

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut,
Lehrstuhl für Molekularbiologie,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Peter B. Becker

**Analyse von posttranslationalen Histonmodifizierungen
und Chromatin-Effektorproteinen während Mitose und Apoptose**

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

vorgelegt von
Roman Anton Rotzinger

aus
Freiburg im Breisgau

2013

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Peter B. Becker

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Markus Rentsch
Prof. Dr. rer. nat. Michael Schleicher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Sandra B. Hake

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag, den 02.05.2013

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Erbinformation und ihre Organisation im eukaryotischen Zellkern.....	1
1.1.1 Die Funktion der DNA und der Ablauf der Proteinbiosynthese	1
1.1.2 Die Organisation der DNA in Chromatin und der Zellzyklus	2
1.1.3 Der Aufbau des Nukleosoms und die kanonischen Histone.....	3
1.2 Posttranslationale Histonmodifizierungen und der Histon-Code	6
1.2.1 Histonmodifizierungen und Chromatin-Effektorproteine.....	6
1.2.2 Der Histon Code und die Modifizierung H3K79me3.....	7
1.3 Histonvarianten und Varianten-spezifische Histonmodifizierungen	8
1.3.1 Histonvarianten und ihre Bedeutung für das Chromatin	8
1.3.2 H3-Varianten und Varianten-spezifische Modifikationen	9
2 FRAGESTELLUNGEN.....	10
2.1 Biochemische Untersuchung Zellzyklus- und Varianten-spezifischer Histon- Phosphorylierungen durch Gel-Elektrophorese Verfahren	10
2.1.1 Ableitung der Fragestellung	10
2.2 Die putative Mitose-spezifische Doppelmodifizierung Lysin 79 Trimethylierung und Threonin 80 Phosphorylierung auf Histon H3.....	10
2.2.1 Ableitung der Fragestellung	10
2.2.2 Vorarbeiten	11
2.3 Charakterisierung und Phänotypisierung der Phosphorylierung von Serin 31 auf H3.3	12
2.3.1 Ableitung der Fragestellung	12
2.3.2 Vorarbeiten	13
3 MATERIAL	14
3.1 Labor und Verbrauchsmaterialien	14
3.2 Geräte.....	15

3.3	Chemikalien und Reagenzien.....	16
3.4	Kits und Fertigbausätze	18
3.5	Enzyme und Substrate	18
3.6	Puffer und Lösungen.....	19
3.7	Oligonukleotide, Primer und Plasmide	19
3.8	Peptide und Proteine	20
3.9	Primär-, Sekundärantikörper und Farbstoffe.....	20
3.10	Kultur-, Nährmedien und Zusätze.....	21
3.11	Bakterien- und Zelllinien.....	21
4	METHODEN	22
4.1	Zellbiologische Methoden.....	22
4.1.1	Kultivierung von Bakterien	22
4.1.2	Kultivierung von HeLa-Zellen.....	23
4.1.3	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	26
4.1.4	Durchflusszytometrie.....	27
4.2	Biochemische Methoden	28
4.2.1	Säurefällung von Histonen	28
4.2.2	Agarosegel-Elektrophorese	28
4.2.3	Acrylamidgel-Elektrophorese	29
4.2.4	Proteinfärbung.....	31
4.2.5	Westernblot-Analyse.....	32
4.2.6	ELISA	33
4.2.7	Peptide-Array Assay	34
4.2.8	Peptide-Competition Assay.....	34
4.3	Massenspektrometrische Methoden.....	35
4.3.1	Massenspektrometrie	35
4.3.2	Analyse in der MALDI-ToF MS.....	36
4.3.3	Analyse in der Orbitrap MS/MS.....	37
4.4	Molekularbiologische Methoden	37
4.4.1	Amplifikation und gezielte Veränderung von Zielgenen	37
4.4.2	Expression/Assemblierung von Mononukleosomen <i>in vitro</i>	39
4.4.3	Gewinnung und Aufreinigung von Mononukleosomen <i>in vivo</i>	40
5	ERGEBNISSE	43
5.1	Biochemische Untersuchung Zellzyklus- und Varianten-spezifischer Histon- Phosphorylierungen durch Gel-Elektrophorese Verfahren	43
5.2	Die putative Mitose-spezifische Doppelmodifizierung Lysin 79 Trimethylierung und Threonin 80 Phosphorylierung auf Histon H3.....	45
5.2.1	Massenspektrometrische Untersuchungen zur Identifizierung einer Doppelmodifizierung H3K79me3T80ph <i>in vivo</i>	47

5.2.2	Massenspektrometrische Analyse zum Nachweis von H3T80ph <i>in vivo</i>	49
5.2.3	Re-Evaluation der Antikörperdaten und Kartierung des exakten Epitops	51
5.3	Charakterisierung und Phänotypisierung der Phosphorylierung von Serin 31 auf der Histonvariante H3.3	54
5.3.1	Expression von mutierten Histon H3 Varianten	55
5.3.2	Durchflusszytometrische Phänotypisierung von HeLa Zelllinien, die HA-H3.1 und -H3.3 Mutanten exprimieren.....	57
5.3.3	Wachstums-/Proliferationsphänotypisierung von Serin 28 Histon H3 und Serin 31 Histon H3.3 Mutanten durch Zellzählung und CFSE-Färbung.....	59
5.3.4	Identifizierung potentieller Kinasen von H3.3S31ph	61
5.3.5	Etablierung eines Systems zur Charakterisierung der Interaktion der Aminosäure Serin 31 von Histon H3.3 mit Effektorproteinen <i>in vitro</i>	64
6	DISKUSSION	66
6.1	Interpretation der per Gel-Elektrophorese Verfahren identifizierten Zellzyklus- und Variantenspezifischen Bandenmuster	66
6.2	Mögliche Gründe für einen frustrierten Nachweis sowie Re-Evaluation der Hypothese einer Doppelmodifizierung H3K79me3T80ph <i>in vivo</i>	67
6.3	Charakterisierung bzw. Phänotypisierung der PTM H3.3S31ph sowie Literaturvergleich identifizierter, potentieller Proteinkinasen	69
7	AUSBLICK	72
7.1	Senkung der Detektionsschwelle zur Identifikation Zellzyklus- und Variantenspezifischer PTMs und MS Analyse der Proteinfractionen	72
7.2	Analysen zum Nachweis von H3K79T80ph außerhalb von Mitose und Apoptose und Identifizierung von Chromatin-Effektorproteinen	73
7.3	Weiterführende Charakterisierung von H3.3S31ph, Untersuchung identifizierter Proteinkinasen und Chromatin-Bindestudien <i>in vitro</i>	74
8	ZUSAMMENFASSUNG	77
	LITERATURVERZEICHNIS	79
	ANHANG	A
	LEBENS LAUF	E
	DANKSAGUNG	G

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Organisation des eukaryotischen Chromatins und epigenetische Modifizierungen.	5
Abb 1-2.: Aminosäuresequenz und PTMs von Histon H3 sowie deren Proteinbindungsstellen.....	7
Abb. 1-3: Bekannte menschliche Histone und Sequenzen der H3-Varianten mit bekannten PTMs.....	9
Abb. 2-1: Spezifitätstestung des α -H3K79me3T80ph Antikörpers.	11
Abb. 2-2: Die Varianten-spezifische Phosphorylierung von Serin 31 in Histon H3.3.	12
Abb. 4-1: DNS Längenstandard (NEB 100bp Leiter).....	28
Abb. 4-2: Protein-Größenstandard (peqGold Marker V).....	29
Abb. 4-3: Aufbau einer 2D-T/A/U-PAGE.....	31
Abb. 4-4: Aufbau eines Westernblots.....	32
Abb. 5-1: Untersuchung Zellzyklus- und Varianten-spezifischer PTMs mittels PAGE-Verfahren.....	44
Abb. 5-2: IF Vergleich der Antikörpersignale von α -H3S10ph und α -H3K79me3T80ph.	46
Abb. 5-3: Nachweisgrenze von H3(74-83)K79me3T80ph Peptiden in der MALDI-ToF MS.....	48
Abb. 5-4: Versuchter Nachweis von H3K79me3T80ph in vivo durch MALDI-ToF MS.....	50
Abb. 5-5: Re-Evaluation und exakte Epitop-Kartierung des Antikörpers α -H3K79me3T80ph.....	53
Abb. 5-6: IF Untersuchung von α -H3S31ph während verschiedener Mitose-Phasen.....	55
Abb. 5-7: IF Untersuchung der Expression von HA-H3.1S28/H3.3S31-Mutanten in HeLa Zellen.....	56
Abb. 5-8: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen von H3-Mutanten-exprimierenden Zellen.....	58
Abb. 5-9: Wachstumsgeschwindigkeiten und Proliferationszeiten von H3S28/H3.3S31 Mutanten	60
Abb. 5-10: Identifizierung potentieller Kinasen von H3.3S31ph.....	62
Abb. 5-11: Nachweis von in E. coli exprimierten, rekombinanten humanen Histonen.....	64
Abb. 8-1: Genetische Kodierung der Aminosäuren.....	A
Abb. 8-2: Aminosäuresequenz des humanes Histons H1.....	B
Abb. 8-3: Aminosäuresequenz des humanen Histons H2A.....	B
Abb. 8-4: Aminosäuresequenz des humanen Histons H2B.....	B
Abb. 8-5: Aminosäuresequenzen der humanen Histone H3.1, H3.2 und H3.3.....	B
Abb. 8-6: Aminosäuresequenz des humanen Histons H4.....	B
Abb. 8-7: pET21(+) Vektorkarte.....	C
Abb. 8-8: pIRESneo Vektorkarte.....	C

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3-1: Zusammensetzung PBS-Puffer, 10x	19
Tab. 3-2: Zusammensetzung (T/A/U)-Ladepuffer	19
Tab. 3-3: Zusammensetzung TBE-Puffer	19
Tab. 3-4: Zusammensetzung SDS-Ladepuffer, 5x	19
Tab. 3-5: Zusammensetzung SDS-Laufpuffer, 10x	19
Tab. 3-6: Zusammensetzung TBS-Puffer	19
Tab. 3-7: Verwendete Primer	19
Tab. 3-8: Verwendete Oligo- und Polypeptide	20
Tab. 3-9: Verwendete Primärantikörper	21
Tab. 3-10: Verwendete Sekundärantikörper (Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelt)	21
Tab. 3-11: Verwendete Sekundärantikörper (Merettich-Peroxidase-gekoppelt)	21
Tab. 3-12: Verwendete Bakterien- und Zelllinien	21
Tab. 4-1: Verwendete Antibiotikakonzentrationen	22
Tab. 4-2: Verwendete Fluoreszenzmarker	27
Tab. 4-3: Verwendete Fluoreszenzmarker	27
Tab. 4-4: Zusammensetzung eines SDS-PAGels	29
Tab. 4-5: Zusammensetzung eines (T/A/U)-PAGels	30
Tab. 4-6: Verwendete Antikörperkonzentrationen	33
Tab. 4-7: Verwendeter PCR-Ansatz	37
Tab. 4-8: Verwendetes PCR-Temperaturprofil	38
Tab. 4-9: Verwendete Antibiotikakonzentrationen	39
Tab. 8-1: Übersetzung der Aminosäuren in Ein- und Dreibuchstabencode	A
Tab. 8-2: Aminosäuresequenzen und Modifizierungen der Peptide des Peptide Array Lot1160	D
Tab. 8-3: Bibliothek rekombinanter, nukleärer Kinasen	D

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	Micro
μg	Microgramm
μl	Mikroliter
μm	Micrometer
2D	Zweidimensional
53BP1	engl. P53 Binding Protein 1
A	Alanin
A/U	Essigsäure/Harnstoff (engl. <i>Acetic Acid/Urea</i>)
AgNO ₃	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C ₂ H ₃ NaO ₂	Natriumacetat
C ₂ H ₄ O ₂	Essigsäure
C ₂ H ₅ NO ₂	Glycin
C ₂ H ₆ O	Ethanol
C ₂ H ₆ OS	2-Mercaptoethanol
C ₃ H ₆ O	Aceton
C ₃ H ₈ O	Isopropanol
C ₃ H ₈ O ₃	Glycerin
C ₂ H ₃ N	Acetonitril
CaSO ₄	Anhydrit
CDC25C	engl. M-Phase Inducer Phosphatase 3
CDC42BPB	engl. CDC42-Binding Protein Kinase β
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CH ₂ O	Formaldehyd
CH ₄ O	Methanol
CH ₄ N ₂ O	HaRNAtoff
CHCl ₃	Chloroform
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Comp.	Kompetent (engl. <i>Competent</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure

DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOT1L	engl. Disruptor of Telomeric Silencing 1 - Like
DPN1	Restriktionsenzym
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure (engl. <i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	engl. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
engl.	Englisch
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal Calf Serum</i>)
fmol	Femtomol
g	Gramm
H	Histon
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dest}	Destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest}	Doppelt destilliertes Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H ₃ BO ₃	Borsäure
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HA	Hämagglutinin
HCCA	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (engl. <i>α-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid</i>)
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	engl. High Fidelity
HIRA	engl. Histone Cell Cycle Regulation Defective Homolog A
i.d.R.	in der Regel
i.R.	im Rahmen
i.S.	im Sinne
i.V.	im Verlauf
i.W.	im Wesentlichen
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRAK	engl. Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
IRES	engl. Internal Ribosomal Entry Site

KAT	Lysin-Acetyltransferasen
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KDMT	Lysin-Demethylase
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KMT	Lysin-Methyltransferase
LB-Medium	engl. Lysogeny Broth Medium
M	Molar
Mal	engl. MyD88 Adaptor-Like Protein
MALDI	engl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MNAse	Micrococcus Nuklease
mol	Mol
MRCKβ	engl. Myotonic Dystrophy Protein Kinase β
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Myc	Myelocytomatose
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat
NHGRI	engl. National Human Genome Research Institute
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OPD	engl. O-Phenylenediamine Dihydrochloride
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAA	engl. Peptide Array Assay
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBS-T	engl. PBS-Tween20
PCA	engl. Peptide Competition Assay
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pg	Picogramm

PIM1	engl. Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase 1
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Protease-/Phosphatase Inhibitor
PRMT	Arginin-Methyltransferase
PTM	Posttranslationale Histonmodifizierung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNaseA	Ribonuklease A
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleic Acid</i>)
ROCK2	engl. Rho Kinase 2
RP-HPLC	engl. Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunde
Sir	engl. Silent Information Regulator
sog.	sogenannt
T	Threonin
T/A/U	Triton/Essigsäure/HaRNAtoff (engl. <i>Triton/Acetic Acid/Urea</i>)
TBE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	engl. Tris-Buffered Saline
TBS-T	TBS-Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (engl. <i>Trifluoro Acetic Acid</i>)
TLR	Toll-Like Rezeptor (engl. <i>Toll-Like Receptor</i>)
ToF	Flugzeit (engl. <i>Time of Flight</i>)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (engl. <i>Transfer Ribonucleic Acid</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
v	Version
Vd	Verdünnung
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
x	Vielfaches
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
xH3	Xenopus Histon H3

1 EINLEITUNG

1.1 Die Erbinformation und ihre Organisation im eukaryotischen Zellkern

1.1.1 Die Funktion der DNA und der Ablauf der Proteinbiosynthese

Die Entschlüsselung der Erbinformation hat wesentlich zum Verständnis der Biologie der belebten Natur beigetragen. Sie bestimmt neben der Proteinstruktur der Organismen auch zu weiten Teilen deren Organisation und Interaktion mit der Umwelt¹. Die Erbinformation liegt ubiquitär in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) vor, bestehend aus den Nukleinbasen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T), die über ein Desoxyribose-Phosphat-Gerüst verknüpft sind (siehe Abb. 1-1 A). Durch Anlagerung eines zweiten, komplementären Stranges entsteht eine räumliche Doppelhelix-Struktur, mit Ausbildung sich stabilisierender Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den sich jeweils gegenüberliegenden Nukleinbasen $A = T$ bzw. $C \equiv G$ ². Jeweils drei Nukleinbasen (sog. Triplets) kodieren dabei in ihrer Kombination für eine Aminosäuren (AS). Eine AS kann hingegen von verschieden aufgebauten Triplets kodiert werden (siehe Anhang A). Dieser genetische Code ist für alle Organismen universell. Die Gesamtheit der für ein Protein kodierenden Nukleinbasen inklusive der regulatorischen Region (Promotor- und Enhancer-Region) nennt man ein Gen³.

Die Übersetzung von Genen in Proteine wird durch verschiedene enzymatische Schritte ermöglicht. Nach dem Auseinanderweichen der DNA-Doppelstränge, katalysiert durch sog. Helikasen⁴, synthetisieren RNA-Polymerasen zur originären DNA-Sequenz komplementäre Einzelstränge aus Ribonukleinsäure (RNA), man spricht von Transskription³. RNA unterscheidet sich von DNA i.W. durch eine Ribose anstelle der Desoxyribose, sowie der Nukleinbase Uracil (U) anstelle Thymin (T). Die Übersetzung dieser sog. Boten-RNA (mRNA) in Proteine erfolgt über Anlagerung von Ribosomen durch Rekrutierung von Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs)⁵. Für ein mRNA-Triplet existiert eine zugeordnete tRNA, welche mit einer definierten AS verbunden ist (siehe Anhang A). Durch sequentielle Anlagerung an tRNA gekoppelter AS (sog. Translation) entstehen Peptide und Proteine⁶.

Ähnlich findet während der Zellteilung die Verdopplung der Erbinformation statt (sog. Replikation). Nach Auftrennung des DNA-Doppelstranges kommt es zur Anlagerung von DNA-Polymerasen⁷. Diese rekrutieren einzelne Desoxyribonukleotide und verknüpfen sie unmittelbar zu neuen DNA-Strängen⁸. Fehlerhaft gepaarte Nukleotide werden durch eine Lesekorrektur-Funktion der DNA-Polymerase erkannt, korrigiert und korrekt gepaarte Nukleotide miteinander verbunden⁹. Auf diese Weise synthetisierte DNA-Stücke werden durch Ligasen miteinander verknüpft und gegen Ende der Zellteilung schließlich auf die entstehenden Tochterzellen aufgeteilt⁸.

Organismen unterscheiden sich in Ihrem Zellaufbau grundlegend. Insbesondere sind pro- von eukaryontischen Zellen zu unterscheiden. Prokaryonten besitzen keinen Zellkern. Sie organisieren

ihre DNA in Ringstrukturen, dem sog. Nukloid bzw. in zytosolischen Plasmid-Strukturen. Bei der prokaryotischen Proteinbiosynthese finden Transkription und Translation unmittelbar aufeinanderfolgend statt¹⁰. Bei Eukaryonten ist die DNA hingegen im Zellkern lokalisiert. Nur wenige Plasmid-ähnlich organisierte Gene finden sich auch bei Eukaryonten in den Mitochondrien. Transkription und Translation sind räumlich und zeitlich voneinander getrennt. Die Transkription findet im Zellkern, die Translation im Zytosol statt¹¹.

1.1.2 Die Organisation der DNA in Chromatin und der Zellzyklus

Die Lokalisation der DNA im Zellkern bedingt bei Eukaryonten die Ausbildung höherer Strukturen, das sog. Chromatin. Es ermöglicht die gleichermaßen komplexe Verdichtung der DNA und die gezielte Steuerung der Aktivität der einzelnen Gene¹². Chromatin unterteilt sich weiter in verschiedene Chromosomen. Der Mensch besitzt beispielsweise 22 Autosomen (Chromosom 1 bis 22) und zwei Gonosomen (Chromosom X bzw. Y). Autosomen liegen homolog, d.h. in doppelter Abschrift vor, Gonosomen liegen, je nach Geschlecht als XX (weiblich) bzw. XY (männlich) vor¹³. Das zweite X-Chromosom wird beim Menschen im weiblichen Organismus inaktiviert. Die Gesamtheit der Chromosomen eines Organismus nennt man den Karyotypen (46XX, bzw. 46XY). Chromosomen unterteilen sich weiter in Chromatiden, wobei je nach Zellzyklus ein oder (zur Zellteilung) zwei Chromatiden vorliegen können¹⁴.

Die Chromatin-Struktur ist abhängig vom Zellzyklus. Die Interphase bezeichnet den Zeitraum zwischen letzter und nächster Kernteilung. Sie beginnt mit der G₁-Phase, welche unmittelbar an eine abgelaufene Zellteilung (die sog. Mitose) anschließt. Hier bestehen Chromosomen aus jeweils einem Chromatid in lockerer Struktur. Die G₁-Phase (engl. *Gap-Phase*) stellt den Zeitabschnitt der Proteinbiosynthese dar. Sie kann in die G₀-Phase übergehen, aus der i.d.R. keine weitere Zellteilung mehr erfolgt, oder in die S-Phase (Synthese-Phase)¹⁴. In der S-Phase kommt es zur Verdoppelung des DNA-Gehaltes der Zelle zur Replikation, weshalb die beiden Chromatiden ab der S-Phase am Zentromer verbunden in doppelter Abschrift vorliegen (sog. Schwester-Chromatiden). An die S-Phase schließt sich die G₂-Phase an, aus der die Zelle von der Interphase in die Mitose übertritt⁸.

Zur Interphase unterteilt sich Chromatin in zwei Zustände, Eu- und Heterochromatin. Euchromatin besteht aus aufgelockerten Bereichen von DNA und ermöglicht einen einfachen Zugang. In euchromatischen Bereichen des Chromatins befinden sich folglich die meisten aktiven Gene¹⁵. Heterochromatin besteht hingegen aus verdichteten DNA-Abschnitten mit wesentlich geringerer Genaktivität. Heterochromatin kann weiter in konstitutives und fakultatives Heterochromatin unterschieden werden. Konstitutives Heterochromatin kommt v.a. in Regionen repetitiver DNA-Sequenzen vor, die kompakt strukturiert sind, und i.d.R. nicht in Euchromatin übergehen. Fakultatives Heterochromatin tritt nicht konsistent auf und kann je nach Regulation in Euchromatin mit gesteigerter Genaktivität übergehen¹⁶. Das Verhältnis Eu-/Heterochromatin ist vom Grad der Zelldifferenzierung abhängig, weshalb funktionsbedingt i.V. der Zelldifferenzierung der Anteil an transkriptionell inaktivem Heterochromatin zunimmt.

Während der Mitose kommt es zu einer starken Verdichtung des Chromatins und zur Aufteilung der Erbinformation auf die Tochterzellen. Zu Beginn der Mitose, in der Prophase, wandern die Zentrosomen an zwei entgegengesetzte Pole des Zytosols. Sie bilden Zentriolen und später den Spindelapparat aus. Dieser regelt die gleiche Auftrennung des Chromatins auf die beiden Tochterzellen. In der Prometaphase kommt es zum Zerfall der Kernhülle, der Spindelapparat dringt von beiden Zellpolen in das Nukleoplasma ein und bindet an die Zentromere der einzelnen Chromosomen. Während der Metaphase kondensieren die Chromosomen maximal. Durch Verkürzung der Spindel entsteht Zug auf die Chromosomen, der sie gegen Ende der Metaphase in einer äquatorialen Ebene, der Metaphasenplatte, anordnet. Zur Anaphase werden die Chromatiden eines Chromosoms schließlich durch den Spindelapparat in die entgegengesetzten Pole des Zytosols gezogen und getrennt, bevor sie in der Telophase wieder dekondensieren und sich die Kernhülle wieder aufbaut. Mit Abschnüren des Zytoplasmas in der Zytokinese entstehen zwei neue Tochterzellen, die Mitose wird verlassen und die Zelle geht in die Interphase über¹⁴.

Eine weitere Phase des Zellzyklus ist die sog. Apoptose, der programmierte Zelltod. Diese Phase unterscheidet sich von der Nekrose durch gezielte Einleitung des Zelluntergangs, wobei umliegende Zellen verschont werden. Es kommt zum Schrumpfen der Zelle und zum proteolytischen Abbau von Zellbestandteilen durch Caspasen. Endonukleasen degradieren das Chromatin und führen zu einem geregelten Abbau von DNA¹⁷. Die Apoptose kann beispielsweise zur Kontrolle von Zellzahl bzw. der Größe von Geweben, beim Ablauf von Differenzierungsprozessen, zur Einschränkung von DNA-Schäden oder zur Eliminierung entarteter Zellen eingeleitet werden¹⁷. Das Signal zur Apoptose kann dabei von außen oder durch die Zelle selbst ausgehen. Insbesondere zwischen einzelnen Phasen des Zellzyklus existieren Kontrollinstanzen, welche eine korrekte DNA-Vervielfältigung gewährleisten sollen, und die Apoptose einleiten können, z.B. wenn es während der Replikation zu schwerwiegenden Mutationen kommt. Mutationen können auch außerhalb der Replikation auftreten, entweder spontan oder durch äußere Einflüsse, wie z.B. durch ionisierende Strahlung, was ebenfalls Apoptose zur Folge haben kann¹⁸. Die Nekrose hingegen stellt einen unkoordinierten Zelltod dar, ohne gezielte Steuerung und häufig verbunden mit deutlicher Schädigung benachbarter Zellen. Organellen und Zytosol werden extrazellulär freigesetzt, was zu einer lokalen Entzündung führt¹⁹.

1.1.3 Der Aufbau des Nukleosoms und die kanonischen Histone

Um die flexible Organisation der DNA zu ermöglichen, ist wie bereits angedeutet ein komplexer Aufbau des Chromatins nötig. Die kleinste Einheit des Chromatins, das sog. Nukleosom, setzt sich aus DNA und verschiedenen Proteinen zusammen. Eine zentrale Rolle spielen Histonoktamere, welche jeweils aus zwei H2A/H2B-Dimeren und einem H3/H4-Tetramer bestehen. Sie bilden eine flachzylindrische Struktur von etwa 11nm Durchmesser. Alle Histonproteine sind stark basische Proteine, die mit den negativen Ladungen der Phosphatgruppen im DNA-Grundgerüst Ionenbindungen eingehen. Die DNA-Doppelhelix legt sich dabei über eine Länge von 146 bp in 1,65 Windungen an ein Histonoktamer an, was die kompakte Struktur des Chromatins ermöglicht und gleichzeitig die Struktur des Nukleosoms stabilisiert²⁰. Die DNA-Abschnitte zwischen zwei

Nukleosomen nennt man Linker-DNA. Sie umfassen beim Menschen zwischen 50 und 60 bp. Durch Anlagerung weiterer Proteine (z.B. des Linkerhistons H1) kommt es zur weiteren Stabilisierung des Komplexes und zur Ausbildung höherer Strukturen, wie z.B. der Solenoid-Faser (30nm Durchmesser) und letztlich dem Chromosom¹⁵.

Nukleosomen sind keine statischen Elemente. Erst ihr hochvariabler Aufbau ermöglicht eine von der Basenabfolge des DNA-Moleküls weitgehend unabhängige und dennoch gezielte Beeinflussung der Aktivität von Genen. Man spricht von Epigenetik²¹. Epigenetische Veränderungen (im weiteren Sinne) können auf allen Ebenen des Chromatins erfolgen. Direkte DNA-Methylierungen sind ebenso bekannt wie Veränderungen auf Ebene der Histone, z.B. posttranslationale Histonmodifizierungen (PTMs), Histonvarianten, Interaktionen mit energieabhängigen Proteinkomplexen (sog. *Remodeler*-Komplexe) oder regulatorische RNA-Moleküle¹⁵. Im engeren Sinne handelt es sich insbesondere bei DNA-Methylierungen um epigenetische Veränderungen, da diese über die Mitose auch auf Tochterzellen bzw. über die Reifeteilung der Zelle (die sog. Meiose) auf Tochterindividuen vererbt werden können²⁵. Im Genom finden sich regionale Unterschiede im Methylierungsmuster der mütterlich- und väterlicherseits vererbten Chromatide, man spricht von Imprinting²².

DNA-Methylierungen kommen bei fast allen Eukaryonten vor. Sie finden ausschließlich an der Nukleosidbase Cytosin (C) und vornehmlich in Nachbarschaft zu Guanin (G), an sog. CpG-Inseln, statt²³. Finden sich regional viele DNA-Methylierungen, beispielsweise in CpG reichen Promotor-Abschnitten, führt dies i.d.R. zu transkriptioneller Inaktivierung der Genregion. DNA-Methylierungen können zum Einen Anlagerung bestimmter Transkriptionsfaktoren verhindern und indirekt die Transkription einzelner Gene unterdrücken. Zum Anderen können spezifische Repressor-Proteine rekrutiert werden, welche eine Inaktivierung der Gene aktiv herbeiführen²⁴. DNA-Methylierungen sind hochdynamische epigenetische Modifizierungen, unterscheiden sich zwischen einzelnen Zelltypen und ändern sich während der Zellentwicklung. Sie spielen neben der Genregulation auch eine Rolle in der Zelldifferenzierung, der X-Inaktivierung, sowie der Zellalterung²³.

Remodelern, welche unter Verbrauch des Energieäquivalents Adenosintriphosphat (ATP) DNA-Histon-Interaktionen auflockern können, ist gemeinsam, dass sie einzelne Nukleosomen entlang des DNA-Moleküls verschieben, einsetzen bzw. entfernen können. So wird die Zugänglichkeit zum jeweiligen DNA-Abschnitt und die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren beeinflusst²⁶. Je nach Proteinkomplex kann der Zugang zur DNA erleichtert oder erschwert werden und resultiert entsprechend in einer Steigerung oder Reduktion der Genaktivität²⁷. Man unterscheidet die ATP-abhängigen Proteinkomplexe i.W. nach ihrer ATPase-Untereinheit in vier verschiedene Untergruppen (ISWI, SWI/SNF, CHD und INO80)²⁸.

Auf Ebene der Histone können AS durch Enzyme gezielt chemisch modifiziert werden. Diese PTMs sind mit einer Vielzahl von Funktionen assoziiert und stark von den jeweiligen PTMs, deren Lage im Protein, sowie dem zeitlichem Auftreten im Zellzyklus abhängig²⁹. Darüber hinaus gibt es aus verschiedenen Histonvarianten aufgebaute Histonoktamere. Obgleich Histone evolutionär stark

konservierte Proteine sind, wird jedes Histon mit Ausnahme von Histon H4, in verschiedenen Varianten exprimiert. H1, H2A, H2B, H3 und H4 werden in Abgrenzung zu diesen Varianten auch als kanonische Histone bezeichnet. Kanonische Histone und ihre Varianten können sich in einzelnen AS bis hin zu ganzen Proteindomänen unterscheiden. Histonvarianten sind schließlich ähnlich den kanonischen Histonen mit unterschiedlichen Funktionen bzw. Chromatinzuständen assoziiert³⁰. Sie können durch ihre vom kanonischen Histon abweichende AS-Sequenz differenziell modifiziert werden oder beispielsweise unterschiedliche Remodeler- oder Effektor-Proteine rekrutieren³¹.

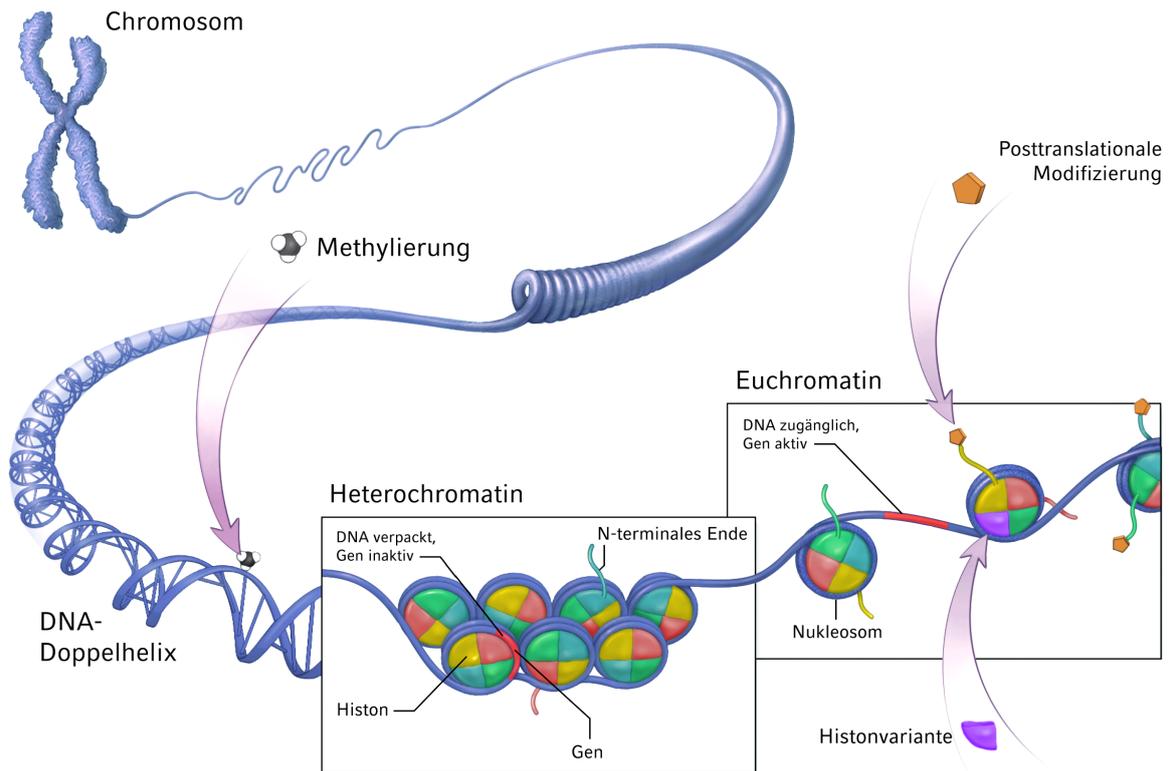


Abb. 1-1: Organisation des eukaryotischen Chromatins und epigenetische Modifizierungen.

Darstellung der Organisation der Erbinformation (DNA) in eukaryontischen Zellen. Zu erkennen ist die DNA-Doppelhelix als Träger der Erbinformation. Die DNA bildet durch Anlagerung verschiedener Histon-Proteinen Nucleosomen, die wiederum höhere Strukturen ausbilden. Dargestellt sind außerdem sich je nach dem Grad der Dichte von Nucleosomen ergebende Zustände des Chromatins (Heterochromatin, Euchromatin), mit denen unterschiedliche Aktivitäten von Genen assoziiert sind, die in diesen Abschnitten enthaltenen sind. Zu erkennen sind darüber hinaus epigenetische Veränderungen der genannten Strukturen durch DNA-Methylierung, posttranslationale Histon-modifizierungen, und Histonvarianten, welche auf die jeweiligen Zustände des Chromatins und die Aktivität der einzelnen Gene Einfluss nehmen können. (Quelle: Modifiziert nach Derryl Leja, National Human Genome Research Institute).

1.2 Posttranslationale Histonmodifizierungen und der Histon-Code

1.2.1 Histonmodifizierungen und Chromatin-Effektorproteine

Es gibt eine Vielzahl an Funktionen von PTMs. Sie spielen wichtige Rollen in Replikation, in DNA-Reparaturmechanismen, in der Gen-Regulation, sowie in Apoptose, Chromatin-Kondensation und Mitose¹⁵. Modifiziert werden können AS durch verschiedene PTMs, z.B. Mono-, Di- und Trimethylierungen und Acetylierungen von Lysinen, Monomethylierungen und a-/symmetrische Dimethylierungen von Argininen³², Phosphorylierungen von Serinen, Tyrosinen und Threoninen, sowie Ubiquitylierungen, Sumoylierungen und ADP-Ribosylierungen³³.

Ogleich sich die Funktionen der PTMs stark unterscheiden können und sie von ihrer Lokalisation im Protein und dem zeitlichen Auftreten abhängig sind, werden den einzelnen PTMs bestimmte Funktionen zugeschrieben¹⁵. Acetylierungen von Lysinen und Phosphorylierungen von Serinen bzw. Threoninen sind häufig mit Aktivierung von Genen assoziiert, Sumoylierungen werden repressive Funktionen zugeschrieben. ADP-Ribosylierungen werden mit unterschiedlichen Chromatin-spezifischen Funktionen, z.B. Regulierung von DNA-Reparaturmechanismen, Chromatinalteration während der Apoptose oder dem Imprinting von Genregionen in Verbindung gebracht. Divers und stark kontextabhängig scheinen Effekte von Methylierungen und Ubiquitylierungen³⁴. Gesetzt bzw. entfernt werden PTMs von spezifischen Enzymen. Acetylierungen bzw. Deacetylierungen werden durch Lysin-Acetyltransferasen (KATs) bzw. Histon-Deacetylasen (HDACs) katalysiert. Entsprechend werden Histone durch Kinasen phosphoryliert bzw. Phosphatasen dephosphoryliert¹⁵. Mono- und Dimethylierungen von Argininen werden durch Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) gesetzt, Lysin-Methyltransferasen (KMTs) vermitteln entsprechend Mono-/Di-/Trimethylierungen von Lysinen³⁵. Methylierungen sind relativ stabil und wurden lange für irreversibel gehalten. Schließlich konnten auch hier Lysin-Demethylasen (KDMTs) identifiziert werden³⁶.

Den Funktionen verschiedener PTMs liegen unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde. PTMs können zu elektrostatischen Veränderungen an Histonen führen und die Bindung der Histone an das DNA-Molekül, die Bindung einzelner Histone innerhalb eines Nukleosoms untereinander, oder die Interaktion ganzer Nukleosomen miteinander beeinflussen³⁷. Außerdem können PTMs zu sterischen Veränderungen führen. Ein Beispiel ist die Acetylierung auf Histon H3 an Lysin 56 (H3K56ac). Diese liegt an der Außenseite des Nukleosoms zwischen Kernsequenz und flexiblem Ende. Indirekt führt sie zum Verlust der positiven Ladung des Lysinrests und zu veränderten Bindungseigenschaften an die negativ geladene DNA^{15,38}. Einen letzten Mechanismus stellt die Rekrutierung von Chromatin-Effektorproteinen dar. PTMs bilden Bindungsstellen, welche spezifisch von einzelnen Proteinen, bis hin zu enzymatischen Proteinkomplexen erkannt werden können³⁹. Je nach rekrutiertem Protein können weitere Veränderungen des Chromatins erfolgen, z.B. Einbringen zusätzlicher PTMs, DNA-Methylierungen oder ATP-abhängige Nukleosomen-Verschiebungen entlang der DNA bzw. gezielter Einbau von Histonvarianten. Effekte können sich auf die Region selbst (*cis*) oder eine im Chromatin entfernte Region (*trans*) auswirken; Eine vielfältige Vernetzung der Mechanismen wird möglich^{15,40}.

1.2.2 Der Histon Code und die Modifizierung H3K79me3

Die sog. *Histone Code Hypothesis* postuliert, dass Kombinationen von PTMs in Mustern vorliegen, welche durch Proteine erkannt und i.S. eines Codes in definierte Funktionen umgesetzt werden^{41,42}. Das Muster muss sich nicht auf einzelne PTMs beschränken, sondern kann mehrere PTMs umfassen⁴³. Die *Switch Hypothesis* postuliert, dass PTMs benachbarter AS Bindungsstellen für Effektorproteine kurzfristig verändern und so z.B. „ausschalten“ können. Insbesondere bei Methylierungen ist dies interessant, da sie relativ statisch sind und deren Effekte so direkt und regulierbar beeinflusst werden können⁴⁴. Ein Beispiel ist die Trimethylierung von Lysin 9 auf Histon H3 (H3K9me3). Sie wird durch Heterochromatin-Protein 1 (HP1) erkannt und führt zu einer Genrepression⁴⁵. Wird das benachbarte Serin 10 (H3K9me3S10ph) phosphoryliert, wird die Bindungsstelle für HP1 blockiert und die Repression aufgehoben⁴⁵. Ähnlich wird die Trimethylierung von Lysin 27 auf Histon H3 (H3K27me3) durch Polycomb erkannt (siehe Abb. 1-2). Eine Phosphorylierung von Serin 28 (H3K27me3S28ph) führt zur Blockade der Erkennungsstelle und dem Abdissoziieren des Proteins⁴⁶. H3S10ph und H3S28ph treten in der Mitose (Prophase bis späte Anaphase) auf. Ihnen werden Funktionen in der Kondensation von Chromatin zugeschrieben⁴⁷. H3S10ph wird auch in der Interphase induziert, z.B. durch Wachstumsfaktoren oder zellulären Stress (bei Aktivierung von *Immediate-early Genes*)⁴⁷. N-terminale Phosphorylierungen von H3 fungieren neben Genaktivitätsregulatoren daher vermutlich auch als Kontrollinstanzen des Zellzyklus (sog. Mitose-Marker)⁴⁸.

PTMs finden sich meist N-terminal, ragen in den intranukleären Raum hervor und sind für Proteine leicht zugänglich¹⁵. Da AS innerhalb der Proteine meist unzugänglich sind, sind nur wenige PTMs innerhalb der Kernsequenzen beschrieben. Eine solche PTM ist auf H3 das mono-/di-/trimethylierte Lysin (H3K79me)⁴⁹. H3K79me3 ist vergleichbar zu H3K9me3 und H3K27me3 von einem Threonin 80 flankiert, welches theoretisch ebenfalls phosphoryliert werden kann (siehe Abb. 1-2 A)¹⁵.

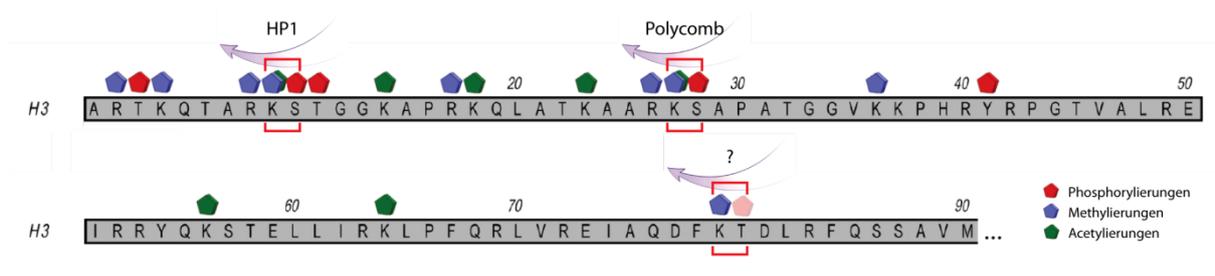


Abb 1-2.: Aminosäuresequenz und PTMs von Histon H3 sowie deren Proteinbindungsstellen.

