen (-Tr) sind nicht mit Trax inkubiert worden. Rpd3 ist in embryonalem Kernextrakt von *Drosophila melanogaster* enthalten („Trax“, Positivkontrolle). „Intein“ bedeutet eine Leerexpression des pMyb2-Vektors, woran abgelesen werden kann, dass nur geringe Mengen Rpd3 unspezifisch an die Intein-gekoppelten Chitinbeads ohne E(z) bzw. E(z)mut bindet. Die Sterne (*) markieren Antikörper-Bindungen von unspezifisch an Chitinbeads gebundenen Proteinen oder Degradationsprodukten von Rpd3 in Trax.

Nach Inkubation mit Trax ist eine deutliche Affinität von Rpd3 an E(z) sowie an E(z)mut nachweisbar. Der Grad an unspezifischer Bindung von Proteinen aus Trax ist an der Negativ-Probe mit Intein-*beads* zu erkennen („Intein“), welches das Produkt einer Leerexpression (Intein und Chitinbindungsdomäne) des Expressionsvektors pMyb2 ohne eine klonierte cDNA darstellt. An diesen *Beads* befindet sich folglich kein E(z)- oder E(z)mut-Fusionsprotein. Offenbar scheint Rpd3 in geringem Maße auch eine unspezifische Bindung mit den Intein-Chitin*beads* einzugehen. Der leichte Intensitätsunterschied zwischen E(z)- und E(z)mut-gebundenem Rpd3 resultiert wahrscheinlich daraus, dass die Proteinmengen von E(z) und E(z)mut vor dem Versuch nicht normalisiert wurden. Deshalb ist nicht gänzlich auszuschließen, dass E(z)mut durch die Punktmutation für das Rpd3-Protein eine möglicherweise etwas geringere Bindungsaffinität aufweist als das nicht-mutierte E(z).

Eine Kreuzreaktion des Rpd3-Antikörpers bzgl. E(z) oder E(z)mut konnte durch an Chitin*beads* gebundenes E(z) respektive E(z)mut ohne vorrausgegangene Inkubation mit Trax erfolgreich ausgeschlossen werden. Da viel Rpd3 in Trax enthalten ist, wird es mit einer erwartungsgemäß starken Intensität detektiert (Positivkontrolle).

3.1.5.2. Positiver Histondeacetylase-Versuch bestätigt den Rpd3-Antikörpernachweis

Parallel zur Western Blot-Analyse wird die Histondeacetylase-Aktivität (HDAC-Versuch) gemessen (s. 5.2.15). Identische Proben wurden dazu mit Histonen inkubiert, die mit radioaktiven Acetylgruppen markiert waren (von Peter Loidl). An den E(z)- bzw. E(z)mut-Chitin*beads* wurde eine HDAC-Aktivität detektiert, welche zuvor mit Trax inkubiert worden waren und Ko-Faktoren gebunden hatten. Gemäß der Rpd3-Detektion im Western Blot (s.o.) fand sich eine HDAC-Aktivität, die den Intensitäten der anti-Rpd3-Banden aus Abbildung 18 entsprach (s. Abbildung 19).

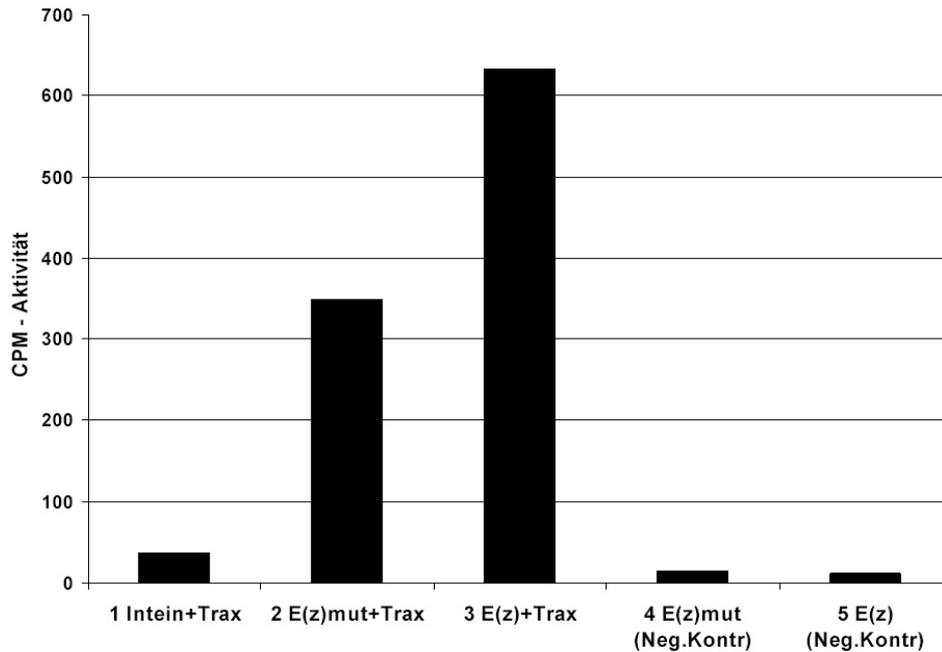


Abbildung 19: HDAC-Versuch mit E(z) und E(z)mut nach Inkubation mit Trax. Die an die Chitinbeads gekoppelten Proteine Intein, E(z) und E(z)mut werden nach Trax-Inkubation (1-3) bzw. ohne Trax-Inkubation (4+5) auf vorhandene HDAC-Aktivität untersucht. Die detektierte Aktivität in 1-3 korreliert mit den Bandenintensitäten des Western Blots in 3.1.5. Die Aktivität beruht offensichtlich auf der HDAC Rpd3.

Die Hintergrundaktivität wird durch die unspezifische Bindung von Rpd3 bzw. Trax-Proteinen an die Inteinbeads verkörpert. Die rekombinanten Proteine E(z) und E(z)mut verfügen ohne zusätzliche Faktoren aus embryonalem Kernextrakt über keine intrinsische HDAC-Aktivität. Die Kongruenz beider Versuche (s. Abbildung 18 und Abbildung 19) und die Charakterisierung des E(z)-Esc-Komplexes von Tie et al. legen nahe, dass es sich bei der detektierten HDAC-Aktivität um die Histondeacetylase Rpd3 handelt (Tie et al., 2001).

3.1.6. Transfektion von E(z) in *Drosophila*-Sf4-Zellen

Langfristig sollte der E(z)-Komplex nicht *in vitro* (d.h. nach Inkubation mit Trax im *pull-down*-Experiment), sondern *in vivo* in einem eukaryonten Expressionssystem hergestellt werden. Deshalb sollte eine stabile Zelllinie mit *Drosophila* Sf4-Zellen etabliert werden. Um eine affinitätschromatographische Reinigung des *in vivo* entstandenen Komplexes mit anti-FLAG-Antikörpern zu ermöglichen, sollte E(z) mit einer kurzen, charakteristischen Aminosäuresequenz, dem FLAG-Peptid, molekular markiert und exprimiert werden („FLAG-getagtes“ E(z)).

Trotz der mit stabilen Zelllinien einhergehenden Nachteile (langsameres Wachstum, Kontaminationen, quantitativ geringere Proteinexpression) wurde hierin die Möglichkeit gesehen, FLAG-getagtes E(z) in einem eukaryonten Expressionssystem zu exprimieren.

Die Primer wurden mit den passenden Restriktionsschnittstellen (KpnI – NotI) für den pPacFLAG-Expressionsvektor versehen (s. 5.1.2) und anschließend die cDNA von E(z) mit der PCR-Methode amplifiziert. Nach der vorübergehenden Klonierung in den pT7blue-Vektor wurde die cDNA in pPacFLAG eingefügt.

Die Transfektion der Sf4-*Drosophila*-Zellen mit dem E(z)-pPac-FLAG-Konstrukt erfolgte nach dem *Effectene-Transfection-Reagent*-Protokoll (s. 5.2.9). Wir lysierten transfezierte Sf4-Zellen (s. 5.2.10) und unterzogen das Lysat einer Western Blot-Analyse mit Anti-FLAG-Antikörpern. Es konnte nachgewiesen werden, dass die transfezierten Sf4-Zellen das FLAG-getagte E(z)-protein exprimieren (s. Abbildung 20).

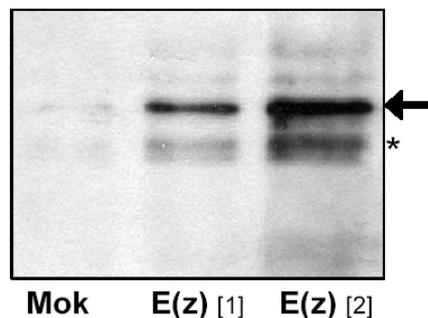


Abbildung 20: FLAG-getagtes E(z) wird in transfezierten Drosophilazellen (Sf4) exprimiert. Das mit dem FLAG-Peptid getagte E(z)-Protein ist in Sf4-Zellen in zwei parallelen Transfektionen [1] und [2] mit Anti-FLAG-Antikörper spezifisch nachweisbar (Pfeil). Das schwache Signal in der Negativkontrolle (Mok) nicht-transfezierter Sf4-Zellen ist durch Überlauf der E(z)-Transfektion [1] bedingt. Der Stern (*) markiert eine unspezifische Antikörperbindung oder ein Degradationsprodukt eines FLAG-E(z)-Proteins.

Abgesehen von dem Expressionsnachweis mit Anti-FLAG konnte mit den stabil transfezierten *Drosophila*-Zelllinien bisher noch kein weiterführendes Ergebnis erhalten werden. Die *in vivo*-Entstehung und Reinigung eines E(z)-Komplexes in einem eukaryonten Expressionssystem konnte nicht bewerkstelligt werden, möglicherweise ist dies in Sf4-Zellen nicht realisierbar (s.a. Czermin et al., 2002).

3.2. Untersuchungen zur Histonmethyltransferase PRset7

Die Histonmethyltransferase PRset7 aus *Drosophila melanogaster* methyliert Lysin 20 in Histon H4. Die Charakterisierung dieses Enzyms wurde bis jetzt hauptsächlich von den Gruppen Zhang und Reinberg vorgenommen (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b), s. 2.7. Nach Abschluss der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurde über die Charakterisierung von zwei weiteren H4 K20-trimethylierenden HMTasen berichtet, die nicht mit PRset7 verwandt sind (Schotta et al., 2004). Es ist noch immer unklar, in welchem

funktionalen Kontext die von PRset7 ausgeführte Modifikation steht, bzw. worin die molekulare Funktion der H4-K20 Methylierung durch PRset7 besteht (s. 4.2)

Ziel war es, das rekombinante Enzym PRset7 genauer zu charakterisieren. Alle Versuche hierzu wurden *in vitro* durchgeführt.

3.2.1. Expression von PRset7 als Inteinusionsprotein

Die cDNA von PRset7 („CG3307“) wurde erworben und mit der PCR-Methode amplifiziert, sodass wir die für PRset7-codierende DNA mit geeigneten Restriktionsschnittstellen (XbaI – NdeI) in den Expressionsvektor pMyb2 klonieren konnten (s. 5.1.2). Die BL21(DE3)-*E.coli* wurden mit dem Konstrukt transformiert und das Protein PRset7 wiederum als Inteinusionsprotein exprimiert (s. 5.2.11). Nach der Elution von den Chitinbeads mittels DTT wurde die Proteinexpression des PRset7-Proteins auf einem 10%-SDS-Gel evaluiert (s. Abbildung 21).

Das erwartete Molekulargewicht von PRset7 betrug 76,5 kDa. In dem Proteineluat finden sich nach der proteolytischen Abspaltung des Enzyms auf dem SDS-Gel mehrere Banden, unter anderem eine mittelstarke Bande der erwarteten Proteingröße. Desweiteren war eine deutliche Bande von 50kDa sichtbar. Im anschließend durchgeführten Western Blot bestätigte sich die erfolgreiche Expression mit einem Antikörper gegen Set8 (s. 5.1.7; „Anti-Set8“ erkennt das homologe PRset7; von Yi Zhang). Da auch im Western Blot mehrere Banden erkannt wurden, handelte es sich bei diesen Proteinen wahrscheinlich um expressionsbedingte Degradationsprodukte von PRset7, die trotz eingesetzten Proteaseinhibitoren entstanden (s. Abbildung 21).

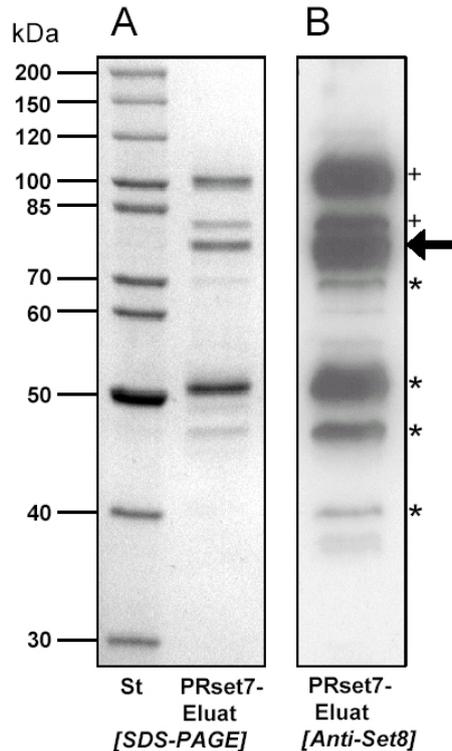


Abbildung 21: Expression von PRset7 (A) mit Proteinnachweis im Western Blot (B). Nach der Elution von den Chitinbeads ist PRset7 (ca. 76kDa, Pfeil) nebst anderen Banden auf einem SDS-Gel nachweisbar (*/+). Die Sterne (*) zeigen die vermutlich N-terminalen Degradationsprodukte von PRset7 an. Proteine, die größer als PRset7 sind (+), stellen wahrscheinlich unvollständig verdautes PRset7-Inteinfusionsprotein dar.

3.2.2. PRset7 methyliert fast ausschließlich rekombinante Nukleosomen

In den Veröffentlichungen von Fang et al. sowie von Nishioka et al. wird unverändertes PRset7 als eine HMTase beschrieben, welche im Vergleich zu Peptiden, Histonen und Oktameren eine hohe Substratspezifität für Nukleosomen aufweist. Erst im nukleosomalen Kontext würde PRset7 Lysin 20 an H4 effektiv methylieren (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b).

Um diese Aussagen am Beginn unserer Untersuchungen zu PRset7 zu bestätigen, benötigten wir die erforderlichen Substrate – vordringlich Nukleosomenarrays (kurze Nukleosomenketten; Chromatin-ähnliche Struktur). Für die folgenden Experimente mit Nukleosomen wurde ausschließlich rekonstituiertes Chromatin verwendet, das entweder mit rekombinant exprimierten („rekombinant“) oder aus *Drosophila*-Embryonen gereinigten Histonen („nativ“) mit derselben 5S-rDNA mit dem Verfahren der Salzdialyse hergestellt wurde (s. 5.2.13).

Um die Konzentrationsverhältnisse abzustimmen, wurden die Histonoktamere und die DNA vor der Dialyse zueinander titriert. Die pro Titration entstandenen Nukleosomenarrays

wurden nach der Salzdialyse mit einem Mikrokokkus-Nuklease-Verdau („MNase“-Verdau) hinsichtlich der Effizienz der Assemblierung überprüft (s. 5.2.14; s. Abbildung 22).

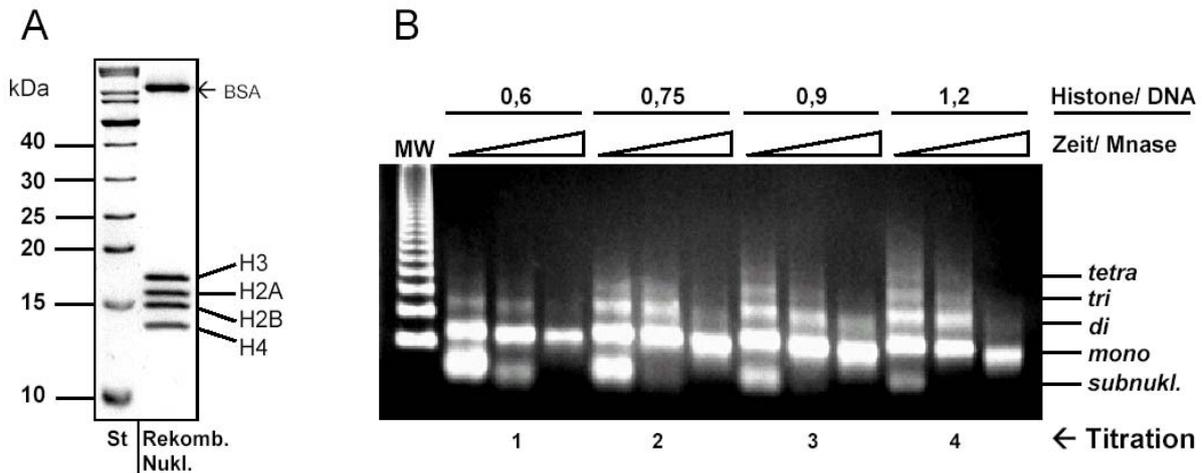


Abbildung 22: Assemblierung von Histonoktameren und DNA zu „rekombinanten Nukleosomen“.

A: Nukleosomenarrays auf 18% SDS-Gel (Coomassie-gefärbt). Auf dem Gel sind nur die rekombinanten Histonproteine zu sehen. Das BSA stammt aus der Assemblierungsreaktion woran an den Banden im SDS-Gel erkennbar ist, dass keine Oktamere, sondern rekonstituierte Nukleosomen aufgetragen wurden.

B: Mikrokokkus-Nuklease-Verdau von vier unterschiedlichen Titrationen (Histonoktamere/ DNA). Die Effizienz der Nukleosomenassemblierung kann anhand des „MNase“-Verdau beurteilt werden. Das Verhältnis der Histonproteinmenge zur DNA-Menge ist über den Titrationen 1-4 angegeben (0,6 – 1,2). Da die Nukleosomen jeweils für 10, 40 und 160 Sekunden von der MNase verdaut wurden (Zeit/ MNase), resultieren in den 3 Spuren pro Titration unterschiedlich viele DNA-Banden. „Mono, di, tri, tetra“ illustriert die Anzahl der in kurzen Verbänden aufgereihten Nukleosomen, denn die MNase kann nur die Verbindungs-DNA zwischen den einzelnen Nukleosomen verdauen. Je länger sie mit den Nukleosomenarrays inkubiert wird, desto kürzer sind in der Folge die resultierenden DNA-Fragmente. In der 10-Sekunden-Spur ist jeweils überschüssige DNA vorhanden, die nicht zu Nukleosomen assembliert werden konnte („subnukl.“). Diese nimmt mit steigender Oktamermenge zu Titration 4 hin ab (bessere Assemblierungsrate), weshalb diese Titration als die beste von 1-4 angesehen werden kann. Als Molekulargewichtsstandard (MW) wurde eine sog. „123bp-Leiter“ verwendet.

Um den Aktivitätstest (HMTase-Versuch, s. 5.2.16) zur Bestätigung der hohen Spezifität von PRset7 durchzuführen, verwendeten wir möglichst gleiche Mengen folgender Substrate (nach Abschätzung auf Coomassie-gefärbtem SDS-Gel): rekombinante Oktamere, rekombinantes Histon H3 und H4, sowie rekombinante Nukleosomen(*arrays*).

Die Substrate wurden mit je 7µl PRset7-Expressionseelat (s. Abbildung 21) und 0,5µl Tritium-markiertem SAM* (entspricht 6,25pmol bzw. 0,5µCi) inkubiert. Der HMTase-versuch (s. 5.2.16) wurde durch Szintillationszählung (Abbildung 23) sowie nach Auftrennung auf einem SDS-Gel durch Autoradiographie (Abbildung 24) analysiert.

Es zeigte sich, dass die HMTase PRset7 stark nukleosomenspezifisch methyliert: Die inkorporierte Radioaktivität in rekombinanten Nukleosomen beträgt im Vergleich zu Oktameren ein 75-faches. Auch wenn die Methylierung der nativen *Drosophila*-Nukleosomen im Vergleich zu den rekombinanten Nukleosomen gering ist, so ist sie doch höher als die der

rekombinanten Oktamere und des rekombinanten Histon H4 (welche von PRset7 in ähnlich geringem Maße methyliert werden).

Wie schon Fang et al. und Nishioka et al. gezeigt hatten, ist PRset7 eine H4-spezifische HMTase (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b). Sie konnten zeigen, dass bei Einsetzen größerer Mengen PRset7 (bzw. Set8) sowohl Histon H4 als auch Oktamere methyliert wurden. Wahrscheinlich ist deshalb eine sehr geringe Aktivität in allen Substraten detektierbar, die ein Histon H4 enthalten. Histon H3 wird von PRset7 hingegen nicht methyliert (Hintergrundaktivität). Auffällig ist der zuvor nicht beschriebene, massive Unterschied inkorporierter Methylgruppen zwischen rekombinanten bzw. nativen Nukleosomen (s. Abbildung 23).

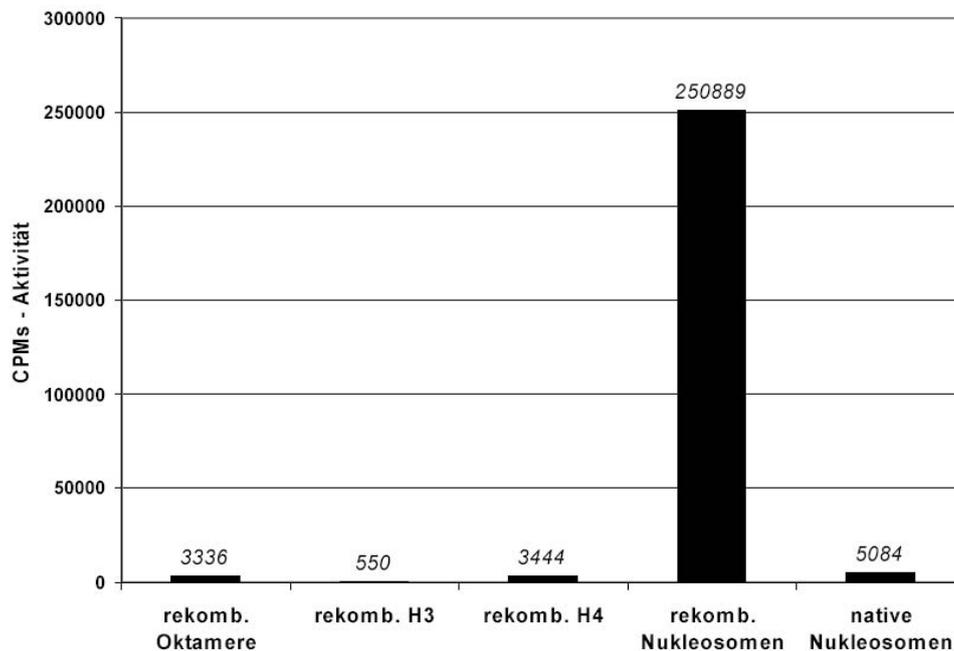


Abbildung 23: HMTase-Versuch mit PRset7 und verschiedenen Substraten. Die nukleosomale Spezifität von PRset7 ist sehr ausgeprägt und scheint auch stark zwischen aus nativen Oktameren und aus rekombinanten Oktameren assemblierten Nukleosomen zu unterscheiden. In H3 wird nur Hintergrundaktivität detektiert, da es von PRset7 nicht methyliert wird. Die anderen Substrate werden jeweils nur schwach methyliert.

3.2.3. PRset7 methyliert spezifisch H4 in rekombinanten Nukleosomen

Da aus den Szintillationszählungen der verschiedenen Substrate nicht geschlussfolgert werden kann, welches der Histone in Oktameren oder Nukleosomen methyliert wurde, analysierten wir den HMTase-Versuch parallel in einer Autoradiographie. Dazu wurden exakt dieselben Mengen des identisch durchgeführten HMTase-Versuchs auf ein 18%-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach Inkubation des Gels in Amplify-Lösung (s. 5.1.1), Trocknung und

Lagerung bei -80°C (24h) konnten dadurch die inkorporierten, Tritium-markierten Methylgruppen in den Substraten auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden (s. 5.2.16).

Die nukleosomale Spezifität ließ sich dabei mit der Autoradiographie noch weiter eingrenzen, denn es war nur die Methylierung rekombinanter Nucleosomen an H4 sichtbar. Somit bestätigten sich die Ergebnisse von Fang et al. und Nishioka et al. bezüglich der Spezifität für nukleosomales H4 (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b), s. Abbildung 24.

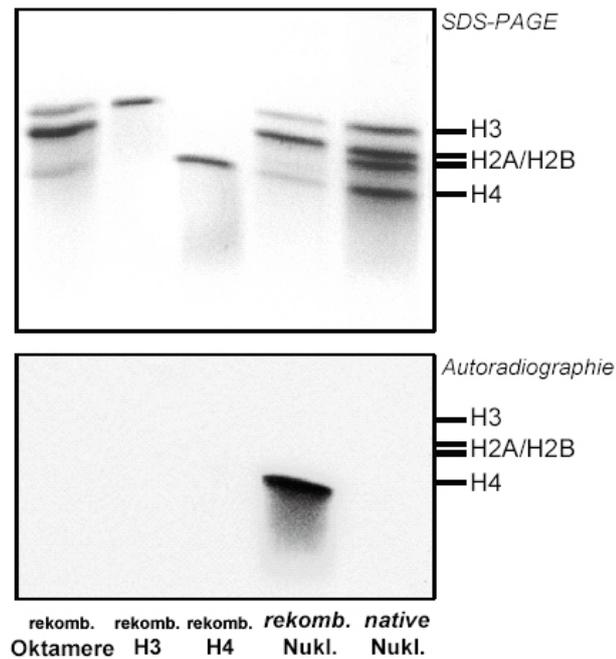


Abbildung 24: HMTase-Versuch zur Substratspezifität von PRset7 durch Autoradiographie. Der Versuch und die Substrate sind identisch zu 3.2.2 bzw. zu Abbildung 23. Eindeutig ist die hohe nukleosomale Substratspezifität zu erkennen, die sich auf Histon H4 in einem nukleosomalen Kontext beschränkt. Aus nativen Oktameren assemblierte Nucleosomen („native Nucleosomen“) werden von PRset7 hingegen nicht sichtbar bzw. nur sehr schwach methyliert.

Auch nach längeren Expositionszeiten der Autoradiographie war nur eine äußerst geringe Inkorporation von radioaktiv markierten Methylgruppen in den anderen H4-enthaltenden Substraten detektierbar. Rückblickend auf die Ergebnisse der Szintillationszählung kann man H3 als eine Negativkontrolle betrachten, da es von PRset7 nicht modifiziert wird. Im Vergleich zu den rekombinanten Nucleosomen ist eine geringe Methylierung von Oktameren, H4 und nativen Nucleosomen vorhanden, was in den Szintillationszählungen und bei langen Aufliegezeiten ($> 4\text{d}$) des Röntgenfilms auf dem Autoradiograph beobachtet werden kann.

In Fang et al. 2002 konnten hohe (nicht näher spezifizierte) Mengen des humanen PRset7-Homolog, Set8, auch andere Substrate als Nucleosomen modifizieren. Dies konnte nicht widerlegt werden, jedoch war in den Versuchen zu erkennen, dass eine jeweils identische Menge PRset7 rekombinante Nucleosomen deutlich präferiert.

3.2.4. PRset7 methyliert keine aus (nativen) *Drosophila*-Oktameren rekonstituierten Nukleosomen

Der interessanteste Befund in Versuchen zur Nukleosomenspezifität von PRset7 war die ausgeprägt stärkere Methylierung der rekombinanten Nukleosomen im Vergleich zu den nativen Nukleosomen (s. 3.2.2 und 3.2.3).

Die Histone, welche zur Assemblierung der rekombinanten und der nativen Nukleosomen dienten, unterschieden sich jedoch grundlegend. Die rekombinanten Histone entstanden *in vitro* (Assemblierung bakteriell exprimierter Histone mit DNA zu „rekombinanten Nukleosomen“) und native Histone *in vivo* (Assemblierung gereinigter Histone aus *Drosophila*-Embryonen mit DNA zu „nativen Nukleosomen“). Es wäre zum Beispiel denkbar, dass die *in vivo* isolierten Histone verglichen mit den rekombinanten Histonen zu einer besseren oder schlechteren Assemblierung der nativen Nukleosomen führten. Eine eliminierte oder verminderte Substratbindung oder Substratmodifikation durch PRset7 hätte die Folge sein können. Zum einen stellte sich deshalb die Frage, ob die Struktur und die Assemblierungsrate der nativen und der rekombinanten Nukleosomen vergleichbar waren. Zum anderen war nicht bekannt, ob die aus *Drosophila*-Embryonen gereinigten Histone möglicherweise bereits einer posttranslationalen Veränderung *in vivo* unterlaufen waren, welche die Methylierung durch PRset7 unmöglich machten. Diese Überlegungen könnten die unterschiedliche enzymatische Aktivität der substratspezifischen HMTase PRset7 an rekombinanten und nativen Nukleosomen begründet haben.

Um zu untersuchen, ob die Assemblierungsraten vergleichbar waren, unterwarfen wir die rekombinanten und die nativen Nukleosomenarrays einem MNase-Verdau (s. 5.2.14). Das Agarosegel zeigte eine identische Assemblierung der unterschiedlich zusammengesetzten Nukleosomen (s. Abbildung 25). Damit war die Voraussetzung für einen möglichst objektiven Vergleich zwischen den unterschiedlichen Nukleosomen gegeben. Es muss erwähnt werden, dass trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, dass sich weitere Strukturen in den Assemblierungsreaktionen der rekonstituierten Nukleosomen befanden, da der MNase-Versuch nur *eine* Möglichkeit für den Nachweis nukleosomaler Strukturen unter vielen darstellt.

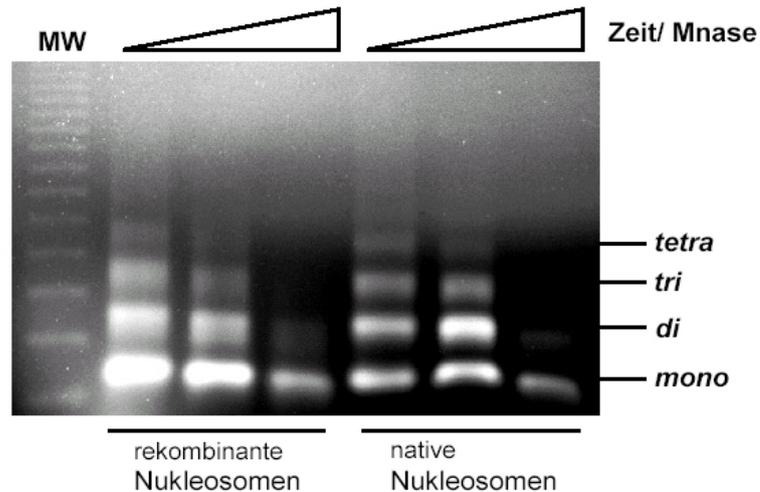


Abbildung 25: Mikrokokkus-Nuklease-Verdau rekombinanter und nativer Nucleosomen. Der MNase-Verdau wurde gemäß 5.2.14 durchgeführt und eine 123bp-Leiter als MW-Standard verwendet. Die Nucleosomen sind bzgl. der Assemblierungsrate identisch: Rekombinante und native Nucleosomen weisen Tetra-Nucleosomenarrays in der 10-Sekunden-Spur auf. Man kann die unterschiedlichen nucleosomalen Substrate diesbezüglich für einen objektiven Vergleich im HMTase-Versuch heranziehen.

Diese neu synthetisierten Nucleosomen wurden anschließend der Methylierung durch PRset7 unterzogen (HMTase-Versuch). Es wurden je 20µl Nucleosomen und je 0,5µl SAM* mit je 7µl PRset7-Elution (bzw. 50mM NaCl in den Negativkontrollen) pro HMTase-Reaktion inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf einem 18% SDS-Gel analysiert, mit Coomassie gefärbt und mittels Autoradiographie analysiert. Auf diesem ist zu erkennen, dass von PRset7 nur die aus rekombinanten Oktameren assemblierten Nucleosomen methyliert werden (s. Abbildung 26).

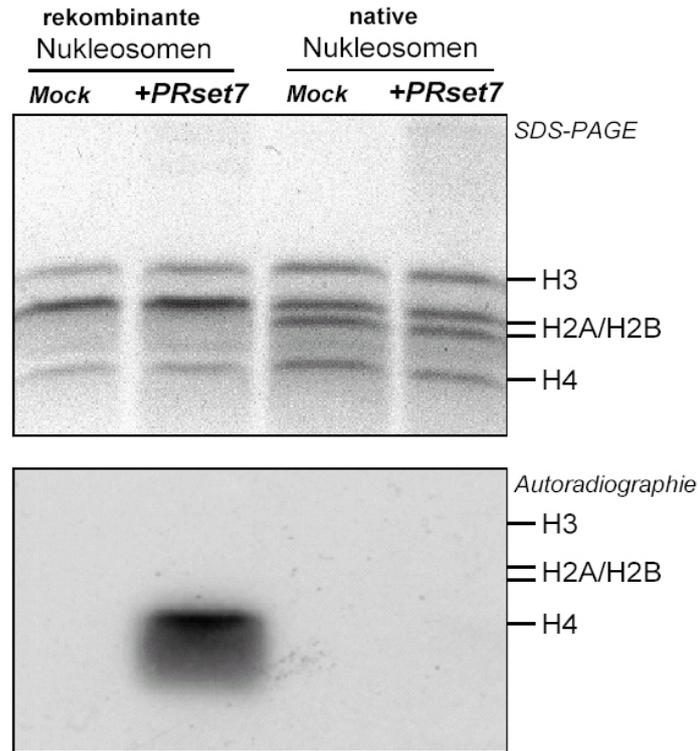


Abbildung 26: Methylierung rekombinanter und nativer Nucleosomen durch PRset7 (SDS-Gel und Autoradiographie). PRset7 methyliert ausschließlich Nucleosomen an H4, die sich aus rekombinanten Histonoktameren zusammensetzen. Die Negativkontrollen (*Mock*) enthielten kein PRset7. Die rekombinanten Histone wurden mit *Xenopus*-cDNA hergestellt, weshalb sich Histon H2A und H2B gelelektrophoretisch als eine Bande darstellen.

Es ist zwar nachteilig, dass bei diesem Versuch für die Assemblierung von rekombinanten Nucleosomen die Histone mit *Xenopus*- und nicht mit *Drosophila*-cDNA hergestellt wurden, doch sind die Histonproteine stark konserviert. Das Histon H4 aus *Xenopus* hat die identische Aminosäuresequenz wie das Histon H4 aus *Drosophila*. Bei nachfolgend durchgeführten Versuchen wurden auch rekombinante Nucleosomen aus *Drosophila*-cDNA verwendet (s. 3.3.6). Das Methylierungsverhalten von PRset7 unterschied nicht zwischen den rekombinanten *Drosophila*- und *Xenopus*-Nucleosomen.

Die aus embryonalen *Drosophila*-Histonen rekonstituierten, nativen Nucleosomen und die rekombinanten Nucleosomen unterschieden sich nur durch die verwendeten Histonoktamere und nicht durch eine unterschiedliche Assemblierung oder durch eine unterschiedliche, um die Oktamere gewundene DNA.

Die rekombinant hergestellten Histone konnten nicht bereits posttranslational modifiziert worden sein, da die hierfür benötigten Enzyme in Bakterien nicht vorkommen (Bonaldi et al., 2004), s. 2.2.2. Die aus *Drosophila*-Embryonen gewonnenen nativen Oktamere hingegen könnten bereits einer posttranslationalen Modifikation *in vivo* unterlegen haben, so dass PRset7 die nativen Nucleosomen deshalb nicht mehr an H4 methylieren konnte (Aktivität in der Szintillationsmessung nur etwas stärker als der Hintergrund, s. Abbildung 23). Diese

Annahme stellt vermutlich den entscheidenden Unterschied zwischen den beiden nukleosomalen Substraten dar und wird darüberhinaus von weiteren Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe unterstützt: Massenspektrometrisch konnte gezeigt werden, dass aus *Drosophila*-Embryonen gewonnenes Histon H4 fast durchgehend an Lysin 20 dimethyliert ist (Bonaldi et al., 2004). Desweiteren wäre denkbar, dass die nativen Oktamere weitere Modifikationen an anderer Stelle im H4-N-Terminus (oder an den übrigen Histonen) aufwiesen, die im Sinne eines Histon-Codes die H4 K20 Methylierung durch PRset7 unmöglich machten (Rea et al., 2000; Strahl and Allis, 2000), s. 2.4. Dieser Fragestellung wurde im weiteren Verlauf nachgegangen (s. 3.3).

3.2.5. PRset7 methyliert keine H4-N-Terminus-Peptide – auch nicht in Anwesenheit von DNA

Die Ergebnisse von Fang et al. hatten gezeigt, dass Set8 (das humane Homolog von PRset7 aus *HeLa*-Zellen) in Anwesenheit von DNA Oktamere an H4 effizient methylieren konnte. Die Autoren konnten jedoch nicht ausschließen, dass sich Nukleosomen im Reaktionsansatz formiert hatten (Fang et al., 2002).

