

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
Lehrstuhl: Molekularbiologie
im BioMedizinischen Centrum
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Peter B. Becker
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Schotta

Epigenetische Regulation von Retrotransposons in Säugetierzellen

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

vorgelegt von
Katharina Schmidt
aus Limburg an der Lahn
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Schotta

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2019

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

D. Sadic; K. Schmidt; S. Groh; I. Kondofersky; J. Ellwart; C. Fuchs; F.J. Theis und G. Schotta: „Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons“. In: EMBO Reports 16, Nr. 7 (2015), S. 836-850

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema "Epigenetische Regulation von Retrotransposons in Säugetierzellen" selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

03.04.2019, Ebersberg

Datum, Ort

Unterschrift Katharina Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Hintergrund	9
2.1	Chromatinstruktur und -regulation	9
2.1.1	DNA-Methylierung	9
2.1.2	Histon-Modifikationen	10
2.1.3	KRAB-Zink-Finger-abhängige Regulation durch Kap1	11
2.1.4	Die Histon 3 Lysin 9 Methyltransferase Setdb1	14
2.1.5	Die SNF2-type ATPase Atrx	15
2.2	Retrotransposons	17
2.2.1	Retrotransposon-Silencing durch DNA-Methylierung	18
2.2.2	Repression von Retrotransposons durch Setdb1-abhängige H3K9-Methylierung und das Korepressorprotein Kap1	19
3	Materialien und Methoden	21
3.1	Chemikalien	21
3.2	Kits und Verbrauchsmaterialien	21
3.3	Enzyme	22
3.4	Puffer und Lösungen	22
3.5	Oligonukleotide	23
3.6	Plasmide	24
3.7	Geräte	26
3.8	Zelllinien	27
3.9	Zellkultur	27
3.10	Lentivirale Transduktion von Zellen	27
3.10.1	Klonierung lentiviraler Reportervektoren mittels In-Fusion [®] Cloning	28
3.10.2	Herstellung der Viruspartikel	29
3.10.3	Bestimmung des Virustiters	29
3.10.4	Transduktion	29
3.11	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	30
3.12	Mutagenese-PCR zur Identifikation von Punktmutationen, welche die Repressionseffekte von GAG 2.22 beeinträchtigen	30
3.13	Repression einzelner Gene unter Verwendung von shRNAs	32
3.14	Konditioneller Knockout des Setdb1-Gens unter Verwendung eines Cre-Rekombinase-Systems	34
3.15	Bestimmung der transkriptionellen Aktivität bestimmter Gene durch quantitative PCR	35

4	Ergebnisse	36
4.1	IAP-Retrotransposons enthalten ein 160 bp langes Sequenzelement, das in der Lage ist, Silencing zu rekrutieren: GAG 2.22	36
4.1.1	Die GAG-Region der IAP-Retrotransposons der Maus enthält eine für ES-Zellen spezifische Silencing-Sequenz: GAG 2.22	36
4.1.2	Die untersuchten Repressionsvorgänge am GAG-Element sind spezifisch bei IAP-Retrotransposons zu beobachten	37
4.2	GAG 2.22-Silencing ist ein sequenzspezifischer Mechanismus	38
4.3	Die H3K9-Methyltransferase Setdb1 und das Korepressorprotein Kap1 sind essenziell für GAG 2.22-Silencing	39
4.4	Die SNF2-Typ ATPase Atrx ist erforderlich für eine schnelle Etablierung der Repression an GAG 2.22	41
4.5	Atrx interagiert mit Kap1 und Setdb1	44
4.5.1	Reduzierte Aktivität von Setdb1 oder Kap1 führt zu einem zusätzlichen Verlust von Repressionsaktivität an GAG 2.22 in Atrx-Knockout-Zellen	44
4.5.2	Kombinierter Verlust der Aktivität von Atrx und Kap1 führt zur Hochregulation endogener IAP-Transkripte	45
5	Diskussion	49
5.1	IAP-Retrotransposons enthalten ein 160 bp langes Sequenzelement, das in der Lage ist, Silencing zu rekrutieren: GAG 2.22	49
5.2	GAG 2.22-Silencing ist ein sequenzspezifischer Mechanismus	51
5.3	GAG 2.22-Silencing ist ein Kap1- und Setdb1-abhängiger Mechanismus	52
5.4	Atrx katalysiert GAG 2.22-Silencing und interagiert dabei mit Kap1 und Setdb1	55
5.5	Zusammenfassendes Modell des möglichen Ablaufes der Repressionsvorgänge an GAG 2.22	56
5.6	Ausblick auf die pathophysiologische Bedeutung der epigenetischen Regulation von Retrotransposons im Menschen und mögliche klinische Anwendungen	58
6	Abkürzungsverzeichnis	62
7	Literatur	66

1 Zusammenfassung

Große Teile sowohl des menschlichen als auch des Mausgenoms sind abgeleitet von Retrotransposons [1–3]. Es wird angenommen, dass diese Elemente ihren Ursprung in evolutionär lange zurückliegenden Infektionen mit exogenen Retroviren haben [4, 5]. Einige von ihnen haben auch nach Millionen von Jahren in ihrem Wirtsgenom die Fähigkeit zur Retrotransposition nicht verloren [6–9]. Unter Retrotransposition versteht man eine Vervielfältigung des betreffenden Retroelementes über eine RNA-Zwischenstufe und seine erneute Integration als DNA an einer anderen Stelle des Genoms [10]. Durch solche Vorgänge kann die Expression umgebender Gene verstärkt, gehemmt oder sogar das Gen komplett zerstört werden. In der Literatur sind zahlreiche Retrotranspositionsvorgänge beim Menschen beschrieben, von denen bekannt ist, dass sie Erkrankungen verursacht haben [11]. Doch auch ohne vollständige Retrotransposition können fehlregulierte Retrotransposons die Genexpressionsmuster von Zellen wesentlich beeinträchtigen und damit unter anderem zur Entstehung von Krebserkrankungen beitragen [12]. Ein Beispiel für immer noch aktive Retrotransposons im Mausgenom sind die IAP-Elemente (intracisternal A-type particles, eine Unterfamilie der LTR-Retrotransposons), deren Expression bereits während der frühen Embryogenese durch epigenetische Mechanismen unterdrückt wird [13–15].

In dieser Doktorarbeit wurde eine Teilsequenz aus den IAP-Elementen identifiziert, welche spezifisch für embryonale Stammzellen der Maus die Bildung von Heterochromatin veranlassen kann, wenn sie neu ins Genom der Zellen integriert wird: Diese Sequenz wurde mit "GAG 2.22" benannt [16]. Das GAG 2.22-Element ist in der Lage, die Abschaltung benachbarter aktiver Gene in Mausstammzellen zu vermitteln. Um dies zu zeigen, wurde ein Reporter-System verwendet, bei dem das Sequenzelement ein benachbartes Gen ausschaltet, welches ein grün fluoreszierendes Protein (EGFP) kodiert [17]. Weiterhin wurden punktmutierte Varianten dieser Repressionssequenz generiert, bei denen die Stilllegung des benachbarten Gens nahezu vollständig verloren geht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Rekrutierung von Heterochromatin an GAG 2.22 um einen sequenzspezifischen Mechanismus handelt. Als elementare Faktoren in diesem Mechanismus konnten das Korepressorprotein Kap1 und die Histonmethyltransferase Setdb1 identifiziert werden, indem für diese und andere Heterochromatin-Faktoren defiziente Zelllinien untersucht wurden. Für Kap1 und Setdb1 war bereits beschrieben, dass sie an der Unterdrückung der Expression von endogenen IAP-Retrotransposons in embryonalen Stammzellen der Maus beteiligt sind [18, 19]. Darüber hinaus konnte die SNF2-Typ ATPase Atrx als weiterer wichtiger Faktor für GAG 2.22-abhängiges Silencing des EGFP-Reporters identifiziert werden [16]. In Atrx-defizienten Zellen zeigte sich der Silencing-Prozess stark verzögert, die grundsätzliche Fähigkeit zum Silencing war jedoch erhalten. Wurde allerdings das Heterochromatin der Zellen durch verminderte Expression von Kap1 oder Setdb1 beeinträchtigt, so reagierten Atrx-Knockout-Zellen mit einer deutlich stärkeren Derepression des Reporters. Auch für endogene IAP-Elemente konnte

nachgewiesen werden, dass alleiniger Verlust von Atrx keinen Einfluss auf das Ausmaß ihrer Expression hat. Bei zusätzlicher Reduktion des Kap1-Levels in den Zellen kam es jedoch zu einer signifikanten Hochregulation der IAP-Transkripte.

Die Kernpunkte dieser Arbeit sind die Identifikation eines neuen Sequenzelementes aus IAP-Retrotransposons (GAG 2.22), das in der Lage ist, in einem sequenzspezifischen Mechanismus repressives Chromatin zu rekrutieren, sowie die Untersuchung der Rolle verschiedener Heterochromatin-Faktoren in diesem Prozess. Im Gegensatz zu den Faktoren Kap1 und Setdb1 erwies sich Atrx als nicht zwingend erforderlich für GAG 2.22-abhängiges Silencing. Für Atrx zeigte sich vielmehr ein beschleunigender und stabilisierender Effekt auf das entstehende Heterochromatin.

2 Hintergrund

2.1 Chromatinstruktur und -regulation

Der Begriff Chromatin beschreibt die übergeordnete Verpackungsstruktur der Kern-DNA eukaryotischer Zellen. Geprägt wurde er von Walther Flemming, einem der ersten Wissenschaftler, die sich mit den Strukturen und Abläufen innerhalb des Zellkerns beschäftigten [20]. Es wird unterschieden zwischen Heterochromatin, welches sich im Elektronenmikroskop dicht kondensiert darstellt, und dem eher aufgelockerten Euchromatin. Heterochromatin korreliert mit transkriptionell stillgelegten Bereichen, wohingegen die offenere Konfiguration des Euchromatins die aktive Transkription begünstigt [21–24]. Ein Nukleosom, die basale Chromatin-Einheit, besteht aus je zwei Kopien der vier Histon-Proteine (H2A, H2B, H3, H4), welche von 146 Basenpaaren des DNA-Stranges umschlungen sind [25, 26].

Obwohl die meisten Zellen eines Organismus dieselbe DNA enthalten, müssen die verschiedenen Zelltypen bestimmte Gene unterschiedlich stark exprimieren, um ihre jeweilige Aufgabe zu erfüllen. Bei der Herstellung und Aufrechterhaltung zelltypspezifischer Transkriptionsprogramme spielt die epigenetische Regulation auf Chromatin-Ebene eine elementare Rolle [27]. Die Chromatinstruktur ist ständigen kovalenten und non-kovalenten Modifikationen durch Proteine und RNA unterworfen. Die dabei ablaufenden molekularen Mechanismen sind äußerst vielfältig und bei Weitem noch nicht vollständig verstanden. Sie umfassen beispielsweise die Methylierung von Cytosin-Nukleotiden der DNA, die chemische Modifikation der Histon-Proteine, die ATP-abhängige Verschiebung von Histon-Oktameren in Bezug auf den umschlingenden DNA-Strang, den Austausch von Histon-Proteinen gegen spezialisierte Varianten und die Interaktion regulatorischer (nicht-kodierender) RNA mit der Chromatinstruktur [28–31].

2.1.1 DNA-Methylierung

Ein Mechanismus der Chromatin-Regulation durch kovalente Veränderungen ist die Methylierung der DNA. In Säugetieren findet diese überwiegend an Cytosin-Basen im Bereich von CpG-Inseln statt. Unter CpG-Inseln versteht man DNA-Abschnitte innerhalb des eukaryotischen Promoters, die einen erhöhten Cytosin-Guanin-Gehalt von über 60% aufweisen. In somatischen Zellen ist das DNA-Methylierungsmuster relativ stabil, wohingegen in Keimzellen und frühen Embryonen eine genomweite Reprogrammierung desselben stattfindet [32–34]. Die beiden DNA-Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b sind in Kooperation mit dem nicht-enzymatischen Dnmt3L-Protein in der Lage, die DNA de novo zu methylieren und sorgen so für die Entstehung bestimmter Methylierungsmuster während der Embryonalentwicklung [35, 36]. Bei jeder Zellteilung muss dieses Muster

auf den neu synthetisierten DNA-Strang übertragen werden. Diese Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters wird von der Methyltransferase Dnmt1 übernommen [37, 38].

Wenngleich die Funktionen der DNA-Methylierung sich immer mehr als sehr vielfältig herausstellen, so ist im Rahmen dieser Arbeit vor allem der repressive Effekt auf die Initiation der Transkription von Bedeutung. Viele Transkriptionsfaktoren binden an CpG-haltige DNA-Sequenzen, was durch Methylierung dieser Bereiche verhindert werden kann. Umgekehrt gibt es aber auch Proteine, die eine Methyl-CpG-Bindedomäne besitzen, damit also speziell methylierte DNA erkennen und daraufhin weitere Repressionsfaktoren rekrutieren [28, 39, 40].

2.1.2 Histon-Modifikationen

Die Histon-Proteine (H2A, H2B, H3, H4), welche den Kern der einzelnen Nukleosomen bilden, sind im Wesentlichen globular konfiguriert. Lediglich die N-terminalen Enden ragen als unstrukturierte "Histone Tails" aus dem Nukleosom heraus. Hier erfolgt eine Vielzahl unterschiedlicher kovalenter Modifikationen mit verschiedenster regulatorischer Funktion (z.B. Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung). Für einen ausführlichen Überblick über die verschiedenen Formen der Histon-Modifikation können folgende Quellen herangezogen werden: C.D. Allis: „Epigenetics“ (2015) [27], T. Kouzarides: „Chromatin Modifications and Their Function“ (2007) [29].

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist der Mechanismus der Histon-Methylierung. Je nach Art und Position der methylierten Aminosäure kann sie sowohl einen aktivierenden als auch einen hemmenden Effekt auf die Genexpression haben [41]. Die Methylgruppen werden durch spezifische Histon-Methyltransferasen auf bestimmte Arginine und Lysine übertragen. Zusätzliche Komplexität entsteht daraus, dass Lysin sowohl mono- als auch di- oder trimethyliert sein kann. Für Arginin gibt es die Möglichkeit der Mono- und Dimethylierung, wobei letztere sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch auftreten kann [42]. Vor allem Lysin-Methyltransferasen haben eine sehr hohe Spezifität, modifizieren also üblicherweise ein bestimmtes Lysin eines speziellen Histons [43]. Nur wenige Methylierungs-Positionen sind bisher genauer im Hinblick auf ihren regulatorischen Effekt untersucht. Mit einer Aktivierung der Transkription werden H3K4-, H3K36- und H3K79-Methylierung in Verbindung gebracht. Ein repressiver Effekt dagegen ist für H3K9-, H3K27- und H4K20-Methylierung beschrieben [29, 44].

Studien zur genomweiten Kartierung von Histon-Modifikationen zeigen für bestimmte DNA-Bereiche eine Anreicherung spezifischer Modifikationen. So finden sich H3K27-Trimethylierungen überwiegend verteilt über inaktive Gene und deren benachbarte Regionen, während repetitive Genombereiche eher durch H3K9-Trimethylierung und H4K20-Trimethylierung gekennzeichnet sind [45]. In embryonalen Stammzellen sind die heterochromatischen Modifikationen H3K9me3 und H4K20me3 auch an vielen Retrotranspo-

sons stark angereichert [46]. Deshalb soll hier ein kurzer Überblick über die Entstehungsmechanismen dieser beiden Histon-Modifikationen gegeben werden (siehe Abbildung 2.1). Am besten untersucht ist die Etablierung von H3K9me3 und H4K20me3 am perizentrischen Heterochromatin der Maus, welches die hochrepetitive Major Satellite DNA in Bereich der Zentromere kompaktiert [47]. Jene Major Satellite Repeats werden durch die Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax9 gebunden und damit die Formierung von Heterochromatin in Gang gesetzt [48]. Über einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus werden anschließend verschiedene Methyltransferasen (Setdb1, Prdm3, Prdm16) rekrutiert und katalysieren zunächst eine H3K9-Monomethylierung [49, 50]. Monomethyliertes H3K9 bildet dann das Substrat für Suv3-9h-Histon-Methyltransferasen, welche daraus Trimethyl-H3K9 generiert [51]. HP1 (Heterochromatin-Protein 1) kann nun als Adaptermolekül fungieren, indem es H3K9me3 mit Hilfe seiner Chromodomäne bindet und Suv4-20h-Enzyme hierher rekrutiert [52, 53]. Diese katalysieren die Formierung von H4K20-Trimethylierungen und sorgen für die Bindung stabilisierender Cohesin-Moleküle an das perizentrische Heterochromatin [54, 55]. Parallel dazu werden durch trimethyliertes H3K9 auch DNA-Methyltransferasen rekrutiert [56].

2.1.3 KRAB-Zink-Finger-abhängige Regulation durch Kap1

Zink-Finger-Proteine mit einer Krüppel-associated box (KRAB) stellen die größte Gruppe im Genom höherer Wirbeltiere kodierter Transkriptionsfaktoren dar [58–62]. Die KRAB-Domäne ist evolutionär hochkonserviert und vermittelt starke Repressionseffekte auf transkriptioneller Ebene [63, 64]. Das Korepressorprotein Kap1 (auch bekannt als Trim28 oder Tif1 β) bindet mit Hilfe einer RING-Finger-Struktur an die KRAB-Domäne und fungiert als universeller Adapter bei KRAB-Zinkfinger-abhängigen Silencing-Prozessen [65–67] (siehe Abbildung 2.2). Am N-Terminus von Kap1 befindet sich die RING finger/B-box/coiled coil (RBCC)-Domäne (auch bekannt als tripartite-motif = Trim), welche die Bindung von jeweils drei Kap1-Molekülen als Homotrimer an eine einzelne KRAB-Domäne ermöglicht [68]. Kap1 rekrutiert daraufhin weitere wichtige Heterochromatin-Proteine wie HP1 und Setdb1. Die C-terminale Chromoshadow-Domäne (CSD) von HP1 bindet als Homodimer an ein spezifisches Aminosäuresegment von Kap1 (HP1BD) und stellt an den beiden N-terminalen Enden jeweils eine Chromodomäne für weitere Bindungspartner zur Verfügung [69, 70]. Am C-Terminus von Kap1 befindet sich eine PHD-Domäne mit intramolekularer Sumo-Ligase-Aktivität, wodurch die unmittelbar benachbarte Bromodomäne sumoyliert wird. Diese Sumoylierung sorgt für die Rekrutierung der H3K9-Methyltransferase Setdb1 sowie der Chd3-Komponente des NuRD (Nucleosome remodeling deacetylase)-Komplexes, welcher eine Histon-Deacetylierung vermittelt [71–75].