N-terminale Peptidsequenz des humanen Histons H3 mit einigen der beschriebenen posttranslationalen Histonmodifizierungen (Phosphorylierungen, Methylierungen, Acetylierungen)^{50,51}. Roter Kasten: Bindungsstellen der Proteine HP1⁴⁵ und Polycomb⁴⁶ in Abhängigkeit der chemischen Modifizierung der jeweiligen Bindungsstellen sowie Darstellung der hierzu analogen Sequenz H3(79-80) mit einer Methylierung an Lysin 79 und einer putativen Phosphorylierung an Threonin 80.

1.3 Histonvarianten und Varianten-spezifische Histonmodifizierungen

1.3.1 Histonvarianten und ihre Bedeutung für das Chromatin

Neben den kanonischen Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 sind, mit Ausnahme von Histon H4, Histonvarianten bekannt, welche sich in der Proteinsequenz unterscheiden (siehe Abb. 1-3 A)³⁰. Histonvarianten können die kanonischen Histone im Nukleosom ersetzen und durch abweichende AS-Sequenz die Chromatinstruktur beeinflussen. Dies kann auf sterischen Strukturveränderungen des Histonoktamers oder auf Beeinflussung des Nukleosoms durch andere Proteine beruhen, z.B. aufgrund unterschiedlicher PTMs oder neueingebrachter Bindungsstellen für Effektorproteine. Möglich sind Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren, mit Chromatin-Effektorproteinen oder mit Nukleosomen. Der Einbau einer Variante in ein Oktamer ist bis heute nicht vollständig verstanden¹⁵, aber es konnte gezeigt werden, dass Varianten über spezifische *Chaperones* in Chromatin integriert werden. Diese führen die Proteine an die DNA heran und ermöglichen deren gezielten Austausch⁵².

Den einzelnen Histonvarianten werden unterschiedliche Funktionen zugerechnet. Histon H1 und seine Varianten spielen eine wichtige Rolle bei der Kondensation des Chromatins. Darüber hinaus ist das als Linkerhiston bezeichnete Histon H1 ähnlich den Kernhistonen im nukleosomalen Oktamer in Regulationsmechanismen involviert. Obgleich die Expression verschiedener H1-Varianten abhängig von Gewebe und Grad der Zelldifferenzierung ist, weisen sie eine große Redundanz auf^{53,54}.

Neben dem kanonischen Histon H2A wurden in Säugern H2A.X, H2A.Z (H2A.Z-1, H2A.Z-2), MacroH2A (MacroH2A1.1, MacroH2A1.2, MacroH2A2), sowie H2A.Bbd beschrieben^{30,55}. Sie unterscheiden sich u.a. in assoziierten Funktionen. H2A.X spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur⁵⁶. H2A.Z-Varianten, die in ihrer Sequenz in nur etwa 60% mit dem kanonischen Histon H2A übereinstimmen, werden in verschiedenen Organismen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben, insbesondere bei der Ausbildung bzw. Eingrenzung von Heterochromatin⁵⁷. Für H2A.Z-Varianten konnte eine wichtige Rolle in einem Signalweg eines Östrogenrezeptors (ERalpha) gezeigt werden, der bei Überexpression der Variante zur kritischen Proliferation menschlicher Brustkrebszellen führt⁵⁸. H2A.Bbd ist nur zu ca. 48% mit H2A identisch. Der Einbau von H2A.Bbd lockert die Chromatinstruktur, verbunden mit transkriptioneller Aktivierung. H2A.Bbd ist Testis-spezifisch und kann auf allen Chromosomen mit Ausnahme des inaktivierten X nachgewiesen werden⁵⁹. Die nur in Vertebraten nachgewiesenen Varianten MacroH2A1.1, -1.2 und -1.3 stellen die längsten und von H2A verschiedensten Varianten dar. Ihr Einbau wird stark durch DNA-Methylierung beeinflusst¹⁵. C-terminal besitzen sie eine Macrodomäne, die nicht als klassische Histonregion gilt⁶⁰. Sie spielt eine Rolle bei der ADP-Ribosylierung und Ubiquitylierung von Histonen und besitzt u.U. enzymatische Aktivität^{61,62}. Neben X-Inaktivierung und Transkriptions-Repression^{62,63} ist bekannt, dass der Einbau von humanem MacroH2A über Interaktion mit dem Onkogen (CDK8) Melanomzellen supprimiert⁶⁴.

In Säugern sind drei weitere H2B-Varianten beschrieben (hTSH2B, H2BFWT, spH2B), die Gewebespezifisch im Hoden exprimiert werden. Ihre Funktion ist bislang unbekannt⁶⁰.

1.3.2 H3-Varianten und Varianten-spezifische Modifikationen

Neben Histon H3 konnten in Säugetieren sieben Varianten identifiziert werden (CENP-A, H3.X, H3.Y, H3.1, H3.1t, H3.2, H3.3, H3.4)^{15,65}. CENP-A wird in zentromeren Nukleosomen eingebaut⁶⁶. Es besitzt ein Serin an siebter Stelle und unterscheidet sich N-terminal stark von H3. Serin 7 wird zur Mitose phosphoryliert und spielt eine Rolle in der Zytokinese⁶⁷. H3.X und H3.Y sind Primaten-spezifisch und in der transkriptionellen Regulation der Zellproliferation involviert⁶⁵. H3.1t ist spezifisch für Hodengewebe und involviert in der Chromatin-Reorganisation zur Spermatogenese¹⁵.

H3.1, H3.2 und H3.3 unterscheiden sich in nur einzelnen AS (siehe Abb. 1-3 B). H3.1 und H3.2 spielen vermutlich eine Rolle in der Repression von Genen⁵⁰. H3.3 steht in verschiedenen Organismen mit aktiver Transkription in Zusammenhang⁶⁸. H3.3 unterscheidet sich von den anderen H3-Varianten u.a. durch ein Serin an Stelle 31. Beim Menschen kann dieses Serin ähnlich wie H3S10 und H3S28 während der Mitose phosphoryliert werden, allerdings nur während der Metaphase³¹ und nur in einer Subpopulation, die direkt an die Zentromere angrenzt (siehe Abb. 1-3 B)³¹. Die Funktion dieser PTM, ihre Kinase, Phosphatase, sowie etwaige Effektorproteine sind noch unbekannt¹⁵. Denkbar wäre u.a. eine Interaktion mit für Histon H3.3 spezifischen Histon-*Chaperone*-Proteinen. Beschrieben wurde als Varianten-spezifisches Chaperone z.B. das Protein HIRA, welches spezifisch für H3.3 ist, jedoch ein anderes Epitop erkennt und daher als Effektorprotein einer Phosphorylierung von H3.3S28 nur nachrangig in Betracht kommt⁶⁹.

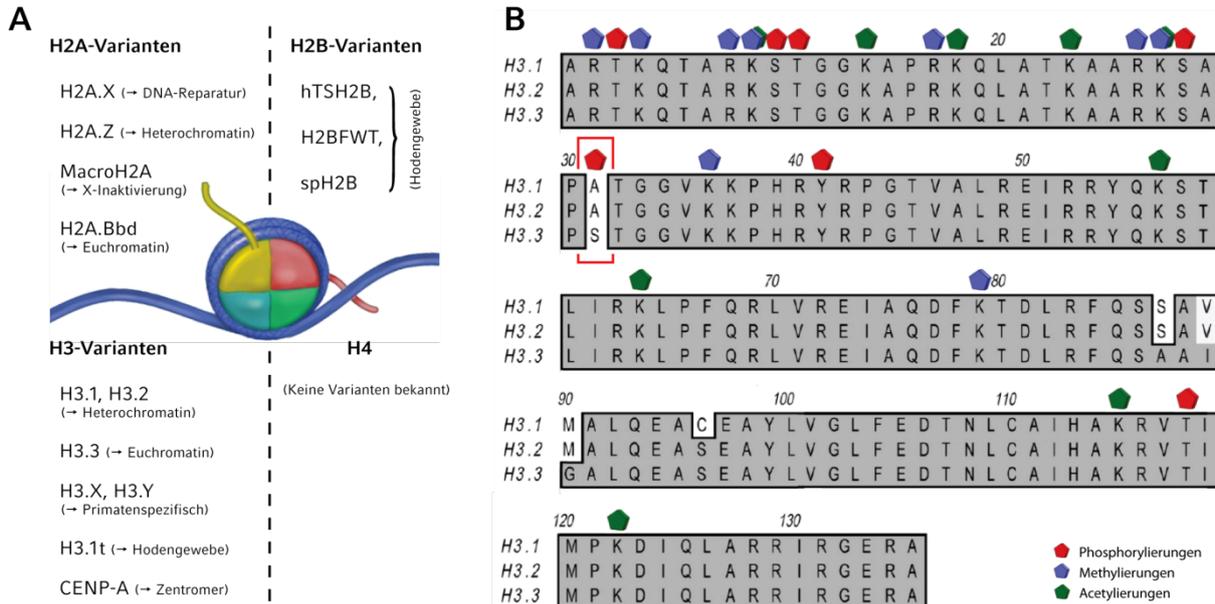


Abb. 1-3: Bekannte menschliche Histone und Sequenzen der H3-Varianten mit bekannten PTMs.

(A) Auflistung beschriebener menschlicher Histonvarianten und deren assoziierte Funktionen und spezifische Lokalisationen und Expressionsmuster^{15,65} (B) N-terminale Peptidsequenz der menschlichen Histonvarianten H3.1, H3.2, H3.3 mit einigen der bislang beschriebenen posttranslationalen Histonmodifizierungen (Phosphorylierungen, Methylierungen, Acetylierungen)^{50,51}. Roter Kasten: Varianten-spezifische Histonmodifizierung H3.3S31ph³¹

2 FRAGESTELLUNGEN

2.1 Biochemische Untersuchung Zellzyklus- und Varianten-spezifischer Histon-Phosphorylierungen durch Gel-Elektrophorese Verfahren

Um die Funktion einzelner Histone, Histonvarianten und PTMs zu untersuchen, werden in vielen Labors Histone routinemäßig über Säurefällung aufgereinigt, extrahiert und über Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) Verfahren aufgetrennt⁷⁰. Da sich diese Arbeit vorrangig mit der Untersuchung von Phosphorylierungen beschäftigt, wurden sowohl A/U-, T/A/U- als auch 2D-T/A/U-PAGE Verfahren eingesetzt⁷¹. Unterschiedlich stark acetylierte bzw. phosphorylierte Proteine können dabei über Ladungsunterschiede durch A/U-PAGE Verfahren aufgetrennt werden, da Acetylierungen positive Ladungen von Lysinresten aufheben und Phosphorylierungen negative Ladungen in Proteine einbringen⁷². Eine Auftrennung nach Varianten wird über unterschiedliche AS-Sequenzen möglich durch Anlagerung des Detergents Triton X-100 an hydrophobe Regionen, wie Cystein und Methinin reiche Regionen, in denen sich z.B. H3.1, H3.2 und H3.3 stark unterscheiden⁷⁰.

2.1.1 Ableitung der Fragestellung

Hieraus ergibt sich die Frage, ob durch Kombination von SDS-PAGE und A/U- bzw. T/A/U-PAGE Verfahren bzw. durch sequentielle Auftrennung nach Molekulargewicht und Acetylierungs- bzw. Phosphorylierungsgraden bzw. Histonvarianten⁷³ eine Identifizierung bislang unbeschriebener PTMs möglich ist. In dieser Arbeit wurden hierzu insbesondere Histone aus mitotischen und apoptotischen Zellen untersucht, da hier vorrangig mit neuen Phosphorylierungen zu rechnen ist³¹.

2.2 Die putative Mitose-spezifische Doppelmodifizierung Lysin 79 Trimethylierung und Threonin 80 Phosphorylierung auf Histon H3

Betrachtet man Sequenz und PTMs des Histons H3, so fällt in Analogie zu H3K9S10 und H3K27S28 eine Sequenz der Kernregion des Proteins auf; H3K79T80. Ähnlich zu Lysin 9 und Lysin 27 auf Histon H3 konnte auch für Lysin 79 eine (Tri-)Methylierung (H3K79me3) *in vivo* beschrieben werden⁷⁴. Darüber hinaus findet sich in unmittelbarer Abfolge auf H3K79 ein Threonin (H3T80), das theoretisch ähnlich einem Serin phosphoryliert werden kann, entsprechend H3S10ph bzw. H3S28ph.

2.2.1 Ableitung der Fragestellung

Es stellt sich vor diesem Hintergrund die Frage, ob *in vivo* eine entsprechende Doppelmodifizierung H3K79me3T80ph vorliegen kann. Bezüglich der *Switch Hypothesis* war zu untersuchen, ob im Falle einer Phosphorylierung die PTM H3T80ph, analog zu H3K9me3S10ph bzw. H3K27me3S28ph, eine Funktion i.S. eines „Schalters“ für Methylierungen des Lysin 79 innehaben könnte (siehe Abb. 1-2).

2.2.2 Vorarbeiten

Um Histon H3 immunologisch *in vivo* auf eine Phosphorylierung an Threonin 80 zu untersuchen, wurde von Frau Dr. S. B. Hake ein kommerziell erwerblicher Antikörper (α -H3K79me3T80ph) gegen das Epitop H3(74-83)K79me3T80ph eingesetzt. Unter Testung in der IF-Mikroskopie mit HeLa Zellen zeigte sich, dass α -H3K79me3T80ph spezifisch mitotische Zellen detektierte. Das Signal ähnelte in seinem Muster dem der Antikörper gegen H3S10ph und H3S28ph⁴⁷. Der Antikörper erkannte Chromatin zwischen der Pro- und Telophase der Mitose (siehe Abb. 2.1 A). Um α -H3K79me3T80ph auf seine Spezifität hin zu untersuchen und Kreuzreaktionen mit den Epitopen um H3K9me3S10ph bzw. H3K27me3S28ph möglichst auszuschließen, wurde der Antikörper mit synthetischen Peptiden (i.S. eines *Peptide-Competition* Ansatzes) getestet. Inkubation führte zur Absättigung des Antikörpers durch spezifisch erkannte Peptide. In der Folge konnte er das entsprechende Epitop in der Immunfluoreszenz bzw. im Western Blot nicht mehr binden. Umgekehrt zeigte somit ein Verbleib eines Signals eine mangelnde Spezifität gegen das inkubierte Peptid an.

α -H3K79me3T80ph detektierte im Western Blot, übereinstimmend mit Beobachtungen in der IF-Mikroskopie, nur aus Nocodazol behandelten Zellen extrahiertes Histon H3 der G₂/M-Phase (siehe Abb. 2.1 B). Histon H3 unbehandelter, asynchroner Zellen wurde nicht erkannt. In einem *Peptide-Competition* Experiment konnte kein Signalverlust bei anderen Peptiden beobachtet werden. Daraus konnte gefolgert werden, dass spezifisch H3(74-83)K79me3T80ph erkannt wurde (siehe Abb. 2-1 B).

Die Testung beschränkte sich auf trimethylierte Peptide. Sie ergab gute Voraussetzungen für weiterführende Studien. Es ergab sich ein erster Anhalt für eine für die G₂/M-Phase spezifische PTM. In folgenden Experimenten wurden daher HeLa Zellen untersucht, die zuvor mittels Nocodazol-Behandlung in der G₂/M-Phase angereichert worden waren.

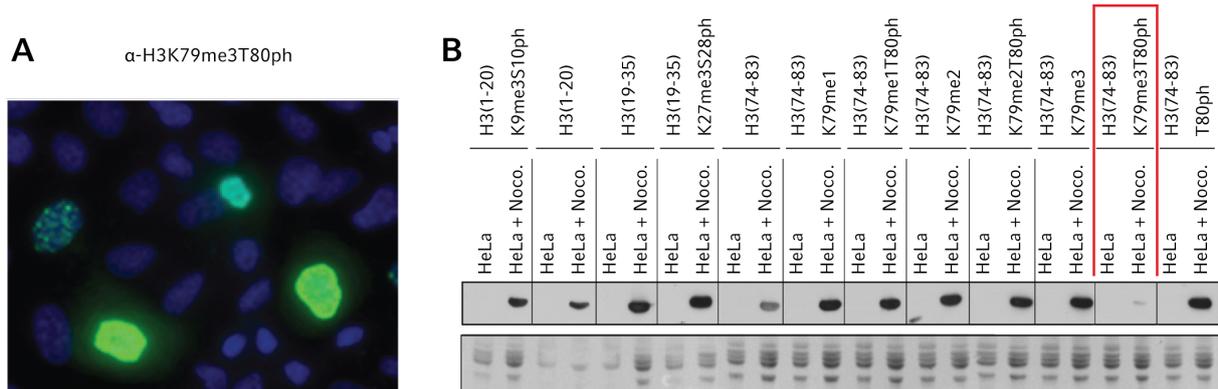


Abb. 2-1: Spezifitätstestung des α -H3K79me3T80ph Antikörpers.

(A) IF-Analyse unbehandelter HeLa Zellen von Frau Dr. S. B. Hake. Färbung der DNA erfolgte mit DAPI (blau) und α -H3k79me3T80ph (grün). (B) Westernblot Analyse eines Peptide-Competition Experiments von Frau Dr. S. B. Hake. Aufgetragen wurden säuregefällte Histone jeweils unbehandelter bzw. durch Nocodazol-Behandlung in der Mitose arretierter HeLa Zellen nach mehrstündiger Präinkubation mit synthetisch generierten Peptiden. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper α -H3K79me3T80ph (oben), bzw. als Ladekontrolle durch Ponceau-Färbung (unten). Roter Kasten: Durch den Peptide-Competition Aufbau erfolgreich verlorenes Signal.

2.3 Charakterisierung und Phänotypisierung der Phosphorylierung von Serin 31 auf Histon H3.3

Histon H3.3 besitzt an Position 31 ein Serin, eine Varianten-spezifische AS, wo Histon H3.1 bzw. H3.2 ein Alanin besitzen. Für dieses Serin konnte gezeigt werden, dass es *in vivo* während der Metaphase an den Zentromeren phosphoryliert wird (siehe Abb. 2-2)³¹.

2.3.1 Ableitung der Fragestellung

Da wenig über die funktionelle Bedeutung von H3.3S31ph bekannt ist, stellt sich die Frage, ob sie eine Rolle für die Regulation von Proliferation, Zellzyklus und/oder Zellteilung innehaben könnte. Entsprechende Interaktionen mit Proteinen i.S. von vermittelnden Effektor-Proteinen konnten bislang nicht beschrieben werden. Auch ein direkter Effekt von H3.3S31ph auf das Nukleosom, z.B. durch elektrostatische Veränderungen von H3.3, wurden noch nicht untersucht. Es konnte ebenfalls noch keine Kinase identifiziert werden, welche H3.3S31 zur Metaphase phosphorylieren kann.³¹

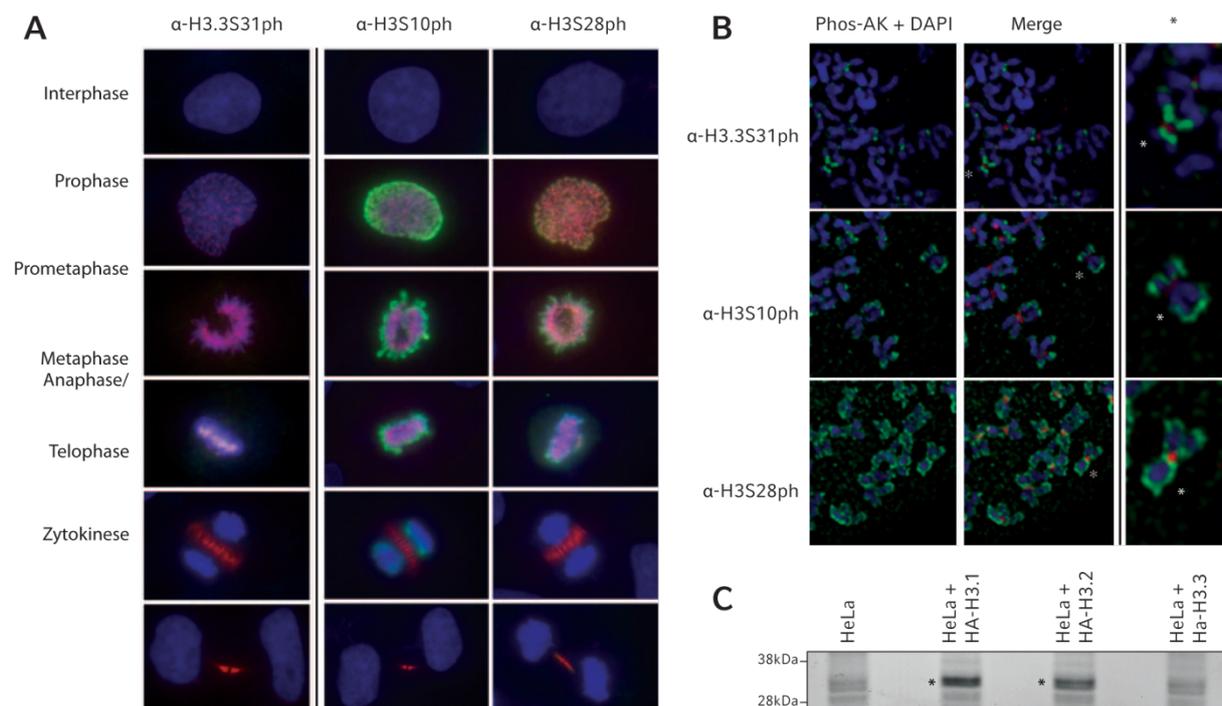


Abb. 2-2: Die Varianten-spezifische Phosphorylierung von Serin 31 in Histon H3.3.

(A) IF-Analyse von HeLa Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen. Färbung der DNA erfolgte mit DAPI (blau), der Proteinkinase Aurora B mit dem Antikörper α -AIM als Markerprotein (rot) sowie α -H3.3S31ph, α -H3S10ph oder α -H3S28ph (grün). (B) IF-Analyse von Chromosomen aus mitotischen HeLa Zellen. Dargestellt sind DANN (blau), Zentromere (α -CENP-A, rot) und α -H3.3S31ph, α -H3S10ph oder α -H3S28ph (grün). (*) Vergrößerter Bereich. (Quelle: Hake, Garcia et al. 2005) (C) Immunpräzipitation von HA-H3.1, -H3.2 oder -H3.3 Mononukleosomen und deren Bindeproteine. Gebundene Proteine wurden durch ein 15%iges SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mittels Coomassie sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurden Mononukleosomen von HeLa Zellen verwendet, die keine getaggten Histone exprimierten. Das Molekulargewicht ergab sich über gleichzeitiges Auftragen von Molekulargrößenstandards. (*) Mittels MS verifiziertes Histon H1. (Quelle: Priv. Doz. Dr. Sandra B. Hake).

2.3.2 Vorarbeiten

Um einen ersten Überblick über mögliche H3.3S31 interagierende Proteine zu gewinnen, wurde von Frau Priv. Doz. Dr. Sandra B. Hake eine *Immunpräzipitation* durchgeführt. Hierzu wurden HeLa Zellen verwendet, die stabil HA-getaggte H3.1, H3.2 oder H3.3 Varianten exprimierten. Aus diesen Zellen wurde Chromatin isoliert und zu Mononukleosomen verdaut, Über den HA-Tag war es möglich, gezielt spezifische Histone H3 Varianten-enthaltende Nukleosomen anderen Binde-faktoren zu präzipitieren.

Bei Auftrennung der gewonnenen Proben ergab sich eine stabile Bindung des Linkerhistons H1 an die Varianten H3.1 und H3.2. Diese Bindung konnte für H3.3 nicht gezeigt werden (siehe Abb. 2-2 C). Weitere Vorarbeiten deuteten auf eine potenzielle Rolle der AS Alanin 31 für die Bindung bzw. Bindungsstelle von Histon H1 hin. Im Umkehrschluss schien eine Rolle der AS Serin 31 für die Dissoziation von Histon H1 von Chromatin möglich (Daten nicht gezeigt)

Da die Rolle der Dissoziation des Linkerhistons H1 von Chromatin für die Proliferation und die Zellteilung bekannt ist^{53,54}, ergab sich zusammenfassend ein vielversprechender erster Ansatz zur Untersuchung potentieller Binde-Proteine in der Untersuchung der Interaktion von H1 und Alanin 31, Serin 31, bzw. phosphoryliertem Serin 31 auf Histon H3.

3 MATERIAL

3.1 Labor und Verbrauchsmaterialien

Einweg- und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (12mm)	Roth (D)
Einmalkanüle Neolus (1.1x40mm)	Terumo Europe (B)
Einmalspritze Omnifix 20ml	Braun (D)
Filter 500ml Bottle Top Filter	Corning Inc. (USA)
Filter Syringe 0,22µm	Millipore (USA)
Filterpapier Chromatography Paper	Whatman International (UK)
Objektträger SuperFrost®	Roth (D)
Parafilm® "M" Laboratory Film	Pechiney (USA)

Reaktionsgefäße und Kulturschalen

1,5ml Reaktionsgefäß	Sarstedt AG (D)
1,5ml MS-Reaktionsgefäß	Sarstedt AG (D)
2ml Reaktionsgefäß	Greiner (D)
15ml Röhrchen (120x17mm)	Sarstedt AG (D)
50ml Röhrchen (114x28mm)	Sarstedt AG (D)
Kryoröhrchen Cryovial sterile	Simport (CA)
Rundbodenröhrchen BD Falcon™ 5ml, Polystyrol	BD Biosciences (USA)
Gewebekulturschale (145, 200mm)	Greiner (D)
6-Loch-Gewebekulturplatte FALCON® MULTIWELL™	BD Labware (USA)
24-Loch-Gewebekulturplatte FALCON® MULTIWELL™	BD Labware (USA)
96-Loch-Platte BioBind Assembly, Streptavidin-beschichtet	Thermo Scientific (FN)
Glaßflaschen (50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1.000ml)	Duran Group (D)

Pipetten- und Pipettenspitzen

0,1-10µl Pipettenspitzen MµlTIFit Research Pipette Tips	Sorenson BioScience (USA)
10µl Pipettenspitzen Plastibrand®	Brand (D)
10µl Pipettenspitzen ZipTip™ _{µ-C18}	Millipore (USA)
20-200µl Pipettenspitzen ART®200	Molecular BioProducts (USA)
1.000µl Pipettenspitzen	Sarstedt AG (D)
Pasteurpipetten (150mm)	Carl Roth (D)
Glaspipetten (5ml, 10ml, 20ml, 25ml)	Brand (D)

Filme, Membranen und Peptide Arrays

PVDF-Membran Amersham Hybond™-P	GE Healthcare (USA)
Röntgenfilm Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF	FujiFilm Co. (JP)
Peptide MicroArray RepliTope™ Lot1160 (siehe Anhang D)	JPT Peptide Technologies (D)

Entwicklungs- und Waschlösungen

CASYTon®	Schärfe System GmbH (D)
CellWASH Lösung	BD Biosciences (USA)
BD FACST TM Shutdown Solution	BD Biosciences (USA)
BD FACST TM Flow Lösung	BD Biosciences (USA)
FACS Clean Lösung	BD Biosciences (USA)
G153 A Entwickler Flüssigkeit	AGFA-Gevaert (B)
G354 Schnellfixierbad	AGFA-Gevaert (B)

3.2 Geräte**Autoklaven, Bunsenbrenner und Destillatoren**

Bunsenbrenner Laboga7 206	CampinGaz® (FR)
Dampfsterilisator VARIOKLAV Typ 500E	HP Labortechnik (D)
Destillator PURELAB-plus	USF (D)

Brut- und Kühlschränke

-80°C Gefrierschrank Typ Nr. 6485	GFL (D)
-20°C Gefrierschrank Typ Nr. GSD11V20	Bosch (D)
4°C Kühlschrank	SIEMENS AG (D)
37°C Inkubator	Heraeus (D)
Eismaschine AF30 AS-E 230/50/1	SCOTSMAN® FRIMONT (IT)
Schüttelinkubator Multitron	Infors (D)

Entwickler, Blot- und Gelkammern

Entwickler AGFA CURIX 60 Röntgen Bender	AGFA-Gevaert (B)
Gelkammer Novex Mini-Cell	Invitrogen (USA)
Gelkammer T/A/U	Eigenherstellung
Westernblot-Kammer TRANS-BLOT® SD CELL	BIO RAD (USA)

Mikroskope, Massenspektrometer, Scanner, Spektro- und Zytometer

Durchflusszytometer BD FACSCanto TM	BD Biosciences (USA)
Infrarotscanner Odyssey®	Li-Cor Biosciences (USA)
Massenspektrometer Voyager-DE TM STR Bio-Spectrometry TM	Applied Biosystems (USA)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (D)
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss (D)
Photospektrometer Biotek TM	Biotek Instruments (USA)
Photospektrometer NanoDrop®	peQLab Biotechnologie (D)
Photospektrometer Ultrospect 2000	Pharmacia Biotech (USA)
Transilluminator	peQLab Biotechnologie (D)
Zytometer Bright-Line Hemacytometer	Hausser Scientific (USA)
Zytometer CASY®-Counter	Schärfe System GmbH (D)

Mikrowellen und Strahler

Mikrowelle IntelloWave 2,45MHz, 700W

US-Strahler Bioruptor™ 200

UV-Strahler Stratalinker 1.800

LG (ROK)

Diagenode (B)

Stratagene (NL)

Mixer, Rotatoren und Zentrifugen

Schüttler Gyrotory® Shaker-Model G2

Rotator Model-Nr. 76.000

Thermomixer 5.436

Tischzentrifuge Biofuge pico

Vakuumzentrifuge Concentrator plus

Zentrifuge 5.417 R

Zentrifuge 5.810 R

Vortex Genie 2™

New Brunswick (USA)

Labor-Brand (D)

Eppendorf AG (D)

Heraeus (D)

Eppendorf AG (D)

Eppendorf AG (D)

Eppendorf AG (D)

Bachofer (D)

Pipetten und Waagen

Pipet-Aid XP

Pipetman 2µl/20µl/200µl/1.000µl

Sartorius Extend

Sartorius TE313S

Drummond (USA)

Gilson (FR)

Sartorius AG (D)

Sartorius AG (D)

Software

Durchflusszytometrie: BD FACSDiva™ Software v5.0.3

Durchflusszytometrie: FlowJo v7.24

ELISA: Gen5™ v1.045

Immunfluoreszenz: Axiovision v4.6

Infrarots scanner: Odyssey Application Software v2.1.12

Massenspektrometrie: Data Explorer v4.0

Massenspektrometrie: Manuelito v2.0

Massenspektrometrie: Voyager Instrument Control Panel

Transilluminator: Vision-Capt v14.1A

BD Biosciences (USA)

TreeStar (USA)

Biotek Instruments (USA)

Zeiss (D)

Li-Cor Biosciences (USA)

Applied Biosystems (USA)

Tobias Straub (D)

Applied Biosystems (USA)

Vilber Lourmat (D)

3.3 Chemikalien und Reagenzien**Antibiotika und Zytostatika**

Ampicillin (Natriumsalz)

Chloramphenicol

Gentamycin

Kanamycin

Neomycin (G418)

Nocodazol

Roche (CH)

Roth (D)

PAA (AT)

Roth (D)

Sigma (USA)

Sigma (USA)

Salze

Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3)	Merck (D)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck (D)
Anhydrit (CaSO_4)	Merck (D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (D)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck (D)
Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)	Merck (D)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie (D)
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Sigma (USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (D)
Kaliumcyanoferrat	Merck (D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (D)
Protaminsulfat	Sigma (USA)
Silbernitrat (AgNO_3)	Roth (D)

Säuren und Basen

α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA)	Sigma (USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck (D)
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma (USA)
Borsäure (H_3BO_3)	Merck (D)
Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), 100% [v/v]	Merck (D)
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Merck (D)
Salzsäure (HCl), 37% [v/v]	Merck (D)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck (D)
Trichloressigsäure (TCA)	Roth (D)
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck (D)
Ultrapure Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Invitrogen (USA)

Organische Reagenzien und Lösungsmittel

2-Mercaptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	Sigma-Aldrich Chemie (D)
Aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)	Roth (D)
Acetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$)	Sigma (USA)
Acrylamid (30%, Rotiphorese Gel 30)	Roth (D)
Agarose	Biozym (D)
Bacto-Agar	Serva Electrophoresis (D)
Bisacrylamid	Merck (D)
Bromphenol Blau	Roth (D)
Chloroform (CHCl_3)	Merck (D)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (D)
Coomassie Brilliant Blue (R250)	Sigma-Aldrich Chemie (D)

Didthiothreitol (DTT)	Roth (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (D)
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium (EDTA-Na ₂)	Sigma (USA)
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma (USA)
Ethanol (C ₂ H ₆ O), 100% [v/v]	Merck (D)
Ethidiumbromid	Merck (D)
Formaldehyd (CH ₂ O), 37% [v/v]	Merck (D)
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega (USA)
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃), 100% [v/v]	Merck (D)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck (D)
Glykogen	Merck (D)
HaRNAtoff (CH ₄ N ₂ O)	Invitrogen (USA)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (D)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Merck (D)
Methanol (CH ₄ O), 100% [v/v]	Merck (D)
Milchpulver	Roth (D)
N,N,N',N',-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma (USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (USA)
Phosstop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (CH)
Pyronin Y	Sigma (USA)
TritonX-100	Sigma (USA)
Trypan Blau	Sigma (USA)
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie (D)
Xylen Cyanol	Sigma (USA)

3.4 Kits und Fertigbausätze

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Kit (100 U)	Biozym (D)
Promega Wizard® Miniprep System	Promega (USA)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (USA)

3.5 Enzyme und Substrate

DPN1 Restriktionsendonuklease	New England Biolabs (USA)
Kinasenbibliothek (siehe Anhang D)	Prof. Dr. D. Eick
Micrococcal Nuclease (MNase)	New England Biolabs (USA)
Phusion HF DNA-Polymerase	Biozym (D)
RNaseA	Roche (CH)
SigmaFAST™ OPD Substrat	Sigma-Aldrich Chemie (D)
Trypsin	Invitrogen (USA)

3.6 Puffer und Lösungen

Tab. 3-1: Zusammensetzung PBS-Puffer, 10x

	Konzentration
NaCl	1,4M
KCl	27mM
Na ₂ HPO ₄	100mM
KH ₂ PO ₄	91mM
(mit HCl titriert auf pH 7,4; gelagert bei 4°C)	

Tab. 3-2: Zusammensetzung (T)/A/U-Ladepuffer

	Konzentration
HaRNAtoff	9M
Pyronin Y, 0,2% [w/v]	10% [v/v]
Eisessig, 100% [v/v]	5% [v/v]
Protaminsulfat [25mg/ml]	50% [v/v]
(Lagerung über 24h nicht möglich)	

Tab. 3-3: Zusammensetzung TBE-Puffer

	Konzentration
TRIS	450mM
Borsäure	450mM
EDTA-Na ₄	8mM
(gelagert bei RT)	

Tab. 3-4: Zusammensetzung SDS-Ladepuffer, 5x

	Konzentration
TRIS	193mM
Glycerol	4,2M
SDS	106mM
β-Mercaptoethanol	3% [v/v]
Bromphenol Blau	0,4% [w/v]
(mit HCl titriert auf pH 6,8; gelagert bei 4°C)	

Tab. 3-5: Zusammensetzung SDS-Laufpuffer, 10x

	Konzentration
TRIS	250mM
Glycin	1,9M
SDS	35mM
(gelagert bei RT)	

Tab. 3-6: Zusammensetzung TBS-Puffer

	Konzentration
TRIS	50mM
NaCl	150mM
(mit HCl pH eintitriert; gelagert bei RT)	

3.7 Oligonukleotide, Primer und Plasmide

Tab. 3-7: Verwendete Primer

	Basensequenz	Hersteller
F-H3.3-S10A	T GCT CGT AAG 'GCC' ACC GGT GGG A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
R-H3.3-S10A	T CCC ACC GGT 'GGC' CTT ACG AGC A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
F-H3.3-S28A	C GCC AGG AAA 'GCC' GCA CCA TCT A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
R-H3.3-S28A	T AGA TGG TGC 'GGC' TTT CCT GGC G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
F-H3.1-A31S	G AGC GCG CCG 'TCT' ACC GGC GGC G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
R-H3.1-A31S	C GCC GCC GGT 'AGA' CGG CGC GCT C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
F-H3.3-S31A	A AGC GCA CCA 'GCT' ACC GGC GGG G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
R-H3.3-S31A	C CCC GCC GGA 'AGC' TGG TGC GCT T	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
F-H3.3-S31E	A AGC GCA CCA 'GAA' ACC GGC GGG G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
R-H3.3-S31E	C CCC GCC GGA 'TTC' TGG TGC GCT T	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)

Plasmide

pET 21 Vektor (siehe Anhang C)

EMD Biosciences (USA)

pIRESneo-Vektor (siehe Anhang C)

Clontech (USA)

(Oligo-)Nukleotide

Adenosintriphosphat (ATP)

Amersham (USA)

Desoxyribonukleotidtriphosphat Mix (dNTP), 10mM

New England Biolabs (USA)

DNA Längenstandard NEB 100bp Leiter

New England Biolabs (USA)

3.8 Peptide und Proteine

peqGOLD IV Protein Marker

peqLabs (D)

peqGOLD V Protein Marker

peqLabs (D)

Tab. 3-8: Verwendete Oligo- und Polypeptide

	Sequenz	Modifikation	Quelle
H3 S10ph	humanes H3 (1-19)	phosphoryliertes Serin 10, biotinylierter N-Terminus	Dr. S. B. Hake
H3.3unmod	humanes H3.3 (22-41)	Biotinylierter N-Terminus	Dr. S. B. Hake
H3.3S28ph	humanes H3.3 (22-41)	phosphoryliertes Serin 28, biotinylierter N-Terminus	Dr. S. B. Hake
H3.3S31ph	humanes H3.3 (22-41)	phosphoryliertes Serin 31, biotinylierter N-Terminus	Dr. S. B. Hake
H3.3S28phS31ph	humanes H3.3 (22-41)	phosphoryliertes Serin 28, phosphoryliertes Serin 31, biotinylierter N-Terminus	Dr. S. B. Hake
H3.3K79me3T80ph	humanes H3.3 (74-83)	trimethyliertes Lysin 79, phosphoryliertes Threonin 80, biotinylierter N-Terminus	Dr. S. B. Hake
xH3	Xenopus H3	Unmodifiziert	Prof. Dr. A. Imhof

3.9 Primär-, Sekundärantikörper und Farbstoffe**Fluoreszenzfarbstoffe**

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Invitrogen (USA)

Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)

Sigma (USA)

Elektrochemielumineszenz Detection Reagent 1 und 2 (ECL)

Amersham (USA)

Propidiumiodid

Sigma (USA)

Tab. 3-9: Verwendete Primärantikörper

	Antigen	Spezies	Typ	Hersteller
α -AIM	Aurora B	Maus	monoklonal	PharMingen (PL)
α -H3 (CT)	humanes H3 (100-135)	Kaninchen	polyklonal	Abcam (USA)
α -H3S10ph	humanes H3S10ph	Kaninchen	monoklonal	Millipore (USA)
α -H3.3S31ph	humanes H3.3S31ph	Kaninchen	polyklonal	Abcam (USA)
α -H3K79me3T80ph	humanes H3K79me3T80ph	Kaninchen	polyklonal	Millipore (USA)
α -HA (Klon 12CA5)	N-YPYDVPDYA-C	Maus	monoklonal	Roche (CH)
α -Myc (Klon 9E10)	N-EQKLISEEDL-C	Maus	monoklonal	Abcam (USA)

Tab. 3-10: Verwendete Sekundärantikörper (Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelt)

	Antigen	Spezies	Typ	Hersteller
Alexa488	Ratten IgG	Ziege	polyklonal	Invitrogen (USA)
Cy3	Kaninchen IgG	Ziege	monoklonal	Dianova (USA)
Cy3	Maus IgG	Ziege	monoklonal	Dianova (USA)

Tab. 3-11: Verwendete Sekundärantikörper (Merettich-Peroxidase-gekoppelt)

	Antigen	Spezies	Typ	Hersteller
α -rabbit IgG-ECL	Kaninchen IgG	Maus	monoklonal	Abcam (USA)
α -rat IgG-ECL	Ratten IgG	Ziege	polyklonal	Amersham (USA)

3.10 Kultur-, Nährmedien und Zusätze

Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs (USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie (D)
LB-Agar	Serva Electrophoresis (D)
DMEM High Glucose (4,5g/L + L-Glutamine + Sodium Pyruvat)	PAA (AT)
OptiMEM with Glutamax	Invitrogen (USA)
Penicillin/Streptomycin, 100x (P/S)	PAA (AT)
Trypsin/EDTA, 10x (0,5% [v/v] / 0,2% [w/v] in PBS)	PAA (AT)

3.11 Bakterien- und Zelllinien

Tab. 3-12: Verwendete Bakterien- und Zelllinien

	Stamm	Genotyp/Zelltyp	Referenz
Escherichia coli	BL21 CodonPlus	B F- ompT hsdS(rB-, mB-) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endAhte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene (NL)
Escherichia coli	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene (NL)
HeLa	-	Humane Zervixkarzinomzellen	ATCC (CCL-2)

4 METHODEN

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme *Comp. XL1-Blue* und *BL21 CodonPlus* gehören zu den *Escherichia coli*. Diese Bakterien sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie können sowohl auf festen Nährböden, als auch in Flüssigmedien angezüchtet werden. *Escherichia coli* sind darüber hinaus in der Lage freie DNA aufzunehmen, wie sie z.B. in Form von Plasmiden in ihrer Umwelt vorliegen kann. Wie unter 4.4.2.3 beschrieben kann diese Fähigkeit des sog. horizontalen Gentransfers zur Transformation der Bakterienzellen genutzt werden. Auf diese Weise können mit Hilfe von Plasmiden mit Selektionsmarkern hezielte Gene vermehrt oder bestimmte Proteine rekombinant hergestellt werden⁷⁵.