Die hohe Nukleosomenspezifität von PRset7 legt nahe, dass DNA für die Substraterkennung bzw. für die enzymatische Aktivität von PRset7 notwendig ist, da Oktamere gar nicht, oder nur sehr wenig methyliert werden (s. Abbildung 23 und Abbildung 24). Dieser Fragestellung wurde mit N-terminalen H4-Peptiden (Aminosäuren 9-28; s. 5.1.4) versucht nachzugehen. Hierfür wurden unmodifizierte H4-Peptide („wt“) und Peptide, die an Lysin 20 bereits eine Methylierung aufwiesen („K20m“) erworben. In einem HMTase-Versuch wurden beide Peptide (je 1µg) in An- und Abwesenheit von DNA-Molekülen (je 1µg) mit PRset7-Eluat (je 7µl bzw. je 7µl 50mM NaCl in den Negativkontrollen) und SAM* (je 1µl) in einem konstanten Volumen inkubiert. Als DNA-Molekül diente dasselbe Plasmid, welches auch für die Assemblierung von Nukleosomen per Salzdialyse verwendet wurde (5S-rDNA). Als Positivkontrolle wurden 10µl rekombinante Nukleosomen (entspricht ca. 0,75µg rekombinantes Oktamer) unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Die Vermutung, dass die wt-H4-Peptide in Anwesenheit von DNA stärker durch PRset7 methyliert würden, konnte nicht bestätigt werden. Die Substratspezifität von PRset7 blieb in den Ergebnissen erhalten, da an der Positivkontrolle (rekombinante Nukleosomen) im Gegensatz zu beiden H4-Peptiden eine starke Methylierung detektierbar war. Hätte PRset7 die Peptide in Anwesenheit von DNA methylieren können, wäre zu erwarten gewesen, dass die Aktivität an den wt-H4-Peptiden mit DNA-Zusatz höher gewesen wäre, als an den übrigen Substraten. Außerdem hätte man

erwartet, dass die prämethylierten K20m-H4-Peptide für eine Methylierung durch PRset7 nicht mehr zugänglich gewesen wären – ob in An- oder Abwesenheit von DNA.

Da aber alle Peptide in An- oder Abwesenheit von DNA im Aktivitätsniveau reproduzierbar mit den Negativkontrollen (kein Enzym, „mock“) vergleichbar waren, musste davon ausgegangen werden, dass keine Methylierung durch PRset7 an H4-Peptiden stattgefunden hatte (s. Abbildung 27). Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass nicht geklärt werden konnte, ob PRset7 in der Lage gewesen wäre, die Peptide zu methylieren, da diese nur einen Teil des N-terminalen H4-Proteins repräsentierten. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese relativ kurzen H4-Polypeptide entweder von PRset7 nicht gebunden werden konnten, oder dass sie möglicherweise nicht als Substrat erkannt wurden.

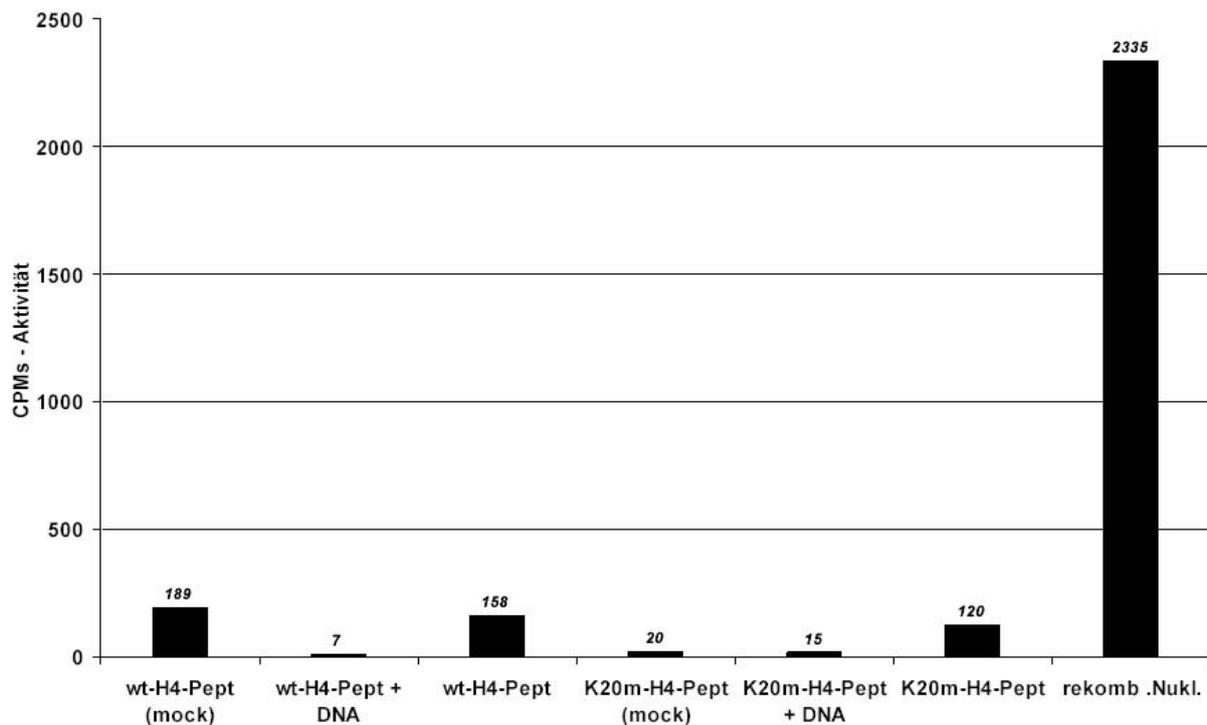


Abbildung 27: HMTase-Versuch mit PRset7 an H4-N-Terminus-Peptiden und DNA. H4-N-Terminus-Peptide (unmodifiziert (wt) oder an Lysin 20 methyliert (K20m)) werden mit und ohne DNA (je 1 µg) einer Methylierung mit PRset7 unterzogen. Der Versuch zeigt, dass die hohe Substratspezifität von PRset7 erhalten bleibt, da es trotz der Anwesenheit von DNA-Molekülen weder in wt-H4-Peptiden noch in prämethylierten K20m-H4-Peptiden zu einer Inkorporation radioaktiver Methylgruppen kommt, während die Positivkontrolle (rekombinante Nukleosomen) demonstriert, dass PRset7 enzymatisch aktiv ist.

3.2.6. Nukleosomales H4 wird von PRset7 an Lysin 20 dimethyliert

Da Fang et al. und Nishioka et al. in ihren Ergebnissen eine Methylierung von Lysin 20 in Histon H4 (H4 K20) durch PRset7 bzw. Set8 gezeigt hatten, sollte diese Eigenschaft für das

hier verwendete Enzym belegt werden. Für diesen Zweck wurde ein Antikörper gegen dimethyliertes H4 Lysin 20 erworben (anti-H4 K20-dimethyl, s. 5.1.7).

In einer HMTase-Reaktion wurden je 25µl rekombinante Nucleosomen eingesetzt, die einmal mit 1µl SAM (32mM) oder ohne SAM (Negativkontrolle) mit je 10µl PRset7-Eluat inkubiert wurden. Von den Reaktionen wurden jeweils 10µl entnommen, auf ein 18% SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit einer 1:10000-Verdünnung von anti-H4 K20-dimeth und zeigte, dass die Antikörper die methylierten Nucleosomen detektieren konnten (s. Abbildung 28).

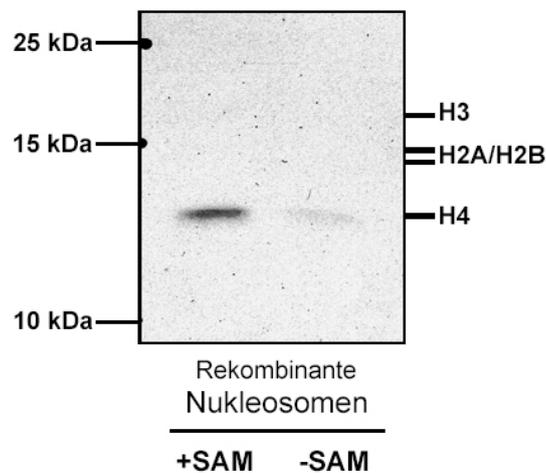


Abbildung 28: Der H4 K20-dimethyl Antikörper detektiert die von PRset7 methylierten, rekombinanten Nucleosomen an H4. Die geringe unspezifische Antikörperbindung an nucleosomales H4 der Negativkontrolle liegt wahrscheinlich an einer nicht gänzlich gewährleisteten Antikörperspezifität. Die Nucleosomen wurden nach Inkubation mit PRset7 und SAM (HMTase-Versuch) gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit der Western Blot-Methode untersucht. Die PVDF-Membran wurde über Nacht mit einer 1:10000-Verdünnung anti-H4 K20-dimethyl inkubiert.

Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass PRset7 rekombinante Nucleosomen an H4 K20 dimethyliert. Da auch nicht-methyliertes, nucleosomales H4 geringfügig detektiert wurde, war der Antikörper offensichtlich nicht ausschließlich spezifisch für dimethyliertes H4 K20. Die verwendeten Nucleosomen der Negativkontrolle („-SAM“) waren ebenfalls aus rekombinanten Histonen synthetisiert worden und konnten somit noch keine posttranslationale Modifikation erfahren haben.

Über eine Mono- oder Tri-Methylierung von nucleosomalem H4 K20 durch PRset7 kann mangels verfügbarer spezifischer Antikörper nichts ausgesagt werden. Es war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt, ob PRset7 diese Modifikationen möglicherweise durchführen kann. Kreuzreaktionen von anti-H4 K20-dimethyl mit möglicherweise durch PRset7 vermitteltem mono- oder tri-methyliertem H4 K20 konnte deshalb nicht ausgeschlossen werden.

3.2.7. Aktivität von PRset7 an rekombinanten Nukleosomen mit N-terminalen Deletionen an H4

Der H4 N-Terminus des Nukleosoms ist in verschiedener Hinsicht interessant. Die N-terminalen 20 Aminosäuren von H4, die aus dem globulären Teil des Histonoktamers herausragen, sind zum Beispiel für die Substratbindung und die Funktion des Nukleosomen-*Remodeling*-Enzyms Iswi von großer Bedeutung (Clapier et al., 2001; Clapier et al., 2002; Corona et al., 2002). In männlichen *Drosophila*-Fliegen wird durch eine Verdoppelung der Transkriptionsrate das Fehlen des zweiten X-Chromosoms ausgeglichen. Auch dies ist mit einer durchgängigen Modifikation am H4 N-Terminus verbunden: Das männliche X-Chromosom ist an H4 Lysin 16 hyperacetyliert. Mit der Frage, ob PRset7 auf bestimmte Abschnitte am H4-N-Terminus angewiesen sei, um Lysin 20 methylieren zu können, wurden spezielle Nukleosomen synthetisiert, welche an H4 N-terminale Deletionen aufwiesen (von C. Clapier): H4-delta5, H4-delta10, H4-delta15 und H4-delta19.

Die Konzentrationen dieser Histone wurden mit SDS-Gelen bestimmt und zusammen mit den rekombinanten *Core*-Histonen voller Länge (H2A, H2B und H3) zu Oktameren rekonstituiert. Aus diesen Oktameren und der 5S-rDNA konnten vier spezielle Nukleosomenarrays mittels Salzdialyse (s. 5.2.13) assembliert werden, die sich von normalen rekombinanten Nukleosomen („wt-Nukleosomen“) nur durch die Länge des jeweiligen H4-N-Terminus unterschieden. Die Titrationen der assemblierten „Delta-H4-Nukleosomen“ wurden mit dem MNase-Verdau evaluiert, um für die weiteren Versuche Nukleosomenarrays mit einer vergleichbar guten Assemblierungsrate auszuwählen (s. Abbildung 29).

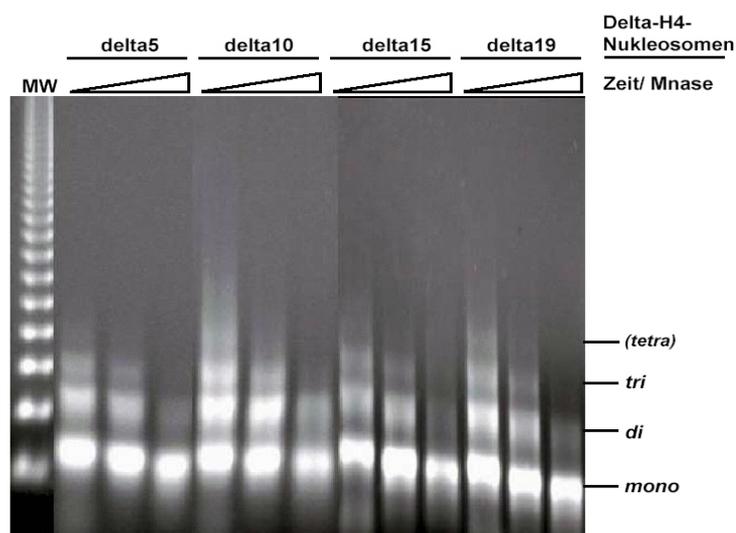


Abbildung 29: MNase-Versuch mit rekonstituierten H4-delta5, -10, -15 und -19-Nukleosomenarrays. Aus vier verschiedenen, MNase-verdauten Titrationen je Delta-H4-Nukleosom wurde je eine (hier abgebildete) Assemblierungsreaktion für die anschließenden Versuche ausgewählt. Das Kriterium war eine möglichst ähnliche Assemblierungsrate der unterschiedlichen Delta-H4-Nukleosomenarrays. Als Standard wurde eine 123bp-Leiter verwendet.

Mit den ausgewählten Delta-H4-Nukleosomen wurde ein HMTase-Versuch durchgeführt, in welchem jeweils 20µl wt-, delta5-, delta10-, delta15- und delta19-H4-Nukleosomen mit je 5µl PRset7-Eluat und je 1µl SAM* inkubiert wurden. Die Reaktionen wurden auf ein 18% SDS-Gel aufgetragen und per Autoradiographie über Nacht analysiert (s. Abbildung 30).

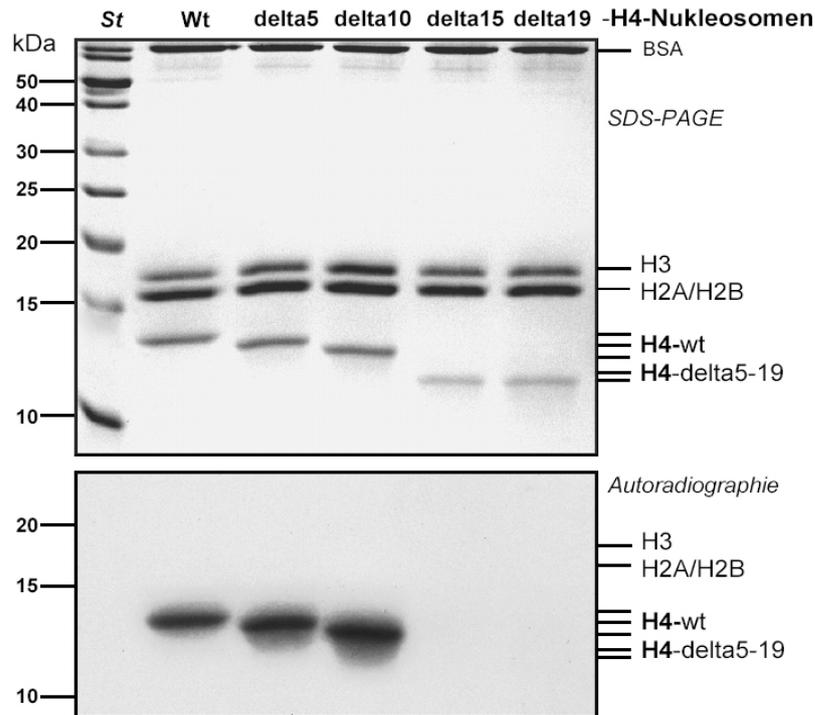


Abbildung 30: SDS-Gel und Autoradiographie von H4 N-terminal deletierten Nukleosomen, die mit PRset7 in einem HMTase-Versuch inkubiert wurden. An rekombinanten Nukleosomenarrays (wt- und Delta-H4-Nukleosomen) wurde die Aktivität von PRset7 durch einen HMTase-Versuch nachgewiesen. Die Autoradiographie zeigte, dass PRset7 jene Nukleosomen, die in H4 ab der 15. oder 19. Aminosäure N-terminal deletiert waren, nicht mehr methylierte. Der Grund für dieses Phänomen war entweder die fehlende Erkennung oder Bindung des Enzyms an das Substrat. Eine weitere Option wäre eine erfolgte Bindung von PRset7 mit einer aus den Deletionen resultierenden, enzymatischen Inaktivität.

Das Ergebnis des Versuchs klärte die Substraterkennung von PRset7 etwas weiter auf: Obwohl in allen verwendeten Delta-H4-Nukleosomen Lysin 20 am H4 N-Terminus noch vorhanden war, konnte die K20-Methylierung offensichtlich nur an Nukleosomen erfolgen, welchen nicht mehr als die ersten 10 Aminosäuren fehlten. War der H4-N-Terminus bis zur 15. (A) oder gar bis zur 19. Aminosäure (R) deletiert, dann erfolgte an Lysin 20 keine Methylierung mehr. Auch nach fünftägiger Exposition des Röntgenfilms auf der Autoradiographie wurde kein Signal in den (auf dem SDS-Gel etwas weniger konzentriert erscheinenden) delta15-H4- und delta19-H4-Nukleosomen detektiert.

Offensichtlich ist der identifizierte Bereich ab der 11. Aminosäure des H4-N-Terminus für die Substraterkennung, die Substratbindung oder für die Substratmethylierung bei

möglicherweise erfolgter Substratbindung notwendig. Diese Tatsache deutet auf eine wichtige Rolle der H4 N-terminalen Aminosäuren 11-19 für die HMTase-Aktivität von PRset7 hin.

3.2.8. Säulenchromatographische Aufreinigung von PRset7

Bei der Expression und anschließenden Elution von PRset7 entstanden einige Degradationsprodukte. Die quantitativ prominentesten Banden hatten ein ungefähres Molekulargewicht von 75kDa und 50 kDa (s. Abbildung 21). Das Ziel der nachfolgenden Experimente war eine Reinigung des PRset7-Volllängenproteins in möglichst homogener Form.

Zur Aufreinigung von PRset7 wurde die Säulenchromatographie verwendet. Wir reinigten zwei identisch durchgeführte Proteinexpressionen auf, einmal unter Verwendung der Gelfiltration (s. 5.2.17.1), das andere Mal mit der Anionenaustauscher-Chromatographie (s. 5.2.17.2).

3.2.8.1. Superdex200-Aufreinigung von PRset7 (Gelfiltration)

Nach erneuter Expression von PRset7 (s. 3.2.1) wurde das erhaltene Proteineluat über eine Superdex200-Säule isokratisch (250mM) aufgetrennt und in 500µl-Fraktionen gesammelt. Es wurden je 22µl der Fraktionen auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen (s. Abbildung 31, A). Die drei prominentesten Proteine waren ca. 100kDa, ca. 75kDa und ca. 50kDa groß.

Die teilweise vereinigten Fraktionen wurden anschließend mit anti-Set8 auf das Vorhandensein von PRset7 untersucht („*pool*“; s. Abbildung 31, B). Für den Western Blot wurden 15µl des PRset7-Eluates (Positivkontrolle) und je 22µl der vereinigten Fraktionen (Fx) 19-22, der Fx 23+24 und der Fx 25 auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Die anschließend auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine wurden über Nacht mit einer 1:1500-Verdünnung von anti-Set8 inkubiert. Dabei zeigte sich, dass anti-Set8 mehrere Proteine detektierte und nicht nur das Protein mit ca. 75kDa (entspricht der Größe von PRset7; enthalten in den *pools* Fx 19-22 und *pool* Fx 23+24. Im *pool* aus Fx 19-22 erkannte Anti-Set8 ein größeres Protein, welches ca. 90 kDa groß ist. Hierbei handelte es sich vermutlich um Verschlag, der wahrscheinlich durch eine unvollständige, Intein-vermittelte Proteolyse bei der Expression von PRset7 als Inteininfusionsprotein auftrat. Die ca. 50kDa und ca. 45kDa großen Proteine waren vermutlich N-terminale Degradationsprodukte von PRset7 (s. *pool*, Fx 23+24, sowie Fx 25).

In einem HMTase-Versuch (s. Abbildung 31, C) wurden je 10µl einer Fraktion mit 5µl rekombinanten Nukleosomen (s. 5.2.13) und 0,5µl SAM* auf enthaltene HMTase-Aktivität getestet (s. 3.2.8.3).

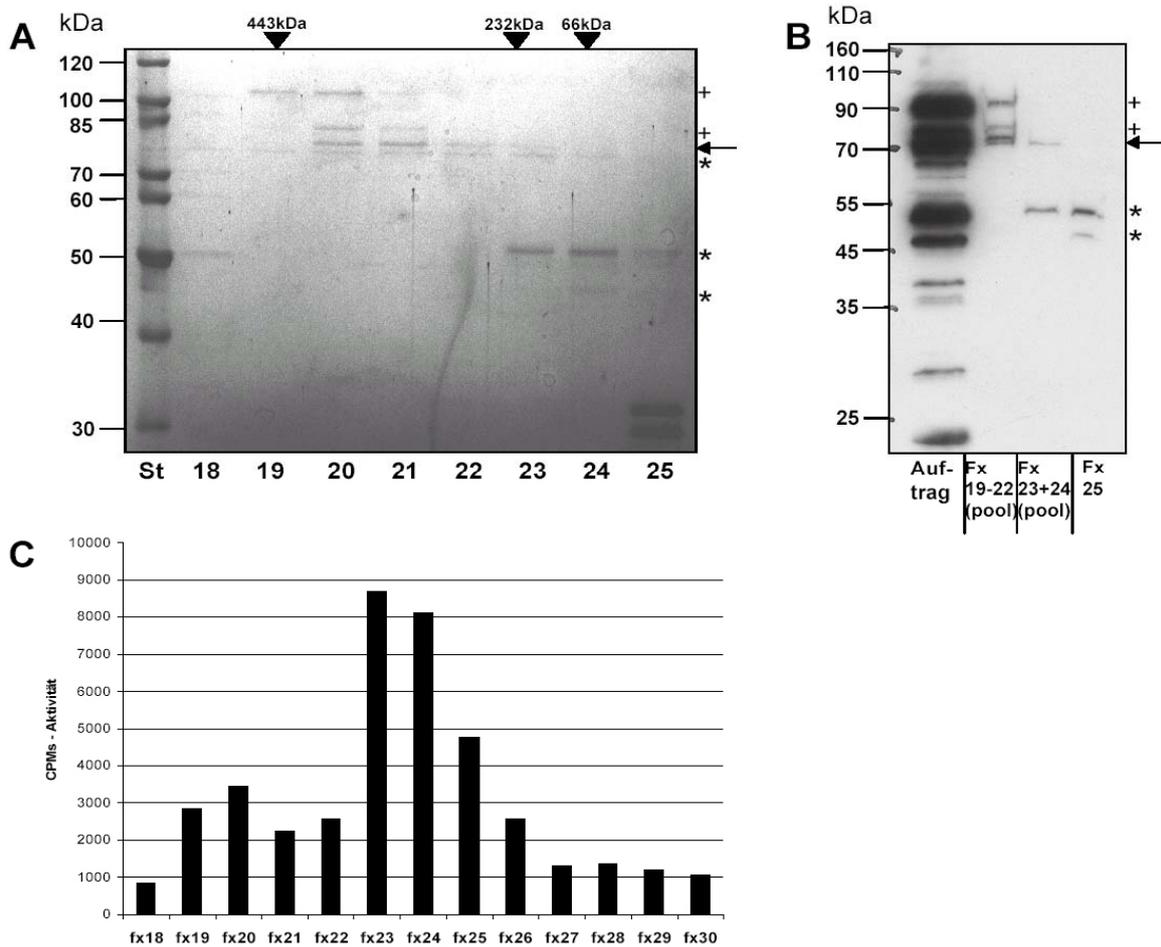


Abbildung 31: Gelfiltration; SDS-Gel, anti-Set8 Western Blot, HMTase-Versuch mit gereinigtem PRset7

A: Fraktionen der Gelfiltration auf SDS-PAGE (coomassie-gefärbt). (+) Verschlag von PRset7; (→) PRset7 in erwarteter Größe von ca. 75kDa; (*) wahrscheinlich N-terminale Degradationsprodukte von PRset7. Die beiden Banden bei ca. 30kDa in Fx25 stammten wahrscheinlich aus den zur Expression verwandten *E.coli* Bakterien, da sie anti-Set8 im Western Blot nicht erkannte (s. B).

B: Western Blot von vereinigten Fraktionen der Gelfiltration mit anti-Set8. Die Proteine, die im SDS-Gel (s. A) markiert sind (+ / → / *) wurden von Anti-Set8 detektiert. Es handelte sich deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit um rekombinante PRset7-Proteine verschiedener Größe (Degradationsprodukte, Verschlag), wovon das Protein bei ca. 75kDa das Protein PRset7 in voller Länge darstellte (→). Im Vergleich zur Vielzahl der Banden im Auftrag sind relativ viele Degradationsproteine durch die Gelfiltration entweder eliminiert oder verdünnt worden.

C: HMTase-Versuch mit den Fraktionen der Gelfiltration an rekombinanten Nukleosomen.

3.2.8.2. MonoQ-Aufreinigung von PRset7 (Anionenaustauscher)

Das rekombinante Protein PRset7 wurde auch mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Dabei wurden die aufgetrennten Proteine durch die graduelle

Erhöhung der Salzkonzentration eluiert, in Fraktionen von je 500µl gesammelt und auf einem 10% SDS-Gel analysiert. Dabei wurde sowohl das ca. 50kDa-Degradationsprodukt von PRset7 als auch das ca. 76kDa-Protein herausgereinigt. Anders als in der Gelfiltrationschromatographie gelang es, die Proteine in getrennten Fraktionen zu isolieren und somit das Volllängenprotein PRset7 ohne Degradationsprodukte zu erhalten (s. Abbildung 32; A, B).

Um sicherzugehen, dass es sich bei dem gereinigten Protein um das Volllängenprotein PRset7 handelte, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Fraktionen 22-29 wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt (je 15µl pro Fx, 5µl Säulenauftrag) und auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-Set8 inkubiert. Der sensitivere Nachweis des Western Blots wies nur diejenigen Banden nach, welche auch im SDS-PAGE angefärbt wurden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass in den Fraktionen 24-29 nur PRset7 in voller Länge vorlag (s. Abbildung 32; B, D).

Parallel zum Proteinnachweis im Western Blot wurde in einem HMTase-Versuch (s. Abbildung 32; C) die spezifische HMTase-Aktivität der einzelnen Fraktionen untersucht (s. 3.2.8.3).

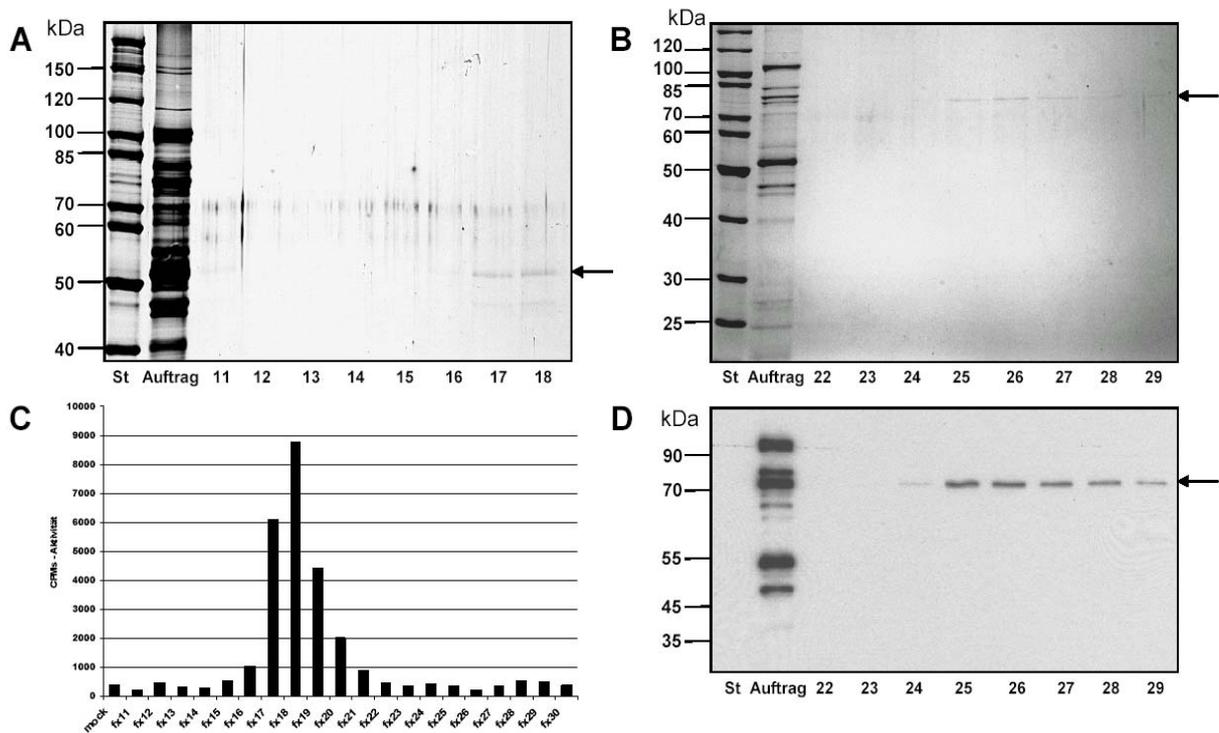


Abbildung 32: Anionenaustauscher; SDS-Gele, Anti-Set8 Western Blot, HMTase-Versuch

A: Fraktionen 11-18 auf einem SDS-Gel (10%, Silberfärbung). Aufgetragen wurden der Säulenauftrag (10µl) und die Fraktionen 11-18 (je 20µl), die nach Reinigung des PRset7-Expressions-Eluates über eine MonoQ-Säule erhalten wurden. Mit Pfeil (→) markiert ist die Bande mit ca. 50kDa, die aus dem PRset7-Expressionseluat herausgereinigt wurde. Diese ist wahrscheinlich ein N-terminales Degradationsprodukt von PRset7. (Ein Western Blot dieser Fraktionen konnte aus quantitativen Gründen nicht angefertigt werden)

B: Fraktionen 22-29, SDS-Gel (10%, Coomassie). Es wurden der Säulenauftrag (10 μ l) und die Fraktionen 22-29 (je 20 μ l) aufgetragen. Mit Pfeil (\rightarrow) wurden die schwach sichtbaren Banden von ca. 76kDa Größe (PRset7 Volllängenprotein) markiert.

D: Fraktionen 22-29, Western Blot mit anti-Set8.

Nach 3h Inkubation detektierte der Antikörper (1:1500 verdünnt) in den Fraktionen 24-29 spezifisch nur eine Bande (\rightarrow), die mit den angefärbten Proteinen im SDS-Gel in Fraktion und Molekulargewicht überlappten. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das PRset7-Volllängenprotein. In diesen Fraktionen lagen keine detektierbaren Degradationsprodukte vor.

C: HMTase-Versuch der Fraktionen 11-30 der Anionenaustauscher-Chromatographie. „Mock“ ist die Negativkontrolle (kein Protein). Die Positivkontrolle bestand aus 3 μ l Säulenauftrag, die Szintillationszählung erreichte eine Aktivität von 26237 cpm. Dieser Wert wurde platztechnisch nicht in die Tabelle integriert.

3.2.8.3. HMTase-Aktivitätstestung der gereinigten PRset7-Proteine

Bisher wurden unsere Versuche zur HMTase-Aktivität von PRset7 direkt mit dem mittels Affinitätschromatographie gereinigten Protein („Expressionseilat“) durchgeführt (s. z.B. 3.2.3, Abbildung 24), in welchem auch mehrere deaktivierte Proteine enthalten waren. Oft können solche Abbauprodukte die Aktivität eines Enzyms jedoch hemmen (Corona et al., 1999; Akhtar and Becker, 2000). Es stellte sich nun die Frage, ob das gereinigte PRset7-Volllängenprotein eine vergleichsweise höhere spezifische Aktivität besitzt. Daher wurden jeweils 10 μ l von den Fraktionen der Gelfiltrations-Chromatographie sowie der Anionenaustauscher-Chromatographie mit je 5 μ l rekombinanten Nukleosomen und je 0,5 μ l SAM* in einem HMTase-Versuch inkubiert und anschließend per Szintillationszählung analysiert (s. 3.2.8.1 und 3.2.8.2).

Die HMTase-Aktivitäten der Fraktionen aus der Gelfiltrationschromatographie (s. 3.2.8.1) suggerierten bereits, dass kürzere Proteine geringeren Molekulargewichts eine vergleichsweise höhere spezifische Aktivität aufwiesen, als größere Proteine über 70kDa. Da das PRset7-Volllängenprotein in keiner Fraktion der Gelfiltrationsreinigung ohne weitere Degradationsprodukte vorlag, konnte eine enzymatische Hemmung nicht ausgeschlossen und somit diese Tendenz nicht objektiviert werden.

Die Anionenaustauscher-Chromatographie konnte den Verdacht aus der Gelfiltrations-Reinigung bestätigen, da nun das gereinigte PRset7-Volllängenprotein homogen vorlag (s. 3.2.8.2). Doch die homogenen Fraktionen mit PRset7-Volllängenprotein waren im Gegensatz zu den Fraktionen, die Degradationsprodukte enthielten, kaum enzymatisch aktiv. Die Menge des im Western Blot detektierten Volllängenproteins (s. Abbildung 32, D) erschien sogar invers zur erhaltenen HMTase-Aktivität (Fx 24-29). Erst in Fx 28 und 29 ist ein leichter Anstieg des Aktivitätsniveaus über die Hintergrundaktivität hinaus zu verzeichnen und geht synchron mit einer beginnenden Intensitätsabnahme der entsprechenden Banden im Western Blot einher.

3.3. Beziehung zwischen H4-Acetylierung und H4-Methylierung

Unsere Ergebnisse mit rekonstituierten Nukleosomen, die ein N-terminal deletiertes Histon H4 enthielten, machten uns auf die nähere Umgebung des Lysin 20 am H4 N-Terminus aufmerksam (s. 3.2.7). Das Vorhandensein der Aminosäuren des H4 N-Terminus bis zur 10. Aminosäure war hierbei keine Voraussetzung für die Methylierung der Nukleosomen an K20, da eine Deletion der N-terminal vor Glycin 11 gelegenen Aminosäuren keine Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität von PRset7 zur Folge hatte.

Somit ist die Bindung oder Aktivität von PRset7 offenbar von einem Bereich zwischen der 11. Aminosäure und den globulären Domänen der *Core*-Histone abhängig (K20 liegt am Übergang vom N-Terminus zur globulären Struktur von Histon H4). In diesem Abschnitt des H4 N-Terminus befinden sich die Lysine K12 und K16, die ebenfalls posttranslational mit *Acetyl*gruppen modifiziert werden können (s. 2.2.2.1). Insbesondere die bedeutsame Modifikation der H4 K16-Acetylierung ist nicht nur für die *dosage compensation* in *Drosophila* essentiell sowie für ein allgemein transkriptionell aktives Chromatin charakteristisch, sondern kann nach neueren Erkenntnissen aus *Saccharomyces cerevisiae* auch mit inaktiven Chromatinregionen assoziiert sein (Kurdistani et al., 2004).

Bedenkt man die hohe Substratspezifität und die hohe Bindungsspezifität von PRset7, erscheint eine mögliche, positive oder negative Beeinflussung der Bindung oder der enzymatischen Aktivität von PRset7 durch die Acetylierung von Lysin 12 oder 16 in Histon H4 plausibel.

Folgende Fragen bezüglich des kritischen Bereiches zwischen der 11. und 19. Aminosäure des H4-N-Terminus erschienen interessant: Hat eine Acetylierung der Lysine 12 oder 16 denselben Effekt, wie die Experimente mit delta15- bzw. delta19-H4-Nukleosomen (s. 3.2.7)? Auch die „Umkehrung“ in der Reihenfolge dieser Modifikationen sollte untersucht werden: Sind Histonacetyltransferasen (HATs) in der Lage, Substrate an H4 zu acetylieren, die bereits an K20 methyliert sind?

Um die Fragestellungen einer möglichen Interaktion (gegenseitige Augmentation oder Inhibition) von H4 K12-/ K16-Acetylierung und H4 K20-Methylierung *in vitro* zu untersuchen, mussten einige Substrate hergestellt, überprüft, sowie Vorversuche durchgeführt werden.

3.3.1. Expression der Histonacetyltransferase MOF als Inteinusionsprotein

Zunächst sollte untersucht werden, ob PRset7 in der Lage sei, H4 K20 zu methylieren, wenn K16 bereits acetyliert ist. Für *in vitro*-Versuche benötigten wir eine Histonacetyltransferase (HAT), welche H4 an K16 acetyliert.

Die HAT MOF ist das bekannteste Enzym, welches diese Modifikation bewerkstelligen kann. Es gehört zur Familie der sog. MYST-HATs, besitzt eine Zink-Finger-Domäne sowie eine Chromodomäne und hat ein Molekulargewicht von ca. 92,5kDa. MOF spielt in der *dosage compensation* in *Drosophila* (männliches X-Chromosom ist an H4 K16 hyperacetyliert) eine essentielle Rolle für die Verdoppelung der Transkriptionsrate auf diesem Chromosom (Turner et al., 1992; Akhtar and Becker, 2000).

Mit einem Restriktionsenzymverdau wurde ein Expressionsvektor pMyb2 verifiziert (von A. Akhtar), welcher die cDNA von MOF enthielt (s. Abbildung 33).

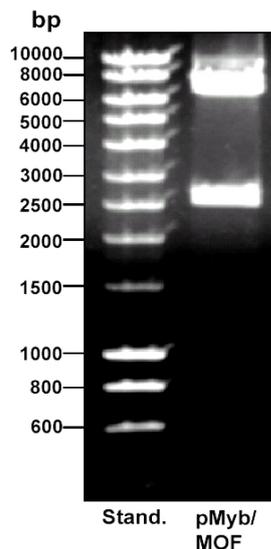


Abbildung 33: Restriktionsverdau des MOF-cDNA-Expressionsvektors. Das Plasmid wurde mit NdeI und XmaI verdaut und das pMyb2-Plasmid dadurch in zwei Fragmente geteilt. Die cDNA von MOF wurde in der erwarteten Größe von ca. 2,5kbp herausgeschnitten.