Über die genannten Mechanismen erfüllt Kap1 wichtige Aufgaben in einer enormen Vielzahl von Prozessen der transkriptionellen Repression. So ist Kap1 beispielsweise erforderlich für die Zfp57-abhängige DNA-Methylierung bei den Imprinting-Vorgängen

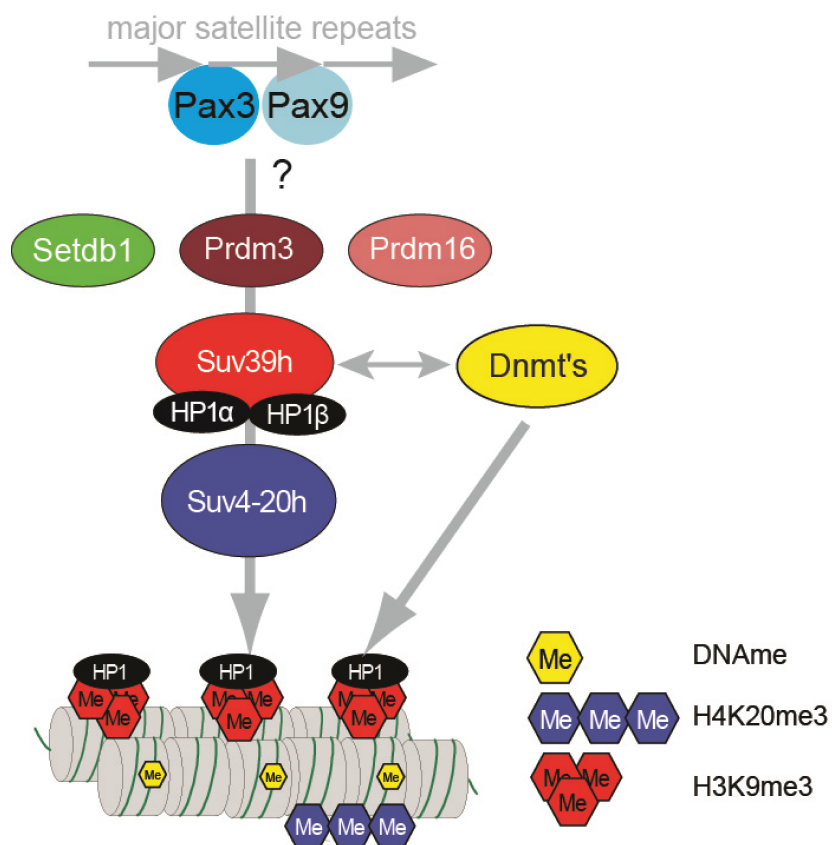


Abbildung 2.1: Silencing-Mechanismus an perizentrischem Heterochromatin: Pax3 und Pax9 binden an Major Satellite Repeats und sorgen über einen bisher noch unverständlichen Mechanismus für die Rekrutierung von Histon-Methyltransferasen. Prdm3, Prdm16 oder Setdb1 katalysieren die Monomethylierung von H3K9, worauf aufbauend Suv3-9h-Enzyme trimethyliertes H3K9 generieren. HP1 fungiert als Adapter zwischen H3K9me3 und weiteren Proteinen wie Suv4-20h, welches die Bildung von H4K20me3 katalysiert. Zusätzlich werden durch H3K9me3 DNA-Methyltransferasen (Dnmts) rekrutiert. (aus D. Sadic: Regulation of heterochromatic gene silencing in mouse [17, 55, 57])

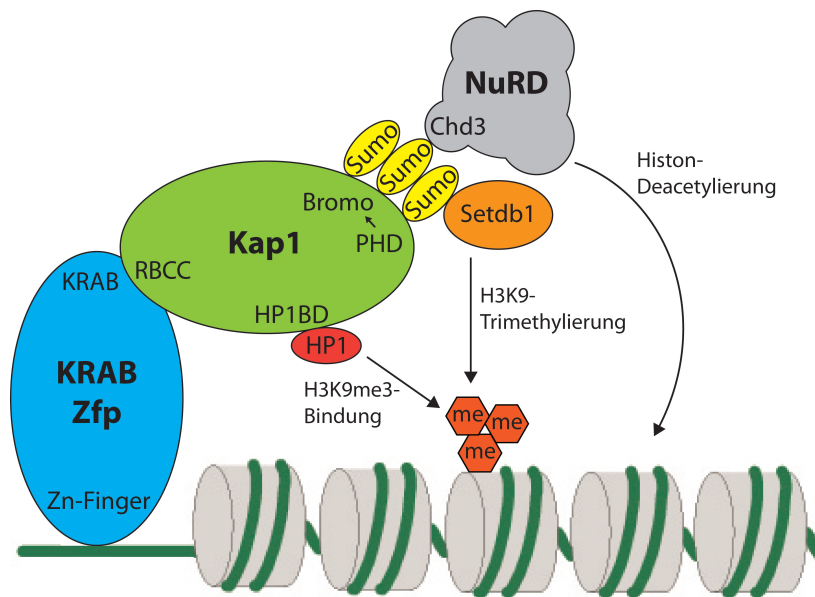


Abbildung 2.2: KRAB-Zink-Finger-abhängige Chromatin-Regulation durch Kap1: Kap1 bindet mit seiner RBCC-Domäne an die KRAB-Domäne eines KRAB-Zinkfinger-Transkriptionsfaktors. An Kap1 wiederum bindet HP1 und die intramolekulare Sumoylierung der Bromodomäne von Kap1 sorgt für die Rekrutierung von Setdb1 und der Chd3-Einheit des NuRD-Komplexes. Setdb1 katalysiert seinerseits H3K9-Trimethylierungen, welche von HP1 gebunden werden. Durch den NuRD-Komplex kommt es zusätzlich zu einer Histon-Deacetylierung. Insgesamt resultiert daraus die Kap1-abhängige Etablierung stark repressiver Chromatinstrukturen. Es ist zu beachten, dass bei in vitro Experimenten KRAB-Zinkfinger-Proteine häufig als Dimer an die DNA binden und außerdem jeweils drei Kap1-Einheiten als Homotrimer an eine KRAB-Domäne rekrutiert werden. Hierdurch kommt es zu einer starken Amplifikation in der Bindungskaskade, auf deren Darstellung zugunsten der Übersichtlichkeit im Schema verzichtet wurde. (Modifiziert nach Sadic (2014) [17], Iyengar und Farnham (2011) [76])

der frühen Embryogenese [77, 78] und trägt zur Etablierung und Aufrechterhaltung spezifischer DNA-Methylierungsmuster in der frühen Embryonalphase bei [79]. Eine weitere wichtige Aufgabe in der Embryonalentwicklung erfüllt Kap1 als Kofaktor des KRAB-Zinkfinger-Proteins Zfp568 bei der Entstehung extraembryonaler Gewebe (Amnion, Chorion, Dottersack, Allantois) [80]. Darüber hinaus sind Funktionen von Kap1 im Rahmen der Mitophagie während der Erythropoese [81] sowie der neuronalen Differenzierung [82, 83] bekannt. Auch bei der Repression retroviraler Elemente ist Kap1 ein unverzichtbarer Faktor. Seine Rekrutierung durch Zfp809 und YY1 ist erforderlich für eine suffiziente Restriktion der Replikation des Moloney murine leukemia virus (M-MLV) in embryonalen Stammzellen [84–86]. Genauso ist Kap1 aber auch ein elementarer Faktor beim Silencing endogener retroviraler Elemente sowie ihnen benachbart liegender Gene [19, 87, 88]. Außer bei Prozessen der transkriptionellen Repression spielt Kap1 auch eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf Beschädigungen der DNA. Durch DNA-Schäden induzierte Proteinkinasen phosphorylieren Kap1 in direkter Nachbarschaft seiner Bromodomäne und verhindern dadurch seine Sumoylierung. Dies führt zu einer vermehrten Expression bestimmter in Zellzyklus-Kontrolle und Apoptose-Regulation involvierter Gene [89, 90]. Die Kombination dieser und vieler weiterer wichtiger Funktionen macht Kap1 zu einem unverzichtbaren Faktor in der Embryonalentwicklung und für die Erhaltung des pluripotenten Status embryonaler Stammzellen [91–93].

2.1.4 Die Histon 3 Lysin 9 Methyltransferase Setdb1

Setdb1 (auch bekannt als ESET oder KMT1E) gehört zur Familie der SET-Domänen-Proteine, einer Gruppe von Histon-Lysin-Methyltransferasen [94]. Ohne weitere Kofaktoren katalysiert Setdb1 hochspezifisch die Mono- und Dimethylierung von Histon 3 Lysin 9. Eine H3K9-Trimethylierung kann Setdb1 nur als Komplex mit seinem Bindoprotein mAM (auch bekannt als MCAF1 oder Atf7ip) veranlassen [72, 95]. Kap1, der universelle Kofaktor der KRAB-Zinkfinger-Protein-Familie, bindet Setdb1 und dirigiert es so an bestimmte DNA-Loci [72]. Diese Interaktion zwischen Kap1 und Setdb1 wird über ein Sumo-interaction motif (SIM) am N-Terminus von Setdb1 hergestellt, das an die sumoylierte Bromodomäne von Kap1 bindet [71]. Setdb1 ist notwendig, um Kap1-abhängige Silencing-Prozesse zu ermöglichen, wofür insbesondere die katalytische Aktivität der SET-Domäne intakt sein muss [18]. Unter anderem bei der Repression endogener Retroviren spielt Setdb1 zusammen mit Kap1 eine unverzichtbare Rolle [18, 96, 97]. In Setdb1-defizienten embryonalen Stammzellen kommt es zur Derepression endogener Retrotransposons und darüber hinaus zu einer Deregulation benachbarter Gene [98]. In differenzierten Zellen tritt die DNA-Methylierung als wichtiger Regulationsmechanismus für Retroelemente in den Vordergrund, weshalb Setdb1 für das Retrotransposon-Silencing in diesem Stadium lange vernachlässigbar erschien [99]. Neuere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass die durch Setdb1 vermittelte Anreicherung von H3K9me3 an endogenen Retroviren auch in differenzierten Zellen eine Rolle spielt.

Ihr Fehlen in Setdb1-defizienten differenzierten Zellen ließ sich mit der Reaktivierung bestimmter zelltypabhängiger Subgruppen von Retroelementen in Verbindung bringen [100].

Neben Kap1 hat Setdb1 noch viele weitere Interaktionspartner. Beispielsweise ist das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) in der Lage, Setdb1 an bestimmte Regionen im Genom zu rekrutieren, woraufhin es dort zu einer verstärkten Methylierung von H3K9 kommt [97, 101]. Ein anderer häufiger Rekrutierungsmechanismus für Setdb1 ist die Modifikation von Transkriptionsfaktoren mit dem small ubiquitin-like modifier (Sumo), wie es auch bei der Bindung an Kap1 der Fall ist. Die Sumoylierung von an DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren führt zur Rekrutierung von Setdb1 und vielen weiteren Heterochromatin-Faktoren [102]. Auch für die Interaktion zwischen Setdb1 und dem Methyl-DNA-Bindeprotein MBD1 wird eine Mediation über die Sumoylierung von MBD1 und anschließende Sumo-abhängige Bindung von Setdb1 vermutet [103]. Zusammen mit dem Chromatin Assembly Factor CAF-1 bilden Setdb1 und MBD1 einen S-Phase-spezifischen Komplex, der für die Methylierung von H3K9 bei der Chromatin-Verdichtung im Rahmen der Replikation sorgt [104, 105]. Darüber hinaus ist Setdb1 ein wesentlicher Faktor im Komplex der Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies (PML-NBs) in der frühen Embryonalentwicklung. Diese PML-NBs werden mit einer Vielzahl zellulärer Prozesse in Verbindung gebracht: Unter anderem Apoptose, DNA-Reparatur und transkriptionelle Regulation. Es wird angenommen, dass Setdb1 hier sowohl für die strukturelle Integrität der PML-NBs als auch in der transkriptionellen Regulation PML-NB-assoziiierter Gene eine wichtige Rolle spielt [106]. Zusammenfassend betrachtet ist Setdb1 eine essenzielle H3K9-Methyltransferase, die ähnlich wie Kap1 unverzichtbar für die frühe Embryonalentwicklung und die Erhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen ist [107, 108].

2.1.5 Die SNF2-type ATPase Atrx

Erstmals beschrieben wurde Atrx als ein Gen, welches bei Patienten mit dem seltenen X-linked alpha thalassemia mental retardation (ATR-X)-Syndrom mutiert ist. Die Betroffenen zeigen starke Entwicklungsverzögerungen, Abnormalitäten des Gesichts und der Genitalien sowie eine reduzierte Expression von α -Globin in Erythrozyten (Alpha-Thalassämie) [109, 110]. Das vom Atrx-Gen abgeleitete Protein hat zwei evolutionär hochgradig konservierte Bereiche. Diese sind die N-terminale ADD-Domäne und die sieben Helicase-Motive am C-Terminus, welche eine ATPase-Domäne vom SNF2-Typ bilden. Insbesondere in diesen beiden Bereichen sind Mutationen zu finden, die zu Erkrankungen führen [111, 112]. Das Atrx-Protein tritt in verschiedenen Splice-Isoformen auf. Am häufigsten zu finden sind das Volllängen-Protein sowie eine verkürzte Variante, bei der die C-terminale ATPase-Domäne fehlt [113].

Über die ADD-Domäne wird Atrx an Histon 3 gebunden [114]. Diese Bindung wird

durch H3K9me3 gefördert und durch H3K4me3 gehemmt. Eine optimale Rekrutierung von Atrx an H3 erfordert die Kombination aus trimethyliertem Lysin 9 und unmethyliertem Lysin 4 [115–117]. Außerdem besitzt Atrx ein PxVxL-Motiv, worüber es mit HP1 interagieren kann. Sowohl durch die Bindung seiner ADD-Domäne an perizentrisches H3K9me3 als auch durch die Interaktion mit HP1 erfolgt eine Lokalisierung von Atrx an perizentrisches Heterochromatin [115, 118]. Darüber hinaus kann Atrx auch durch das Methyl-CpG-Bindeprotein MeCP2 an Heterochromatin rekrutiert werden. Mutationen des humanen MeCP2-Gens stören die Interaktion des Proteins mit Atrx und verursachen neurologische Störungen (Rett-Syndrom, X-linked mental retardation) [119, 120]. Der sich hier andeutende Zusammenhang zwischen Atrx und DNA-Methylierung wird durch die Tatsache unterstützt, dass Zellen von Patienten mit dem Atrx-Syndrom genauso wie von Atrx-Knockout-Maus-Embryos Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters an verschiedenen repetitiven Sequenzen zeigen [121–123]. Zusammen mit dem Death domain-associated Protein 6 (Daxx) bildet Atrx einen ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplex, in dem Atrx die zentrale ATPase-Einheit darstellt [124]. Daxx ist ein spezifisches Chaperon für Histon 3.3 und katalysiert zusammen mit Atrx die Platzierung von H3.3/ H4-Tetrameren in repressives Chromatin im Bereich der perizentrischen und telomerischen Repeats [125, 126]. Neuere Studien geben auch Hinweise auf Atrx-unabhängige Funktionen von Daxx. Zum Beispiel scheint Daxx im Komplex mit Kap1 und Setdb1 einen wichtigen Beitrag zur Repression endogener Retroviren zu leisten [126].

In vielen Arten von Tumoren sind die Gene Atrx und Daxx mutiert. Beispielsweise bei Glioblastomen im Kindesalter spielen Mutationen im H3.3-Atrx-Daxx-Chromatin-Remodelling-Pathway eine wichtige Rolle [127]. Auch in kindlichen Neuroblastomen zeigt sich Atrx häufig mutiert. Vor allem in besonders aggressiven Hochrisiko-Formen des Neuroblastoms lassen sich sehr oft Atrx-Mutationen nachweisen [128]. Die Häufigkeit von Atrx-Mutationen steigert sich mit steigendem Erkrankungsalter der Neuroblastom-Patienten. Bei frühkindlichen Neuroblastomen ist Atrx nur sehr selten mutiert, wohingegen bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen sehr häufig Atrx-Mutationen nachweisbar sind [129]. Bestimmte Subtypen von Gliomen sind ebenfalls mit Mutationen im Atrx-Gen assoziiert [130]. Besonders häufig sind Atrx-Mutationen in Grad II-III Astrozytomen, Oligoastrozytomen und sekundären Glioblastomen nachweisbar [131, 132]. Letztere entwickeln sich aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen (= Astrozytome Grad II/ III) und haben eine deutlich bessere Prognose als die primären Glioblastome [133]. Weitere Tumorentitäten, bei denen sich oftmals Mutationen in Atrx und/ oder Daxx nachweisen lassen, sind die neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (PaNETs) sowie verschiedene Arten von Sarkomen [134, 135]. Viele der genannten Tumoren aktivieren einen Telomerase-unabhängigen Weg zur Aufrechterhaltung der Telomere [136]. Die Aktivierung dieses „alternative lengthening of telomeres“ (ALT) korreliert mit Mutationen in Atrx und Daxx [137, 138]. Dies ist konsistent mit der bekannten wichtigen Rolle von Atrx und Daxx in der Erhaltung der strukturellen Integrität von Telomeren [139–142]. Da in so vielen Arten von Tumoren Mutationen in Atrx zu finden sind, liegt eine Funktion

als Tumorsuppressor nahe. Sicher nachgewiesen ist dies jedoch bisher nicht. Dagegen spricht, dass in Atrx-Syndrom-Patienten kein gesteigertes Risiko für maligne Erkrankungen beschrieben ist. Viele weitere Funktionen von Atrx sind ebenfalls noch weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Atrx eine wichtige Rolle beim Silencing von Retrotransposons in embryonalen Stammzellen der Maus spielt.