4.1.1.1 Kultivierung auf Nährböden

Zur Kultivierung wurde LB-Medium mit zugesetzten Antibiotika (siehe Tab. 4-1) zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien verwendet, welches unter Zugabe von 1,5% [w/v] Bacto-Agar ausgehärtet wurde. Die antibiotikahaltigen Agarplatten wurden bei 4°C gelagert und mit 100µl Bakteriensuspension beimpft. Hierzu wurde ein Trigalski-Spatel zunächst in 100% [v/v] Ethanol geschwenkt und anschließend mittels eines Bunsenbrenners abgeflammt, um ihn zu sterilisieren. Nach Abkühlung des Spatels wurde die Bakteriensuspension auf der Platte gleichmäßig verteilt und die Agarplatten mit dem Deckel nach unten inkubiert (ü.N, 37°C).

4.1.1.2 Kultivierung in Flüssigmedien

Je nach den jeweiligen Resistenzeigenschaften der eingesetzten Plasmide wurde autoklaviertes LB-Medium mit oder ohne Zugabe von Antibiotika verwendet (Konzentrationen siehe Tab. 4-1). Die Flüssigkultur wurde mittels eines mit einer autoklavierten, sterilen Pipettenspitze gepickten Bakterienklons oder mit einer geeigneten Menge angesetzter Flüssigkultur angeimpft. Die bakterielle Flüssigkultur wurde anschließend in einem ausreichend großen Glasgefäß im Schüttelinkubator kultiviert (ü.N., 200rpm, 37°C). Dabei wurde jeweils darauf geachtet, dass die Bakterien mit ausreichend Sauerstoff versorgt waren.

Tab. 4-1: Verwendete Antibiotikakonzentrationen

	Konzentration
Ampicillin	5µg/ml
Chloramphenicol	3,4µg/ml
Kanamycin	5µg/ml

4.1.1.3 Dichtemessung der Bakterien

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in Flüssigmedien wurde in dieser Arbeit die optische Dichte der Bakteriensuspension gemessen. Diese Methode beruht auf Lichtstreuung an Bakterien mit einer von Wasser abweichenden Dichte⁷⁶. Hierzu wurde in dieser Arbeit das *Ultrospect 2000 Spectrophotometer* zunächst mit LB-Medium geeicht und anschließend in einer Küvette die zu messende Bakteriensuspension in den Strahlengang gebracht. Der Extinktionswert wurde jeweils bei 600nm bestimmt.

4.1.1.4 Lagerung in Glycerinstocks

Um Bakterien über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden in dieser Arbeit Glycerinstocks verwendet. Glycerin ist ein Frostschutzmittel und verhindert die Bildung von Eiskristallen und somit mögliche Zellschäden beim Einfrieren⁷⁷. Hierzu wurden die Bakterien zunächst in Flüssigmedium angezogen (ü.N., 37°C), 850ml Suspension mit 150ml Glycerin in einem sterilen 2ml Reaktionsgefäß vermischt und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Glycerinstocks wurden bei -80°C gelagert. Bei Bedarf konnte mit einer sterilen Pipettenspitze der Stock angekratzt, in Flüssigmedium angeimpft und im Schüttelinbkubator angezogen werden (ü.N. 200rpm, 37°C).

4.1.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten HeLa Zellen sind humane, adhärent wachsende und immortalisierte Zellen eines Zervixkarzinoms⁷⁸. Kultiviert wurde die Zelllinie mit glukosehaltigem Medium (DMEM High Glucose + 10% [v/v] FCS + 1% [w/v] P/S) bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ in Gewebekulturschalen beliebiger Größe. Erreichten die Zellen einer Kultur eine Konfluenz von etwa 70% bis 90%, wurden diese durch Verdünnung reduziert und ein Teil der Zellen in eine neue Platte zur weiteren Kultivierung überführt. Hierfür wurde das alte Medium zunächst abgesaugt, die adhären Zellen mit PBS gewaschen und anschließend vom Boden der Kulturschale durch Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst. Nach Zugabe von frischem Medium wurde ein Teil der Suspension in eine neue Gewebekulturschale überführt, auf diese Weise verdünnt und erneut mit Medium aufgefüllt.

4.1.2.1 Spezielle Kultivierung

Bei einigen Fragestellungen dieser Arbeit war eine Kultivierung der HeLa Zellen in anderen Kulturgefäßen als den standardmäßig verwendeten Gewebekulturschalen nötig:

In 6-Loch-Gewebekulturplatten

Zur einfacheren Handhabung wurden HeLa Zellen jeweils zur Plasmid-Transfektion, sowie zur jeweiligen Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. zur Bestimmung der Proliferationszeit in 6-Loch-Gewebekulturplatten kultiviert. Hierzu wurden jeweils 1×10^5 Zellen in die Vertiefungen der Platten ausgesät, mit Medium auf 2ml Gesamtvolumen aufgefüllt und kultiviert (24h, 37°C, 5% [v/v] CO₂). Anschließend erfolgte die Transfektion der HeLa Zellen, bzw. die experimentelle Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Proliferationszeit wie unter 4.4.1.5, 4.1.2.4 und 4.1.2.5 beschrieben.

In 24-Loch-Gewebekulturplatten

Für die Betrachtung von immunhistochemisch angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop war es notwendig, die Zellen direkt auf einem Objektglas anzuziehen. Um hierbei Kontaminationen zu vermeiden wurden die runden Objektgläser zuvor unter sterilen Bedingungen in 24-Loch-Platten eingesetzt, zweimal mit je 70% [v/v] Ethanol desinfiziert und nochmals mit PBS gewaschen, um Ethanolrückstände auf dem Objektträger zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 4×10^4 Zellen in die Vertiefungen der 24-Loch-Gewebekulturplatten auf den Deckgläsern ausgesät, mit Medium auf 1ml Gesamtvolumen aufgefüllt und im Brutschrank kultiviert (24h, 37°C, 5% [v/v] CO₂). Die immunhistochemische Anfärbung erfolgte letztlich wie unter 4.1.3 beschrieben.

4.1.2.2 Spezielle Kulturbedingungen

Bei einigen Fragestellungen war eine spezielle Behandlung der HeLa Zellen in Kultur nötig:

Behandlung mit Nocodazol

Für die gezielte Betrachtung und biochemische Analyse mitotischer Zellen wurden HeLa Zellen in dieser Arbeit mit Nocodazol behandelt. Nocodazol ist ein Agens, welches in Zellen mit der Polymerisation der Mikrotubuli interferiert, welche einen wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts bilden. Durch Behandlung mit Nocodazol wird insbesondere der Aufbau der Mitosespindel und die Zytokinese erheblich behindert. Es kommt zum Arrest des Zellzyklus in der Metaphase⁷⁹. Verwendet wurde hierzu eine Nocodazolkonzentration von 0,1ng/µl, welche dem Kulturmedium direkt zugesetzt wurde. Nach Inkubation (20h, 37°C, 5% [v/v] CO₂) wurden die mitotischen Zellen durch leichtes Anklopfen der Gewebekulturschale vom Boden gelöst. Durch direkte Abnahme des Mediums ohne Trypsin-Behandlung der HeLa Zellen konnte eine zusätzliche, relative Anreicherung mitotischer Zellen erreicht werden, da sich diese in der Mitose ohne weiteres Zutun von der Gewebekulturschale lösten und von nicht-mitotischen Zellen getrennt werden konnten.

Behandlung mit UV-Licht

Für die gezielte Betrachtung apoptotischer Zellen wurden HeLa Zellen mit UV-Licht behandelt. UV-Licht führt als ionisierende Strahlung u.a. zu Alterationen der DNA, was irreparable Zellschäden zur Folge haben kann. Insofern diese durch intrazelluläre Reparaturmechanismen nicht behoben werden können, leitet die Zelle die Apoptose ein¹⁸. Hierzu wurden Gewebekulturschalen in den *UV-Stratalinker 1.800* überführt und bei geöffneter Abdeckung mit 100.000µJ/cm²

bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen erneut inkubiert (37°C, 5% CO₂), bevor sie zur weiteren Analyse abgenommen wurden.

Behandlung mit Neomycin

Für eine gezielte Selektion transfizierter HeLa Zellen (siehe 4.4.1.5) wurde dem Kulturmedium je nach Fragestellung Neomycin zugesetzt. Die erfolgreich mit dem pIRESneo Vektor transfizierten HeLa Zellen wiesen eine Resistenz gegen das entsprechende Zellgift auf (siehe 4.4.1.5). Verwendet wurde eine Neomycin-Konzentration von 600µg/ml, die dem Medium direkt zugesetzt wurde.

4.1.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl standen je nach Fragestellung zwei Verfahren zur Auswahl:

In der Zählkammer

Zur einfachen Quantifizierung weniger Zellen wurde in dieser Arbeit das *Bright-Line Hemacytometer* eingesetzt. Hierzu wurden die HeLa Zellen wie unter 4.1.2. beschrieben mit Trypsin/EDTA angelöst, bzw. wie unter 4.1.2.2. beschrieben mit Nocodazole behandelt. Die Zellsuspension wurde abgenommen und gevortext, um Messfehlern vorzubeugen. 15µl der Suspension wurden zur Unterscheidung vitaler von toten Zellen mit 15µl Trypan-Blau vermischt und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Mit dem CASY®-Counter

Bei umfangreicheren Quantifizierungen wurde die Zellzahl mit Hilfe des *CASY®-Counters* bestimmt. Die HeLa Zellen wurden wie unter 4.1.2, bzw. 4.1.2.2 beschrieben gelöst und 50µl der zu messenden Zellsuspension zu 10ml *CasyTon®*-Lösung hinzugegeben. Direkt vor der Zählung wurde die Zellsuspension durch mehrmaliges Schwenken gemischt, um Messfehler möglichst gering zu halten.

4.1.2.4 Wachstumsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien wurden zunächst, wie unter 4.1.2.1 beschrieben HeLa Zellen auf Gewebekulturschalen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen über insgesamt 12 Tage inkubiert (37°C, 5% [v/v] CO₂) und nach jeweils 72 Stunden mit dem *CASY@-Counter* gezählt (siehe 4.1.2.3). Bei jeder Zählung wurden die HeLa Zellen verdünnt, wobei der Verdünnungsfaktor jeweils so gewählt wurde, dass die Zellen nach drei Tagen wieder eine Konfluenz von 70% bis 90% erreichten.

Mathematische Berechnung

Um die Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurde aus den Messwerten und deren Verdünnungsfaktoren die hypothetische Zellzahl berechnet, wie sie bei unbegrenztem Wachstum der Zellen und ohne Verdünnung anzunehmen gewesen wäre. Die pro Milliliter gezählten Messwerte des *CASY@-Counters* wurden in die tatsächlichen Volumina der Flüssigmedien umgerechnet. Folgende Formel wurde verwendet, wobei x der Zellzahl, v dem Verdünnungsfaktor und n dem Zeitpunkt der Messung in Tagen entspricht:

$$x_n * v_{n-3} * \dots * v_{n=1}$$

Desweiteren wurde in einem nächsten Schritt die Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie errechnet. Hierzu wurde die Formel für logarithmisches Wachstum zugrunde gelegt, wobei c_0 der Anzahl der zu Beginn ausgesetzten Zellen, k der jeweiligen Wachstumskonstante und t dem Zeitabschnitt in Stunden entspricht:

$$c_0 * e^{k*t}$$

Pro Zelllinie wurden drei Ansätze vorbereitet, um die Standardabweichung bestimmen zu können. Folgende Formel wurde verwendet, wobei x dem Stichprobenmittelwert und n dem Stichprobenumfang entspricht:

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Anschließend wurde der Signifikanzwert der errechneten Wachstumsgeschwindigkeiten mit dem Zweistichproben-t-Tests bestimmt.

4.1.2.5 Proliferationszeit

Zur Bestimmung der Proliferationszeit wurden in dieser Arbeit die einzelnen Zelllinien mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) angefärbt. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in Zellen relativ stabil ist und auf diese nicht toxisch wirkt. Bei Teilung einer Zelle wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen weitergegeben, so dass die Abschwächung des Signales einer Zellpopulation Rückschlüsse auf deren Teilungsrate ermöglicht⁸⁰. Hierzu wurden HeLa Zellen zunächst wie unter 4.1.2 beschrieben in Suspension gebracht. Durch Zentrifugation (10min, 310xg) wurden die Zellen pelletiert, zum Entfernen des überschüssigen Mediums in PBS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (10min, 310xg) pelletiert. Das auf diese Weise gewaschene Pellet wurde durch Resuspension in 8ml PBS + 4µl 10mM CFSE (in DMSO) angefärbt. Eine Kontrolle wurde ohne Zugabe von CFSE mit 8ml PBS unter Zugabe von 4µl DMSO geführt. Anschließend wurde die Zellsuspension im Dunkeln inkubiert (10min, 37°C). Um den Färbeprozess zu stoppen wurden 2ml 100% [v/v] FCS zugegeben. Zur Entfernung überschüssigen CFSE und DMSO

wurde die Suspension zweimal durch Zentrifugation (10min, 310xg) pelletiert und in 20% [v/v] FCS (in PBS) aufgenommen. Schließlich wurde das Pellet zur Inkubation (37°C, 5% [v/v] CO₂) in Medium aufgenommen und auf 6-Loch-Gewebekulturplatten ausgebracht.

Mathematische Berechnung

Die Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben abgenommen und in der Durchflusszytometrie analysiert (siehe 4.1.4). Hierbei wurde jeweils die mittlere Signalintensität einer Zelllinie gemessen (Mean). Zur Bestimmung der Proliferationszeit wurde die Formel für negatives logarithmisches Wachstum angenommen, wobei c_0 der gemittelten Signalintensität zu Beginn des Experiments, $-k$ der Zerfallskonstante und t dem Zeitabschnitt in Stunden entspricht:

$$c_0 * e^{-k*t}$$

Je Zelllinie wurden drei Ansätze vorbereitet, um die Standardabweichung bestimmen zu können. Folgende Formel wurde verwendet, wobei x dem Stichprobenmittelwert und n dem Stichprobenumfang entspricht:

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Der Signifikanzwert wurde unter Verwendung des Zweistichproben-t-Tests bestimmt.

4.1.2.6 Lagerung in Flüssigstickstoff

Zum Lagern von HeLa Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden 70% konfluent gewachsene Zellen analog zu 4.1.2 in Suspension gebracht und in einem 50ml Röhrchen durch Zentrifugation (10min,

310xg) pelletiert, anschließend das Pellet in 2ml Einfriermedium (10% [v/v] DMSO in FCS) resuspendiert und auf zwei Kryoröhrchen zu je 1ml aufgeteilt. Diese wurden zunächst für mehrere Wochen bei -80°C gelagert, bevor sie in den Flüssigstickstofftank überführt wurden.

4.1.2.7 Auftauen aus Flüssigstickstoff

Die in 4.1.2.4 präparierten Kryoröhrchen wurden zum Auftauen nach Entnahme aus dem Stickstofftank (bzw. bei kürzerer Lagerung direkt aus dem -80°C Gefrierschrank) zügig in einem Wasserbad aufgetaut (37°C), in 10ml warmem Medium (RT) aufgenommen und zur Entfernung zytotoxischen DMSOs durch Zentrifugation (10min, 310xg) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf Gewebekulturschalen ausgesät (siehe 4.1.2).

4.1.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) ermöglicht neben der morphologischen Charakterisierung von Zellen die immunhistochemische Anfärbung bestimmter Proteine, sowie deren Lokalisation in der Zelle⁸¹. Verwendet wurde in dieser Arbeit das *Axiovert 200M*. Wie unter 4.1.2.1 beschrieben wurden HeLa Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Nach Fixierung der Zellen für 15min mit 1% [v/v] Formaldehyd (in PBS) wurden die Membranen mit 0,1% [v/v] TritonX-100 (in PBS) permeabilisiert. Die Deckgläser für 20min mit einer Blockierlösung (PBS + 0,1% [v/v] TritonX-100 + 1% [w/v] BSA) behandelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden Zielproteine für eine Stunde von einem Primärantikörper (in Blockierlösung) gebunden und dreimal für je 5min mit 0,1% [v/v] TritonX-100 (in PBS) gewaschen. Dieser Primärantikörper wurde

durch Zugabe eines an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers (in Blockierlösung) und Inkubation für 30min im Dunkeln erkannt. Um unspezifische Signale dieses Zweitantikörpers zu vermeiden wurden die Objektgläser erneut dreimal mit 0,1% [v/v] TritonX-100 (in PBS) gewaschen. Der Zellkern wurde durch Färbung der DNA unter Zugabe von 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. DAPI lagert sich dabei an AT-reichen Sequenzen der DNA an⁸². Die eingesetzten Zweitantikörper bzw. Fluoreszenzfarbstoffe (Konzentrationen siehe Tab. 4-2) konnten durch Anregung mit UV-Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Tab. 4-2: Verwendete Fluoreszenzmarker

	Verdünnung
4',6-Diamino-2-phenylindol	1 : 20.000
Alexa488 (Ziege-α-Kaninchen)	1 : 500
Cy3 (Ziege-α-Kaninchen)	1 : 500
Cy3 (Ziege-α-Maus)	1 : 500

4.1.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur computergesteuerten Charakterisierung von Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. Es beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zelle, wenn diese Laserstrahlen passieren. Dabei können zusätzliche Eigenschaften durch freie oder an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe untersucht werden⁸³. In dieser Arbeit wurde das *BD FACSCanto™* benutzt. 1×10^6 HeLa Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben kultiviert, in Suspension gebracht und durch Zentrifugation (10min, 310xg) pelletiert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (10min, 385xg). Je nach

Fragestellung wurden die Zellen nach Resuspension in 300 μ l PBS durch tropfenweise Zugabe von 70% [v/v] Methanol unter Vortexen fixiert und bei -20°C gelagert (60min bis mehrere Tage). Anschließend wurden die Zellen nach Zentrifugation (10min, 385xg) in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10min, 385xg) wurde das Pellet in PBS mit einem Primärantikörper resuspendiert und für inkubiert (60min, RT). Der Antikörper richtete sich gegen das zu untersuchende Protein und wurde je nach Fragestellung gewählt. Durch Zentrifugation (10min, 385xg), Resuspension des Pellets in PBS und erneuter Zentrifugation (10min, 385xg) wurden die Zellen gewaschen und im Dunkeln mit Zweitantikörper (in PBS) inkubiert (60min, RT). Dieser Antikörper war Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelt und detektierte den Erstantikörper (siehe Tab. 4-3). Durch Zentrifugation (10min, 385xg), Resuspension in PBS und Zentrifugation (10min, 385xg) wurden die Zellen gewaschen. Zur Bestimmung der Zellzyklusphase wurden die DNA der Zellen in Propidiumiodid-Lösung (100 μ g/ml RNaseA + 50 μ g/ml Propidiumiodid in PBS) gefärbt (30min, 37°C). Die Zugabe von RNaseA diente der Degradation von RNA, um die Färbung von RNA durch Propidiumiodid zu vermeiden. Zur Analyse wurden die Zellen in den überführt. Ggf. wurde auf die Antikörper-Detektion verzichtet und nur Propidiumiodid-gefärbt. Die Signale wurden mit *BD FACSDiva™ Software v5.0.3*, bzw. *FlowJo v7.24* ausgewertet.

Tab. 4-3: Verwendete Fluoreszenzmarker

	Verdünnung
Propidiumiodid	1 : 20
Alexa488 (Ziege-α-Kaninchen)	1 : 1.000

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Säurefällung von Histonen

Histone sind stark basische Proteine, was sich zur gezielten Aufreinigung der Histonproteine aus Zelllysat nutzen lässt⁷⁰. Zwischen 5×10^6 und 2×10^7 HeLa Zellen wurden, wie unter 4.1.2 beschrieben, geernet. Durch Zentrifugation (10min, 310xg) pelletiert wurden die Zellen in 1ml PBS aufgenommen, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und erneut pelletiert (5min, 385xg). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in eiskaltem hypotonen Lysepuffer (10mM TRIS pH8 + 1mM KCl + 1,5mM MgCl₂ + 1mM DTT + 0,4mM PMSF + PPI) aufgenommen und die Zellen unter ständiger Rotation (30min, 4°C) lysiert. Nach Zentrifugation (10.500xg, 10 min, 4°C) wurde das Pellet in 400µl eiskalter Schwefelsäure (0,4N) resuspendiert und unter ständiger Rotation (ü.N., 4°C) inkubiert, um die Zellkerne zu hydrolysieren. Anschließend wurde das Kernlysat durch Zentrifugation (10min, 18.000xg, 4 °C) präzipitiert, während alle säurelöslichen Proteine (u.a. die Histone) weiterhin im Überstand gelöst vorlagen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Histonextraktion wurden 132µl eisgekühlte Trichloressigsäure hinzugefügt, das Gefäß mehrmals invertiert und anschließend auf Eis inkubiert (30min). Das Lysat wurde abzentrifugiert (10min, 18.000xg, 4 °C), der Überstand verworfen und die Histone durch zweimaliges Waschen mit 500µl eiskaltem Aceton, gefolgt von je einem Zentrifugationsschritt (5min, 18.000xg, 4°C), an der Wand des Reaktionsgefäßes gefällt. Das Pellet wurde luftgetrocknet (RT) und anschließend bei -20°C in 50µl bis 100µl H₂O_{dest} aufgenommen.

4.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente nach erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1% [w/v] Agarosegelen, denen zur Detektion der Fragmente 500µg Ethidiumbromid beigemischt wurde. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei veränderter Struktur unter Anregung mit UV-Licht⁸⁴. Die DNA-Proben wurden auf das Gel geladen und die Elektrophorese durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (120V, 20min) gestartet. Hierbei diente TBE als Laufpuffer für die Elektrophorese. Die DNA-Fragmente wandern im Gel aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode, wobei die Geschwindigkeit der Migration abhängig von der jeweiligen Länge der Fragmente ist⁸⁴. Zum optischen Verfolgen des Gellaufs wurde den DNA-Proben zuvor ein

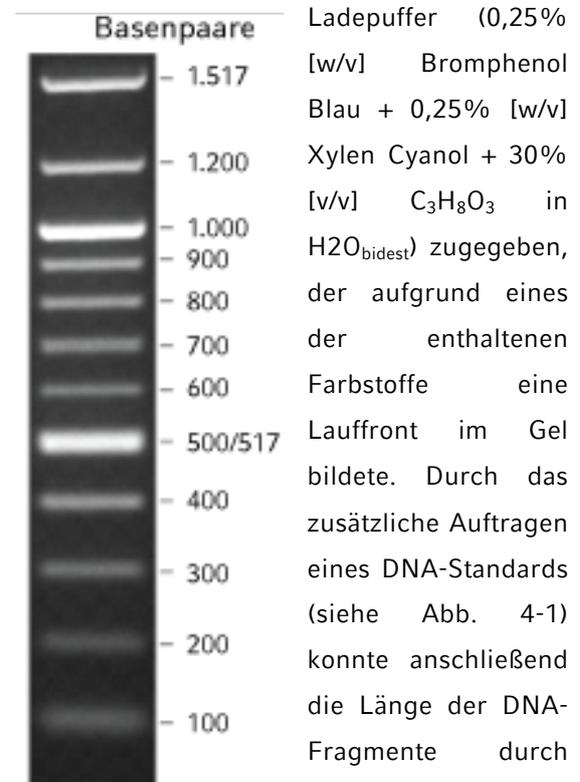


Abb. 4-1: DNS Längenstandard (NEB 100bp Leiter)

Agarosegel bestimmt werden.

4.2.3 Acrylamidgel-Elektrophorese

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) eignet sich zur Auftrennung von Proteinen mit Molmassen zwischen 5kDa und 500kDa. In dieser Arbeit kamen je nach Fragestellung verschiedene PAGE Varianten zum Einsatz. Die Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, mit dem sich Mischungen von Proteinmolekülen unter Einfluß eines elektrischen Feldes innerhalb eines Gels auftrennen lassen. Unter denaturierenden und auch reduzierenden Bedingungen hängt die Geschwindigkeit der Wanderung der Moleküle von ihrem Molekulargewicht ab, große Moleküle wandern langsamer als kleine⁸⁵. Zur Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht (v.a. der verschiedenen Histone) wurde ein 15%iges Polyacrylamidgel verwendet (15% SDS-PAGE). Dieses wurde in einer *Novex Mini Cell Kammer* gegossen. Zunächst wurde das Trenngel bis ca. 1,5cm unter die Oberkante der Gelkammer gegossen und zum Aushärten mit H₂O_{dest} abgedeckt, was einer gleichmäßigen Verteilung des Polyacrylamidgels in der Kammer diente. Anschließend wurde das Wasser abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und zum Aushärten ein Kamm eingesteckt, dessen Taschen zur späteren Beladung des Gels dienten. Die Zusammensetzung des verwendeten Gels war

Tab. 4-4: Zusammensetzung eines SDS-PAGels

	Sammelgel	Trenngel
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	265µl	4ml
H₂O_{dest}	1.465µl	920µl
1M TRIS (ph 8.8)	-	2,9ml
1M TRIS (ph 6.6)	250µl	-
10% Natriumdodecylsulfat	20µl	80µl
10% Ammoniumperoxodisulfat	20µl	80µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	2µl	8µl

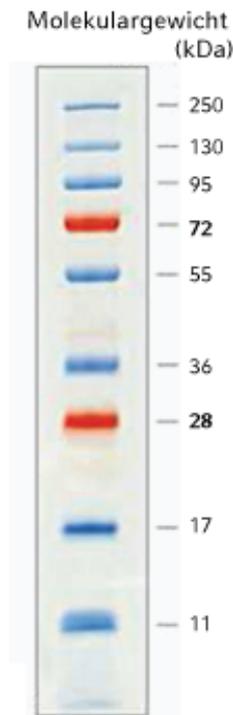


Abb. 4-2: Protein-Größenstandard (peqGold Marker V)

unterschiedlich bei Trenn- und Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tab. 4-4). Um eine weitgehend gleiche negative Verteilung der Ladungen in den Proben zu erreichen, wurden diese in SDS-Ladepuffer aufgenommen und zur Denaturierung im Thermoblock (5min, 95°C) erhitzt, bevor sie in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels geladen wurden. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Protein-Größenstandard (peqGOLD Marker IV bzw. V) geladen. Der Marker diente zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine (siehe Abb. 4-2). Die Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt, die angelegte Spannung betrug zunächst 100V (20min) und wurde nach Verlassen der Proteine aus dem Sammelgel auf 180V (60min) erhöht. Nach Durchlaufen des Gels (sichtbar an der Lauffront des Ladepuffers) wurde das SDS-Gel zur Detektion der Proteine entweder gefärbt (siehe 4.2.4), oder zur Immundetektion mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 4.2.5).

4.2.3.1 (Triton)/Essigsäure/Urea-PAGE

Mit der Essigsäure/Urea-PAGE (A/U-PAGE) lassen sich ähnlich zur SDS-PAGE Proteingemische in einem Gel mittels eines elektrischen Feldes auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle hängt jedoch im Unterschied zur SDS-PAGE direkt von deren Ladungseigenschaften ab, sodass zusätzlich zum Molekulargewicht ladungsspezifisch nach Proteinmodifizierungen (z.B. Acetylierungen oder Phosphorylierungen) aufgetrennt werden kann⁷⁰. Je nach Fragestellung wurde dem Gel darüber hinaus TritonX-100 zugesetzt (T/A/U-PAGE). Durch Anlagerung an bestimmte Aminosäuren (Cystein und Methionin) war somit auch eine sequenzspezifische Auftrennung nach Proteinvarianten möglich⁷⁰. Das Gel wurde in einer eigens hergestellten Gelkammer (40cm x 20cm) gegossen. Das Trenngel wurde bis ca. 3cm unter die Oberkante der Gelkammer gegossen, zur gleichmäßigen Verteilung in der Kammer mit H₂O_{dest} abgedeckt und für eine Stunde ausgehärtet. Das Wasser wurde abgegossen, das Sammelgel I bis etwa 1,5cm unter die Oberkante der Gelkammer gegossen und erneut für ca. 2 Stunden mit H₂O_{dest} abgedeckt. Um oxidierende Bedingungen im Gel zu reduzieren wurden 500µl (T/A/U-Lade-

puffer bei 200V (ü.N., 4°C) in das Gel einlaufen gelassen (von der Anode weg hin zur Katode). Das Sammelgel II wurde bis unter die Oberkante der Gelkammer gegossen, zur späteren Beladung des Gels ein Kamm eingesteckt und für eine Stunde ausgehärtet. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele kann Tab. 4-5 entnommen werden. Vor der Analyse wurden die Proteinproben in der Vakuumzentrifuge eingedampft (15min, V-Aq, RT) in 10µl (T/A/U-Ladepuffer aufgenommen und in die Taschen des (T/A/U-Gels geladen. Leere Taschen wurden mit A/U-Ladepuffer gefüllt, um eine bessere Auftrennung des Gels zu erreichen. Es wurde kein Protein-Standard geladen. Die an das Gel angelegte Spannung betrug durchgängig 300V (ü.N., 4°C). Nach vollständigem Durchlaufen des Gels (sichtbar an der Lauffront des Ladepuffers) wurde das (T/A/U-Gel zur Detektion der Proteine mittels Proteinfärbung behandelt (siehe 4.2.3).

4.2.3.2 Zweidimensionale T/A/U- PAGE

Um eine Auftrennung nach Sequenz, Ladung und Molekulargewicht zu erreichen, konnten T/A/U- und SDS-PAGE kombiniert werden⁷³. Hierzu wurde zunächst analog zu 4.1.7.1 eine T/A/U-PAGE durchgeführt. Anschließend wurde das Gel längs zu den gelaufenen Proteinfractionen in seine einzelnen Banden zerlegt, dreimal für je 5min mit 0,125M TRIS

Tab. 4-5: Zusammensetzung eines (T/A)U-PAGels

	Sammelgel I	Sammelgel II	(T/A)U Trenngel
60% Acrylamid / 0,4% Bisacrylamid	500µl	1,25ml	7,5ml
H₂O_{dest}	2,8ml	2,05ml	(11,19ml) 12,3ml
10% TritonX-100	-	-	(1,11ml) -
Essigsäure	250µl	250µl	1,5ml
HaRNAtoff	1,8g	1,8g	10,8g
10% Ammoniumperoxodisulfat	70µl	140µl	420µl
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin	30µl	60µl	180µl

ph8.8 äquiliert und die Banden anstatt eines Kammes in ein SDS-Sammelgel eingegossen (siehe Abb. 4-3). Es wurde Platz für einen Protein-Größenmarker (peqGOLD Marker V) gelassen. Die weitere Durchführung entsprach der SDS-PAGE (siehe 4.1.7)

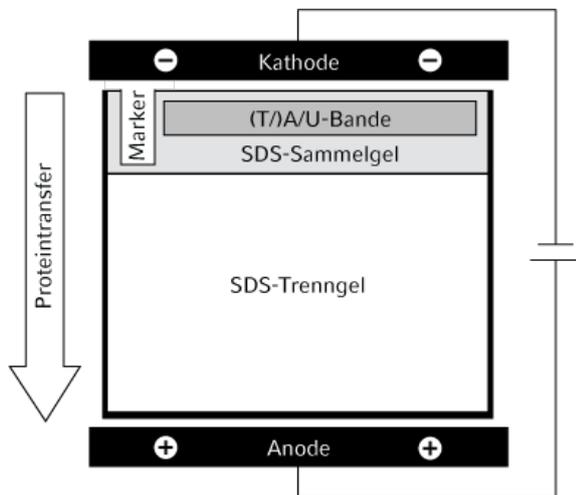


Abb. 4-3: Aufbau einer 2D-T/A/U-PAGE

4.2.4 Proteinfärbung

Zur generellen Detektion von Proteinen in SDS-Gelen wurden diese je nach Fragestellung durch Proteinfärbung sichtbar gemacht:

4.2.4.1 Coomassie-Färbung

Zum einfachen Färben der unter 4.2.2 aufgeführten Gele wurde in dieser Arbeit Coomassie-Brilliant-Blau eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert und Proteine somit unspezifisch anfärbt. Mit dieser Färbemethode lassen sich Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 200ng bis 400ng pro Bande sichtbar machen⁸⁶. Hierzu wurden die Gele nach der Gel-Elektrophorese unter Verwendung filtrierter Coomassie-Lösung (50% [v/v] CH₄O + 10% [v/v] C₂H₄O₂ + 1,21mM Brilliant Blue R250 in H₂O_{bidest}) angefärbt (60min, RT). Durch mehrmaliges Waschen (H₂O_{dest} + 40% [v/v]

C₂H₆O + 10% [v/v] C₂H₄O₂) wurden die Banden deutlich sichtbar. Zur Beseitigung aller Rückstände der enthaltenen Essigsäure, wurden die Gele mehrmals mit H₂O_{dest} gewaschen, bevor sie wie unter 4.3.1.1 beschrieben zur Analyse in der Massenspektrometrie bearbeitet, oder zur einfachen Aufbewahrung getrocknet wurden.

Entfärben Coomassie-gefärbter Gele

Zur Analyse in der Massenspektrometrie (siehe 4.3.1.1) war es nötig, die einzelnen Gelbanden komplett zu entfärben⁸⁷. Um die Entfärbereaktion vorzubereiten, wurden die Gelbanden jeweils zunächst in H₂O_{bidest}, dann in 10mM Ammoniumbicarbonat geschüttelt (5min, 37°C). Zum Entfärben wurden die Gelbanden schließlich in 50% Acetonitril + 50mM Ammoniumbicarbonat bis zum Verschwinden der Färbung inkubiert (60min, 37°C) und zweimal mit H₂O_{dest} gewaschen (5min, 37°C).

4.2.4.2 Silber-Färbung

Zum Anfärben geringerer Mengen an Proteinen wurde in dieser Arbeit die Silber-Färbung verwendet. Diese Färbung beruht auf der Anlagerung von Silberkationen an Proteine. Nach Reduktion der Silberkationen zu elementarem Silber wird dieses unlöslich und färbt die Proteine schwarz. Mit dieser Färbemethode lassen sich Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 1ng bis 30ng pro Bande sichtbar machen⁸⁸. Hierzu wurde das Gel nach der Gel-Elektrophorese zunächst für mindestens eine Stunde fixiert (H₂O_{dest} + 40% [v/v] C₂H₆O + 10% [v/v] C₂H₄O₂) und anschließend für 10min gewaschen (H₂O_{dest} + 50% [v/v] CH₄O). Zur Beseitigung aller Säurerückstände wurde ein weiterer Waschschriff (10min, RT) mit H₂O_{bidest} durchgeführt. Um die Färbereaktion vorzubereiten wurde das Gel mit 0,02% [w/v]

Natriumthiosulfat sensibilisiert (10min) und zur Entfernung von Rückständen zweimal für je eine Minute in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Anschließend wurde das Gel in 0.1% [w/v] Silbernitrat inkubiert (20min) und vor dem Start der Entwicklungsreaktion zur Entfernung von Rückständen erneut zweimal für je eine Minute mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Gel in Entwicklungslösung (0,04% [v/v] CH_2O + 2% [w/v] Na_2CO_3) geschwenkt, bis das gewünschte Ergebnis erzielt war. Zum Beenden der Entwicklungsreaktion wurde das Gel in 1% [v/v] Essigsäure getaucht, gründlich geschwenkt und bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

Entfärben Silber-gefärbter Gele

Zur Analyse einzelner Gele in der Massenspektrometrie (siehe 4.2.1.1) war es notwendig, die einzelnen Gelbanden vor der Probenaufbereitung zu entfärben. Hierzu wurden sie zunächst für 30min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen. Anschließend wurde das Silber im Gel reduziert ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ + 30mM Kaliumcyanoferrat + 100mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Nach Verschwinden der schwarzen Färbung wurde das Gel für 30min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen.

4.2.5 Westernblot-Analyse

Die Westernblot-Analyse ist ein empfindliches und spezifisches Protein-Nachweis-Verfahren mit einer Nachweisgrenze von bis zu 1pg Protein. Durch das Blotten auf eine PVDF-Membran sind zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch immunologische Nachweisverfahren detektierbar⁸⁹. In dieser Arbeit wurde in dem *TRANS-BLOT® SD CELL®* Apparat das *semi-dry* Verfahren angewandt. Hierzu wurde die PVDF-Membran für 30sec in Methanol aktiviert und zusammen mit dem Polyacrylamidgel für etwa 15min in

Transferpuffer (20% [v/v] CH_3OH + 48mM TRIS + 39mM $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ + 1,3mM 10% SDS) äquilibriert. Anschließend wurden Gel und Membran von in Transferpuffer getränkten Filterpapieren eingerahmt, welche als Ionen-Reservoir dienten. Senkrecht zum Polyacrylamidgel wurde ein elektrisches Feld angelegt, Transferpuffer ermöglichte den Proteintransfer über eine Stunde bei 200mA (siehe Abb. 4-4). Für die Immundetektion der Proteine wurde die PVDF-Membran auf dem Schüttler in Blockierlösung (5% [w/v] Milchpulver, 0,1% Tween20 in TBS) inkubiert (60min, 4°C), um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde sie dreimal für je 10min in TBS-T (TBS + 0,1% [v/v] Tween20) gewaschen, bevor sie mit einem Primärantikörper (in TBS-T + 5% [m/v] Milchpulver) inkubiert wurde (ü.N., 4°C). Dieser detektierte das nachzuweisende Protein und wurde je nach Fragestellung gewählt. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen, bevor sie mit einem Sekundärantikörper (in TBS-T + 5% [m/v] Milchpulver) inkubiert wurde (60min, 4°C). Dieser Antikörper erkannte den verwendeten Primärantikörper und war zum Nachweis mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Konzentrationen siehe Tab. 4-6). Nach einem erneuten Waschschrift (dreimal für je 15min in TBS-T) wurde die

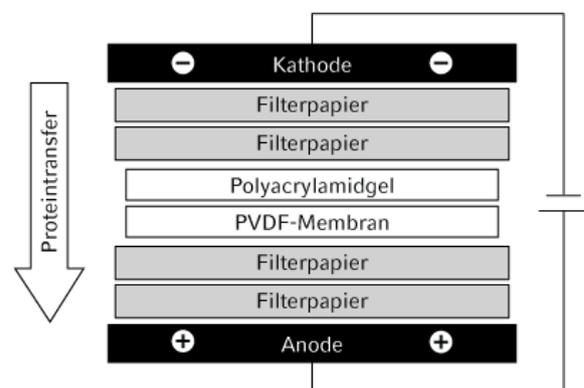


Abb. 4-4: Aufbau eines Westernblots

Membran zur Detektion mittels Röntgenfilmen in der Dunkelkammer mit Lumineszenzreagenz (ECL) als Substrat benetzt. Je nach Stärke des Signals wurden unterschiedliche Expositionszeiten gewählt.

Tab. 4-6: Verwendete Antikörperkonzentrationen

	Verdünnung
α -rabbit IgG-ECL	1 : 5.000
α -rat IgG-ECL	1 : 5.000

Strippen von PVDF-Membranen

Bei einigen Fragestellungen wurde eine PVDF-Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörper-Molekülen behandelt. Um unerwünschte Signale zuvor benutzter Antikörper zu vermeiden, wurden diese auf der Membran denaturiert und durch Waschen entfernt. Hierzu wurde die Membran mit Denaturierungs-Puffer (2% [w/v] SDS + 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) in der Mikrowelle erhitzt und nach Zugabe von 100mM β -Mercaptoethanol für 10min geschüttelt. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10min wie unter 4.1.9 beschrieben in TBS-T gewaschen und schließlich erneut behandelt.

4.2.6 ELISA

Der Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Dabei können Proteine oder niedermolekulare Verbindungen durch Antikörper nachgewiesen werden, welche an Enzyme gekoppelt sind. Die durch die Enzyme katalysierte Reaktion weist das Vorhandensein des Antigens nach, indem sie durch Umsetzung eines Substrates üblicherweise einen Farbumschlag erzeugt. Die Signalstärke ist dabei im Allgemeinen

abhängig von der Antigenkonzentration, sodass auch quantitative Aussagen möglich sind⁹⁰. In dieser Arbeit wurden Streptavidin-beschichtete 96-Loch-Platten mit biotinylierten Peptiden unterschiedlicher Konzentration (in PBS + 0,05% [v/v] Tween20) inkubiert (ü.N., 37°C). Durch die Interaktion von Streptavidin mit Biotin wurden die Peptide an die 96-Loch-Platte gebunden. Nach zwei Waschschritten (PBS + 0,05% [v/v] Tween20) wurde die 96-Loch-Platte mit Blockier-Lösung (PBS + 0,05% [v/v] Tween20 + 1% [w/v] BSA) inkubiert (60min, 37°C), um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Je nach Fragestellung wurden den an die Platte gebundenen Peptiden nach zwei weiteren Waschschritten (PBS + 0,05% [v/v] Tween20) 200ng Kinase (in 20mM Hepes pH7.6 + 1mM MgCl₂ + 1mM EGTA + PPI) und Substrat (10 μ M ATP) zugegeben und inkubiert (60min, RT). Nach zwei weiteren Waschschritten (PBS + 0,05% [v/v] Tween20) wurde ein Erstantikörper (in PBS + 0,05% [v/v] Tween20) zugegeben und inkubiert (2h, 37°C). Dieser Antikörper richtete sich gegen das zu untersuchende Peptid und wurde je nach Fragestellung entsprechend gewählt. Die an die Platte gebundenen Peptide wurden zweimal gewaschen (PBS + 0,05% [v/v] Tween20) und anschließend mit einem Zweitantikörper inkubiert (2h, 37°C), der je nach verwendeten Erstantikörper gewählt wurde und zur Detektion mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Nach zwei letzten Waschschritten (PBS + 0,05% [v/v] Tween20) wurden die Peptide mit *SigmaFAST™ OPD* Substrat inkubiert (30min, RT) um die gebundenen Antikörper im *Biotek Photospektrometer™* nachzuweisen und mittels *Gen5™ v1.045* auszuwerten.