3.3.1.1. Superdex200-Aufreinigung von MOF (Gelfiltration)

Nach der Expression von MOF in *E.coli* als Inteinusionsprotein und der anschließenden Elution mit DTT (vgl. 3.1.1 und 3.2.1) wurde MOF mittels einer Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt, um es von Degradationsprodukten zu befreien. Diese können die enzymatische Aktivität von MOF inhibieren (Akhtar and Becker, 2000). Die erhaltenen Fraktionen wurden mit je 15µl einer Fraktion und 5 µl Auftrag (entspricht dem MOF-Expressionseeluat) auf ein 8%-SDS-Gel aufgetragen. Zur Aktivitätsdetektion in den Fraktionen wurde parallel ein Histonacetyltransferase-Versuch durchgeführt (HAT-Versuch, s. 5.2.16).

Für diesen wurden je 10µl einer Fraktion, 10µl rekombinante Nukleosomen und 1µl Acetyl-Coenzym-A* (AcCoA*) verwendet. Die Negativkontrolle enthielt kein Enzym (s. Abbildung 34; A,B).

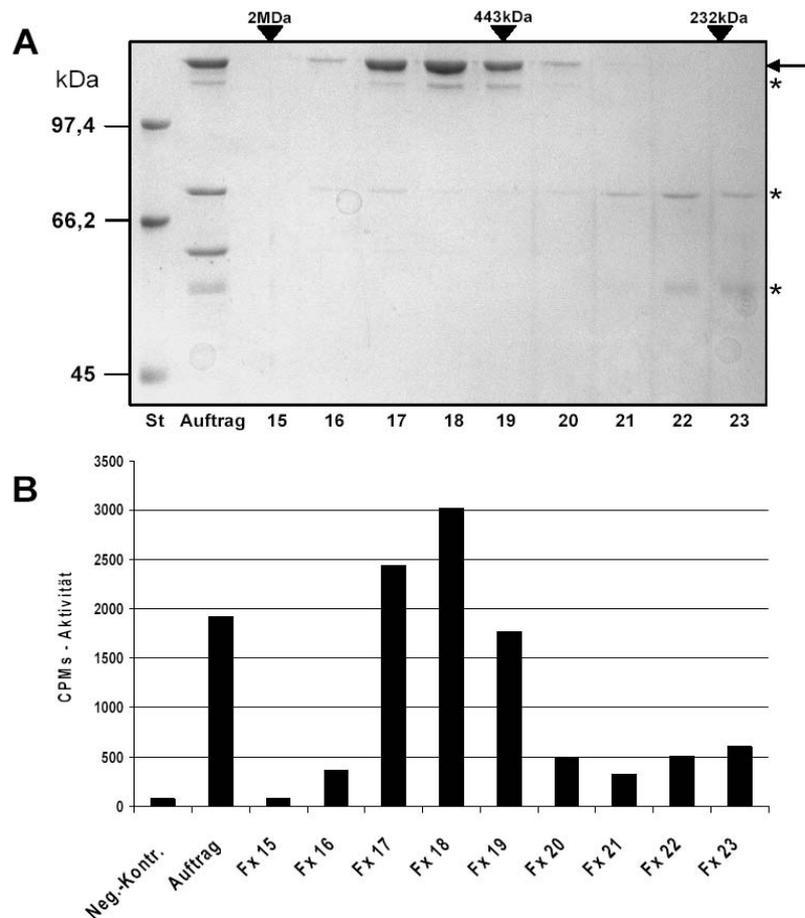


Abbildung 34: -Aufreinigung von MOF (Gelfiltration) (A) und Aktivitätstestung der Fraktionen im HAT-Versuch (B):

A: **SDS-Gel der Fraktionen 15-23.** Die mit (*) markierten Banden stellen Degradationsprodukte dar, die bereits im Auftrag vorhanden waren, und durch die Reinigung nicht gänzlich entfernt werden konnten. Es blieb unklar, warum MOF (92,5kDa) in der Gelelektrophorese nicht entsprechend dem MW aufgetrennt wurde. In Akhtar et al. wurde dieses Phänomen ebenfalls beobachtet (Akhtar and Becker, 2000). Die gewonnene Proteinmenge an MOF war hoch, so dass Fx 17-19 vereint wurden.

B: **HAT-Aktivität der MOF-Fractionen an rekombinanten Nukleosomen.** Es zeigte sich, dass das Enzym Acetylgruppen transferieren konnte. Die Aktivität der einzelnen Fraktionen spiegelt die Intensität der MOF-Protein-Banden in (A) wieder. Verglichen mit dem Auftrag wird eine Anreicherung der Aktivität durch die Aufreinigung erzielt.

Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität bzw. dem quantitativ höchsten MOF-Gehalt (Fx 17-19) wurden anschließend vereint und über Nacht dialysiert (20mM Tris pH 8,0; 50mM NaCl; 0,1 mM EDTA; Proteaseinhibitor 0,2mM PMSF; 0,5mM DTT; 50% Glycerin).

3.3.1.2. Aktivitätstestung von MOF an rekombinanten Nukleosomen

Für die weiteren Versuche war eine ausgiebigere Aktivitätskontrolle des MOF-Proteins an verschiedenen Substraten notwendig. Zunächst wurde ein weiterer HAT-Versuch mit Nukleosomen durchgeführt. Die Analyse per Autoradiographie sollte die Spezifität von MOF bestätigen (vorwiegend Acetylierung von H4). Es wurden hierfür rekombinante und native Nukleosomen eingesetzt (je 24 μ l), die mit je 1, 3, 5, und 10 μ l dialysiertem MOF und je 2 μ l AcCoA* inkubiert wurden. Auch nach fünftägiger Exposition des Röntgenfilms auf dem getrocknetem SDS-Gel konnte lediglich eine *Auto*-Acetylierung von MOF detektiert werden. Eine Acetylierung der Nukleosomen war nicht nachzuweisen (s. Abbildung 35).

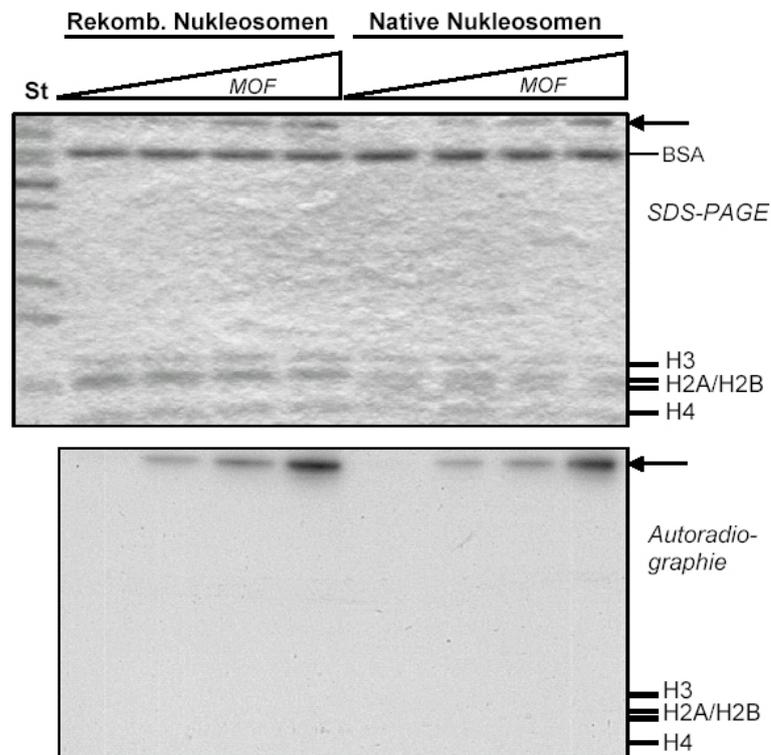


Abbildung 35: HAT-Versuch mit MOF und Nukleosomen führte zu MOF-Autoacetylierung. MOF (Pfeil oben) war nicht in der Lage, Nukleosomen zu acetylieren (Autoradiographie). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Nukleosomen mit rekombinanten oder nativen Oktameren assembliert wurden. Auch die Menge an eingesetztem MOF-Protein beeinflusste das Modifikationsverhalten nicht. MOF war enzymatisch aktiv, aber es acetylierte ausschließlich sich selbst (Pfeil unten).

Das Ergebnis dieses HAT-Versuchs bedingt auch, dass die gemessene Aktivität der Fraktionen nach der Reinigung von MOF (s. 3.3.1.2) auf der Autoacetylierung von MOF beruhte, da hier dieselben rekombinanten Nukleosomen eingesetzt wurden. MOFs nukleosomale Aktivität, wie sie in der Literatur beschrieben ist (Akhtar and Becker, 2000), konnte auch mittels verschiedener Versuchsvariationen und langen Aufliegezeiten der Röntgenfilme nicht reproduziert werden.

3.3.2. Acetylierung von rekombinanten Nucleosomen mit MOF und MSL 1, 2 und 3

MOF ist als Teil des *dosage compensation*-Komplexes mit den Proteinen MSL1, MSL2 und MSL3 assoziiert (Kelley et al., 1995; Smith et al., 2000). Morales et al. hatte mit bakteriell exprimiertem MOF-Protein und mit in Baculoviren exprimierten MSL-Proteinen (MSL1 und MSL3) gezeigt, dass durch deren Zusammenwirken die Acetylierung rekombinanter Nucleosomen stark verbessert wird (Morales et al., 2004). Zeitgleich wurde von unserer Arbeitsgruppe ebenfalls der Nachweis erbracht, dass das in 3.3.1 bereits verwendete MOF-Protein Nucleosomen acetylieren kann. Hierfür wurden die MSL-Proteine 1, 2 und 3 (von V. Morales), rekombinante Nucleosomen, dialysiertes MOF und die drei MSL-Proteine sowie AcCoA* inkubiert. Die isovolumetrische Negativkontrolle war identisch zusammengesetzt, jedoch enthielt sie kein MOF. Anschließend trennten wir den Reaktionsansatz mit einem 18%-SDS-Gel auf und analysierten die inkorporierte Radioaktivität mittels Autoradiographie. Erst nach neuntägiger Auflegezeit offenbarte der Film das abgebildete Signal in H4 (s. Abbildung 36).

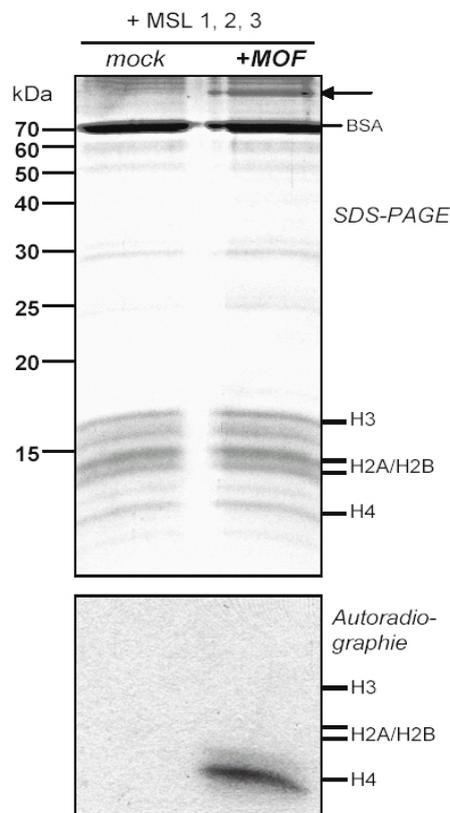


Abbildung 36: MOF kann zusammen mit MSL1, 2, 3 rekombinante Nucleosomen acetylieren. Der HAT-Versuch zeigt, dass MOF (Pfeil) die MSL-Proteine 1-3 benötigt, um die Nucleosomen acetylieren zu können. Die MSL-Proteine können ohne MOF keine Acetylgruppen an nucleosomales H4 transferieren (s. Negativkontrolle). Die katalytische Aktivität war jedoch nicht sehr hoch, da eine lange Expositionszeit für ein Signal notwendig war. Die Nucleosomen (v.a. H3) waren leicht degradiert (Doppelbanden).

MOF konnte demzufolge Nukleosomen nur dann effizient H4 acetylieren, wenn die MSL-Proteine gegenwärtig waren.

3.3.3. Rekombinante und native Oktamere können von MOF acetyliert werden

Wie beispielsweise Smith et al. gezeigt hatten, kann MOF Oktamere acetylieren (Smith et al., 2000). Da sich die H4 K20-spezifische Methylierung von PRset7 an rekombinanten und nativen Nukleosomen deutlich unterschied (s. 3.2.4), sollte herausgefunden werden, ob MOF diese beiden Substrate ebenfalls unterschiedlich stark acetylieren würde. Da sich die Acetylierung an H4 K16 durch MOF in unmittelbarer Nähe der Aminosäure H4 K20 befindet, erschien dies plausibel. In einem HAT-Versuch wurden rekombinante und native Oktamere jeweils mit und ohne MOF in Anwesenheit von AcCoA* inkubiert. Anschließend wurden sie auf einem 18%-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und per Autoradiographie analysiert (1 Tag Exposition; s. Abbildung 37, A). Ein parallel und identisch durchgeführter HAT-Versuch wurde szintigraphisch ausgewertet (s. Abbildung 37, B).

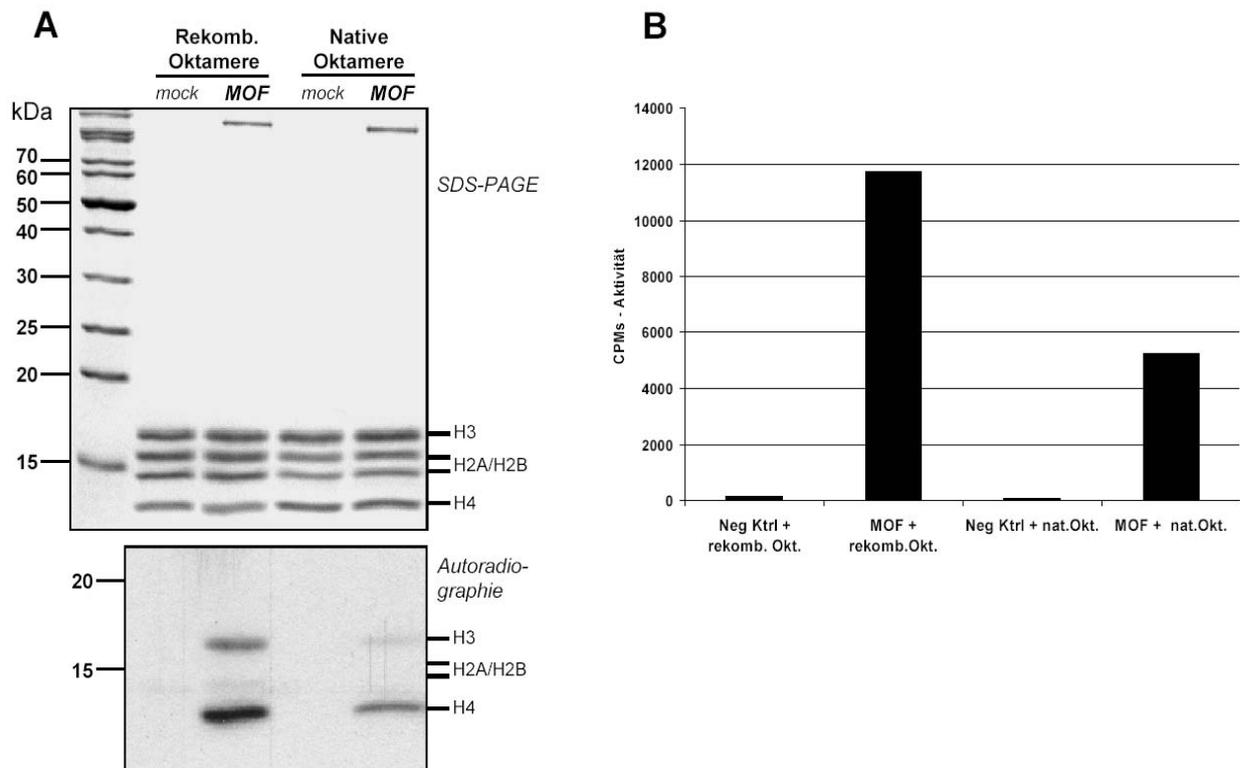


Abbildung 37: MOF-vermittelte Acetylierung von rekombinanten und nativen Oktameren.

A: Die Oktamere wurden von MOF überwiegend an H4 acetyliert. Die enzymatische Aktivität war nicht wie bei Nukleosomen auf die Autoacetylierung von MOF beschränkt. Auffällig war die geringere Acetylierung der nativen Oktamere im Vergleich zu den rekombinanten Oktameren.

B: HAT-Versuch: Szintillationszählung. Im szintigraphischen Aktivitätsnachweis wurde die um ca. 55% geringere Acetylierung der nativen Oktamere quantitativ erfasst.

Erwartungsgemäß war in der Autoradiographie die Acetylierung des Histons H4 der rekombinanten sowie der nativen Oktamere entsprechend der Spezifität von MOF am stärksten ausgeprägt. Doch wurden bei annähernd identischer Menge an Oktameren die nativen im Vergleich zu den rekombinanten Oktameren von MOF weniger stark acetyliert. Unklar blieb warum MOF – ebenso wie PRset7 – die *rekombinanten* Oktamere bevorzugte. Vermutlich hing die verminderte, MOF-vermittelte Acetylierung (K16) und die fast erloschene PRset7-vermittelte Methylierung (K20) an Histon H4 mit bereits *in vivo* erfolgten Modifikationen der Histone aus nativen Oktameren zusammen. Jedoch schienen diese Faktoren MOF bei der Acetylierung nicht so stark zu behindern wie dies für die Methylierung durch PRset7 der Fall war (s. 3.2.4).

3.3.4. K20-methylierte H4-Peptide werden von MOF acetyliert

Nachdem bestätigt werden konnte, dass MOF Oktamere acetylierte, sollte untersucht werden, ob eine Prämethylierung an H4-N-Terminus-Peptiden die Acetylierung durch MOF beeinflussen würde. Die erworbenen H4-Peptide wurden bereits in Kapitel 3.2.5 beschrieben („wt“ und „K20m“). Wir führten mit diesen Substraten einen HAT-Versuch durch und inkubierten die wt- und K20m-Peptide jeweils mit MOF und AcCoA*, bzw. die Negativkontrollen isovolumetrisch ohne MOF (s. Abbildung 38).

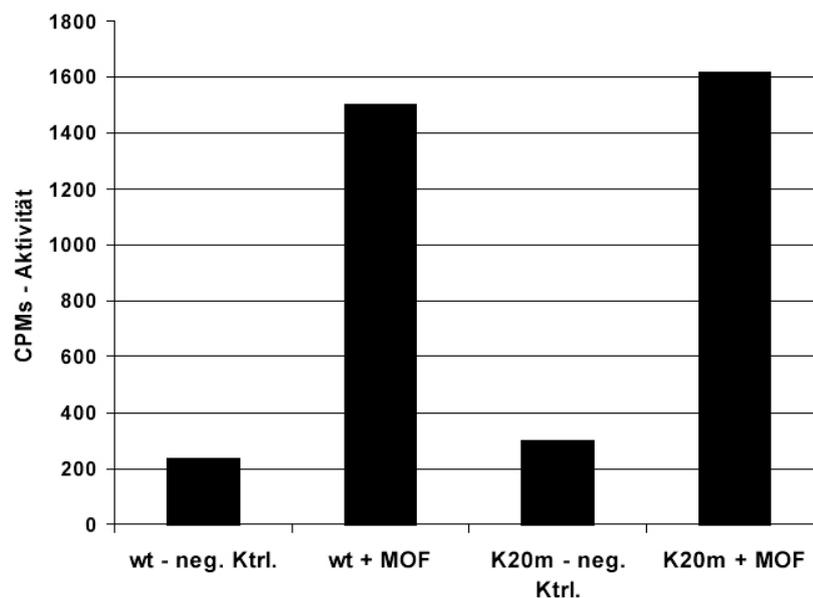


Abbildung 38: Acetylierung von H4 wt- und H4 K20m-Peptiden durch MOF. Die MOF-vermittelte Acetylierung von H4-wt- und H4-K20m-Peptiden wurde szintigraphisch analysiert. Es zeigte sich, dass MOF die an K20 prämethylierten H4-Peptide im Vergleich zu den wt-H4-Peptiden sogar etwas stärker acetylierte.

Das reproduzierbare Ergebnis zeigte, dass eine bestehende K20-Methylierung die MOF-vermittelte H4 K16-Acetylierung nicht inhibierte. Die K20m-H4-Peptide wurden sogar etwas stärker von MOF acetyliert als die wt-H4-Peptide. Dies wies auf eine identische bzw. tendenziell erleichterte K16-Acetylierung bei vorhandener Methylgruppe an K20 hin.

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe massenspektrometrisch die tatsächliche MOF-vermittelte Acetylierung der eingesetzten H4-Peptide nachgewiesen wurde, konnte der Verdacht entkräftet werden, dass die Autoacetylierung von MOF die Ergebnisse des HAT-Versuchs möglicherweise falsch positiv beeinflusst haben könnte.

Zunächst erschienen die Ergebnisse aus 3.3.3 und 3.3.4 widersprüchlich. Doch die nativen Oktamere aus 3.3.3 hatten im Gegensatz zu den H4-N-Terminus-Peptiden den Nachteil, dass sie möglicherweise schon Lysin-Modifikationen aufwiesen: H4 K16-Acetylierungen hätten an den *nativen* Oktameren bereits *in vivo* erfolgt sein können, weshalb MOF die nicht-modifizierten, *rekombinanten* Oktamere aus 3.3.3 vergleichsweise stärker acetylierte. Die Ergebnisse aus 3.3.3 und 3.3.4 standen deshalb nicht im offenem Widerspruch zueinander. Die reduzierte MOF-Acetylierung der nativen Oktamere und die etwas stärkere Acetylierung der prämethylierten H4-Peptide sind vielmehr ein Indiz dafür, dass sich die K16-Acetylierung von einer bereits bestehenden K20-Methylierung wahrscheinlich nicht reduzieren oder inhibieren lässt.

3.3.5. Methylierung von H4 K16- und H4 K12-acetylierten Nukleosomen durch PRset7

Die Ergebnisse aus 3.2.7 hatten nahegelegt, dass der Bereich zwischen der 11. bis 19. Aminosäure des N-terminalen Histon H4 für die nukleosomale K20-Methylierung durch PRset7 essentiell ist. Es sollte aufgeklärt werden, ob PRset7 Nukleosomen auch dann an H4 K20 methylieren kann, wenn sie in diesem Bereich nicht deletiert, sondern acetyliert sind. Zuvor mussten jedoch Nukleosomen synthetisiert werden, die in dem genannten Abschnitt des H4-N-Terminus Lysin-Acetylierungen (H4 K16 und H4 K12) aufwiesen.

Die hierfür durchgeführten Vorversuche mit MOF ergaben, dass Nukleosomen mit Zuhilfenahme der *MSL*-Proteine nur wenig effektiv an H4 K16 acetyliert werden konnten (s. 3.3.2 und 3.3.1.2). Deshalb sollten zuerst rekombinante Oktamere mit MOF an H4 K16 acetyliert werden und die gesetzte Modifikation anschließend verifiziert werden. Daraufhin sollten die Oktamere per Salzdiälyse zu Nukleosomen assembliert werden. Dieser „Umweg“ war nötig, weil einerseits MOF reproduzierbar Nukleosomen nicht acetylierte (s. 3.3.2) und andererseits das substratspezifische PRset7 *ausschließlich* rekombinante Nukleosomen effektiv methylieren konnte (s. 3.2.2).

Die H4 K12-Acetylierung sollte durch die Histonacetyltransferase HAT1 ausgeführt werden. Dieses Enzym gehört zur Familie der HAT-*B*-Histonacetyltransferasen (s. 2.2.2.1) und wurde ursprünglich in Hefe identifiziert. Für die Versuche wurde rekombinant hergestelltes HAT1 verwendet. Außer der H4 K12-Acetylierung verfügt HAT1 über eine H4 K5-Acetylase-Aktivität (Parthun et al., 1996). Diese Modifikation liegt aber außerhalb jenes Bereiches, der für die Enzymaktivität von PRset7 essentiell ist (kein Aktivitätsverlust bei N-terminaler H4-Deletion bis zur 10. Aminosäure, s. 3.2.7). Deshalb wurde im Folgenden davon ausgegangen, dass eine zusätzliche Acetylierung an H4 K5 durch HAT1 die Fragestellung nicht beeinflussen würde.

Da die in zwei getrennten Ansätzen und durch zwei unterschiedliche Enzyme hergestellten H4 K12- und H4 K16-acetylierten Substrate für die anschließenden HMTase-Versuche mit PRset7 vergleichbar sein sollten, wurde mit der H4 K12-Acetylierung durch HAT1 ebenso verfahren wie mit der H4 K16-Acetylierung durch MOF. Die rekombinanten Oktamere wurden erst nach erfolgreicher Acetylierung zu acetylierten Nukleosomen assembliert.

3.3.5.1. Herstellung von H4 K16- und H4 K12-acetylierten Oktameren

Für die Acetylierung von Oktameren wurde eine identische Menge rekombinanter Oktamere mit AcCoA (nicht radioaktiv markiert) und mit dialysiertem MOF bzw. mit HAT1 inkubiert. Somit erhielten wir H4 K16- bzw. H4 K5- und K12-acetylierte Oktamere, die jedoch noch von dem im Reaktionsgemisch enthaltenem AcCoA und den Histonacetyltransferasen befreit werden mussten. Dies gelang durch die Verwendung von Kationenaustauschern („Biorex 70-*Beads*“, s. 5.1.1), welche die stark positiv geladenen Oktamere binden können. Nach sechsmaligen Waschschritten der mit Oktameren beladenen Biorex 70 *Beads* mit 200mM BC-Puffern sollten die Enzyme und das AcCoA aus dem HAT-Versuch eliminiert worden sein. Die Elution der acetylierten Oktamere von den Biorex 70-*Beads* wurde mit hohen Salzkonzentrationen durchgeführt (NaCl 2M) wodurch die Oktamere aus der Bindung mit den negativ geladenen *Beads* verdrängt wurden.

Die Oktamere wurden mit Antikörpern hinsichtlich ihrer Acetylierung analysiert, die für die gesetzten Modifikationen am H4-N-Terminus spezifisch sein sollten. Dabei wurden sowohl die H4 K16- und die H4 K5+K12-acetylierten Oktamere, als auch unmodifizierte, rekombinante Oktamere jeweils mit einem H4-K16-acetyl-Antikörper (Anti-H4-K16-ac) und einem H4-K12-acetyl-Antikörper (Anti-H4-K12-ac) untersucht (s. Abbildung 39).

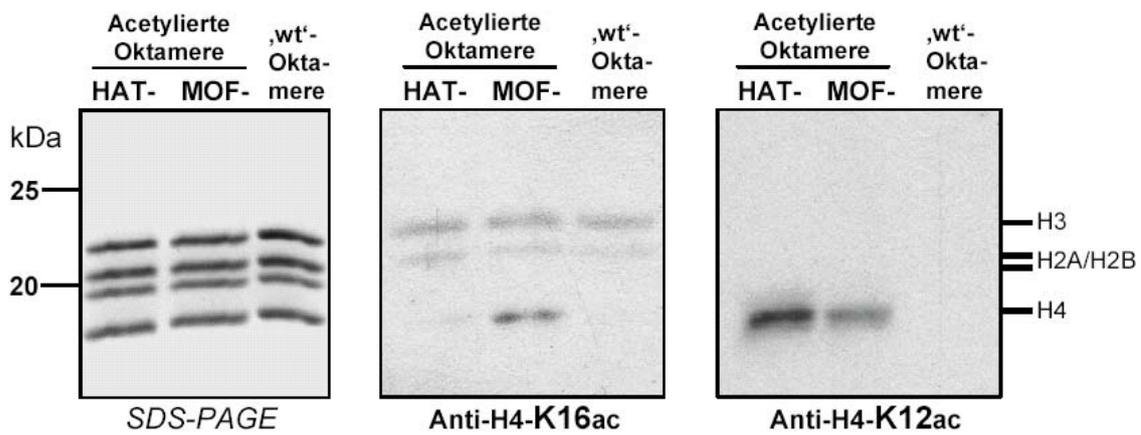


Abbildung 39: Western Blot mit spezifischen H4-acetyl-Antikörpern bestätigt die Oktamer-Acetylierung. Im Western Blot mit Anti-H4-K16-acetyl und Anti-H4-K12-acetyl wurden die Oktamere auf die spezifische Acetylierung durch MOF bzw. durch HAT1 untersucht. Anti-H4-K16-acetyl kreuzreagiert etwas mit H3 und H2A/H2B, erkennt jedoch spezifisch das MOF-acetylierte H4 im Oktamer. Anti-H4-K12-acetyl erkennt die HAT-acetylierten Oktamere an H4 deutlich. Die zusätzliche Detektion Anti-H4-K12-acetyl in MOF-acetylierten Oktameren ist entweder in geringer Spezifität von Anti-H4-K12-acetyl oder in einer partiellen H4 K12-Acetylierung durch MOF begründet.

Anti-H4-K16-ac erkannte H4 in MOF-acetylierten Oktameren im Vergleich zu H4 K12-acetylierten Oktameren (trotz schwacher Bande) spezifisch. Ein weiterer Beleg für die MOF-vermittelte H4-Acetylierung (allerdings nicht spezifisch für Lysin 16) fand sich ferner im HAT-Versuch aus 3.3.3.

Anti-H4-K12-ac erkannte die HAT1-acylierten Oktamere am stärksten, jedoch wurden auch die MOF-acetylierten Oktamere schwach detektiert. Es konnte weder ausgeschlossen werden, dass Anti-H4-K12-ac mit der H4 K16-Acetylierung kreuzreagierte, noch dass MOF möglicherweise H4 K12 geringfügig acetylieren kann.

Beide Antikörper erkannten jedoch diejenigen H4-Acetylierungen am besten, gegen die sie gerichtet waren und sowohl Anti-H4-K12-ac als auch Anti-H4-K16-ac detektierten die unmodifizierten ‚wt‘-Oktamere nicht. Somit konnte gezeigt werden, dass beide Oktamere spezifisch acetyliert wurden.

3.3.5.2. Assemblierung von H4 K16- und H4 K12-acetylierten Nukleosomen

Die H4 K16- und die H4 K12-acetylierten Oktamere wurden nun per Salzdialyse zu Nukleosomen assembliert (s. 3.2.2; 5.2.13). Um für die folgenden Versuche wiederum identische Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde die Assemblierungsrate der gewonnenen H4 K12- sowie der H4 K16-acetylierten Nukleosomen mit einem MNase-Verdau (s. 5.2.14) analysiert (s. Abbildung 40).

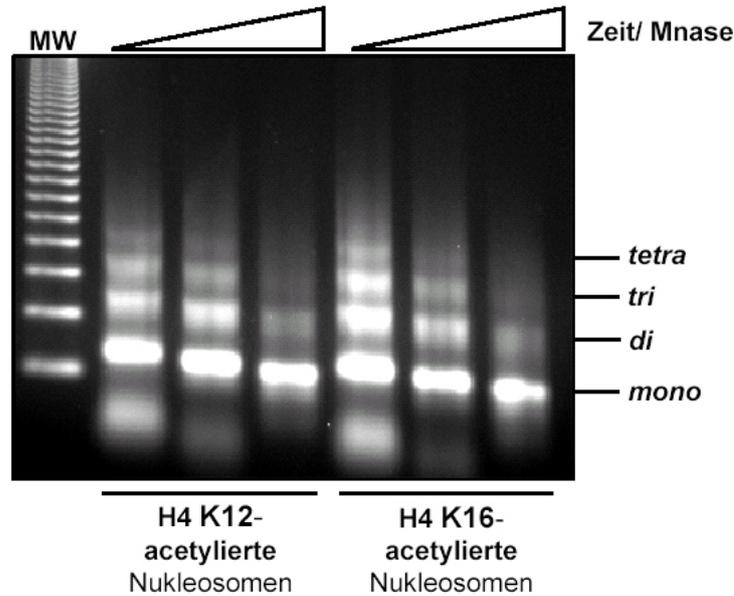


Abbildung 40: Mikrokokkusnuklease-Verdau der mit MOF (H4 K16) bzw. HAT1 (H4 K12) acetylierten Nucleosomen. Zwar war in beiden Assemblierungsreaktionen das DNA/ Histon-Verhältnis geringfügig zu hoch (s. 10-Sekunden-Spuren: subnucleosomale DNA), doch waren die unterschiedlich acetylierten Nucleosomenarrays gemessen an der Assemblierungsrate identisch und somit vergleichbar (in jeder 10-Sekunden-Spur sind mindestens Tetra-Nucleosomenarrays vorhanden).

Der Assemblierungsgrad der Nucleosomen war nahezu identisch und konnte auch mit dem der zuvor assemblierten, rekombinanten Nucleosomen (s. Abbildung 22) verglichen werden. Im Folgenden sollte ein vergleichender HMTase-Versuch mit PRset7 unter Verwendung der beiden acetylierten Nucleosomen und der unmodifizierten Nucleosomen durchgeführt werden.

3.3.6. HMTase-Versuch mit PRset7 an H4 K16- und H4 K12-acetylierten Nucleosomen

Nachdem herausgefunden wurde, dass H4 K20-prä-methylierte Substrate (H4 N-terminale Peptide) die Acetylierungsrate an H4 K16 wenig oder gar nicht beeinflussen können, sollte nun im Umkehrschluss untersucht werden, ob oder in welchem Maße PRset7 präacetylierte Nucleosomen mit Acetylgruppen an Histon H4 K12 bzw K16 an K20 methylieren kann.

Dazu wurde mit identischen Mengen der präacetylierten Nucleosomen ein HMTase-Versuch mit PRset7 und SAM* durchgeführt, der nach 5, 10 und 30 Minuten Inkubationszeit durch das Auftragen einer einheitlichen Menge des Reaktionsansatzes auf ein p81-Filterpapier gestoppt wurde (s. 5.2.16). Die Szintillationszählung sollte auch den ungefähren zeitlichen Verlauf der H4 K20-Methylierung an den unterschiedlichen Nucleosomenarrays wiedergeben. Als Positivkontrolle dienten unmodifizierte rekombinante Nucleosomen. (s. Abbildung 41).

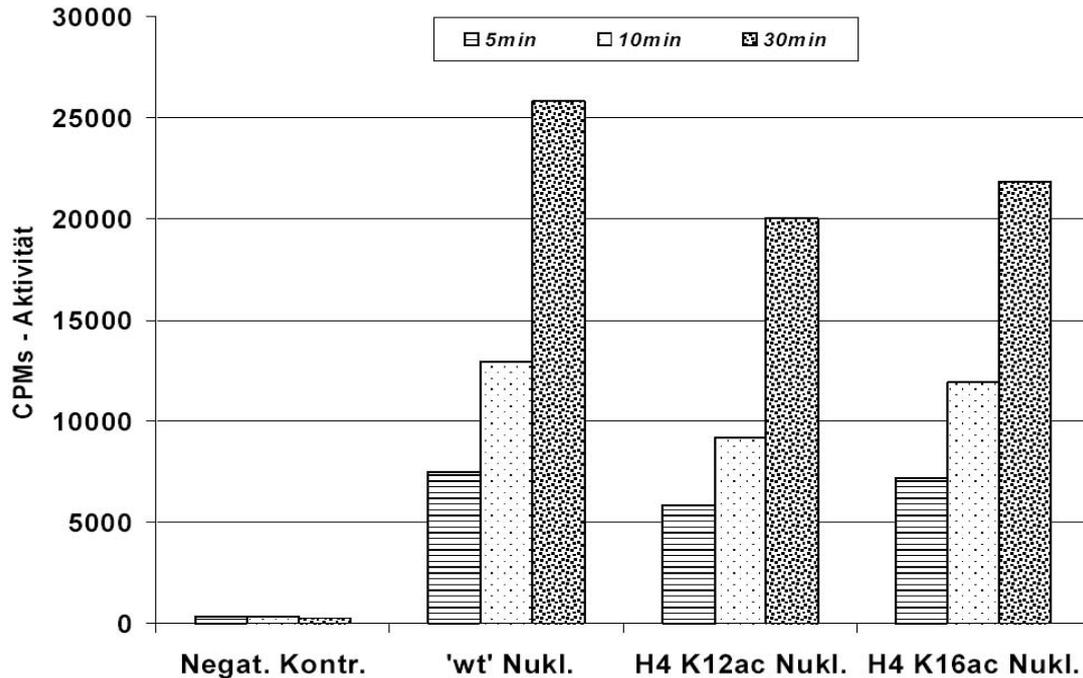


Abbildung 41: HMTase-Versuch mit PRset7 und H4 K12- und H4 K16-acetylierten Nucleosomen. Die Reaktionen wurden jeweils nach 5, 10, und 30 Minuten gestoppt, um den zeitlichen Verlauf grob nachzuvollziehen. Die acetylierten Nucleosomen wurden etwas schlechter methyliert als die unmodifizierten ‚wt‘-Nucleosomen. Insgesamt wird durch den HMTase-Versuch keine signifikante Reduktion der Methylierung durch bereits am H4-N-Terminus bestehenden Acetylgruppen angedeutet, da eine etwas geringere Quantität beider präacetylierter Nucleosomen im Vergleich zu den wt-Nucleosomen angenommen werden muss (s. Abbildung 39: Bandenintensität der Oktamere im SDS-Gel vor der Assemblierung).

Der Szintillationszählung des HMTase-Versuchs ergab, dass PRset7 in der Lage war, die präacetylierten Nucleosomen zu methylieren. Die höchste Aktivität wurde in den unmodifizierten (‚wt‘) Nucleosomen erzielt (Positivkontrolle), während die H4 K20-Methylierung der acetylierten Nucleosomen etwas geringer ausfiel. Die H4 K12-acetylierten Nucleosomen konnte PRset7 etwas schlechter methylieren, als die H4 K16-acetylierten Nucleosomen. Jedoch musste eine geringere Konzentration der präacetylierten Nucleosomen im Vergleich zu den unmodifizierten Nucleosomen angenommen werden (s. Abbildung 39, SDS-Gel der Oktamere). Der zeitliche Verlauf inkorporierter Methylgruppen nach 5, 10 und 30 Minuten war (gemessen an den absoluten Werten der Aktivitätszählung) bei allen eingesetzten Substraten vergleichbar.

Um die gemessenen Werte und die Substratspezifität der Modifikation besser beurteilen bzw. bestätigen zu können, wurde erneut ein identischer HMTase-Versuch (Inkubationszeit 30 Min.) durchgeführt, der anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Autoradiographie sichtbar gemacht wurde (s. Abbildung 42).