2.2 Retrotransposons

Etwa 40 bis 60% sowohl des menschlichen als auch des Mausgenoms sind abgeleitet von Retrotransposon-Sequenzen [1, 2, 143]. Es wird angenommen, dass diese Elemente ihren Ursprung in evolutionär lange zurückliegenden Infektionen mit exogenen Retroviren haben [4, 5]. Die retroviralen Sequenzen wurden stabil ins Genom ihres Wirtes integriert, womit eine Koevolution von Virus- und Wirtsgenom begann [3, 144]. Einige dieser endogenisierten Retroviren haben auch nach Millionen von Jahren in ihrem Wirt die Fähigkeit zur Retrotransposition nicht verloren [6–9]. Unter Retrotransposition versteht man eine Vervielfältigung des betreffenden Retroelementes über eine RNA-Zwischenstufe und seine erneute Integration als DNA an einer anderen Stelle im Genom [10]. Die in Säugtieren vorkommenden Retrotransposons werden in drei Klassen unterteilt: LINEs (long interspersed nucleotide elements), SINEs (short interspersed nucleotide elements) und LTR-Transposons (LTR = long terminal repeats). Letztere sind auch häufig unter der Bezeichnung endogene Retroviren zu finden.

In dieser Arbeit wurde die Heterochromatin-Formierung an IAP-Retrotransposons, einer Unterfamilie der LTR-Transposons, genauer untersucht. LTR-Transposons sind die vorherrschende Art von Retrotransposons in Pflanzen, kommen aber auch in Säugtieren vor. Nahezu 10% des humanen und des Mausgenoms sind von dieser Familie von Retroelementen abgeleitet [145]. LTR-Retrotransposons tragen an beiden Enden die namensgebenden long terminal repeat-Sequenzen und kodieren dazwischen üblicherweise ein Capsid-Protein (GAG), eine reverse Transkriptase (RT), eine Integrase (IN), eine RNase-Helicase und eine Protease. Häufig wird nicht für jede dieser Funktionen ein eigenes Enzym kodiert, sondern sind mehrere enzymatische Aktivitäten in einem multifunktionalen Protein vereint [145]. Entwicklungsgeschichtlich scheinen LTR-Retrotransposons im Vergleich zu anderen Transposon-Familien relativ jung zu sein. Es wird angenommen, dass sie durch eine Fusion älterer Retrotransposon-Klassen entstanden sind [146].

Beim Vergleich zwischen menschlichem und Mausgenom fällt auf, dass Retrotransposons zwar bei beiden einen ähnlich hohen Anteil ausmachen, sich aber unterschiedlich verhalten. In Labormäusen sind Retrotranspositionereignisse für etwa 10% der Neumutationen verantwortlich, beim Menschen dagegen liegt dieser Anteil nur bei etwa 0,1%. Dieser enorme Unterschied lässt sich vor allem dadurch erklären, dass viele endogene

Retroviren im Mausgenom noch aktiv sind, während sie im Menschen ihre Fähigkeit zur Transposition verloren haben [9]. Ein paar wenige im humanen Genom noch aktive Retrotransposons sind dennoch bekannt. Aus der Familie der LTR-Retrotransposons sind hier die human endogenous retroviruses K (HERV-K) zu nennen sowie aus der Gruppe der LINEs die L1-Retrotransposons [6–8, 147]. In der Maus sind die Retrotransposon-Klassen mit der höchsten Aktivität die intracisternal A-type particle (IAP) -Transposons mit etwa 300 funktionalen Kopien und die MusD/ETn-Retrotransposons mit 9 funktionalen Kopien [13, 148].

Die Transpositionsaktivität endogener Retroviren kann die Expression umgebender Gene verstärken, hemmen oder sogar das betreffende Gen komplett zerstören [149, 150]. Viele Transpositionereignisse können sogar direkt mit bestimmten Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht werden. Für etwa 100 verschiedene Arten von Erkrankungen sind Fälle bekannt, die ursächlich auf Retrotranspositionen zurückgeführt werden können. Als Beispiele lassen sich monogenetische Erkrankungen wie Neurofibromatose Typ 1, Hämophilie A und B, Muskeldystrophie Duchenne und Zystische Fibrose nennen, aber auch Fälle von Colon- oder Mammakarzinomen können mit Mutationen durch Retrotranspositionereignisse in Verbindung gebracht werden [11, 151]. Auch ohne vollständige Retrotransposition können fehlregulierte Retrotransposons die Genexpressionsmuster von Zellen wesentlich beeinträchtigen und damit zum Beispiel zur Entstehung von Krebserkrankungen beitragen [12].

Trotz allem können Retroelementen aber nicht nur negative Effekte zugeschrieben werden. Retrotransposons wurden im Rahmen der Koevolution mit dem Wirtsgenom an dieses adaptiert und erfüllen wichtige Aufgaben als regulatorische Sequenzen für bestimmte Gene [152]. Beispielsweise der Promoter für die Expression des Enzyms Amylase im menschlichen Speichel ist abgeleitet von einem integrierten Retrovirus [153]. Darüber hinaus gibt es in Säugetieren sogar Gene, die sich direkt aus Retrotransposon-Sequenzen entwickelt haben, wie zum Beispiel die für die Anlage der Plazenta unverzichtbaren Syncytine [154–157].

Um die Stabilität des Genoms aufrechtzuerhalten, haben Säugetiere im Laufe der Evolution vielfältige Wege zur Repression der Aktivität von Retroelementen entwickelt [158, 159]. Diese Regulationsmechanismen finden überwiegend auf Chromatin-Ebene statt und sorgen sowohl für die Unterdrückung gefährlicher Retrotranspositionereignisse als auch für die Kontrolle der mittlerweile adaptierten, von Retroelementen abgeleiteten regulatorischen Sequenzen [99, 160, 161].

2.2.1 Retrotransposon-Silencing durch DNA-Methylierung

Der Mechanismus der DNA-Methylierung wurde bereits in Kapitel 2.1.1 überblicksartig beschrieben. Er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation endogener Retroviren.

Es wird sogar vermutet, dass sich die Methylierung der DNA ursprünglich als Abwehrmechanismus des Wirts gegen Retrotranspositionsereignisse entwickelt hat [162]. Für Maus-Embryos im Postimplantations-Stadium stellt die DNA-Methylierung den zentralen Mechanismus zur Restriktion endogener Retroviren dar. Nach Knockout der DNA-Methyltransferase Dnmt1 kommt es in Maus-Embryos am Tag 8,5 zu einer hundertfachen Hochregulation von IAP-Elementen [163]. Damit konsistent zeigen auch embryonale Fibroblasten der Maus (MEF) nach Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin eine deutliche Derepression von IAP-Elementen [96]. In der männlichen Keimbahn sind die de novo Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b sowie ihr Kooperationsprotein Dnmt3L für die Repression von IAP-Retrotransposons von essenzieller Bedeutung [164, 165]. Im Gegensatz dazu läuft das Silencing von Retrotransposons im Präimplantations-Stadium unabhängig vom Mechanismus der DNA-Methylierung ab. Der Knockout von Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b oder Dnmt3L führt in embryonalen Stammzellen zu keiner Beeinträchtigung der Regulation von Retroelementen [79, 166, 167]. In diesem Entwicklungsstadium gibt es weitere Restriktionsmechanismen für Retrotransposons, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

2.2.2 Repression von Retrotransposons durch Setdb1-abhängige H3K9-Methylierung und das Korepressorprotein Kap1

In embryonalen Stammzellen findet sich eine deutliche Konzentration der heterochromatischen Modifikationen H3K9me3 und H4K20me3 an vielen Retrotransposons, so zum Beispiel auch an MusD/ETn- und IAP-Elementen [46]. Das zuständige Enzym für die H3K9-Methylierung an Retroelementen ist Setdb1, weshalb es in Setdb1-defizienten ES-Zellen der Maus zu einem Verlust von H3K9me3 kommt. Damit einher geht eine starke Hochregulation endogener Retroviren [18, 98]. Die Setdb1-abhängige Methylierung von H3K9 scheint also eine entscheidende Rolle bei der Repression von Retrotransposons in ES-Zellen der Maus zu spielen. Der Verlust der Suv4-20h-Enzyme und damit auch von H4K20me3 hat dagegen keine Derepression von Retroelementen zur Folge [18].

Ein ähnlicher Effekt wie der Knockout von Setdb1 zeigt sich auch beim Verlust des Korepressorproteins Kap1 in mES-Zellen. In Kap1-defizienten ES-Zellen kommt es zu einer starken Hochregulation der Expression endogener Retroviren. Auch hier fällt eine Reduktion der H3K9-Trimethylierungen an Retroelementen auf, was eine Kooperation von Setdb1 und Kap1 bei der Restriktion endogener Retroviren in ES-Zellen nahelegt [19, 87]. Bei embryonalen Fibroblasten der Maus (MEF) dagegen kommt es durch Setdb1- oder Kap1-Knockout zu keiner wesentlichen Derepression von Retroelementen [18, 19]. Beide Proteine scheinen also vorwiegend in mES-Zellen, weniger jedoch in späteren Entwicklungsstadien für die Regulation endogener Retroviren erforderlich zu sein.

Der genaue Mechanismus, wie der Kap1/ Setdb1-Komplex an Retrotransposons rekrutiert wird und dort zur Blockade der Expression führt, ist noch ungeklärt. Es wird vermu-

tet, dass sequenzspezifische KRAB-Zinkfinger-Proteine die verschiedenen Transposon-Klassen erkennen und Kap1 dann mit Hilfe ihrer KRAB-Domäne gebunden wird [19] (siehe auch Kapitel 2.1.3). Dazu passend kann zwischen Retrotransposons und KRAB-Zinkfinger-Proteinen eine deutliche Koevolution beobachtet werden [168, 169]. Ein derartiger sequenzspezifischer Rekrutierungsmechanismus konnte für die Repression des exogenen Retrovirus M-MLV (Moloney murine leukemia virus) in ES-Zellen bereits nachgewiesen werden [84, 85]. Die M-MLV-Replikation wird durch das mausspezifische KRAB-Zinkfinger-Protein Zfp809 unterdrückt, welches Kap1 rekrutiert und damit die H3K9me3-abhängige Stilllegung des Virus ermöglicht [84, 85]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es sich beim Kap1/ Setdb1-abhängigen Silencing von IAP-Retrotransposons in mES-Zellen um einen sequenzspezifischen Mechanismus handelt. Außerdem wurde ein 160 bp langer Sequenzbereich der IAP-Elemente identifiziert, der ausreicht, um repressives Chromatin zu rekrutieren und damit Hinweise auf die mögliche Bindestelle eines entsprechenden KRAB-Zinkfinger-Proteins geben kann.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle
MgCl ₂	VWR Chemicals
MnSO ₄	VWR Chemicals
Ethanol	VWR Chemicals
Isopropanol	Honeywell Specialty Chemicals
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth
Hygromycin	Carl Roth
Puromycin	Carl Roth
DMSO	Sigma-Adrich
Ethidiumbromid	Carl Roth
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	New England Biolabs
Random Hexamer Primer	New England Biolabs

3.2 Kits und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 15 ml; 50 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym
Serologische Pipetten	Sarstedt
Zellkulturplatten	Sarstedt
Cryovials	Carl Roth
Wizard [®] Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-up System	Promega
NucleoBond [®] Xtra plasmid purification	Machery-Nagel
RNeasy [®] Plus Micro Kit	Qiagen
FastSYBR [®] Green Master Mix	Applied Biosystems

3.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme	New England BioLabs
Trypsin-EDTA	PAA/ Sigma-Aldrich
Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich
Phusion Polymerase	New England Biolabs
In-Fusion [®] HD Cloning Kit	Clontech Laboratories
T4 DNA Ligase	Roche
SuperScript [™] III Reverse Transkriptase	Life Technologies

3.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung/ Bezugsquelle
Jumpstart [™] Reaktionspuffer für Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich
PBS (Phosphate buffered saline)	10 mM Na ₃ PO ₄ 1,7 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl (Chemikalien von VWR Chemicals bezogen)
Zellkulturmedium I für embryonale Mausstammzellen 500 ml	412 ml Dulbecco's modified eagles medium 75 ml Fetal Bovine Serum 5 ml Penicillin/ Streptomycin 100x 5 ml Non-Essential Amino Acids 1 ml β-Mercaptoethanol 0,35% 2 ml Leukemia inhibitory factor (LIF) (LIF hergestellt im eigenen Labor, alle andern Inhaltsstoffe von Sigma Life Science bezogen)
Zellkulturmedium II für HeLa-Zellen, HEK-Zellen, embryonale Mausfibroblasten 500 ml	439 ml Dulbecco's modified eagles medium 50 ml Fetal Bovine Serum 5 ml Penicillin/ Streptomycin 100x 5 ml Non-Essential Amino Acids 1 ml β-Mercaptoethanol 0,35% (Inhaltsstoffe von Sigma Life Science bezogen)
2x HBS Puffer	140 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₃ 50 mM Hepes (Chemikalien von VWR Chemicals bezogen)

3.5 Oligonukleotide

Die im Folgenden genannten Oligonukleotide standen bereits zu Beginn der Arbeit in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

GS276.1 qPCR GAPDH f	5'-tcaagaaggtggtgaagcag-3'
GS276.2 qPCR GAPDH r	5'-gttgaagtcgcaggagacaa-3'
GS278.1 qPCR Actin f	5'-ggtcactcactattggcaacg-3'
GS278.2 qPCR Actin r	5'-tccatacccaagaaggaagg-3'
GS2512 qPCR global IAP f	5'-cgggtcgcggtaataaaggt-3'
GS2513 qPCR global IAP r	5'-actctcgttccccagctgaa-3'
GS954 qPCR Setdb1 f	5'-gtcgggataaatccaaatgtgcc-3'
GS955 qPCR Setdb1 r	5'-ccaaccgatttgtgcacatgttt-3'
GS1909 qPCR KAP1 f	5'-cggaaatgtgagcgtgttctc-3'
GS1910 qPCR KAP1 r	5'-cggtagccagctgatgcaa-3'

Die im Folgenden genannten Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit abgeleitet und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Name	Sequenz
GS1853 GAG2 f	5'-tcgaattctttctagaaaggaaaatacaacaggcatt-3'
GS1854 GAG2 r	5'-gagcctcacgtctagaaggccctaataagccgtg-3'
GS1855 GAG1 f	5'-tcgaattctttctagaaaaagaggaaaaagggaaaag-3'
GS1856 GAG1 r	5'-gagcctcacgtctagatgtattttcctttgttctctct-3'
GS2301 GAG1.1 r	5'-gagcctcacgtctagacaagagctggctccccg-3'
GS2302 GAG1.2 f	5'-tcgaattctttctagagatgggctcggggagc-3'
GS2303 GAG1.2 r	5'-gagcctcacgtctagattttctcataatgagctgcttct-3'
GS2304 GAG1.3 f	5'-tcgaattctttctagagaagaagcagctcattatgaga-3'
GS2305 GAG1.3 r	5'-gagcctcacgtctagacagcaaaactggccttcg-3'
GS2306 GAG1.4 f	5'-tcgaattctttctagagcggctggcgaaggcc-3'
GS2307 GAG1.4 r	5'-gagcctcacgtctagagcgcagggtgaccac-3'
GS2308 GAG1.5 f	5'-tcgaattctttctagaccctgcgtagtggcag-3'
GS1898 GAG2.2 f	5'-tcgaattctttctagacgtaaatacggaaacaatgctaa-3'
GS1901 GAG2.3 r	5'-gagcctcacgtctagatcaaaagtccaatctctctgctc-3'
GS2328 GAG2.2 half f	5'-tcgaattctttctagaatggcactaactcctgctgact-3'
GS2327 GAG2.3 half r	5'-gagcctcacgtctagacttgtgcagcttcatgccaa-3'
GS2331 GAG2 short f	5'-tcgaattctttctagaaaggaaa-3'
GS2332 GAG2 short r	5'-gagcctcacgtctagaagg-3'
GS2381 Cre-NLS f	5'-tgactagtttgatcgccaccatggccaattta-3'

GS2382 Cre-NLS r	5'-ggccgctacttagattcacagatcttcttcagaaaataagt-3'
GS2450 GAG2.2 short f	5'-tcgaattctttctagacgta-3'
GS2451 GAG2.3 half short r	5'-gagcctcacgtctagact-3'
GS2501 GAG2.22 delta46 f	5'-aattcgtaaatacggaaaccaatgctaattttaccttggtg cagtttagacaggctcgccggctccctagtagggcacaata tatggaatggagagcgctttggcatgaagctgcacaag-3'
GS2502 GAG2.22 delta46 r	5'-ctagcttgtgcagcttcatgcaaagcgctctccattcca tatatttgccatactaggagccggcgagcctgtctaac tgaccaaggtaaaattagcattggttccgtatttacg-3'
GS2503 GAG2.22 delta 80 f	5'-aattcgtaaatacggaaaccaatgctaattttaccttggtg cagttatggaatggagagcgctttggcatgaagctgcacaag-3'
GS2504 GAG2.22 delta 80 r	5'-ctagcttgtgcagcttcatgcaaagcgctctccattcca tataactgcaccaaggtaaaattagcattggttccgtatttacg-3'
GS2505 GAG2.22 delta 100 f	5'-aattcgtaaatacggaaaccaatgctaattttaccggagag cgctttggcatgaagctgcacaag-3'
GS2506 GAG2.22 delta 100 r	5'-ctagcttgtgcagcttcatgcaaagcgctctccggtaaa attagcattggttccgtatttacg-3'
GS2565 GAG100 f	5'-tcgaattctttctagattggtgcagtttagacaggct-3'
GS2566 GAG100 r	5'-gagcctcacgtctagaattccatattttgccatactagg-3'