4.2.7 Peptide-Array Assay

Der *Peptide-Array Assay* (PAA) ist ein Verfahren zur Beurteilung der Spezifität von Antikörpern. Es lassen sich insbesondere Aussagen über polyklonale Antikörper treffen, welche sich gegen ein bestimmtes Epitop eines bekannten Proteins richten. Hierbei lassen sich unterschiedliche Zustände des Proteins (z.B. Methylierungen, Phosphorylierungen, etc.) untersuchen und somit Aussagen über die Spezifität der eingesetzten Antikörper treffen. Das zu untersuchende Protein wird dabei in einzelne, sich überlappende Peptidfragmente von jeweils 10 bis 20 Aminosäuren Länge aufgeteilt und industriell auf einen Objektträger aufgetragen, den sog. *Peptide-Array*. Hierbei ist jedem bekannten Peptidfragment eine bekannte Koordinate auf dem Objektträger zugeordnet. So lassen sich nach Detektion der Signale des zu charakterisierenden Erstantikörpers mittels eines fluoreszierenden Zweitantikörpers Rückschlüsse auf die Spezifität gegenüber dem an dieser Koordinate aufgetragenen Peptid ziehen⁹¹. Der in dieser Arbeit eingesetzte *Peptide-Array* wurde durch *JPT Peptide Technologies* hergestellt (siehe Anhang D). Um unerwünschte Bindungen des Antikörpers mit der Oberfläche des Objektträgers zu vermeiden, wurde die Oberfläche zunächst für eine Stunde mit PBS + 2% [w/v] BSA behandelt und auf diese Weise blockiert. Bei allen Schritten der Untersuchung mit dem *Peptide-Array* war stets darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen auf der Oberfläche des Objektträgers bildeten und so falsch negative Ergebnisse verursachten. Die Flüssigkeit wurde abgetropft und der *Peptide-Array* schließlich mit 800µl des zu charakterisierenden Erstantikörpers (je nach Antikörper in Serum, bzw. PBS) inkubiert

(ü.N., 4°C). Um ungebundene Antikörpermoleküle von der Oberfläche zu entfernen und so unspezifische Signale der Antikörper möglichst zu vermeiden, wurde der *Peptide-Array* einmal für 15min und anschließend zweimal für je 5min mit PBS-T (PBS + 0,05% [v/v] Tween20) gewaschen. Um die gebundenen Antikörper schließlich zu detektieren, wurde der Objektträger für eine weitere Stunde mit 2,5ml Zweitantikörper (in PBS) inkubiert, einmal für 15min und viermal für jeweils 5min mit PBS-T gewaschen. Um wiederum Rückstände des PBS von der Oberfläche des Objektträgers zu entfernen wurde dieser abschließend je einmal mit H₂O_{dest} und 100% [v/v] Methanol gewaschen. Das Signal wurde mittels *Infrarotscanner Odyssey* ausgelesen und unter Verwendung von *Odyssey Application Software v2.1.12* ausgewertet.

4.2.8 Peptide-Competition Assay

Der *Peptide-Competition Assay* (PCA) ist eine Methode zur Beurteilung der Spezifität von Antikörpern. Insbesondere lassen sich Aussagen über die Spezifität polyklonaler Antikörper treffen, welche sich gegen eine bestimmte Domäne eines Peptids richten (z.B. gegen ein phosphoryliertes Epitop). Zu Beachten ist, dass es bei erfolgreicher Bindung des Antikörpers an das Peptid zu einem Signalverlust kommt⁶⁵. Die zu untersuchenden Antikörper wurden hierbei zunächst mit rekombinant hergestellten Peptiden inkubiert (4h, 4°C), welche das zu erkennende Epitop in sich trugen, bzw. mit Peptiden ohne das zu erkennende Epitop, die als Negativkontrollen dienten. Anschließend wurde die Antikörper-Peptid-Suspension wie unter 4.1.3, bzw. 4.2.5 beschrieben, anstelle des bloßen Einsatzes eines Antikörpers verwendet.

4.3 Massenspektrometrische Methoden

4.3.1 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Verfahren sind gut geeignete Methoden zur Analyse von chemisch veränderten Proteinen. Sie zählen heute zum Goldstandard bei der Analyse von posttranslationalen Histonmodifizierungen und erlauben neben der Quantifikation einzelner Histonmodifizierungen auch die quantitative Analyse von unterschiedlichen Kombinationen mehrerer Modifizierungen in einem Histon. Die Massenspektrometrie ist anderen verbreiteten Methoden zur Analyse von Histonmodifizierungen, wie den PAGE-Verfahren, hinsichtlich der Spezifität und Nachweisgrenze überlegen⁹². Die Analyse von Histonproteinen bedingt eine spezifische Aufbereitung der Proben für die anschließende Untersuchung in der Massenspektrometrie⁹³.

4.3.1.1 Aufbereitung der Gele

Zur massenspektrometrischen Analyse von Histonen wurden diese wie unter 4.2.1 beschrieben aus HeLa Zellen gefällt, wie unter 4.2.3.1 beschrieben über SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich wie unter 4.2.4 beschrieben angefärbt. Die so sichtbar gemachte Bande wurde aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und konnte anschließend für die Analyse in der Massenspektrometrie aufbereitet werden. Hierbei war besonders darauf zu achten, dass es zu keiner unerwünschten Kontamination der Proben mit anderen Proteinen kam (z.B. Keratin). Die Banden wurden hierzu in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ bedeckt und bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse der Proteine wurden diese dann wie unter 4.2.4 beschrieben entfärbt und wie unter 4.3.1.2 beschrieben weiter aufbereitet.

4.3.1.2 Aufbereitung der Proteine

Da ganze Proteine i.d.R. zu große Massen besitzen, um in der Massenspektrometrie untersucht werden zu können, mussten diese zunächst mittels Trypsin degradiert werden⁹³. Trypsin schneidet dabei direkt hinter unmodifizierten Argininen und Lysinen. Da Histone jedoch ein hohes Maß dieser Aminosäuren besitzen, war es nötig unmodifizierte Lysine chemisch zu acetylieren, um einen Überverdau der Proteine zu vermeiden⁹³. Um die Gelbanden zunächst von Wasser zu befreien, wurden die entfärbten Fragmente jeweils mit 100µl Acetonitril inkubiert (5min, 37°C). Der Überstand wurde verworfen und der Entfärbeschritt so oft wiederholt, bis die Banden sich komplett weiß färbten. Zur chemischen Acetylierung (Schutz vor Überverdau durch Trypsin) wurde der Überstand erneut entfernt und anschließend mit 10µl 0,1M Ammoniumbicarbonat, gefolgt von 1µl Anhydrit behandelt (45min, 37°C). Es war darauf zu achten, dass sich durch entweichendes CO_2 kein zu hoher Druck im Reaktionsgefäß aufbaute. Anschließend wurden die Proben zweimal mit 200µl 0,1M Ammoniumbicarbonat und einmal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ für je 5min gewaschen und erneut wie oben beschrieben dehydriert. Zum Trypsin-Verdau wurde der Überstand entfernt und die Proben mit je 10µl 50mM Ammoniumbicarbonat und 1µl Trypsin [0,2µg/µl] inkubiert (5min, 4°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30µl 50mM Ammoniumbicarbonat gestartet (37°C, ü.N.) und nach erfolgreichem Verdau durch Zugabe von 10% Trifluoressigsäure und Lagerung der Proben auf Eis gestoppt. Die verdauten Proteine verließen ü.N. das Gel und lagen gelöst im Überstand vor.

4.3.1.3 Anreicherung der Peptide

Zur Analyse in der Massenspektrometrie wurden die unter 4.3.1.2 Trypsin-verdauten Proteine, bzw. kurze, synthetische Peptide angereichert. Es kamen je nach Fragestellung unterschiedliche Methoden zu Einsatz:

Millipore ZipTip™_{μ-C18}-Pipettierung

ZipTip™_{μ-C18}-Pipettierung ermöglicht durch eine chromatographische Pipettenspitze das Aufreinigen und Konzentrieren von Proteinproben mit niederem Molekulargewicht im Bereich von Femtomol bis hin zu wenigen Picomol⁹³. Hierzu wurden 3μl der unter 4.3.1.2 Trypsin-verdauten Proteine, bzw. der kurzen, synthetischen Peptide jeweils 7μl 0,1% [v/v] TFA zugegeben. Eine *ZipTip™_{μ-C18}*-Pipette wurde mehrmals mit 10μl 100% [v/v] Acetonitril angefeuchtet und dreimal mit 10μl 0,1% [v/v] TFA äquilibriert. Anschließend wurde die Probensuspension dreimal mit der *ZipTip™_{μ-C18}*-Pipette aufgezogen und verworfen. Die *ZipTip™_{μ-C18}*-Pipette wurde dreimal mit jeweils 10μl 0,1% [v/v] TFA gewaschen und schließlich mit 10μl Elutionslösung (50% [v/v] C₂H₃N + 0,1% [v/v] TFA in H₂O_{bidest}) in ein frisches 1,5ml fassendes Reaktionsgefäß mit 2μl bereits vorgegebener Elutions-Lösung eluiert.

Glygen TopTip™-TiO₂-Pipettierung

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Anreicherung speziell phosphorylierter Peptide wurde je nach Fragestellung mittels *Glygen TopTip™-TiO₂*-Pipettierung erreicht. Bei dieser Methode wurde sich zu Nutzen gemacht, dass chromatographische Pipetten mit Titaniumdioxid-Beschichtung insbesondere an Peptide mit Phosphorylierungen bindet⁹⁴. Hierzu wurde eine *TopTip™-TiO₂*-Pipette zunächst dreimal mit je 10μl 1% [v/v] TFA angefeuchtet. Dann wurden die unter 4.3.1.2

Trypsin-verdauten Proteine, bzw. die kurzen, synthetischen Peptide dreimal aufpipettiert und verworfen. Die *TopTip™-TiO₂*-Pipette wurde dreimal mit je 10μl 1% [v/v] TFA gewaschen und an das TiO₂ gebundenen Peptide zweimal mit je 4μl und einmal mit 8μl 1% [v/v] Ammoniak in 4μl 10% [v/v] TFA eluiert. Das Eluat wurde unter Zuhilfenahme der *ZipTip™_{μ-C18}*-Pipettierung aufbereitet.

4.3.2 Analyse in der MALDI-ToF MS

Zur Analyse im *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* - Flugzeit-Massenspektrometer (MALDI-ToF MS) wurden die unter 4.3.1.2 gewonnenen und unter 4.3.1.3 aufbereiteten Proben zusammen mit einem Matrix-Salz auf eine geeichte Metallplatte übertragen, um anschließend im *Voyager-DE™ STR Bio-Spectrometry™* Analysator mit einem Laserstrahl ionisiert und in die Gasphase übertragen werden zu können. Auf diese Weise konnte über das Flugverhaltender einzelnen Probenbestandteile im Vakuum auf deren Masse zurückgeschlossen werden⁹⁵. Die anschließende Auswertung fand mittels *Data Explorer v4.0*, bzw. *Manuelito v2.0* statt. Je nach Fragestellung kamen in dieser Arbeit verschiedene Matrix-Salze zur Anwendung.

α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA)

HCCA ist eine der gängigsten Matrices in der MALDI-ToF MS Analyse mit einem λ_{\max} von 337nm bzw. 355nm. Sie ist insbesondere geeignet für Peptide (~10kDa)⁹⁶. In dieser Arbeit wurden jeweils 2μl der wie unter 4.3.1.3 angereicherten Peptide mit jeweils 2μl HCCA-Matrix (HCCA + 50% [v/v] C₂H₃N + 50% [v/v] TFA) vermischt und auf die geeichte Metallplatte aufgetragen und getrocknet.

2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)

DHB ist eine häufig verwendete MALDI-ToF MS Matrix mit einem λ_{max} von 337nm bzw. 355nm. Sie ist geeignet für Proteine unter 10kDa, sowie negative Ionen⁹⁷. In dieser Arbeit wurden jeweils 2 μ l der in 4.3.1.3 angereicherten Peptide mit 2 μ l DHB-Matrix (130mM DHB + 50% [v/v] C₂H₃N + 1% [v/v] H₃PO₄) auf die geeichte Metallplatte aufgetragen und getrocknet.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Amplifikation und gezielte Veränderung von Zielgenen

Um die Bedeutung und die Funktion einzelner Aminosäuren eines Histonproteins *in vivo* zu untersuchen, wurden Histone mit entsprechenden Aminosäureaustauschen in humanen Zellen exprimiert und charakterisiert.

4.4.1.1 Generierung von Primern

Zum gezielten Einbringen einer Punktmutation in ein Gen wurde die PCR-Methode angewendet (siehe 4.4.2.2). Dafür wurden kurze einzelsträngige DNA-Fragmente von etwa 23bp Länge benötigt, sogenannte Primer, um die entsprechende Mutation in der PCR zu generieren. Jeweils zwei Primer wurden dabei so gewählt, dass Ihre Sequenz komplementär zu der zu mutierenden DNA-Region (sog. Matrize) in einem Plasmid war. Einzig eine Base unterschied sich dabei auf den beiden Strängen des Plasmids von der ursprünglichen Sequenz und führte so zu einer gezielten Punktmutation in den synthetisierten Tochtersträngen⁹⁸. Die Primer wurden kommerziell von *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* erworben (siehe Tab. 3-7).

4.3.3 Analyse in der Orbitrap MS/MS

Zur Analyse in der Orbitrap MS/MS wurden die entsprechenden Peptide wie unter 4.3.1.1, bzw. 4.3.1.2 aufgearbeitet und wie unter 4.3.1.3 beschrieben angereichert. Die anschließenden Analyse in der Orbitrap MS/MS wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU München durchgeführt.

4.4.1.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation und Veränderung von DNA *in vitro*. Wie unter 4.4.1.1 beschrieben lagern sich dabei Primer an die zu vervielfältigende DNA-Sequenz an. Unter Zugabe einer Polymerase, ausreichend dNTPs, bzw. einem geeigneten Puffer (siehe Tab. 4-7) werden DNA-Einzelstränge bei Durchlaufen eines Temperaturprofils (siehe Tab. 4-8) DNA-Doppelsträngen verlängert⁹⁸. Als DNA-Matrizen dienten die für die Histone H3.1 bzw. H3.3 codierenden Gensequenzen, die mit einem HA-Epitop markiert im pIRESneo-Vektor

Tab. 4-7: Verwendeter PCR-Ansatz

	Vol
DNA-Matrize	1,8 μ l
F-Primer]	1 μ l
R-Primer	1 μ l
10mM dNTPs	0,4 μ l
Phusion HF Puffer, 5x	4 μ l
Phusion DNA-Polymerase	1 μ l
H ₂ O _{dest}	11,6 μ l
(gekühlt auf Eis)	

Tab. 4-8: Verwendetes PCR-Temperaturprofil

98°C	30sec	17 Zyklen	Initialisierung
98°C	30sec		Denaturierung
57°C	20sec		Primer-Anlagerung
68°C	165sec		Elongation
4°C	∞		Lagerung

vorlagen (siehe Anhang C). Die Plasmide wurden freundlicherweise von Frau Dr. S. B. Hake und Herrn C. Bönisch zur Verfügung gestellt. Um die ursprünglichen Plasmide, welche die Punktmutation nicht enthielten, aus der Suspension zu entfernen und eine Expression des ursprünglichen Proteins zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz mit dem Restriktionsenzym DPN1 behandelt (90min, 37°C). Dieses Enzym verdaute spezifisch methylierte (bakteriell synthetisierte) DNA, wie den initial verwendeten Vektor pIRESneo/HA. Dabei wurden in der PCR synthetisierte DNA-Segmente nicht geschnitten, da diese keine Methylierung aufwiesen.

4.4.1.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterienstämmen

Wie unter 4.1.1 beschrieben sind einige Bakterien zur Aufnahme freier DNA fähig. In dieser Arbeit wurden hierzu 100µl der *Comp. XL1-Blue* mit 1µl der unter 4.4.2.2 amplifizierten DNA inkubiert (30min, 4°C). Anschließend wurde die Bakterien zur Aktivierung im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt (45sec, 42°C), welcher die Aufnahme der Plasmid-DNA ermöglichte. Nach Zugabe von 900µl LB0-Medium wurden die Bakterienzellen noch einmal zu Vermehrungszwecken inkubiert (60min, 37°C) und schließlich wie unter 4.1.1.1 beschrieben ausplattiert, bzw. mittels der im Vektor enthaltenen Ampicillinresistenz selektioniert.

4.4.1.4 DNA-Aufreinigung

Die in Bakterien transformierten Plasmide wurden nach Amplifikation durch die Bakterien mit Hilfe entsprechender Kits aus den Kulturen isoliert. Das zugrunde liegende Prinzip basiert auf der alkalischer Lyse der Zellen und der anschließenden Fällung von genomischer DNA und Proteine. Die Plasmid-DNA bleibt dabei in Lösung. Durch den Zusatz von RNaseA wird sämtliche RNA abgebaut (Verhinderung ungewollter Synthese) und Plasmid-DNA kann schließlich gereinigt und eluiert werden⁹⁹. Zur Kontrolle wurden die aufgereinigten Plasmide kommerziell durch *Sigma Eurofins MWG* sequenziert.

Promega Wizard® Miniprep Aufreinigung

Für die Amplifikation von Plasmiden im kleinen Maßstab wurde wie unter 4.1.1.2 beschrieben eine Bakterienkolonie (ü.N., 37°C) von einer Agarplatte gepickt und in 5ml LB-Medium im Schüttelinkubator angezogen (200rpm, ü.N., 37°C). Diesem wurde entsprechend der Resistenzeigenschaften des Bakterienstammes Antibiotika zugesetzt (siehe Tab. 4-1) und inkubiert (ü.N. 37°C). Die Plasmide wurden unter Verwendung des *Promega Wizard® Miniprep Systems* nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels des *NanoDrop®* Photospektrometers ermittelt.

QIAGEN® Plasmid Maxi Kit Aufreinigung

Zur Aufreinigung im großen Maßstab amplifizierter Plasmide wurde das *QIAGEN® Plasmid Maxi Kit* verwendet. Dabei wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Konzentration der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *NanoDrop®* Photospektrometers bestimmt. Die Proben wurden anschließend bei -20°C aufbewahrt.

4.4.1.5 Transfektion von HeLa-Zellen

Um die unter 4.4.2.4 aufgereinigten Plasmide in *HeLa-Zellen* zu übertragen und stabil zu exprimieren wurden zunächst wie unter 4.1.2.1 beschrieben *HeLa-Zellen* in einer 6-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät und bei Erreichen von 70 - 90% Konfluenz der Zellen transfiziert. Hierzu wurde zunächst pro Ansatz eine Transfektions-Suspension (100µl Opti-MEM-Medium + 1µg Plasmid + 6µl *FuGENE® HD Transfection Reagent*) angesetzt und inkubiert (15min, RT). Anschließend wurde das Medium der Zellen abgesaugt, die Transfektions-Suspension zupipettiert und die Zellen ü.N. inkubiert (siehe 4.1.2). Um einen Selektionsdruck aufzubauen und eine stabile Expression der Konstrukte zu gewährleisten wurde die Transfektions-Suspension nach 24h abgesaugt und die Zellen wie unter 4.1.2.2 beschrieben mittels Neomycin für mindestens zwei Wochen selektioniert.

4.4.2 Expression/Assemblierung von Mononukleosomen *in vitro*

Um die Bedeutung und die Funktion einzelner Aminosäuren eines Histonproteins bzw. einzelner Histonvarianten *in vitro* untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit Histone rekombinant hergestellt. Hierzu wurden humane Histone in Bakterien exprimiert. Die entsprechenden *Escherichia coli* Kulturen *BL21 Codon Plus* mit bereits erfolgreich transformierter pET21 Plasmiden wurden freundlicherweise von Frau S. Dambacher zur Verfügung gestellt. Diese Plasmide enthielten bereits die Gene der einzelnen Histone (H1, H2A, H2B und H4) bzw. einzelner Histonvarianten (H3.1, bzw. H3.3) und konnten direkt durch Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium amplifiziert werden.

4.4.2.1 Induzierbare Plasmide

Da humane Histone in Bakterienzellen toxische Eigenschaften besitzen wurde in dieser Arbeit ein induzierbares System benutzt. Das in *BL21 CodonPlus* transformierte Plasmid trug neben einem Resistenzgen zur Selektion der Bakterien im Flüssigmedium die eigentliche Histonsequenz hinter einem Operator, welcher die Transkription des Proteins je nach Vorhandensein des Induktors IPTG steuerte¹⁰⁰. Die transformierten Bakterien wurden wie unter 4.1.1.2, bzw. 4.1.1.3 beschrieben in antibiotikahaltigem Flüssigmedium (siehe Tab. 4-9) bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,6 angezogen. Anschließend wurde die Transkription des Proteins durch Zugabe von 0,1mM IPTG induziert und die Bakterien weiter im Schüttelinkubator inkubiert (3h, 200rpm, 37°C). Schließlich wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10min, 5.000xg, RT), in Puffer aufgenommen (1mM EDTA + 50mM TRIS pH 7,4 + 0,1M NaCl in H₂O_{dest}), mittels Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Tab. 4-9: Verwendete Antibiotikakonzentrationen

	Konzentration
Ampicillin	1ml/l
Chloramphenicol	34mg/ml

4.4.2.2 Protein-Aufreinigung

Zum Aufschließen der Bakterienzellen und zum Aufreinigen der rekombinanten Proteine wurden diese zunächst aufgetaut und abzentrifugiert (10min, 1.700xg, 4°C). Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in 100ml Waschpuffer 1 (1mM EDTA + 50mM TRIS pH 7,4 + 0,1M NaCl in H₂O_{dest}) aufgenommen und auf je acht 50ml Röhrchen verteilt. Jeder Ansatz wurde viermal für je 30sec sonifiziert (Amplitude 30) und

abzentrifugiert (20min, 20.000xg, 4°C). Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in 50ml Waschpuffer 2 resuspendiert (1mM EDTA + 50mM TRIS pH 7,4 + 0,1M NaCl + 1% [v/v] TritonX-100 in H₂O_{dest}) und in je vier 50ml Röhren überführt. Jeder Ansatz wurde zweimal für je 30sec sonifiziert (Amplitude 30) und abzentrifugiert (20 min, 20.000xg, 4°C). Die Sonifizierung wurden erst mit Waschpuffer 2 und anschließend mit Waschpuffer 1, sowie den entsprechenden Zentrifugationsschritten wiederholt. Schließlich wurden die Überstände verworfen und die Pellets erneut in Waschpuffer 1 aufgenommen und in je vier 50ml Röhren übertragen. Jeder Ansatz wurde abschließend noch einmal sonifiziert (Amplitude 30) und abzentrifugiert (20min, 20.000xg, 4°C). Nach Verwerfen der Überstände wurden die Pellets in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Die Auftrennung der einzelnen Histonfraktionen über eine Chromatographie-Säule, sowie die Assemblierung zu Chromatin und Mononukleosomen *in vitro* erfolgte unter Zusammenarbeit mit Frau C. Mehlhorn und Frau S. Dambacher.

4.4.3 Gewinnung und Aufreinigung von Mononukleosomen *in vivo*

Zur speziellen Charakterisierung bestimmter Antikörper-Epitope wurden N-terminal verkürzte Mononukleosomen generiert^{101,102}. Hierzu wurde *in vivo* synthetisiertes, mitotisches Chromatin verwendet. Die Synthese *in vivo* war von besonderer Bedeutung, um sicherzustellen, dass die gewonnenen einzelnen Mononukleosomen auch die von den Antikörpern mutmaßlich zu erkennenden PTM aufwiesen.

4.4.3.1 MNase-Verdau

Zur Gewinnung von *in vivo* synthetisierten Mononukleosomen wurden $1 \cdot 10^7$ HeLa Zellen wie unter 4.1.2 beschrieben angezogen. Die Zellen wurden für 18 Stunden mit Nocodazol behandelt und wie unter 4.1.2.2 beschrieben abgenommen. Anschließend wurden die mitotischen Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (10min, 310xg, RT) und nach Entfernen des Überstandes bis zur weiteren Bearbeitung bzw. Analyse bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen lysiert (0,05mM DTT + 20mM HEPES/KOH + 20% [w/v] Glycerol + 0,2mM EDTA + 0,2% [v/v] TritonX-100 + 300 mM KCl in H₂O_{bidest} + PPI) und erneut abzentrifugiert (5min, 650xg, 4°C). Zur gezielten Spaltung des zellulären Chromatins in einzelne Mononukleosomen wurde das gewonnene Pellett anschließend mit MNase verdaut (50µl 20mM CaCl₂ + 4µl MNase in 1ml 20mM HEPES/KOH + 20% [w/v] C₃H₈O₃ + 0,2mM EDTA + 0,2% [v/v] TritonX-100 + 300mM KCL in H₂O_{bidest} + PPI). MNase schneidet dabei die DNA an den frei zugänglichen Stellen zwischen den einzelnen Nukleosomen, wodurch einzelne Mononukleosomen freigesetzt werden²⁰. Nach vorher festgelegten Zeitpunkten wurden jeweils 100µl des Ansatzes abgenommen und der Verdau durch Zugabe von 0,5µl 0,5M EGTA und Lagerung auf Eis gestoppt. Schließlich wurden die einzelnen Ansätze abzentrifugiert (20min, 20.800xg, 4°C) und die Überstände jeweils in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

4.4.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um den Grad der Verdauung des Chromatins zu überprüfen (siehe 4.4.3.1), wurde die mit MNase behandelte DNA auf die Länge ihrer einzelnen Fragmente überprüft. Hieraus ließ

sich zurückschließen, ob der Verdau vollständig war und das Chromatin zu Mononukleosomen gespalten wurde. DNA wurde hierzu aus einem kleinen Volumen der Überstände aus 4.4.3.1 mittels Zugabe von einem gleichen Volumen von Phenol/Chloroform unter Vortexen aufgereinigt. Nach Zentrifugation (5min, 16.000xg, RT) wurde die obere Phase abgenommen und der Schritt einmal mit Phenol/Chloroform und einmal nur mit Chloroform mit Vortexen und Zentrifugation wiederholt. Schließlich wurde die DNA aus der oberen Phase gefällt (Zugabe von $\frac{1}{9}$ Vol 3M $C_2H_3NaO_2$ + 3Vol 100% [v/v] C_2H_6O +2 μ l Glykogen: 15min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation (20min, 16.000xg, 4°C) wurden die Pellets durch mit 70% [v/v] Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15min, 16.000xg, 4°C) und nach Lufttrocknen wie unter 4.2.2 beschrieben über ein einfaches Agarose-Gel aufgetrennt.

4.4.3.3 Trypsin-Verdau

Um nur die N-Terminalen Enden der Histone zu verdauen, die in die einzelnen Mononukleosomen integriert waren, wurde den unter 4.4.3.1 gewonnenen Mononukleosomen Trypsin zugegeben¹⁰². Hierzu wurden die Überstände der erfolgreich gewonnenen Mononukleosomen (siehe 4.4.3.2) vereint und diesen 50mM Ammoniumbicarbonat zugegeben. Der Verdau wurde durch Zugabe von 0,1 μ g Trypsin gestartet, während die Proben auf dem Thermoschüttler inkubiert wurden (800rpm, 25°C). Zu vorher bereits definierten Zeitpunkten wurden je 16 μ l der Suspension abgenommen und der Trypsin-Verdau durch Zugabe von einem gleichen Volumen von 1% [v/v] TFA und zusätzliche Lagerung auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die einzelnen Proben wie unter 4.2.3.1 beschrieben per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot-Analyse untersucht (siehe 4.2.5).

5 ERGEBNISSE

5.1 Biochemische Untersuchung Zellzyklus- und Varianten-spezifischer Histon-Phosphorylierungen durch Gel-Elektrophorese Verfahren

Eine Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Identifizierung neuer PTMs während der Mitose und Apoptose. Da bisher vermehrt Histon-Phosphorylierungen in diesen Zellstadien gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei bislang unentdeckten Histon PTMs ebenfalls um solche PTMs handeln könnte (siehe 2.1). Hierzu wurden unter Einsatz von A/U-, T/A/U- und 2D-T/A/U-PAGE Verfahren die kanonischen Histone und, soweit möglich, ihre Varianten untersucht. Insbesondere Phosphorylierungen der Varianten H3.1, H3.2 und H3.3 sollten identifiziert werden. Die Auftrennung von Histon-Isoformen bzw. -Varianten erfolgte über deren Ladungs- bzw. Sequenzunterschieden mittels ein oder zweidimensionaler A/U- bzw. T/A/U-PAGE Gelelektrophorese Verfahren^{70,72,73}.

HeLa Zellen konnten durch Behandlung mit Nocodazol in der Mitose arretiert und unbehandelten, asynchronen HeLa Zellen gegenübergestellt werden. Apoptotische HeLa Zellen wurden durch UV-Bestrahlung mit 100.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ gewonnen. Die bestrahlten Zellen wurden jeweils 30, 180 und 360 min nach Bestrahlung geerntet und mit unbestrahlten Zellen verglichen. Die UV-Bestrahlung führte zu irreparablen DNA-Schäden, was die Induktion der Apoptose durch die Zelle nach sich zog¹⁷. Aus den mitotischen, apoptotischen und asynchronen bzw. unbehandelten HeLa Zellen wurden in der Durchflusszytometrie auf ihre Zellzyklusphasen untersucht. Hierzu wurde die DNA der Zellen nach Methanol-Fixierung unter Zugabe von Propidiumiodid quantitativ gefärbt. Über die Intensität des detektierten Propidiumiodid-Signals konnte den Zellen eine Phase im Zellzyklus zugeordnet werden. Anschließend wurden aus allen Zellen Histone isoliert.

In der Auswertung der einzelnen Zellpopulationen zeigte sich eine erfolgreiche Anreicherung der für 18 h Nocodazol-behandelten Zellen (0,1 ng/ μl) in der G₂/M-Phase auf etwa 86% (siehe Abb 5-1 A). HeLa Zellen, die mit UV-Licht bestrahlt worden waren (100.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) zeigten hingegen bereits 180 min nach UV-Bestrahlung einen Übergang in die Apoptose. 360 min nach UV-Behandlung waren beinahe alle Zellen der UV-bestrahlten Population in die Apoptose übergetreten. Bei Aufbereitung der UV-bestrahlten Zellen für die Untersuchung in der Durchflusszytometrie wurde auf eine Fixierung durch Zugabe von Methanol verzichtet. Die zunehmende Permeabilität der Zell- und Kernmembran aufgrund des Zelluntergangs ermöglichte bereits das Eindringen von Propidiumiodid in den Zellkern und somit die gewünschte Anfärbung der DNA. Eine Unterscheidung von nekrotischen von apoptotischen Zellen erfolgte über das unterschiedliche Färbeverhalten, das sich aufgrund frühzeitiger Fragmentierung der nekrotischen Zellen erklärt (siehe Abb 5-1 B).

In der Auftrennung der aufbereiteten Histone über die A/U-PAGE zeigten sich im Vergleich zu den Proben, die aus asynchronen HeLa Zellen gewonnen worden waren, für die Nocodazol-behandelten Proben einige auffällige Banden, welche in ihrer Lokalisation Histon H1 zugeordnet werden konnten.

Unter Durchleuchtung konnten neun Banden identifiziert werden, gegenüber fünf Banden in den unbehandelten Proben. Die Differenz von sechs Banden argumentierte für eine Hyperacetylierung bzw. -phosphorylierung von H1 in der G₂- bzw. M-Phase. Bei Proben, die aus den UV-bestrahlten, apoptotischen HeLa Zellen gewonnen worden waren, zeigten sich in der A/U-PAGE im Vergleich mit den Proben der unbehandelten Kontrolle keine zusätzlichen Banden (siehe Abb. 5-1 C).

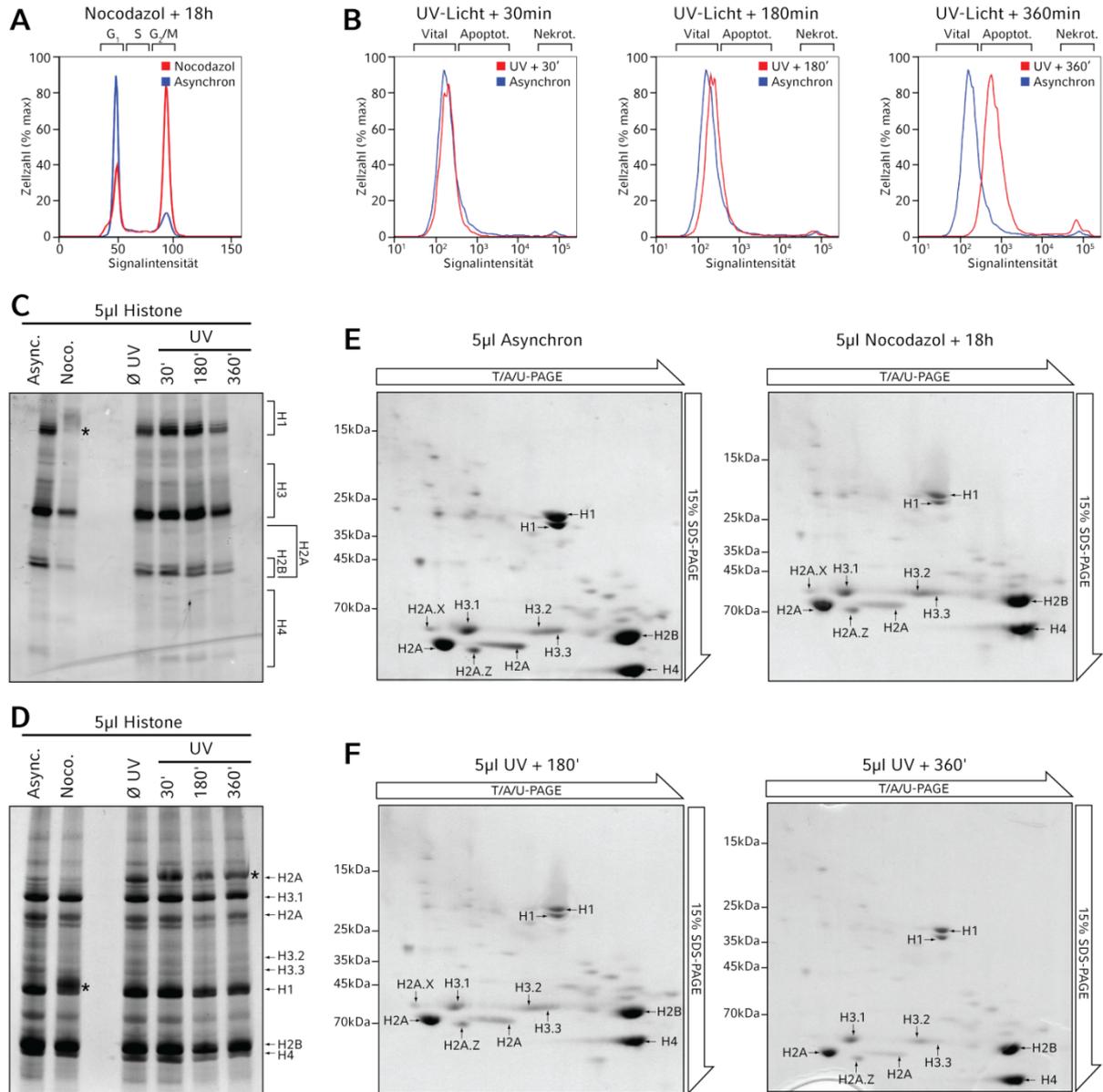


Abb. 5-1: Untersuchung Zellzyklus- und Varianten-spezifischer PTMs mittels PAGE-Verfahren

(A) Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse fixierter, Propidiumiodid-gefärbter HeLa Zellen. Roter Graph: HeLa Zellen 18 h nach Nocodazol-Behandlung (0,1 ng/μl) (zu unterscheiden sind G₁-, S-, G₂/M-Phase) bzw. (B) 30, 180, 360 min nach UV-Behandlung (100.000 μJ/cm²). Jeweils blauer Graph: unbehandelte HeLa Kontrollpopulation. X-Achse: gemessene Propidiumiodid-Intensität, Y-Achse: Anzahl gemessener Zellen. (C) Coomassie-gefärbte A/U- bzw. (D) T/A/U-PAGE Gele zur Auftrennung säuregefällter Histonfraktionen der unter A und B beschriebenen Zellen. Zu unterscheiden sind die einzelnen Histone nach Ladungs- bzw. Sequenzunterschieden. (*) Ladungsverschiebungen durch Acetylierungen, bzw. Phosphorylierungen der Histonproteine. (E) Coomassie gefärbte 2D-T/A/U-PAGE Gele zur Auftrennung säuregefällter Histone der unter A, bzw. (F) unter B beschriebenen HeLa Zellen. Zu unterscheiden sind die aufgetrennten Histonvarianten. Das Molekulargewicht ergab sich über zusätzliches Auftragen eines bekannten Protein-Größenstandards in der zweiten SDS-PAGE Dimension.

Übereinstimmend fanden sich auch bei Auftrennung der Histone über die T/A/U-PAGE die zusätzlichen H1 in den Proben der Nocodazol-behandelten HeLa Zellen. Im Gegensatz zur A/U-Page konnten überdies auch zusätzliche Banden detektiert werden, die in ihrer Lokalisation dem Histon H2A entsprachen. Hier zeigten sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weitere Banden bei den Proben, die aus den UV-behandelten HeLa Zellen gewonnen worden waren. Dies argumentierte letztlich für eine Acetylierung bzw. Phosphorylierung von Histon H2A nach UV-Bestrahlung bzw. nach Einleitung von Apoptosemechanismen durch die Zelle (siehe Abb. 5-1 D).

Der nächste Analyseschritt bestand in der sequentiellen Auftrennung durch eine 2D-T/A/U-PAGE. Hierbei bestätigte sich erneut für die Proben der HeLa Zellen, die in der G₂/M-Phase angereichert worden waren, eine Hyperacetylierung bzw. -phosphorylierung im Bandenmuster von Histon H1 (siehe 5-1 E). Interessanterweise konnte auch Histon H2A (bzw. H2A.X und H2A.Z) in den Proben der UV-behandelten Zellen ein auffälliges Bandenmuster zugeordnet werden. Im Verlauf konnte ein Signalverlust in den Proben aus UV-bestrahlten HeLa Zellen beobachtet werden. Insbesondere H2A.X konnte 360 min nach Bestrahlung nicht mehr eindeutig detektiert werden (siehe 5-1 F).

Zusammenfassend ließen sich Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen übereinstimmend in der A/U-, T/A/U-, und 2D-T/A/U-PAGE für das Histon H1 in mitotischen Zellen nachweisen. In der T/A/U- und 2D-T/A/U-PAGE zeigten sich für Histon H2A Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen in UV-bestrahlten Zellen. In der Auftrennung durch die 2D-T/A/U-PAGE kam es zudem zu einem Signalverlust von Histon H2A (bzw. H2A.X und H2A.Z). Für Histon H3 bzw. seine Histonvarianten H3.1, H3.2 und H3.3 konnten in keiner der durchgeführten PAGE Verfahren auffällige Bandenmuster im Vergleich mit Proben der unbehandelten Kontrollen beobachtet werden.

5.2 Die putative Mitose-spezifische Doppelmodifizierung Lysin 79 Trimethylierung und Threonin 80 Phosphorylierung auf Histon H3

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem Nachweis einer möglichen Histon-Doppelmodifizierung von Histon H3 mit einer Trimethylierung an Lysin 79 zusammen mit einer Phosphorylierung an Threonin 80 (H3K79me3T80ph) *in vivo*. Der Verdacht auf das Vorliegen von H3K79me3T80ph wurde anhand der bereits bekannten Trimethylierung an Lysin 79 aus der *Histone Code Hypothesis* bzw. der *Switch Hypothesis* abgeleitet (siehe 2.2.1). Erste Daten eines kommerziell erwerblichen Antikörpers gegen das entsprechende Epitop H3(74-83)K79me3T80ph wurden von Frau Dr. S. B. Hake erhoben und zeigten in der IF-Mikroskopie ein Mitose-spezifisches Signal im Chromatin von HeLa Zellen. Weitere Tests des Antikörpers durch Frau Dr. S. B. Hake i.S. eines *Peptide-Competition* Experiments mit anschließender Westernblot Analyse deuteten auf eine Spezifität des Antikörpers für das Epitop um H3(74-83)K79me3T80ph hin (siehe 2.2.2).

Ausgehend von den Vorarbeiten wurden HeLa Zellen zur immunozytochemischen Charakterisierung von H3K79me3T80ph in der IF-Mikroskopie untersucht. Dies diente u.a. auch der Untersuchung der

PTM bezüglich ihres genaueren Auftretens während des Zellzyklus, da sich in ersten IF-Analysen unter Verwendung des Antikörpers α -H3K79me3T80ph bereits Hinweise auf ein Mitose-spezifisches Auftreten von H3K79me3T80ph ergeben hatten (siehe 2.2.2). Zur Visualisierung des Zellkerns wurde die DNA der Zellen zunächst nach Fixierung durch Methanol mit DAPI angefärbt. Dies ermöglichte neben genauer Identifizierung und Lokalisation des Zellkerns auch die Abgrenzung des Zytoplasmas. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen die Proteinkinase Aurora-B (α -AIM) eingesetzt. Aurora B wird insbesondere in mitotischen Zellen sowie in den sog. *Midbodies* (Zell-Zell-Kontakten) stark exprimiert. Das Muster ist für die jeweiligen Mitosestadien charakteristisch. Auf diese Weise konnten Zellen in die verschiedenen Stadien der Mitose eingeteilt werden¹⁰³. Zusätzlich zur Detektion mit α -AIM wurden die Zellen mit einem weiteren Antikörper behandelt. Auch dieses Signal konnte anhand der Gegenfärbung mit α -AIM den Mitosestadien zugeteilt werden. Eingesetzt wurde als Kontrolle ein Antikörper gegen den Mitosemarker H3S10ph (α -H3S10ph)⁴⁷, bzw. α -H3K79me3T80ph. Die Signale der α -H3S10ph und α -H3K79me3T80ph wurden anschließend verglichen.