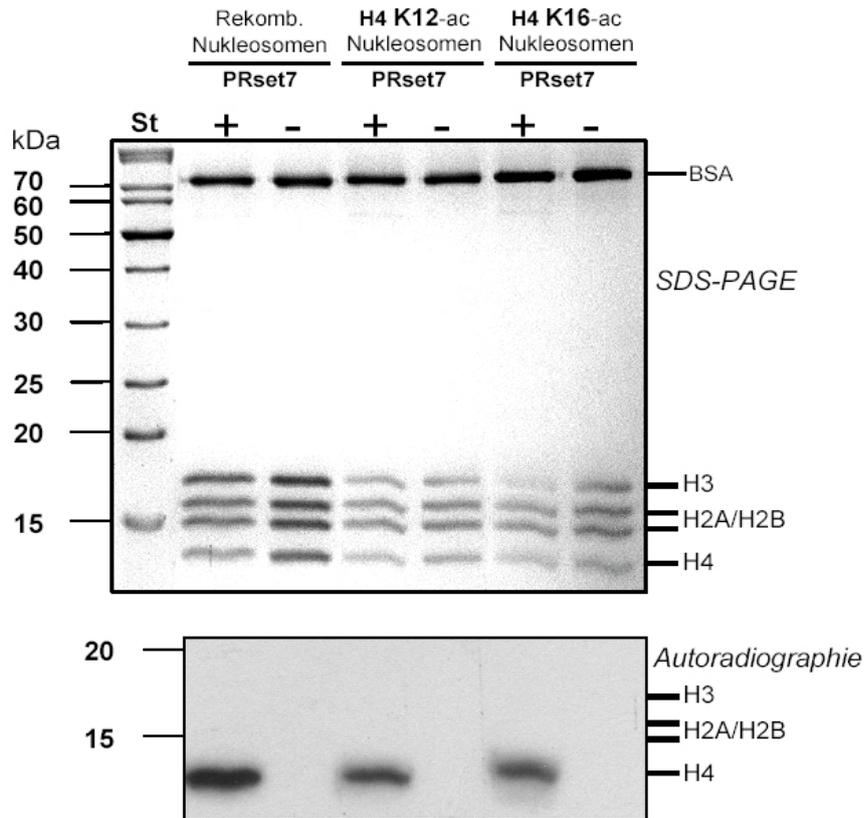


Abbildung 42: SDS-Gel und Autoradiographie des HMTase-Versuchs von PRset7 mit präacetylierten Nukleosomen. Die präacetylierten Nukleosomen werden von PRset7 methyliert, jedoch etwas weniger stark als die unmodifizierten Nukleosomen. Wahrscheinlich ist dies ein quantitatives Phänomen, erkennbar an den schwächeren Histonbanden der präacetylierten Nukleosomen im SDS-Gel. Eine partielle Inhibition der PRset7-Methylierung durch die Präacetylierung kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Der Röntgenfilm bestätigte, dass PRset7 die an H4 K12 und die an H4 K16 acetylierten Nukleosomen an H4 methylieren konnte und dass die Methylierung dieser beiden Substrate in der Intensität etwas geringer auszufallen schien, als die Methylierung der unmodifizierten Positivkontrolle („Rekomb. Nukleosomen“). Obwohl bei der Assemblierung von unmodifizierten und acetylierten Oktameren zu Nukleosomen nach demselben Protokoll mit identischen Mengen DNA und Oktameren verfahren wurde (s. 5.2.13), war an den aufgetragenen Nukleosomen im SDS-Gel dennoch zu erkennen, dass die Histonproteine der acetylierten Nukleosomen etwas weniger intensive Banden aufwiesen, als die unmodifizierten, rekombinanten Nukleosomen. Die etwas geringere Methylierung der präacetylierten Nukleosomen könnte somit durch diesen Konzentrationsunterschied begründet sein. Eine mäßige Inhibition der PRset7-vermittelten Methylierung durch die Präacetylierung kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Aufgrund des erfolgreichen Nachweises inkorporierter Methylgruppen hatten die H4 K12- bzw. die H4 K16-acetylierten Nukleosomen offenbar keine „global inhibierenden“ Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität von PRset7.

3.3.7. HMTase-Versuch in Anwesenheit präacetylierter und unmodifizierter Nukleosomen

Da nach den bisherigen *in vitro*-Versuchen ausgesagt werden konnte, dass die H4-Acetylierung an K12 oder K16 die enzymatische Aktivität von PRset7 an Nukleosomen nicht wesentlich zu beeinflussen schien, stellte sich die Frage, ob PRset7 in gleichzeitiger Anwesenheit unmodifizierter *und* präacetylierter Nukleosomen eines der beiden Substrate bevorzugen würde. In Kapitel 3.2.7 wurden Nukleosomen mit N-terminal deletierten H4-Histonen zur Untersuchung der Bindungs- und Substratspezifität von PRset7 verwendet. Die Deletion bis zur 10. Aminosäure des H4-N-Terminus tat der HMTase-Aktivität von PRset7 keinen Abbruch (s. Abbildung 30). Die H4-delta10-Nukleosomen eigneten sich daher gut, um eine mögliche Präferenz von PRset7 zwischen nicht-acetylierten H4-delta10-Nukleosomen und den beiden an H4 acetylierten Nukleosomen in einer gemeinsamen Reaktion zu untersuchen. Die Gelelektrophorese sollte die unterschiedlich großen H4-Moleküle der H4-delta10- und der präacetylierten Nukleosomen auftrennen, um die jeweilige Methylierung per Autoradiographie sichtbar machen zu können.

In einem Reaktionsansatz wurden jeweils die H4-delta10-Nukleosomen und die H4 K12-acetyl bzw. die H4 K16-acetyl-Nukleosomen (je 1:1-Verhältnis) zusammen mit PRset7 und SAM* im Rahmen eines HMTase-Versuches inkubiert. Über Nacht wurde ein Röntgenfilm auf dem SDS-Gel exponiert (s. Abbildung 43).

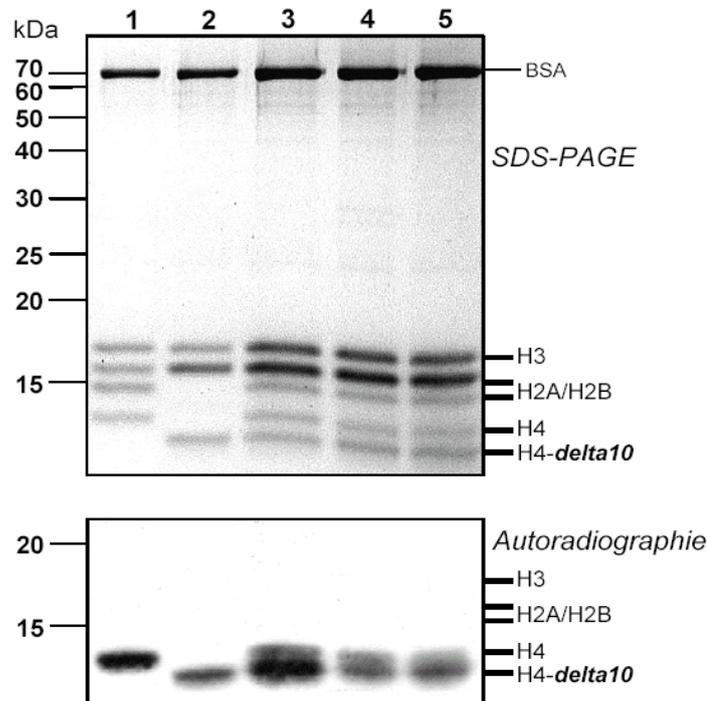


Abbildung 43: HMTase-Versuch mit PRset7 an H4-delta-10-, H4 K12-acetyl- und H4 K16-acetyl-Nukleosomen. Es sollte untersucht werden, inwieweit PRset7 Präferenzen bei gleichzeitigem Vorliegen von unmodifizierten und präacetylierten Nukleosomen bzgl. der H4 K20-Methylierung hat. Dabei dienten H4-

delta10-Nukleosomen als „Ersatz“ für unmodifizierte rekombinante Nukleosomen. Mit dieser eleganten Lösung konnten wegen des unterschiedlichen Molekulargewichts von H4 die inkorporierten Methylgruppen beider Nukleosomen per Autoradiographie (nach Auftrennung auf einem 18% SDS-Gel) getrennt voneinander evaluiert werden. Es zeigte sich, dass PRset7 keine eindeutige Präferenz hat, da sowohl beide acetylierten Nukleosomen als auch die H4-delta10-Nukleosomen gleichzeitig methyliert werden konnten.

- 1 Unmodifizierte, rekombinante Nukleosomen
- 2 H4-delta10-Nukleosomen
- 3 1:1-Verhältnis von H4-delta10- und unmodifizierten, rekombinanten Nukleosomen
- 4 1:1-Verhältnis von H4-delta10- und H4 K12-acetylierten Nukleosomen
- 5 1:1-Verhältnis von H4-delta10- und H4 K16-acetylierten Nukleosomen

Auch bei gemeinsamer Anwesenheit von H4 K12- bzw. H4 K16-acetylierten Nukleosomen sowie von H4-delta10-Nukleosomen (stellvertretend für ‚wt‘-rekombinante Nukleosomen mit unverkürztem H4) konnte keine eindeutige Bevorzugung eines der beiden Substrate durch PRset7 aufgedeckt werden.

3.3.8. Die Deacetylierung von H4-Peptiden ist nicht vom Methylierungsstatus abhängig

Mit massenspektrometrischen Experimenten wurde in unserer Arbeitsgruppe herausgefunden, dass gereinigte Histone aus *Drosophila* (nativ) fast durchgängig eine Monoacetylierung und eine Dimethylierung am Histon H4-N-Terminus aufwiesen (Bonaldi et al., 2004). So entwickelte sich die Fragestellung, ob eine Deacetylasereaktion an einem acetylierten und dimethylierten H4-N-Terminus im Vergleich zu einem acetylierten und nicht-methylierten H4-N-Terminus positiv oder negativ beeinflusst würde. Es war zum Beispiel denkbar, dass die gewöhnlich reaktionsfreudigen HDACs durch die Dimethylierung an ihrer Deacetylaseaktivität gehindert werden könnten.

Hierzu wurden H4-N-Terminus-Peptide („wt“ und „K20m“; s.a. 3.2.5) mit MOF in einem HAT-Versuch acetyliert (Inkubation der wt- und K20m-Peptide mit MOF und AcCoA*, s.a. 3.3.4). Eine identische Menge der acetylierten Peptide wurde mit einer Szintillationszählung analysiert, um die Effizienz der HAT-Reaktion quantitativ beurteilen zu können. Somit konnten die Peptide gemäß der geringgradig unterschiedlich inkorporierten Radioaktivität mengenmäßig für den folgenden Histon-Deacetylase-Versuch (HDAC-Versuch) abgeglichen werden.

Für den HDAC-Versuch wurde die Histondeacetylase Rpd3 (von A. Brehm) verwendet. Es wurde je eine identische Menge radioaktiv markierter wt- und K20m-Peptide mit Rpd3 inkubiert und die Menge freigesetzter radioaktiver Acetylgruppen szintigraphisch gemessen (s. Abbildung 44). Die Negativkontrollen waren bis auf nicht enthaltenes Rpd3 identisch zusammengesetzt.

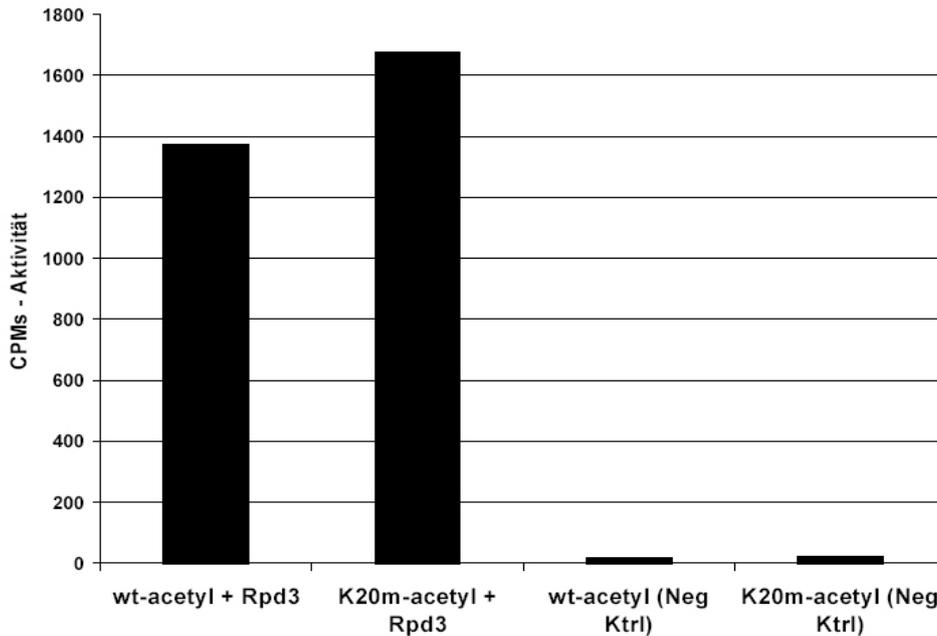


Abbildung 44: Deacetylierung acetylierter H4-N-Terminus-Peptide durch Rpd3. K20-methylierte („K20m“) und unmodifizierte („wt“) H4-N-Terminus-Peptide wurden zuerst acetyliert und anschließend mit Rpd3 in einem Histondeacetylase-Versuch (HDAC-Versuch) inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Methylierung an K20 keinen negativen Einfluss auf die katalytische Deacetylaseaktivität von Rpd3 hat.

Die Szintillationszählung ergab, dass es keine Beeinflussung der Histondeacetylase-Aktivität von Rpd3 durch eine eventuell vorhandene Methylierung (K20m-Peptide) zu beobachten war. Vielmehr scheint Rpd3 die radioaktiv markierten Acetylgruppen von K20m-Peptiden effektiver entfernen zu können als von nicht-methylierten wt-Peptiden.

3.3.9. Anti-H4-K20-dimethyl und Anti-H4-K16-acetyl an acetylierten H4-N-Terminus-Peptiden

In einigen Versuchen verwendeten wir Antikörper, die eine sehr spezifische Substraterkennung für einzelne modifizierte Aminosäuren in den N-Termini der Histone aufweisen sollten. In der Literatur wurden ebenfalls Antikörper zum Nachweis der H4 K20-Methylierung aus *in vitro*-Versuchen oder zum Anfärben von Chromatinbezirken in Polytän-Chromosomen aus *Drosophila* verwendet; diese Daten erschienen teilweise widersprüchlich (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b; Rice et al., 2002). Da die verschiedenen Modifikationen häufig auf engstem Raum vorliegen (z.B. H4 K20-Methylierung und H4 K16-Acetylierung), sollte anhand von Anti-H4-K20-dimethyl und Anti-H4-K16-acetyl untersucht werden, wie spezifisch die Antikörper für die Detektion dieser Modifikationen sind, wenn gleichzeitig eine benachbarte, weitere Modifikation vorliegt. Im Speziellen sollte ermittelt werden, ob Anti-H4-K16-acetyl an den H4-N-Terminus-Peptiden zwischen „K16-acetyl und K20-methyl“ und „K16-acetyl und nicht-modifiziert (wt)“ unterscheiden könnte. Weiterhin

sollte in Erfahrung gebracht werden, ob Anti-H4-K20dimethyl an Peptiden zwischen „K20m methyl und H4 K16-acetyl“ und „nicht-modifiziert (wt) und K16-acetyl“ differenzieren würde.

Um sowohl die methylierten („K20m“) als auch die unmodifizierten („wt“) H4-N-Terminus-Peptide zu acetylieren, wurde ein HAT-Versuch mit der Histonacetyltransferase MOF wie in 3.3.4 durchgeführt. Dort wurde bereits gezeigt, dass beide H4-Peptide von MOF acetyliert werden konnten. Die vier unterschiedlichen Peptide (wt-acetyl und K20m-acetyl; wt und K20m (nicht-acetyliert)) wurden anschließend in drei Quantitäten je Peptid (2, 5 und 10µg) auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die aufgetragenen Peptide wurden mit den entsprechenden Antikörpern gleichsam einem Western Blot inkubiert (s. 5.2.5).

3.3.9.1. Untersuchung zur Spezifität von Anti-H4-K16-acetyl

Der erste auf der Membran verwendete Antikörper war Anti-H4-K16-acetyl in einer Verdünnung von 1:1000 (s. Abbildung 45).

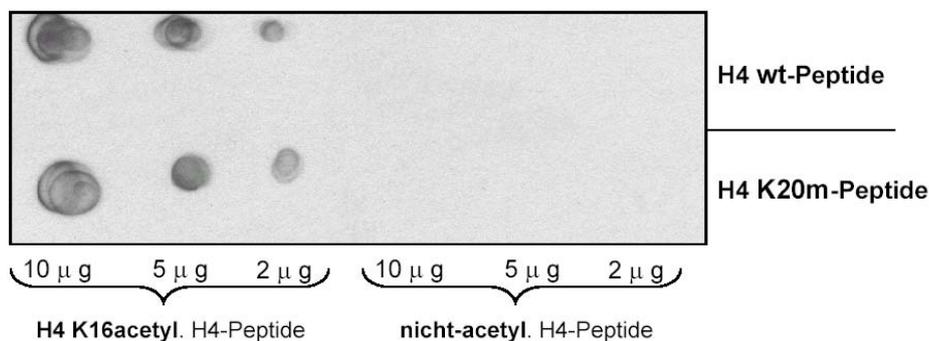


Abbildung 45: Detektion von acetylierten und nicht-acetylierten H4-Peptiden mit Anti-H4-K16-acetyl Anti-H4-K16-acetyl ist für die Acetylierung von H4-Peptiden sehr spezifisch (keine Detektion der nicht-acetylierten H4-Peptide). Eine zusätzlich vorhandene Methylierung an acetyliertem K20m-H4-Peptid beeinflusst die spezifische Erkennung der Acetylgruppe an K16 nicht.

Der exponierte Film zeigte, dass Anti-H4-K16-acetyl spezifisch für die Acetylierung von H4 K16 ist. Der Antikörper machte keinen Unterschied zwischen methylierten (K20m) oder nicht-methylierten (wt) Peptiden, solange eine Acetylierung mit MOF stattgefunden hatte. Nicht-acetylierte wt- oder K20m-H4-Peptide wurden nicht detektiert.

3.3.9.2. Untersuchung zur Spezifität von Anti-H4-K20-dimethyl

Nach dem Entfernen der Antikörper des vorhergehenden Versuchs wurde die Peptidmembran mit dem H4 K20-dimethyl-Antikörper inkubiert (ebenfalls in einer 1:1000-Verdünnung des Antikörpers, s. Abbildung 46).

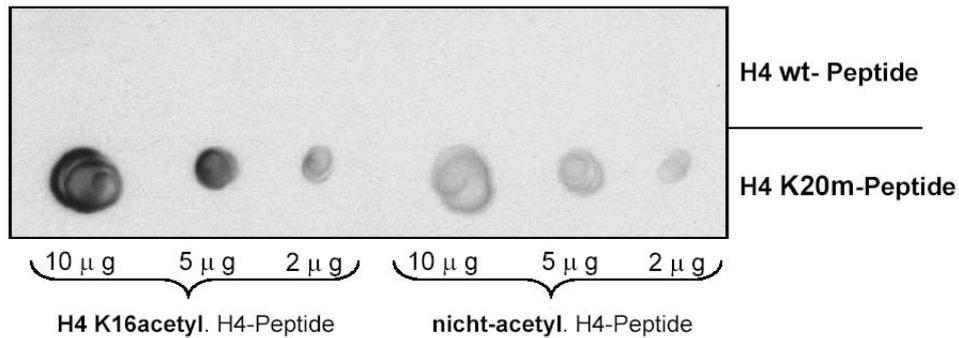


Abbildung 46: Detektion von acetylierten und nicht-acetylierten H4-Peptiden mit Anti-H4-K20-dimethyl
Eine bessere Detektion von zuvor acetylierten prämethylierten Peptiden wurde beobachtet.

Anti-H4-K20-dimethyl detektierte die K20m-Peptide offensichtlich besser, wenn sie zuvor von MOF an H4 K16 acetyliert wurden. Dieses Ergebnis offenbarte, dass Anti-H4-K20-dimethyl verglichen mit Anti-H4-K16-acetyl weniger spezifisch ist: Zumindest die Intensität der Detektion dieses Antikörpers kann durch eine weitere Modifikation beeinflusst werden. Der Antikörper Anti-H4-K20-dimethyl ist jedoch ausreichend spezifisch, um die wt- von den K20m-Peptiden zu differenzieren.

4. DISKUSSION

Die vorgelegten Ergebnisse aus Untersuchungen zu den Histonmethyltransferasen E(z) und PRset7 sollen vorwiegend hinsichtlich der HMTase PRset7 und der H4 K20-Methylierung diskutiert werden. Die Daten zu E(z) und dem E(z)-Esc-Komplex wurden bereits publiziert sowie in der Einleitung (s. 2.6.1) und ferner in Übersichtsartikeln ausführlich dargestellt (z.B. in Cao and Zhang, 2004b). Auf die wachsenden medizinischen Implikationen von E(z) und anderen PcG- und TrxG-Proteinen ist in 2.8 eingegangen worden.

4.1. Interpretation der mit E(z) erzielten Ergebnisse

Mit dem rekombinant exprimierten E(z)-Protein konnte keine HMTase-Aktivität erhalten werden. Eine Mutation des aktiven Zentrum von E(z) konnte erfolgreich eingeführt werden (E(z)mut). Durch die Inkubation von rekombinantem E(z)- bzw. E(z)mut-Protein mit embryonalem Kernextrakt („Trax“) aus *Drosophila* wurde jeweils die Rekrutierung zusätzlicher Faktoren erreicht. Auf diese Weise konnte die Bindung der HDAC Rpd3 an E(z) und E(z)mut sowie die Rpd3-assoziierte HDAC-Aktivität nachgewiesen werden. Hier wäre es sinnvoll gewesen, die Proteinmengen an E(z)- und E(z)mut-Protein vor der Durchführung des HDAC-Versuchs zu normalisieren (s. 3.1.5.2). Da auch E(z)mut Rpd3 binden kann und da die Mutation der SET-Domäne unweit des C-Terminus von E(z) liegt, ist es unwahrscheinlich, dass eine mutationsbedingte, veränderte Faltung zur enzymatischen Inaktivität von E(z)mut führen würde. Tie et al. konnten in Bindungsstudien mit Deletionsproteinen zeigen, dass ein 73 Aminosäuren langes Polypeptid des E(z)-N-Terminus für die Interaktion mit Rpd3 ausreicht (Tie et al., 2001). In diesem Zusammenhang erscheint die Frage interessant, ob die Bindung von Kofaktoren (z.B. Rpd3) an die N-terminale Region von E(z) eine räumliche Veränderung des Proteins bewirkt und erst hiermit die HMTase-Aktivität von E(z) induziert wird.

Die Ergebnisse aus 3.1 sind nebst weiteren Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe in die Publikation von Czermin et al. eingegangen. Die mit E(z) im Komplex assoziierten Proteine konnten identifiziert (s. 2.6.1) und die Rpd3-Bindung an E(z) aus der Trax-Inkubation somit bestätigt werden (s. 3.1.5.1). Mit rekombinant hergestellten Proteinen des identifizierten E(z)-Komplexes gelang es weiterhin, einen E(z)-Komplex *in vitro* herzustellen. An diesem wurde die HMTase-Aktivität von E(z) und die fehlende HMTase-Aktivität eines entsprechenden Komplexes demonstriert, der E(z)mut enthielt (Czermin et al., 2002); s. 3.1.3.

Durch die Transfektion von FLAG-getagtem E(z) in *Drosophila*-Zellen konnte bislang kein *in vivo* entstandener, „eukaryonter“ E(z)-Esc-Komplex hergestellt werden. Möglicherweise ist die mangelhafte Expression von Esc hierfür verantwortlich, da dieses Protein *in vivo* nur während der frühen Embryonalphase exprimiert wird und ab dem Larvenstadium in den Zellen nicht mehr nachweisbar ist. Es ist deshalb durchaus denkbar, dass der aus den Kernextrakten von *Drosophila*embryos aufgereinigte und beschriebene E(z)-Esc-Komplex in Sf4-*Drosophila*-Zellen in dieser Form nicht existiert, weil er nur in der frühen Embryonalphase zur *Etablierung* von homöotischen Expressionsmustern benötigt wird.

Cao et al. gelang es schließlich, die minimalen Bestandteile eines aktiven E(z)-Esc-Komplexes zu identifizieren. Mit Hilfe eines Baculo-Expressionssystems konnte gezeigt werden, dass neben E(z) und Esc nur noch der Komplexpartner Su(z)12 für eine HMTase-Aktivität von E(z) benötigt wird. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass durch die Bindung von Su(z)12 und eine dadurch bewirkte räumliche Veränderung (innerhalb des E(z)-Proteins oder zwischen E(z) und Nukleosom) eine Triggerung der HMTase-Aktivität von E(z) stattfindet. Offensichtlich ist Su(z)12 auch für die PcG-Funktionen essentiell: In knockdown-Experimenten konnte gezeigt werden, dass an zuvor stillgelegten *hox*-Genen wieder eine Transkription stattfindet (Cao and Zhang, 2004a).

Einen Hinweis darauf, dass ein anderer, ca. 3MDa E(z)-Komplex für die *Aufrechterhaltung* der *hox*-Genregulation verantwortlich sein könnte, wurde von Furuyama et al. erbracht. In diesem Komplex wird erstmals die nicht in Embryonen gefundene Assoziation des aus Hefe bekannten *silencing*-Proteins SIR2 mit E(z) beschrieben und mit PcG-vermitteltem *silencing* verknüpft (Furuyama et al., 2004).

4.2. PRset7, die H4 K20-Methylierung und die H4 Acetylierung

4.2.1. Die nukleosomale Spezifität der PRset7-vermittelten H4-Methylierung

In den Versuchen zur Substratspezifität von PRset7 war ausschließlich die Methylierung von rekombinanten Nukleosomenarrays an Histon H4 stark ausgeprägt (s. 3.2.2 und 3.2.3). In rekombinantem Histon H4 und in rekombinanten Oktameren wurde hingegen eine ca. 75-fach geringere Inkorporation von Methylgruppen festgestellt. Da die Assemblierung der rekombinanten Oktamere mit Plasmid-DNA zu einer kurzen Nukleosomenkette (Nukleosomenarray) das einzige Unterscheidungsmerkmal zwischen den rekombinanten Oktameren und den rekombinanten Nukleosomen darstellt, musste entweder die nukleosomale DNA, die Verbindungs-DNA oder eine andere ausgebildete Struktur zwischen zwei (zu Nukleosomen assemblierten) Oktameren für die Methylierung durch PRset7 besonders förderlich sein. Fang et al. wollten dieser Frage nachgehen, indem sie nicht-

assemblierte Oktamere und DNA in einem HMTase-Versuch mit PRset7 (bzw. Set8) inkubierten. Sie detektierten zwar eine vergleichsweise vermehrte Inkorporation von Methylgruppen, konnten jedoch nicht ausschließen, dass sich in der Reaktion aus nicht-assemblierten Oktameren und der DNA Nukleosomen formiert hatten (Fang et al., 2002).

Die Ergebnisse von Fang et al. konnten in unserem Versuch mit derselben Fragestellung unter Verwendung von H4-N-Terminus-Peptiden (AA 9-28) entkräftet werden (s. 3.2.5). Um die Analogie zu verbessern, wurde die DNA desselben 5S-rDNA-Plasmids eingesetzt, welches für die Assemblierung der rekombinanten Nukleosomen verwendet wurde. Im Gegensatz zu den Nukleosomen konnten die H4-Peptide trotz der im Reaktionsgemisch vorhandenen DNA von PRset7 im HMTase-Versuch nicht methyliert werden. Es konnte jedoch nicht beurteilt werden, ob PRset7 in der Lage ist, die H4-Peptide zu binden oder ob PRset7 trotz einer möglicherweise erfolgten Bindung die HMTase-Aktivität an dem Peptid-Substrat nicht auszuüben vermag.

Bezüglich des H4-N-Terminus ergeben sich Parallelen zwischen PRset7 und dem Remodeling-Faktor ISWI. Die ATPase-Aktivität von ISWI kann nicht stimuliert werden, wenn kein nukleosomaler H4-N-Terminus vorhanden ist, wodurch keine regelmäßigen Abstände zwischen neu synthetisierten Nukleosomen gewährleistet werden können (Ito et al., 1997; Clapier et al., 2001). Im Gegensatz zu PRset7 kann die enzymatische Aktivität von ISWI jedoch durch ein H4-Peptid in Anwesenheit von DNA wiederhergestellt werden (Clapier et al., 2002). Durch eine Interaktion des H4-N-Terminus-Peptids mit der DNA kann hier vermutlich das für die Bindung von ISWI beschriebene „Epitop“ wieder entstehen (Ebralidse et al., 1988; Johnson et al., 1992; Baneres et al., 1997).

4.2.2. Eine mögliche nukleosomale Erkennungsstruktur für PRset7?

Eine Erklärung dafür, dass H4-N-Terminus-Peptide und DNA für die enzymatische Aktivierung von PRset7 nicht ausreichen, könnte eine Nukleosomen-spezifische Interaktion des H4-N-Terminus mit dem H2A-H2B-Dimer eines benachbarten Nukleosoms liefern: Direkt nach dem DNA-nahen Austritt des H4-N-Terminus aus dem globulären Bereich der *Core*-Histone (ungefähr bei Lysin 20), legen sich die N-terminalen Aminosäuren 16-25 von H4 einer hoch konservierten, sehr sauren Region des H2A-H2B-Dimers an, welche sich an der Oberfläche eines benachbarten Nukleosoms befindet. Ob diese Assoziation kristallisationsbedingt ist, kann gemäß Luger et al. nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Luger et al., 1997; Luger and Richmond, 1998). Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass in *Saccharomyces cerevisiae* diese Interaktion zwischen dem H4-N-Terminus und dem H2A-H2B-Dimer nicht gefunden wird und die Chromatinstruktur dieser Hefespezies im Vergleich

zu höheren Eukaryonten weniger kondensiert erscheint. Deshalb ist diese internukleosomale Assoziation wahrscheinlich für höhere Ordnungen der Chromatinstruktur von Bedeutung (White et al., 2001). Die Erkennung dieser speziellen Struktur (H4-N-Terminus, saure Oberfläche des benachbarten H2A-H2B-Dimers, nukleosomale DNA), die nur in Nukleosomenarrays vorhanden ist, könnte für die hohe nukleosomale Substratspezifität von PRset7 verantwortlich sein.

Darüberhinaus wäre es interessant, im Rahmen weiterer Versuche aufzuklären, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem oben beschriebenen Unterschied in der nukleosomalen Struktur und dem Nichtvorhandensein der H4 K20 Methylierung oder eines PRset7-Homologs in *Saccharomyces cerevisiae* besteht (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b).

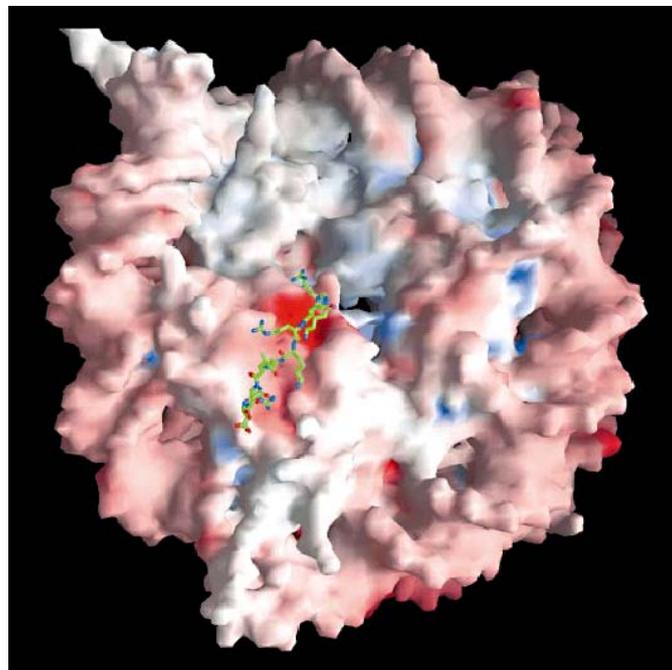


Abbildung 47: Elektrostatische Anziehung von H4-N-Terminus und benachbartem H2A-H2B-Dimer. Der H4-N-Terminus (grün) ist auf der Oberfläche des H2A-H2B-Dimers im Nukleosomen-Core dargestellt. Die Aminosäuren 16-25 des H4-N-Terminus liegen dabei einem stark negativ geladenen Bereich des H2A-H2B-Dimers auf (intensiv rot gefärbt), der aus den sauren Seitenketten von 7 Aminosäuren besteht. (Aus Luger et al., 1997).

4.2.3. PRset7 methyliert nur teilweise rekombinante H4-N-terminal deletierte Nukleosomen

Mit rekonstituierten, an H4 N-terminal deletierten, rekombinanten Nukleosomen konnte mittels HMTase-Versuchen das Methylierungsverhalten von PRset7 besser charakterisiert werden (s. 3.2.7). Offensichtlich benötigt PRset7 zur Erkennung, Bindung oder eigentlichen Methylierungsreaktion des nukleosomalen Substrates nur einen bestimmten Teil des Histon

H4 N-Terminus. Die Deletion bis zu den ersten 10 Aminosäuren hat keine negativen Auswirkungen auf die H4 K20-Methylierung, die in diesen Nucleosomen dieselbe Intensität wie an den „nicht-H4-deletierten“ („wt-“) Nucleosomen aufweist. Trotz einer identischen Menge eingesetzter Nucleosomen scheint die detektierte H4 K20-Methylierung von den wt-Nucleosomen hin zu den delta10-H4-Nucleosomen sogar tendenziell zuzunehmen (s. Abbildung 30).

Deletionen ab der 15. sowie ab der 19. Aminosäure des H4 N-Terminus bewirken ein vollständiges Ausbleiben der H4 K20-Methylierung. Das bedeutet, dass zwischen der 11. und der 15. Aminosäure ein nach C-terminal gerichteter Bereich des H4-N-Terminus beginnen muss, der für die Methylierung von Lysin 20 durch PRset7 essentiell ist.

Interessanterweise entspricht dieser Bereich ungefähr dem Abschnitt des H4-N-Terminus, der mit der sauren Oberfläche des benachbarten H2A-H2B-Dimers im nucleosomalen Verband interagiert (s. 4.2.2). Darüberhinaus konnten Dorigo et al. mit Deletionsversuchen der Histon-N-Termini nachweisen, dass der für die Kompaktierung verantwortliche Bereich im H4-N-Terminus zwischen der 15. und der 19. Aminosäure gelegen ist (Dorigo et al., 2003).

Eine Deletion der C-terminalen Aminosäuren über den Bereich zwischen der 11. und der 15. Aminosäure hinaus kann folglich diese internucleosomale Bindung und Kompaktierung möglicherweise ganz oder teilweise korrumpieren und die Dislokation des H4-N-Terminus von dieser Struktur bewirken. Demzufolge sprächen die durchgeführten H4-N-Terminus-Deletionsversuche mit rekombinanten Nucleosomen in (s. 3.2.7) für die vorgeschlagene, „nucleosomale Erkennungsstruktur“ von PRset7.

4.2.4. Reduzierte enzymatische Aktivität von PRset7 an nativen Nucleosomen

Ein auffälliger Befund bei der Untersuchung der Substratspezifität von PRset7 war die im Vergleich zu *rekombinanten* Nucleosomen sehr geringe Methylierung von H4 in *nativen* Nucleosomen (s. 3.2.2). Bezüglich der nucleosomalen Eigenschaften der rekombinanten und der nativen Nucleosomen konnte von vergleichbaren Substraten für die HMTase-Versuche mit PRset7 ausgegangen werden, soweit dies mit einem Mikrokokkus-Nuklease-Verdau nachvollziehbar war (Vorhandensein eines Nucleosomenarrays sowie vergleichbare Assemblierungsrate, s. 3.2.4).

In unserer Arbeitsgruppe wurden die N-Termini von Histonen aus *Drosophila*-Embryonen (aus welchen auch die verwendeten nativen Nucleosomen assembliert wurden) massenspektrometrisch analysiert. In diesen von Bonaldi et al. publizierten Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass die H4-N-Termini aus *Drosophila*-Embryonen fast gänzlich an Lysin 20 di-methyliert sind (Bonaldi et al., 2004). Daher ist anzunehmen, dass PRset7 im

HMTase-Versuch die rekonstituierten, nativen Nukleosomen zwar als Substrat erkannte, jedoch die Methylierung an K20 aufgrund der dort bereits vorhandenen Dimethylierung nicht mehr bewerkstelligen konnte. Dass der weitgehend ausbleibenden Methylierung nativer Nukleosomen kein quantitativer Unterschied zwischen den rekombinanten und nativen Nukleosomen zugrunde lag, wird durch die starke Bandenintensität der nativen Nukleosomen im SDS-Gel in Abbildung 24 illustriert.

Eine durchgängige H4 K20-Dimethylierung konnte indes ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe in *humanen* Zellen (*HeLa*) nachgewiesen werden (Zhang et al., 2002). Die H4 K20-Dimethylierung lässt daher auf ein mögliches Merkmal schließen, das höheren Eukaryonten gemein ist.

4.2.5. Nachweis der nukleosomalen H4 K20-Di-Methylierung durch PRset7

An rekombinanten, mit PRset7 methylierten Nukleosomen konnte mittels Anti-H4-K20-Dimethyl eine spezifische Dimethylierung von H4 K20 nachgewiesen werden, wobei der Antikörper auch mit rekombinanten Nukleosomen leicht kreuzreagierte, die nicht methyliert waren (s. 3.2.6). Der verwendete Antikörper war zur Zeit der Versuchsdurchführungen der einzige, kommerziell erhältliche Antikörper zur Detektion von Methylgruppen an H4 Lysin 20. Von der Arbeitsgruppe um D. Reinberg wird die Auffassung vertreten, dass PRset7 ausschließlich eine H4 K20-Monomethylierung durchführe (Sims, III et al., 2003). Bei einer vorausgesetzten Spezifität des verwendeten Antikörpers für die K20-Dimethylierung konnte der in 3.2.6 erbrachte Nachweis diese Aussage nicht bestätigen.