3.6 Plasmide

Die im Folgenden genannten Plasmide standen bereits zu Beginn der Arbeit in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Plasmid	Beschreibung
#183 psPAX2	lentivirales Verpackungsplasmid, kodiert für HIV-1 Proteine
#806 pLKO1mod-shSetdb1-A	lentiviraler Transfervektor für Setdb1-shRNA
#811 pLP-ecoenv	lentivirales Verpackungsplasmid, kodiert ecotropic M-MLV env Protein
#849 pLKO1mod-shSCRAMBLED	lentiviraler Transfervektor für Kontroll-shRNA
#940 pLenti6-EF1a-EFEGT-neo (Reportervektor, im Folgenden Reporterv.)	lentiviraler Transfervektor mit EF1a-Promoter und EGFP-Gen
#950 pLenti6-EFEGT-neo/IAP-LTR	Reporterv. + LTR des IAP
#951 pLenti6-EFEGT-neo/IAP-5'UTR	Reporterv. + 5'-UTR des IAP
#952 pLenti6-EFEGT-neo/IAP-GAG anti	Reporterv. + GAG-Fragment des IAP

#1011 pLenti6-EFEGT-neo/GAG1	Reporterv. + GAG1-Fragment des IAP
#1012 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2	Reporterv. + GAG2-Fragment des IAP
#1013 pLenti6-EFEGT-neo/GAG3	Reporterv. + GAG3-Fragment des IAP
#1014 pLenti6-EFEGT-neo/GAG4	Reporterv. + GAG4-Fragment des IAP
#1015 pLenti6-EFEGT-neo/GAG5	Reporterv. + GAG5-Fragment des IAP
#1016 pLenti6-EFEGT-neo/POL	Reporterv. + POL-Fragment des IAP
#1044 pLKO1mod-shKAP1-A	Transfervektor für Kap1-shRNA
#1046 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2.1	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.1
#1047 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2.2	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.2
#1048 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2.3	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.3
#1050 pLenti6-EFEGT-neo/GAG-A	Reporterv. + GAG-Subfragment A
#1051 pLenti6-EFEGT-neo/GAG-B	Reporterv. + GAG-Subfragment B
#1052 pLenti6-EFEGT-neo/GAG-C	Reporterv. + GAG-Subfragment C
#1053 pLenti6-EFEGT-neo/GAG-D	Reporterv. + GAG-Subfragment D
#1088 pLenti6-EFEGT-neo/MusD-GAG1	Reportervektor + Fragment aus MusD-Retrotransposon
#1089 pLenti6-EFEGT-neo/MusD-GAG2	Reportervektor + Fragment aus MusD-Retrotransposon
#1090 pLenti6-EFEGT-neo/ETn-GAG1	Reportervektor + Fragment aus ETn-Retrotransposon
#1091 pLenti6-EFEGT-neo/ETn-GAG2	Reportervektor + Fragment aus ETn-Retrotransposon
#1092 pLenti6-EFEGT-neo/MMTV-GAG2	Reportervektor + Fragment aus MMTV-Retrotransposon
#1093 pLenti6-EFEGT-neo/MuERV-GAG2	Reportervektor + Fragment aus MuERV-Retrotransposon

Die im Folgenden genannten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

Plasmid	Beschreibung
#1068 pLenti6-EFEGT-neo/GAG1.1	Reporterv. + GAG-Subfragment 1.1
#1069 pLenti6-EFEGT-neo/GAG1.2	Reporterv. + GAG-Subfragment 1.2
#1070 pLenti6-EFEGT-neo/GAG1.3	Reporterv. + GAG-Subfragment 1.3
#1071 pLenti6-EFEGT-neo/GAG1.4	Reporterv. + GAG-Subfragment 1.4
#1072 pLenti6-EFEGT-neo/GAG1.5	Reporterv. + GAG-Subfragment 1.5
#1073 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2.21	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.21
#1074 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2.22	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.22
#1075 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2.23	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.23
#1076 pLenti6-EFEGT-neo/GAG2.24	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.24
#1134 pLenti-EFEGT-neo/GAG100	Reporterv. + GAG-Subfragment 100

#1087 pLenti6-EF1a-CRE-IRES-PURO	Lentiviraler Transfervektor mit EF1a-Promoter + CRE-Rekombinase-Gen + Puromycin-Resistenzgen
#1263 pLenti6-EFEGT-neo/ GAG2.22delta46	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.22 ohne mittlere 46 Basenpaare
#1264 pLenti6-EFEGT-neo/ GAG2.22delta80	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.22 ohne mittlere 80 Basenpaare
#1265 pLenti6-EFEGT-neo/ GAG2.22delta100	Reporterv. + GAG-Subfragment 2.22 ohne mittlere 100 Basenpaare
#1284 pLenti6-EFEGT-neo/ GAG2-mut38	Reporterv. + GAG2-Mutante 38
#1285 pLenti6-EFEGT-neo/ GAG2.22-mut7	Reporterv. + GAG2.22-Mutante 7

3.7 Geräte

Gerät	Hersteller
FACSCanto™ Durchflusszytometer	BD Biosciences
HERAsafe Sicherheitswerkbank	Heraeus
HERAcell 240 Inkubator	Heraeus
CASY Cell Counter and Analyzer	Roche
B5050 Inkubator	Heraeus
LightCycler® 480 II Real-Time-PCR-System	Roche
peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler	Peqlab
MULTIFUGE 4KR Zentrifuge	Heraeus
Cryofuge 6000i Zentrifuge	Heraeus
Pico 17 Zentrifuge	Heraeus
MULTIFUGE 3L Zentrifuge	Heraeus
Ultrospec 2000 Spectrophotometer	Pharmacia Biotech
NanoDrop® Spectrophotometer	Peqlab
Multitron Schüttelinkubator	Infors HT
Agarosegelkammern und Spannungsquelle	Peqlab
Concentrator plus Eindampfungssystem	Eppendorf
Aqualine AL 5/ AL 18 Wasserbad	Lauda
ThermoStat™ plus Heizblock	Eppendorf
Transferpette® S Mikroliterpipetten	Brand
accu-jet® Pipettierhelfer	Brand

3.8 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien standen zu Beginn der Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Zelllinie	Beschreibung
WT26	embryonale Stammzellen der Maus (mES-Zellen) - Wildtyp
E19-8	embryonale Fibroblasten der Maus - Wildtyp
T37	transgene HeLa-Zelllinie - Ursprung humanes Cervixkarzinom
293T	transgene humane embryonale Nierenzellen
B32-3 & B33-1	mES-Zellen - konditioneller Setdb1-Knockout möglich
Dn57	mES-Zellen - Doppel-KO der H3K9-Methyltransferase Suv3-9
ADFL72	mES - Doppel-KO der H3K9-Methyltransferase Suv3-9
B4.2	mES - Doppel-KO der H4K20-Methyltransferase Suv4-20
B7.1	mES - Doppel-KO der H4K20-Methyltransferase Suv4-20
DNMT1	mES - Knockout der DNA-Methyltransferase Dnmt1
DNMT3ab	mES - Knockout der DNA-Methyltransferasen DNMT3a/b
Feeder-Zellen	embryonale Fibroblasten der Maus - Proliferationsunfähig
E.Coli Stellar	kompetente Bakterien für Klonierungszwecke (Clontech)

3.9 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert und unter sterilen Bedingungen behandelt.

Embryonale Stammzellen der Maus wurden auf gelatinisierten Kulturplatten in Kulturmedium I (siehe Kapitel 3.4) gehalten, täglich mit frischem Medium versorgt und alle zwei Tage neu ausgesät. Die Kultur aller anderen Zelllinien erfolgte in Kulturmedium II (siehe Kapitel 3.4) auf Platten ohne Gelatine. Diese Zelllinien wurden jeden dritten Tag auf neue Kulturplatten ausgesät.

3.10 Lentivirale Transduktion von Zellen

Um bestimmte DNA-Fragmente in das Genom der untersuchten Zellen einzubringen, wurde ein lentivirales Transduktionssystem verwendet. Dazu mussten zunächst mit Hilfe einer Verpackungszelllinie entsprechende lentivirale Partikel generiert werden, mit denen die untersuchten Zellen anschließend infiziert werden konnten. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 3.2 zusammengefasst.

3.10.1 Klonierung lentiviraler Reportervektoren mittels In-Fusion® Cloning

In dieser Arbeit wurden verschiedenste DNA-Fragmente dahingehend untersucht, ob sie in embryonalen Stammzellen der Maus bzw. in embryonalen Fibroblasten der Maus in der Lage sind, die Repression eines Reportergens zu vermitteln. Dazu wurde das betreffende Testfragment jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem starken Promoter und einem EGFP (enhanced green fluorescent protein)-Gen in einen lentiviralen Reportervektor kloniert. Die Integration des EGFP-Gens ins Genom der untersuchten Zellen hatte in den meisten Fällen zur Folge, dass die Zellen das entsprechende Protein synthetisierten und dadurch begannen grün zu fluoreszieren. Nur wenn das Testfragment in der Lage war, Repressionsprozesse zu vermitteln, wurde der Promoter stillgelegt und es kam keine grüne Fluoreszenz zustande.

Als Basisvektor wurde jeweils der lentivirale Transfervektor #940 pLenti6-EF1a-EFEGT-neo (siehe Abbildung 3.1) verwendet, welcher in der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung stand. Der Vektor wurde mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme linearisiert und mittels In-Fusion® Cloning das jeweilige Testfragment eingefügt. Das Testfragment wurde zuvor durch eine PCR mit speziell für die Verwendung des In-Fusion-Enzyms gestalteten Primern generiert. Diese Primer mussten an jedem Ende einen 15 Basenpaare langen Überhang aufweisen, welcher identisch mit jeweils einem Ende des linearisierten Vektors war. Die Überlappungen des so entstehenden PCR-Produktes mit dem Vektor wurden durch das In-Fusion-Enzym erkannt und die jeweils passenden Enden miteinander fusioniert. Genauere Angaben über die Durchführung der Klonierungen können den Protokollen des Herstellers entnommen werden [170].

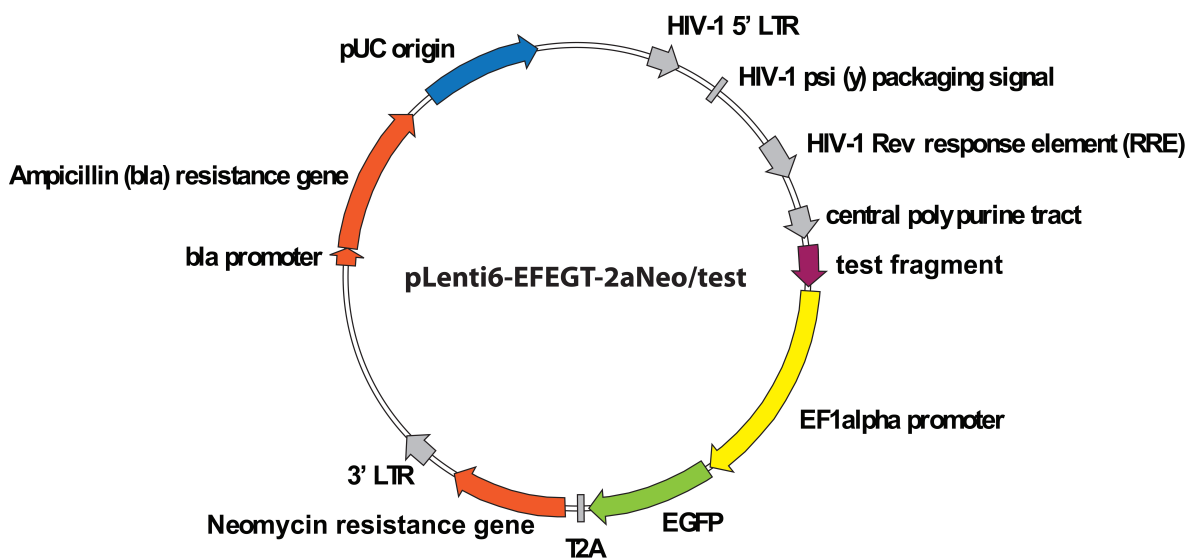


Abbildung 3.1: Lentiviraler Basisvektor pLenti6-EF1a-EFEGT-neo

3.10.2 Herstellung der Viruspartikel

Zur Herstellung der Viruspartikel wurden HEK 293T Zellen als Verpackungszelllinie verwendet. Die Zellen wurden dazu durch Calcium-Phosphat-Transfektion mit dem lentiviralen Transfektor sowie den beiden Verpackungsplasmiden psPAX2 (kodiert für HIV-1-Proteine) und pLP-eco env (kodiert für das ecotropic M-MLV env-Protein) transfiziert wie in Tabelle 3.11 beschrieben.

Substanz	Menge
2.5 M CaCl ₂ Lösung	120 µl
DNA	8 µg lentiviraler Transfektor 8 µg psPAX2 8 µg pLP-eco env
H ₂ O	auffüllen auf 1200 µl
2x HBS	1200 µl

Tabelle 3.11: Calcium-Phosphat-Transfektion

Die Verpackungszellen wurden anschließend für 8 Stunden mit dem Transfektionsmix inkubiert und erhielten danach frisches Kulturmedium, in dem sich die nun von den Zellen produzierten Viruspartikel ansammeln konnten. Das Kulturmedium wurde schließlich 48 Stunden nach der Transfektion mitsamt den enthaltenen lentiviralen Partikeln abgenommen und zur Transduktion anderer Zellen verwendet. Falls nötig wurde die Viruslösung bei -80 °C eingefroren und gelagert.

3.10.3 Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Gehaltes an infektiösen Partikeln in der gewonnenen Viruslösung wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen davon inkubiert und der Anteil infizierter Zellen jeweils mittels FACS-Analyse (siehe Kapitel 3.11) bestimmt. Die HeLa-Zellen als menschliche Zelllinie eigneten sich in diesem Fall gut als Kontrolle, da die in dieser Arbeit untersuchten mausspezifischen Effekte bei ihnen nicht auftreten. Es wurde eine transgene HeLa-Zelllinie (T37) verwendet, die das mausspezifische Protein SLC7A1 an der Zelloberfläche trägt. Da die verwendeten Lentiviren genau jenes Protein zur Anheftung an eine Zelle benötigen, konnten die HeLa-Zellen trotz ihrer menschlichen Herkunft durch sie infiziert werden.

3.10.4 Transduktion

Die zu transduzierenden Zellen wurden jeweils am Vortag auf Zellkulturplatten ausgesät. Vor der Infektion erhielten sie frisches Kulturmedium, welches mit 8 µg Polybrene pro

ml Medium versetzt war, um die Infektionseffizienz zu steigern. Anschließend wurde die Viruslösung zum Kulturmedium gegeben. Die Menge richtete sich dabei nach dem zuvor bestimmten Virustiter und vor allem nach dem zu transduzierenden Zelltyp. Für eine vergleichbare Infektionsrate benötigten embryonale Fibroblasten der Maus die fünffache Virusmenge und embryonale Stammzellen der Maus die 25-fache Virusmenge der HeLa-Kontrollzellen. Danach wurden die Zellkulturplatten für eine Stunde bei 1000 g und 34 °C zentrifugiert und anschließend das Kulturmedium erneuert.

3.11 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die mit Hilfe des lentiviralen Systems transduzierten Zellen wurden je nach Experiment zwischen zwei und elf Tagen nach der Transduktion mittels FACS analysiert. Das Gerät registrierte nach dem Auftreffen eines Lasers auf die Zellen die Streuung des Lichts und die durch den Laser angeregte Fluoreszenz der Zelle. Die gemessenen Parameter konnten zur Sortierung der Zellen in bestimmte Populationen durch das Gerät dienen. Darüber hinaus konnte durch die statistische Auswertung der erhobenen Fluoreszenzdaten die Repressionsaktivität in der jeweils untersuchten Situation bestimmt werden.

3.12 Mutagenese-PCR zur Identifikation von Punktmutationen, welche die Repressionseffekte von GAG 2.22 beeinträchtigen

Um festzustellen, ob die Rekrutierung der untersuchten Repressionsvorgänge am IAP-Element sequenzspezifisch stattfinden, wurden in die zuvor identifizierte Rekrutierungssequenz GAG 2.22 einzelne Punktmutationen eingefügt. Dazu wurde das GAG 2.22-Fragment als Template in einer stark fehleranfälligen Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Der Einbau fehlerhafter Basen während der PCR wurde durch drei Faktoren provoziert. Es wurde eine im Vergleich zu anderen Enzymen relativ fehleranfällige Taq-Polymerase verwendet und deren Reaktionsbedingungen wurden zusätzlich durch eine 0,25 mM MnSO₄-Konzentration im Reaktionsansatz erschwert. Darüber hinaus fand die PCR über eine hohe Zyklenzahl (32 Zyklen) statt um die Fehlerrate weiter zu steigern. Das PCR-Protokoll im Detail zeigt Tabelle 3.12.