Bei Auswertung der Daten zeigten sich in der IF-Mikroskopie eine gelungene DAPI-Färbung mit Darstellung der Zellkerne der HeLa Zellen. Die Färbung mittels α -AIM zeigte eine Färbung insbesondere mitotischer Zellen sowie der *Midbodies*. Dies entsprach dem typischen Expressionsmuster der Kinase Aurora B¹⁰³. Der Antikörper α -H3S10ph zeigte ein spezifisches Färbemuster nur für mitotisches Chromatin. Durch Vergleich mit dem Antikörpersignal von α -AIM konnte gezeigt werden, dass es sich dabei ausschließlich um Zellen der Pro- bis Anaphase handelte. Dieses Signal war weitgehend identisch mit dem Signal des Antikörpers α -H3K79me3T80ph. Er zeigte ebenfalls ein spezifisches Muster von Chromatin mitotischer Zellen zwischen der Pro- und Anaphase (siehe Abb. 5-3). Der Antikörper gegen α -H3K79me3T80ph war somit Mitose-spezifisch.

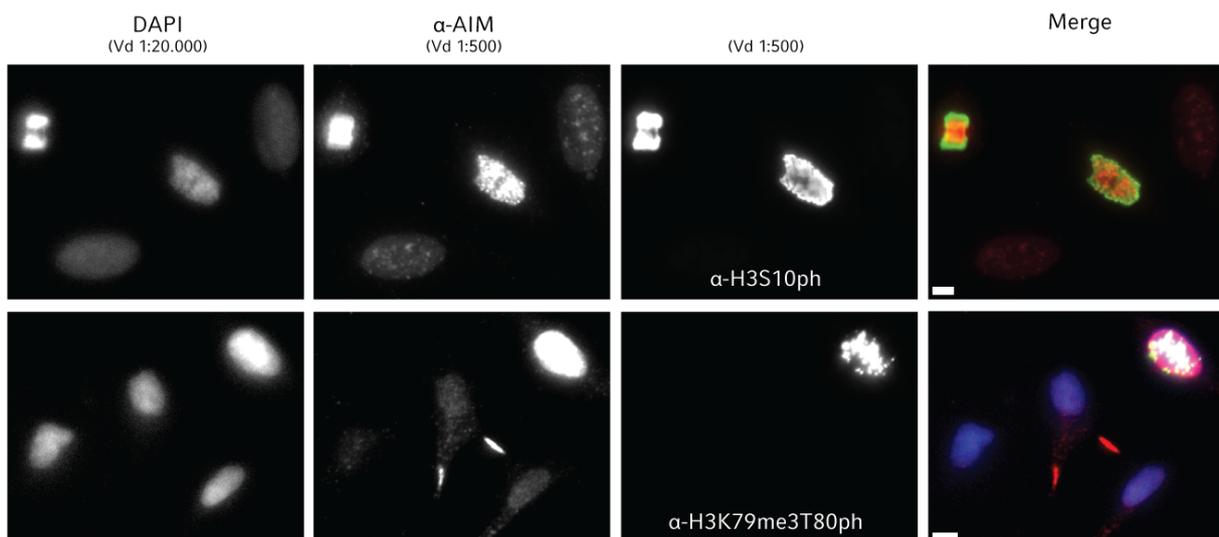


Abb. 5-2: IF Vergleich der Antikörpersignale von α -H3S10ph und α -H3K79me3T80ph

IF Analyse unbehandelter HeLa Zellen. Färbung der DNA erfolgte mit DAPI (linke Spalte, im Merge blau dargestellt), der Proteinkinase Aurora B zur Unterscheidung der Zellzyklus-Phasen mit α -AIM (zweite Spalte von links, im Merge rot dargestellt), sowie entweder α -H3S10ph oder α -H3K79me3T80ph (zweite Spalte von rechts, im Merge grün dargestellt). Merge: Übereinanderlagerung der Signale. (—) 10 μ m.

Um zu untersuchen, ob H3 Threonin 80 tatsächlich auch *in vivo* 80 posttranslational phosphoryliert vorliegt, wurde zusätzlich zu den auf Antikörpern basierenden biochemischen Analysen die MALDI-ToF Massenspektrometrie (MS) herangezogen. Die MS stellt den Goldstandard zum Nachweis von PTMs in der Proteinanalytik dar. Sie ermöglicht neben dem Nachweis *in vivo* auch quantitative Aussagen. Außerdem ist es möglich mehrere bzw. unterschiedliche PTMs innerhalb eines Peptids zu analysieren⁹³. Im Fall von H3T80ph war dies von besonderem Interesse, da eine Phosphorylierung an Threonin 80 theoretisch auch in verschiedenen Kombinationen mit und ohne Mono-, Di- oder Trimethylierungen an K79 vorkommen kann (siehe 2.2.1). Die Methode wurde hierzu zunächst in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Proteinanalytik unter Leitung von Prof. Dr. A. Imhof etabliert.

Bevor mit dem *in vivo* Nachweis von H3T80ph begonnen werden konnte, musste auf Grundlage synthetischer Peptide die Nachweisgrenze der Methode für H3T80ph bzw. seinen methylierten Isoformen H3K79me1T80ph, H3K79me2T80ph, bzw. H3K79me3T80ph abgeschätzt werden. Dies war wichtig, um die besten Versuchsbedingungen zu bestimmen, da *in vivo* phosphorylierte Peptide in der MS häufig schwer nachzuweisen sind. Die Detektion ist nämlich stark abhängig von der Aminosäuresequenz des individuellen Peptids. Phosphorylierungen liegen *in vivo* häufig nur in geringer Abundanz vor, sind chemisch labil oder führen wegen ungünstiger Ionenverhältnisse zu schwierigen Detektionsbedingungen¹⁰⁴. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde stellvertretend das synthetische Peptid H3(74-83)K79me3T80ph verwendet. Es wurde dabei versucht, sowohl die absolute, als auch die relative Nachweisgrenze zu bestimmen. Die absolute Nachweisgrenze sollte zeigen, bis zu welcher minimal eingesetzten, absoluten Menge das Peptid nachgewiesen werden konnte. Die relative Nachweisgrenze sollte eine Verdrängung phosphorylierter Peptide durch den Einsatz großer Mengen unmodifizierter Peptide ausschließen, denn eine Verdrängung müsste eine relative Anreicherung phosphorylierter Peptide in den *in vivo* gewonnenen Proben nach sich ziehen.

Zur näherungsweisen Bestimmung wurde das synthetische Peptid H3(74-83)K79me3T80ph (1715,9 Da) in einem Ansatz mit rekombinanten, Trypsin-verdautem Xenopus Histon H3 (xH3) untersucht, welches freundlicherweise von Prof. Dr. A. Imhof zur Verfügung gestellt wurde. Die Zugabe von xH3 diente der Abbildung möglichst realistischer Versuchsbedingungen, da auch *in vivo* gewonnene Proben aus Gemischen unmodifizierter und modifizierter Peptide bestehen. Die Menge an xH3 wurde konstant gehalten (25ng) und absteigende Mengen an H3(74-83)K79me3T80ph (250ng, 25ng, 250pg, 25pg) zugegeben. Zum Nachweis der relativen Nachweisgrenze wurden konstanter Menge (25ng) H3(74-83)K79me3T80ph ansteigende Mengen an xH3 (5ng, 500ng, 10µg, 25µg) zupipettiert.

Die Analyse der Proben erfolgte unter Einsatz von *ZipTip*TM_{µ-C18}-Pipetten unter Verwendung einer HCCA-Matrix im *Negative Ion Mode* der MALDI-ToF MS. Der Nachweis des Peptids H3(74-83)K79me3T80ph gelang bis zu einer absolut eingesetzten Menge von 250pg. Dies entsprach einer Konzentration von 200 fmol, einem Verhältnis von phosphoryliertem Peptid zu xH3 von etwa 1:100 bzw. absolut < 100 Peptiden in der Probe. Der Einsatz von 25pg, einer Konzentration von 20fmol, bzw. einem Verhältnis von H3(74-83)K79me3T80ph zu xH3 von etwa 1:1.000 konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Anreicherung über *TopTip*TM-TiO₂-Pipetten bzw. unter Einsatz einer

DHB-Matrix, welche jeweils selektiv Phospho-Peptide anreichern¹⁰⁵, führte zu keinen verbesserten Bedingungen des Versuchsaufbaus (siehe Abb.5-3 A).

Der Nachweis der relativen Nachweisgrenze von H3(74-83)K79me3T80ph erfolgte ebenfalls unter Einsatz von *ZipTip*TM_{μ-C18}-Pipetten und der HCCA-Matrix im *Negative Ion Mode* der MALDI-ToF MS. Ein Verlust des Signals konnte für H3(74-83)K79me3T80ph bis zu einer eingesetzten Menge an xH3 von über 25μg nicht detektiert werden. Dies entsprach in etwa einem Verhältnis von Trypsin-verdaulichem xH3 zu H3(74-83)K79me3T80ph von 1.000:1. Eine Anreicherung von phosphorylierten Peptiden über *TopTip*TM-TiO₂-Pipetten bzw. unter Einsatz einer DHB-Matrix führten zu keiner weiteren Signalverstärkung. Der Umstand, dass H3(74-83)K79me3T80ph trotz Einsatz größter Mengen an xH3 immer noch detektiert werden konnte argumentierte dafür, dass eine relative Verdrängung von H3(74-83)K79me3T80ph durch unmodifiziertes xH3 in der Probe nicht relevant war. Daher erschien eine Anreicherung phosphorylierter Peptide einer *in vivo* gewonnenen Probe nicht zwingend notwendig (siehe Abb. 5-3 B).

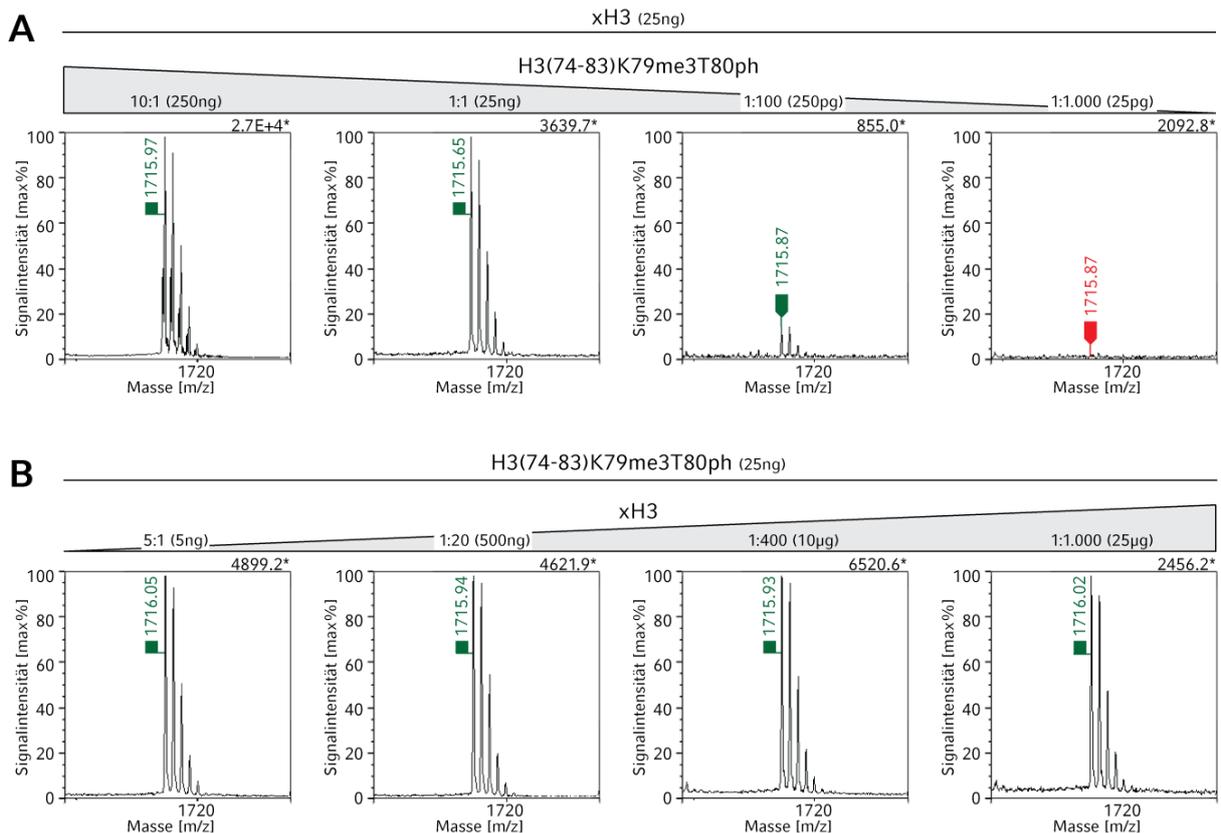


Abb. 5-3: Nachweisgrenze von H3(74-83)K79me3T80ph Peptiden in der MALDI-ToF MS

(A) MALDI-ToF Massenspektren jeweils unterschiedlicher Mengen synthetisch hergestellter Peptide H3(74-83)K79me3T80ph (250ng, 25ng, 250pg, 25pg) unter Zugabe von jeweils 25ng chemisch propionyliertem, Trypsin-verdaulichem *Xenopus* Histon H3 (xH3), bzw. (B) unterschiedlicher Mengen chemisch propionyliertem, Trypsin-verdaulichem xH3 (5ng, 500ng, 10μg, 25μg) unter Zugabe von jeweils 25ng synthetisch hergestellter Peptide H3(74-83)K79me3T80ph. Dargestellt sind [m/z]-Signale des synthetischen Peptids H3(74-83)K79me3T80ph (1715,90 [m/z]). Grün: erfolgreich detektierte [m/z]-Signale. Rot: nicht detektierbare [m/z]-Signale. X-Achse: gemessenes Verhältnis [m/z], Y-Achse: Prozent der maximal gemessenen Signalintensität. (*) In diesem Spektrum maximal gemessene Signalintensität.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass synthetisches H3(74-83)K79me3T80ph in der MALDI-ToF MS bis zu einer Menge von 250pg, 200fmol bzw. absolut etwa 80 Peptiden hatte nachgewiesen werden können. Die Phosphorylierung ging durch Aufbereitung der Proben nicht verloren. Ein Signalverlust des Peptids aufgrund Verdrängung durch unmodifiziertes xH3 konnte bei Einsatz von 25µg xH3 nicht beobachtet werden. Eine Anreicherung phosphorylierter Peptide führte zu keinen verbesserten Nachweisbedingungen.

5.2.2 Massenspektrometrische Analyse zum Nachweis von H3T80ph *in vivo*

Zur Analyse *in vivo* gewonnener Histone in der MALDI-ToF MS mussten diese zunächst chemisch propionyliert und Trypsin-verdaut werden. Infolge lagen in der Probe kürzere, chemisch veränderte Peptide unterschiedlicher Massen vor. Diese konnten anschließend in der MS detektiert und identifiziert werden. Für H3K79me3T80ph ergab sich ein Peptid der Aminosäuresequenz H3(73-83). Da keine Informationen für H3T80ph über eine *in vivo* zu erwartende Abundanz vorlagen, wurden orientierend die Beobachtungen aus den Vorexperimenten für das synthetische Peptid H3(74-83)K79me3T80ph herangezogen. Da absolut bereits < 100 Peptide hatten nachgewiesen werden können, war auch für eine *in vivo* gewonnene Probe davon auszugehen, dass die Nachweisgrenze der Methode unter Einsatz großer Mengen an Proteinen bzw. HeLa Zellen kein Hindernis darstellen sollte. Da auch eine Verdrängung unter Einsatz großer Mengen unmodifizierter xH3-Peptids nicht hatte nachgewiesen werden können, war zudem davon auszugehen, dass dabei beliebige Mengen an HeLa Zellen eingesetzt werden konnten, ohne einen Signalverlust durch kompetitive Verdrängung der Peptide *in vivo* zu befürchten (siehe 5.2.1).

Zur Analyse der Proben in der MALDI-ToF MS wurde auf dieser Grundlage eine möglichst maximale Anzahl von HeLa Zellen eingesetzt. Zellen wurden hierzu auf 13 großen Gewebekulturplatten angezogen und zur Anreicherung in der M-Phase für 18 h mit Nocodazol behandelt. Die Überprüfung des Zellzyklus erfolgte nach Abnahme von 10^6 Zellen in der Durchflusszytometrie (analog zu 5.1). Es zeigte sich eine über 95%ige Anreicherung der HeLa Zellen in der M-Phase. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Population asynchroner HeLa Zellen (siehe Abb. 5-4 A).

Anschließend wurden Histone aus den Zellen säuregefällt und über ein 15% SDS-PAGE Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden, die Histon H3 zugeordnet werden konnten, wurden ausgeschnitten und weiter für die Analyse in der MS aufbereitet. Um sicherzustellen, dass die chemisch relativ labile Phosphorylierung bei Aufbereitung der Proben nicht verloren ging, wurde vorab eine Western Blot Analyse der Proben durchgeführt. Die Detektion mit einem α -H3 (CT) Antikörper diente dabei als Ladekontrolle. Eine Detektion mit α -H3S10ph diente als Positivkontrolle. Die Detektion des bekannten Mitosemarkers bestätigte dabei zum Einen die durchflusszytometrischen Daten und die Anreicherung der Zellen in der M-Phase⁴⁷. Zum Anderen wurde sichergestellt, dass Phosphorylierungen durch die Aufreinigung der Proben nicht verloren gingen, da H3S10ph später auch als Positivkontrolle in der MALDI-ToF MS diente. Die Detektion mit

α -H3K79me3T80ph zeigte ähnlich zu α -H3S10ph ein Signal nur in Proben, die aus Nocodazol-behandelten Zellen aufgereinigt worden waren. Er bestätigte somit die durchflusszytometrischen Daten und argumentierte dafür, dass auch H3K79me3T80ph nach der Aufreinigung noch in der Probe vorhanden war und zur MS Analyse in der Probe zur Verfügung stand (siehe Abb. 5-4 B).

Die Analyse der Proben in der MS erfolgte nach chemischer Propionylierung und Trypsin-Verdau unter Verwendung der *ZipTip*TM _{μ -C18}-Pipette und HCCA-Matrix im *Negative Ion Mode*. Dies hatte sich unter 5.2.1 als die günstigsten Bedingungen zur Detektion der PTM erwiesen. Die Positivkontrolle H3S10ph konnte erfolgreich bei 1091,54 [m/z] detektiert werden (siehe Abb. 5-4 C). Eine Phosphorylierung an Threonin 80 konnte aufgrund verschiedener Methylierungen an Lysin 79 theoretisch in vier verschiedenen Peptiden H3(73-83)T80ph (1469,78 [m/z]), H3(73-83)K79me1T80ph (1483,70 [m/z]), H3(73-83)K79me2T80ph (1441,69 [m/z]), bzw. H3(73-83)K79me3T80ph (1455,70 [m/z]) vorliegen. Unter Verwendung der *ZipTip*TM _{μ -C18}-Pipette und der HCCA-Matrix konnte jedoch keines dieser Peptide weder im *Negative* noch im *Positive Ion Mode* detektiert werden. Auch die Anreicherung von Phospho-Peptiden unter Verwendung von *TopTip*TM-TiO₂-Pipetten, einer DHB-Matrix, sowie Orbitrap MS/MS Analysen im Zentrum für Proteinanalytik führten zu keinem Erfolg (siehe Abb. 5-4 D).

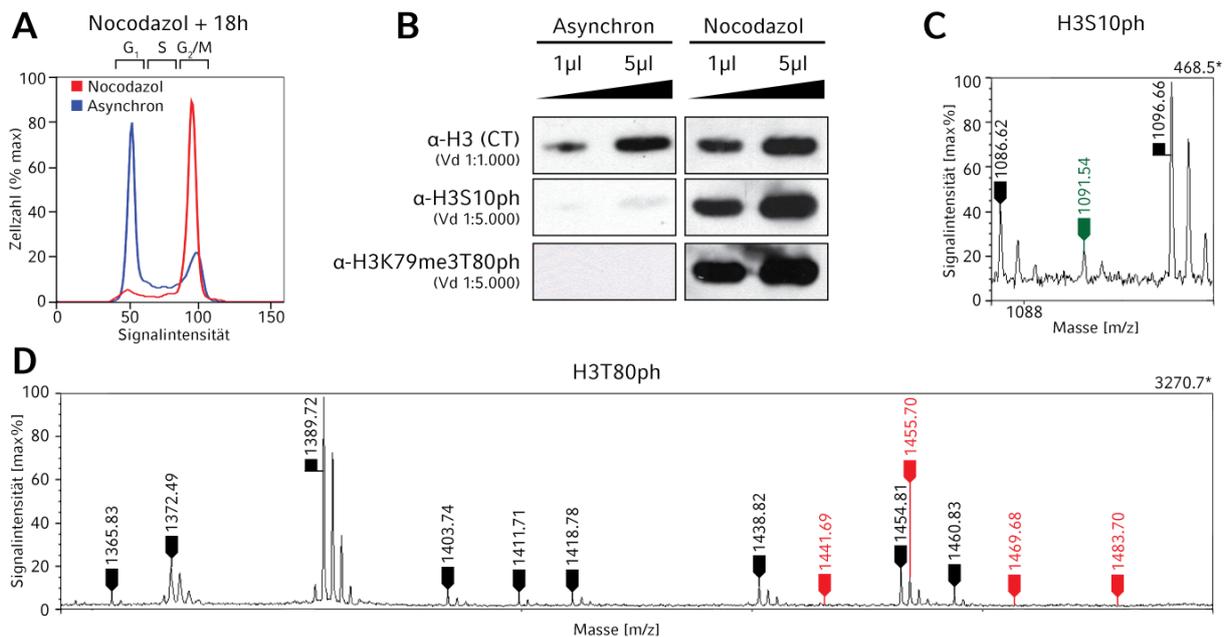


Abb. 5-4: Versuchter Nachweis von H3K79me3T80ph in vivo durch MALDI-ToF MS

(A) Durchflusszytometrische Analyse fixierter, Propidiumiodid-gefärbter HeLa Zellen. Roter Graph: Zellen 18 h nach Nocodazol-Behandlung (0,1ng/ μ l). Blauer Graph: Unbehandelte Kontrollpopulation. X-Achse: gemessene Propidiumiodid-Intensität, Y-Achse: Anzahl gemessener Zellen. Zu unterscheiden sind G₁- von S- und G₂/M-Phase (B) WesternBlot Analyse säuregefällter Histone der unter A beschriebenen Zellen. Detektion erfolgte durch α -H3 (CT) (oben), α -H3S10ph (mitte), und α -H3K79me3T80ph (unten). Belichtungszeit: 4min. (C) MALDI-ToF MS Spektren der unter B beschriebenen Proben. Dargestellt sind [m/z]-Signale des Peptids mit H3S10ph (1091,54 [m/z]) bzw. (D) der Peptide mit H3T80ph (1469,68 [m/z]), H3K79me1T80ph (1483,70 [m/z]), H3K79me2T80ph (1441,69 [m/z]), H3K79me3T80ph (1455,70 [m/z]). Grün: detektierte [m/z]-Signale. Rot: nicht detektierbare [m/z]-Signale. Schwarz: sonstige detektierte [m/z]-Signale. X-Achse: gemessenes Verhältnis [m/z], Y-Achse: Prozent der maximal gemessenen Signalintensität. (*) Maximal gemessene Signalintensität.

Zusammenfassend konnte die bekannte PTM H3S10ph *in vivo* erfolgreich detektiert werden. Eine Phosphorylierung an H3T80 konnte jedoch trotz Einsatz größerer Proteinmengen weder in der MALDI-ToF MS, noch in der Orbitrap MS/MS nachgewiesen werden. Eine Anreicherung von Phospho-Peptiden über *TopTip*TM-TiO₂-Pipetten und eine DHB-Matrix führten nicht zum Erfolg.

5.2.3 Re-Evaluation der Antikörperdaten und Kartierung des exakten Epitops

Der fehlende Nachweis eines phosphorylierten H3T80 Peptids in der MALDI-ToF MS bzw. MS/MS führte bei gelungenem, aber schwachem Nachweis der Positivkontrolle H3S10ph zu der Frage, ob H3T80ph aufgrund eines methodischen Problems nicht nachgewiesen werden konnte oder ob *in vivo* eine Phosphorylierung trotz immunologischer Hinweise nicht existierte (siehe 5.2.2). Vor dem Hintergrund, dass die Western Blot Analyse der eingesetzten Proben mit α -H3K79me3T80ph ein Signal zeigte, das Histon H3 zugeordnet werden konnte, war trotz der Testung des Antikörpers (siehe 2.2.2) an eine Kreuzreaktion zu denken (siehe 5.2.2). Um den Antikörper zu re-evaluieren und sein exaktes Epitop zu bestimmen, wurde ein biochemischer bzw. immunologischer Ansatz gewählt.

Zunächst wurde die Spezifität des Antikörpers α -H3K79me3T80ph in einem Peptide-Array Ansatz untersucht, der zum Zeitpunkt der ursprünglichen Testung durch Frau Dr. S. B. Hake nicht zur Verfügung gestanden hatte. Er enthielt kurze, sich teilweise überlappende Peptidsequenzen der Histone, i.W. von H3 bzw. H4. Die Peptide lagen unmodifiziert, mit einzelnen oder in Kombination mit verschiedenen PTMs vor. Eine Positivkontrolle wurde durch Messung eines Epitops geführt, welches durch den verwendeten Zweitantikörper erkannt wurde (Kaninchen IgG). Eine Negativkontrolle wurde durch Auswertung eines Bereichs ohne Peptid gewährleistet. Nach Inkubation mit α -H3K79me3T80ph und statistischer Auswertung der Signale ergab sich eine bevorzugte Bindung des Antikörpers an Epitope, welche Phosphorylierungen in direkter Nachbarschaft zu Di- oder Trimethylierungen enthielten (wie H3K79me3T80ph). Es fanden sich neben Bindungen an Epitope mit H3T80ph jedoch auch Bindungen an andere, ähnliche Phosphorylierungen des Histons H3, wie K9me3S10ph, K9me2S10ph, K27me3S28ph oder K27me2S28ph (siehe Abb. 5-5 A). In der Testung des Antikörpers α -H3K79me3T80ph im Peptide-Competition Experiment waren initial Trimethylierungen, nicht jedoch Dimethylierungen getestet worden (siehe 1.2.3). Insofern waren *in vivo* Kreuzreaktion des Antikörpers mit solchen Dimethylierungen möglich (siehe 4.1). Insbesondere, da für die identifizierten PTMs ein ähnliches Mitose-spezifisches Muster bekannt ist, das weitgehend den in der IF Mikroskopie beobachteten Mustern entspricht^{31,47}.

Um auszuschließen, dass es sich beim in der IF Mikroskopie beobachteten Signal des Antikörpers α -H3K79me3T80ph um eine Kreuzreaktion, insbesondere mit den Epitopen um H3K9me2S10ph bzw. H3K27me2S28ph, handelte, wurde das Epitop in einem weiteren Versuchsaufbau näher charakterisiert und eingegrenzt. Dies war möglich, da es sich bei den mutmaßlich kreuzreagierenden Epitopen gänzlich um N-terminal im Protein lokalisierte Epitope handelte (H3K9S10, H3K27S28), wohingegen das Epitop um H3K79T80ph zentral im Histonprotein H3 liegt. Über einen graduellen

Verdau des Histons beginnend vom N-Terminus konnte über den Verlust des Antikörpersignals zwischen einem N-terminalen bzw. zentralen Epitop unterschieden werden. Hierzu wurden HeLa Zellen 30 großer Gewebekulturplatten durch Nocodazol-Behandlung in der M-Phase angereichert. Chromatin wurde isoliert und durch *Micrococcal Nuclease* (MNase) zu Mononukleosomen gespalten. Bei einem anschließenden Trypsin-Verdau blieb die Kernsequenz der Histone durch die gebundene DNA geschützt, während die ins Lysat ragenden N-terminalen Sequenzen einem Verdau zugänglich waren¹⁰². Trypsin spaltet von N-terminal Peptidbindungen hinter den AS Arginin und Lysin, sofern diese unmodifiziert sind⁹³. Es ermöglicht so einen graduellen Verdau und verhindert gleichzeitig einen Überverdau der Histone. Dieser wurde zudem durch Phenol-/Chloroform Extraktion und Ethanol-Fällung der an die Nukleosomen gebundenen DNA mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese ausgeschlossen. Eine Länge der einzelnen DNA-Fragmente von ca. 150bp entsprach der Länge der an ein Mononukleosom gebundenen DNA und somit dem gewünschten Verdau²⁰. Wie in Abb. 5-5 B zu sehen, kam es bereits nach zehn Minuten zur Spaltung des Chromatins zu Mononukleosomen. Nach 15 min trat bereits ein Überverdau der Proben ein. Aufgetragen wurden jeweils die gefällten DNA Fragmente der einzelnen Ansätze. Die Mononukleosomen zwischen 10 und 15 min wurden daher vereinigt, um eine größtmögliche Menge an Mononukleosomen für die weitere Analyse zur Verfügung zu stellen. Anschließend wurden die Mononukleosomen auf 25°C gekühlt und für unterschiedliche Dauer mit Trypsin behandelt. Auf diese Weise wurden die Epitope mit den AS H3K9S10 und H3K27S28 schrittweise abgespalten, während die AS H3K79T80 im Histonkern erhalten blieb (siehe Abb. 5-5 D).

Nach Verdau der Proben wurden mehrere Zeitpunkte im Westernblot analysiert. Die Detektion mittels α -H3 (CT) diente der Ladekontrolle. Da das Epitop des Antikörpers C-terminal liegt, detektierte er Peptide unabhängig vom N-terminalen Verdau. Er diente somit der Kontrolle des Trypsin-Verdau und dem Ausschluss eines Überverdau der Proben. Es zeigte sich eine stückweise Degradierung des Histons H3 mit mehr als drei Fragmenten. Erwartungsgemäß kam es im Verlauf zur Abnahme des größten Fragmentes (H3), während die kleineren Fragmente (H3 Δ 1, H3 Δ 2, H3 Δ 3, H3 Δ 4) zunahm. Dies entsprach angedauten H3 Proteinen. Ein Überverdau der Histone über das N-terminale Ende hinweg und in den Kernbereich des Proteins hinein, der zu Interpretations-Schwierigkeiten geführt hätte, wurde nicht nachgewiesen (siehe Abb. 5-5 C). Im Vergleich zu α -H3 (CT) detektierte der α -H3S10ph nur die Fragmente H3 und H3 Δ 1. Dies entsprach der N-terminalen Lokalisation der AS Serin 10 in Histon H3, denn bei Verdau des Histons ging mit Serin 10 auch das Epitop des Antikörpers α -H3S10ph verloren. Die Detektion durch α -H3K79me3T80ph zeigte nur Fragment H3 und entsprach somit i.W. dem Signal des Antikörpers α -H3S10ph. Dies argumentierte für ein räumlich ähnliches, bzw. evtl. identisches Epitop der Antikörper (siehe Abb. 5-5 C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Signal von α -H3K79me3T80ph *in vivo* nicht von H3K79me3T80ph, sondern aufgrund einer Kreuzreaktion vorrangig von H3K9me2S10ph stammte.

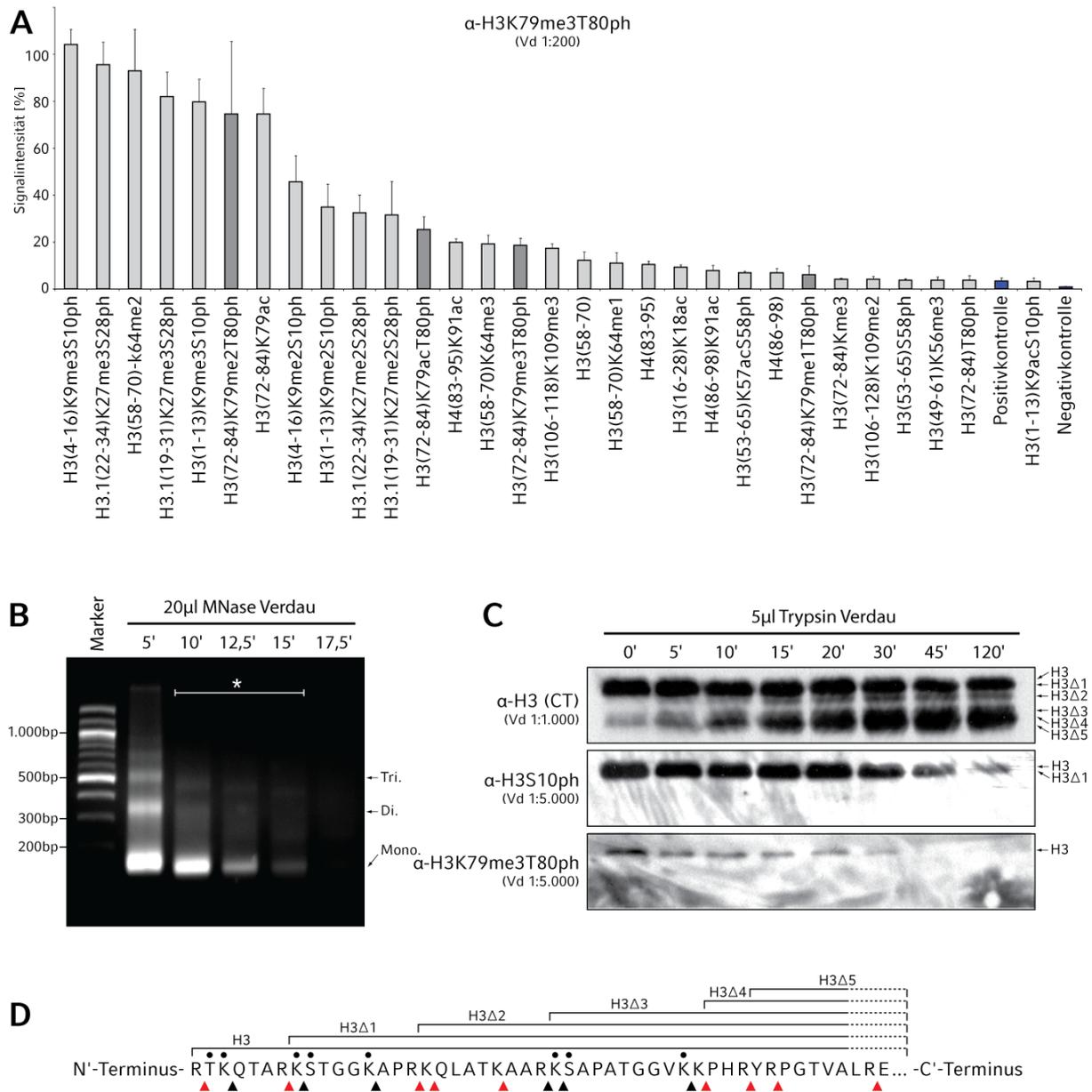


Abb. 5-5: Re-Evaluation und exakte Epitop-Kartierung des Antikörpers α -H3K79me3T80ph

(A) Peptide Array Analyse zur Untersuchung der Spezifität von α -H3K79me3T80ph. Dargestellt sind die 25 signalintensivsten gemessenen Peptide. Dunkelgraue Balken: Peptide mit der PTM H3T80ph. Hellgraue Balken: Andere Peptide. Blaue Balken: Kontrollen. Positivkontrolle: aufgetragenes Kaninchen IgG. Negativkontrolle: kein aufgetragenes Peptid. (B) Agarosegel-Elektrophorese der DNA nach Spaltung von Chromatin durch MNase. Aufgetragen wurden je 20 μ l unterschiedlicher Zeitpunkte (5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 min) nach Spaltung der DNA und Chloroform-/Phenol-Aufreinigung. Zu unterscheiden sind Mono-, Di- und Trinukleosomen. (*) DNA-Proben, die zur weiteren Analyse in C vereinigt wurden. (C) Western Blot Analyse der unter B* beschriebenen Mononukleosomen. Geblottet wurden je 5 μ l unterschiedlich lang gespaltener Mononukleosomen (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 120 min) aufgetragen auf eine 15% SDS-PAGE. Detektion durch α -H3 (CT) (oben), α -H3S10ph (mitte), und α -H3K79me3T80ph (unten). Zu unterscheiden ist unverdautes Histon H3 (H3) von drei unterschiedlich stark degradierten Fragmenten (H3 Δ 1, H3 Δ 2, H3 Δ 3) Belichtungszeit: 20 min. (D) N-terminale Proteinsequenz von Histon H3. Zu unterscheiden sind mögliche Peptidfragmente (H3, H3 Δ 1, H3 Δ 2, H3 Δ 3, H3 Δ 4), wie sie theoretisch *in vivo* bei Trypsin-Verdau der unter C aufgetrennten Proben möglich wären. (▲) Schnittstellen für Trypsin. (●) PTMs während der Mitose¹⁰⁶.

5.3 Charakterisierung und Phänotypisierung der Phosphorylierung von Serin 31 auf der Histonvariante H3.3

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ergab sich aus der bekannten, Varianten-spezifischen Aminosäure Serin 31 in der Histonvariante H3.3. Diese Aminosäure unterscheidet H3.3 u.a. von den Histonvarianten H3.1 und H3.2, die anstatt des Serins ein Alanin besitzen. Für das Serin 31 der Histonvariante H3.3 konnte bereits gezeigt werden, dass es *in vivo* in phosphoryliertem Zustand vorliegen kann (H3.3S31ph) (siehe 2.3)³¹. H3.3S31ph befindet sich nur während der Metaphase direkt benachbart der Zentromerenregion^{31,47}. Die genaue Funktion dieser PTM, ihre Interaktionen mit möglichen Chromatin-Effektorproteinen, sowie ihre Kinase bzw. Phosphatase sind bislang nicht bekannt. Aufgrund des Expressionsmusters wird für H3.3S31ph jedoch eine Rolle in der Mitose vermutet (siehe 2.3.1)³¹.

Um die Phosphorylierung von H3.3S31 hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktion weiter charakterisieren zu können, wurden HeLa-Zellen mit einem kommerziell erwerblichen α H3.3S31ph Antikörper gefärbt. Der in den ursprünglichen Studien um H3.3S31 verwendete Antikörper stand kommerziell nicht mehr zur Verfügung, weshalb zunächst Folgestudien nicht möglich waren. Daher wurde ein neuer Antikörper neu generiert und erworben wurde. Über diesen Antikörper lagen jedoch noch keine Daten über seine Spezifität vor, so dass er zunächst getestet werden. Hierzu wurde er in der IF Mikroskopie untersucht. Das durch den Antikörper detektierte Expressionsmuster wurde dabei mit bereits publizierten Daten verglichen³¹. Eine auf diese Weise ermittelte Übereinstimmung der Muster, argumentiert für eine Spezifität des eingesetzten Antikörpers. Im Einzelnen wurden die Zellkerne der eingesetzten HeLa Zellen durch DAPI Färbung dargestellt. Zur Identifizierung und Einteilung Zellen in die einzelnen Phasen der Mitose wurde (analog zu 4.2) α -AIM1. Durch eine Cofärbung mit α -H3.3S31ph war es möglich das Stadium des Zellzyklus der Zellen zu vergleichen und das Muster des Antikörpers dem jeweiligen Zellzyklus zuzuordnen.

α -H3.3S31ph zeigte ein für Chromatin in der Mitose spezifisches Signal. Es konnte bereits schwach in Chromatin von Zellen in der Prometaphase nachgewiesen werden und war gut detektierbar in Zellen, die sich in der Methaphase befanden. Das Signal verschwand schließlich wieder in Zellen, die sich in der frühen Anaphase befanden. Das Chromatin von Zellen außerhalb dieser Mitose-Phasen zeigte jeweils kein Signal für den Antikörper α -H3.3S31ph. Diese Ergebnisse stimmten gut mit bereits publizierten Daten über H3.3S31ph überein (siehe Abb. 5-6)³¹.

Das Antikörpersignal von α -H3.3S31ph unterschied sich somit vom Muster der Antikörper gegen die PTMs H3S10ph und H3S28ph. Diese zeigten im Chromatin bereits früher (in der Prophase) bzw. länger (bis hin zur Telophase) ein Signal i.S.e. Phosphorylierung des jeweiligen Chromatins⁴⁷. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der neu erworbene Antikörper α -H3.3S31ph spezifisch das phosphorylierte Serin 31 auf der Histonvariante H3.3 erkannte, welches auch durch den Antikörper in den vorausgegangenen Studien erkannt worden war.