Der erbrachte Antikörpernachweis einer Dimethylierung von H4 K20 wird durch die weitgehend ausbleibende Methylierung nativer Nukleosomen unterstützt (s. 3.2.4 und 4.2.4) und legt deshalb nahe, dass PRset7 für die Dimethylierung von H4 K20 verantwortlich ist.

Eine Publikation von Julien et al. stellt ein weiteres Indiz für die H4 K20 Dimethylierung durch PRset7 dar. Die (durch HCF1-Deletion) induzierte Überexpression von PRset7 geht mit einer Zunahme der H4 K20-Dimethylierung einher, während die H4 K20-Monomethylierung abnimmt und die H4 K20-Trimethylierung konstant bleibt (Julien and Herr, 2004). Die spezifische Trimethylierung von H4 K20 wird von den von Schotta et al. entdeckten HMTasen Suv4-20h1 und Suv4-20h2 ausgeführt. Sie offenbarten in der Charakterisierung von Schotta et al. nur sehr geringe H4 K20 Dimethylase-Aktivität (Schotta et al., 2004).

Es ist unklar, ob PRset7 eine H4 K20 Monomethylierung ausführen kann und es ist ebenfalls nicht gewiß, ob PRset7 die einzige H4 K20 Dimethylase ist. Die resultierende Lethalität in PRset7-depletierten *Drosophila*-Larven verdeutlicht jedoch die essentielle Bedeutung dieser

HMTase und der H4 K20-(Di)Methylierung für die Entwicklungs- und Lebensfähigkeit eines eukaryonten Organismus (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b).

4.2.6. Der „autoinhibitorische“ N-Terminus und die SET-Domäne von PRset7

Die Expression von PRset7 als Inteinfusionsprotein enthielt viele Degradationsprodukte sowie unvollständig proteatisch verdautes PRset7-Protein (s. 3.2.1). Aufgrund deren Detektion durch Anti-Set8 war es wahrscheinlich, dass es sich um Degradationsprodukte von PRset7 handelte. Anti-Set8 wurde von der Arbeitsgruppe um Y. Zhang als polyklonaler Antikörper gegen das *hSet8*-Protein (humanes PRset7-Homolog) entwickelt, welches eine Sequenzhomologie von ca. 52% zu dem von uns exprimierten PRset7 aus *Drosophila* (anschließend als „*dPRset7*“ bezeichnet) aufweist und somit für den Nachweis ausreichend spezifisch gewesen sein dürfte (s. Abbildung 21).

Durch die Reinigungen von *dPRset7* gelang es, die Degradationsprodukte und das Volllängenprotein voneinander zu trennen sowie HMTase-Versuche mit den einzelnen Fraktionen durchzuführen (s. 3.2.8.3). Dabei zeigte sich, dass das in Abbildung 32 identifizierte Volllängenprotein von *dPRset7* enzymatisch inaktiv war. Die kürzeren Degradationsprodukte besaßen hingegen eine hohe HMTase-Aktivität, was in Deletionsversuchen von Fang et al. mit dem humanen PRset7-Homolog *hSet8* ebenfalls demonstriert werden konnte (Fang et al., 2002). Im Gegensatz zu Su(var)3-9, das ohne N-Terminus inaktiv ist (Eskeland et al., 2004), hat der N-Terminus von PRset7 offensichtlich eine „autoinhibitorische Wirkung“ auf die enzymatische Aktivität ausgeübt.

Diese Erkenntnis ist in anbeacht der verschiedenen Homologe von *dPRset7* (691 AA) und deren Länge spannend. Der C-Terminus, welcher auch die SET-Domäne enthält, ist in diesen Proteinen am höchsten konserviert. Der N-Terminus hingegen ist relativ variabel. Beispielsweise bestehen die etwa nur halb so großen humanen Homologe des *dPRset7*-Proteins, *hSet8* aus 352 AA (Fang et al., 2002), bzw. *hPRset7* aus 322 AA (Nishioka et al., 2002b). Die beiden humanen Homologe stimmen übrigens in der Aminosäuresequenz exakt überein; lediglich das von Fang et al. identifizierte *hSet8* ist am N-Terminus 30 AA länger als das identifizierte *hPRset7*-Protein von Nishioka et al. Die ohnehin N-terminal kürzeren humanen Volllängenproteine *hSet8* bzw. *hPRset7* sind somit immer noch kürzer, als die enzymatisch aktivsten *dPRset7*-Degradationsprodukte (s. Abbildung 31 und Abbildung 32). Zusätzlich N-terminal verkürztes, rekombinantes *hPRset7* bzw. *hSet8* verlor in HMTase-Versuchen von Fang et al. und Nishioka et al. die nukleosomale Substratspezifität (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b). Möglicherweise erklärt der etwas längere N-Terminus der

dPRset7-Degradationsprodukte die durchwegs erhaltene, nukleosomale Substratspezifität der mit ihnen erbrachten Ergebnisse. Ob das in dieser Arbeit exprimierte und verwendete *dPRset7* bei weiterer N-terminaler Verkürzung (d.h. degradiertes *dPRset7* kleiner als 45 kDa) ebenfalls die nukleosomale Spezifität einbüßt, ist anzunehmen, wurde jedoch nicht untersucht.

Aufgrund der im Vergleich zu anderen SET-Domänen-HMTasen sehr weit C-terminal gelegenen SET-Domäne aller PRset7-Homologe, konnte die beobachtete Degradation von *dPRset7* nur N-terminal erfolgt sein. Sonst wäre die SET-Domäne in Mitleidenschaft gezogen worden und somit die HMTase-Aktivität erloschen. Darüberhinaus konnten Fang et al. in einem eindrucksvollen Deletionsversuch zeigen, dass die HMTase-Aktivität des homologen *hSet8* ohne die C-terminal der SET-Domäne gelegenen 9 Aminosäuren fast gänzlich erlischt (Fang et al., 2002). Offensichtlich komplettiert diese sehr kurze C-flankierende Domäne der SET Domäne auch das aktive Zentrum aller PRset7-Homologe (gemäß allen bisherigen Strukturanalysen von Histon-Lysin-Methyltransferasen (HKMTasen) mit enthaltener SET-Domäne; s. 2.3.1).

Hinsichtlich der interpretierten Ergebnisse sind für eine funktionierende HMTase-Aktivität von *dPRset7* *in vivo* zwei grundsätzliche Optionen denkbar: Einerseits könnte das Protein auch intrazellulär degradiert und dadurch aktiviert werden. Andererseits wäre denkbar, dass *dPRset7* – vergleichbar zu E(z) – innerhalb eines Komplexes vorliegen könnte (s. 2.6.1). Vielleicht könnte dieser hypothetische Komplex die „Inhibitorwirkung des N-Terminus“ durch hervorgerufene strukturelle Veränderungen des *dPRset7*-Proteins kompensieren.

4.2.7. Gegenseitige Beeinflussung der H4-K20-Methylierung und H4-K16- (bzw. -K12-) Acetylierung?

In den Experimenten zum Methylierungsverhalten von PRset7 an rekombinanten Nucleosomen mit N-terminalen H4-Deletionen wurde gezeigt, dass zwischen der 11. und 15. Aminosäure eine Region in C-terminaler Richtung beginnt, die für die Methylierung von K20 durch PRset7 essentiell ist (s. 4.2.3). Da in diesem Bezirk des H4-N-Terminus zwei posttranslational acetylierbare Lysine vorkommen (K12 und K16), lag die Fragestellung nahe, ob Veränderungen durch die Acetylierung dieser Lysine zu einer veränderten Methylierung von K20 führen würden.

Aufgrund der hohen nukleosomalen Spezifität von PRset7 konnte diese Fragestellung nur mit acetylierten Nucleosomen beantwortet werden, deren Herstellung langwieriger war (s. 3.3.5). Rekombinante Oktamere wurden mit rekombinant hergestelltem HAT1 (H4 K12) und mit rekombinant hergestelltem MOF (H4 K16) acetyliert und vor der Assemblierung zu Nucleosomen mit Anti-H4 K12-acetyl bzw. Anti-H4 K16-acetyl im Western Blot auf die

erfolgte Acetylierung hin überprüft. Trotz des gelungenen Nachweises (s. 3.3.5.1) konnte dadurch der *Grad* der Acetylierung in den jeweiligen Oktameren nicht quantifiziert werden.

Im HMTase-Versuch mit PRset7 wurde die Methylierung der H4 K12- bzw. H4 K16-acetylierten Nukleosomen mit der Methylierung der unmodifizierten („wt“), rekombinanten Nukleosomen verglichen. Die im Vergleich zu den acetylierten Nukleosomen stärkere Methylierung der wt-Nukleosomen (s. 3.3.6) ist wahrscheinlich durch eine höhere Quantität bedingt, die im SDS-Gel in der darauffolgenden Autoradiographie sichtbar wurde (s. Abbildung 42). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Präacetylierung die Methylierung teilweise inhibiert. Desweiteren ist die Methylierung der acetylierten Nukleosomen untereinander nicht gleichmäßig, da die K16-acetylierten Nukleosomen etwas stärker methyliert wurden als die K12-acetylierten Nukleosomen. Es ist unklar, ob dieser Unterschied ebenfalls quantitative oder möglicherweise andere Ursachen hat.

Der anschließend durchgeführte, kompetitive HMTase-Versuch bei gleichzeitigem Vorliegen von delta10-H4-Nukleosomen und K12- bzw. K16-acetylierten Nukleosomen ließ eine Präferenz von PRset7 für die delta10-H4-Nukleosomen erkennen (s. 3.3.7). Allerdings ist in der Autoradiographie ebenfalls deutlich zu erkennen, dass PRset7 bei vorliegendem 1:1-Verhältnis von wt-Nukleosomen und delta10-H4-Nukleosomen eindeutig die delta10-H4-Nukleosomen bevorzugt methyliert (s. Abbildung 43). Diese Beobachtung relativiert die schwächere Methylierung der acetylierten Nukleosomen im Vergleich zu den delta10-H4-Nukleosomen. Da bereits zuvor aufgefallen war, dass PRset7 die delta10-H4-Nukleosomen offensichtlich stärker methyliert als die wt-Nukleosomen (s. 4.2.3), könnte über eine partielle Inhibition der enzymatischen Aktivität von PRset7 durch die ersten 10 Aminosäuren des H4-N-Terminus spekuliert werden.

Insgesamt scheint eine Präacetylierung von rekombinanten Nukleosomen an K12 oder K16 nicht zur starken Inhibition einer nachfolgenden H4 K20-Methylierung durch PRset7 zu führen. Hätten die vorgenommenen Acetylierungen des nukleosomalen H4-N-Terminus dieselben Auswirkungen auf das Methylierungsverhalten von PRset7 gehabt, wie die Deletion H4-N-terminaler Aminosäuren über die 10. Aminosäure hinaus (s. 3.2.7), wäre eine stärker reduzierte, vielleicht sogar aufgehobene K20-Methylierung erwartet worden. Jedoch können die Beobachtungen mangels einer Quantifizierung des vorliegenden Acetylierungsgrades der Substrate nur als tendentieller bzw. als globaler Effekt gedeutet werden.

Die Tendenz der beschriebenen Ergebnisse wird von massenspektrometrischen Untersuchungen verschiedener Gruppen gestützt. Sowohl in *Drosophila*-Zellen, als auch in humanen und bovinen Zellen wurden regelmäßig K20-dimethylierte H4-N-Termini zusammen mit verschiedenen Graden der Acetylierung identifiziert (Zhang et al., 2002; Bonaldi et al., 2004; Sarg et al., 2004), so dass eine gegenseitige Inhibition dieser beiden Modifikationen am H4-N-Terminus unwahrscheinlich ist.

Nachdem der Effekt einer Präacetylierung auf die PRset7-vermittelte Methylierung untersucht wurde, sollte auch die Acetylierung von Substraten hinsichtlich einer Prämethylierung an H4 K20 untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden auf die Untersuchung der H4 K16 Acetylierung durch die exprimierte Histonacetyltransferase MOF beschränkt (s. 3.3.1; vorwiegend H4 K16-Acetylierung).

Da MOF ohne Kofaktoren keine nukleosomale Acetylierung ausführen konnte (s. 3.3.1.2), wurden nicht-modifizierte, rekombinante Oktamere mit nativen Oktameren in einem HAT-Versuch miteinander verglichen. Die schwächere Acetylierung des Histonproteins H4 der nativen Oktamere ist in der Autoradiographie deutlich erkennbar (s. 3.3.3). Da auch hier der Grad der bereits vorhandenen Acetylierungen an den nativen Oktameren (posttranslationale Modifikationen *in vivo*) nicht bekannt war, konnte nicht beurteilt werden, ob die geringere, MOF-vermittelte Acetylierung durch eine K20-Prämethylierung oder eine Präacetylierung von H4 begründet war. Da im Vergleich zu den rekombinanten Oktameren die Inkorporation von radioaktiv markierten Acetylgruppen in Histon H3 der nativen Oktamere ebenfalls stark verringert war, sind vermutlich bereits vorhandene Modifikationen an den nativen Oktameren für die geringere Acetylierung durch MOF verantwortlich. Es wäre dennoch sinnvoll gewesen, die nativen Oktamere mit verschiedenen Antikörpern zu evaluieren (z.B. Anti-H4-K12-acetyl, -H4-K16-acetyl, -H4-K20-dimethyl).

In einem weiteren HAT-Versuch mit unmodifizierten („wt“) und K20-methylierten („K20m“) H4-N-Terminus-Peptiden war keines der beiden Substrate von MOF bevorzugt acetyliert worden (s. 3.3.4). Ferner wurde die Fragestellung angegangen, ob durch eine vorhandene H4 K20-Methylierung ein Unterschied in der Deacetylierung von wt- und K20m-H4-N-Terminus-Peptiden existierte. Dazu wurden beide Peptide zuvor mit MOF an K16 acetyliert. Die Histondeacetylase Rpd3 konnte beide Substrate deacetylieren und unterschied nur wenig zwischen den wt- oder K20m-Peptiden; tendenziell wurden die K20m-Peptide im Vergleich zu den wt-Peptiden sogar etwas effektiver deacetyliert (s. Abbildung 44). Mit Blick auf die massenspektrometrischen Beobachtungen sprechen auch diese Ergebnisse nicht für eine gegenseitige Inhibition der H4 K16 Acetylierung und der H4 K20 Methylierung.

Bei der initialen Charakterisierung von PRset7 wurde aufgrund des Histon-Code-Modells (s. 2.4) als wahrscheinlich erachtet, dass die benachbarten, acetylierbaren Lysine mit der PRset7-vermittelten H4 K20-Methylierung interferieren würden (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b). Die Untersuchungen zu dieser Hypothese wurden teilweise mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt und führten zu widersprüchlichen Ergebnissen, deren Aussagekraft fraglich erscheint. Beispielsweise wurde in gegenseitigen Inhibitionsversuchen für Acetylierungsreaktionen die Acetyltransferase p300 verwendet, die *alle Core*-Histone an *mehreren* Lysinen acetylieren kann (Schiltz et al., 1999). Für unsere Versuche verwendeten

wir hingegen die Acetyltransferase MOF, die an Histon H4 spezifisch Lysin 16 zu acetylieren vermag (Akhtar and Becker, 2000; Smith et al., 2000). Darüberhinaus waren die von beiden Gruppen verwendeten Antikörper vermutlich nicht spezifisch genug, um zwischen den verschiedenen Graden der Methylierung (mono, di, tri) von H4 K20 zu unterscheiden. Es ist ebenfalls fraglich, ob die Spezifität der Antikörper bei eventuellem Vorliegen mehrfacher Modifikationen an einem Histon-N-Terminus gewahrt blieb.

Deshalb war es von Interesse, die Spezifität der in unseren Versuchen verwendeten Antikörper zu überprüfen (s. 3.3.9). MOF-acetylierte wt- und K20m-H4-N-Terminus-Peptide wurden von Anti-H4-K16-acetyl unabhängig von der an K20m vorhandenen Methylgruppe mit gleicher Intensität detektiert. Nicht-acetylierte wt- und K20m-Peptide wurden nicht erkannt, was somit insgesamt für eine hohe Spezifität des Anti-H4-K16-acetyl-Antikörpers spricht.

Hingegen kann der Anti-H4-K20-Dimethyl offensichtlich nicht zwischen Mono- und Dimethylierung von H4 K20 unterscheiden kann, da er an die K20-*monomethylierten* H4-N-Terminus-Peptide bindet. Außerdem konnte Anti-H4-K20-Dimethyl in Abbildung 46 zwar die Methylierung an K20m im Vergleich zu wt-Peptiden korrekt differenzieren, doch veränderte sich die Intensität der Detektion mit Vorhandensein einer Acetylierung an K16. Die K16-acetylierten K20m-Peptide wurden von Anti-H4-K20-Dimethyl eindeutig besser erkannt, als die nicht-acetylierten K20m-Peptide. Folglich könnte dies eine falsch positive, stärkere Methylierung der K16-acetylierten K20m-Peptide suggerieren.

Bei der Analyse von Peptiden und anderen Substraten bietet sich aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten mit Antikörpern deshalb die objektivere Methode der Massenspektrometrie an. Sarg et al. konnten mittels dieser Methode nachweisen, dass die Mono- und Dimethylierung von H4 K20 in *Maus*-Zellen gemeinsam mit allen Acetylierungsstufen des H4-N-Terminus auftritt, die Trimethylierung hingegen nicht (Sarg et al., 2004). Hiermit offenbart sich ein neues, im Vergleich zu den Untersuchungen von Fang et al. und Nishioka et al. differenzierteres Bild zwischen dem *Grad* der Methylierung an H4 K20 und der Acetylierung des H4-N-Terminus, auf das im folgenden Kapitel detaillierter eingegangen wird.

4.2.8. Eine Neubewertung der H4 K20 Methylierung

Zunehmend wurde deutlich, dass die nicht nur die Lokalisation, sondern auch der Grad einer Histonmethylierung (Mono-, Di- oder Trimethylierung) für bestimmte Funktionen und Strukturen im Chromatin eine zentrale Rolle spielt. So ist beispielsweise die HP1-rekrutierende H3 K9 Trimethylierung und die H3 K27 Monomethylierung für das konstitutive

Heterochromatin charakteristisch, während die H3 K9 Dimethylierung in weiten Teilen euchromatischer Bereiche vorliegt (Peters et al., 2003). Die H3 K4 Dimethylierung ist hingegen mit dekondensiertem, zur Transkription befähigtem Chromatin assoziiert und die H3 K4 Trimethylierung scheint spezifisch mit einer gegenwärtigen Transkription verknüpft zu sein (Santos-Rosa et al., 2002).

In der Zusammenschau aktueller Publikationen und der in Kapiteln 3.2 und 3.3 erbrachten Ergebnisse zeichnet sich ab, dass die H4 K20 Methylierung – ähnlich der Methylierung von H3 K9 oder von H3 K4 – je nach Methylierungsgrad unterschiedliche Aufgaben im Chromatin besitzt. Desweiteren scheinen sich die jeweiligen Methylierungsgrade unterschiedlich auf andere posttranslational modifizierte Lysine auszuwirken, so dass das vielzitierte Modell des *Histon-Codes* (Strahl and Allis, 2000), s. 2.4, hinsichtlich der neueren Erkenntnissen über die differenzierte Methylierung etwas „hinterherhinkt“. Diese Tatsache war für die Aufgabenstellung und für die Interpretation der Ergebnisse mit PRset7 jedoch von Bedeutung, da beide erstbeschreibenden Autoren der HMTase PRset7 (bzw. dessen Homologe) die H4 K20-Methylierung ohne Bezug zur Mono-, Di- oder Trimethylierung analysiert hatten. Vermutlich wurde angenommen, dass die H4 K20-Methylierung grundsätzlich eine Modifikation des „inaktiven Chromatins“ sei, die nicht gleichzeitig mit der benachbarten und hauptsächlich für „aktives Chromatin“ charakteristischen H4 K16-Acetylierung vorliegen könne (Turner et al., 1992; Nishioka et al., 2002b). Einige Publikationen konnten belegen, dass der gegenseitige Ausschluß beider Modifikationen nur sehr bedingt zutrifft und mit dem zusätzlichen Komplexitätsniveau einer möglichen Mono-, Di- und Trimethylierung von H4 K20 zusammenhängt. Passend zu den von uns vorgelegten Ergebnissen konnten massenspektrometrische Untersuchungen keinen Anhaltspunkt für eine durchgängige gegenseitige Inhibition der H4 K20 Methylierung mit der H4-Acetylierung aufzeigen: In *Maus*-Erythroleukämiezellen fanden Sarg et al. eine Assoziation von überwiegend di-methyliertem H4 K20 mit einer *Hyperacetylierung* an denselben H4-N-Termini. Ähnliche Beobachtungen hatten zuvor bereits Zhang et al. in *HeLa*-Zellen und Bonaldi et al. in *Drosophila*-Zellen gemacht (Bonaldi et al., 2004; Zhang et al., 2002), s. 4.2.4. In derselben Studie wurde von Sarg et al. in heterochromatin-assoziierten Bereichen trimethyliertes K20 kontinuierlich mit einer *Hypoacetylierung* an H4-N-Termini vorgefunden, was eine negative gegenseitige Beeinflussung der K20-Trimethylierung mit der H4-Acetylierung in diesen Bereichen nahe legt (Sarg et al., 2004). Auch Koumouli et al. konnten die H4 K20-Trimethylierung mit konstitutivem Heterochromatin assoziieren, bevor diese Beziehung durch die Entdeckung der ausführenden H4 K20 Trimethylasen Suv4-20h1 und Suv4-20h2 begründet werden konnte (Kourmouli et al., 2004; Schotta et al., 2004). Darüberhinaus demonstrierten beide Arbeitsgruppen eine Su(var)3-9-abhängige, heterochromatin-assoziierte Trimethylierung von H3 K9 als Voraussetzung für eine

anschließende H4 K20 Trimethylierung (s. ausführliche Darstellung zu Heterochromatin, 2.1.1.2). Schotta et al. zeigten ferner auf, dass die Suv4-20h1- und Suv4-20h2-HMTasen *keine* Sequenzhomologien zu PRset7 aufweisen. Einzig die konservierte SET-Domäne ist ihnen gemein, die in Suv4-20h1- und Suv4-20h2 jedoch in der N-terminalen Hälfte liegt (und nicht wie in PRset7 weit im C-terminalen Bereich).

Es kristallisieren sich folglich differenzierte Eigenschaften der unterschiedlichen H4 K20 Methylierungsgrade heraus, die jeweils von verschiedenen HMTasen ausgeführt werden. Die Darstellung einer durchgängigen, gegenseitigen Inhibition der H4 K20 Methylierung und der H4 Acetylierung erscheint hingegen verkürzt. Die Trimethylierung hat offensichtlich andere funktionelle und strukturelle Implikationen für das Chromatin, als die (Mono- oder) Dimethylierung von H4 K20. Je älter eine eukaryote Zelle ist, desto größer ist in der Regel der Anteil des Heterochromatins. Entsprechend nimmt die heterochromatinassoziierte H4 K20 Trimethylierung mit wachsender zellulärer Differenzierung zu und wird überwiegend in älteren eukaryoten Zellen vorgefunden (Sarg et al., 2002; Sarg et al., 2004). Die hypothetischen Überlegungen von Sarg et al. bezüglich eines großen HDAC-Suv4-20h-Multi-Enzymkomplexes mit nachfolgender Bindung von HP1 an die H4 K20-Trimethylierung erscheinen demzufolge nicht abwegig (Sarg et al., 2004). Vielleicht können für die Di- und für die Trimethylierung von H4 K20 in zukünftigen Untersuchungen jeweils unterschiedliche, chromatinbindende Proteine oder Proteinkomplexe mit biologischer Regulatorfunktion identifiziert werden.

Darüber hinaus könnten sich die in 4.2.2 beschriebenen, internukleosomalen Interaktionen der H4 N-Termini mit den Oberflächen benachbarter H2A-H2B-Dimere möglicherweise durch den Grad der K20 Methylierung verändern. Angesichts der lockeren Chromatinstruktur in *S. cerevisiae*, in deren Nukleus diese H4 N-terminalen, internukleosomalen Assoziationen nicht existieren (White et al., 2001), könnten sich Modifikationen dieser Interaktionen wesentlich auf den Kondensationsgrad des Chromatins auswirken.

Bemerkenswerterweise ist der Ausfall der H4 K20 Trimethylierung in *Drosophila*-Larven mit dem Leben vereinbar, während die Depletion von PRset7 mit nachfolgendem Verlust der H4 K20 Dimethylierung lethale Folgen für die *Drosophila*-Larven hat (Nishioka et al., 2002b; Schotta et al., 2004). Von Julien et al. konnte mit einer (durch Deletion des Gens HCF1) induzierten Überexpression von PRset7 in mitotischen Zellen eine vermehrte H4 K20 Dimethylierung und eine gleichzeitige Abnahme der H4 K20 Monomethylierung bei gleichbleibender Trimethylierung nachgewiesen werden (Julien and Herr, 2004). Diese Veränderungen wirkten sich negativ auf die Mitoseregulation aus und führten zu fehlerhafter Chromosomensegregation und Zellteilungsdefekten. Möglicherweise haben PRset7 und die H4 K20 Dimethylierung darum eine konstitutive, „homöostatische“ Aufgabe für weite Teile

des Genoms; sie könnten für die reibungslose Zellteilung und für die globale Chromatinstruktur von Bedeutung sein.

Entsprechend den oben dargestellten Beziehungen zwischen der H4 K20 Di- und Trimethylierung konnte durch massenspektrometrische Versuche unserer Arbeitsgruppe in Tumorzellen (wenig differenziert, hohe Mitoseaktivität, viele Zellteilungen) eine global erhöhte K20 Dimethylierung und erniedrigte K20 Trimethylierung am H4 N-Terminus festgestellt werden.

Es wäre von großem Interesse, ob in Tumorzellen ein kausaler Zusammenhang zwischen bekanntermaßen meist fehlregulierten Polycomb- und Trithorax-Proteinen (s. 2.6 und 2.8) mit charakteristischen H4 K20 Methylierungsgraden aufgedeckt werden kann. Ein initialer Schritt in diese Richtung bestünde in der Aufklärung des durch die HMTase Ash1 vermittelten Methylierungsgrades an H4 K20 (Beisel et al., 2002) – dieses TrxG-Protein, das mit „aktivem Chromatin“ assoziiert wird, spielt in verschiedenen malignen Neoplasien eine wichtige Rolle (s. 2.8).

4.3. Histon(de)methylierung – aktuelle Entwicklungen

Die obige, schriftliche Ausarbeitung spiegelt den wissenschaftlichen Kenntnisstand von Oktober 2004 wider. Um die Aktualität zu gewährleisten wird im folgenden Abschnitt auf die neuesten Erkenntnisse und Entwicklungen im Bereich der PcG-Proteine, der Histon H4 K20 Methylierung sowie der kürzlich entdeckten Histon-Lysin-Demethylasen eingegangen.

4.3.1. Die zentrale Rolle von E(z) und PcG-Proteinen für das *silencing*

Zu E(z) und der PC-vermittelter Repression wurden einige bedeutende Entdeckungen gemacht. In 2.6.2 wurde der PcG-vermittelte *silencing*-Mechanismus dargestellt, über welchen beispielsweise spezifische *hox*-Gene an der Expression gehindert werden. Eine ähnliche Rolle scheinen E(z) und weitere PcG-Proteine auch für das sog. *imprinting* (elterliche Prägung) zu haben. Schon länger ist bekannt, dass diese spezifische und vererbare Repression eines mütterlichen oder väterlichen Allels über die embryonale DNA-Methylierung sog. *ICRs* (imprinting control regions) gesteuert wird (Delaval and Feil, 2004). Untersuchungen von Umlauf et al. sprechen für eine Aufrechterhaltung und Ausführung dieser „Repressions-Information“ durch Histonmethyltransferasen: Im Modellorganismus *Maus* existiert ein cluster stillgelegter, paternaler Allele auf Chromosom 7, deren Promotoren *nicht* DNA-methyliert sind. Jedoch liegen dort H3 K9-Di- und H3 K27-Tri-Methylierungen vor und es konnte eine Assoziation des paternalen Chromosoms mit dem E(z)-Esc-Komplex

nachgewiesen werden. Da insbesondere die H3 K27 Tri-Methylierung mit PcG-vermitteltem *silencing* verknüpft ist (Czernin et al., 2002), ist es wahrscheinlich, dass der E(z)-Esc-Komplex für die Etablierung der spezifischen Histonmethylierungen und die konsekutive Stilllegung der paternalen Allele verantwortlich ist (Umlauf et al., 2004).

Ferner wurde von Wang et al. entdeckt, dass an dem für das *silencing* benötigten PRC1-PcG-Komplex eine Ubiquitin Ligase assoziiert ist (Wang et al., 2004). Wenig später demonstrierten Cao et al., dass diese Ubiquitinylierung von H2A an Lysin 119 für die Repression von *hox*-Genen benötigt wird. Es ist jedoch noch nicht geklärt, weshalb diese Modifikation ebenfalls für die Repression benötigt wird, bzw. welcher Mechanismus schließlich hierzu führt. Da an *imprinting*-Allelen H3 K27- und K9-Methylierungen nachgewiesen wurden (Umlauf et al., 2004), wird bei der elterlichen Prägung vermutlich derselbe Mechanismus genutzt, welcher bei der besser untersuchten *hox*-Gen-Repression ebenfalls zum Tragen kommt: Nach differenzierter H3 K9 und H3 K27 Methylierung durch E(z) in PRC2 kann der PRC1-Komplex rekrutiert werden, der schließlich zu einer Ubiquitinylierung an H2A K119 und zu einer Anlagerung verschiedener PcG-Proteine und somit zur Geninaktivität führt.

Die Inaktivierung eines X-Chromosoms in Säugetieren wird ebenfalls durch die spezifische H3 K27 Trimethylierung und durch das PcG-*silencing* vermittelt, wie bereits in 2.6.2 geschildert wurde (Heard, 2005). Der Nachweis von ubiquitiniertem H2A K119 in inaktivierten X-Chromosomen lieferte schließlich ein weiteres Indiz, dass sich die elterliche Prägung und die X-Inaktivierung desselben *silencing*-Mechanismus bedienen (Fang et al., 2004; de Napoles et al., 2004). Wahrscheinlich hat das PcG-vermittelte *silencing* in inaktivierten X-Chromosomen initiiierende Funktion, denn dessen DNA wird sukzessive an den Promotoren methyliert und die (ubiquitinylierten) H2A-Moleküle durch macroH2A-Histonvarianten ersetzt (s. 2.2.1).

Eine weitere Assoziation ist ebenfalls vom inaktivierten X-Chromosom bekannt: Es handelt sich um nicht-codierende RNA-Moleküle (sog. ncRNA). Es scheint, dass ncRNAs für die Regulation des korrekten Wechselspiels zwischen PcG- und den TrxG-Faktoren wichtig sind sowie für die Bindung und Funktionsausübung der jeweiligen regulatorischen Komplexe eine Rolle spielen. Nicht-codierende Transkripte der *PREs* (polycomb response elements, s. 2.6.2) sind offensichtlich nicht nur essentiell für den reibungslosen Wechsel zwischen reprimierenden PcG-Proteinen und aktivierenden TrxG-Proteinen am Chromatin, sondern können auch PcG-Proteine an der Bindung an die *PREs* hindern, womit diese ncRNAs eine bislang unbekannt Form des „anti-*silencings*“ darstellen (Schmitt et al., 2005). Im Einklang mit dieser Entdeckung konnte kürzlich gezeigt werden, dass *PREs* und Bestandteile der RNAi-Maschinerie kolokalisieren. Mit ihren Untersuchungen legen Grimaud et al. nahe, dass das RNAi-System eine organisierende Funktion für die PcG-Proteine im Chromatin

übernimmt (Grimaud et al., 2006). Auch die ncRNA-Transkription von *TREs* (trithorax response elements) ist mit der Organisation von TrxG-Proteinen assoziiert worden: Die *TRE*-Transkripte sind in der Lage, das TrxG-Protein Ash1 an die *TREs* zu rekrutieren und somit zur TrxG-vermittelten Genaktivierung beizutragen (Sanchez-Elsner et al., 2006). Passend zu den jüngsten RNA-Erkenntnissen konnten Bernstein et al. vor kurzem erstmals nachweisen, dass ein homologes Polycomb-Protein in *Maus* RNA binden kann (Bernstein et al., 2006).

Insgesamt ist es verblüffend, dass die in kurzer Zeit und in verschiedenen Forschungsbereichen erbrachten Ergebnisse in dieselbe Richtung weisen. Für die Memorierung und Vererbbarkeit der Information über die Genaktivität wird auf folgende epigenetische Mechanismen zurückgegriffen, die offensichtlich – stärker als bislang angenommen – synergistisch und zueinander komplementär sind: Die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikationen, strukturbildende bzw. „Chromatin-lesende“ Bindungsproteine (z.B. HP1, PC) und die nicht-codierenden RNA-Transkripte. Die PcG- und TrxG-Proteine scheinen hierbei einen „Dreh- und Angelpunkt“ zu bilden. Weitere Erkenntnisse über – in malignen Tumorzellen häufig deregulierte – PcG- und TrxG-Proteine werden deshalb von großer Bedeutung sein (s. 2.8).

4.3.2. Die differenzierte H4 K20 Methylierung

In Analyse und Interpretation vieler Histon-Lysinmethylierungen wird gegenwärtig der Methylierungsgrad mit einbezogen. Dies gilt auch für die H4 K20 Methylierung, für die in 4.2.8 eine differenziertere Betrachtung vorgeschlagen wurde. Durch weitere Untersuchungen setzte sich zunehmend die Auffassung durch, dass je nach Grad der H4 K20 Methylierung unterschiedliche Funktionen und Implikationen mit dieser speziellen Histonmethylierung einhergehen können.

In der Hefe *S. pombe* existiert (im Gegensatz zu *S. cerevisiae*) die H4 K20 Methylierung und ein ausführendes, nukleäres Enzym Set9, welches von Sanders et al. erstmals beschrieben wurde und für alle Grade der H4 K20 Methylierung in *S. pombe* verantwortlich ist. Die Unterschiede zwischen *S. pombe* und *S. cerevisiae* bezüglich der Chromatinstruktur und -funktion sind bereits länger bekannt und laut Allshire et al. ist *S. pombe* besser als *S. cerevisiae* für vergleichende Chromatin-Untersuchungen eukaryonter Organismen geeignet (Allshire, 2003), s. 4.2.2. Von Sanders et al. konnte in diesem – vergleichsweise einfach aufgebauten – eukaryonten Organismus keine Assoziation zwischen der H4 K20 Methylierung und einer Heterochromatin-Formation oder einer Regulation der Genaktivität nachgewiesen werden. Vielmehr wurde ein unerwarteter Zusammenhang zwischen der K20 Methylierung an Histon H4 und der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen entdeckt. In

ihren Versuchen konnten Sanders et al. nachweisen, dass die HMTase Set9 und die H4 K20 Methylierung in *S. pombe* bei DNA-Doppelstrangbrüchen die Rekrutierung von *Crb2* an die DNA vermitteln kann. *Crb2* ist ein sog. *checkpoint*-Protein und wichtig für die Markierung von DNA-Brüchen und somit für die Rekrutierung und die Funktionsausübung der DNA-Reparatur-Maschinerie. Die H4 K20 Methylierung scheint hier für die *Crb2*-Bindung eine globale Markierung im Chromatin darzustellen (ähnlich der H3 K9 Methylierung für HP1 oder der H3 K27 Methylierung für Polycomb), wobei noch unklar ist, wie oder durch was diese Rekrutierung vermittelt wird und ob hierfür eine Mono-, Di- oder Tri-Methylierung erforderlich ist (Sanders et al., 2004).

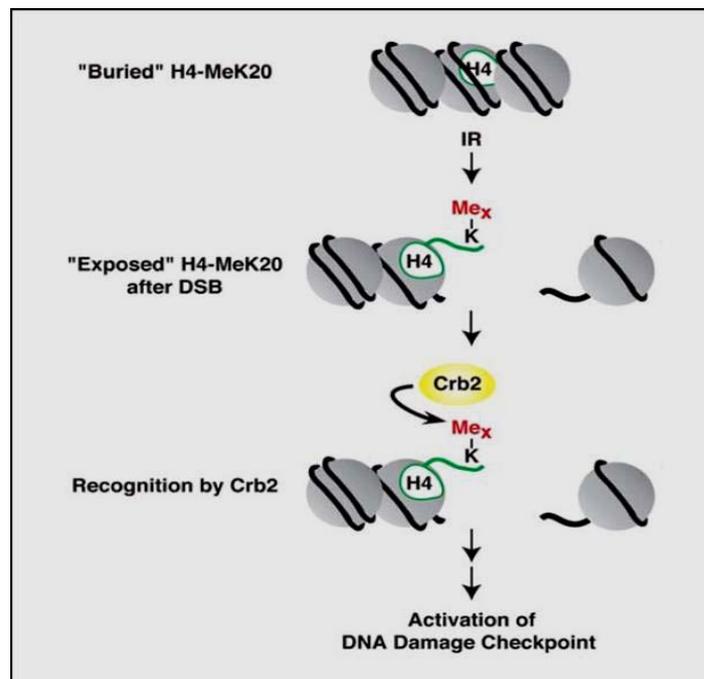


Abbildung 48: Modell für eine H4 K20 vermittelte Rekrutierung von Crb2. Nach einem Doppelstrangbruch (DSB) liegt das bei intakter DNA möglicherweise im Nucleosomen-Core verborgene, methylierte H4 K20 frei. Somit kann *Crb2* an die DNA rekrutiert werden und die DNA-Reparatur initiieren (aus Sanders et al., 2004).