Die so generierten mutierten Varianten von GAG 2.22 wurden als gepoolte Bibliothek in den EGFP-Reportervektor kloniert (siehe Kapitel 3.10.1). Durch lentivirale Transduktion (siehe Kapitel 3.10) konnten die Mutanten dann als gesamte Bibliothek in mES-Zellen eingebracht werden. Zwei Tage nach Transduktion wurden mittels FACS (siehe Kapitel 3.11) diejenigen Zellen aussortiert, in denen die Repression des Reportergens nicht oder nur unvollständig stattgefunden hatte und somit eine grüne Fluoreszenz nachweisbar war. Diese Zellen mussten eine Variante von GAG 2.22 enthalten, deren Fähigkeit zur

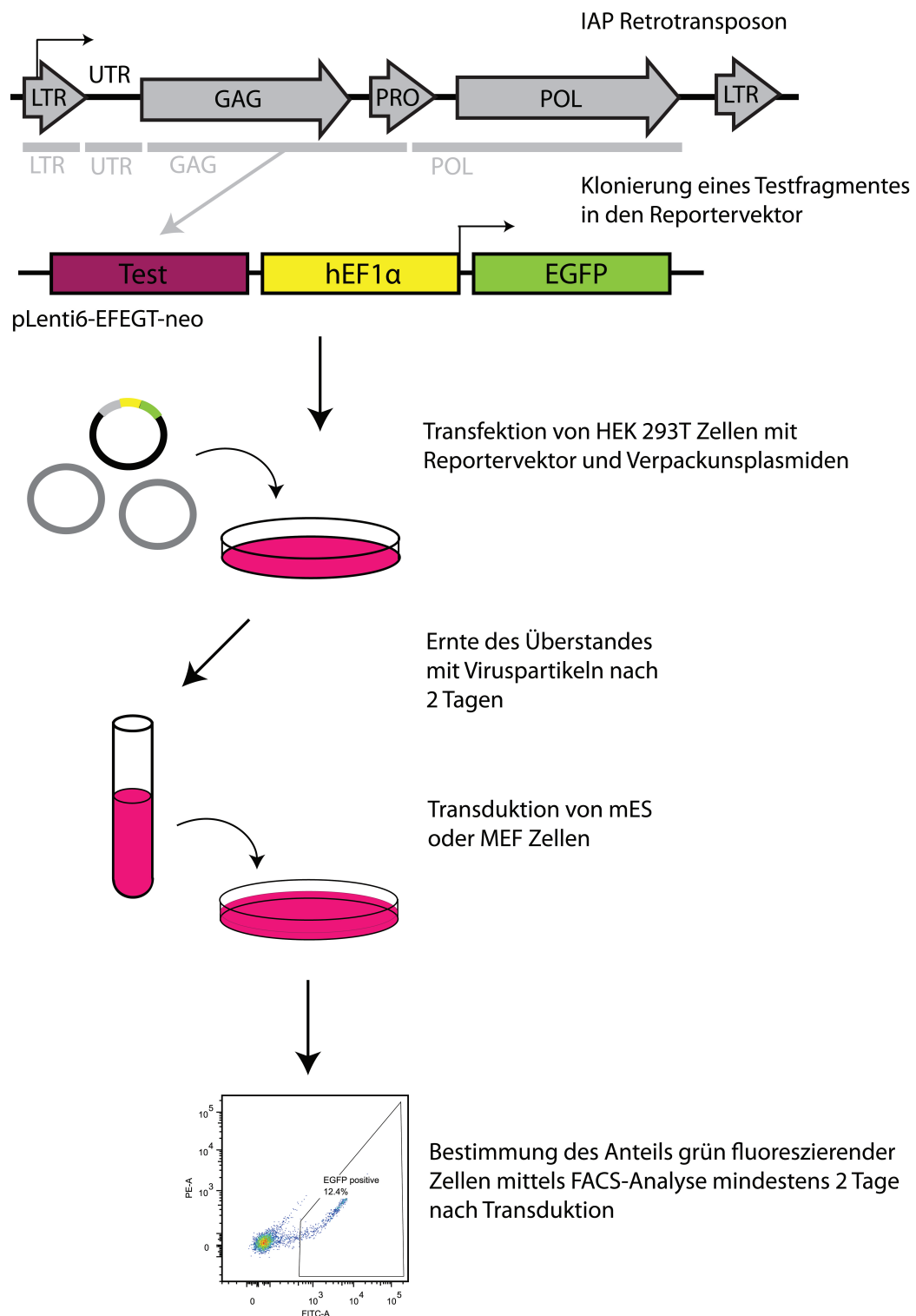


Abbildung 3.2: Übersicht über den lentiviralen Reporter-Assay (siehe Kapitel 3.10 und 3.11)

Substanz	Konzentration	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Jumpstart TM Puffer	1x (Herstellerangabe)	Initiale Denaturierung	94°C	1 min
Primer GS1898	0,25 µM	Denaturierung	94°C	30 s
Primer GS2327	0,25 µM	Alignment	65°C	25 s
dNTPs	0,2 mM	Elongation	72°C	12 s
MnSO ₄	0,25 mM	Finale Elongation	72°C	7 min
MgCl ₂	5,5 mM			
Taq-Polymerase	0,05 U/µL			
Template: Plasmid #952	0,2 ng/µL			

(b) Temperaturprotokoll der Mutagenese-PCR, Zyklenzahl: 32

(a) Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR. Der Ansatz wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt und anschließend die PCR nach dem in b beschriebenen Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tabelle 3.12: Mutagenese-PCR

Rekrutierung von Silencing-Prozessen durch die enthaltenen Mutationen beeinträchtigt war. Aus den gewonnenen Zellen wurde die genomische DNA extrahiert und mittels PCR eine neue Bibliothek von GAG 2.22-Varianten generiert. Aus dieser eingegrenzten Bibliothek von Mutanten wurden schließlich einzelne Klone mit Hilfe des in Kapitel 3.10 und 3.11 beschriebenen Reporterassays gegengetestet. Diejenigen Varianten, bei denen sich eine deutliche Beeinträchtigung der Repression zeigte, wurden sequenziert und mit der Originalsequenz verglichen. Einen Überblick über den gesamten Ablauf des Mutagenese-Experiments gibt Abbildung 3.3.

3.13 Repression einzelner Gene unter Verwendung von shRNAs

Zur Untersuchung der Frage, inwieweit bestimmte Zellproteine für die beobachtete Repression erforderlich sind, wurde die Expression der entsprechenden Gene mit Hilfe von shRNAs (short hairpin RNAs) reprimiert. Die genetische Information für die jeweilige shRNA wurde durch das in Kapitel 3.10 beschriebene lentivirale Transduktionssystem in die Zellen eingebracht. Ein daran gekoppeltes Puromycin-Resistenzgen ermöglichte die anschließende Selektion der transduzierten Zellen. Die Selektion wurde jeweils zwei Tage nach Transduktion begonnen und nach weiteren zwei Tagen der Reporter Assay mit dem verbleibenden Zellen durchgeführt. Gleichzeitig wurde eine andere Zellgruppe mit dem Genfragment für eine Kontroll-shRNA (Scrambled) infiziert, die keine bestimmte Genexpression in den Zellen unterdrücken kann. Die Repressionsfähigkeit der beiden Zellgruppen konnte verglichen und so die Rolle des jeweiligen Faktors bei der Repression betrachtet werden. Tabelle 3.13 zeigt die Sequenzen der verwendeten shRNAs.

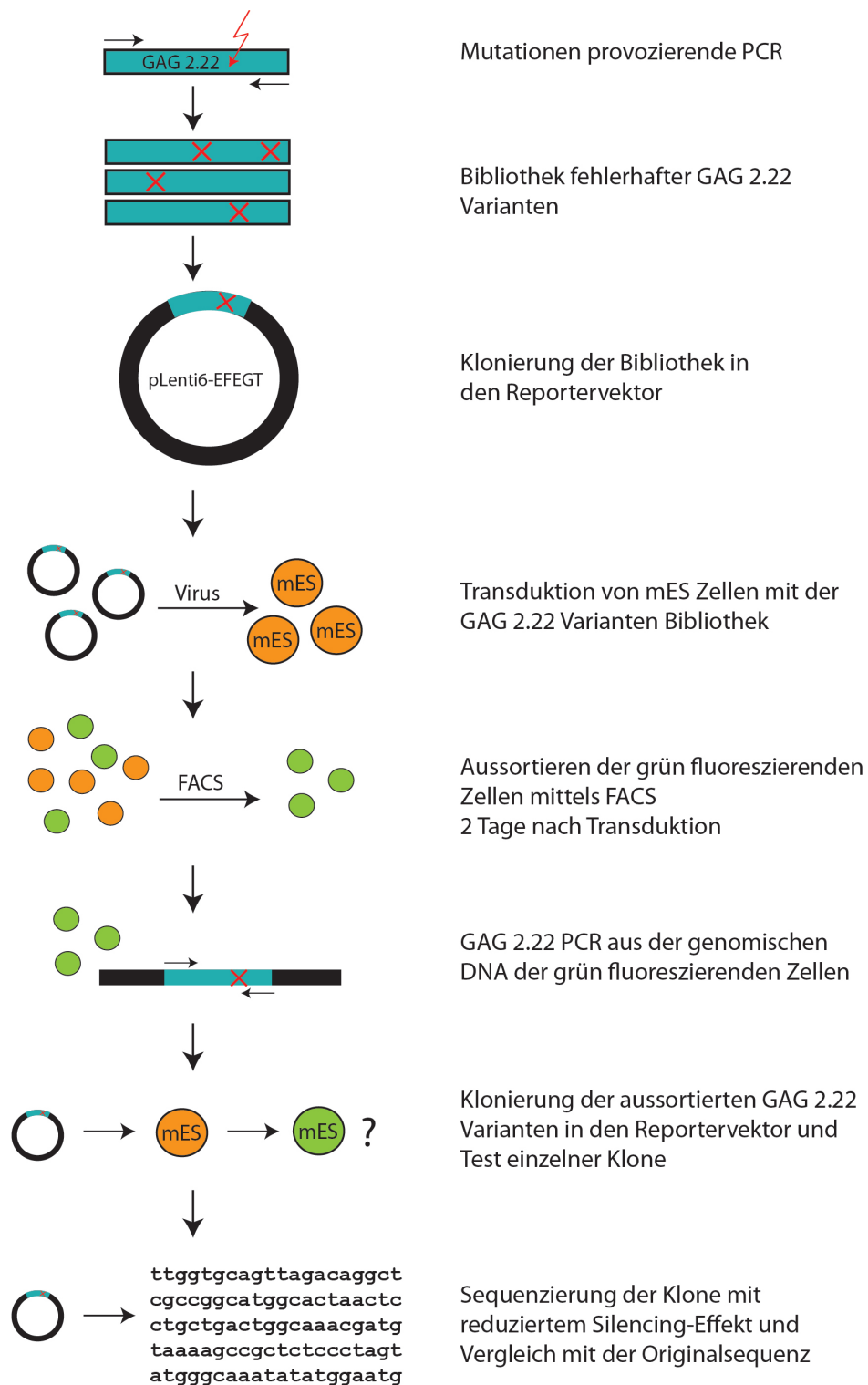


Abbildung 3.3: Übersicht über die Mutagenese-PCR zur Identifikation von Punktmutationen, welche die Rekrutierungsfunktion von GAG 2.22 beeinträchtigen (Kapitel 3.12)

Zielgen	shRNA-Sequenz
Kap1	5'-gcagtgaggaaccaacgtaa-3'
Setdb1	5'-gccttgatcttccatgtcatt-3'
Scrambled Kontrolle	5'-caacaagatgaagagcaccaa-3'

Tabelle 3.13: Die genannten shRNA-Sequenzen wurden jeweils mit einem pLKO1-Vektor-Rückgrat verwendet (siehe Plasmidliste in Kapitel 3.6).

3.14 Konditioneller Knockout des Setdb1-Gens unter Verwendung eines Cre-Rekombinase-Systems

Um die Rolle der H3K9-Methyltransferase Setdb1 bei der untersuchten Rekrutierung repressiven Chromatins genauer zu betrachten, sollten Setdb1-Knockout-Zellen im Reporterassay untersucht werden. Da Setdb1 allerdings essenziell für den Erhalt des pluripotenten Status von ES-Zellen ist, können die Zellen nach komplettem Verlust von Setdb1 nur noch wenige Tage überleben [107, 108]. Deshalb musste ein System entwickelt werden, mit dessen Hilfe das Setdb1-Gen zu einem bestimmten Zeitpunkt gezielt ausgeknockt werden kann.

Dazu wurde eine Zelllinie verwendet, bei der das Setdb1-Gen zwei LoxP-Elemente enthält. Diese Elemente können durch eine Cre-Rekombinase erkannt und daraufhin der dazwischenliegende Teil des Gens ausgeschnitten werden, sodass das Setdb1-Gen seine Funktion verliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Gen für die Cre-Rekombinase und ein Puromycin-Resistenzgen zusammen in einen lentiviralen Transfektor kloniert. So konnte die Cre-Rekombinase bei Bedarf mit Hilfe lentiviraler Transduktion in die Zellen eingebracht werden und dann eine Selektion der transduzierten Zellen erfolgen. Anschließend standen die so geschaffenen Setdb1-Knockout-Zellen wenige Tage für vergleichende Experimente gegenüber Zellen mit normalem Setdb1-Level zur Verfügung. Eine Übersicht über das System gibt Abbildung 3.4.

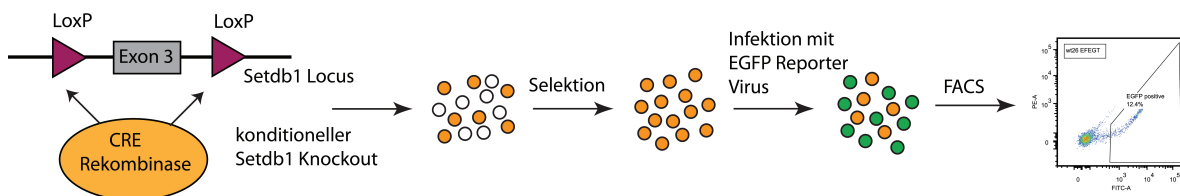


Abbildung 3.4: Konditioneller Knockout des Setdb1-Gens mit Hilfe eines Cre-Rekombinase-Systems (Kapitel 3.14). Die Cre-Rekombinase wurde mittels lentiviraler Transduktion in die Zellen eingebracht und am Folgetag mit der Puromycin-Selektion begonnen. Nach 24-stündiger Selektion erfolgte die Transduktion mit dem EGFP-Reporter. Weitere zwei Tage darauf wurden die Zellen schließlich mittels FACS analysiert.

3.15 Bestimmung der transkriptionellen Aktivität bestimmter Gene durch quantitative PCR

Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Transkriptionsaktivität der untersuchten IAP-Retrotransposons besser zu verstehen, wurde in verschiedenen Knockout- bzw. Knockdown-Situationen der Gehalt der Zellen an entsprechenden RNA-Transkripten bestimmt. Die RNA wurde jeweils mit Hilfe des Qiagen RNeasy[®] Micro Kits aus den Zellen gewonnen und anschließend mit Hilfe einer reversen Transkriptase (Superscript[®] III, Protokoll nach Hersteller Life Technologies) in cDNA umgesetzt. Diese cDNA konnte schließlich mittels qPCR quantifiziert werden.

Für die quantitative PCR wurde die gewonnene cDNA mit geeigneten Primern für die betrachteten IAP-Elemente und dem FastSYBR[®] Green Master Mix nach den Angaben des Herstellers Applied Biosystems inkubiert und anschließend mit Hilfe des LightCycler[®] 480 II Real-Time-PCR-Systems der Firma Roche analysiert. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils in Triplikaten auf einer 384-Well-Platte durchgeführt. Jeder einzelne Reaktionsansatz setzte sich aus 5 µl FastSYBR[®] Green Master Mix, 3 µl H₂O, 1 µl Primer Mix (3 µM) und 1 µl cDNA zu einem Gesamtvolumen von 10 µl zusammen. Die verwendeten Primer können der Liste in Kapitel 3.5 entnommen werden.

4 Ergebnisse

4.1 IAP-Retrotransposons enthalten ein 160 bp langes Sequenzelement, das in der Lage ist, Silencing zu rekrutieren: GAG 2.22

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Entdeckung des GAG-Elementes der IAP-Retrotransposons als Induktor nahezu vollständiger Repression eines benachbarten Promotors [17]. In ähnlicher Art und Weise war zuvor bereits die UTR-Region der IAP-Retrotransposons als Silencing-rekrutierende Sequenz identifiziert worden [19]. Der in Kapitel 3.10 und 3.11 beschriebene EGFP-Reporter-Assay (siehe Abbildung 3.2) wurde verwendet, um das Kernelement innerhalb der GAG-Region zu identifizieren, das für die Etablierung der Repression verantwortlich ist.

4.1.1 Die GAG-Region der IAP-Retrotransposons der Maus enthält eine für ES-Zellen spezifische Silencing-Sequenz: GAG 2.22

Zunächst wurden verschiedene Subfragmente des IAP-Elementes im EGFP-Reporter-Assay untersucht. In Übereinstimmung mit den bereits publizierten Daten [19] konnte für die UTR-Region eine milde transrepressive Aktivität nachgewiesen werden. Das GAG-Sequenzelement führte in embryonalen Stammzellen der Maus (mES) zu einer nahezu vollständigen Repression des Reporters. Diese Beobachtung war spezifisch für mES-Zellen und ließ sich in embryonalen Fibroblasten (MEF) nicht nachweisen (siehe Abbildung 4.1 A).

Die insgesamt etwa 2000 bp umfassende GAG-Region wurde in viele verschiedene Subfragmente zerlegt und diese anschließend in den lentiviralen Reportervektor (siehe Abbildung 3.1) kloniert. Mit jedem dieser Testfragmente wurde die EGFP-Expression im Reporter-Assay sowohl für mES-Zellen als auch für MEF bestimmt. Eine kleine Auswahl der untersuchten Fragmente ist in Abbildung 4.1 B dargestellt. Zunächst wurde das 400 bp umfassende Element GAG 2 identifiziert, welches ebenfalls zu einer annähernd vollständigen Repression des Reporters führte. Dieses konnte weiter auf ein Minimalfragment von 160 bp eingegrenzt werden: GAG 2.22. GAG 2.22 war in mES-Zellen das kleinste Fragment, das im Reporter-Assay noch die volle Repressionsaktivität vermitteln konnte. In MEF dagegen war der Effekt weiterhin nicht nachweisbar (siehe Abbildung 4.1).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die GAG-Sequenz des IAP-Retrotransposons ein neues, starkes Silencing-Element enthält, das spezifisch in embryonalen Stammzellen der Maus (mES) die Repression eines Reportergens vermitteln kann. Dieses Ele-

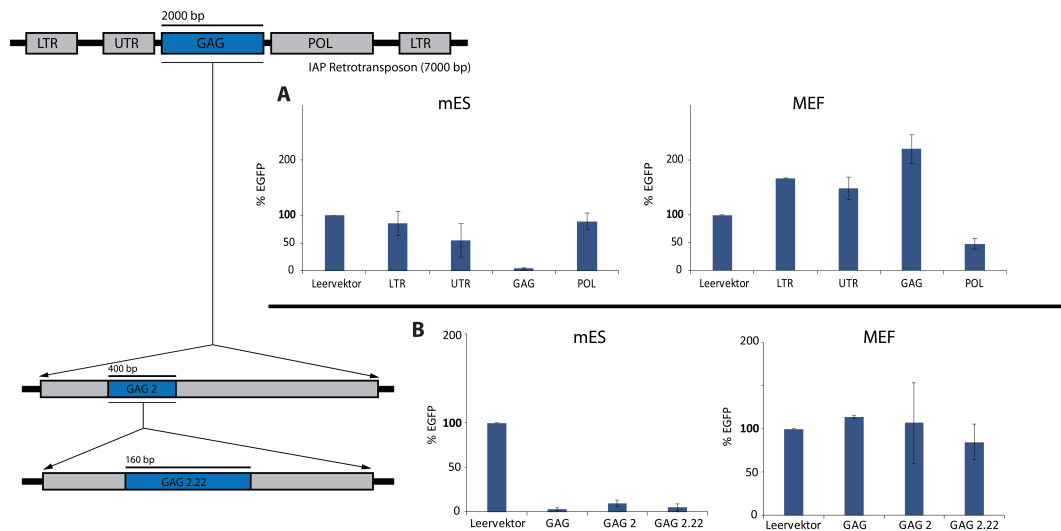


Abbildung 4.1: Die GAG-Region der IAP-Retrotransposons der Maus enthält eine für mES-Zellen spezifische Silencing-Sequenz: GAG 2.22

Zur Eingrenzung des für die Etablierung von repressivem Chromatin verantwortlichen Sequenzelements wurden verschiedene Teilstücke des IAP-Retrotransposons im EGFP-Silencing-Assay getestet. Die Experimente wurden sowohl an embryonalen Stammzellen der Maus (mES) als auch an embryonalen Fibroblasten der Maus (MEF) durchgeführt. Nur in embryonalen Stammzellen, nicht jedoch in embryonalen Fibroblasten, ließen sich starke Repressionseffekte durch GAG 2.22 und alle größeren, GAG 2.22 enthaltenden Testfragmenten nachweisen. Die verbleibende EGFP-Expressionsaktivität ist jeweils prozentual zum Leervektor angegeben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

ment wurde mit „GAG 2.22“ benannt.