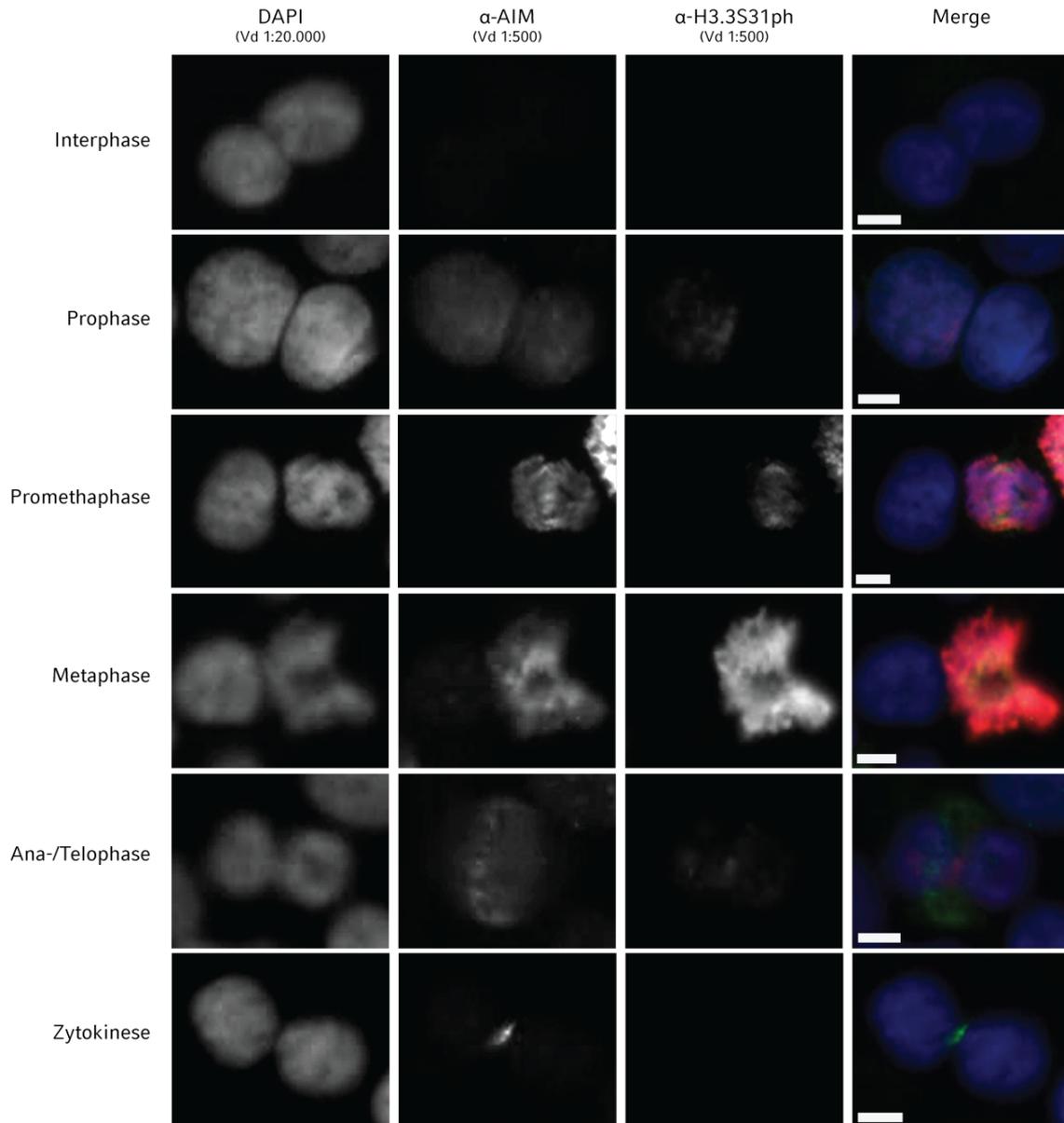


Abb. 5-6: IF Untersuchung von α -H3S31ph während verschiedener Mitose-Phasen

IF Analyse unbehandelter HeLa Zellen in der Interphase und einzelnen Mitose-Phasen (Pro-, Prometha-, Meta-, Ana-, Telophase, Zytokinese). Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (obere Reihe, im Merge blau dargestellt), der Proteinkinase Aurora B zur Unterscheidung der Zellzyklus-Phasen mit α -AIM (zweite Reihe von oben, im Merge grün dargestellt), sowie mit α -H3.3S31ph (zweite Reihe von unten, im Merge rot dargestellt). Merge: Übereinanderlagerung zum Vergleich der einzelnen Signale. (→)10 μ m.

5.3.1 Expression von mutierten Histon H3 Varianten

Um einen ersten Einblick in die biologische Funktion von H3.3S31ph zu erhalten, wurden Zellen generiert, die Histon H3-Mutanten exprimierten. Diese Mutanten wiesen AS Unterschiede auf, die entweder Phosphorylierungen verhinderten oder diese konstitutiv imitierten. Hierbei wurden mit Hilfe einer PCR-basierten Mutagenese Punktmutationen in Plasmide eingeführt, welche die Gene der

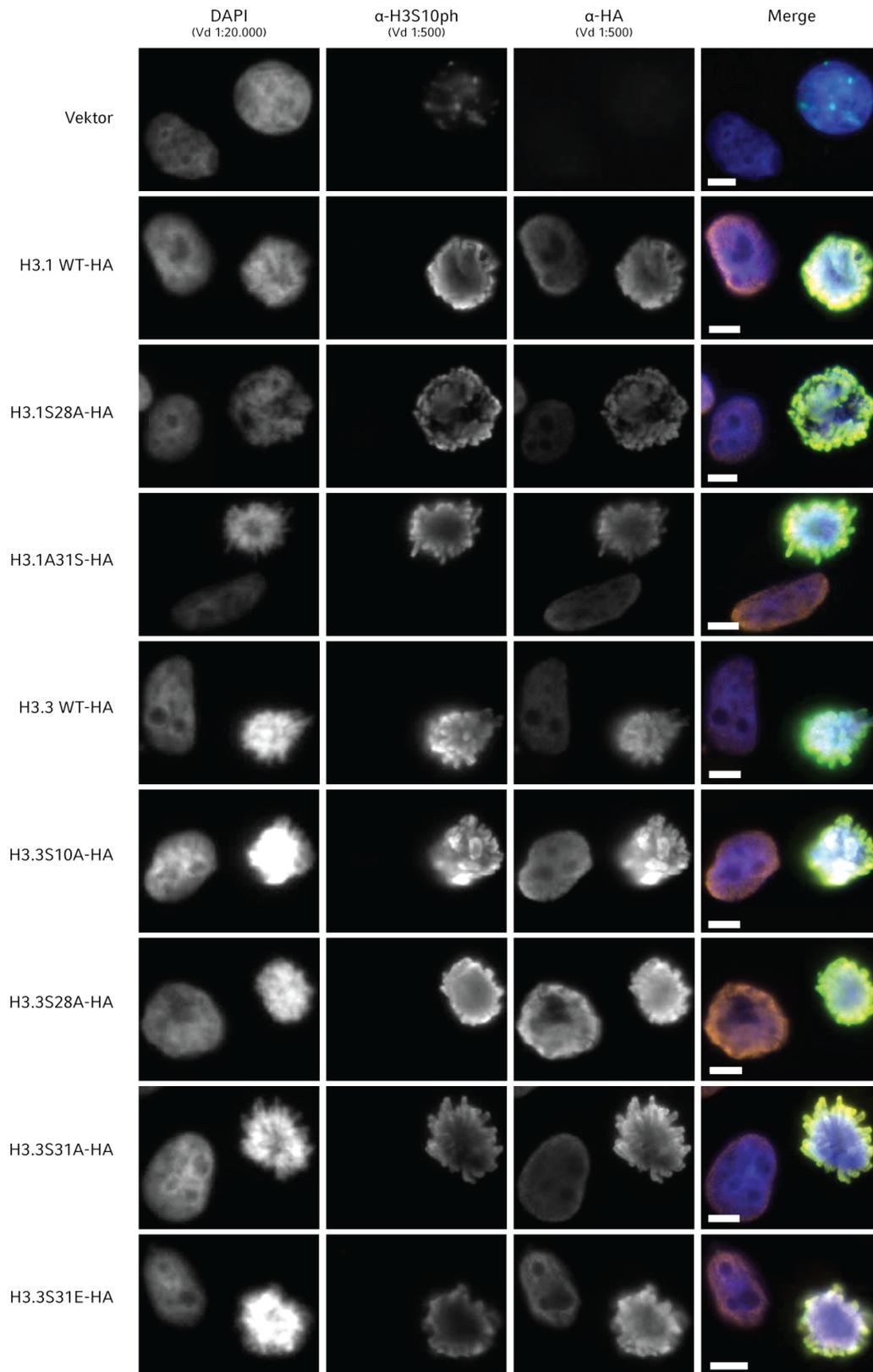


Abb. 5-7: IF Untersuchung der Expression von HA-H3.1S28/H3.3S31-Mutanten in HeLa Zellen

IF Analyse C-terminal HA-Tag-gekoppelter H3.1S28/H3.3S31-Mutanten (H3.1S28A-HA, H3.1A31S-HA, H3.3S10A-HA, H3.3S28A-HA, H3.3S31A, H3.3S31E) exprimierender HeLa Zellen bzw. Kontrolllinien (Leervektor, H3.1 WT-HA, H3.3 WT-HA). Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (erste Spalte, im Merge blau dargestellt), mit α -S10ph zur Unterscheidung mitotischen Chromatins (zweite Spalte von links, im Merge grün dargestellt), sowie mit α -HA (zweite Spalte von rechts, im Merge rot dargestellt). Merge: Übereinanderlagerung zum Vergleich der einzelnen Signale. (→)10 μ m.

menschlichen Histone H3.1 und H3.3 enthielten. Infolge wiesen die exprimierten Histone gegenüber dem Wildtyp einen Aminosäureaustausch auf. Auf diese Weise mutierte Plasmide wurden in *E. coli* Bakterien vervielfältigt und anschließend in HeLa Zellen transfiziert. Über ein Resistenzgen konnten erfolgreich transfizierte HeLa Zellen in Kultur selektioniert werden, wodurch eine stabile Expression der Konstrukte erreicht werden konnte. Zur Detektion der transfizierten Konstrukte waren die Sequenzen der Histonproteine in den Plasmiden mit der von HA-Tags gekoppelt. Diese wurden N-terminal an den Mutanten exprimiert und konnten anschließend durch einen etablierten α -HA Antikörper detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Serine, die bekanntermassen in H3.3 während der Mitose phosphoryliert werden können, zu Alanin ausgetauscht um die Modifizierung zu verhindern. Folgende Mutanten wurden in HA-H3.3 generiert: S10A, S28A und S31A. Durch diese Konstrukte konnte man dann mögliche phänotypische Änderungen der transfizierten Zellen mit entweder genereller Phosphorylierung oder Positions-spezifischer Phosphorylierung unterscheiden. Zusätzlich wurde S31 zu E mutiert, welches in ihrer räumlichen Struktur eine Phosphorylierung und somit ein ständig phosphoryliertes Epitop simuliert. Als Kontrollen wurde H3.1S28A und H3.1A31S, welches jetzt das H3.3-spezifische Serin enthielt, generiert. Als Negativ- Kontrollen dienten der Leervektor, der kein HA-H3-Gen enthielt, und die unveränderten Wildtyp-Gene der beiden Varianten H3.1 und H3.3. Es ist zu beachten, dass bei dem gewählten Versuchsaufbau neben den transfizierten Mutanten auch die ursprünglichen, endogenen, unveränderten Histone in den HeLa Zellen exprimiert werden. Um von einem exprimierten Konstrukt auf einen Phänotypen rückschließen zu können, musste nach Transfektion nachgewiesen werden, ob die Mutante in das Chromatin integriert wurde. Hierzu wurden die Zelllinien in der IF analysiert. Die transfizierten Konstrukte wurden durch α -HA Antikörper visualisiert. Dieser zeigte Signale in allen transfizierten Zellen mit Ausnahme solcher, die mit dem des Leervektor transfiziert wurden. Die parallele Detektion durch den Antikörper α -H3S10ph ermöglichte die Identifizierung von Zellen in der Mitose. Im Vergleich mit α -HA konnte so gezeigt werden, dass alle Konstrukte in das Chromatin eingebaut wurden (siehe Abb. 5-7).

Zusammenfassend ließ sich eine durchgängige Expression der Mutanten in allen transfizierten HeLa Zelllinien erreichen, und es zeigte sich, dass alle HA-H3 Varianten (mutiert und Wildtyp) wie erwartet in das Chromatin integriert wurden.

5.3.2 Durchflusszytometrische Phänotypisierung von HeLa Zelllinien, die HA-H3.1 und –H3.3 Mutanten exprimieren

Da die PTM H3.3S31ph, wie bereits ausgeführt, eine Rolle in der Mitose von Zellen zugeschrieben wird (siehe 2.3.1), wurden zur weiteren Analyse transfizierte HeLa Zellen, welche die mutierten Konstrukte erfolgreich exprimierten und auch in das Chromatin von HeLa Zellen integrierten (siehe 5.3.1), in der Durchflusszytometrie auf ihre Verteilung in den Hasen des Zellzyklus hin untersucht.

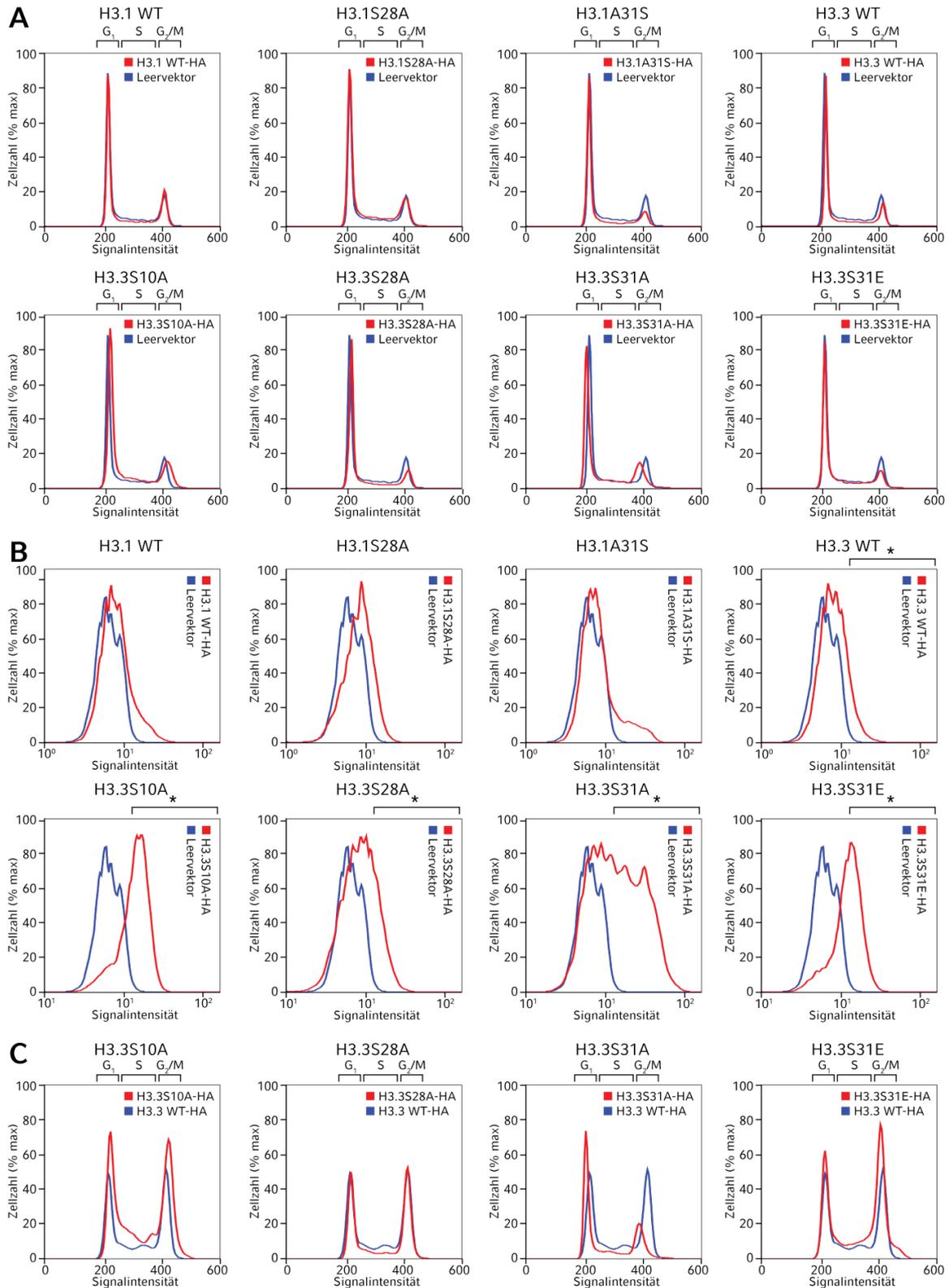


Abb. 5-8: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen von H3-Mutanten-exprimierenden HeLa Zellen

(A)(C) Durchflusszytometrische Analyse H3S28/H3.3S31 mutierter pIRESneo/HA-Plasmid transfizierter HeLa Zellen nach Fixierung und Propidiumiodid-Färbung, bzw. (B) nach Detektion mittels α -HA Antikörper (1:500 verdünnt). (*) Sub-Population der unter C dargestellten Zellen. Roter Graph: Signal der jeweiligen Konstrukte. Blauer Graph: Signal der Leervektor-, bzw. Wildtyp-Kontrolle. X-Achse: Propidiumiodid, bzw. Antikörper-Intensität, Y-Achse: Prozent der maximal gezählten Zellen. Zu unterscheiden sind G_1 - von S- und G_2 -/M-Phase.

Nach einer ersten Analyse aller Zelllinien ergab sich, ohne Berücksichtigung der Expressionslevel transfizierter Konstrukte, kein wesentlicher Unterschied in den Zellzyklusphasen im Vergleich zu den Wildtypen oder der Leervektor-Kontrolle (siehe Abb. 5-8 A). Um den Zellzyklus in Abhängigkeit von der Expression der Mutanten zu untersuchen, wurden die Ansätze in einem nächsten Schritt nach Fixierung der Zellen durch Ethanol mit einem α -HA Antikörper gegengefärbt. Das so ermittelte Signal war abhängig von der Menge an exprimiertem HA-Protein. So konnte im Vergleich zum Leervektor die Expression der Mutanten beurteilt werden und unterschiedlich stark exprimierende Sub-Populationen voneinander getrennt untersucht werden. Bei Untersuchung des HA-Tag Signals zeigte sich, eine Expression in allen Zelllinien. Eine schwache Expression zeigte sich für HA-H3.1, -H3.1S28A -H3.1A31S und -H3.3. Stärkere Expressionslevel konnten für HA-H3.3S10A, -H3.3S28A, H3.3S31A und -H3.3S31E gezeigt werden. Die Signalverschiebung zwischen H3.1, H3.1S28, H3.3 und H3.3S28A gegenüber dem Leervektor deutete auf eine gleichmäßige Expression hin. Die Zellen, die H3.1A31S, H3.3S10A, H3.3S31A und H3.3S31E exprimierten wiesen mehrere Peaks auf, was für unterschiedlich stark exprimierende Subpopulationen spricht (siehe Abb 5-8 B).

Im Vergleich stark exprimierender H3.3 Mutanten mit dem Wildtyp zeigte sich bei Konstrukten, die ein Serin enthielten, übereinstimmend mit H3.3 Wildtyp und H3.3S10A und H3.3S28A eine etwa 50%ige Anreicherung in der G_2 -/M-Phase. H3.3S31A wies keine Anreicherung auf. H3.3S31E, das eine ständige Phosphorylierung von H3.3 an Position 31 imitierte, zeigte eine Anreicherung in der G_2 -/M-Phase. Dies argumentierte für eine Rolle von H3.3S31ph in der Mitose (siehe Abb. 5-8 C).

Zusammenfassend konnte eine Expression der Konstrukte in allen Zelllinien bestätigt werden. Bei Aufschlüsselung nach Expressions-leveln zeigte sich eine veränderte Relation der G_1 - zur G_2 -/M-Phase in Abhängigkeit der AS an Position 31 in H3.3.

5.3.3 Wachstums-/Proliferationsphänotypisierung von Serin 28 Histon H3 und Serin 31 Histon H3.3 Mutanten durch Zellzählung und CFSE-Färbung

Unabhängig von der Analyse des Zellzyklus konnten bei Handhabung der HeLa Zellen in der Zellkultur wiederholt bei unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen von Transfektionen jeweils Unterschiede im Wachstumsverhalten einzelner Zelllinien beobachtet werden. Um die Unterschiede quantifizieren zu können, wurden daher Wachstumskurven der einzelnen Mutanten erstellt. Hierzu wurden entsprechend HeLa Zellen in Gewebekulturschalen ausgesät und nach drei, sechs, neun und zwölf Tagen gezählt. Die ermittelten Zellzahlen wurden unter Berücksichtigung der zum Wachstum notwendigen Verdünnung zu absoluten Zellzahlen hochgerechnet. Der Vergleich der absoluten Zellzahlen diente der Berechnung der Verdopplungszeiten der Zelllinien.

Im Vergleich zur Vektorkontrolle ergab sich ein beschleunigtes Wachstum der mit dem H3.3 WT transfizierten Zelllinie, bzw. ein verlangsamtes Wachstum der Zelllinien mit H3.3S28A und H3.3S31A.

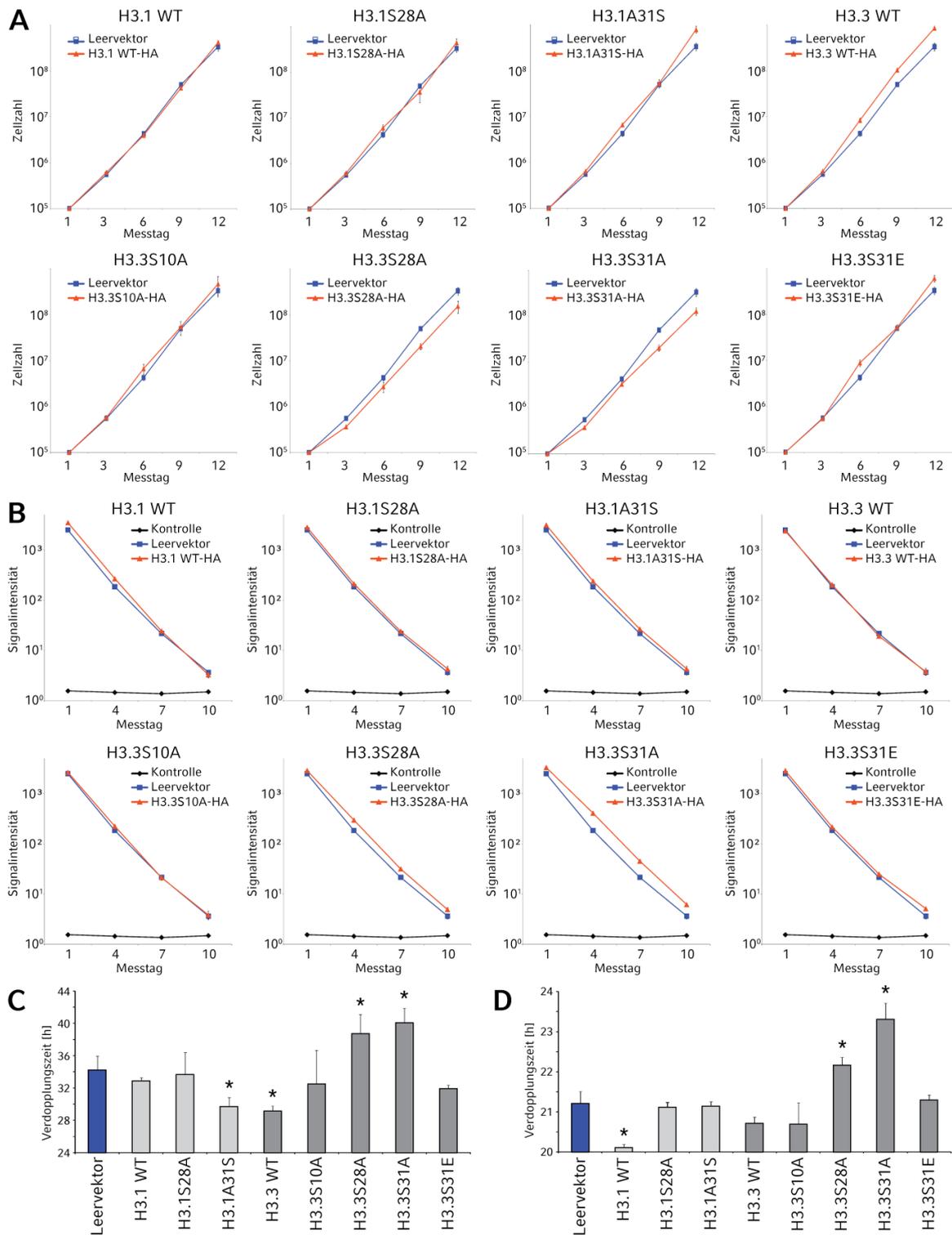


Abb. 5-9: Wachstumsgeschwindigkeiten und Proliferationszeiten von H3S28/H3.3S31 Mutanten-Zelllinien

(A) Wachstumskurven der H3-Mutanten exprimierenden HeLa Zellen. Aufgetragen sind zu jeweiligen Messtagen (1, 3, 6, 9, 12) gemessene, hochgerechnete Zellzahlen. Roter Graph: Werte des jeweiligen Konstrukts. Blauer Graph: Werte der Leervektor-Kontrolle. X-Achse: Messtag. Y-Achse: errechnete Verdünnungs-bereinigte Zellzahl. (B) Proliferationskurven der CFSE-gefärbten Populationen analog zu A. Aufgetragen sind die mittleren, durchflusszytometrischen Messwerte (Mean) der Zelllinien zu den jeweiligen Messtagen (1, 4, 7, 10). Schwarzer Graph: Ungefärbte, untransfizierte HeLa Kontrollpopulation. X-Achse: Messtag. Y-Achse: gemessene CFSE-Signalintensität. (C) Aus den Werten von A, bzw. (D) aus B berechnete Verdopplungszeiten der Zellpopulationen. Balken: Dunkelgrau Mutanten der Variante H3.3. Hellgrau Mutanten der Variante H3.1. Blau Leervektor. (*) $p < 0,0001$ (zweiseitiger T-Test).

Die übrigen mutierten Zelllinien zeigten im Vergleich zur Vektorkontrolle kein signifikant verändertes Wachstumsverhalten. Dies entsprach den Beobachtungen aus der Handhabung der Zellen in der Zellkultur (siehe Abb. 5-10 A).

Zur Verifizierung und zur Charakterisierung des Proliferationsphänotyps wurden die Populationen in einem weiteren Versuch mit CFSE angefärbt. CFSE verteilt sich bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf Tochterzellen, wodurch über die ermittelte Signalintensität Rückschlüsse auf die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen möglich werden⁸⁰. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch nach jeweils ein, vier, sieben und zehn Tagen. Im Vergleich zur Vektorkontrolle ergaben sich eine signifikant erhöhte Proliferationsrate für den Wildtyp H3.3. Signifikant verlangsamte Proliferationsraten ergaben sich für die Mutanten H3.3S28A und H3.3S31A. Eine untransfiziert und ungefärbte HeLa-Population diente als Negativkontrolle (siehe Abb. 5-9 B).

Die Berechnung der Generationszeiten aus den Wachstumskurven ergab gegenüber dem Leervektor ($34,2\text{h} \pm 1,7\text{h}$) signifikant beschleunigte Generationszeiten der Zelllinien H3.1A31S ($29,7\text{h} \pm 1,1\text{h}$) und H3.3 WT ($29,2\text{h} \pm 0,6\text{h}$). Signifikant verlangsamte Generationszeiten ergaben sich für H3.3S28A ($38,7\text{h} \pm 2,4\text{h}$) und H3.3S31A ($40,1\text{h} \pm 1,8\text{h}$) (siehe Abb. 5-10 C). Die Daten der Proliferationskurven ergaben gegenüber dem Leervektor ($21,2\text{h} \pm 0,3\text{h}$) eine signifikant beschleunigte Verdopplungszeit der Zelllinie H3.1 WT ($20,1\text{h} \pm 0,1\text{h}$) gegenüber signifikant verlangsamten Generationszeiten der Mutanten H3.3S28A ($22,1\text{h} \pm 0,2\text{h}$) und H3.3S31A ($23,3\text{h} \pm 0,4\text{h}$). H3.3S31A zeigte im Vergleich zu H3.3S28A nochmals eine langsamere Generationszeit (siehe Abb. 5-9 D).

Zusammenfassend zeigten die Analysen der Daten aus den Wachstumskurve und den Proliferationszeiten übereinstimmend ein gegenüber dem Leervektor signifikant verlangsamtes Wachstum der Mutanten H3.3S28A und H3.3S31A.

5.3.4 Identifizierung potentieller Kinasen von H3.3S31ph

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Identifizierung möglicher Kinasen der Phosphorylierung von Serin 31 auf Histon H3.3. Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass H3.3 Serin 31 *in vivo* phosphoryliert vorliegen kann, jedoch konnte bisher keine entsprechende Kinase identifiziert werden (siehe 2.3.1)³¹. Kinasen der Aurora B Familie, welche für die Mitose-spezifischen Phosphorylierungen H3S10ph und H3S28ph verantwortlich sind, kommen aufgrund der deutlich abweichenden Aminosäuresequenz um H3.3S31 weniger in Betracht³¹. Außerdem unterscheidet sich H3.3S31ph von H3S10ph und H3S28ph im räumlichen und zeitlichen Auftreten, was dafür argumentiert, dass es sich bei H3.3S31ph sehr wahrscheinlich um eine andere Kinase handelt³¹.

Zur Identifizierung potentieller Kinasen für die PTM H3.3S31ph wurde ein immunbiochemischer Ansatz gewählt. Es wurde ein Antikörper eingesetzt, welcher spezifisch H3.3S31ph erkannte. Um den Antikörper α -H3.3S31ph vorab auf seine Spezifität hin zu testen und auszuschließen, dass *in vitro* Kreuzreaktionen mit H3.3S28ph auftreten, wurde eine ELISA Analyse durchgeführt. Hierzu

wurde der Antikörper mit synthetisch phosphorylierten Peptiden inkubiert. Es wurde untersucht, ob er diese spezifisch erkannte bzw. ob er Negativkontrollen nicht detektierte. Zum Einsatz kamen synthetisch generierte, biotinylierte Peptide, welche das Epitop jeweils in den phosphorylierten und unmodifizierten Zuständen enthielten (H3.3(22-41), H3.3(22-41)S28ph, H3.3(22-41)S31ph und H3.3(22-41)S28phS31ph). Die Peptide wurden über die Biotinylierung auf Streptavidin-beschichtete 96-Lochplatten gebunden und mit dem Antikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper konnten von der Lochplatte abgewaschen werden, wohingegen gebundene Antikörper über enzymgekoppelte Zweitantikörper detektiert werden konnten. Auf diese Weise konnten mit einer möglicherweise ebenfalls im Epitop vorkommenden Phosphorylierung der AS Serin 28 ausgeschlossen werden. Auch eine Verdrängung des Antikörpers i.S. eines Verlusts des Epitops durch S28ph (trotz erfolgreicher Phosphorylierung an Serin 31) konnte ausgeschlossen werden. Dies ermöglichte im späteren Versuchsaufbau Rückschlüsse von einem Antikörpersignal auf eine Phosphorylierung des Serins 31.

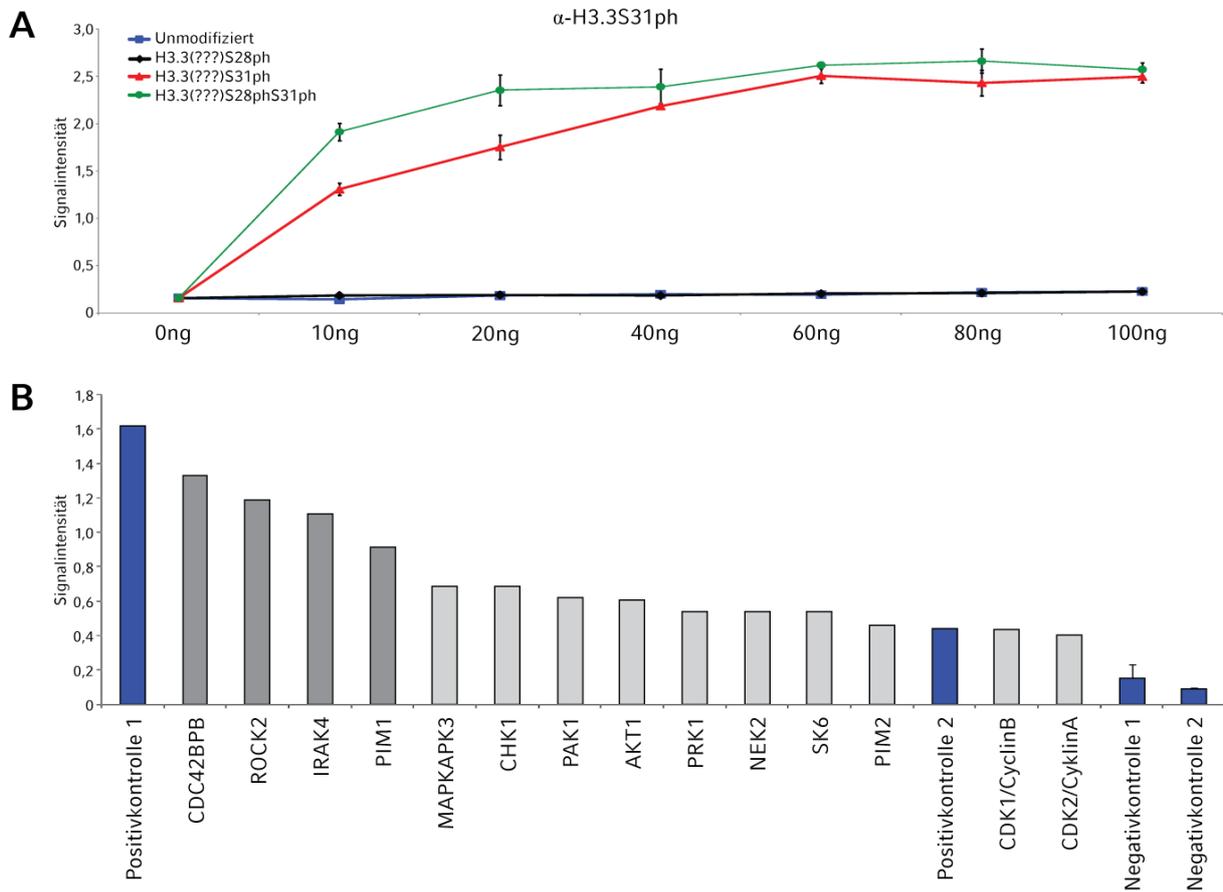


Abb. 5-10: Identifizierung potentieller Kinasen von H3.3S31ph

(A) ELISA Analyse des Antikörpers α -H3.3S31ph (1:500 verdünnt). Getestet wurde der Antikörper mit unterschiedlichen biotinylierten Peptiden (H3.3(22-41); blau, H3.3(22-41)S28ph; schwarz, H3.3(22-41)S31ph; rot, H3.3(22-41)S28phS31ph; grün), die an eine Streptavidin-beschichtete 96-Loch-Platte gebunden wurden. X-Achse: Mengen eingesetzten Peptids. Y-Achse: gemessene Signalintensität. (B) ELISA Analyse 83 verschiedener, rekombinant hergestellter Kinasen unter Zugabe von unmodifiziertem Peptid H3.3(22-41) und ATP bei Detektion mit unter A beschriebenen Antikörper. Dunkelgraue Balken: Signalintensität >50% der Positivkontrolle 1. Hellgraue Balken: Signalintensität < 50% der Positivkontrolle 1. Blaue Balken: geführte Kontrollen. Positivkontrolle 1: Peptid H3.3(22-41)S31ph ohne Zugabe einer Kinase. Positivkontrolle 2: H3(22-41) unter Zugabe der Kinase G11 (Detektion mit α -H3S10ph). Negativkontrolle 1: unmodifiziertes Peptid H3.3(22-41) ohne Zugabe einer Kinase. Negativkontrolle 2: Detektion ohne Zugabe eines Peptids oder einer Kinase. X-Achse: eingesetzte Kinasen. Y-Achse: gemessene Signalintensität.

Im ELISA zeigte sich eine Spezifität von α -H3.3S31ph für das H3.3S31ph Peptid. Der Antikörper erkannte die alleinige Phosphorylierung von Serin 31, sowie die gleichzeitige Phosphorylierung beider Serine im Epitop (S28ph und S31ph). Eine alleinige Phosphorylierung des Serins 28 wurde nicht erkannt. Ein Signal entsprach damit einer spezifischen Erkennung der Phosphorylierung von Serin 31 durch den Antikörper. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von S28 und S31 zu keinem Signalverlust führte. S31ph konnte also in jedem Fall detektiert werden. Als Negativkontrolle diente jeweils unmodifiziertes H3.3(22-41) Peptid (siehe Abb. 5-10 A).

Zur eigentlichen Identifizierung potentieller Kinasen von H3.3S31ph wurden anschließend 83 rekombinant hergestellte, nukleäre Kinasen eingesetzt, welche freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. D. Eick (Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt wurden. Der Versuchsaufbau entsprach einer analog zum Vorexperiment aufgebauten ELISA Analyse. Biotinylierte, nicht-phosphorylierte H3.3(22-41) Peptide wurden an Streptavidin beschichtete 96-Loch-Gewebekulturplatten gebunden und jeweils zusammen mit einer der rekombinanten Kinasen unter Zugabe von ATP inkubiert. Ein an S31-gebundenes Phosphat wurde mit dem getesteten α -H3.3S31ph Antikörper detektiert, der wiederum durch einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper anhand eines Farbumschlags nach Substratzugabe detektiert werden konnte. Ein detektiertes Signal argumentierte aufgrund der zuvor gezeigten Spezifität des Antikörpers für eine Phosphorylierung an Serin 31 und so für eine Aktivität der eingesetzten Kinase.

Als Positivkontrolle 1 wurde nur das synthetisch phosphorylierte Peptid H3.3(22-41)S31ph ohne Zugabe einer rekombinanten Kinase geführt. Als Positivkontrolle 2 diente das unmodifizierte Peptid H3(22-41) unter Zugabe von ATP und der Serin10-spezifischen Kinase GIL1. Letztere wurde mit einem α -H3S10ph Antikörper detektiert. Als Negativkontrolle 1 diente nur das unmodifizierte Peptid H3.3(22-41) ohne Zugabe einer Kinase. Als Negativkontrolle 2 wurden Proben ohne Zugabe von Peptiden oder Kinasen eingesetzt. Im ELISA ergaben sich in den jeweiligen Ansätzen intensive Signale der untersuchten Peptide unter Zugabe der rekombinanten Kinasen CDC42BPB, ROCK2, IRAK4 und PIM1 mit einer Intensität von $> 50\%$ der Positivkontrolle 1. Die Ansätze mit den rekombinanten Kinasen MAPKAPK3, CHK1, PAK1, AKT1, PRK1, NEK2 SK6 und PIM2 zeigten ein Signal $< 50\%$ der Positivkontrolle 1, jedoch $> 100\%$ der Positivkontrolle 2. Unter Zugabe der Kinasen CDK1/CyclinB und CDK2/CyclinA konnten nur Signale mit einer Intensität von $< 100\%$ der Positivkontrolle 2 detektiert werden. Solche Kinasen aus Ansätzen mit einem Signal von $< 100\%$ der signalstärksten Negativkontrolle sind nicht gezeigt, da sie als potentielle H3.3S31ph Kinase für eine weitere Analyse nicht in Frage kommen. Da aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der rekombinanten Kinasen mit Ausnahme der Negativkontrollen jeder Ansatz nur einmal durchgeführt werden konnte, konnten keine Fehlerbalken errechnet werden (siehe Abb. 5-10 B).

Zusammenfassend konnten 14 potentielle Kandidaten für Kinasen der bekannten Phosphorylierung H3.3S31ph identifiziert werden. Dabei zeigten die vier Kinasen CDC42BPB, ROCK2, IRAK4 und PIM1 die jeweils höchste Signalintensität im ELISA Versuchsaufbau. Die kamen daher als mögliche Kinasen von H3.3S31ph zunächst in die engere Auswahl.

5.3.5 Etablierung eines Systems zur Charakterisierung der Interaktion der Aminosäure Serin 31 von Histon H3.3 mit Effektorproteinen *in vitro*

Eine letzte Fragestellung dieser Arbeit befasste sich mit der Interaktion des Linkerhistons H1 mit der Region um Serin 31 auf H3. Unveröffentlichte Daten von Frau Priv. Doz. Dr. Sandra B. Hake deuteten auf eine Rolle von Serin 31 für die Dissoziation von H1 von Chromatin hin (siehe 2.3.2). Vor diesem Hintergrund sollte ein System etabliert werden, welches *in vitro* die Untersuchung von Interaktionen zwischen dem Linkerhiston H1 und den AS Alanin, Serin bzw. der PTM S31ph ermöglicht. Das System sollte dann zur Analyse weiterer Effektorproteine zur Verfügung stehen (siehe 2.3.2).

Zur Etablierung eines solchen Systems wurde ein *in vitro* Ansatz gewählt. Neben dem Linkerhiston H1 wurden die humanen Histone H2A, H2B, H3.2, H3.3 und H4 unter Verwendung IPTG-induzierbarer Plasmide in großem Maßstab in *E. coli* BL21 CodonPlus rekombinant exprimiert. Die hierzu benötigten Plasmide wurden freundlicherweise von Frau S. Dambacher zu Verfügung gestellt.