Interessant erscheint, dass dieser für die höhere Chromatinstruktur so wesentliche H4 N-Terminus (White et al., 2001; Dorigo et al., 2003), am Übergang in das globuläre Nucleosomen-core eine meist methylierte Aminosäure besitzt (K20), die im Falle einer Störung der Chromatin-Struktur in Form von Doppelstrangbrüchen die DNA-Reparatur-Mechanismen initiieren kann, s.a. 4.2.2 und 4.2.3. In der Zusammenschau ist dies ein weiteres Indiz der wichtigen Rolle des H4 N-Terminus für die Organisation, Stabilität und Integrität des Chromatins. Desweiteren müsste geklärt werden, ob eine bislang noch unbekannte Verknüpfung zwischen der H4 K20 Methylierung und der ebenfalls mit *Crb2*-Rekrutierung und DNA-Doppelstrangbrüchen assoziierten, phosphorylierten Histonvariante H2A.X besteht (Hoeijmakers, 2001; Nakamura et al., 2004), s. 2.2.1.

Dieser neu entdeckte Zusammenhang ist ein spannendes Beispiel für die Bedeutung der H4 K20 Methylierung für die Genomintegrität in einem relativ einfach aufgebauten, eukaryonten Organismus. Bereits von Sanders et al. wurde aufgeworfen, dass sich die H4 K20 Methylierung in höher entwickelten, multizellulären Organismen spezifiziert hat. Im Gegensatz zu *S. pombe* liegen bei höheren Eukaryonten zwei oder mehrere H4 K20 methylierende Enzyme vor, die – je nach Methylierungsgrad – auch verschiedene Aufgaben für das Chromatin wahrnehmen (Sanders et al., 2004). Die H4 K20 Trimethylierung wird von den HMTasen Suv4-20h1 und Suv4-20h2 ausgeführt, ist mit der Ausbildung einer Heterochromatin-Struktur assoziiert und deren Abwesenheit ist mit der Entwicklung von *Drosophila*-Larven vereinbar (Schotta et al., 2004), s. 4.2.7. Die H4 Mono- und Dimethylierung wird hingegen von anderen HMTasen wie beispielsweise PRset7 ausgeführt und ist für die Entwicklung von *Drosophila*-Larven und den reibungslosen Mitoseablauf essentiell (Fang et al., 2002; Nishioka et al., 2002b; Julien and Herr, 2004), s. 4.2.8. Desweiteren ist die H4 K20 Dimethylierung an vielen höherentwickelten Eukaryonten als globale Modifikation gefunden worden und kann außerdem unabhängig von verschiedenen Acetylierungsgraden vorkommen (s. 4.2.7).

Wenn die H4 K20 Methylierung in Eukaryonten Aufgaben der DNA-Integrität übernimmt (beispielsweise die Lokalisation der DNA-Reparatur in *S. pombe*), so überrascht es nicht, dass die Deletion von PRset7 in *Drosophila* während der embryonalen Entwicklung lethal ist. Eine plausible Fragestellung wäre, ob es zwischen dem Absterben PRset7-depletierter *Drosophila*-Larven und defekten DNA-Reparaturmechanismen einen Zusammenhang gibt? Bisher konnte dies nur für *S. pombe* gezeigt werden. Möglicherweise ist die H4 K20 Methylierung somit in sämtlichen höher entwickelten Eukaryonten eine wichtige Voraussetzung für die Funktion des Genoms. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die H4 K20 Methylierungen – insbesondere die Mono- und die Dimethylierung – Histonmodifikationen sind, die sich evolutiv und parallel zur Komplexität eukaryonter Organismen entwickelt haben. Der konkrete Effekt einer H4 K20 Methylierung könnte je nach Organismus verschiedenartig sein, doch dem einen Ziel gelten, die Stabilität und die Integrität des Genoms zu gewährleisten.

4.3.3. Die Lysin-Demethylasen

Die in die Arginin- und Lysinmethylierung unterteilte Histonmethylierung (s. 2.3) ist über Jahre als irreversible Histonmodifikation angesehen worden. Mit der Entdeckung der ersten Deiminase (Deimination von methyliertem Arginin) durch Cuthbert et al. wurde auch die Suche nach Lysin-Demethylasen intensiviert (Cuthbert et al., 2004).

Sechs Jahre nach der Entdeckung der ersten Histon-Lysin-Methylase konnte von Shi et al. erstmals eine Lysin-Demethylase identifiziert werden und somit das „Dogma der Irreversibilität“ der Lysin-Methylierung aufgehoben werden (Shi et al., 2004; Trewick et al., 2005).

Die von Shi et al. gefundene Demethylase LSD1 demethyliert H3 K4 durch eine Amin-Oxidations-Reaktion und zeigt nur geringe Aktivität an methylierten nukleosomalen Histonen. LSD1 liegt in einem Komplex zusammen mit HDAC-1 und -2 und dem Protein CoREST vor, das die nukleosomale Demethylase-Aktivität von LSD1 ermöglicht und es vor proteolytischem Verdau schützt. Aufgrund der mit aktiver Transkription assoziierten H3 K4 Methylierung und der HDAC-Aktivität propagierten Shi et al. einen Komplex, der zu einer repressiven Chromatinkonstitution führt (Shi et al., 2005). Interessanterweise konnte von Shi et al. in einem Versuch gezeigt werden, dass die Demethylierung von hyperacetylierten im Vergleich zu hypoacetylierten Nukleosomen weniger stark ausgeprägt war. Dies ist eine interessante Parallele zu den Deacetylase-Versuchen an prämethylierten H4-Peptiden in 3.3.8 und kann als weiterer Hinweis gewertet werden, dass ein Nebeneinander methylierter und acetylierter Histone ein normaler Zustand im Chromatin zu sein scheint (s.a. 4.2.7).

Offensichtlich kann sich die Spezifität von LSD1 auf noch unbekannt Weise ändern: Metzger et al. konnten zeigen, dass LSD1 mit dem Androgenrezeptor in normalem und neoplastischem Prostatagewebe assoziiert ist und durch eine H3 K9 Demethylierung (im Sinne einer „De-Repression“) zu einer Transkriptions-Aktivierung von Androgen-abhängigen Genen führt (Metzger et al., 2005). Es wäre denkbar, dass die Spezifität von verschiedenen Kofaktoren innerhalb eines LSD1-Komplexes abhängt.

LSD1 ist eine flavinabhängige Mono- und Di-Demethylase. Da die Demethylierungsreaktion von LSD1 über ein sog. Imin-Intermediat abläuft und hierzu ein protoniertes Lysin benötigt wird, kann eine Amin-Oxidase wie LSD1 keine trimethylierten Histone demethylieren. Nach Vorschlag eines Protein-hydroxylierenden Mechanismus für die Demethylierung durch sog. JmjC-Domänen-Proteine von Trewick et al. konnten die ersten Lysin-Demethylasen mit JmjC-Domänen identifiziert werden (Trewick et al., 2005). Mit den SET-Domänen Proteinen teilen sich die JmjC-Demethylasen die Eigenschaft, dass sie sehr substratspezifisch sind und in Untergruppen zusammengefasst werden können.

Tsukada et al. identifizierte das JHDM1A- (bzw. FBXL11-) Protein aus der JmjC-Familie. JHDM1 demethyliert H3 K36me_{1/2} (mono- und dimethyl) mit Hilfe der Kofaktoren alpha-Ketoglutarat und Fe(II). Es konnte demonstriert werden, dass die JmjC-Domäne für die Demethylase-Aktivität verantwortlich ist (Tsukada et al., 2006). Die kürzlich entdeckte Demethylase JHDM2 benötigt dieselben Kofaktoren wie JHDM1 (alpha-Ketoglutarat und Fe(II)). Die Demethylierung ist spezifisch gegen Methylierungen an H3K9me_{1/2} gerichtet. Ähnlich der Aminoxidase LSD1 konnte auch für JHDM2 gezeigt werden, dass diese

Demethylase mit Genen assoziiert ist, die durch Androgen-Rezeptoren aktiviert werden. Auf diese Weise wird die Wirkung des Hormons – die Transkription spezifischer Gene – durch die Demethylierung von Histon H3 K9 im Sinne einer „De-Repression“ (s.o.) bewerkstelligt (Yamane et al., 2006).

Weitere Demethylasen, die kürzlich entdeckt wurden, werden als JMJD2-Familie bezeichnet. Die Besonderheit dieser Demethylasen liegt in ihrer Fähigkeit, auch *trimethyliertes* H3 K36 oder H3 K9 zu demethylieren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl mono- als auch dimethylierte Lysine als Reaktionsprodukte resultieren können. Dies eröffnet vollkommen neue Perspektiven für das „Finetuning“ im Zusammenhang mit den Graden der Histonmethylierung und den hiermit assoziierten Funktionen (Whetstine et al., 2006). Als Besonderheit konnten innerhalb der JMJD2-Familie Proteine mit verschiedenen Spezifitäten identifiziert werden: JMJD2B demethyliert nur H3 K9me₃, JMJD2C nur H3 K9me₃ und H3 K36me₃, JMJD2D nur H3 K9me_{2/3}. Eine weitere, interessante Erkenntnis sind die zwei sog. *Tudor*-Domänen der DMTase JMJD2A (Demethylierung von H3 K9me_{2/3} und H3 K36me_{2/3}), die in der Lage sind, methyliertes H3 K4 und methyliertes H4 K20 zu erkennen und zu binden (Huang et al., 2006). Diese neuesten Ergebnisse wecken Spekulationen über ein ausgeklügeltes Gleichgewicht zwischen Methylierung und Demethylierung, bzw. zwischen der Aktivität von SET-Domänen-HKMTs und JmjC-Domänen-DMTasen. Möglicherweise existieren auch Assoziationen von HMTasen und DMTasen innerhalb größerer Komplexe. Beispielsweise konnte in *S. pombe* ein Komplex identifiziert werden, der sowohl Proteine mit einer JmjC-Domäne enthält, als auch die HMTase SET1, welche H3 K4 methyliert (Roguev et al., 2003).

Zwar ist zu erwarten, dass aufgrund der Vielzahl von JmjC-Proteinen im humanen Genom noch weitere Enzym-Familien aufgedeckt werden, die wahrscheinlich neben H3 auch andere Histone an methylierten Lysinen demethylieren und somit Einfluss auf die Chromatin-Organisation nehmen können. Alternativ könnten auch einige Methylierungen stark konserviert sein und von DMTasen gar nicht oder nur teilweise entfernt werden (Stichwort: „konstitutionelle Modifikationen für die Chromatin-Homöostase“, s. 4.2.8 und 4.3.2). Noch sind beispielsweise keine H4-Demethylasen entdeckt worden, welche die PRset7-vermittelte K20-Methylierung entfernen könnte. Möglicherweise gibt es keine Enzymklasse hierfür oder die H4 K20 Methylierung ist eine konstitutionelle Modifikation, die beispielsweise aufgrund ihrer Lage am (oder im) Übergang zwischen N-Terminus und Nukleosomen-*Core* nicht entfernt werden kann. Ebenso wurde noch keine DMTase für die H3 K27 Methylierung identifiziert, welche von der HMTase E(z) (PRC2-Komplex) ausgeführt wird. Aufgrund der – in dieser Arbeit ausführlich dargestellten – wichtigen Aufgaben beider HMTasen hinsichtlich der Genaktivität und der Funktionalität des globalen Chromatins sowie aufgrund bislang nicht nachgewiesener H4 K20- oder H3 K27-Demethylasen, werden die HMTasen PRset7 und E(z)

in einem aktuellen Beitrag von Trojer et al. als beständige „epigenetische Regulatoren“ in einem hypothetischen Vererbungsmodell präsentiert (Trojer and Reinberg, 2006). Ein noch zu identifizierender Vererbungsmechanismus der Histonmethylierungen H4 K20 und H3 K27 wird die Funktion dieser epigenetischen Markierungen und des epigenetischen Zellgedächtnisses verständlicher machen.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. MATERIAL

5.1.1. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Produkt	Bezogen von
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Greiner
1,5-, 3,5- und 5 ml-Reagenzröhrchen	Sarstedt
15- und 50 ml-Gefäße	Sarstedt
250 ml-Zentrifugationsgefäße (steril)	Corning
(³ H)Acetyl-Coenzym A (AcCoA*) Spezifische Aktivität 4 Ci/mmol Konzentration 250 µCi/ml bzw. 9,25 MBq/ml	Amersham Biosciences
Acetyl-Coenzym A (AcCoA) (ohne spezifische Aktivität, "cold"), 10mM	Sigma
Amplify-Lösung	Amersham Biosciences
BioRex 70-Material	BioRad
Bradford-Reagenz	BioRad
Desoxyribonukleotide	Roche
Dialyseschläuche	Spectrum
DNA-Standard „Smart Ladder“	Eurogentec
DNA-Standard „123bp-Ladder“	Gibco Invitrogen
DNA-Standard „MW XVII“	Roche
Elektroporationsküvetten	Molecular Bio Products
Entwicklerlösung für Western Blots (ECL)	Amersham Biosciences
Feinchemikalien, Lösungsmittel und Medienzusätze	Sigma, Roth, Merck, Difco, BD
Filter (0,45 und 0,22 µm)	Roth
Filterpapier Whatman 3 MM	Whatman
Geneticin (G418)	PAA Laboratories
Glykogen	Roche
Hybond N+ (PVDF)-Membran	Amersham Biosciences
Intein-Agarose-beads	NEB
Kolloidales Coomassie	Novex, Invitrogen
M2-Agarose (Flag-beads)	Sigma
Medium für <i>Drosophila</i> - und Schmetterlingszellen (Schneiders <i>Drosophila</i> Medium und SF-900)	Gibco Invitrogen
Mira cloth-Gewebe	Calbiochem
Pasteurpipetten	Roth
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml und 0,5 ml	Biozym und GeneAmp
Photometerküvetten	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sörensen
Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, PMSF)	Roche
Proteinkonzentrationsröhrchen	Pall Filtron
Radiochemikalien	Amersham

Röntgenfilme	Fuji
Rotiphorese Acrylamid-Bisacrylamidmischung	Roth
S-Adenosyl-L-(methyl- ³ H)Methionin (SAM*) Spezifische Aktivität 74 Ci/mmol bzw. 183 mCi/mg Konzentration 1 mCi/ml bzw. 37 MBq/ml	Amersham Pharmacia Biotech
SAM (ohne spezifische Aktivität, "cold"), 32mM	NEB
SDS-Einmalgelkassetten	Invitrogen
Silikonisierte 1,5 ml-Reaktionsgefäße	Biozym
Spritzen und Zubehör	Becton Dickinson
Vorgefertigte Säulen für Chromatographie-System	Pharmacia
Zellkulturschalen und -flaschen	Greiner

5.1.2. Vektoren und Konstrukte

Folgende Vektoren wurden für Klonierungen verwendet:

Name	Besonderheit	Bezogen von
pMyb2	Intein- <i>tag</i>	NEB
pPacFLAG	FLAG- <i>tag</i>	Guoqing Chen
pT7blue	„Blunt“-Klonierungsstelle	Novagen

Liste der verwendeten Konstrukte, die entweder von anderen Gruppen bezogen wurden, im Labor vorhanden waren oder selbst konstruiert wurden:

Name: Insert (in Vektor)	Bemerkung:	Bezogen von <i>oder</i> kloniert über folgende Restriktionsendo- -nukleasen
E(z) (in pMyb2)	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Intein- <i>beads</i>	NdeI – XhoI
E(z)-FLAG (in pPacFLAG)	Expression von E(z)-FLAG in stabilen <i>Drosophila</i> -Zelllinien	KpnI – NotI
pNEO	Herstellung von stabilen <i>Drosophila</i> -Zelllinien	A. Brehm
PRset7 (in pMyb2)	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Intein- <i>beads</i>	XbaI – NdeI
MOF (in pMyb2)	<i>E. coli</i> Expression Reinigung über Intein- <i>beads</i>	A. Akhtar
pAI61	enthält 5S-rDNA, für Nukleosomenassemblierung	Hansen

5.1.3. Oligonukleotide

Die Sequenzen der Primer für Klonierungen sind der Datenbank des Imhof-Labors zu entnehmen.

5.1.4. Peptide

Es wurden zwei Histon-H4 Peptide verwendet (je N-terminale Aminosäuren 9-28 von H4). Das „wt“-H4-Peptid ist unmodifiziert. Das „K20m“-H4-Peptid ist an Lysin 20 methyliert. Die Sequenz lautet:



5.1.5. Bakterienstämme

Für Klonierungen und Plasmidamplifikationen wurde *E. coli* DH5 α (Invitrogen) verwendet, für Proteinexpressionen *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene).

Genotypen:

- **DH5 α** : *E. coli* F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)_{U169} recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1 (Hanahan, 1983)
- **BL21(DE3)pLysS** : *E. coli* B F⁻ dem ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3) (Studier et al., 1990)

pLysS: Chloramphenicol-Resistenz bei Konzentrationen unter 40 μ g/ml, jedoch sensitiv bei Konzentrationen über 100 μ g/ml.

5.1.6. Zelllinien

Für die Transfektionen wurden *Drosophila*-Zellen (Sf4-Zellen) verwendet.

5.1.7. Antikörper

Antikörper	Bezogen von	Verdünnung in Western Blots	Zweitantikörper
α -E(Z)	A. Otte	1:1000	α -rabbit
α -FLAG	Sigma	1:1000	α - mouse
α -H4 K12 acetyl	Upstate	1:1000	α -rabbit

α -H4 K16 acetyl	Upstate	1:1000	α -rabbit
α -H4 K20 dimethyl	Upstate	1:1000 – 1:10000	α -mouse
α -Rpd3	A. Courey	1:1000	α -rabbit
α -Set8	Y. Zhang	1:1500	α -rabbit

Die Zweitantikörper waren jeweils mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurden von *Dianova* bezogen. Sie wurden in Verdünnungen von 1:5000 (α -Mouse) bzw. 1:10000 (α -Rabbit) eingesetzt.

5.1.8. Enzyme und Kits

Produkt	Bezogen von
Effectene Transfektions-Kit	Qiagen
Expand High Fidelity Kit	Roche
Mikrokokkus-Nuklease	Sigma
Proteinase K	Sigma
Plasmidisolations-Kit	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	Roche, NEB, Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega
T4 DNA-Ligase	NEB
Taq Polymerase	Genaxxon

5.1.9. Geräte

Gerät	Bezogen von
-80°C-Schränke	GFL
Agarosegelkammern	EMBL Heidelberg und Eigenbau Werkstatt des Butenandt-Institutes
Autoklav	H+P
Bakterieninkubator/Schüttler	New Brunswick Scientific
Chromatographiesystem „Äkta“	Amersham Pharmacia Biotech
Dialysekammern	Eigenbau Werkstatt des Butenandt-Institutes
Drehrad	neoLab
Elektroporationsgerät	BioRad
Entwickler für Röntgenfilme	Agfa
Filmkassetten	Appligene
Geigerzähler	Genitron
Geldokumentationssystem	Pharmacia Biotech
Geltrockner	BioRad
Homogenisierer	Yamato
Inkubator für <i>Drosophila</i> -Käfige	Bavaria
Laborschüttler	Roth
Labor-Tischzentrifuge	Eppendorf (Modell 5415 C)

	Heraeus (Biofuge pico)
Labor-Zentrifugen	Sorvall (Modell RC5C), Heraeus/Kendro (Cryofuge 6000i)
Leitfähigkeitsmesser	Hanna Instruments
Lichtmikroskop Zellkultur	Zeiss
Luminometer	Berthold
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikrowelle	LG
PCR-Maschine	MWG, Perkin Elmer
pH-Meter	Mettler Toledo
Power Supplies	Pharmacia, Consort, BioRad
Reinstwasseranlage	Elga Labwater
Rotoren	SS34, Super-LiteGSA (Sorvall DuPont), Ti50, TLA55 (Beckman)
Rührer	Heidolph
SDS-Gelkammern und Western Blot-System	Novex
Sterilwerkbänke	PMV
Szintillationszähler mit Drucker	Beckman
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschallgerät	Branson
UV-Meter (Photometer)	Pharmacia Biotech
UV-Transilluminatoren	Bachofer
Vortexer	Bachofer
Wärmeschrank 26°C (<i>Drosophila</i> -Zellen)	LMS
Wärmeschrank 37°C (Bakterien)	Memmert
Wasserbad	Braun

5.2. Methoden

5.2.1. Grundlegende molekularbiologische Methoden

5.2.1.1. PCR für Klonierungen

PCRs wurden wie folgt in 0,2 ml-Gefäßen pipettiert:

- 100 – 500 ng Template-DNA
- 1 µl Primer (100 pmol/µl *stock*-Konzentration), jeweils *forward* und *reverse*
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix (der vier Nucleotide)
- 5 µl 10x Puffer für PCR (mit MgCl₂)
- 1 µl Taq-Polymerase
- Wasser ad 50 µl

Für Klonierungen wurde meist der „Expand High Fidelity“ Kit (Roche) verwendet, der neben einer Taq-Polymerase auch eine *proofreading* Polymerase enthält. Dies senkt die Fehlerrate von $2,6 \cdot 10^{-5}$ auf $8,5 \cdot 10^{-6}$.

Für analytische PCRs wurde Taq-Polymerase der Firma Genaxxon verwendet. Die PCRs wurden nach folgendem Temperaturprogramm in PCR-Maschinen der Firmen Perkin Elmer bzw. MWG durchgeführt:

5 min	95°C	Denaturierung	1x
30 sec	95°C	Denaturierung	25-35x
30 sec	55°C	Annealing der Primer	
1 min/kb	72°C	Elongation	
5 min	72°C	Elongation	1x

Nach der PCR wurden 5 µl des Reaktionsansatzes entnommen und auf einem Agarosegel analysiert. Falls genug Produkt vorhanden war, wurde es direkt in einem präparativen Ansatz mit den passenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt.

5.2.1.2. Gelelektrophorese von Agarosegelen

Agarosegele wurden in Konzentrationen von 0,7 bis 2% (w/v) hergestellt. Dazu wurde 1x TBE-Puffer zusammen mit der abgewogenen Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Der Lösung wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und anschließend das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Nachdem die Proben (die ca. 10 – 20 µl Volumen hatten) mit 5 µl 5x-Laufpuffer versetzt und in die Probenauftragstaschen eingefüllt worden waren, wurde die Elektrophorese mit 10 V/cm Gel-Länge durchgeführt. Als Größenstandard dienten die „Smart Ladder“ (Eurogentec) und der „MW-XVII“-Standard (Roche). Die Gele konnten aufgrund des im Gel bereits enthaltenen Ethidiumbromids direkt unter UV-Licht betrachtet und fotografiert werden.

Für präparative Ansätze (z.B. Aufreinigung einer PCR) wurden die gleichen Gele verwendet, die Taschen wurden vergrößert und die Proben mit entsprechend mehr Ladepuffer versehen.

1xTBE Puffer:

90 mM Tris
90 mM Borsäure
2 mM EDTA

5x-Gelladepuffer:

50% (v/v) Glycerin
10 mM EDTA

für **Bluejuice:** 0,05% (w/v) Bromphenolblau
0,05% (w/v) Xylencyanol

für **Orange G:** 0,05% (w/v) Orange G

5.2.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (Amersham Pharmacia Biotech) nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und in ca. 20-30 μl TE aufgenommen.

5.2.1.4. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Vor einer Ligation (s. 5.2.1.5) wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmidmoleküle mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP; 1 U/ μl , Promega) entfernt, um intramolekulare Selbstligation zu verhindern. Dazu wurden 10 – 15 μg linearisierte Plasmid-DNA mit 1 U SAP und Reaktionspuffer des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 200 μl über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (s. 5.2.1.2).

5.2.1.5. Ligation von DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments in das zuvor linearisierte und dephosphorylierte Plasmid erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 Ligase; 5 U/ μl , NEB). 200 – 300 ng Plasmid, 0,5 – 1 μg des entsprechenden DNA-Fragmentes, 5 U T4 Ligase und Ligationspuffer des Herstellers wurden in einem Endvolumen von 10 μl über Nacht bei RT inkubiert. Das molare Verhältnis zwischen Plasmid und Insert betrug ca. 1:3.

1 μl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E. coli* verwendet (s. 5.2.1.8).

5.2.1.6. Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli*

Aus einer Glycerinkultur wurden *E. coli* DH5 α - oder BL21 als Übernachtskultur in LB „null“ (= ohne Antibiotika) gezogen. Diese Kultur wurde am Morgen in 500 ml LB null verdünnt und bei 37°C und 200 rpm auf einem Bakterienschüttler vermehrt, bis die OD₆₀₀ ca. 0,5 bis 0,7 betrug.

Die Bakterien wurden 15 min auf Eis gekühlt, und dann 20 min bei 4200 rpm in der Heraeus-Zentrifuge abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in 250 ml eiskaltem bi-destilliertem

Wasser aufgenommen, abzentrifugiert (4200 rpm, 20 min), wieder in 250 ml eiskaltem Wasser aufgenommen und nochmals abzentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und wiederum abzentrifugiert (4200 rpm, 10 min). Dieses Pellet wurde in dem gleichen Volumen (z.B. Pellet ca. 1 ml, Aufnahme in 1 ml) 15% (v/v) Glycerinlösung aufgenommen, in Aliquots von 50 oder 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium:

1% (w/v) Bacto-Trypton

1% (w/v) NaCl

0,5% Bacto-Yeast

5.2.1.7. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Alternativ wurden *E. coli* auch chemisch kompetent hergestellt.

Dazu wurde eine in 5 ml LB null geschüttelte Übernacht-Vorkultur von DH5 α oder BL21 auf 500 ml LB+CaCl₂ expandiert und bei 18-22°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,6 erreicht war. Dies kann je nach Bakterienwachstum 30 bis 48 Stunden in Anspruch nehmen. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt und bei 2000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und wie oben abzentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 3 ml DMSO wurden unter leichtem Schütteln hinzugefügt. Die Bakterien wurden in 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

TB-Puffer :

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

10 mM PIPES

55 mM MnCl₂

sterilfiltrieren (nicht autoklavieren)

LB+CaCl₂:

LB wie oben

+10 mM CaCl₂

5.2.1.8. Transformation von *E.coli*

a) elektrisch kompetente *E. coli*

100 µl kompetente *E. coli* (Herstellung siehe Kapitel 5.2.1.6) wurden mit 1-1,5 µl Ligationsansatz (siehe Kapitel 5.2.1.5) versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Firma Molecular Bio Products) mit 1mm-Spalt gefüllt. Nach einem Elektroschock von 1,4 V bei 400 Ω (BioRad Gene Pulser) wurden die Zellen unter Zugabe von 300 µl LB aus der Küvette

geholt und für 30 min bei 37°C leicht geschüttelt. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin (Roth) ausplattiert. Nach 16 – 24 h Inkubation bei 37°C wurden Klone entsprechend der weiteren Verwendung gepickt.

b) chemisch kompetente *E. coli*

100 µl kompetente *E. coli* (siehe Kapitel 5.2.1.7) wurden mit 1-1,5 µl Ligationsansatz (siehe Kapitel 5.2.1.5) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Zellen für 1-2 min bei 42 °C und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei RT mit 300 µl LB- Medium versetzt und 30 min bei 37 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin (Roth) ausplattiert. Nach 16 – 24 h Inkubation bei 37°C wurden Klone entsprechend der weiteren Verwendung gepickt.

5.2.1.9. Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden nach folgender Methode gewonnen (Birnboim and Doly, 1979): Von einer 5 ml-Übernachtskultur in entsprechendem Selektionsmedium (verwendete Antibiotika: s.u.) wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert, in 300 µl P1-Puffer aufgenommen, mit 300 µl P2-Puffer versetzt, 5 min bei RT inkubiert, mit 300 µl P3-Puffer versetzt und 10 min auf Eis stengelassen. Anschließend wurden die Zelltrümmer (10 min bei 13 000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand mit 630 µl Isopropanol versetzt und die DNA ausgefällt (Zentrifugation bei 4°C, 13 000 rpm, Tischzentrifuge, 10 min). Das DNA-Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 20 µl 1x TE aufgenommen.

Puffer P1:

50 mM Tris pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml Rnase A

Puffer P2:

200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

Puffer P3:

3 M Kaliumacetat pH 5,5

1x TE:

10 mM Tris pH 8,0
1 mM EDTA

Antibiotika:

Antibiotikum (gelöst in ...)	Endkonzentration in LB:
Ampicillin (Wasser bzw. Ethanol)	100 µg/ml
Chloramphenicol (Ethanol)	10 µg/ml

5.2.1.10. Restriktionsanalysen

Restriktionsanalysen von Miniprep-DNA (ca. 500 ng DNA) wurden meist in einem Volumen von 10 µl nach Angaben der Hersteller der jeweiligen Restriktionsenzyme durchgeführt. Für präparative Ansätze, z.B. um 10 –20 µg DNA zu spalten, wurde der Ansatz entsprechend vergrößert und darauf geachtet, dass die DNA-Konzentration 100 ng/µl nicht überstieg.

5.2.1.11. Präparation von Plasmid-DNA im Maxi- bzw. Giga-Maßstab

Um 100 bis 500 µg Plasmid-DNA herzustellen, wurden *E. coli* DH5α-Zellen mit der gewünschten DNA transformiert (siehe Kapitel 5.2.1.8) und auf LB-Platten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika (siehe Kapitel 5.2.1.9) ausgestrichen. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium (+Antibiotika) für 6-8 Stunden bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde dann am Abend in 500 ml LB-Medium (+Antibiotika) gegeben und über Nacht bei 37°C/200 rpm auf einem Bakterienerschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die dicht bewachsene Bakterien suspension für eine „Maxi-Prep“ nach Anleitung der Firma Qiagen GmbH verwendet, die auf der alkalischen Lyse beruht. Um noch größere Mengen Plasmid-DNA herzustellen (ca. 2-4mg; z.B. 5S-rDNA für Nukleosomenassemblierung s. 5.2.13), wurde entsprechend nach der „Giga-Prep“-Anleitung der Firma Qiagen GmbH verfahren.

5.2.2. Konzentrationsbestimmung von DNA und Proteinen

Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, wurde in einer Glasküvette 995 µl bi-distilliertes Wasser vorgelegt und 5 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung dazugegeben. Anschließend wurde die Absorption des Leerwertes und der Probe bei 260 nm im Photometer gemessen. Da eine dsDNA-Lösung der Konzentration 50 µg/ml eine Absorption von 1,0 bei 260 nm aufweist, kann die DNA-Konzentration aus dem gemessenen Absorptions-Wert wie folgt berechnet werden:

$$A * 10\ 000 = \text{Konzentration in ng/}\mu\text{l}$$

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Bradford-Reagenz (BioRad) bestimmt. In Einmal-Plastikküvetten wurde je 800 µl Wasser und 1-5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz wurde der Inhalt der Küvetten gemischt und 5 min bei RT stengelassen. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer bestimmt. Als Leerwert diente eine Lösung ohne Protein; außerdem

wurde eine Eichkurve mit BSA erstellt, die von 1 bis 50 µg BSA/ ml Lösung reichte. Anhand dieser Eichkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

5.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das Gelsystem der Firma Novex verwendet. Zwischen zwei zusammenhängende vorgefertigte Plastikplatten wurden Trenn- und Sammelgel nacheinander eingegossen. Nach dem Gellauf wurden die Plastikplatten getrennt und die Gele entweder mit Coomassie oder Silber angefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

Pro Gel wurden 6 ml Trenngel und 2 ml Sammelgel angesetzt.

Trenngel (10%):

2,4 ml Wasser
2 ml Acrylamidmix (30/0,8)
1,5 ml 1,5M Tris pH 8,8
30 µl 20% SDS
30 µl 20% APS
2,5 µl TEMED

Sammelgel (5%):

1,4 ml Wasser
0,33 ml Acrylamidmix (30/0,8)
0,25 ml 1M Tris pH 6,8
10 µl 20% SDS
10 µl 20% APS
2 µl TEMED

Zur Herstellung von Gelen mit anderen Prozentsätzen des Trenngels (z.B. 8%, 15%, 18%) wurde die Menge der eingesetzten Acrylamidlösung bei konstantem Endvolumen variiert.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt, so dass dessen Endkonzentration „1x“ betrug. Anschließend wurden die Proben 3 min auf 95°C erhitzt und in die Probenauftragstaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 40 bis 50 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

SDS-Ladepuffer:

192 mM Glycerin
25 mM Tris
0,1% (w/v) SDS

4x SDS-Probenladepuffer :

200 mM Tris pH 6,8
8% (w/v) SDS
40% (v/v) Glycerin
4,2% (v/v) β-Mercaptoethanol
0,2% (w/v) Bromphenolblau

5.2.4. Proteinfärbemethoden

5.2.4.1. Coomassiefärbung

Die zu färbenden Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese für 5 min in der Fixierlösung inkubiert (für alle Schritte wurde jeweils ein Laborschüttler verwendet) und anschließend mit Färbelösung für 30 min angefärbt. Das Entfärben erfolgte meist über einen

längeren Zeitraum in der Entfärbelösung. Zum schnelleren Entfärben wurde der Entfärbelösung ein Zellstoffpapier zugesetzt, das das überschüssige Coomassie binden kann. Dieses Papier wurde mehrmals erneuert, bis der Gelhintergrund klar wurde. Nach Erreichen des gewünschten Entfärbegrades wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems fotografiert, ausgewertet, und in einem Geltrockner auf Filterpapier getrocknet.

Fixierlösung:

50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung:

10% (v/v) Essigsäure
0,025% (w/v) Coomassie (G-250)

Entfärbelösung:

10% (v/v) Essigsäure

5.2.4.2. Silberfärbung (nach Blum)

Das fertig gelaufene SDS-Gel wurde für zwei Stunden oder über Nacht in der Fixierlösung geschüttelt (Laborschüttler). Anschließend wurde das Gel drei mal für 20 min. mit Waschlösung gewaschen und 1 min. in Thiosulfatlösung eingelegt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit Wasser wurde das Gel für eine Stunde in Silbernitratlösung inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal kurz mit Wasser gewaschen und das Gel in den Entwickler gelegt, bis die Banden die gewünschte Intensität angenommen hatten. Dann wurde sofort die Stop-Lösung auf das Gel gegeben. Dokumentation und Auswertung erfolgten wiederum mit dem Geldokumentationssystem.

Fixierer:

40% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure

Waschlösung:

30% (v/v) Ethanol

Thiosulfatlösung:

0,02% (w/v) Na₂S₂O₃

Silbernitratlösung:

0,2% (w/v) AgNO₃

Entwickler:

3% (w/v) Na₂CO₃
0,05% (v/v) H₂CO (Formaldehyd)
0,0004% (w/v) Na₂S₂O₃

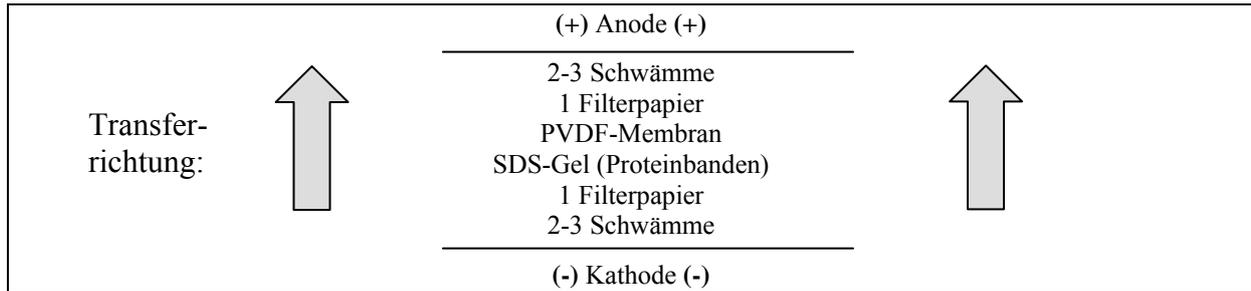
Stop-Lösung:

0,5% (w/v) Glycin

5.2.5. Western Blot

Der Western Blot dient dazu, die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen und durch eine Immunreaktion spezifisch zu detektieren.

Nach Benetzen der auf Gelgröße zurechtgeschnittenen PVDF-Membran (Hybond P, Amersham Biosciences) mit Methanol wurde diese zusammen mit dem Gel, Filterpapieren und den Schwämmen in Western Blot Puffer getränkt. Das Western-Blot-„Sandwich“ wurde wie folgt zusammengebaut:



Der Western Blot wurde mit einer Stromstärke von 400 mA für eine Stunde durchgeführt.

Western Blot Puffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
15% (v/v) Methanol
0,02% (w/v) SDS

Anschließend wurde die mit den Proteinen „beladene“ Membran für eine halbe Stunde in 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver (gelöst in PBS + 0,1% Tween) inkubiert. Die abgesättigte Membran wurde dann für eine Stunde mit der Primärantikörper-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) in PBS + 0,1% Tween wurde die Membran für 30 min mit dem verdünnten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend erneut dreimal (je 10 min) in PBS + 0,1% Tween gewaschen.

Primärantikörperlösung:

Antikörper in 5% (w/v) fettfreiem
Milchpulver, in PBS-Tween gelöst;
Verdünnung je nach Antikörper von
1:500 bis 1:2000

Sekundärantikörperlösung:

Antikörper, mit Meerretichperoxidase
gekoppelt (in 5% (w/v) fettfreiem
Milchpulver, in PBS-Tween gelöst);
Verdünnung: 1:10 000

Nach dem Waschen wurde der Western Blot mit dem ECL-KitTM (*enhanced chemoluminescence*, Western Blotting Detection Reagent; Amersham Biosciences) entwickelt. Die Membran wurde hierzu auf ein Stück Haushaltsfolie gelegt und für eine Minute mit 1 ml eines 1:1-Gemisches aus Lösung A und Lösung B des ECL-KitsTM benetzt. Anschließend wurde die Membran in Folie verpackt und in einer Filmkassette gegen einen Röntgenfilm (Super RX, Fuji) exponiert.

5.2.6. Fliegenhaltung

Zur Gewinnung größerer Mengen wt *Drosophila*-Embryoextraktes wurden wt *Drosophila melanogaster* (Canton R) (Taufliegen) „in Kultur“ gehalten. Die Fliegen haben eine Entwicklungszeit von ca. 10 Tagen, so dass jede 2. Woche das Sammeln von Embryos möglich war.