4.1.2 Die untersuchten Repressionsvorgänge am GAG-Element sind spezifisch bei IAP-Retrotransposons zu beobachten

IAP-Retrotransposons stellen nur eine von zahlreichen Transposon-Familien im Mausgenom dar [145]. Nachdem nachgewiesen war, dass das GAG-Element der IAP-Familie repressives Chromatin rekrutieren kann, wurde deshalb untersucht, ob dies auch auf äquivalente Bereiche anderer Transposons der Maus zutrifft. Dazu wurde der in Kapitel 3.10 und 3.11 beschriebene EGFP-Reporter-Assay (siehe Abbildung 3.2) vergleichend mit Vertretern anderer Familien endogener Retrotransposons (MusD, MuERV, MMTV, ETn) durchgeführt.

Während die GAG-Region des IAP-Elements im Reporter Assay mit ES-Zellen erneut eine nahezu vollständige Repression des Reportergens vermittelte, konnten derartige Effekte für keinen der anderen getesteten Transposon-Typen nachgewiesen werden. Auch

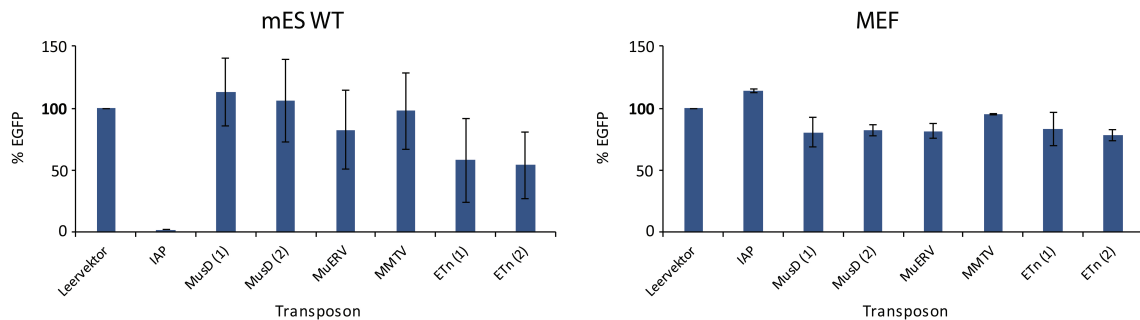


Abbildung 4.2: Die untersuchten Repressionsvorgänge am GAG-Element sind spezifisch bei IAP-Retrotransposons zu beobachten

Die GAG-Region der IAP-Retrotransposons vermittelt im EGFP-Reporter-Assay mit embryonalen Stammzellen eine nahezu vollständige Repression des benachbarten Promoters und damit der Expression von EGFP. Äquivalente Bereiche anderer Retrotransposons (MusD, MuERV, MMTV und ETn) zeigen diesen Effekt dagegen nicht. In embryonalen Fibroblasten war mit keinem der getesteten Fragmente ein Repressionseffekt nachweisbar. Die erreichte EGFP-Expressionsaktivität ist jeweils prozentual zum Leervektor angegeben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

dieses Experiment wurde zusätzlich vergleichend mit embryonalen Fibroblasten der Maus durchgeführt. Hier zeigte sich mit keinem der Testfragmente ein Silencing-Effekt (siehe Abb. 4.2).

Daraus lässt sich vermuten, dass der untersuchte Silencing-Mechanismus am GAG-Element spezifisch bei IAP-Retrotransposons stattfindet. Für Sequenzelemente von GAG-Genen anderer Transposons (getestet wurden MusD, MuERV, MMTV und ETn) bzw. Sequenzelemente, die sich in einer ähnlichen Position im jeweiligen Retroelement befinden, konnte kein Silencing-Effekt nachgewiesen werden.

4.2 GAG 2.22-Silencing ist ein sequenzspezifischer Mechanismus

Um festzustellen, ob das untersuchte GAG 2.22-Silencing sequenzspezifisch stattfindet, wurden mit Hilfe der in Kapitel 3.12 beschriebenen Mutagenese-PCR Punktmutanten des GAG 2.22-Fragments generiert. Diese Mutanten wurden dann im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Vermittlung repressiver Effekte im EGFP-Reporter-Assay (siehe Kapitel 3.10 und 3.11) mit dem ursprünglichen GAG 2.22-Fragment verglichen. Aus der Vielzahl der generierten Mutanten konnten so diejenigen ermittelt werden, bei denen die Stilllegung des Reportergens ganz oder teilweise aufgehoben war.

Mittels FACS-Analyse ließ sich für einige GAG 2.22-Mutanten eine starke Derepression

des EGFP-Reporters nachweisen. Abbildung 4.3 A zeigt beispielhaft im FACS-Plot den deutlich erhöhten Anteil EGFP-positiver Zellen beim Reporter-Assay mit Mutante 38 verglichen mit der GAG 2.22-Originalsequenz. Diejenigen Mutanten mit dem größten Derepressionseffekt (1, 3, 7, 25, 30, 38 und 40) sind in Abbildung 4.3 B zusammengefasst.

Die oben genannten Mutanten des GAG 2.22-Fragmentes wurden sequenziert, um die jeweils enthaltenen Punktmutationen zu identifizieren. Es erfolgte ein Vergleich der Mutanten-Sequenzen mit der 100% IAP-Consensus-Sequenz [171], um diejenigen Mutationen herauszufiltern, welche stark konservierte Basenpaare des IAP-Elements betreffen. In Abbildung 4.3 C wurden die daraus resultierenden relevanten Mutationen rot markiert.

Die Rekrutierung von Repressionsvorgängen an GAG 2.22 konnte somit als sequenzspezifischer Mechanismus identifiziert werden, der durch den Austausch einzelner Basen stark beeinträchtigt werden kann. Die Zusammenschau der sequenzierten Mutanten deutet eine Häufung der relevanten Mutationen an drei verschiedenen Stellen an (Position 77/160 bp: a -> g; Position 94/160 bp: a -> g; Position 118 bzw. 119/160 bp: a -> g). Die drei genannten Positionen sind jeweils bei mindestens zwei Mutanten verändert und jede der identifizierten Mutanten ist an mindestens einer der drei Stellen betroffen.

4.3 Die H3K9-Methyltransferase Setdb1 und das Korepressorprotein Kap1 sind essenziell für GAG 2.22-Silencing

Zur Annäherung an den am GAG 2.22-Element ablaufenden Repressionsmechanismus wurde untersucht, ob GAG 2.22-Silencing von bestimmten bekannten heterochromatischen Proteinen abhängig ist. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Stilllegung von Retrotransposons in embryonalen Stammzellen unabhängig vom Mechanismus der DNA-Methylierung abläuft [166]. Damit konsistent zeigte sich im EGFP-Reporter-Assay mit Knockout-Zellen, denen die DNA-Methyltransferasen Dnmt1 bzw. Dnmt3a und Dnmt3b fehlten, keinerlei Beeinträchtigung des EGFP-Silencings (siehe Abbildung 4.4 A).

Außerdem war bekannt, dass in embryonalen Stammzellen die Histon-Modifikationen H3K9-Trimethylierung und H4K20-Trimethylierung stark gehäuft an vielen Retrotransposons einschließlich der IAP-Elemente auftreten [46]. Für die H3K9-Methyltransferase Suv3-9h sowie die H4K20-Methyltransferase Suv4-20h konnte im Reporter-Assay mit entsprechenden Knockout-Zellen allerdings kein Einfluss auf den an GAG 2.22 ablaufenden Repressionsmechanismus nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.4 A). Der Knockout der H3K9-Methyltransferase Setdb1 dagegen führte zu einer vollständigen Aufhebung der Repression des EGFP-Reportergens (siehe Abbildung 4.4 B).

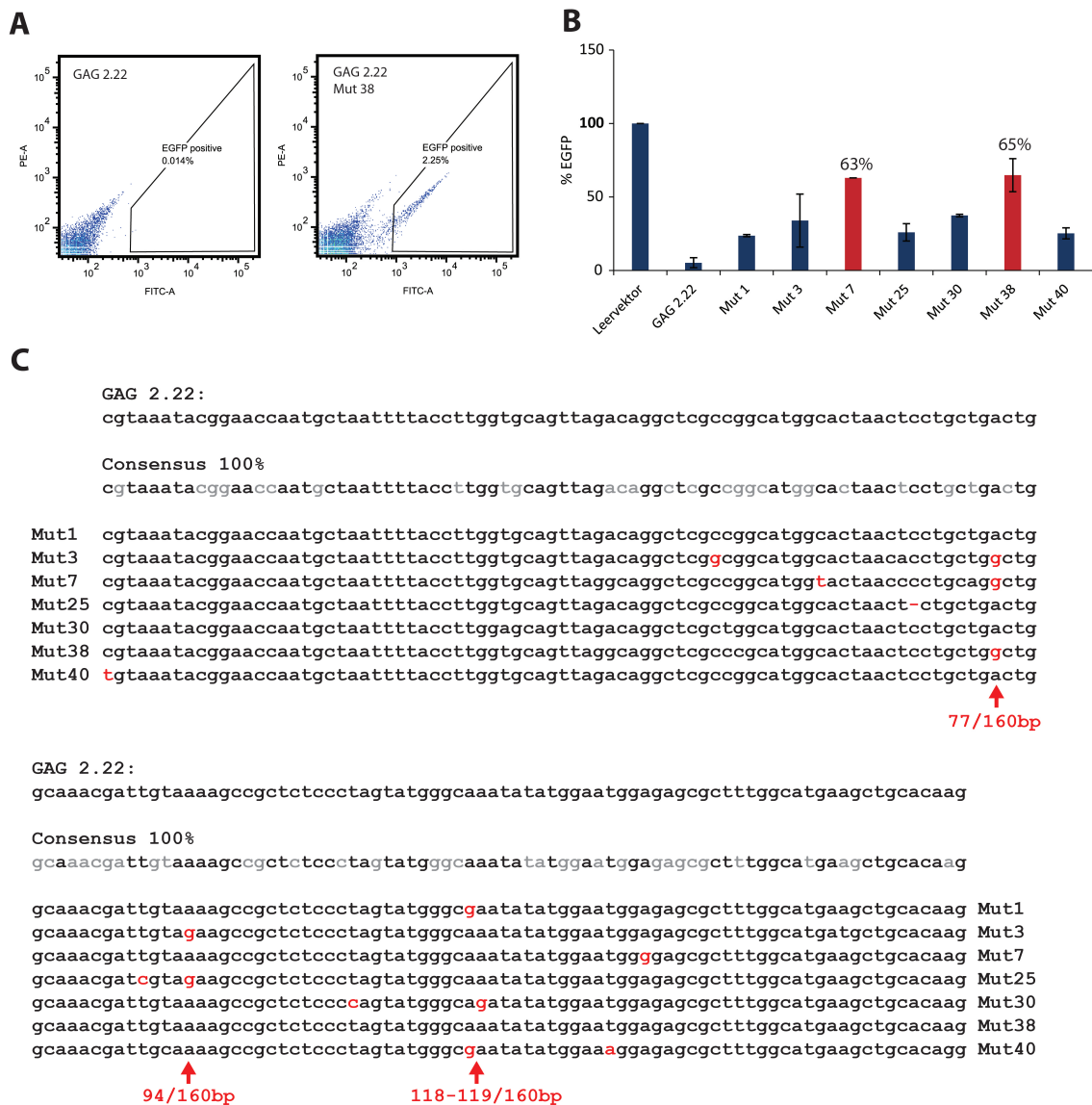


Abbildung 4.3: GAG 2.22-Silencing ist ein sequenzspezifischer Mechanismus

Bestimmte Punktmutationen in der GAG 2.22-Sequenz beeinträchtigen die Repressionsaktivität erheblich. Die stärkste Derepression im EGFP-Silencing-Assay konnte bei der Sequenzvariante Mut 38 beobachtet werden (**A**). Weitere Beispiele für Mutanten mit beeinträchtigter Repressionsfähigkeit sind in **B** zusammengefasst. Die einzelnen Punktmutationen wurden analysiert und dem GAG 2.22 entsprechenden Bereich aus der 100% Consensus-Sequenz der IAP-Elemente gegenübergestellt. Diejenigen Mutationen, welche konservierte Basen betreffen, sind in **C** jeweils rot markiert. Gehäuft zu beobachten waren Mutationen an drei verschiedenen Stellen: Position 77/160 bp: a → g; Position 94/160 bp: a → g; Position 118 bzw. 119/160 bp: a → g

Es ist zu beachten, dass Setdb1 für den Erhalt des pluripotenten Status von ES-Zellen notwendig ist und die Zellen ohne Setdb1 nur noch wenige Tage überleben können. Deshalb wurden in diesem Experiment ES-Zellen verwendet, in denen das Setdb1-Gen zwei LoxP-Elemente enthält. Zwei Tage vor Transduktion mit dem GAG 2.22-EGFP-Reporter wurde mittels Lentivirus-Transduktion eine Cre-Rekombinase in die Zellen eingebracht und so der Setdb1-Knockout aktiviert (siehe Kapitel 3.14).

Setdb1 konnte somit als essenzieller Faktor für den Silencing-Prozess am GAG 2.22-Element der IAP-Retrotransposons im EGFP-Reporter-Assay identifiziert werden. Dies ist konsistent mit der aus der Literatur bereits bekannten Entdeckung, dass in Setdb1-Knockout-ES-Zellen eine starke Hochregulation endogener retroviraler Elemente einschließlich der IAP-Retrotransposons stattfindet [18].

Neben Setdb1 war auch das Korepressorprotein Kap1 bereits zuvor mit Retrotransposon-Silencing in mES-Zellen in Verbindung gebracht worden [19]. Deshalb wurde untersucht, ob Kap1 auch für die GAG 2.22-abhängige Repression des EGFP-Reporters erforderlich ist. Für dieses Experiment wurde in ES-Zellen mit Hilfe von short hairpin RNAs die Expression von Kap1 unterdrückt (siehe Kapitel 3.13). Der Kap1-Knockdown führte im EGFP-Reporter-Assay zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Repression (siehe Abbildung 4.4 C). Beim GAG 2.22-Silencing des EGFP-Reportergens handelt es sich also um einen Kap1-abhängigen Mechanismus. Nachdem in diesem Experiment nur Kap1-Knockdown-Zellen und keine Kap1-Knockout-Zellen untersucht wurden, lässt sich keine Aussage darüber machen, ob der Verlust von Setdb1 möglicherweise zu einer schwereren Beeinträchtigung der Silencing-Fähigkeit führt als der Verlust von Kap1.

4.4 Die SNF2-Typ ATPase Atrx ist erforderlich für eine schnelle Etablierung der Repression an GAG 2.22

Atrx ist eine SNF2-Typ ATPase mit N-terminaler ADD-Domäne, die an methyliertes H3K9 bindet und mit dem humanen ATR-X-Syndrom (X-linked mental retardation with alpha-thalassemia) in Verbindung gebracht wird [109, 115, 116, 121, 172]. Durch Dr. Dennis Sadic konnte mittels shRNA-Screening aufgedeckt werden, dass eine auf Atrx abzielende shRNA die Repression des EGFP-Reporters am GAG-Element stark beeinträchtigt [16, 17]. Es lag deshalb nahe, dass Atrx eine wichtige Rolle im Setdb1- und Kap1-abhängigen Silencing von IAP-Retrotransposons spielen könnte. Um den Einfluss von Atrx beim GAG 2.22-Silencing genauer zu betrachten, wurden Atrx-Knockout-ES-Zellen (zur Verfügung gestellt durch Dr. Dennis Sadic [16, 17]) im EGFP-Reporter-Assay mit Wildtyp-ES-Zellen verglichen.