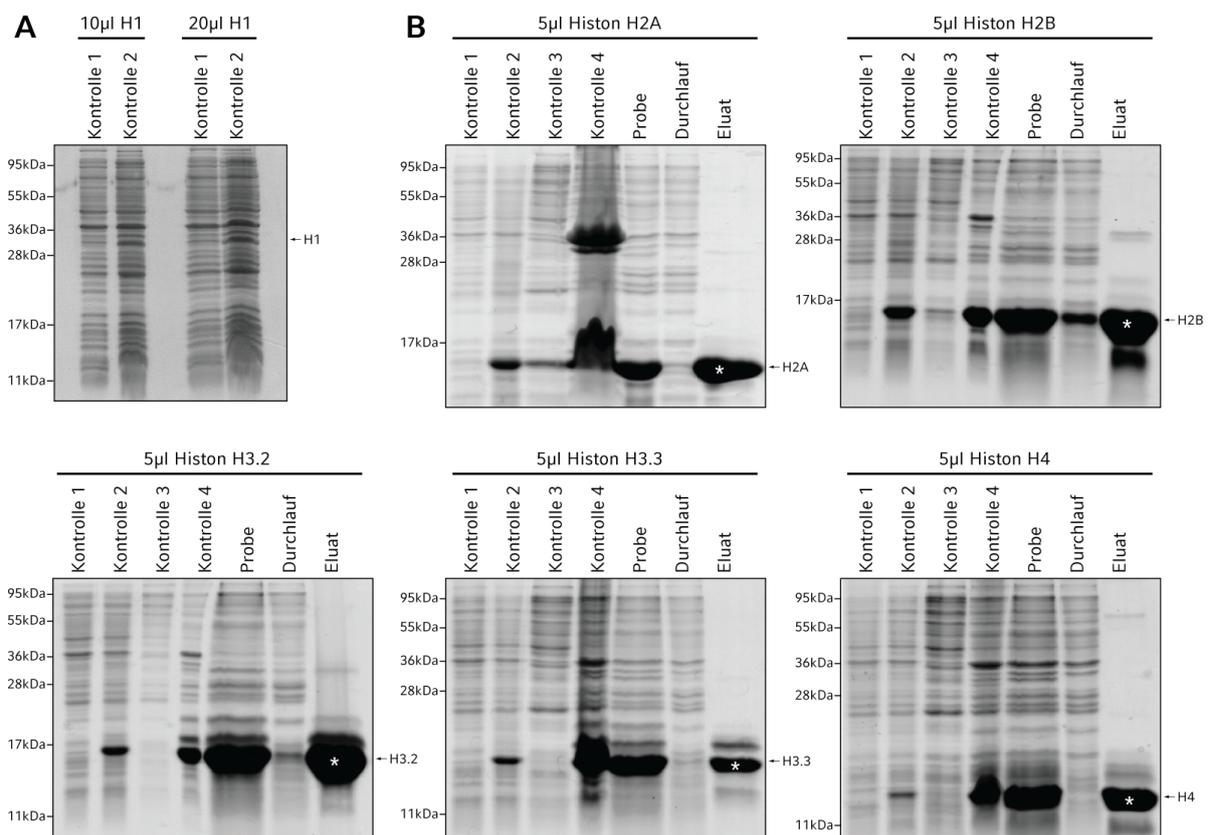


Abb. 5-11: Nachweis von in *E. coli* exprimierten, rekombinanten humanen Histonen

(A) Coomassie-gefärbte 15% SDS-PAGE Gele mit Zellextrakten von *E. coli* zur Expressionskontrolle von durch IPTG-Induktion exprimierten und (B) über eine Chromatographie-Säule aufgereinigten humanen Histonproteinen. Kontrolle 1: Expression vor IPTG Induktion. Kontrolle 2: Expression 3h nach IPTG Induktion. Kontrolle 3: nach Waschen verworfener Überstand. Kontrolle 4: nach Waschen weitergeführte Pellets. Probe: auf Chromatographie-Säule aufgetragene Probe. Durchlauf: nach Auftrennung verworfene Proteinfraktion. Eluat: über Na^{2+} -Gradienten eluierte Proteinfraktion. (*) Erfolgreich aufgereinigte Histone. Eingesetzt wurden jeweils 5µl der Proben. Das Molekulargewicht ergab sich über zusätzliches Auftragen eines bekannten Protein-Größenstandards (nicht gezeigt)

Die anschließende Assemblierung der aufgereinigten, rekombinanten Histone zu Mononukleosomen sollte als Ausgangspunkt für weitere *in vitro* Bindestudien dienen.

Nach Transfektion der Plasmide in *E. coli* wurde die Expression der Histone nach Aufkochen und Auftragen des Zellysats auf eine SDS-PAGE kontrolliert. Betrachtet wurden die in *E. coli* exprimierten humanen Histone vor (Kontrolle 1) und 3h nach IPTG-Induktion (Kontrolle 2). Für Histon H1 zeigte sich dabei lediglich eine schwache Expression im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle. Eine anschließende Aufreinigung der Histonproteine war daher für Histon H1 nicht möglich (siehe Abb. 5-11 A). Die Histone H2A, H2B, H3.2, H3.3 und H4 zeigten jedoch eine starke Expression. Sie konnten extrahiert und über Chromatographie-Säulen aufgereinigt werden. Um nachzuvollziehen, wie viel Protein beim jeweiligen Aufschließen und Waschen der Proben verloren ging, wurde auch der Überstand nach dem Waschen (Kontrolle 3), bzw. die gefällten Proteine (Kontrolle 4) mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese und Coomassie Färbung untersucht. Es zeigte sich hierbei bei der Expression der extrahierten Histone eine teilweise so starke Expression, dass es zu einer Überladung der jeweiligen Gele kam (Kontrolle 4). Die Effizienz der Aufreinigung der Histone H2A, H2B, H3.2, H3.3 und H4 durch Chromatographie-Säulen (Durchlauf, sowie Eluat) wurde ebenfalls untersucht. Hierbei zeigte sich jeweils eine erfolgreiche Aufreinigung und Anreicherung der Histone (siehe Abb. 5-11 B).

Zusammenfassend konnten die humanen Histone H2A, H2B, H3.2, H3.3 und H4 erfolgreich über ein IPTG-induzierbares System in *E. coli BL21 CodonPlus* exprimiert und aufgereinigt werden. Das Histon H1 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich exprimiert werden. Die Expression und Aufreinigung des Linkerhistons H1 konnte in weiterführenden experimentellen Studien im Anschluss an diese Arbeit von Frau C. Mehlhorn erfolgreich durchgeführt werden.

6 DISKUSSION

6.1 Interpretation der per Gel-Elektrophorese Verfahren identifizierten Zellzyklus- und Varianten-spezifischen Bandenmuster

Die Auftrennung und Untersuchung der *in vivo* gewonnenen Proben aus mitotischen, apoptotischen, asynchronen und unbestrahlten HeLa Zellen erfolgte durch A/U-, T/A/U- und 2D-T/A/U-PAGE Verfahren. Hierbei konnten übereinstimmend Hinweise auf Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen von Histon H1 nachgewiesen werden, die aus Zellen in der G₂- bzw. M-Phase stammten. Für Proben, die aus UV-bestrahlten Zellen stammten, ergaben sich Hinweise auf Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen von Histon H2A.X und H2A.Z. Für alle übrigen Histone, insbesondere für die Histonvarianten H3.1, H3.2 und H3.3, konnten aus den PAGE Analysen keine abundanten Phosphorylierungen abgeleitet werden (siehe 5.1).

In den Proben, die aus Zellen in der G₂- bzw. M-Phase stammten, ergaben sich in der A/U- bzw. T/A/U-PAGE für Histon H1 sechs zusätzliche Banden gegenüber der Kontrolle, die aus asynchronen HeLa Zellen stammte. Der Unterschied im Bandenmuster deutete insofern entweder auf eine Hyperacetylierung oder eine Hyperphosphorylierung von Histon H1 hin (siehe 5.1). Es ist bekannt, dass Histon H1 im Zellzyklus von der S- bis zur M-Phase in einer hyperphosphorylierten Form vorliegen kann^{108,109}. Je nach H1-Variante sind gegenüber der Interphase dabei bis zu sechs zusätzliche Phosphatgruppen beschrieben (H1T10ph, H1S17ph, H1T137ph, H1T154ph, H1S172ph und H1S188ph)¹⁰⁹. Obgleich die Funktionen dieser Phosphorylierungen im Einzelnen noch unbekannt sind, wird ihnen eine Rolle für die Kondensation bzw. Dekondensation des Chromatins in der S- und M-Phase, als Voraussetzung zur Replikation, zugeschrieben^{109,110}. Vor diesem Hintergrund passen die Ergebnisse der Analyse der A/U- bzw. T/A/U-PAGE dieser Arbeit gut zu den bereits publizierten Daten. Letztlich ist eine sichere Identifizierung der Banden bzw. eine Zuordnung zu einzelnen Phosphorylierungen allein anhand der A/U- bzw. T/A/U-PAGE jedoch nicht möglich. Es ist beispielsweise u.a. vorstellbar, dass die beobachteten Banden auch aufgrund von Acetylierungen zustande kamen. Außerdem ist es denkbar, dass die Banden aufgrund anderer Phosphatgruppen aufgetrennt wurden, als den in der Literatur beschriebenen. Für eine sichere Identifizierung der Banden, eine sichere Zuordnung zu einzelnen PTM und eine abschließende Interpretation sind daher weitere Analysen, wie z.B. eine Identifizierung über MS, notwendig (siehe 7.1).

Ähnlich verhält es sich mit den auffälligen Bandenmustern, die in den T/A/U- und 2D-T/A/U-PAGE Ansätzen beobachtet wurden. Aus den Banden der Proben, die aus den UV-bestrahlten Zellen gewonnen werden konnten, ergaben sich Hinweise auf Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen des Histons H2A, bzw. der Varianten H2A.X und H2A.Z (siehe 5.1). Dies kann beispielsweise mit einer bereits beschriebenen Phosphorylierung des Histons H2A.X (g-H2A.X) erklärt werden, welches eine entscheidene Rolle in der Zellantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche spielt^{111,112}. Weitere Phosphorylierungen an H2A.X haben in diesem Zusammenhang eine wichtige Funktion für

Reparatursysteme der Zelle (z.B. H2A.XY142ph)¹¹¹. Letztlich lassen sich jedoch auch diese Banden allein auf Grundlage der PAGE-Verfahren nicht sicher einzelnen Phosphorylierungen zuordnen, sodass zur Identifizierung weiterführende Analysen durchgeführt werden sollten (siehe 7.1).

Im Gegensatz zu den Auffälligkeiten in den Bandenmustern der Histone H1 und H2A ergaben sich in den A/U-, T/A/U- und 2D-T/A/U-PAGE Ansätzen keine auffälligen Veränderungen für die übrigen Histone (siehe 5.1). Einerseits kann dies bedeuten, dass für die Histone H2B, H3 und H4 keine wesentlichen abundanten Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen zu identifizieren sind. Andererseits kann es dadurch erklärt werden, dass die eingesetzte Methode eine zu geringe Sensitivität aufweisen könnte, um einzelne Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen zu detektieren. Insbesondere aufgrund bekannter Mitose-spezifischer Phosphorylierungen der Histonvarianten H3.1, H3.2 und H3.3 scheint dies eher wahrscheinlich. So fand sich in den jeweiligen PAGE Ansätzen beispielsweise weder ein Hinweis auf die beschriebenen H3S10ph, H3S28ph oder H3.3S31ph, obgleich diese gesichertermaßen während der Mitose auftreten sollten⁴⁷. Es sollte daher versucht werden, das Auflösungsvermögen und die Sensitivität der Methode weiter zu erhöhen (siehe 7.1).

6.2 Mögliche Gründe für einen frustrierten Nachweis sowie Re-Evaluation der Hypothese einer Doppelmodifizierung H3K79me3T80ph *in vivo*

Die aus der *Switch Hypothesis* abgeleitete Hypothese einer Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 80 *in vivo* wurde letztlich verworfen. Zwar hatte der kommerziell erworbene Antikörper α -H3K79me3T80ph initial bei Testung in einem *Peptide Competition* Experiment eine Spezifität für das Epitop um H3K79me3T80ph gezeigt (siehe 2.2.2). Weiterführende Untersuchungen in einem *Peptide Array* Experiment hatten jedoch sehr wahrscheinliche Kreuzreaktionen mit anderen Epitopen auf Histon H3 nahegelegt (siehe 5.2.3).

Prinzipiell können derartige Unterschiede in der Antikörperspezifität auch durch unterschiedliche Konzentrationen des eingesetzten Antikörpers α -H3K79me3T80ph bedingt sein, z.B. durch eine zu hohe Konzentration des Antikörpers in der Lösung und durch dadurch bedingte unspezifische Bindungen aufgrund von Übersättigung. Dies könnte ebenfalls erklären, weshalb teilweise widersprüchliche Ergebnisse im *Peptide Array* bzw. *Peptide Competition* (insbesondere bezüglich der Peptide H3K9me3S10ph bzw. K27me3S28ph) beobachtet wurden. Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der Analyse zusätzlicher Peptide im *Peptide Array* Experiment. Hier konnte der Antikörper Peptide getestet werden, welche zuvor im *Peptide Competition* Ansatz nicht analysiert worden waren. Insbesondere Peptide mit Phosphorylierungen in direkter Nachbarschaft zu Dimethylierungen (wie H3K9me2S10ph oder K27me2S28ph) waren initial nicht getestet worden (siehe 5.2.3). Insgesamt argumentieren die Ergebnisse in Übereinschau beider Experimente jedoch für eine Kreuzreaktion *in vivo*, vorrangig für Peptide bzw. Epitope um die PTMs H3K9me2S10ph, H3K9me3S10ph, H3K27me2S28ph bzw. H3S28me3S28ph, da es hierbei um Phosphorylierungen handelt, die gesichert Mitose-spezifisch auftreten und im Expressionsmuster übereinstimmen^{31,47}.

Diese These wird auch durch die Ergebnisse aus den weiterführenden Experimenten zur näheren Charakterisierung des Epitops des Antikörpers α -H3K79me3T80ph gestützt. Das Epitop des Antikörpers konnte dabei grob auf die ersten 15 bis 20 AS von Histon H3 eingeschränkt werden (siehe 5.2.3), was gut mit dem Epitop um H3K9me2S10ph vereinbar ist. Auch H3T3K4 kommt theoretisch in Betracht (siehe Abb. 5-5 D). Jedenfalls aber schließt der Versuch weitestgehend aus, dass das Antikörpersignal *in vivo* von einer PTM jenseits des N'-Terminus (und damit von H3K79me3T80ph) stammt. Vor diesem Hintergrund sind auch die Ergebnisse aus den immunozytochemischen Untersuchungen nicht eindeutig zu interpretieren. Da diese jedoch zusammen mit den Überlegungen der *Switch Hypothesis* zu der ursprünglichen Annahme einer Phosphorylierung von T80 geführt hatten (siehe 2.2.1), war die Grundlage der These infrage gestellt. Hiermit steht auch der frustrane massenspektrometrische Nachweis von H3K79me3T80ph *in vivo*, trotz theoretisch optimaler Versuchsbedingungen, im Einklang (siehe 5.2.2).

Ogleich es aus den dargelegten Gründen sehr unwahrscheinlich erscheint, dass H3T80ph *in vivo* vorkommt, kann sie nicht abschließend und mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Eine einmal nachgewiesene Kreuzreaktion des Antikörpers α -H3K79me3T80ph bedeutet nicht zwangsläufig, dass eine PTM H3T80ph *in vivo* nicht existiert. So kann das Epitop H3K79me3T80ph beispielsweise durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einer abundanteren PTM (beispielsweise H3S10ph oder H3S28ph) lediglich überlagert werden. Dies ist insbesondere möglich, unterstellt man H3T80ph und H3S10ph bzw. H3S28ph i.S. der *Switch Hypothesis* jeweils ähnliche Expressionsmuster im Zellzyklus (siehe 2.2.1). Außerdem wäre ohnehin anzunehmen, dass es sich bei H3K79me3T80ph um eine sehr seltene, wenig abundante PTM handelt, da sie bislang nicht in der Literatur beschrieben werden konnte. Auch eine erfolglose Detektion in der MALDI-ToF MS bzw. MS/MS kann durch eine nur sehr geringe Expression erklärt werden (siehe 5.2.2). Es sollte daher versucht werden einen abschließenden Nachweis letztlich mit einer weiter verbesserten Detektionsschwelle in der MS/MS zu führen (siehe 7.2).

Neben einer zu niedrigen Detektionsschwelle kann ein frustraner Nachweis einer Phosphorylierung an H3T80 trotz vorliegen *in vivo* theoretisch auch anders begründet sein. So ist es beispielsweise auch denkbar, dass H3T80ph zu einer anderen, als der vorrangig untersuchten G₂/M-Phase vorliegt. In dieser Arbeit wurde i.S. der *Switch Hypothesis* initial davon ausgegangen, dass H3T80ph einen „Schalter“ für Methylierungen an Lysin 79 auf Histon H3 darstellt. Diese Methylierungen werden beim Menschen durch die Methyltransferase DOT1L gesetzt. Der Status der H3K79-Methylierungen ist (entsprechend der Aktivität von DOT1L) abhängig von der jeweiligen Phase des Zellzyklus, wobei am meisten Methylierungen während der G₁-Phase vorliegen, diese während der S-Phase abnehmen, zur G₂-Phase einen niedrigsten Stand erreichen und dann erneut in der M-Phase ansteigen⁷⁴. Setzt man also für eine Phosphorylierung H3T80ph eine inhibierende Funktion für DOT1L voraus, erwartet man eine Phosphorylierung vorrangig in der S-, G₂- und M-Phase. Dies entspricht damit am ehesten der Inaktivität der Methyltransferase DOT1L bzw. dem entsprechenden Methylierungsmuster des Histons H3⁷⁴. Da H3T80ph letztlich jedoch in Zellen der G₂/M-Phase nicht nachgewiesen werden konnte (siehe 5.2.2), liegt die Überlegung nahe, ob einer Phosphorylierung H3T80ph auch eine von

DOT1L unabhängige Funktion zugrunde liegen könnte. Demzufolge könnten Phosphorylierungen an H3T80 möglicherweise in anderen Zellzyklus-Phasen zu erwarten sein. Das Anreichern von Zellen in der G₂/M-Phase hätte in einem solchen Fall die Minimierung von modifizierten Histonen in den analysierten Proben zur Folge gehabt. Vor diesem Hintergrund scheint es sinnvoll, abhängig von möglichen weiteren Funktionen einer unterstellten Phosphorylierung an H3T80 auch andere Stadien des Zellzyklus zu untersuchen. Letztlich kommen hierbei in Übereinstimmung mit der Literatur eine ganze Reihe an unterschiedlichen Funktionen bzw. Bindepartnern in Betracht. Neben einer Interaktion mit DOT1L sind für Methylierungen an H3K79 abhängig vom Grad der Methylierung nämlich verschiedene Bindeproteine beschrieben. Beispielsweise vermitteln Methylierungen an Lysin 79 über eine Restriktion von Sir-Proteinen (Sir2 und Sir3) das Silencing der Telomerenregion⁴⁹. Eine Kontrollfunktion während der Meiose halten sie über Interaktion mit Pch2 und Sir2 inne¹¹³. K79-Methylierungen erfüllen darüber hinaus über Rekrutierung des Bindeproteins 53BP1 eine Funktion in der Reparatur von DNA-Doppelstranbrüchen während der G₁- und S-Phase des Zellzyklus^{114,115}. Somit ist ein Auftreten der Phosphorylierung H3T80ph auch zu diesen Phasen des Zellzyklus denkbar. In weiteren Studien sollten daher auch Zellen jeweils in der G₀-, G₁- und S-Phase angereichert und analysiert werden. Zusätzlich stellen auch Zellen nach Induktion von DNA-Reparaturmechanismen, nach Induktion der Apoptose, bzw. soweit möglich, auch meiotische Zellen interessante Populationen für weitere Studien dar (siehe 7.2).

6.3 Charakterisierung und Phänotypisierung der PTM H3.3S31ph sowie Literaturvergleich identifizierter, potentieller Proteinkinasen

Zur Untersuchung der Funktion der Varianten-spezifischen PTM H3.3S31ph wurde in dieser Arbeit ein molekularbiologischer Ansatz gewählt, da kein verlässlicher, kommerziell erwerblicher Antikörper zur Verfügung stand. Hierzu wurden verschiedene punktmutierte Konstrukte in HeLa-Zellen überexprimiert. Ein entsprechender Phänotyp sollte dann Rückschlüsse auf eine Funktion der jeweils punktmutierten Aminosäure ermöglichen (siehe 5.3.1). Bei Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die einzelnen Zelllinien neben den jeweils mutierten Konstrukten immer auch die endogenen, unveränderten Histone exprimierten. Vor diesem Hintergrund war im Vorfeld aufgrund des Versuchsaufbaus nicht von starken Phänotypen durch die Überexpression der mutierten Proteine auszugehen. Dennoch fanden sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung nach Überprüfung der einzelnen Zelllinien auf Expression und Chromatin-Integration der Konstrukte (siehe 5.3.1 und 5.3.2) auffällige Phänotypen. Insbesondere ergaben sich Hinweise, die auf eine Mitose-relevante Funktion der Phosphorylierung an Serin 31 hindeuteten. Konstrukte, welche die AS Serin 31 deutlich überexprimierten (H3.3 WT, H3.3S10A, H3.3S28A), zeigten eine relative Anreicherung der Zellen in der G₂/M-Phase gegenüber solchen Zelllinien, welche an Stelle 31 ein Alanin enthielten (H3.3S31A). Die Mutante H3.3S31E, welche eine ständige Phosphorylierung an Serin 31 imitierte, zeigte eine nochmals deutlichere Anreicherung der Zellen in der G₂/M-Phase (siehe 5.3.2). Dies deutet im Einklang mit Überlegungen in der Literatur auf eine Funktion von Serin 31 bzw. der PTM H3.3S31ph für den Zellzyklus bzw. die Mitose hin (siehe 5.3.2)³¹.

Übereinstimmend zur Verschiebung des Zellzyklus konnten auch in Analysen der Wachstums- bzw. der Proliferationszeiten deutliche Phänotypen einzelner Mutanten nachgewiesen werden, obgleich diese analog zur beschriebenen Untersuchung des Zellzyklus ebenfalls stets die endogenen, unveränderten Histone exprimierten (siehe 5.3.3). Es ist weiter zu beachten, dass die Bestimmung der Wachstums- und Proliferationszeiten sich in der Erfassung der auszuwertenden Zellen unterscheiden. Insofern die Bestimmung der Wachstumszeiten von einem möglichen Absterben einzelner Zellen bei Durchlaufen des Zellzyklus beeinflusst wird, beruhen die ermittelten Daten, die der Bestimmung der Proliferationszeit zugrunde liegen (über Färbung mit CFSE), allein auf der Anzahl stattgefundener Mitosen. Sie berücksichtigen daher den Zelltod einzelner Zellen nicht. Unterschiede in den beiden Ansätzen sind somit vorrangig durch möglichen vermehrten Zelltod zu erklären (siehe 5.3.3). Vor diesem Hintergrund ist es umso erstaunlicher, dass die Konstrukte H3.3S28A und H3.3S31A gegenüber dem Leervektor und den Wildtyp-Kontrollen übereinstimmend in beiden Ansätzen ein signifikant verlangsamtes Wachstum aufwiesen (siehe 5.3.3). Insofern dies in den Daten der Wachstumsbestimmung auch auf etwaige toxische Eigenschaften des Konstrukts zurückzuführen sein kann, argumentiert das übereinstimmende Ergebnis aus der Bestimmung der Proliferationszeiten für einen tatsächlichen Effekt der Konstrukte auf den Zellzyklus. Hierfür argumentiert auch der Einklang zwischen den Daten der Bestimmung aus Wachstums- bzw. Proliferationszeiten und der vorausgegangenen Analyse des Zellzyklus (siehe 5.3.2). In Übereinschau mit der Literatur lassen sich aus den gewonnenen Daten somit Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion der PTM H3.3S31ph für die Zelle ziehen. Vorrangig ist eine Rolle von H3.3S31ph als mögliche Kontrollinstanz in der Mitose denkbar. Eine solche Kontrollfunktion für den Zellzyklus zur Mitose konnte bereits für andere Phosphorylierungen auf Histon H3 oder der Zentromer-spezifischen Variante CENP-A gezeigt werden¹¹⁶. Die räumliche Nähe zu Serin 28 und der auffällige Wachstumsphänotyp der Mutante H3.3S28A lassen dabei außerdem an eine Interaktion der beiden Phosphorylierungen H3S28ph und H3.3S31ph denken (beispielsweise i.S. einer gegenseitigen Kompensation, Verstärkung oder Suppression). Um dies zu bestätigen bzw. um genauere Aussagen über die spezifische Funktion der Phosphorylierung H3.3S31ph und den damit verbundenen Mechanismen treffen zu können, sind jedoch weiterführende Studien notwendig (siehe 7.3).

Auf der Suche nach der entsprechenden Kinase von H3.3 Serin 31 hatte die Testung der 84 rekombinanten Kinasen, die freundlicherweise durch Prof. Dr. Dirk Eick zur Verfügung gestellt worden waren, 14 potentielle Kandidaten ergeben. Anhand der Signalintensität im ELISA konnten dabei die vier Kinasen CDC42BPB, IRAK4, PIM1 und ROCK2 für eine Phosphorylierung in die engere Auswahl genommen werden (siehe 5.3.4). Für diese vier Kinasen sind in der Literatur unterschiedliche Funktionen beschrieben. Die humane Kinase CDC42BPB gehört beispielsweise zur Gruppe der p21-regulierten GTPasen. Für ihr murines Analogon MRCK β konnte in Ratten gezeigt werden, dass es eine Rolle in der Migration von Zellen innehat. MRCK β stellt dabei über die Phosphorylierung von nichtmuskulären Myosin-Leichtketten eine Voraussetzung zur Kontraktion von Aktin und Myosin-Filamenten dar^{117,118}. Ein spezifisches Auftreten der Kinase in der Metaphase ist jedoch nicht beschrieben, was eher gegen eine Funktion dieser Kinase für eine Phosphorylierung von Histon H3.3 Serin 31 *in vivo* argumentiert. Ähnlich konnte für die Kinase ROCK2 gezeigt werden,

dass sie eine Rolle in der Migration von adulten neuronalen Vorläuferzellen spielt. Ein Effekt der Kinase ROCK2 auf die Proliferation, die Apoptose oder die Differenzierung von Zellen konnte dabei jedoch explizit nicht nachgewiesen werden¹¹⁹. Dies argumentiert ebenfalls eher gegen eine Funktion von ROCK2 für die Phosphorylierung von Histon H3.3 Serin 31 *in vivo*. Die humane Kinase IRAK4 wird in verschiedenen Studien mit Signalwegen der innate Immunabwehr (über sog. Toll-Like Rezeptoren, TLR) in Verbindung gebracht. IRAK4 führt dabei zusammen mit der verwandten Kinase IRAK1 zur gezielten Phosphorylierung des Proteins Mal, welches wiederum eine wichtige Rolle im Signalweg des TLR2 und des TLR4 spielt¹²⁰. Auch für IRAK4 liegen jedoch keine Hinweise auf ein Mitosespezifisches Expressions- oder Aktivitätsmuster vor. Dies argumentiert analog zu den Kinasen CDC42BPB und ROCK2 ebenfalls eher gegen eine Funktion von IRAK4 für eine Phosphorylierung von H3.3S31 *in vivo*.

Anders verhält es sich hingegen mit dem vierten identifizierten Protein, der humanen Kinase PIM1. Die Serin/Threonin-Kinase PIM1 gehört zur Gruppe der Calcium/Calmodulin-regulierten Kinasen (CAMK). Sie wird bekanntermaßen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben exprimiert. PIM1 phosphoryliert dabei mehrere Proteine, von denen den meisten eine Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus oder aber der Apoptose zugeschrieben wird¹²¹. Die Kinase PIM1 gilt überdies als Proto-Onkogen lymphoider Tumoren. Insbesondere vermittelt PIM1 nachgewiesenermaßen über eine Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung von CDC25C, einer für den Eintritt in die Mitose essentiellen Phosphatase, eine regulatorische Funktion i.S. einer Kontrollinstanz in der G₂/M-Phase¹²². Vor diesem Hintergrund scheint PIM1 für weiterführende Untersuchungen bezüglich einer Phosphorylierung von H3.3S31 ein sehr aussichtsreicher Kandidat zu sein (siehe 7.3).

Unter den übrigen 14 identifizierten potentiellen Kinasen von H3.3S31 finden sich einige weitere interessante Kandidaten, die laut Literatur im engeren Zusammenhang mit Mitose-relevanten Funktionen der Zelle stehen. Zu nennen sind hier insbesondere die Kinase PIM2¹²¹, eine zu PIM1 eng verwandte Kinase, sowie die Kinasen MAPKAPK3¹²³, CHEK1¹²⁴ und NEK2¹²⁵. Da die Signale dieser Kinasen im durchgeführten ELISA Versuchsaufbau allerdings deutlich geringer ausfielen, als das Signal von PIM1, scheint ihre Affinität zu der Bindungsstelle geringer zu sein, als die der Kinase PIM1. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der im ELISA Experiment *in vitro* angebotenen Bindungsstelle lediglich um eine kurze Proteinsequenz des Histons H3.3 von 19 AS Länge handelte. Ein *in vivo* vollwertig vorliegendes Protein H3.3 kann über sterische oder elektrostatische Eigenschaften eine Affinität der Kinasen zum Protein merklich beeinflussen. Vor diesem Hintergrund scheint eine Rolle der Kinasen PIM2, MAPKAPK3, CHEK1 und NEK2 für eine Phosphorylierung von H3.3S31 *in vivo* zwar weniger wahrscheinlich, sollte aber für den Fall eines negativen Ergebnisses bei der Untersuchung der vorrangigen Kinase PIM1 weiter in Betracht gezogen werden (siehe 7.3).

7 AUSBLICK

7.1 Senkung der Detektionsschwelle zur Identifikation Zellzyklus- und Varianten-spezifischer PTMs und MS Analyse der Proteinfractionen

Wie unter 6.1 beschrieben, konnten in dieser Arbeit mögliche Hyperacetylierungen bzw. Hyperphosphorylierungen für die Histone H1 und H2A mit Hilfe von A/U- T/A/U- und 2D-T/A/U-PAGE Verfahren nachgewiesen werden. Die jeweils beobachteten Banden konnten jedoch nicht bestimmten Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen alleine auf Grundlage der PAGE Verfahren zugeordnet werden. Hierzu sind letztlich weiterführende Untersuchungen der Gele notwendig. Gleiches gilt für die Analyse der übrigen Histonproteine, für die keine auffälligen Bandenmuster i.S. möglicher Phosphorylierungen detektiert wurden (insbesondere H3.1, H3.2 und H3.3). Die Nachweisgrenze bzw. Sensitivität der Methode sollte daher möglichst weiter erhöht werden.

Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Nachweisgrenze liegt in der Aufreinigung der Proben bzw. säuregefällten Histone über ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographie Verfahren (sog. RP-HPLC). Dieses Verfahren stand bei Durchführung der Experimente in unserem Labor noch nicht zur Verfügung, konnte jedoch mittlerweile erfolgreich etabliert werden. Es kann nun für weitergehende Analysen i.S. einer verbesserten Aufbereitung der Proben herangezogen werden. Die Auftrennung der Proteine mittels RP-HPLC Verfahren erfolgt, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit eingesetzten PAGE Verfahren, mittels einer stationären bzw. mobilen Phase anhand polarer Eigenschaften der Proben über eine Trennsäule. Das Trennvermögen der RP-HPLC liegt dabei ein Vielfaches über dem der in dieser Arbeit angewandten Methode¹²⁶. Sie verspricht daher für weitere Untersuchungen idealere Bedingungen und eine wesentlich verbesserte Trennschärfe der Proteine.

An eine derart verbesserte Auftrennung über ein RP-HPLC Verfahren kann dann analog zu 5.1 auch eine Auftrennung über A/U-, T/A/U-PAGE und 2D-T/A/U-Verfahren erfolgen. Um deren Auflösungsvermögen weiter zu steigern ist es theoretisch möglich, die Laufstrecke der Proteine im Gel zu verlängern. Außerdem kann versucht werden über das Anlegen einer niedrigeren Spannung (entsprechend über einen längeren Zeitraum) die Trennschärfe des Verfahrens zu steigern. Auf diese Weise sollte es möglich sein, die Auftrennung im Gel bis hin zu einzelnen Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen zu optimieren. Damit sollten auch einzelne Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen der Histone H3.1, H3.2 und H3.3 nachweisbar sein.

Zur anschließenden Identifizierung bzw. Zuordnung der einzelnen Banden zu bestimmten, verifizierten Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen ist es letztlich möglich, diese analog zu 5.2 aus den A/U-, T/A/U- bzw. 2D-T/A/U-PAGE Gelen herauszulösen und für eine Analyse in der MALDI-ToF MS bzw. der Orbitrap MS/MS aufzubereiten. Eine solche massenspektrometrische Analyse der Banden kann letztlich eine genaue Identifikation der Proteine bzw. eine sichere Zuordnung der Banden zu bestimmten Acetylierungen bzw. Phosphorylierungen ermöglichen.

7.2 Analysen zum Nachweis von H3K79me3T80ph außerhalb von Mitose und Apoptose und Identifizierung von Chromatin-Effektorproteinen

Der Nachweis einer putativen Modifizierung H3K79me3T80ph *in vivo* war in dieser Arbeit weder in der MALDI-ToF MS noch in der Orbitrap MS/MS gelungen. Hierfür konnten verschiedene Gründe vorliegen. Obgleich es aufgrund der Daten wahrscheinlich erscheint, dass die PTM H3K79me3T80ph *in vivo* nicht vorkommt, ist es denkbar, dass ein Nachweis auch aufgrund einer ungeeigneten Anreicherung der Proben bzw. eines unzureichenden Detektionslimits der Methode nicht gelungen war. Vor diesem Hintergrund sollte versucht werden, zusätzlich zu den HeLa Zellen in der G₂/M-Phase auch solche HeLa Zellen zu untersuchen, die sich in der G₀-, G₁- und S-Phase, sowie in der Apoptose, der DNA-Reparatur und der Meiose befinden. Zusätzlich sollte versucht werden, die Detektionsschwelle des Versuchsaufbaus weiter zu verbessern, um auch sehr seltene, wenig abundante PTM sicher detektieren zu können (siehe 6.2).

Um eine möglichst große Anzahl modifizierter Histone in der MS untersuchen zu können, sollten Zellen in den oben genannten Phasen des Zellzyklus vor Aufbereitung für die MS bzw. MS/MS Analyse synchronisiert werden. Dies kann ähnlich der Synchronisierung von Zellen in der G₂/M-Phase (siehe 4.1.2.2) durch Versetzung des Nährmediums der Zellen mit bestimmten Reagenzien erfolgen. Um Zellen beispielsweise in der G₀-Phase zu arretieren, kann Isoleucin-defizientes DMEM Medium unter Zugabe von 5% dialysiertem Medium für 72h verwendet werden¹²⁷. Eine entsprechende Synchronisierung von Zellen in der S-Phase kann ebenfalls durch Inkubation in Isoleucine-defizientem DMEM Medium für 48h erreicht werden, gefolgt von einer Inkubation in 7,5mM Thymidin-haltigem DMEM Medium für weitere 18h¹²⁸. Durch anschließende Inkubation für weitere 5,5h in einfachem, unbehandeltem DMEM Medium kann der Thymidin-Block wieder aufgehoben werden. Eine Abnahme der HeLa Zellen führt dann je nach Zeitpunkt zu synchronisierten Zellen ganz zu Beginn oder, bei entsprechendem Ernten der Zellen nach etwa 5,5h, zu synchronisierten Zellen in etwa der mittleren S-Phase¹¹⁰. Die Analyse von Zellen in der G₁-Phase kann analog zu 5.2 über asynchrone Zellen erfolgen. Die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen bzw. die Einleitung der Apoptose durch intensive UV-Bestrahlung ist ebenfalls analog zu 5.1 bereits etabliert¹⁸. Ein Problem stellt hingegen die Untersuchung von meiotischen Zellen dar. Sie ist anhand von HeLa Zellkulturen nicht möglich. Es ist hierzu nötig einen anderen Modellorganismus heranzuziehen, z.B. *Xenopus* Oozyten¹²⁹. Vor diesem Hintergrund scheint es sinnvoll, sich in weiteren Untersuchungen zunächst auf HeLa Zellen der G₀-, G₁- und S-Phase, sowie nach Induktion von DNA-Reparaturmechanismus bzw. Apoptose zu beschränken. Analog zu den Ausführungen in 7.1 bietet es sich auch für die Untersuchung der Proben zur Analyse der mutmaßlichen PTM H3K79me3T80ph an, sie nach der entsprechenden Synchronisation und Aufschlüsselung und Aufbereitung über eine RP-HPLC Säule aufzutrennen bzw. anschließend unter den verbesserten MS/MS Bedingungen zu analysieren.

Sollte auf diese Weise eine Phosphorylierung an Threonin 80 auf Histon H3 *in vivo* nachgewiesen werden, könnten sich weitere Studien ähnlich wie unter 5.3 mit der Identifizierung der

entsprechenden Kinase, potentieller Chromatin-Effektorproteine und der weiteren Charakterisierung ihrer Funktion beschäftigen. Hierzu bietet sich analog zum bereits für die Phosphorylierung an Serin 31 auf Histon H3.3 etablierten ELISA Ansatz eine Übertragung auf eine H3T80 an (siehe 5.3.4). Geht man von einer Interaktion von H3T80ph mit DOT1L bzw. mit Methylierungen an H3K79 aus, sollten dabei im ELISA Experiment verschiedene Peptide eingesetzt werden. Die Aktivität der entsprechenden Kinasen sollte sowohl mit unmodifizierten H3 Peptiden, als auch mit Peptiden, welche verschiedene Methylierungszuständen von H3K79 enthalten, untersucht werden. Vor dem Hintergrund der *Switch Hypothesis* ist nämlich denkbar, dass eine Kinase das Epitop um H3T80 nur unter bestimmten Methylierungszuständen von Lysin 79 erkennen und somit phosphorylieren kann, bzw. eine Methylierung an Lysin 79 die Aktivität der Kinase beeinflussen kann.

Sollte es gelingen, eine potentielle Kinase für H3T80 zu identifizieren, müsste diese anschließend zunächst *in vitro* weiter auf ihre Aktivität getestet werden. Beispielsweise könnte hierzu das unter 5.3.5 etablierte System des rekombinanten Chromatins herangezogen werden. Zu beachten ist, dass dem Chromatin ggf. analog zum ELISA Versuchsaufbau rekombinantes DOT1L zugegeben werden müsste, um eine Methylierung von H3K79 *in vitro* zu erreichen. Im Umkehrschluss kann anhand dieses Versuchsaufbaus untersucht werden, ob DOT1L rekombinantes Histon H3 nach einer Phosphorylierung von H3T80 noch methylieren kann. Rekombinant erzeugte, *in vitro* phosphorylierte Histone könnten dann in Bindestudien letztlich eingesetzt werden, um aus *in vivo* gewonnenem Zell-Lysat durch spezifische Bindung Interaktionspartner bzw. Chromatin-Effektorproteine zu identifizieren und weiter zu analysieren.

7.3 Weiterführende Charakterisierung von H3.3S31ph, Untersuchung identifizierter Proteinkinasen und Chromatin-Bindestudien *in vitro*

Bei der Untersuchung der bereits bekannten Phosphorylierung H3.3S31ph hatten sich in dieser Arbeit Hinweise auf eine Funktion der AS Serin 31 bzw. ihrer PTM auf Histon H3 für die Zellteilung von HeLa Zellen ergeben. Im Einzelnen konnte bei gezielter Überexpression punktmutierter Konstrukte wiederholt ein Phänotyp für Zellzyklus, Wachstums- und Proliferationsgeschwindigkeiten der HeLa Zellen nachgewiesen werden. Der beobachtete Phänotyp war abhängig vom Auftreten der AS Serin 31 und führte insbesondere bei ihrer Defizienz zu einem veränderten Zellzyklus bzw. verlangsamten Proliferationszeiten. Es muss hierbei darauf hingewiesen werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien neben den punktmutierten Histonen dabei stets auch weiterhin die endogenen Histon-Proteine exprimierten. Vor diesem Hintergrund war initial eigentlich nicht von einem starken Phänotyp auszugehen gewesen (siehe 6.3).

Um den beobachteten Phänotypen weiter zu charakterisieren sollte versucht werden, die Expression der endogenen H3.3 Histone zu supprimieren, möglichst sogar vollständig zu unterbinden. Dies hätte theoretisch zur Folge, dass die untersuchten Zellen zur Gänze auf die Integration der punktmutierten Konstrukte angewiesen wären. Ein Phänotyp sollte dementsprechend ausgeprägter

ausfallen. Es stehen hierzu theoretisch zwei verschiedene molekularbiologische Methoden zur Auswahl. Neben der nur partiellen Unterdrückung der Genexpression über einen sog. *Knockdown* mittels RNA-Interferenz (RNAi)¹³⁰ ist es auch möglich, die Genexpression vollständig mittels eines sog. *Knockouts* zu unterbinden¹³¹. Ein *Knockout* ist technisch allerdings ungleich schwieriger umzusetzen und birgt aufgrund der essentiellen Funktionen von Histonprotein die hohe Gefahr einer Letalität für den Modellorganismus. Vor diesem Hintergrund erscheint die RNAi die geeignetere Methode zur weiteren Untersuchung der punktmutierten HeLa Zelllinien. Mit den auf diese Weise modifizierten Mutanten sollten dann die bereits durchgeführten Analysen zu Zellzyklus, Wachstums- und Proliferationsgeschwindigkeit wiederholt werden. Ferner ist es denkbar, die Transfektion und den Knockdown auf andere Zelllinien (z.B. HEK293) auszuweiten.

Der Ansatz eines Knockdown bzw. Knockout Experiments ließe sich auch auf die weitere Untersuchung der identifizierten potentiellen Kinasen PIM1, PIM2, MAPKAPK3, CHEK1 und NEK2 anwenden. Obgleich ihre Aktivität *in vitro* bereits anhand des ELISA Aufbaus nachgewiesen werden konnte, bleibt unsicher, ob sie H3.3S31 auch *in vivo* phosphorylieren können. Hierzu könnte das Signal des Antikörpers α -H3.3S31ph vor und nach einem *Knockdown* der jeweiligen Kinasen korreliert werden. Eine Aktivität der Kinase *in vivo* vorausgesetzt sollte ihr Knockdown über einen Verlust der Phosphorylierung an H3.3S31 zu einer Abschwächung des Antikörpersignals führen. Analog hierzu könnte auch versucht werden, entsprechend einen *Knockout* der Kinasen durchzuführen. Dies hätte i.W. den Vorteil, dass bei Verlust des Antikörpersignals für α -H3.3S31ph eine Aktivität der Kinase *in vivo* über ein sog. *Rescue* Experiment mit hoher Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann. Hierbei wird versucht den ursprünglichen Phänotypen (bzw. den Wildtypen) nach erfolgreichem Knockout durch erneute Transfektion der entsprechenden Kinase wieder herzustellen¹³².