Die einzelnen Aktivitäten während einer „Fliegenwoche“ sind:

Tag 1	<i>Dienstag</i>	Ansetzen von neuen Larvenboxen aus einer Übernachtsammlung von Embryos
Tag 10 bis 11	<i>Donnerstag/Freitag</i>	Transfer der neu geschlüpften Fliegen in die Käfige
Tag 11 bis mind. 15	<i>Freitag bis Dienstag</i>	Tägliches Füttern der Fliegen
Tag 13 bis 18	<i>Sonntag bis Freitag</i>	Sammeln von Embryos alle 12 h, Aufbewahrung bei 4°C
Tag 15 = Tag 1	<i>Dienstag</i>	Ansetzen von neuen Larvenboxen
Tag 18	<i>Freitag</i>	Herstellung des Embryo-Extraktes
Tag 11 bis 18	- . -	Reinigen der Larvenboxen
Tag 19 oder später	- . -	Reinigen der Käfige

5.2.6.1. Ansetzen von Larvenboxen

In 8 weiße Plastikboxen mit Gitterdeckel wurden jeweils mehrere gefaltete, saugfähige Zellstoffpapierschichten gelegt, wobei auf der einen Seite eine kleine „Rinne“ freigelassen wurde. Anschließend wurde die Hefemischung zubereitet und auf und unter das Papier gegossen.

Hefemischungs-Rezept für eine Larvenbox:

250 ml Wasser
 3 ml Ortho-Phosphorsäure
 0,5 ml Propionsäure
 37,5 g Zucker
 56,5 Brauereihefe (fein gemahlen und gesiebt)
 0,75 g Nipagin

Die über Nacht auf den Agarplatten gesammelten Embryos wurden mit Hilfe eines Haushaltspinsels von den Platten heruntergewaschen und durch drei immer feiner werdende Siebe von größeren Partikeln abgetrennt. Die Embryos wurden in ca. 10 ml 70% Ethanol resuspendiert. Anschließend wurden 8 Rundfilterpapiere in zwei Hälften geschnitten und auf jede Hälfte wurden ca. 0,5 ml der Embryosuspension gegeben. Nach dem Trocknen der Filterpapiere wurden diese auf die Zellstoffschichten gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Filterpapiere durch die Hefemischung gut befeuchtet wurden. In jede Box wurden zwei Filterpapiere gelegt. Die Boxen wurden sorgfältig verschlossen und im großen Fliegeninkubator oben auf die Regale gestellt.

5.2.6.2. Transfer der neu geschlüpften Fliegen in die Käfige

Vor dem Transfer der Fliegen wurden die Käfige vorbereitet. Dazu wurden die Plastikkkäfige hinten mit einem Vorhangstoff verschlossen und vorne ein Schlauch aus Vorhangstoff angebracht, und in den Fliegeninkubator gestellt. In jeden Käfig wurden zwei Apfelsaft-Agarplatten (siehe Kapitel 5.2.6.4) gelegt, auf die jeweils ein Esslöffel Hefepaste gegeben wurde.

Die frisch geschlüpften Fliegen in den Larvenboxen wurden mit CO₂ betäubt, schnell in einen großen Erlenmeyerkolben geschüttelt und ungefähr abgewogen. In jeden Käfig wurden ca. 30g Fliegen gesetzt. Dies entspricht einer Zahl von ca. 30 000 Fliegen. Nachdem der Erlenmeyerkolben in einen Käfig geleert worden war, wurde zügig der vordere Eingang mittels eines Knotens verschlossen. Die leeren Larvenboxen wurden bei -20°C eingefroren, um alle noch nicht geschlüpften Fliegen abzutöten.

5.2.6.3. Tägliches Füttern der Fliegen und Sammeln der Embryos

Morgens und abends wurden jeweils die zwei Apfelsaft-Agarplatten in den Käfigen ausgetauscht. Dazu wurden pro Käfig zwei frische Platten mit einem Esslöffel Hefepaste versehen. Die Knoten an den Käfigen wurden vorsichtig geöffnet. Nachdem sich die Fliegen etwas beruhigt hatten, wurden die neuen Platten in die Käfige gelegt und gleichzeitig die belegten Platten entfernt. Hilfreich dabei ist das Abschütteln der auf den alten Platten sitzenden Fliegen, um möglichst wenig Fliegen entkommen zu lassen. Nachdem bei allen Käfigen die Agarplatten ausgetauscht worden waren, wurden die Käfige wieder mit einem Knoten im Vorhangstoff verschlossen.

Die mit Embryos belegten Platten wurden bis zum Ende der Sammelperiode, normalerweise bis zum Ende der Woche, bei 4°C aufbewahrt und dann für den Extrakt (s. 5.2.7) verwendet.

5.2.6.4. Herstellung von Agarplatten und Hefepaste (Futter)

Rezept für ca. 200 Apfelsaft-Agarplatten:

- Ca. 500 g Fadenagar in 12 l entionisiertem Wasser bei ca. 110°C zum Kochen bringen; hierzu wird ein sehr großer Topf benötigt.
- Temperatur auf 80°C zurückstellen, nachdem der Fadenagar geschmolzen ist.
- Zum Agar dazugeben: 3,5 l Apfelsaft; 750 ml Rübensirup; 420 ml 10% (w/v) Nipaginlösung (gelöst in Ethanol)
- Alles gut verrühren.
- Mittels eines Plastikbechers den flüssigen Agar entnehmen und jeweils ca. 80 ml davon in eine 16cm-Petrischale geben. Nach dem Erkalten des Agars die Plastikplatten im Kühlraum aufbewahren.

Hefepaste (Futter):

In einer Küchenmaschine werden folgende Zutaten gemischt:

- 750 ml Wasser
- 4,6 ml Propionsäure
- 1 Packung = 500 g vakuumverpackte Backhefe.

Die Paste wird verrührt, bis sie eine erdnußbutterartige Konsistenz erreicht.

5.2.7. Herstellung von *Drosophila* Embryo-Extrakt (“TRAX”)

Die über mehrere Tage hinweg gesammelten Embryos wurden von den Apfelsaft-Agarplatten mit Hilfe eines Haushaltspinsels und kaltem Leitungswasser abgewaschen. Durch drei übereinander liegende Siebe mit immer kleineren Maschen wurden die Embryos aufgereinigt: Das erste Sieb dient der Abtrennung von ganzen Fliegen, das zweite fängt Flügel und andere kleinere Verunreinigungen ab und im dritten Sieb sammeln sich die Embryos.

Die Embryos wurden in einen Plastikbecher überführt und mit Embryo-Waschpuffer auf 200 oder 400 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Zum anschließenden Dechorionieren der Embryos wurde 60 ml „Chlorbleiche“ (Natriumhypochloritlösung mit 6-14% aktivem Chlor) pro 200 ml Embryosuspension dazugegeben und die Mischung für 2,5 min auf einem Magnetrührer gerührt. Daraufhin wurden die Embryos sofort in das feinste Sieb überführt und für 10 min mit kaltem Leitungswasser gewaschen.

Um die Chorionhüllen abzutrennen, wurden die Embryos wieder in einen Plastikbecher gegeben und in 1l Embryowaschpuffer resuspendiert. Durch kräftiges Rühren wurde der Vorgang des Ablöses der Embryohüllen beschleunigt. Nachdem sich die Embryos unten im Becher abgesetzt hatten und die Hüllen oben, wurden letztere durch Dekantieren abgetrennt und verworfen. Dieser Schritt wurde noch zweimal mit jeweils 1l 0,7% NaCl-Lösung wiederholt.

Die Embryos wurden durch einen Büchnertrichter abgenutscht, einmal mit 200 ml entionisiertem Wasser gewaschen und dann möglichst gut durch das Vakuum auf dem Filterpapier getrocknet. Die Embryos wurden abgewogen, sofort auf Eis gestellt und das Gewicht wurde notiert.

Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Pro g Embryo wurden 6 ml Nu-I Puffer vorbereitet, d.h. der Puffer wurde mit DTT und PMSF versehen. Die Embryos wurden in 1 ml pro g Embryo Nu-I resuspendiert und durch einen Yamato-Homogenisierer passiert (5 Passagen bei 1500 Umdrehungen pro Minute). Die Kerne bleiben bei diesem Schritt intakt.

Das Homogenat wurde durch ein Miracloth-Tuch filtriert und direkt in einen GSA-Zentrifugenbecher gegeben. Das Miracloth-Tuch wurde mit dem restlichen Nu-I-Puffer durchgespült.

Im anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Kerne abgetrennt. Die Zentrifugation erfolgte im GSA Rotor der Sorvall Zentrifuge für 15 min bei 8000 rpm. Der Überstand, bestehend aus Cytoplasma, wurde anschließend vorsichtig abgegossen, und die Seitenwände der Zentrifugenbecher wurden mit Einmal-Papiertüchern von Lipiden befreit. Das Kernpellet wurde in 1 ml Nu-II Puffer (versehen mit DTT und PMSF) pro g Embryo resuspendiert, wobei vermieden wurde, das unter dem Kernpellet liegende gelbe Dotterpellet mitzususpendieren. Zur vollständigen Resuspension wurde ein Hand-Homogenisierer mit losem Stopfen verwendet. Das Volumen der resuspendierten Kerne wurde in einem Messzylinder bestimmt.

Embryo-Waschpuffer:

0,7% (w/v) NaCl
0,04% (v/v) Triton-X 100

Nu-I Puffer:

15 mM Hepes-KOH, pH 7.6
10 mM KCl
5 mM MgCl₂
0,1 mM EDTA, pH 8.0
0,5 mM EGTA, pH 8.0
350 mM Saccharose

Nu-II Puffer:

15 mM Hepes, pH 7.6
110 mM KCl
5 mM MgCl₂
0,1 mM EDTA, pH 8.0

HEMG Puffer:

25 mM Hepes, pH 7.6
X mM KCl (HEMG 40= HEMG + 40 mM KCl)
12.5 mM MgCl₂
0,1 mM EDTA, pH 8.0
10 % (v/v) Glycerol

Nu-I, Nu-II und HEMG Puffer wurden direkt vor der Verwendung mit DTT (Endkonzentration 1 mM) und PMSF (Endkonzentration 0,2 mM) versetzt.

5.2.8. Kultur von *Drosophila*-Zellen

Drosophila Sf4 –Zellen wurden bei 26°C im Inkubator gehalten. Für die Zellhaltung wurden Zellkulturflaschen verwendet, für Proteinexpressionen Schalen. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen gesplittet und mit frischem Medium versorgt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen immer adhärent wuchsen und sich nicht in zu großer Zahl von der Oberfläche lösten. Falls dies der Fall war (ein Anzeichen von zu dichter Kultur) wurden möglichst alle Zellen durch Schütteln von der Oberfläche abgelöst und mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden sie in eine frische Flasche mit frischem Medium überführt, wobei die Verdünnung zwischen 1:5 und 1:10 betrug.

Medium für Sf4 –Zellen:

Schneiders *Drosophila* Medium, revised; von Invitrogen
mit 10% FCS und Glutamin, Penicillin (50 U/ml) +Streptomycin (50 µg/ml) versetzt

PBS:

1,36 M NaCl
0,13 M KCl
0,04 M Na₂HPO₄
0,018 M KH₂PO₄
auf pH 7,4 eingestellt

5.2.9. Stabile Transfektion von *Drosophila* Zellen

Für stabile Transfektionen wurden Sf4-Zellen verwendet. Gestartet wurde mit ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen in einer 10 cm-Kulturschale. Für die Transfektion wurde mit dem „Effectene Transfection Reagent“ der Firma Quiagen gearbeitet.

Einen Tag nach dem Aussäen wurden die Zellen mit insgesamt 2 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die DNA setzte sich dabei wie folgt zusammen: Es wurden 1,8 µg des jeweils gewünschten Plasmids verwendet; zusätzlich wurden noch 0,2 µg des Plasmids pNeo hinzugegeben, welches eine Geneticin-Resistenz vermittelt. Um die Transfektion durchzuführen, wurden 16 µl Enhancer, 300 µl Puffer EC und 60 µl Effectene-Reagenz benötigt. Die Zellen wurden vor dem Aufträufeln der DNA-Lipidkomplexe mit 7 ml frischem Medium versehen.

Anschließend wurden die Zellen auf den 10cm-Kulturschalen zunächst für 2 Tage bei 26°C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden sie in Zellkulturflaschen überführt, da für die längeren Kultivierungszeiten Flaschen praktischer sind und das Medium nicht so leicht verdunstet. Außerdem wurden 200 µl Geneticin (G418, Konzentration 50 mg/ml, PAA Laboratories) pro 10 ml Medium hinzugegeben. Geneticin selektiert die Zellen, so dass nach längerer Zeit nur diejenigen überleben, welche durch das pNeo-Plasmid resistent gegen Geneticin sind. Da das „gewünschte“ Plasmid in viel größerer Menge eingesetzt wird als pNeo-Plasmid, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die überlebenden Zellen neben pNeo auch das „gewünschte“ Plasmid aufgenommen haben.

Geneticin muss nach ca. 4 Tagen erneuert werden. Die Zellen wurden dann jeweils mit etwas frischem, Geneticin-haltigem Medium versetzt und unter dem Mikroskop betrachtet. Normalerweise sterben bald nach Zugabe des Geneticins große Mengen von Zellen ab. Einige wenige überleben aber und bilden „Zellhaufen“, welche sich später kontinuierlich vermehren. Nach einigen Wochen sind die Zellen stabil und können auf Expression des gewünschten Plasmides getestet werden.

5.2.10. Affinitätsreinigung von E(z)-FLAG aus transfezierten Sf4-Zellen

Um E(z) allein oder zusammen mit koexprimierten Proteinen aufzureinigen, wurde eine Affinitätsreinigung über den Flag-tag von E(z) durchgeführt. Dazu wurden 400 µl Ganzzellextrakt, 75 µl Flag-beads-1:1-Gemisch (Sigma) in BC 100 und 800 µl BC0 zusammenpipettiert und für 2 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die *beads* dreimal mit BC 300+0,1% NP40 für jeweils 20 min gewaschen.

Die so gewaschenen *beads* wurden direkt eingesetzt (z.B. für Western Blotnachweis von E(z)).

BC Puffer:

25 mM HEPES pH 7,6
x mM KCl (100mM KCl = BC100; usw.)
1 mM MgCl₂
0,5 mM EGTA
0,5 mM EDTA
10 % (v/v) Glycerin

5.2.11. BL21 Expression von Proteinen mit Intein-Tag

1 µl pMyb-Plasmid wurde in 50 µl BL21(DE3)pLys-Zellen transformiert und über Nacht auf Chloramphenicol-Ampicillin-LB-Platten bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien von der Platte abgenommen und in 100 ml LB gegeben (mit 100µl Amp und 30 µl Chloramphenicol). Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden jeweils 5 bis 10 ml der Vorkultur auf 0,5 l LB + Chloramphenicol + Ampicillin verdünnt (gesamt 4 l LB) und bei 37°C geschüttelt bis die OD₆₀₀ ca. den Wert von 0,8 bis 0,9 erreicht hatte. Dann wurden die Bakterien mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei 18°C über Nacht weiterschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 20 min, 4°C, in Heraeus-Zentrifuge), das Pellet in 30 ml Intein-Säulen-Puffer resuspendiert, in ein 50 ml-Gefäß gegeben und die Bakterien 3 min bei -180°C schockgefroren. Die Bakterien wurden bei 37°C aufgetaut (dauert ca. 15 –20 min), dabei lysieren die Bakterien und die Lösung wird zähflüssig. Nach Ultraschallbehandlung (2 mal je 1 min, Amplitude 60%, bis Lösung nicht mehr dickflüssig ist) wurde das Bakterienlysat in SS34-Röhrchen geben und der Zelldebris abzentrifugiert (30 min, 20 000 rpm, 4°C, Sorvall-Zentrifuge).

Währenddessen wurden die Chitinbeads (Chitin kovalent an Agarose-Matrix gebunden; New England Biolabs) vor Verwendung zweimal mit Intein-Säulen-Puffer gewaschen und anschließend eine 1:1-Mischung aus ebendiesem Puffer und den Chitinbeads hergestellt. Der

Bakterienüberstand wurde mit 3 ml 1:1-Gemisch Chitinbeads versetzt und bei 4°C für 2 Stunden rotiert. Die *beads* wurden danach abzentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4°C), in 5 ml Säulenpuffer resuspendiert und in eine BioRad-Plastiksäule (15 ml) gegeben. Die *beads* wurden dreimal mit jeweils 10 ml Säulenpuffer gewaschen, einmal mit 5 ml Elutionspuffer OHNE DTT und einmal mit 1 ml Elutionspuffer MIT DTT. Anschließend wurde das Säulchen unten verschlossen, 700 µl Elutionspuffer MIT DTT auf die Säule gegeben und diese auch mit dem Deckel verschlossen. Die Säule wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 6 ml Elutionspuffer MIT DTT darauf gegeben und das Protein eluiert, wobei 0,5 ml-Fractionen aufgefangen wurden. Von jeder Fraction wurden 10 – 15 µl entnommen und mit einem SDS-Gel oder einem Western Blot analysiert. Die am höchsten konzentrierten Fractionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt.

Intein-Säulen-Puffer:

20 mM Tris pH 8
500 mM NaCl
0,1 mM EDTA
0,1% Triton X-100

Elutionspuffer OHNE DTT:

20 mM Tris pH 8
150 mM NaCl
0,1 mM EDTA

Elutionspuffer MIT DTT:

Siehe obigen Elutionspuffer,
DTT dazugeben (Endkonzentration von 35 mM)

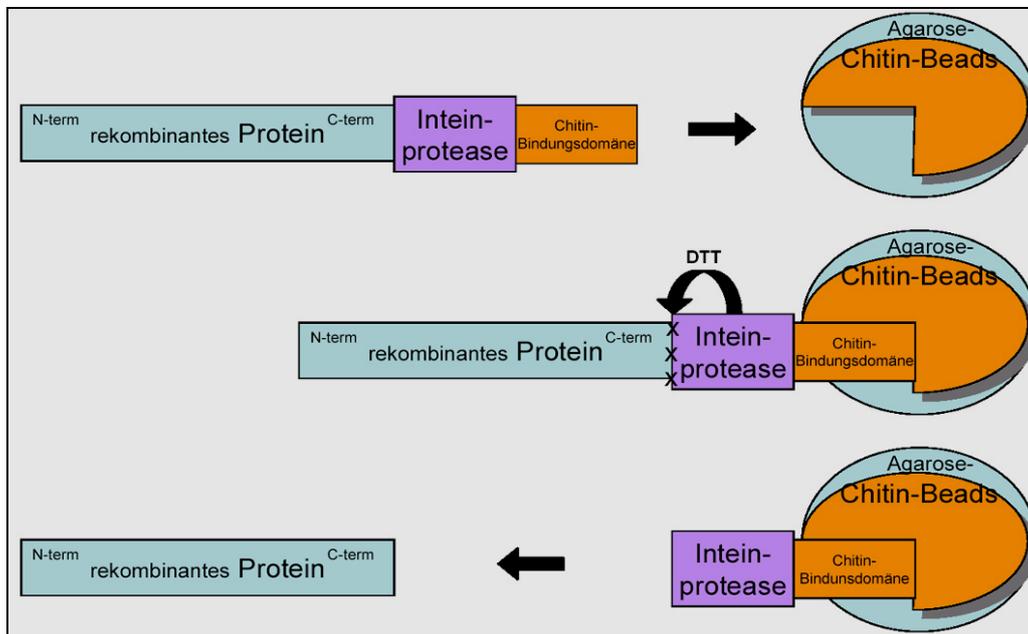


Abbildung 49: Schema zur Expression eines Intein-fusionsproteins: Matrixbindung und proteolytische Abspaltung des rekombinanten Proteins.

5.2.12. Punktmutation von E(z) zu E(z)mut

Um die Mutation der Nukleotid-Triplets von 2 kritischen Aminosäuren innerhalb der SET-Domäne von E(z) auszuführen, bedienten wir uns der PCR-Methode (5.2.1.1). Die Primer wurden so entworfen, dass bei der ersten PCR das E(z)-Gen in zwei Teilstücken amplifiziert wurde. Beide Teilstücke codierten daraufhin für eine von *N-H-S*- zu *A-G-S*-mutierte Aminosäuresequenz. Das erste Teilstück (A) reichte vom 5'-Ende des E(z)-Gens bis zur *A-G-S*-codierende Sequenz und war durch die Konstruktion der Primer nach der PCR am 5'-Ende mit einer Nde I-Restriktionsschnittstelle versehen. Das zweite Teilstück (B) reichte von der *A-G-S*-codierende Sequenz bis zum 3'Ende, welches mit einer Xho I-Schnittstelle versehen war. Nach Gelelektrophorese, Isolation und Reinigung wurden die DNA-Teilstücke der ersten PCR nur mit den Primern des 5'-Endes (Nde I) und des 3'-Endes (Xho I) versetzt. In einer zweiten PCR synthetisierten wir so die gewünschte E(z)mut-codierende cDNA, die anschließend (identisch zu E(z)) in den pMyb2-Expressionsvektor kloniert wurde (s. 5.2.1). Durch das Austauschen der ursprünglichen Codons für *N-H-S*, 2164-*aat-cat-tcc*-2172, gegen die Codons für *A-G-S*, 2164-*gcg-gga-tcc*-2172, wurde zugleich eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym SacII erhalten (*gga-tcc*). Dies ermöglichte eine Kontrolle, ob die Mutation erfolgreich war.

5.2.13. Assemblierung von Oktameren und DNA zu Nukleosomenarrays mit der Salzdialyse

Die Assemblierung von Nukleosomenarrays (d.h. kürzeren Verbänden bzw. Ketten aus Nukleosomen) kann aus einer 5S-rDNA und rekonstituierten Oktameren in einer ca. 20- bis 24-stündigen Salzdialyse bewerkstelligt werden (rekonstituierte Oktamere aus rekombinanten Histonen von B. Czermin, native Oktamere gereinigt aus *Drosophila*-Embryo-Zellkernen von A. Imhof erhalten).

Mit assemblierten Nukleosomenarrays kann man in *in vitro*-Versuchen eine dem Chromatin vergleichbare oder zumindest möglichst ähnliche Struktur einsetzen.

Eine Assemblierungsreaktion (500 µl) enthielt:

40 µg BSA

60 µg DNA

60 µg Histonoktamere

Eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen ist die Endkonzentration von 2M Salzgehalt (NaCl/ KCl) in 500 µl. Die verwendete 5S-rDNA ist ein Plasmid, das eine

Positionierungssequenz bestehend aus 11 aneinander gereihten, identischen DNA-Abschnitten enthält, welche die Assemblierung von Oktameren mit der DNA fördert.

Wegen des schwer abschätzbaren DNA- und Oktamer-Konzentrationsverhältnisses wurde bei jeder Salzdialyse eine Titration mit mehreren Assemblierungsreaktionen durchgeführt (z.B. DNA : Oktamer = 0,8:1 / 1:1 / 1:1,2 / 1:1,4). Die Assemblierungsreaktionen wurden in einer Dialysekammer konstant von dem Hochsalz-Puffer gegen den Niedrigsalz-Puffer dialysiert. Dabei wurden 3 L des Niedrigsalz-Puffer während einer Zeit von 20 bis 24 Stunden bei 4°C (Kühlraum) in die 600 ml Hochsalz-Puffer gepumpt. Das Volumen des Hochsalz-Puffer-Gefäßes (600ml) bleibt während der Dialyse konstant. Das Volumen einer Assemblierungsreaktion steigt während der Dialyse auf ca. 800µl an.

In die Dialysekammer wurde ein aufgeschnittener, mit bi-destilliertem Wasser benetzter Dialyseschlauch (Spectrum) eingespannt. Um eine einwandfreie Dialyse zu gewährleisten, wurde stets darauf geachtet, dass die benetzte Membran nicht antrocknete und dass sich beim Befüllen der Dialysekammer mit Hochsalzpuffer keine Luftblasen gebildet hatten. Nach der Befüllung der Dialysezellen mit den einzelnen Assemblierungsreaktionen wurde die Kammer mit Haushaltsfolie abgedeckt, um eine Verdunstung der Assemblierungsreaktionen und eine Verflüchtigung des β-Mercapto-Ethanol zu vermeiden. Die Puffergefäße wurden ebenfalls bedeckt.

Wenn rekombinant hergestellte Histon-Oktamere für die Assemblierung zu Nukleosomenarrays verwendet wurden, hießen die Nukleosomen „rekombinante Nukleosomen“. Für die Rekonstitution von „nativen Nukleosomen“ nach demselben Protokoll wurden Histon-Oktamere verwendet, die zuvor aus Zellkernen von *Drosophila melanogaster*-Embryonen herausgereinigt wurden.

Die pro Titration entstandenen Nukleosomenketten wurden nach der Salzdialyse mit einem Mikrokokkus-Nuklease-Verdau auf die Effizienz der Assemblierung hin überprüft (s. 5.2.14).

Hochsalz-Puffer:

2M NaCl
10mM Tris pH8 1M
1mM EDTA
1mM β-Mercapto-Ethanol
0,01% NP40

1L Niedrigsalz-Puffer:

50mM NaCl
10mM Tris pH8 1M
1mM EDTA
1mM β-Mercapto-Ethanol
0,01% NP40

5.2.14. Mikrokokkus-Nuklease-Verdau nach Assemblierung von Nukleosomenarrays

Der Mikrokokkus-Nuklease-Verdau („MNase“-Verdau) stellte *eine* Möglichkeit dar, das Vorhandensein von Nukleosomenarrays sowie die Effizienz der Assemblierung zu

untersuchen. Das Mikrokokkus-Nuklease-Enzym verdaut die DNA bei Vorliegen einer Nukleosomenkette nur zwischen den einzelnen Nukleosomen (Verbindungs-DNA).

Aus jeder dialysierten Assemblierungsreaktion einer Titrationsreihe wurden 60 μl Nukleosomen entnommen und nacheinander mit 50 μl „MNase-Mix“ versetzt. Hierbei musste zur schnellen und effektiven Vermischung 2 bis 3 mal auf- und abpipettiert werden. Daraus wurden bereits nach 10 Sekunden 35 μl entnommen und in ein mit 8 μl „Stop-Mix“ bereitstehendes Eppendorf-Gefäß unter 2-3maligem Auf- und Abpipettieren überführt. Dieser Schritt wird nach je 40 und 160 Sekunden wiederholt.

Aufgrund des Zeitmangels zwischen den einzelnen Arbeitsschritten empfahl sich folgendes Vorgehen:

- Die Eppendorf-Gefäße bereits vor dem Versuchsstart mit je 8 μl Stop-Mix zu versehen.
- Zwei Pipetten gleichzeitig zu verwenden (35 μl und 50 μl).
- Die zu testenden Nukleosomen nicht parallel, sondern nacheinander zu verdauen.

Zu jeder gestoppten MNase-Reaktion wurden 1,5 μl Proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben, vermischt und für eine Stunde bei 40°C inkubiert.

Daraufhin wurde die DNA mit der Ammonium-Acetat-Methode präzipitiert und die Gefäße für mindestens 1h (möglichst über Nacht) auf Eis oder bei -20°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Nach Lufttrocknen der präzipitierten DNA wurde diese in Ladepuffer resuspendiert und auf ein Ethidium-Bromid-haltiges Agarosegel (1,2%) aufgetragen.

Anhand der Bandenzahl im Agarose-Gel ließ sich nach dem Verdau abschätzen, ob im angestrebten 1:1-Verhältnis der unterschiedlichen Titrations mengenmäßig zuviel DNA (MNase produziert viele kleine DNA-Fragmente) oder zu viele Histone („überassemblierte Nukleosomen“, d.h. zu viele größere DNA-Fragmente, weil die DNA für die MNase schlecht zugänglich ist) in einer dialysierten Assemblierungsreaktion vorlagen.

EX 100 Puffer:

10 mM TRIS/HCl pH 7,5
100 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
10% Glycerin
0,5 mM EDTA pH8,0

„Stop-Mix“:

4% SDS
100 mM EDTA pH 8,0

„MNase-Mix“ (für ca. XX Titrations):

2,4 μl 1M CaCl₂
398 μl EX100 Puffer (Raumtemperatur)
3,2 μl MNase (50u/ μl)

DNA-Präzipitation mit Ammonium-Acetat:

0,5 Volumen NH₄Ac, 7,5M
1 μl Glykogen
2,5 Volumen Ethanol, 100%

5.2.15. HDAC-Versuch

Die mit $E(z)$, $E(z)$ mut, bzw. Intein gekoppelten Chitinbeads wurden nach der Trax-Inkubation und anschließenden Waschschrinen für 90 min bei 30°C mit 2 μl ³H-markierten Hühner-

Histonen (25 000 cpm/ μ l) inkubiert. Dann wurden 230 μ l IPH150 Puffer sowie 65 μ l einer 1M HCl/0.16M Essigsäure-Mischung dazugegeben. Anschließend wurden 700 μ l Ethylacetat daraufpipettiert, kräftig mit dem Vortex geschüttelt, kurz zentrifugiert und je 500 μ l von der oberen Phase abgenommen. Diese wurden für die Szintillationszählung verwendet.

IPH 150:

50 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
0,1% (v/v) NP40
0,2 mM PMSF

5.2.16. Aktivitätsversuche: HMTase- und HAT-Versuch

Histonmethyltransferase-Assays (HMTase-Assays) und Histonacetyltransferase-Assays (HAT-Assays) nach der „*spot-and-count*“-Methode sind eine schnelle und einfache Methode, um Methyltransferase-Aktivität bzw. Acetyltransferase-Aktivität in rekombinant hergestellten Proteinen bzw. in Chromatographiefraktionen zu detektieren.

Die Aktivitäts-Assays wurden in einem Gesamtvolumen von 40 μ l durchgeführt. Dazu wurden in HMTase-Assays zwischen 10 und 20 μ l rekombinante Nukleosomen (bzw. die entsprechende Proteinmenge anderer Substrate wie Histone, Oktamer oder Peptide; 20 μ l Nukleosomen entsprechen etwa 1,5 μ g assembliertem Histonoktamer) zusammen mit 500 nCi SAM* (S-Adenosyl-(methyl- 3 H)-L-Methionin (20 μ Ci ml $^{-1}$) (Amersham)) und 7 μ l eluiertem Protein einer Inteinexpression oder 10 bzw. 15 μ l einer Säulenfraktion inkubiert. Die HAT-Assays wurden identisch durchgeführt, allerdings wurde 250 nCi AcCoA* (3 H)Acetyl-Coenzym A (10 μ Ci ml $^{-1}$) (Amersham)) anstelle von SAM* eingesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Aufträufeln von ca. 30 μ l des Reaktionsansatzes auf p81-Filterpapier gestoppt („*spot*“). Die negative Ladung des Filterpapiers zog die positiv geladenen Histone oder Peptide an. Die Filterpapiere wurden drei mal 10 Minuten in 50 mM Na $_2$ CO $_3$ pH 9.2 gewaschen, um möglichst alle nicht an das Filterpapier gebundenen Moleküle (insbesondere radioaktives SAM* bzw. AcCoA*) zu entfernen und anschließend getrocknet. Der Einbau von 3 H-markierten Methyl- bzw. Acetylgruppen wurde nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler (Beckmann) gemessen („*count*“).

Für **Autoradiographien** (Detektion der in Proteine eingebauten 3 H-markierten Methylgruppen bzw. Acetylgruppen auf einem Röntgenfilm) war die Zusammensetzung und die Inkubation der Reaktionen identisch. Nach der Inkubationszeit wurden sie mit SDS-Ladepuffer versetzt, erhitzt und elektrophoretisch mit einem SDS-Gel aufgetrennt (s. 5.2.3).

Meist wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, fotografiert, analysiert und wieder entfärbt (s. 5.2.4.1) bevor es für 30 Minuten in „Amplify“-Lösung (Amersham) geschüttelt wurde. Nach dem Trocknen wurde ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt und für einen oder mehrere Tage (je nach Intensität der detektierten Aktivität) bei -80 °C in einer Filmcassette exponiert und anschließend entwickelt.

5.2.17. Proteinreinigung (von PRset7 und MOF)

5.2.17.1. Superdex 200

Eine Superdex200-Säule (HR 10/30) wurde in BC 200-Puffer (200 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurden das Proteineluat aus der Expression des betreffenden Intein-Fusionsproteins (PRset7 bzw. MOF) aufgetragen und der Säulenlauf mit folgendem Programm gestartet:

Geschwindigkeit	0,5 ml/min
Max. Druck	1,5 Mpa
Fraktionsgröße	0,5 ml
Elution	Isokratisch bei 200 mM NaCl, ca. 30 ml

Die PRset7- bzw. MOF-enthaltenden Fraktionen wurden per SDS-Gel und Western Blot identifiziert (10% SDS-Gele), vereinigt (Gesamtvolumen ca. 10 ml), aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.2.17.2. Mono Q

PRset7 wurde ebenfalls über die MonoQ-Säule (1 ml CV, HR 5/5) gereinigt. Die Säule wurde mit BC100 (100 mM NaCl) äquilibriert. Für den Säulenlauf wurden folgende Parameter verwendet:

Geschwindigkeit	0,5 ml/min
Max. Druck	5 Mpa
Fraktionsgröße	0,3 ml
Auftrag in	150 mM NaCl
Waschen nach Auftrag	2 CV, 100 mM NaCl
Gradient	In 10 CV von 100 mM auf 500 mM NaCl

PRset7 und dessen Degradationsprodukte wurden per SDS-Gel und Western Blot (je 10% Gele) identifiziert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad,K. and Henikoff,S. (2002a). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99 Suppl 4*, 16477-16484.

Ahmad,K. and Henikoff,S. (2002b). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell 9*, 1191-1200.

Akhtar,A. and Becker,P.B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol. Cell 5*, 367-375.

Alberts,B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland.

Allfrey,V.G., Faulkner,R., and Mirksy,A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 51*, 786-794.

Allshire,R. (2003). Centromere and kinetochore structure and function. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, R.Egel, ed. (Berlin: Springer Verlag), pp. 149-166.

Angelov,D., Molla,A., Perche,P.Y., Hans,F., Cote,J., Khochbin,S., Bouvet,P., and Dimitrov,S. (2003). The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell 11*, 1033-1041.

Angelov,D., Vitolo,J.M., Mutskov,V., Dimitrov,S., and Hayes,J.J. (2001). Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98*, 6599-6604.

Ayton,P.M. and Cleary,M.L. (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene 20*, 5695-5707.

Ayyanathan,K., Lechner,M.S., Bell,P., Maul,G.G., Schultz,D.C., Yamada,Y., Tanaka,K., Torigoe,K., and Rauscher,F.J., III (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev. 17*, 1855-1869.

Baneres,J.L., Martin,A., and Parello,J. (1997). The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J. Mol. Biol. 273*, 503-508.

Bannister,A.J., Schneider,R., and Kouzarides,T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell 109*, 801-806.

Becker,P.B. and Horz,W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem. 71*, 247-273.

Bednar,J., Horowitz,R.A., Grigoryev,S.A., Carruthers,L.M., Hansen,J.C., Koster,A.J., and Woodcock,C.L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95*, 14173-14178.

Beisel,C., Imhof,A., Greene,J., Kremmer,E., and Sauer,F. (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature 419*, 857-862.

- Bel,S., Core,N., Djabali,M., Kieboom,K., Van der,L.N., Alkema,M.J., and van Lohuizen,M. (1998). Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes in mice. *Development* 125, 3543-3551.
- Belmont,A.S. and Bruce,K. (1994). Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J. Cell Biol.* 127, 287-302.
- Bernstein,E., Duncan,E.M., Masui,O., Gil,J., Heard,E., and Allis,C.D. (2006). Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol. Cell Biol.* 26, 2560-2569.
- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Birve,A., Sengupta,A.K., Beuchle,D., Larsson,J., Kennison,J.A., Rasmuson-Lestander,A., and Muller,J. (2001). Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development* 128, 3371-3379.
- Bonaldi,T., Imhof,A., and Regula,J.T. (2004). A combination of different mass spectroscopic techniques for the analysis of dynamic changes of histone modifications. *Proteomics.* 4, 1382-1396.
- Bongiorni,S., Cintio,O., and Prantera,G. (1999). The relationship between DNA methylation and chromosome imprinting in the coccid *Planococcus citri*. *Genetics* 151, 1471-1478.
- Boyer,L.A., Langer,M.R., Crowley,K.A., Tan,S., Denu,J.M., and Peterson,C.L. (2002). Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol. Cell* 10, 935-942.
- Bracken,A.P., Pasini,D., Capra,M., Prosperini,E., Colli,E., and Helin,K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 22, 5323-5335.
- Brattstrom,L., Lindgren,A., Israelsson,B., Andersson,A., and Hultberg,B. (1994). Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J. Intern. Med.* 236, 633-641.
- Breiling,A., O'Neill,L.P., D'Eliseo,D., Turner,B.M., and Orlando,V. (2004). Epigenome changes in active and inactive polycomb-group-controlled regions. *EMBO Rep.* 5, 976-982.
- Brown,S.W. (1966). Heterochromatin. *Science* 151, 417-425.
- Caldas,C. and Aparicio,S. (1999). Cell memory and cancer--the story of the trithorax and Polycomb group genes. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 313-329.
- Cao,R., Wang,L., Wang,H., Xia,L., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Jones,R.S., and Zhang,Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043.
- Cao,R. and Zhang,Y. (2004a). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol. Cell* 15, 57-67.
- Cao,R. and Zhang,Y. (2004b). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 155-164.
- Carruthers,L.M. and Hansen,J.C. (2000). The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation. *J. Biol. Chem.* 275, 37285-37290.