Insgesamt vier unabhängige Atrx-defiziente ES-Zelllinien wurden mit Hilfe des in Kapitel 3.10 und 3.11 beschriebenen Reporter-Assays auf ihre Fähigkeit zum Silencing an GAG

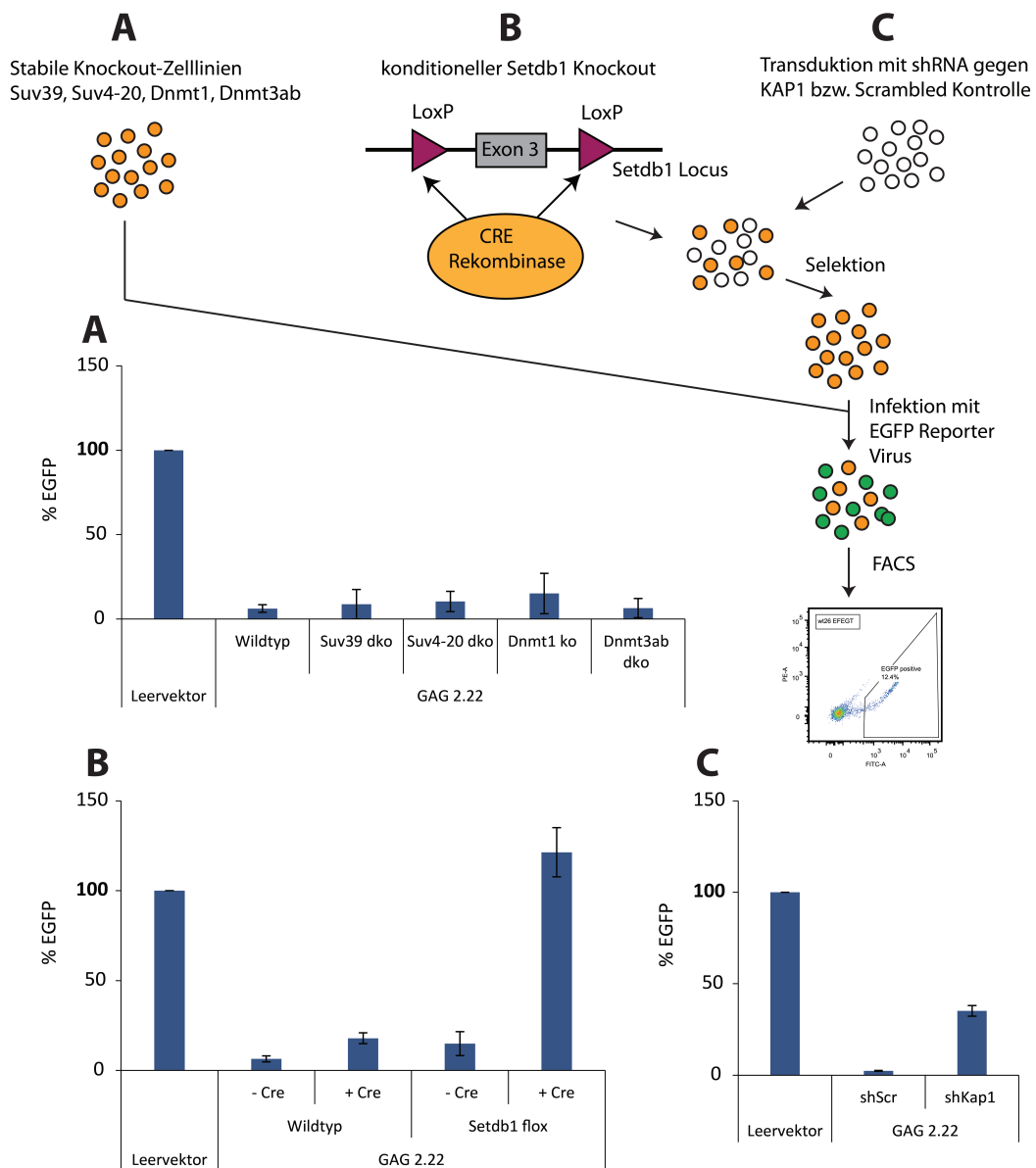


Abbildung 4.4: Die H3K9-Methyltransferase Setdb1 und das Korepressorprotein Kap1 sind essenziell für GAG 2.22-Silencing

A: Die Fähigkeit von mES-Zellen zur Rekrutierung repressiven Chromatins an GAG 2.22 wurde in verschiedenen Knockout-Zelllinien getestet. Der Knockout der H3K9-Methyltransferase Suv3-9, der H4K20-Methyltransferase Suv4-20 sowie der DNA-Methyltransferasen Dnmt1 und Dnmt3a/b führte zu keiner Beeinträchtigung der Repression im EGFP-Silencing-Assay. **B:** Nach konditionellem Knockout der H3K9-Methyltransferase Setdb1 kam es dagegen zu einer vollständigen Derepression. **C:** Embryonale Stammzellen der Maus wurden mit lentiviralen shRNAs gegen Kap1 oder eine Kontrollsequenz (Scrambled) transduziert. Im anschließend durchgeführten EGFP-Reporter-Assay kam es zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Repression in den Kap1-defizienten Zellen. Die Standardabweichungen sind jeweils durch Fehlerbalken angegeben.

2.22 hin untersucht. In allen vier Atrx-Knockout-Zelllinien zeigte sich die Fähigkeit zur Repression des EGFP-Reporters zwar grundsätzlich erhalten, die Silencing-Kinetik aber deutlich verlangsamt (siehe Abbildung 4.5). Bei den im Vergleich betrachteten Wildtyp-ES-Zellen fiel der Anteil EGFP-positiver Zellen bereits zwei Tage nach Transduktion mit dem Reporter deutlich unter 5% und ab dem dritten Tag nach Transduktion waren nahezu keine EGFP-positiven Zellen mehr nachweisbar. Die Atrx-defizienten Zellen hingegen zeigten zwei Tage nach Transduktion noch einen EGFP-positiven Anteil von rund 25%. 5% oder weniger wurden erst ab dem vierten Tag nach Transduktion erreicht. Insgesamt wurden beide Zellgruppen über einen Zeitraum von elf Tagen nach der Transduktion beobachtet. In diesem Zeitraum näherte sich das EGFP-Silencing in den Atrx-Knockout-Zellen den Wildtyp-Zellen immer mehr an, trotzdem blieb der Anteil EGFP-positiver Zellen geringfügig erhöht.

Atrx ließ sich damit als weiterer wichtiger Faktor für GAG 2.22-abhängiges Silencing des EGFP-Reporters identifizieren. Sein Verlust verhindert den Repressionsprozess allerdings nicht vollständig sondern führt lediglich zu einer deutlichen Verzögerung des Silencings.

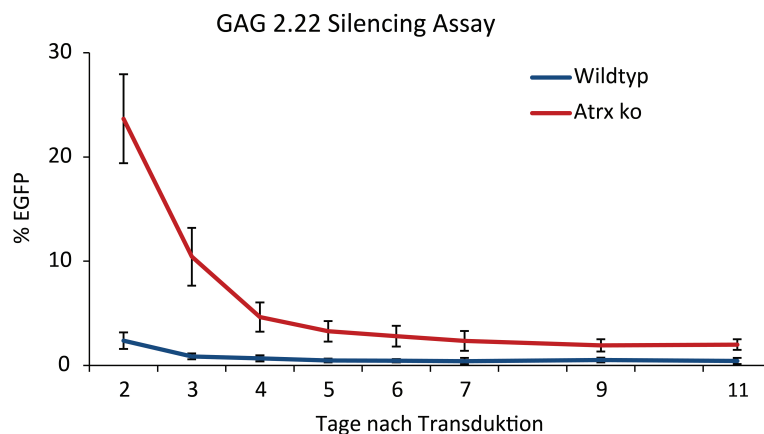


Abbildung 4.5: Die SNF2-Typ ATPase Atrx ist erforderlich für eine schnelle Etablierung der Repression an GAG 2.22

Atrx wurde als wichtiger Regulator für GAG 2.22-Silencing identifiziert [16, 17]. Um seine Rolle im Repressionsprozess genauer zu untersuchen, wurden Atrx-Knockout-Zellen (vier unabhängige Zelllinien) im EGFP-Reporter-Assay mit Wildtyp-Zellen (zwei unabhängige Zelllinien) verglichen. Die Zellen wurden nach der lentiviralen Transduktion mit dem GAG 2.22-EGFP-Reporter für insgesamt elf Tage beobachtet und die EGFP-Expression im Verhältnis zum Leervektor jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. In den Atrx-defizienten Zellen zeigte sich eine deutlich langsamere Etablierung der Repression. Die Standardabweichung wird durch Fehlerbalken angegeben.

4.5 Atrx interagiert mit Kap1 und Setdb1

Das GAG 2.22-Silencing eines benachbarten EGFP-Reporters konnte als Setdb1- und Kap1-abhängiger Mechanismus identifiziert werden (siehe Kapitel 4.3, Abbildung 4.4). Darüber hinaus war nachweisbar, dass der Silencing-Mechanismus an GAG 2.22 für seine schnelle Etablierung Atrx benötigt [16, 17] (siehe Abbildung 4.5). Daraus ergab sich die Frage, ob und falls ja welche Interaktionen zwischen den Faktoren Setdb1, Kap1 und Atrx im Rahmen der Repression stattfinden.

4.5.1 Reduzierte Aktivität von Setdb1 oder Kap1 führt zu einem zusätzlichen Verlust von Repressionsaktivität an GAG 2.22 in Atrx-Knockout-Zellen

Um eventuelle Interaktionen zwischen Atrx und Setdb1 oder Kap1 beim GAG 2.22-Silencing aufzudecken, wurde untersucht, wie Atrx-Knockout-Zellen sich im EGFP-Reporter-Assay verhalten, wenn durch zusätzlichen shRNA-Knockdown das Setdb1- oder Kap1-Level der Zellen reduziert ist. Vergleichsweise wurde die jeweilige Knockdown-Situation auch in Wildtyp-ES-Zellen getestet. Wie bereits in Kapitel 4.4 (siehe Abbildung 4.5) beschrieben, erreichen Wildtyp-ES-Zellen im EGFP-Reporter-Assay ohne zusätzlichen Knockdown bereits zwei Tage nach Transduktion eine nahezu vollständige Repression des Reporters. Bei den Atrx-Knockout-Zellen hingegen kann der Silencing-Prozess an GAG 2.22 nur stark verlangsamt ablaufen (siehe Abbildung 4.6 A).

Mittels lentiviraler Transduktion wurden shRNAs gegen Kap1, Setdb1 oder eine Scrambled-Kontrolle in Wildtyp-ES-Zellen und Atrx-Knockout-Zellen eingebracht und vier Tage später der Reporter-Assay mit den so behandelten Zellen begonnen. Die verbleibende EGFP-Expression relativ zum Leervektor wurde an den Tagen 2, 3, 4 und 5 nach Transduktion mit dem Reportervektor mittels FACS (siehe Kapitel 3.11) bestimmt. Durch quantitative PCR wurden am Tag 6 nach shRNA-Transduktion die Expressionslevel von Kap1 und Setdb1 in den Zellen bestimmt und damit die Effektivität des jeweiligen Knockdowns überprüft (siehe Abbildung 4.7 A).

Im Experiment nach Scrambled-Kontroll-Knockdown ergab sich keinerlei Unterschied zur Ausgangssituation ohne Knockdown. Auch hier fand in den Wildtyp-ES-Zellen eine rasche Repression des EGFP-Reporters an GAG 2.22 statt, während in Atrx-Knockout-Zellen eine deutlich verzögerte Silencing-Kinetik zu beobachten war (siehe Abbildung 4.6 B).

Wurde allerdings die Kap1-Expression in den getesteten Zellen mittels shRNA-Knockdown reduziert, so zeigten sowohl die Wildtyp- als auch die Atrx-KO-Zellen starke Beeinträchtigungen beim Silencing des EGFP-Reporters (siehe Abbildung 4.6 C). Hier konnte erneut die Kap1-Abhängigkeit des Silencing-Mechanismus am GAG 2.22-Element nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3). Darüber hinaus zeigte sich, dass Atrx-defiziente

Zellen durch den gleichen Kap1-Knockdown in ihrer Silencing-Fähigkeit weitaus schwerer beeinträchtigt waren als Wildtyp-ES-Zellen.

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Situation nach Setdb1-Knockdown. Es ist zu beachten, dass es sich hier im Gegensatz zu Kapitel 4.3 nicht um komplett Setdb1-defiziente Zellen handelte. Stattdessen erfolgte lediglich ein milder shRNA-Knockdown von Setdb1. Die daraus folgende leichte Reduktion des Setdb1-Levels konnten Wildtyp-Zellen im Reporter-Assay weitgehend kompensieren. Bei ihnen war nur eine geringfügige Derepression des EGFP-Reporters nachweisbar. In Atrx-Knockout-Zellen hingegen führte bereits dieser schwache Knockdown von Setdb1 zu einer erheblichen Verschlechterung des Silencings an GAG 2.22 (siehe Abbildung 4.6 D).

Zusammengefasst zeigen Atrx-KO-Zellen sowohl nach Kap1- als auch nach Setdb1-Knockdown eine deutlich stärkere Derepression im GAG 2.22-Reporter-Assay als gleich behandelte Wildtyp-ES-Zellen. In Atrx-defizienten Zellen kann eine erniedrigte Konzentration von Kap1 oder Setdb1 also schlechter kompensiert werden. Atrx scheint somit in der Lage zu sein, die Effizienz der Kap1- und Setdb1-abhängigen Repressionsvorgänge am GAG 2.22-Element in ES-Zellen erheblich zu steigern.

4.5.2 Kombiniertes Verlust der Aktivität von Atrx und Kap1 führt zur Hochregulation endogener IAP-Transkripte

Atrx konnte in vitro als wichtiger Katalysator für die schnelle und effiziente Etablierung Kap1- und Setdb1-abhängigen Silencings am GAG 2.22-Element identifiziert werden (siehe Kapitel 4.4, Abbildung 4.5, Kapitel 4.5.1, Abbildung 4.6). Außerdem war aus der Literatur bekannt, dass sowohl Kap1- als auch Setdb1-Defizienz zu einer starken Derepression endogener retroviraler Elemente einschließlich der IAP-Retrotransposons in embryonalen Stammzellen der Maus führt [18, 19]. Unklar war allerdings, ob auch beim Fehlen von Atrx eine Derepression endogener IAP-Elemente erfolgt.

Deshalb wurde die Expression endogener IAP-Elemente in Atrx-Knockout-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-mES-Zellen mittels qPCR analysiert. Zusätzlich erfolgte in den getesteten Zellen ein shRNA-Knockdown von Kap1, Setdb1 oder einer Scrambled-Kontrolle. Die Effektivität des jeweiligen Knockdowns wurde mittels quantitativer PCR überprüft (siehe Abbildung 4.7 A). So konnte sichergestellt werden, dass durch den Knockdown jeweils eine gleich starke Reduktion des Kap1-/ Setdb1-Levels in Wildtyp- und Atrx-Knockout-Zellen erreicht wurde.

In der Kontrollsituation nach Scrambled-Knockdown unterschied sich die IAP-Expression in Atrx-KO-Zellen und Wildtyp-mES-Zellen nicht voneinander (siehe Abbildung 4.7 B). Isolierter Verlust von Atrx führt also noch nicht zu einer Derepression endogener IAP-Elemente. Wurde jedoch zusätzlich die Expression von Kap1 mittels shRNA-Knockdown gehemmt, so ergab sich eine signifikante Steigerung der Expression endogener IAP-

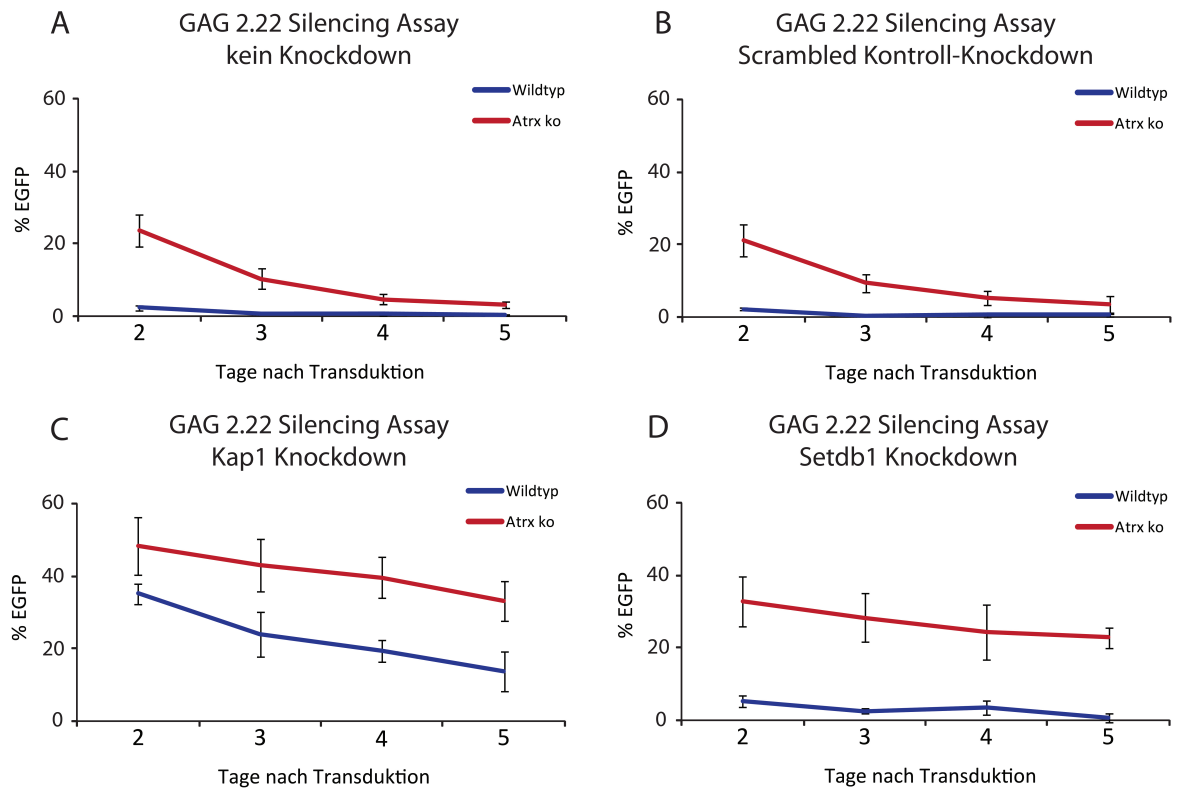


Abbildung 4.6: Reduzierte Aktivität von Setdb1 bzw. Kap1 führt zu einem zusätzlichen Verlust von Repressionsaktivität an GAG 2.22 in Atrx-Knockout-Zellen

Es wurde jeweils ein EGFP-Reporter-Assay mit Atrx-KO-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-mES-Zellen durchgeführt und die verbliebene EGFP-Expression relativ zum Leervektor mehrmals im Zeitverlauf bestimmt. Die Standardabweichung wird durch Fehlerbalken angegeben. **A:** Repressionsaktivität ohne zusätzlichen Knockdown. Deutlich verlangsamte Etablierung der Repression in Atrx-Knockout-Zellen. **B:** Die Repressionsaktivität nach Scrambled-Kontroll-Knockdown unterscheidet sich nicht von der Situation ohne Knockdown. **C:** Die Repressionsaktivität ist nach Kap1-Knockdown in beiden Zellpopulationen stark reduziert. Die Atrx-KO-Zellen zeigen eine deutlich stärkere Beeinträchtigung als die Wildtyp-Zellen. **D:** Die Repressionsaktivität nach Setdb1-Knockdown zeigt die stärkste Diskrepanz zwischen Atrx-KO-Zellen und Wildtyp-mES.