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen dem Linkerhiston H1 und der AS Alanin (bzw. Serin) 31 auf Histon H3 (bzw. der Variante H3.3) steht das System des rekombinanten Chromatins zur Verfügung (siehe 5.3.5). Da sich bekanntlich die Varianten H3.2 und H3.3 i.W. an Position 31 unterscheiden, können *in vitro* entsprechend Mononukleosomen assembliert werden, die sich i.W. nur durch H3.2A31 bzw. H3.3S31 unterscheiden. So kann in getrennten Ansätzen das Bindungsverhalten von Histon H1 jeweils bei Gegenwart der entsprechenden AS untersucht und verglichen werden. Vorab ist es hierzu jedoch nötig, die Expression von Histon H1 weiter zu steigern. In einem weiteren Schritt können Mononukleosomen mit H3.3S31 in unmodifiziertem und phosphoryliertem Zustand dazu verwendet werden analog zu 2.3.2 i.S. einer Immunpräzipitation weitere mögliche Chromatin-Effektorproteine zu identifizieren und weiter zu analysieren. Diese Fragestellung wird augenblicklich freundlicherweise durch Frau Christine Mehlhorn i.R. ihrer Dissertation weiterverfolgt.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Desoxyribonukleinsäure (DNA), die Erbinformation, definiert die Struktur und Funktion jeder Zelle. In Eukaryoten ist sie um Oktamere aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden. Sie bilden mit der DNA höhere Strukturen, das sog. Chromatin. Die Struktur des Chromatins beeinflusst direkt die Aktivität der gebundenen DNA. Eukaryoten besitzen daher viele molekulare Mechanismen zu ihrer Veränderung, z.B. posttranslationale Modifizierungen (PTMs) von Histonproteinen oder den Austausch von kanonischen Histonen mit Histonvarianten (z.B. H3.1, H3.2, H3.3, u.a.). Für einige Varianten sind ihnen eigene, charakteristische PTMs beschrieben, z.B. die Phosphorylierung des Serins 31 der Variante H3.3 (H3.3S31ph). Die *Histone Code Hypothesis* postuliert, dass PTMs von Histonen in festen Mustern vorliegen können. Die *Switch Hypothesis* beschreibt die Regulation von Bindemolekülen an Histone durch benachbarte PTMs. Auf ihrer Grundlage wurde die These der Doppelmodifizierung einer bekannten Trimethylierung der Aminosäure (AS) Lysin 79 mit einer mutmaßlichen Phosphorylierung der AS Threonin 80 auf Histon H3 aufgestellt (H3K79me3T80ph). Neben der Etablierung eines einfachen Systems zur Identifizierung bisher unbeschriebener Phosphorylierungen bestand ein zweites Ziel dieser Arbeit im Nachweis der Phosphorylierung von H3 Threonin 80 *in vivo*. Eine weitere Zielsetzung lag in der genaueren Charakterisierung der bereits beschriebenen Varianten-spezifischen PTM H3.3S31ph, deren Expression zwar eng umschrieben ist, über deren spezifische Funktionen, Kinase und mögliche Effektorproteine aber wenig bekannt ist.

Um einen Überblick über Phosphorylierungen verschiedener Histonroteine zu gewinnen, wurden unterschiedliche Polyacrylamidgel-Elektrophoresen Verfahren (PAGE) etabliert. Zum Einsatz kamen A/U-, T/A/U- und 2D-T/A/U-PAGE Verfahren. Sie ermöglichten in Übereinstimmung mit der Literatur die Auftrennung bekannter PTM und stehen nun für weiterführende Studien zur Verfügung.

Der massenspektrometrische Nachweis der putativen PTM H3K79me3T80ph *in vivo* gelang nicht. Trotz optimierter Versuchsbedingungen konnte die Phosphorylierung weder in der MALDI-ToF, noch in der Orbitrap MS/MS nachgewiesen werden. Initiale Antikörperdaten wurde aufgrund einer aufgedeckten Kreuzreaktivität in Frage gestellt. Obgleich nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden kann, dass H3K79me3T80ph *in vivo* nicht existiert, wurde die These letztlich verworfen.

Die molekularbiologische Untersuchung der Varianten-spezifischen PTM H3.3S31ph ergab bei verifizierter Überexpression und Chromatin-Integration punktmutierter Histone übereinstimmend Hinweise auf einen Effekt der PTM auf die Zellteilung. Es konnte gezeigt werden, dass Serin 31 bzw. ihre PTM H3.3S31ph sowohl Zellzyklus, als auch Wachstums- und Proliferationsgeschwindigkeiten von HeLa Zellen beeinflusst. Dies argumentiert für eine aktivierende Funktion von H3.3S31ph in der Mitose. Weiter konnten mithilfe eines ELISAs fünf potentielle Proteinkinasen für H3.3S31ph identifiziert werden. Vorrangig kommt dabei die nukleäre Kinase PIM1 in Betracht. Zur weiteren Untersuchung potentieller Effektorproteine wurde *in vitro* ein molekularbiologisches Modellsystem etabliert. Es steht nun für weiterführende Studien zur Verfügung. Erste Vorarbeiten konnten bereits zeigen, dass hier evtl. Interaktionen mit dem Linkerhiston H1 eine wichtige Rolle spielen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **149**, 297-326 (1979).
2. Watson, J. D. & Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-8 (1953).
3. Nirenberg, M. et al. RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**, 1161-8 (1965).
4. Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 419-429 (1993).
5. McQuillen, K., Roberts, R. B. & Britten, R. J. Synthesis of Nascent Protein by Ribosomes in *Escherichia Coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1437-47 (1959).
6. Holley, R. W. et al. Structure of a Ribonucleic Acid. *Science* **147**, 1462-5 (1965).
7. Kornberg, T. & Gefter, M. L. DNA synthesis in cell-free extracts of a DNA polymerase-defective mutant. *Biochem Biophys Res Commun* **40**, 1348-55 (1970).
8. Blow, J. J. & Tanaka, T. U. The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. Second in the cycles review series. *EMBO Rep* **6**, 1028-34 (2005).
9. McCulloch, S. D. & Kunkel, T. A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res* **18**, 148-61 (2008).
10. Thanbichler, M., Wang, S. C. & Shapiro, L. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J Cell Biochem* **96**, 506-21 (2005).
11. Zimmer, C. Origins. On the origin of eukaryotes. *Science* **325**, 666-8 (2009).
12. Wolffe, A. P. & Guschin, D. Review: Chromatin Structural Features and Targets That Regulate Transcription. *Journal of Structural Biology* **129**, 102-122 (2000).
13. Tjio, J. H. The chromosome number of man. *Am J Obstet Gynecol* **130**, 723-4 (1978).
14. De Souza, C. P. & Osmani, S. A. Mitosis, not just open or closed. *Eukaryot Cell* **6**, 1521-7 (2007).
15. Bonisch, C., Nieratschker, S. M., Orfanos, N. K. & Hake, S. B. Chromatin proteomics and epigenetic regulatory circuits. *Expert Rev Proteomics* **5**, 105-19 (2008).
16. Grewal, S. I. & Jia, S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* **8**, 35-46 (2007).
17. Fullgrabe, J., Hajji, N. & Joseph, B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ* **17**, 1238-43 (2010).
18. Teyssier, F., Bay, J. O., Dionet, C. & Verrelle, P. Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation. *Bull Cancer* **86**, 345-57 (1999).
19. Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K. & Vandenneele, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* **44**, 205-21 (2008).
20. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-60 (1997).
21. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-63 (2004).
22. Jeltsch, A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* **3**, 274-93 (2002).
23. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21 (2002).
24. Boyes, J. & Bird, A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64**, 1123-34 (1991).
25. Feil, R. & Berger, F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet* **23**, 192-9 (2007).
26. Becker, P. B. & Horz, W. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* **71**, 247-73 (2002).
27. Gangaraju, V. K. & Bartholomew, B. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutat Res* **618**, 3-17 (2007).
28. Langst, G. & Becker, P. B. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* **1677**, 58-63 (2004).
29. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80 (2001).
30. Pusarla, R. H. & Bhargava, P. Histones in functional diversification. Core histone variants. *Febs J* **272**, 5149-68 (2005).
31. Hake, S. B. et al. Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6344-9 (2005).
32. Zhang, Y. & Reinberg, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-60 (2001).
33. Cosgrove, M. S. Histone proteomics and the epigenetic regulation of nucleosome mobility. *Expert Rev Proteomics* **4**, 465-78 (2007).
34. Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A. & Schubert, I. Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity.

- Trends Plant Sci* **11**, 199-208 (2006).
35. Rea, S. et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-9 (2000).
 36. Shi, Y. et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-53 (2004).
 37. Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. & Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1037-43 (2004).
 38. Yuan, J., Pu, M., Zhang, Z. & Lou, Z. Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle* **8**, 1747-53 (2009).
 39. de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S. & Martinez-Balbas, M. A. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* **27**, 164-75 (2005).
 40. Briggs, S. D. et al. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**, 498 (2002).
 41. Turner, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-45 (2000).
 42. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5 (2000).
 43. Bernstein, B. E. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-26 (2006).
 44. Fischle, W., Wang, Y. & David Allis, C. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. **425**, 475-479 (2003).
 45. Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B. H. & Peters, J. M. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438**, 1176-80 (2005).
 46. Gehani, S. S. et al. Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent H3K27me3S28 phosphorylation. *Mol Cell* **39**, 886-900 (2010).
 47. Dong, Z. & Bode, A. M. The role of histone H3 phosphorylation (Ser10 and Ser28) in cell growth and cell transformation. *Mol Carcinog* **45**, 416-21 (2006).
 48. Goto, H. et al. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* **274**, 25543-9 (1999).
 49. Ng, H. H. et al. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* **16**, 1518-27 (2002).
 50. Hake, S. B. et al. Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* **281**, 559-68 (2006).
 51. Bhaumik, S. R., Smith, E. & Shilatifard, A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1008-16 (2007).
 52. Polo, S. E. & Almouzni, G. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 104-11 (2006).
 53. Bustin, M., Catez, F. & Lim, J. H. The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell* **17**, 617-20 (2005).
 54. Khochbin, S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**, 1-12 (2001).
 55. Dryhurst, D. et al. Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. *BMC Biol* **7**, 86 (2009).
 56. Tsukuda, T., Fleming, A. B., Nickoloff, J. A. & Osley, M. A. Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **438**, 379-83 (2005).
 57. Jin, J. et al. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* **30**, 680-7 (2005).
 58. Svtelisl, A., Gevry, N., Grondin, G. & Gaudreau, L. H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells. *Cell Cycle* **9**, 364-70 (2010).
 59. Chadwick, B. P. & Willard, H. F. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* **152**, 375-84 (2001).
 60. Bernstein, E. & Hake, S. B. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol* **84**, 505-17 (2006).
 61. Karras, G. I. et al. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J* **24**, 1911-20 (2005).
 62. Hernandez-Munoz, I. et al. Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7635-40 (2005).
 63. Doyen, C. M. et al. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **26**, 1156-64 (2006).
 64. Kapoor, A. et al. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature* **468**, 1105-9 (2010).
 65. Wiedemann, S. M. et al. Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *J Cell Biol* **190**, 777-91 (2010).
 66. Sullivan, K. F. A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 182-8 (2001).
 67. Zeitlin, S. G., Shelby, R. D. & Sullivan, K. F. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol* **155**, 1147-57 (2001).
 68. Hake, S. B. & Allis, C. D. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6428-35 (2006).

69. Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. & Nakatani, Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51-61 (2004).
70. Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D. & Hake, S. B. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* **2**, 1445-57 (2007).
71. Johns, E. W. The electrophoresis of histones in polyacrylamide gel and their quantitative determination. *Biochem J* **104**, 78-82 (1967).
72. Panyim, S. & Chalkley, R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch Biochem Biophys* **130**, 337-46 (1969).
73. Bonner, W. M., West, M. H. P. & Stedman, J. D. Two-Dimensional Gel Analysis of Histones in Acid Extracts of Nuclei, Cells, and Tissues. *European Journal of Biochemistry* **109**, 17-23 (1980).
74. Feng, Q. et al. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* **12**, 1052-8 (2002).
75. Chen, I. & Dubnau, D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* **2**, 241-9 (2004).
76. S. E. Braslavsky, K. N. H. Glossary of terms used in photochemistry (Recommendations 1988). *Pure and Applied Chemistry* **60**, 1055-1106 (1988).
77. Robergs, R. A. & Griffin, S. E. Glycerol. Biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. *Sports Med* **26**, 145-67 (1998).
78. Masters, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* **2**, 315-9 (2002).
79. Sweet, S. C., Rogers, C. M. & Welsh, M. J. Calmodulin stabilization of kinetochore microtubule structure to the effect of nocodazole. *J Cell Biol* **107**, 2243-51 (1988).
80. Lyons, A. B. & Parish, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* **171**, 131-7 (1994).
81. Ramos-Vara, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* **42**, 405-26 (2005).
82. Taniou, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S. & Wilson, W. D. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* **31**, 3103-12 (1992).
83. Davey, H. M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci* **24**, 91-7 (2002).
84. Huang, Q. & Fu, W. L. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* **43**, 841-2 (2005).
85. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
86. Fazekas de St Groth, S., Webster, R. G. & Datyner, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* **71**, 377-91 (1963).
87. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. & Ferrara, P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* **203**, 173-9 (1992).
88. Kerenyi, L. & Gallyas, F. Errors in quantitative estimations on agar electrophoresis using silver stain. *Clin Chim Acta* **47**, 425-36 (1973).
89. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3116-20 (1979).
90. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-4 (1971).
91. Min, D. H. & Mrksich, M. Peptide arrays: towards routine implementation. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 554-8 (2004).
92. Lindner, H. H. Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms. *ELECTROPHORESIS* **29**, 2516-2532 (2008).
93. Villar-Garea, A., Israel, L. & Imhof, A. Analysis of histone modifications by mass spectrometry. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 14**, Unit 14 10 (2008).
94. Thingholm, T. E., Jorgensen, T. J. D., Jensen, O. N. & Larsen, M. R. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. **1**, 1929-1935 (2006).
95. Beavis, R. C. & Chait, B. T. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Commun Mass Spectrom* **3**, 436-9 (1989).
96. Beavis, R. C., Chaudhary, T. & Chait, B. T. alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* **27**, 156-158 (1992).
97. Strupat, K., Karas, M. & Hillenkamp, F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption--ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **111**, 89-102 (1991).
98. Hutchison, C. A. et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 6551-6560 (1978).
99. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23 (1979).
100. Hansen, L. H., Knudsen, S. & Sorensen, S. J. The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr Microbiol* **36**, 341-7 (1998).

101. Czermin, B. et al. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185-96 (2002).
102. Duncan, E. M. et al. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* **135**, 284-94 (2008).
103. Adams, R. R., Carmena, M. & Earnshaw, W. C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* **11**, 49-54 (2001).
104. Moyer, S. C., Cotter, R. J. & Woods, A. S. Fragmentation of phosphopeptides by atmospheric pressure MALDI and ESI/Ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **13**, 274-83 (2002).
105. Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P. & Jorgensen, T. J. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* **4**, 873-86 (2005).
106. Garcia, B. A. et al. Modifications of human histone H3 variants during mitosis. *Biochemistry* **44**, 13202-13 (2005).
107. Zondlo, S. C., Gao, F. & Zondlo, N. J. Design of an encodable tyrosine kinase-inducible domain: detection of tyrosine kinase activity by terbium luminescence. *J Am Chem Soc* **132**, 5619-21 (2010).
108. Hohmann, P. in *Molecular and Cellular Biochemistry* 81-92 (Springer Netherlands, 1983).
109. Happel, N., Stoldt, S., Schmidt, B. & Doenecke, D. M phase-specific phosphorylation of histone H1.5 at threonine 10 by GSK-3. *J Mol Biol* **386**, 339-50 (2009).
110. Halmer, L. & Gruss, C. Effects of cell cycle dependent histone H1 phosphorylation on chromatin structure and chromatin replication. *Nucleic Acids Res* **24**, 1420-7 (1996).
111. Foster, E. R. & Downs, J. A. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *Febs J* **272**, 3231-40 (2005).
112. van Attikum, H. & Gasser, S. M. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* **19**, 207-17 (2009).
113. San-Segundo, P. A. & Roeder, G. S. Role for the silencing protein Dot1 in meiotic checkpoint control. *Mol Biol Cell* **11**, 3601-15 (2000).
114. Tatum, D. & Li, S. Evidence that the histone methyltransferase Dot1 mediates global genomic repair by methylating histone H3 on lysine 79. *J Biol Chem* **286**, 17530-5 (2011).
115. Jones, B. et al. The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. *PLoS Genet* **4**, e1000190 (2008).
116. Pascreau, G., Arlot-Bonnemains, Y. & Prigent, C. Phosphorylation of histone and histone-like proteins by aurora kinases during mitosis. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 369-74 (2003).
117. Moncrieff, C. L., Bailey, M. E., Morrison, N. & Johnson, K. J. Cloning and chromosomal localization of human Cdc42-binding protein kinase beta. *Genomics* **57**, 297-300 (1999).
118. Huo, L. et al. Cdc42-dependent formation of the ZO-1/MRCKbeta complex at the leading edge controls cell migration. *Embo J* **30**, 665-78 (2011).
119. Leong, S. Y., Faux, C. H., Turbic, A., Dixon, K. J. & Turnley, A. M. The Rho Kinase Pathway Regulates Mouse Adult Neural Precursor Cell Migration. *Stem Cells* (2010).
120. Dunne, A. et al. IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination, and degradation of MyD88 adaptor-like (Mal). *J Biol Chem* **285**, 18276-82 (2010).
121. Bachmann, M. & Moroy, T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 726-30 (2005).
122. Bachmann, M., Hennemann, H., Xing, P. X., Hoffmann, I. & Moroy, T. The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J Biol Chem* **279**, 48319-28 (2004).
123. Clifton, A. D., Young, P. R. & Cohen, P. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* **392**, 209-14 (1996).
124. Flagg, G. et al. Atm-dependent interactions of a mammalian chk1 homolog with meiotic chromosomes. *Curr Biol* **7**, 977-86 (1997).
125. Schultz, S. J. & Nigg, E. A. Identification of 21 novel human protein kinases, including 3 members of a family related to the cell cycle regulator nimA of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ* **4**, 821-30 (1993).
126. Lindsay, S. & Kealey, D. *High performance liquid chromatography* (1987).
127. Tobey, R. A. & Ley, K. D. Isoleucine-mediated regulation of genome replication in various mammalian cell lines. *Cancer Res* **31**, 46-51 (1971).
128. Pedrali-Noy, G. et al. Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucleic Acids Res* **8**, 377-87 (1980).
129. Maller, J. L. & Krebs, E. G. Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **252** 1712-1718 (1977).
130. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-9 (2004).
131. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-12 (1987).
132. Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A. & Ekker, S. C. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* **6**, 69-77 (2009).

ANHANG

Codon-Sonne

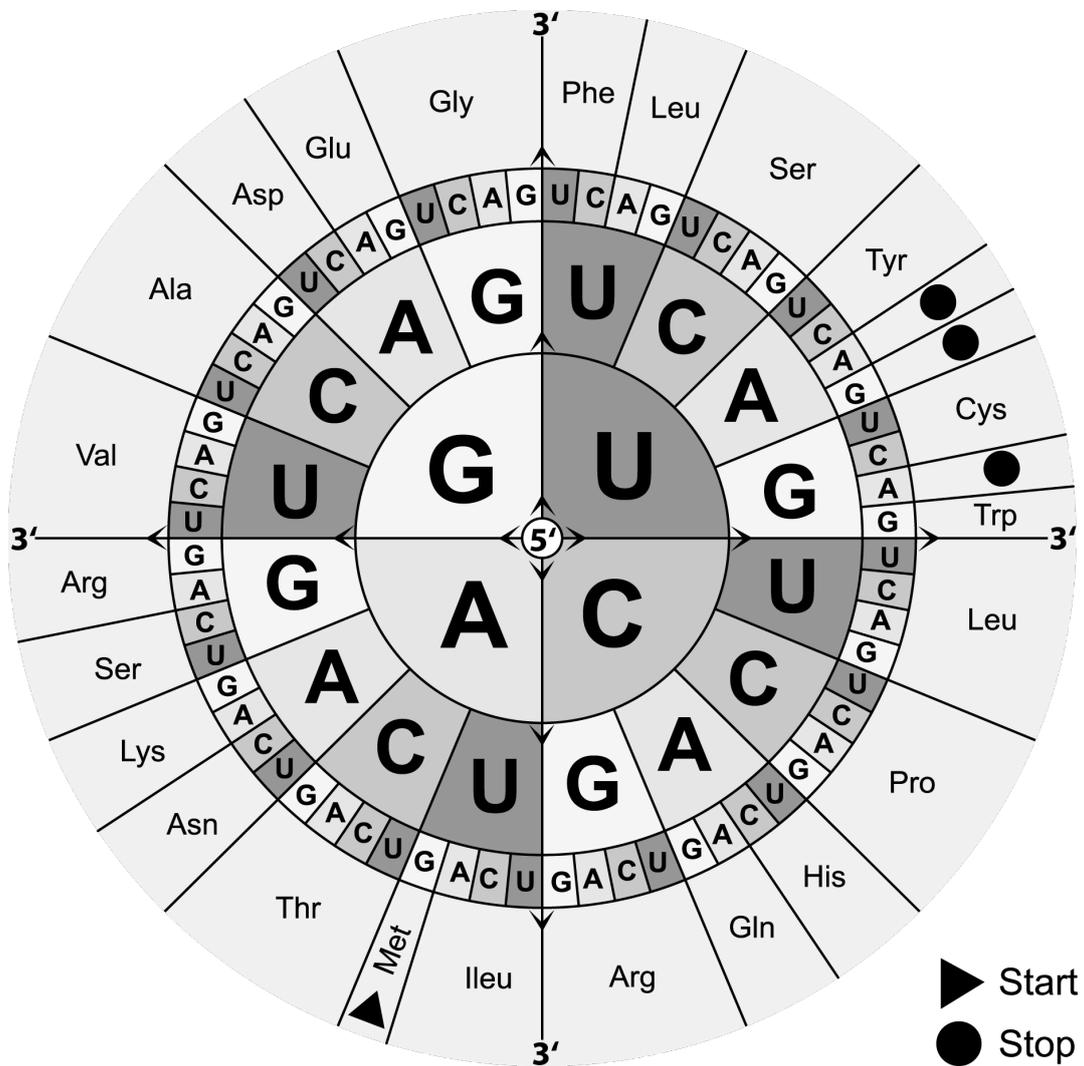


Abb. 8-1: Genetische Kodierung der Aminosäuren (Quelle: Wikipedia)

Buchstabencode der Aminosäuren

Tab. 8-1: Übersetzung der Aminosäuren in Ein- und Dreibuchstabencode

	1BC	3BC						
			Glutamin	Gln	Q	Phenylalanin	Phe	F
Alanin	Ala	A	Glycin	Gly	G	Prolin	Pro	P
Arginin	Arg	R	Histidin	His	H	Serin	Ser	S
Asparagin	Asn	N	Isoleucin	Ile	I	Threonin	Thr	T
Aspartat	Asp	D	Leucin	Leu	L	Tryptophan	Trp	W
Cystein	Cys	C	Lysin	Lys	K	Tyrosin	Tyr	Y
Glutamat	Glu	E	Methionin	Met	M	Valin	Val	V

Humanes Histon H1

H1	S	E	T	V	P	P	A	P	A	A	S	A	A	P	E	K	P	L	A	G	K	K	A	K	K	P	A	K	A	A	A	S	K	K	K	P	A	G	P	S	V	S	E	L	I	V	Q	A	A	S	S	K	E	R	G	G	V	S		
H1	L	A	A	L	K	K	A	L	A	A	A	G	Y	D	V	E	K	N	N	S	R	I	K	L	G	I	K	S	L	V	S	K	G	T	L	V	Q	T	K	G	T	G	A	S	G	S	F	K	L	N	K	K	A	S	S	V	E	T	K	P
H1	G	A	S	K	V	A	T	K	T	K	A	T	G	A	S	K	K	L	K	K	A	T	G	A	S	K	S	V	K	T	P	K	K	A	K	K	P	A	A	T	R	K	S	S	K	N	P	K	K	P	K	T	V	K	P	K	V	A		
H1	K	S	P	A	K	A	K	A	V	K	P	K	A	A	K	A	R	V	T	K	P	K	T	A	K	P	K	K	A	A	P	K	K	K																										

Abb. 8-2: Aminosäuresequenz des humanen Histons H1 (Quelle: NHGRI)

Humanes Histon H2A

H2A	S	G	R	G	K	Q	G	G	K	A	R	A	K	A	K	S	R	S	R	A	G	L	Q	F	P	V	G	R	V	H	R	L	L	R	K	G	N	Y	S	E	R	V	G	A	G	A	P	V	Y	L	A	A	V	L	E	Y	L	T	A	
H2A	E	I	L	E	L	A	G	N	A	A	R	D	N	K	K	T	R	I	I	P	R	H	L	Q	L	A	I	R	N	D	E	E	L	N	K	L	L	G	R	V	T	I	A	Q	G	G	V	L	P	N	I	Q	A	V	L	L	P	K	K	T
H2A	E	S	H	H	K	A	K	G	K																																																			

Abb. 8-3: Aminosäuresequenz des humanen Histons H2A (Quelle: NHGRI)

Humanes Histon H2B

H2B	P	E	P	A	K	S	A	P	A	P	K	K	G	S	K	K	A	V	T	K	A	Q	K	K	D	G	K	R	K	R	S	R	K	E	S	Y	S	I	Y	V	Y	K	V	L	K	Q	V	H	P	D	T	G	I	S	S	K	A	M	G
H2B	I	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	G	E	A	S	R	L	A	H	Y	N	K	R	S	T	I	T	S	R	E	I	Q	T	A	V	R	L	L	P	G	E	L	A	K	H	A	V	S	E	G	T	K	A	V	T	K
H2B	Y	T	S	S	K																																																						

Abb. 8-4: Aminosäuresequenz des humanen Histons H2B (Quelle: NHGRI)

Humanes Histon H3.1, H3.2, H3.3

H3.1	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P	A	T	G	G	V	K	K	P	H	R	Y	R	P	G	T	V	A	L	R	E	I	R	R	Y	Q	K	S	T	E	L
H3.2	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P	A	T	G	G	V	K	K	P	H	R	Y	R	P	G	T	V	A	L	R	E	I	R	R	Y	Q	K	S	T	E	L
H3.3	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P	S	T	G	G	V	K	K	P	H	R	Y	R	P	G	T	V	A	L	R	E	I	R	R	Y	Q	K	S	T	E	L
H3.1	L	I	R	K	L	P	F	Q	R	L	V	R	E	I	A	Q	D	F	K	T	D	L	R	F	Q	S	S	A	V	M	A	L	Q	E	A	C	E	A	Y	L	V	G	L	F	E	D	T	N	L	C	A	I	H	A	K	R	V	T	I	M
H3.2	L	I	R	K	L	P	F	Q	R	L	V	R	E	I	A	Q	D	F	K	T	D	L	R	F	Q	S	S	A	V	M	A	L	Q	E	A	S	E	A	Y	L	V	G	L	F	E	D	T	N	L	C	A	I	H	A	K	R	V	T	I	M
H3.3	L	I	R	K	L	P	F	Q	R	L	V	R	E	I	A	Q	D	F	K	T	D	L	R	F	Q	S	A	A	I	G	A	L	Q	E	A	S	E	A	Y	L	V	G	L	F	E	D	T	N	L	C	A	I	H	A	K	R	V	T	I	M
H3.1	P	K	D	I	Q	L	A	R	R	I	R	G	E	R	A																																													
H3.2	P	K	D	I	Q	L	A	R	R	I	R	G	E	R	A																																													
H3.3	P	K	D	I	Q	L	A	R	R	I	R	G	E	R	A																																													

Abb. 8-5: Aminosäuresequenzen der humanen Histone H3.1, H3.2 und H3.3 (Quelle: NHGRI)

Humanes Histon H4

H4	S	G	R	G	K	G	G	K	L	G	K	G	G	A	K	R	H	R	K	V	L	R	D	D	I	Q	G	I	T	K	P	A	I	R	R	L	A	R	R	G	G	V	K	R	I	S	G	L	I	Y	E	E	T	R	G	V	L	K	V
H4	F	L	E	N	V	I	R	D	A	V	T	Y	T	E	H	A	K	R	K	T	V	T	A	M	D	V	V	Y	A	L	K	R	Q	G	R	T	L	Y	G	F	G	G																	

Abb. 8-6: Aminosäuresequenz des humanen Histons H4 (Quelle: NHGRI)

Vektorkarte: pET 21

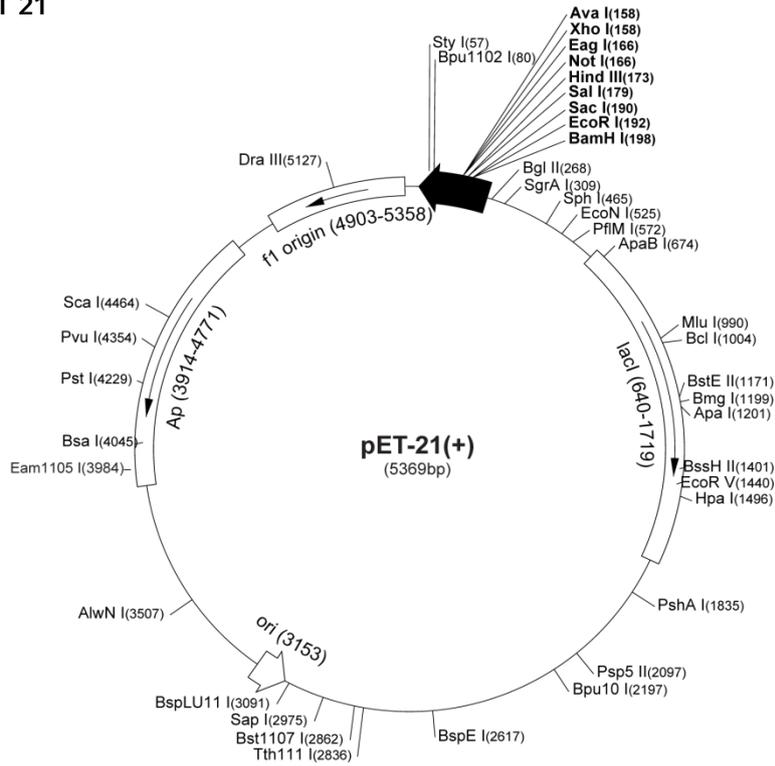


Abb. 8-7: pET21(+) Vektorkarte (Quelle: Merck)

Vektorkarte: pIRESneo

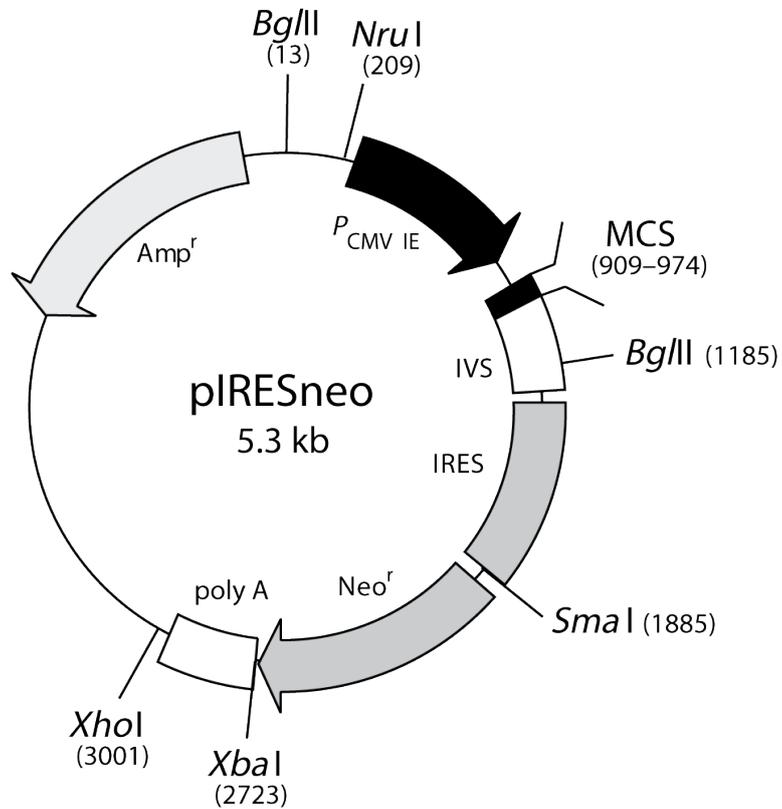


Abb. 8-8: pIRESneo Vektorkarte (Quelle: Clontech)

Peptide Array

Tab. 8-2: Aminosäuresequenzen und Modifizierungen der Peptide des Peptide Array Lot1160

H2A	H3(10-22)	H3(25-37)K36me2	H3(75-87)K79me2	H4(4-16)
H2A(110-125)	H3(10-22)K14ac	H3(25-37)K36me3	H3(75-87)K79me3	H4(4-16)K5acK8acK12acK16ac
	H3(10-22)R17me2K18ac			
H3	H3(10-22)K18ac	H3(28-40)	H3(116-128)	H4(6-18)
H3(1-13)	H3(10-22)K18me1	H3(28-40)K36ac	H3(116-128)K122ac	H4(6-18)K8ac
H3(1-13)R2me2		H3(28-40)K36me	H3(116-128)K122me	H4(6-18)K8acK12ac
H3(1-13)K4me	H3(13-25)	H3(28-40)K36me2	H3(116-128)K122me2	H4(6-18)K8acK12acK16ac
H3(1-13)K4me2	H3(13-25)K14ac	H3(28-40)K36me3	H3(116-128)K122me3	H4(6-18)K8acK16ac
H3(1-13)K4me3	H3(13-25)R17me2	H3(28-40)K37ac		H4(6-18)K12ac
H3(1-13)K4meS10ph	H3(13-25)R17me2K18ac	H3(28-40)K37me	H3-Varianten	H4(6-18)K12acK16ac
H3(1-13)K4me2S10ph	H3(13-25)K18ac	H3(28-40)K37me2	H3.1(86-98)	H4(6-18)K16ac
H3(1-13)K4me3S10ph	H3(13-25)K23ac	H3(28-40)K37me3	H3.1(86-98)S87ph	
H3(1-13)K9ac				H4(10-22)
H3(1-13)K9acS10ph	H3(16-28)	H3(34-46)	H3.2(86-98)	H4(10-22)K12ac
H3(1-13)K9me	H3(16-28)R17me2		H3.2(86-98)S87ph	H4(10-22)K12acK16ac
H3(1-13)K9me2	H3(16-28)K18ac	H3(49-61)K56me	H3.2(86-98)S87phS96ph	H4(10-22)K16ac
H3(1-13)K9me3	H3(16-28)K23ac	H3(49-61)K56me3	H3.2(86-98)S96ph	H4(10-22)K20me
H3(1-13)K9meS10ph	H3(16-28)K23me	H3(49-61)K56meS57ph		H4(10-22)K20me2
H3(1-13)K9me2S10ph	H3(16-28)K27me		H3.3(22-34)	H4(10-22)K20me3
H3(1-13)K9me3S10ph	H3(16-28)K27me2	H3(50-62)	H3.3(22-34)K27meS31ph	
H3(1-13)S10ph	H3(16-28)K27me3	H3(50-62)K56ac	H3.3(22-34)K27me2S31ph	H4(13-25)
		H3(50-62)K56acS57ph	H3.3(22-34)K27me3S31ph	H4(13-25)K16ac
H3(1-21)	H3(18-31)K27me2S28ph	H3(50-62)S57ph	H3.3(22-34)S28ph	H4(13-25)K16acK20me
H3(1-21)K4me	H3(18-31)K27me3S28ph		H3.3(22-34)S28phS31ph	H4(13-25)K16acK20me2
H3(1-21)K9me		H3(53-65)	H3.3(22-34)S31ph	H4(13-25)K16acK20me3
	H3(18-39)	H3(53-65)K56ac	H3.3(86-98)	H4(13-25)K20ac
H3(4-16)	H3(18-39)K27me	H3(53-65)K56me	H3.3(86-98)S96ph	H4(13-25)K20me
H3(4-16)K9ac	H3(18-39)K36me	H3(53-65)K56acS57ph		H4(13-25)K20me2
H3(4-16)K9me		H3(53-65)S57ph	H3.X(8-20)	H4(13-25)K20me3
H3(4-16)K9me2	H3(19-31)		H3.X(73-85)	
H3(4-16)K9me3	H3(19-31)K27me	H3(58-70)	H3.X(134-146)	H4(26-38)
H3(4-16)K9acS10ph	H3(19-31)K27me2	H3(58-70)K64me		H4(26-38)K31ac
H3(4-16)K9meS10ph	H3(19-31)K27me3	H3(58-70)K64me2	H4	H4(26-38)K31me
H3(4-16)K9me2S10ph	H3(19-31)K27meS28ph	H3(58-70)K64me3	H4(1-13)	H4(26-38)K31me2
H3(4-16)K9me3S10ph	H3(19-31)S28ph		H4(1-13)S1ph	H4(26-38)K31me3
H3(4-16)S10ph		H3(72-84)	H4(1-13)R3me2	
H3(4-16)S10phK14ac	H3(22-34)	H3(72-84)K79ac	H4(1-13)K5ac	H4(50-62)
H3(4-16)K14ac	H3(22-34)K23ac	H3(72-84)K79me	H4(1-13)K5acK8ac	H4(50-62)K59ac
	H3(22-34)K27me	H3(72-84)K79me2	H4(1-13)K5acK8acK12ac	
H3(7-19)	H3(22-34)K27me2	H3(72-84)K79me3	H4(1-13)K8ac	H4(53-65)
H3(7-19)K9ac	H3(22-34)K27me3	H3(72-84)K79acT80ph	H4(1-13)K8acK12ac	H4(53-65)K59ac
H3(7-19)K9acS10ph	H3(22-34)K27meS28ph	H3(72-84)K79me1T80ph	H4(1-13)K12ac	
H3(7-19)S10ph	H3(22-34)K27me2S28ph	H3(72-84)K79me2T80ph		H4(83-95)
H3(7-19)S10phK14ac	H3(22-34)K27me3S28ph	H3(72-84)K79me3T80ph	H4(3-15)	H4(83-95)K91ac
H3(7-19)K14ac	H3(22-34)S28ph	H3(72-84)T80ph	H4(3-15)K5ac	
H3(7-19)K14me2			H4(3-15)K5acK8ac	H4(86-98)
H3(7-19)R17me2	H3(25-37)	H3(75-87)	H4(3-15)K5acK12ac	H4(86-98)K91ac
H3(7-19)K18ac	H3(25-37)K36me	H3(75-87)K79me	H4(3-15)K5acK8acK12ac	

Kinasenbibliothek

Tab. 8-3: Bibliothek rekombinanter, nukleärer Kinasen (Zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. D. Eick)

Kinasen	CK2α1	CDK5/p25NCK	ERK2	JNK1	MST4	PIM1	ROCK2	TSF1
ABL1	CK2α2	CDK5/p35NCK	FER	JNK3	MYLK2	PIM2	S6K	TSK2
AKT1	CDC42BPBK	CDK6/CyclinD1	FRK (RAK)	MAPKAPK3	NEK2	PKC-α	SAK	TTK
ARK5	CDK1/CyclinB	CDK7/CyclinH	Gil-1	MAPKAPK5	NEK6	PKC-δ	SGK1	VRK1
Aurora A	CKD1/CyclinE	CDK8/CyclinC	GSK3-β	MAPK14	NIK NCK	PKC-ε	SGK3	Wee1
Aurora B	CDK2/CyclinA	CDK9/CyclinT	HRI	MARK1	NLK NEMO	PKC-γ	SNARK	
Aurora C	CDK2/CyclinE	CHK1	IKK-β	MARK3	PAK1	PKC-μ	SRC	
B-RAF	CDK3/CyclinE	CLK1	IKK-ε	MEK1 (SESE)	PBK	PLK1	SNK	
BRK	CDK4/CyclinD1	COT (MAP3K8)	IARK4	MEK1wt	PCTAIRE	PLK3	SRPK1	
CK1α1	CKD4/CyclinD3	DAPK1	Jil	MKK6	PSK	PRK1	SRPK2	

DANKSAGUNG

Die Experimente dieser Arbeit wurden unter Betreuung von Frau Priv. Doz. Dr. Sandra B. Hake und Herrn Prof. Dr. Peter B. Becker im Zeitraum von 2008 bis 2010 in der Abteilung für Molekularbiologie des Adolf-Butenandt-Instituts an der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt. Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich in dieser Zeit zusammenarbeiten durfte und die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein außerordentlicher Dank geht an erster Stelle an Herrn Prof. Dr. Peter B. Becker für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Ich bedanke mich für die ausgezeichneten Möglichkeiten, die mir an seinem Institut zur Verfügung gestellt wurden, das Thema zu bearbeiten. Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Priv. Doz. Dr. Sandra B. Hake für ihre kompetente Betreuung im Laboralltag, für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, ihre konstruktiven Vorschläge und Anregungen, für ihren schier grenzenlosen Einsatz, ihre unvergleichliche Motivationsfähigkeit, ihre fachliche wie persönliche Unterstützung und für die kritische Durchsicht meines Manuskripts.

Mein Dank geht darüber hinaus auch an alle Kollegen der Arbeitsgruppe um Frau Priv. Doz. Dr. Sandra B. Hake. Ich bedanke mich bei Frau Dr. Sonja Wiedemann und Herrn Clemens Bönisch für die Einweisung in Arbeitstechniken und Geräte, für ihre stets freundliche und geduldige Hilfe, sowie für die fruchtbaren Diskussionen und Denkanstöße. Weiter bedanke ich mich bei Frau Silke Mildner und Frau Christine Mehlhorn für die gute Zusammenarbeit und das einzigartige Arbeitsklima.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Axel Imhof, seiner Arbeitsgruppe, sowie dem von ihm geleiteten Zentrum für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Instituts mit allen seinen Mitarbeitern. Mein Dank gilt dabei insbesondere Frau Dr. Ana Villar-Garea und Herrn Dr. Lars Israel für die Einarbeitung und Betreuung in Bezug auf die verwendete massenspektrometrische Methodik.

Ich bedanke mich weiter bei allen Kollegen der Arbeitsgruppen um Dr. Philipp Korber und Prof. Dr. Gunnar Schotta für die stets konstruktiven und hilfreichen Gespräche sowie die immer angenehme Atmosphäre. Ich bedanke mich vorrangig bei Frau Silvia Dambacher für Ihre Unterstützung und Zusammenarbeit rund um den Bereich der Expression und Assemblierung von Mononukleosomen.

Nicht zuletzt geht mein Dank an Prof. Dr. Dirk Eick vom Institut für Molekulare Epigenetik des Helmholtz-Zentrum München für die freundliche Überlassung der rekombinanten Kinasenbibliothek.

Letztlich möchte ich mich beim „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken, betreut durch Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, für die großzügige finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und die Begleitung des Kolloquiums.

Meinen herzlichsten Dank!