- Chadwick,B.P. and Willard,H.F. (2002). Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* *157*, 1113-1123.
- Chambon,P., DuPraw,E.J., and Kornberg,A. (1968). Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. IX. Ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid polymerases in nuclear fractions of vegetative cells and spores of *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* *243*, 5101-5109.
- Chang,L., Loranger,S.S., Mizzen,C., Ernst,S.G., Allis,C.D., and Annunziato,A.T. (1997). Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* *36*, 469-480.
- Cheutin,T., McNairn,A.J., Jenuwein,T., Gilbert,D.M., Singh,P.B., and Misteli,T. (2003). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* *299*, 721-725.
- Chiarugi,A. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends Pharmacol. Sci.* *23*, 122-129.
- Clapier,C.R., Langst,G., Corona,D.F., Becker,P.B., and Nightingale,K.P. (2001). Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. *Mol. Cell Biol.* *21*, 875-883.
- Clapier,C.R., Nightingale,K.P., and Becker,P.B. (2002). A critical epitope for substrate recognition by the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *Nucleic Acids Res.* *30*, 649-655.
- Corona,D.F., Clapier,C.R., Becker,P.B., and Tamkun,J.W. (2002). Modulation of ISWI function by site-specific histone acetylation. *EMBO Rep.* *3*, 242-247.
- Corona,D.F., Langst,G., Clapier,C.R., Bonte,E.J., Ferrari,S., Tamkun,J.W., and Becker,P.B. (1999). ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol. Cell* *3*, 239-245.
- Cress,W.D. and Seto,E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J. Cell Physiol* *184*, 1-16.
- Cuthbert,G.L., Daujat,S., Snowden,A.W., Erdjument-Bromage,H., Hagiwara,T., Yamada,M., Schneider,R., Gregory,P.D., Tempst,P., Bannister,A.J., and Kouzarides,T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* *118*, 545-553.
- Czermin,B., Melfi,R., McCabe,D., Seitz,V., Imhof,A., and Pirrotta,V. (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* *111*, 185-196.
- Czermin,B., Schotta,G., Hulsmann,B.B., Brehm,A., Becker,P.B., Reuter,G., and Imhof,A. (2001). Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.* *2*, 915-919.
- Dahiya,A., Wong,S., Gonzalo,S., Gavin,M., and Dean,D.C. (2001). Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol. Cell* *8*, 557-569.
- Davie,J.R. and Candido,E.P. (1978). Acetylated histone H4 is preferentially associated with template-active chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *75*, 3574-3577.
- Davie,J.R., Lin,R., and Allis,C.D. (1991). Timing of the appearance of ubiquitinated histones in developing new macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Biochem. Cell Biol.* *69*, 66-71.
- de Murcia,G., Huletsky,A., and Poirier,G.G. (1988). Modulation of chromatin structure by poly(ADP-ribose)ylation. *Biochem. Cell Biol.* *66*, 626-635.

- de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., Koseki, H., and Brockdorff, N. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* 7, 663-676.
- De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., and Spierer, P. (1996). The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* 384, 589-591.
- Debrauwere, H., Gendrel, C.G., Lechat, S., and Dutreix, M. (1997). Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. *Biochimie* 79, 577-586.
- Delaval, K. and Feil, R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 188-195.
- Dellino, G.I., Schwartz, Y.B., Farkas, G., McCabe, D., Elgin, S.C., and Pirrotta, V. (2004). Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol. Cell* 13, 887-893.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., and Richmond, T.J. (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* 327, 85-96.
- Ebralidse, K.K., Grachev, S.A., and Mirzabekov, A.D. (1988). A highly basic histone H4 domain bound to the sharply bent region of nucleosomal DNA. *Nature* 331, 365-367.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V., and Elgin, S.C. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 9923-9927.
- Eissenberg, J.C., Morris, G.D., Reuter, G., and Hartnett, T. (1992). The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* 131, 345-352.
- Elgin, S. and Workman, J. (2000). Oxford University Press.
- Eskeland, R., Czermin, B., Boeke, J., Bonaldi, T., Regula, J.T., and Imhof, A. (2004). The N-terminus of *Drosophila* SU(VAR)3-9 mediates dimerization and regulates its methyltransferase activity. *Biochemistry* 43, 3740-3749.
- Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C., and Tremethick, D.J. (2002). The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat. Struct. Biol.* 9, 172-176.
- Fang, J., Chen, T., Chadwick, B., Li, E., and Zhang, Y. (2004). Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 52812-52815.
- Fang, J., Feng, Q., Ketel, C.S., Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Simon, J.A., and Zhang, Y. (2002). Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr. Biol.* 12, 1086-1099.
- Fanti, L., Dorer, D.R., Berloco, M., Henikoff, S., and Pimpinelli, S. (1998). Heterochromatin protein 1 binds transgene arrays. *Chromosoma* 107, 286-292.
- Faust, C., Lawson, K.A., Schork, N.J., Thiel, B., and Magnuson, T. (1998). The Polycomb-group gene *eed* is required for normal morphogenetic movements during gastrulation in the mouse embryo. *Development* 125, 4495-4506.

- Felsenfeld,G. and Groudine,M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Feng,Q., Wang,H., Ng,H.H., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Struhl,K., and Zhang,Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* 12, 1052-1058.
- Fischle,W., Wang,Y., Jacobs,S.A., Kim,Y., Allis,C.D., and Khorasanizadeh,S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870-1881.
- Francis,N.J. and Kingston,R.E. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 409-421.
- Fuks,F., Burgers,W.A., Godin,N., Kasai,M., and Kouzarides,T. (2001). Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* 20, 2536-2544.
- Furuyama,T., Banerjee,R., Breen,T.R., and Harte,P.J. (2004). SIR2 is required for polycomb silencing and is associated with an E(Z) histone methyltransferase complex. *Curr. Biol.* 14, 1812-1821.
- Gilbert,N., Boyle,S., Fiegler,H., Woodfine,K., Carter,N.P., and Bickmore,W.A. (2004). Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118, 555-566.
- Giovannucci,E., Rimm,E.B., Ascherio,A., Stampfer,M.J., Colditz,G.A., and Willett,W.C. (1995). Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 265-273.
- Golderer,G. and Grobner,P. (1991). ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies. *Biochem. J.* 277 (Pt 3), 607-610.
- Grimaud,C., Bantignies,F., Pal-Bhadra,M., Ghana,P., Bhadra,U., and Cavalli,G. (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* 124, 957-971.
- Grzymski,E.C. (2003). Histone methylation unSETtled. *Nat. Struct. Biol.* 10, 236.
- Gu,Y., Nakamura,T., Alder,H., Prasad,R., Canaani,O., Cimino,G., Croce,C.M., and Canaani,E. (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* 71, 701-708.
- Gurley,L.R., D'Anna,J.A., Barham,S.S., Deaven,L.L., and Tobey,R.A. (1978). Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur. J. Biochem.* 84, 1-15.
- Gutjahr,T., Frei,E., Spicer,C., Baumgartner,S., White,R.A., and Noll,M. (1995). The Polycomb-group gene, extra sex combs, encodes a nuclear member of the WD-40 repeat family. *EMBO J.* 14, 4296-4306.
- Hampsey,M. and Reinberg,D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113, 429-432.
- Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hans,F. and Dimitrov,S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 20, 3021-3027.

- Hayes, J.J. and Hansen, J.C. (2002). New insights into unwrapping DNA from the nucleosome from a single-molecule optical tweezers method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 1752-1754.
- Heard, E. (2004). Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 247-255.
- Heard, E. (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 482-489.
- Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb. wiss. Bot.* *1*, 762-818.
- Henikoff, S. (2000). Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim. Biophys. Acta* *1470*, O1-O8.
- Henikoff, S., Furuyama, T., and Ahmad, K. (2004). Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet.* *20*, 320-326.
- Henikoff, S. and Matzke, M.A. (1997). Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet.* *13*, 293-295.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). DNA repair mechanisms. *Maturitas* *38*, 17-22.
- Holliday, R. and Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* *187*, 226-232.
- Honda, B.M., Dixon, G.H., and Candido, E.P. (1975). Sites of in vivo histone methylation in developing trout testis. *J. Biol. Chem.* *250*, 8681-8685.
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., and Bradbury, E.M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.* *268*, 305-314.
- Huang, S. (2002). Histone methyltransferases, diet nutrients and tumour suppressors. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 469-476.
- Huang, Y., Fang, J., Bedford, M.T., Zhang, Y., and Xu, R.M. (2006). Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* *312*, 748-751.
- Imhof, A. (2003). Histone modifications: an assembly line for active chromatin? *Curr. Biol.* *13*, R22-R24.
- Imhof, A. and Seitz, V. (2003). Histon Methyltransferasen – Textmarker des Genoms? *Bioforum* *26*, 212-214.
- Ito, T., Bulger, M., Pazin, M.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* *90*, 145-155.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* *416*, 556-560.
- Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N., and Chalkley, R. (1976). Modifications to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* *104*, 471-483.
- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* *20*, 5232-5241.

- Jacobson, M.K. and Jacobson, E.L. (1999). Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 415-417.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* *33 Suppl*, 245-254.
- James, T.C. and Elgin, S.C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell Biol.* *6*, 3862-3872.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., and Reuter, G. (1998). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol. Life Sci.* *54*, 80-93.
- Johnson, L.M., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M. (1992). Identification of a non-basic domain in the histone H4 N-terminus required for repression of the yeast silent mating loci. *EMBO J.* *11*, 2201-2209.
- Jones, C.A., Ng, J., Peterson, A.J., Morgan, K., Simon, J., and Jones, R.S. (1998). The *Drosophila* esc and E(z) proteins are direct partners in polycomb group-mediated repression. *Mol. Cell Biol.* *18*, 2825-2834.
- Jones, R.S. and Gelbart, W.M. (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol. Cell Biol.* *13*, 6357-6366.
- Julien, E. and Herr, W. (2004). A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Mol. Cell* *14*, 713-725.
- Kadosh, D. and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* *89*, 365-371.
- Kelley, R.L., Solovyeva, I., Lyman, L.M., Richman, R., Solovyev, V., and Kuroda, M.I. (1995). Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell* *81*, 867-877.
- Kirmizis, A., Bartley, S.M., and Farnham, P.J. (2003). Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* *2*, 113-121.
- Kirmizis, A., Bartley, S.M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P.J. (2004). Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev.* *18*, 1592-1605.
- Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Hayes, D.F., Sabel, M.S., Livant, D., Weiss, S.J., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 11606-11611.
- Klein, R.R. and Houtz, R.L. (1995). Cloning and developmental expression of pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* *27*, 249-261.
- Korber, P. and Horz, W. (2004). SWRed not shaken; mixing the histones. *Cell* *117*, 5-7.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* *184*, 868-871.
- Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D.M., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Shi, W., Fundele, R., and Singh, P.B. (2004). Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.* *117*, 2491-2501.

- Kramer, O.H., Gottlicher, M., and Heinzel, T. (2001). Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol. Metab* 12, 294-300.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J. (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* 23, 4207-4218.
- Kurdistani, S.K., Tavazoie, S., and Grunstein, M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117, 721-733.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol. Cell* 14, 183-193.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 16, 2893-2905.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J., and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.* 116, 2117-2124.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., and Jenuwein, T. (1997). Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J.* 16, 3219-3232.
- Langst, G. and Becker, P.B. (2001). Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J. Cell Sci.* 114, 2561-2568.
- Langst, G. and Becker, P.B. (2004). Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim. Biophys. Acta* 1677, 58-63.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, A.H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* 13, 1192-1200.
- Levine, S.S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P., and Kingston, R.E. (2002). The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol. Cell Biol.* 22, 6070-6078.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Li, B., Howe, L., Anderson, S., Yates, J.R., III, and Workman, J.L. (2003). The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 278, 8897-8903.
- Li, J., Moazed, D., and Gygi, S.P. (2002). Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *J. Biol. Chem.* 277, 49383-49388.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., and Berger, S.L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* 5, 917-926.

- Loyola,A., LeRoy,G., Wang,Y.H., and Reinberg,D. (2001). Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev.* *15*, 2837-2851.
- Luger,K., Mader,A.W., Richmond,R.K., Sargent,D.F., and Richmond,T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- Luger,K. and Richmond,T.J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 140-146.
- Lund,A.H. and van Lohuizen,M. (2004). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 239-246.
- Lyko,F. and Paro,R. (1999). Chromosomal elements conferring epigenetic inheritance. *Bioessays* *21*, 824-832.
- Ma,J., Hwang,K.K., Worman,H.J., Courvalin,J.C., and Eissenberg,J.C. (2001). Expression and functional analysis of three isoforms of human heterochromatin-associated protein HP1 in *Drosophila*. *Chromosoma* *109*, 536-544.
- Mahadevan,L.C., Willis,A.C., and Barratt,M.J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* *65*, 775-783.
- Marks,P., Rifkind,R.A., Richon,V.M., Breslow,R., Miller,T., and Kelly,W.K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* *1*, 194-202.
- Marmorstein,R. (2003). Structure of SET domain proteins: a new twist on histone methylation. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 59-62.
- Martinez-Balbas,M.A., Tsukiyama,T., Gdula,D., and Wu,C. (1998). *Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 132-137.
- Megee,P.C., Morgan,B.A., and Smith,M.M. (1995). Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes Dev.* *9*, 1716-1727.
- Meneghini,M.D., Wu,M., and Madhani,H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* *112*, 725-736.
- Metzger,E., Wissmann,M., Yin,N., Muller,J.M., Schneider,R., Peters,A.H., Gunther,T., Buettner,R., and Schule,R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* *437*, 436-439.
- Miller,T.A., Witter,D.J., and Belvedere,S. (2003). Histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* *46*, 5097-5116.
- Milne,T.A., Briggs,S.D., Brock,H.W., Martin,M.E., Gibbs,D., Allis,C.D., and Hess,J.L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell* *10*, 1107-1117.
- Min,J., Feng,Q., Li,Z., Zhang,Y., and Xu,R.M. (2003a). Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase. *Cell* *112*, 711-723.
- Min,J., Zhang,X., Cheng,X., Grewal,S.I., and Xu,R.M. (2002). Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 828-832.
- Min,J., Zhang,Y., and Xu,R.M. (2003b). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev.* *17*, 1823-1828.

- Mishra,S.K. and Das,B.R. (1992). (ADP-ribosyl)ation pattern of chromosomal proteins during ageing. *Cell Mol. Biol.* 38, 457-462.
- 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., and Allis,C.D. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.
- Morales,V., Straub,T., Neumann,M.F., Mengus,G., Akhtar,A., and Becker,P.B. (2004). Functional integration of the histone acetyltransferase MOF into the dosage compensation complex. *EMBO J.* 23, 2258-2268.
- Muller,J., Hart,C.M., Francis,N.J., Vargas,M.L., Sengupta,A., Wild,B., Miller,E.L., O'Connor,M.B., Kingston,R.E., and Simon,J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 111, 197-208.
- Murray,K. (1964). The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* 3, 10-15.
- Nakamura,T., Mori,T., Tada,S., Krajewski,W., Rozovskaia,T., Wassell,R., Dubois,G., Mazo,A., Croce,C.M., and Canaani,E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* 10, 1119-1128.
- Nakamura,T.M., Du,L.L., Redon,C., and Russell,P. (2004). Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 24, 6215-6230.
- Ng,H.H., Robert,F., Young,R.A., and Struhl,K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell* 11, 709-719.
- Ng,J., Li,R., Morgan,K., and Simon,J. (1997). Evolutionary conservation and predicted structure of the Drosophila extra sex combs repressor protein. *Mol. Cell Biol.* 17, 6663-6672.
- Nielsen,S.J., Schneider,R., Bauer,U.M., Bannister,A.J., Morrison,A., O'Carroll,D., Firestein,R., Cleary,M., Jenuwein,T., Herrera,R.E., and Kouzarides,T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.
- Nishioka,K., Chuikov,S., Sarma,K., Erdjument-Bromage,H., Allis,C.D., Tempst,P., and Reinberg,D. (2002a). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* 16, 479-489.
- Nishioka,K., Rice,J.C., Sarma,K., Erdjument-Bromage,H., Werner,J., Wang,Y., Chuikov,S., Valenzuela,P., Tempst,P., Steward,R., Lis,J.T., Allis,C.D., and Reinberg,D. (2002b). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* 9, 1201-1213.
- Noma,K., Allis,C.D., and Grewal,S.I. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293, 1150-1155.
- Nowak,S.J. and Corces,V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* 20, 214-220.
- Nusslein-Volhard,C., Frohnhof,H.G., and Lehmann,R. (1987). Determination of anteroposterior polarity in Drosophila. *Science* 238, 1675-1681.
- O'Carroll,D., Erhardt,S., Pagani,M., Barton,S.C., Surani,M.A., and Jenuwein,T. (2001). The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol. Cell Biol.* 21, 4330-4336.

- Ogryzko, V.V., Hirai, T.H., Russanova, V.R., Barbie, D.A., and Howard, B.H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell Biol.* *16*, 5210-5218.
- Olins, A.L. and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* *183*, 330-332.
- Osley, M.A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* *60*, 827-861.
- Otte, A.P. and Kwaks, T.H. (2003). Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 448-454.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H., and Margolis, R.L. (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 3734-3738.
- Paro, R. and Hogness, D.S. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 263-267.
- Parthun, M.R., Widom, J., and Gottschling, D.E. (1996). The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* *87*, 85-94.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H., and Jenuwein, T. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* *12*, 1577-1589.
- Peters, A.H., Mermoud, J.E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N., and Jenuwein, T. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat. Genet.* *30*, 77-80.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., and Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* *107*, 323-337.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* *14*, R546-R551.
- Phillips, D.M. (1963). The presence of acetyl groups of histones. *Biochem. J.* *87*, 258-263.
- Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., Bonaccorsi, S., Marchetti, E., Caizzi, R., Caggese, C., and Gatti, M. (1995). Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 3804-3808.
- Platero, J.S., Hartnett, T., and Eissenberg, J.C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* *14*, 3977-3986.
- Platero, J.S., Sharp, E.J., Adler, P.N., and Eissenberg, J.C. (1996). In vivo assay for protein-protein interactions using *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma* *104*, 393-404.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., and Zhang, Y. (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* *300*, 131-135.
- Polo, S.E., Theocharis, S.E., Klijanienko, J., Savignoni, A., Asselain, B., Vielh, P., and Almouzni, G. (2004). Chromatin assembly factor-1, a marker of clinical value to distinguish quiescent from proliferating cells. *Cancer Res.* *64*, 2371-2381.

- Poux,S., Horard,B., Sigrist,C.J., and Pirrotta,V. (2002). The *Drosophila trithorax* protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development* *129*, 2483-2493.
- Poux,S., Melfi,R., and Pirrotta,V. (2001). Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev.* *15*, 2509-2514.
- Rea,S., Eisenhaber,F., O'Carroll,D., Strahl,B.D., Sun,Z.W., Schmid,M., Opravil,S., Mechtler,K., Ponting,C.P., Allis,C.D., and Jenuwein,T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593-599.
- Reuter,G. and Spierer,P. (1992). Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays* *14*, 605-612.
- Rhodes,D.R., Sanda,M.G., Otte,A.P., Chinnaiyan,A.M., and Rubin,M.A. (2003). Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 661-668.
- Rice,J.C., Nishioka,K., Sarma,K., Steward,R., Reinberg,D., and Allis,C.D. (2002). Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* *16*, 2225-2230.
- Riggs,A.D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* *14*, 9-25.
- Robyr,D., Suka,Y., Xenarios,I., Kurdistani,S.K., Wang,A., Suka,N., and Grunstein,M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* *109*, 437-446.
- Rogakou,E.P., Pilch,D.R., Orr,A.H., Ivanova,V.S., and Bonner,W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858-5868.
- Roguev,A., Schaft,D., Shevchenko,A., Aasland,R., Shevchenko,A., and Stewart,A.F. (2003). High conservation of the Set1/Rad6 axis of histone 3 lysine 4 methylation in budding and fission yeasts. *J. Biol. Chem.* *278*, 8487-8493.
- Roth,S.Y., Denu,J.M., and Allis,C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 81-120.
- Ruiz-Carrillo,A., Wangh,L.J., and Allfrey,V.G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* *190*, 117-128.
- Saffery,R., Sumer,H., Hassan,S., Wong,L.H., Craig,J.M., Todokoro,K., Anderson,M., Stafford,A., and Choo,K.H. (2003). Transcription within a functional human centromere. *Mol. Cell* *12*, 509-516.
- Sanchez-Elsner,T., Gou,D., Kremmer,E., and Sauer,F. (2006). Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit *Drosophila* Ash1 to Ultrabithorax. *Science* *311*, 1118-1123.
- Sanders,S.L., Portoso,M., Mata,J., Bahler,J., Allshire,R.C., and Kouzarides,T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* *119*, 603-614.
- Santos-Rosa,H., Schneider,R., Bannister,A.J., Sherriff,J., Bernstein,B.E., Emre,N.C., Schreiber,S.L., Mellor,J., and Kouzarides,T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407-411.
- Sarg,B., Helliger,W., Talasz,H., Koutzamani,E., and Lindner,H.H. (2004). Histone H4 hyperacetylation precludes histone H4 lysine 20 trimethylation. *J. Biol. Chem.* *279*, 53458-53464.

- Sarg,B., Koutzamani,E., Helliger,W., Rundquist,I., and Lindner,H.H. (2002). Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J. Biol. Chem.* 277, 39195-39201.
- Schiltz,R.L., Mizzen,C.A., Vassilev,A., Cook,R.G., Allis,C.D., and Nakatani,Y. (1999). Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J. Biol. Chem.* 274, 1189-1192.
- Schmitt,S., Prestel,M., and Paro,R. (2005). Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev.* 19, 697-708.
- Schneider,R., Bannister,A.J., and Kouzarides,T. (2002). Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends Biochem. Sci.* 27, 396-402.
- Schotta,G., Lachner,M., Sarma,K., Ebert,A., Sengupta,R., Reuter,G., Reinberg,D., and Jenuwein,T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18, 1251-1262.
- Schreiber,S.L. and Bernstein,B.E. (2002). Signaling network model of chromatin. *Cell* 111, 771-778.
- Sellers,W.R. and Loda,M. (2002). The EZH2 polycomb transcriptional repressor--a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell* 2, 349-350.
- Seshadri,S., Beiser,A., Selhub,J., Jacques,P.F., Rosenberg,I.H., D'Agostino,R.B., Wilson,P.W., and Wolf,P.A. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 346, 476-483.
- Shao,Z., Raible,F., Mollaaghababa,R., Guyon,J.R., Wu,C.T., Bender,W., and Kingston,R.E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 98, 37-46.
- Shelby,R.D., Vafa,O., and Sullivan,K.F. (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J. Cell Biol.* 136, 501-513.
- Shi,Y., Lan,F., Matson,C., Mulligan,P., Whetstine,J.R., Cole,P.A., Casero,R.A., and Shi,Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shi,Y.J., Matson,C., Lan,F., Iwase,S., Baba,T., and Shi,Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol. Cell* 19, 857-864.
- Silva,J., Mak,W., Zvetkova,I., Appanah,R., Nesterova,T.B., Webster,Z., Peters,A.H., Jenuwein,T., Otte,A.P., and 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.
- Simon,J. (1995). Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 376-385.
- Simon,J., Chiang,A., Bender,W., Shimell,M.J., and O'Connor,M. (1993). Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev. Biol.* 158, 131-144.
- Sims,R.J., III, Nishioka,K., and Reinberg,D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 19, 629-639.
- Sittman,D.B., Graves,R.A., and Marzluff,W.F. (1983). Histone mRNA concentrations are regulated at the level of transcription and mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 1849-1853.

- Smith,E.R., Pannuti,A., Gu,W., Steurnagel,A., Cook,R.G., Allis,C.D., and Lucchesi,J.C. (2000). The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol. Cell Biol.* *20*, 312-318.
- Sobel,R.E., Cook,R.G., Perry,C.A., Annunziato,A.T., and Allis,C.D. (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 1237-1241.
- St Johnston,D. and Nusslein-Volhard,C. (1992). The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. *Cell* *68*, 201-219.
- Stassen,M.J., Bailey,D., Nelson,S., Chinwalla,V., and Harte,P.J. (1995). The Drosophila trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech. Dev.* *52*, 209-223.
- Sterner,D.E. and Berger,S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 435-459.
- Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-45.
- Strahl,B.D., Ohba,R., Cook,R.G., and Allis,C.D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 14967-14972.
- Straub,T. (2003). Heterochromatin dynamics. *PLoS. Biol.* *1*, E14.
- Struhl,G. and Brower,D. (1982). Early role of the *esc+* gene product in the determination of segments in Drosophila. *Cell* *31*, 285-292.
- Strutt,H., Cavalli,G., and Paro,R. (1997). Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J.* *16*, 3621-3632.
- Studier,F.W., Rosenberg,A.H., Dunn,J.J., and Dubendorff,J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* *185*, 60-89.
- Su,I.H., Basavaraj,A., Krutchinsky,A.N., Hobert,O., Ullrich,A., Chait,B.T., and Tarakhovsky,A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* *4*, 124-131.
- Sun,F.L., Cuaycong,M.H., and Elgin,S.C. (2001). Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in Drosophila melanogaster pericentric heterochromatin. *Mol. Cell Biol.* *21*, 2867-2879.
- Sun,Z.W. and Allis,C.D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* *418*, 104-108.
- Tagami,H., Ray-Gallet,D., Almouzni,G., and Nakatani,Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* *116*, 51-61.
- Takahara,Y., Tomotsune,D., Shirai,M., Katoh-Fukui,Y., Nishii,K., Motaleb,M.A., Nomura,M., Tsuchiya,R., Fujita,Y., Shibata,Y., Higashinakagawa,T., and Shimada,K. (1997). Targeted disruption of the mouse homologue of the Drosophila polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* *124*, 3673-3682.

- Tamaru,H., Zhang,X., McMillen,D., Singh,P.B., Nakayama,J., Grewal,S.I., Allis,C.D., Cheng,X., and Selker,E.U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* *34*, 75-79.
- Taylor,W.R., Xiao,B., Gamblin,S.J., and Lin,K. (2003). A knot or not a knot? SETting the record 'straight' on proteins. *Comput. Biol. Chem.* *27*, 11-15.
- Thoma,F., Koller,T., and Klug,A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* *83*, 403-427.
- Thompson,I.M., Pauler,D.K., Goodman,P.J., Tangen,C.M., Lucia,M.S., Parnes,H.L., Minasian,L.M., Ford,L.G., Lippman,S.M., Crawford,E.D., Crowley,J.J., and Coltman,C.A., Jr. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2239-2246.
- Tie,F., Furuyama,T., and Harte,P.J. (1998). The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) bind directly to each other and co-localize at multiple chromosomal sites. *Development* *125*, 3483-3496.
- Tie,F., Furuyama,T., Prasad-Sinha,J., Jane,E., and Harte,P.J. (2001). The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development* *128*, 275-286.
- Tie,F., Prasad-Sinha,J., Birve,A., Rasmuson-Lestander,A., and Harte,P.J. (2003). A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from *Drosophila* that contains polycomblike and RPD3. *Mol. Cell Biol.* *23*, 3352-3362.
- Tkachuk,D.C., Kohler,S., and Cleary,M.L. (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* *71*, 691-700.
- Trewick,S.C., McLaughlin,P.J., and Allshire,R.C. (2005). Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep.* *6*, 315-320.
- Trojer,P. and Reinberg,D. (2006). Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. *Cell* *125*, 213-217.
- Tsai,J.C., Perrella,M.A., Yoshizumi,M., Hsieh,C.M., Haber,E., Schlegel,R., and Lee,M.E. (1994). Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 6369-6373.
- Tschiersch,B., Hofmann,A., Krauss,V., Dorn,R., Korge,G., and Reuter,G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* *13*, 3822-3831.
- Tsukada,Y., Fang,J., Erdjument-Bromage,H., Warren,M.E., Borchers,C.H., Tempst,P., and Zhang,Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* *439*, 811-816.
- Turner,B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* *111*, 285-291.
- Turner,B.M. (2003). Memorable transcription. *Nat. Cell Biol.* *5*, 390-393.
- Turner,B.M., Birley,A.J., and Lavender,J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* *69*, 375-384.
- Tyler,J.K. (2002). Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *Eur. J. Biochem.* *269*, 2268-2274.

- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* *402*, 555-560.
- Tyler, J.K., Bulger, M., Kamakaka, R.T., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1996). The p55 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Mol. Cell Biol.* *16*, 6149-6159.
- Umlauf, D., Goto, Y., Cao, R., Cerqueira, F., Wagschal, A., Zhang, Y., and Feil, R. (2004). Imprinting along the *Kcnq1* domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat. Genet.* *36*, 1296-1300.
- Valk-Lingbeek, M.E., Bruggeman, S.W., and van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* *118*, 409-418.
- van der Lugt, N.M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te, R.H., van, d., V, Deschamps, J., Sofroniew, M., van Lohuizen, M., and . (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.
- van Leeuwen, F., Gafken, P.R., and Gottschling, D.E. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* *109*, 745-756.
- Vaquero, A., Loyola, A., and Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowledge Environ.* *2003*, RE4.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* *419*, 624-629.
- Varga-Weisz, P.D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., and Becker, P.B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* *388*, 598-602.
- Vermaak, D., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2003). Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 266-274.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* *87*, 95-104.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1998). Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol.* *8*, 96-108.
- Visser, H.P., Gunster, M.J., Kluin-Nelemans, H.C., Manders, E.M., Raaphorst, F.M., Meijer, C.J., Willemze, R., and Otte, A.P. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *112*, 950-958.
- Vlag, J. and Otte, A.P. (1999). Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat. Genet.* *23*, 474-478.
- Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N., and Grunstein, M. (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* *408*, 495-498.
- Wade, P.A. (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 693-698.

- Wallrath,L.L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 147-153.
- Wang,G., Ma,A., Chow,C.M., Horsley,D., Brown,N.R., Cowell,I.G., and Singh,P.B. (2000). Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol. Cell Biol.* 20, 6970-6983.
- Wang,H., Wang,L., Erdjument-Bromage,H., Vidal,M., Tempst,P., Jones,R.S., and Zhang,Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.
- Wang,L., Mizzen,C., Ying,C., Candau,R., Barlev,N., Brownell,J., Allis,C.D., and Berger,S.L. (1997). Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human GCN5 and is required for complementation of growth and transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 17, 519-527.
- Waterborg,J.H. (2002). Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochem. Cell Biol.* 80, 363-378.
- Wei,Y., Mizzen,C.A., Cook,R.G., Gorovsky,M.A., and Allis,C.D. (1998). Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7480-7484.
- Weiler,K.S. and Wakimoto,B.T. (1995). Heterochromatin and gene expression in Drosophila. *Annu. Rev. Genet.* 29, 577-605.
- Wells,D.E. (1986). Compilation analysis of histones and histone genes. *Nucleic Acids Res.* 14 *Suppl*, r119-r149.
- Whetstone,J.R., Nottke,A., Lan,F., Huarte,M., Smolikov,S., Chen,Z., Spooner,E., Li,E., Zhang,G., Colaiacovo,M., and Shi,Y. (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* 125, 467-481.
- White,C.L., Suto,R.K., and Luger,K. (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J.* 20, 5207-5218.
- Wilmot,I., Schnieke,A.E., McWhir,J., Kind,A.J., and Campbell,K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wolffe,A.P. (1998). *Chromatin: Structure and Function*. Academic Press.
- Wolffe,A.P. and Matzke,M.A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286, 481-486.
- Woodcock,C.L. and Dimitrov,S. (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 130-135.
- Workman,J.L. and Kingston,R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545-579.
- Wu,K., Helzlsouer,K.J., Comstock,G.W., Hoffman,S.C., Nadeau,M.R., and Selhub,J. (1999). A prospective study on folate, B12, and pyridoxal 5'-phosphate (B6) and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8, 209-217.
- Xiao,B., Wilson,J.R., and Gamblin,S.J. (2003). SET domains and histone methylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 699-705.
- Xin,Z., Tachibana,M., Guggiari,M., Heard,E., Shinkai,Y., and Wagstaff,J. (2003). Role of histone methyltransferase G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *J. Biol. Chem.* 278, 14996-15000.

- Yamane,K., Toumazou,C., Tsukada,Y., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Wong,J., and Zhang,Y. (2006). JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* *125*, 483-495.
- Yoshida,M., Kijima,M., Akita,M., and Beppu,T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* *265*, 17174-17179.
- Zacharias,H. (1995). Emil Heitz (1892-1965): chloroplasts, heterochromatin, and polytene chromosomes. *Genetics* *141*, 7-14.
- Zegerman,P., Canas,B., Pappin,D., and Kouzarides,T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J. Biol. Chem.* *277*, 11621-11624.
- Zhang,K., Williams,K.E., Huang,L., Yau,P., Siino,J.S., Bradbury,E.M., Jones,P.R., Minch,M.J., and Burlingame,A.L. (2002). Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.* *1*, 500-508.
- Zhang,Y., Ng,H.H., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Bird,A., and Reinberg,D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* *13*, 1924-1935.
- Zhang,Y. and Reinberg,D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* *15*, 2343-2360.
- Zhimulev,I.F., Belyaeva,E.S., Bolshakov,V.N., and Mal'ceva,N.I. (1989). Position-effect variegation and intercalary heterochromatin: a comparative study. *Chromosoma* *98*, 378-387.

7. ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE

α	Anti-
anti-	Antikörper X
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS, AA	Aminosäure, Amino acid
ATP	Adenosyltriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine Serum Albumine <i>Rinderserumalbumin</i>
Ci	Curie
cpm	Counts per minute <i>Zerfälle pro Minute</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
CV	Column Volume <i>Säulenvolumen</i>
d (vor Proteinname)	Drosophila-
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTase	De-Methylase
DNA	Desoxyribonucleicacid <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ds	Double strand <i>Doppelstrang</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FCS	Fetal calf serum <i>Fötale Kälberserum</i>
H3-K9	Lysin 9 im Histon H3
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HMT, HMTase HKMTase	Histon-Methyltransferase Histon- <i>Lysin</i> -Methyltransferase
HMTase-Aktivität	Histon-Methyltransferase-Aktivität
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IVT	In vitro Translation
kbp	Kilobasenpaare
mRNA	messenger-Ribonucleicacid <i>Boten-Ribonukleinsäure</i>
MW	Molecular Weight <i>Molekulargewicht</i>
NP-40	Nonidet P-40

Abkürzungen und Begriffe

N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
PAGE	P oly a crylamid g elektrophorese
PBS	P hosphate B uffered S aline <i>Phosphat gepufferte Kochsalzlösung</i>
PCR	P olymerase C hain R eaction <i>Polymerasekettenreaktion</i>
PVDF	P oly(vinylidene difluoride)
RNA	R ibonucleicacid <i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	R evolutions p er m inute Umdrehungen pro Minute
RT	R aum t emperatur
SAM	S -Adenosyl-L-Methionin (nicht radioaktiv)
SAM*	S -Adenosyl-L-Methionin (radioaktiv* markiert)
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	S ingle strand <i>Einzelstrang</i>
TBP	T ATA- b inding- p rotein
TEMED	N,N,N',N'- T etramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	T richostatin A
wt	W ild T yp Form eines Proteins

Abkürzungen für Aminosäuren:

<i>Aminosäure</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Einbuchstabencode</i>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Imhof für die fortwährend engagierte und exzellente Betreuung meiner Dissertation sowie für jegliche fachliche und persönliche Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Becker danke ich ebenfalls herzlich für die hervorragenden Forschungsbedingungen, das beispielhafte Miteinander am Lehrstuhl, meine beständige Förderung sowie für eine Vielzahl erfolbringender Empfehlungsschreiben.

Der gesamten Imhof-Gruppe gilt mein Dank für die schöne Zeit im Labor und darüber hinaus. Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Birgit Czermin bedanken: Im Jahre 2001/02 hat sie zusammen mit Prof. Dr. Axel Imhof einen jungen Medizinstudenten in den ersten Monaten mit Engelsgeduld an das „Neuland Labor“ herangeführt.

Prof. Dr. Gustav Klobeck möchte ich für die stete Hilfe bei PC-Problemen und für die netten Gespräche danken.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Molekularbiologie gilt an dieser Stelle ein ‚Dankeschön‘ für die angenehme und teils sehr interkulturelle Atmosphäre. Die Offenheit zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen und die damit einhergehende konstant große Hilfsbereitschaft sorgten für ein ausgesprochen angenehmes Arbeitsklima.

Meinem Bruder Ingo, meinen Freunden und meiner Familie sei für Rat, gute Gespräche und die Geduld gedankt, die sie mir insbesondere in kraftzehrenden Zeiten entgegengebracht haben.

Meinen Eltern möchte ich sagen:

Danke für alles, was Ihr für mich seid,
für alles, was Ihr mir gegeben und für mich getan habt.

9. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Name: Volker Thomas Friedrich Seitz
Geburtsdatum: 30. März 1979
Geburtsort: München
Bekenntnis: rk

SCHULLAUFBAHN UND ZIVILDIENTST:

1989 – 1996 Staatliches Gymnasium Gröbenzell, Landkreis Fürstentfeldbruck
1996 – 1998 Kollegstufe, Karlsgymnasium, München-Pasing
1998 – 1999 Zivildienst im städt. Alten- und Servicezentrum, München

STUDIUM UND FACHARZTAUSBILDUNG:

10/1999 Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/2002 1. Staatsexamen
03/2005 2. Staatsexamen
2005 – 2006 Praktisches Jahr; DAAD-Stipendiat (Jahresstipendium)
1. Terial: Innere Medizin, PJ-Programm der Med. Kliniken 2 UND 3,
Universitätsklinikum Großhadern, LMU
2. Terial: Anästhesiologie, University of Newfoundland UND
University of Saskatchewan, Kanada
3. Terial: Chirurgie/ Traumatologie, Groote Schuur Hospital UND
G.F.Jooste Hospital, University of Cape Town (UCT), Südafrika
05/2006 3. Staatsexamen
09/2006 Assistenzarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Universitätsklinikum Heidelberg

DISSERTATION UND PROMOTIONSSTUDIUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN:

03/2001 Praktikum, Lehrstuhl für Molekularbiologie, Adolf-Butenandt-Institut
Seit 11/2001 Dissertation, Adolf-Butenandt-Institut, Med. Fakultät der LMU München
Lehrstuhl für Molekularbiologie, Prof. Dr. Peter Becker
Betreuung durch Prof. Dr. Axel Imhof
SoSe 2003 Forschungssemester am Lehrstuhl für Molekularbiologie
2002 – 2003 Promotionsstudium Molekulare Medizin, FöFoLe-Programm (Förderung
von Forschung und Lehre) der Medizinischen Fakultät der LMU