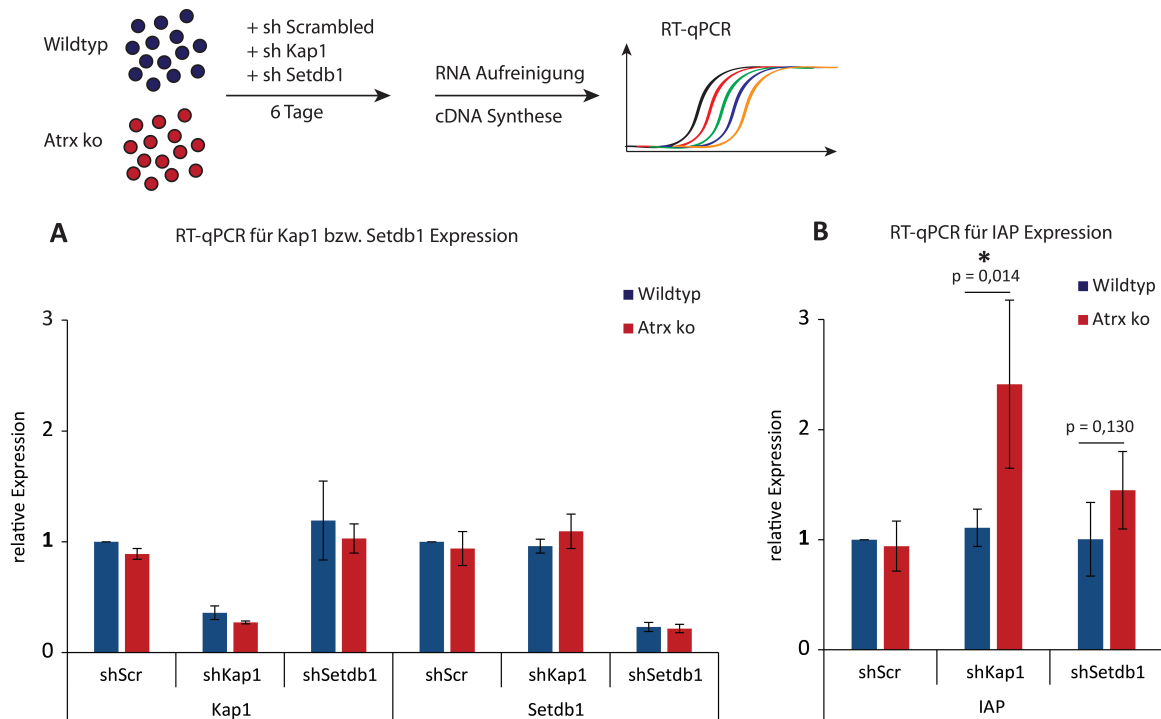


Abbildung 4.7: Kombiniertes Verlust der Aktivität von Atrx und Kap1 führt zur Hochregulation endogener IAP-Transkripte

Mittels quantitativer PCR wurden die Level an endogenen IAP-Transkripten in Wildtyp-Zellen und Atrx-Knockout-Zellen verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Knockdown von Kap1, Setdb1 oder einer Scrambled-Kontrolle. Die Expressionslevel sind jeweils relativ zum Scrambled-KO-Wildtyp angegeben. **A** zeigt die Effektivität des jeweiligen Knockdowns. In **B** sind die IAP-Expressionslevel dargestellt. Die IAP-Expression unterscheidet sich in Wildtyp-Zellen sowohl nach Kap1- als auch nach Setdb1-Knockdown nicht von der Kontrollsituation. In Atrx-Knockout-Zellen dagegen führt der Kap1-Knockdown zu einer signifikanten Hochregulation der endogenen IAP-Transkripte. Nach Setdb1-Knockdown zeigt sich in Atrx-Knockout-Zellen ebenfalls eine Tendenz zur IAP-Hochregulation, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

Elemente in Atrx-defizienten Zellen gegenüber dem Wildtyp. Der Mangel an Kap1 konnte in den Wildtyp-Zellen kompensiert werden, sodass es zu keiner Hochregulation der IAP-Transkripte kam. In Atrx-Knockout-Zellen hingegen zeigte sich die IAP-Expression mehr als verdoppelt. Das ansonsten gleiche Experiment wurde auch mit Knockdown des Faktors Setdb1 durchgeführt. Die IAP-Expression in Wildtyp-ES-Zellen blieb auch in diesem Fall unverändert. Atrx-defiziente Zellen ließen nach Setdb1-Knockdown zwar eine Tendenz zur Hochregulation der IAP-Transkripte erkennen, welche jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 4.7 B).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Faktors Atrx allein noch keine Deregulation endogener IAP-Elemente in mES-Zellen zur Folge hat. Auf eine Reduktion des Kap1-Levels durch shRNA-Knockdown reagierten Atrx-defiziente Zellen allerdings weitaus empfindlicher als der Wildtyp mit einer verstärkten IAP-Expression. Atrx scheint somit die Effizienz des Kap1-abhängigen Silencings endogener IAP-Retrotransposons zu steigern, bei ausreichendem Kap1-Level für die Repression aber nicht zwingend erforderlich zu sein.

5 Diskussion

5.1 IAP-Retrotransposons enthalten ein 160 bp langes Sequenzelement, das in der Lage ist, Silencing zu rekrutieren: GAG 2.22

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die UTR-Region von IAP-Retrotransposons der Maus in der Lage ist, einen benachbarten Promoter im lentiviralen Reporter-Assay stillzulegen [19]. Dieses Ergebnis konnte reproduziert werden; darüber hinaus ließ sich eine deutlich stärkere Silencing-Aktivität für das GAG-Element der IAP-Retrotransposons nachweisen [16, 17] (siehe Abbildung 4.1). Innerhalb der GAG-Sequenz konnte ein 160 bp langes Element identifiziert werden, welches ausreicht, um die volle Repressionsaktivität auf einen benachbarten Promoter auszuüben (siehe Abbildung 4.1).

Jeder Versuch, den für die Rekrutierung der Repression verantwortlichen Bereich in der GAG-Region noch stärker einzugrenzen, resultierte in einem teilweisen oder vollständigen Verlust der Silencing-Aktivität (Daten nicht abgebildet). Unter der Annahme, dass die GAG 2.22-Sequenz von einem DNA-Bindeprotein erkannt werden muss, um den Silencing-Prozess in Gang zu setzen, fällt die ungewöhnlich große Länge der Bindestequequenz von 160 bp auf. Eine mögliche Erklärung ist, dass an GAG 2.22 nicht nur ein, sondern mehrere Faktoren binden, deren jeweilige Bindestepositionen sich in der 160 bp-Sequenz verteilt befinden. Da viele DNA-Erkennungsfaktoren an palindromische Sequenzen binden, lag es nahe, GAG 2.22 auf derartige Bereiche hin zu untersuchen. Dabei konnten allerdings nur wenige und sehr kurze Palindrome identifiziert werden (siehe Abbildung 5.1 A). Trotzdem ist es denkbar, dass ein Dimer von DNA-Bindeproteinen auch an einen nicht hundertprozentig symmetrischen Bereich des DNA-Stranges binden kann. Um solche zumindest teilweise palindromischen Bereiche aufzudecken, wurden das GAG 2.22-Element und seine reverse komplementäre Sequenz mit Hilfe der YASS-Alignment-Software miteinander verglichen [173]. Dabei konnten zwei unabhängige Bereiche innerhalb von GAG 2.22 identifiziert werden, welche zumindest eine teilweise Symmetrie zwischen den beiden DNA-Strängen aufweisen (siehe Abbildung 5.1 B). Hierbei handelt es sich erstens um die Nukleotide 8 - 40 und zweitens um die Nukleotide 95 - 142. Diese beiden hypothetischen Bindestequequenzen könnten von jeweils einem Transkriptionsfaktor-Dimer erkannt und damit der Silencing-Prozess an GAG 2.22 initiiert werden (siehe Abbildung 5.1 C).

Die Modellvorstellung zweier DNA-Bindestellen mit jeweils einem unabhängigen Erkennungsfaktor wirft die Frage auf, welchen Selektionsvorteil diese erhöhte Komplexität bieten könnte, sodass sie sich im Laufe der Evolution gegen einfachere Mechanismen durchsetzen konnte. Zum einen kann ein Erkennungsmechanismus mit zwei erforderlichen Bindefaktoren eine sehr hohe Spezifität sicherstellen. Da der Effekt einer erfolgrei-

A: Palindrome in GAG 2.22

GAG 2.22

cgtaaaacggaaccaatgctaattttaccttgg**tgca**gtagacaggctcg**ccggc**atggcactaactcctgctgactg
gcaaacgatttgtaaaagccgctctcc**ctag**tatgggcaaatat**at**ggaa**tg**gag**agc**gctttgg**catg**a**agct**gcacaag

B: Symmetrische Sequenzen in GAG 2.22

GAG 2.22

cgtaaaacggaaccaatgctaattttaccttgg**tgca**gtagacaggctcgccggcatggcactaactcctgctgactg
gcaaacgatttgtaaaagccgctctcc**ctag**tatgggcaaatat**at**ggaa**tg**gag**agc**gctttgg**catg**a**agct**gcacaag

GAG 2.22: 5' - cgtaaa**acggaaccaatgctaattttaccttgg**tgca**gtaga**... -3'
Reverse Complement: 5' - ...tcta**actgcaccaaggtaaaattagcat**ttggtccg**tatttacg** -3'

GAG 2.22: 5' - ... gattgtaa**agcgcgtctccctag**tatgggcaaatat**at**ggaa**tg**gag**agc**gctttgg**catg**a... -3'
Reverse Complement: 5' - ... ttcattgca**aaagcgcgtctccattcc**atatattgccc**atactagg**gag**agc**gcttttacaatc... -3'

C: Hypothetische Erkennung von GAG 2.22 durch zwei Bindefaktoren

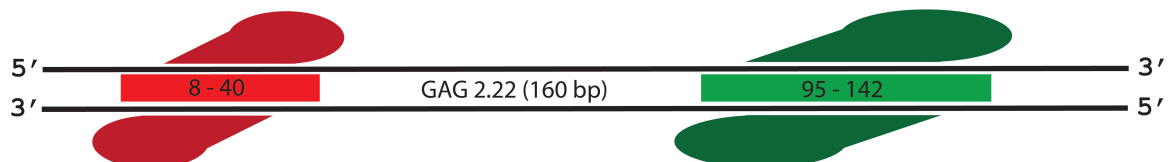


Abbildung 5.1: Analyse der GAG 2.22-Sequenz und Entwicklung eines hypothetischen Erkennungsmodells

A: Nur wenige kurze Palindrom-Sequenzen finden sich im GAG-2.22 Element. **B:** Der Vergleich der GAG 2.22-Sequenz mit ihrem reversen Komplement mittels YASS-Alignment-Software [173] zeigt zwei teilweise symmetrische bzw. palindromische Bereiche, die mögliche Bindestellen für DNA-Erkennungsfaktoren darstellen. **C:** Im hypothetischen Erkennungsmodell binden zwei Transkriptionsfaktoren jeweils als Dimer an einen der beiden in **B** entdeckten Sequenzbereiche.

chen Erkennung von GAG 2.22 eine annähernd vollkommene Repression ist, könnte der Mechanismus schwerwiegende Folgen haben, sollte er an falscher Stelle ablaufen. Durch die Notwendigkeit zweier unabhängiger Bindungsereignisse kann diese Gefahr minimiert werden. Zum anderen ist es naheliegend, dass der Silencing-Mechanismus durch Verteilung der Initiation auf zwei Bindestellen robuster gegenüber einzelnen Punktmutationen im GAG 2.22 Element wird. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse in Kapitel 4.2. Dort wurde gezeigt, dass Punktmutationen die Repressionsvorgänge an GAG 2.22 zwar deutlich beeinträchtigen können, jedoch kaum zu einer kompletten Derepression führen (siehe Abbildung 4.3).

5.2 GAG 2.22-Silencing ist ein sequenzspezifischer Mechanismus

Die Silencing-Vorgänge an GAG 2.22 können durch einzelne Punktmutationen in der GAG 2.22-Sequenz deutlich beeinträchtigt werden (siehe Kapitel 4.2, Abbildung 4.3). Diese Sequenzspezifität ist ein weiteres Indiz dafür, dass die GAG 2.22-Sequenz vermutlich durch bestimmte DNA-Bindeproteine erkannt werden muss, um die Etablierung repressiven Chromatins zu initiieren. Durch Mutation einzelner Basen könnte die Bindung jener Faktoren erschwert bzw. verhindert werden, wodurch die in Kapitel 4.2 gezeigte Derepression zu erklären wäre.

Es konnten drei Positionen innerhalb von GAG 2.22 ermittelt werden, an denen im EGFP-Reporter-Assay zur Derepression führende Mutationen gehäuft zu finden waren (siehe Abbildung 4.3). Interessanterweise befindet sich nur eine der drei identifizierten kritischen Basen innerhalb einer der beiden in Kapitel 5.1 beschriebenen möglichen Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Eine zweite grenzt direkt an die gleiche hypothetische Erkennungssequenz an, während die dritte mitten im Abstandshalter zwischen den beiden potentiellen Bindestellen liegt (siehe Abbildung 5.2 A). Für diese Mutation im Zwischenstück zeigt sich im Vergleich mit den beiden anderen sogar eine Tendenz zu besonders ausgeprägter Derepression. Die vermutete Bindung zweier Transkriptionsfaktoren an die im vorigen Kapitel ermittelten Bereiche in GAG 2.22 kann also nicht allein verantwortlich sein für die Initiation der Repression.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den hypothetischen Bindebereichen und den im Experiment nachgewiesenen kritischen Mutationen wäre, dass das Silencing an GAG 2.22 über einen komplett anderen Mechanismus initiiert wird als bisher vermutet. Für Pflanzen sind zum Beispiel komplexe RNA-abhängige Mechanismen zum Silencing von Retrotransposons beschrieben [174]. Es wäre also auch hier denkbar, dass die GAG 2.22-Sequenz erst dann zur Rekrutierung epigenetischer Repression führt, wenn sie in RNA transkribiert wird. So ließe sich auch gleichzeitig erklären, dass es in DNA-Pulldown-Experimenten bisher nicht möglich war spezifische repressive Binfaktoren für GAG 2.22 zu identifizieren (Experimente durchgeführt von Dr. Falk Butter in Kooperation mit Dr.

Dennis Sadic [17, 175]). Gegen einen RNA-abhängigen Mechanismus spricht allerdings, dass sowohl die IAP-UTR-Region als auch das IAP-GAG-Element auch in Antisense-Richtung kloniert noch in der Lage sind, einen benachbarten Promoter stillzulegen [17, 19].

Angenommen, dass zwei unabhängige DNA-Bindefaktoren für die Erkennung von GAG 2.22 erforderlich sind, dann würde zwischen diesen beiden Faktoren höchstwahrscheinlich eine Interaktion stattfinden. Dadurch käme es zu einer Veränderung der umgebenden DNA-Konformation, die dann den Aufbau eines Repressionskomplexes mit weiteren Faktoren ermöglichen könnte (siehe Abbildung 5.2 B). Da in den durchgeführten DNA-Pulldown-Experimenten mit linearer, immobilisierter DNA gearbeitet wurde, wäre die Ausprägung solcher übergeordneter Strukturen hier kaum möglich gewesen. Dies liefert eine weitere denkbare Erklärung dafür, dass mit dieser Methode kein spezifischer Bindefaktor für GAG 2.22 gefunden werden konnte. In einem solchen komplexen Erkennungsmodell, welches unter anderem auf einer Konformationsänderung des DNA-Stranges beruht, würde nicht nur den beiden Transkriptionsfaktor-Bindepositionen, sondern auch den 54 Basenpaaren dazwischen eine wichtige Bedeutung zukommen. Denn nur wenn Länge und Beschaffenheit des Abstandes zwischen den beiden Bindungselementen genau stimmten, könnte die korrekte Konformation entstehen. Mutationen in diesem Zwischenraum könnten den Erkennungsmechanismus stark beeinträchtigen, wenn sie das Verhalten des DNA-Stranges bei der Bildung einer übergeordneten Struktur verändern. Die Mutation an Position 77 könnte bei diesem Vorgang eine entscheidende Rolle spielen und deshalb eine so starke Beeinträchtigung der Repression verursachen.

Anhand der vorliegenden Daten erscheint die Bindung zweier sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren an GAG 2.22 als wahrscheinlichster Erkennungsmechanismus. Zur Annäherung an den tatsächlichen Ablauf im Detail könnten nun gezielt Veränderungen in Sequenz und Länge des Spacers sowie innerhalb der beiden potentiellen Bindestellen eingeführt und das Ergebnis erneut im EGFP-Reporter-Assay getestet werden. Um gleichzeitig auch die beiden notwendigen Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, wäre es denkbar, die DNA-Pulldowns mit Concatemeren der einzelnen hypothetischen Bindeelemente zu wiederholen und so die Affinität für die zu isolierenden Faktoren zu verbessern.

5.3 GAG 2.22-Silencing ist ein Kap1- und Setdb1-abhängiger Mechanismus

Kap1 ist bekannt als wichtiger epigenetischer Regulator, der durch KRAB-Zinkfinger-Proteine rekrutiert wird [67, 76]. Sein Knockdown führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung der GAG 2.22-abhängigen Repression im Reporter-Assay (siehe Abbildung 4.4 C). Neben ihrer engen Verbindung zu Kap1 zeigt die Familie der KRAB-Zinkfinger-Proteine eine Koevolution mit endogenen Retroviren [168, 169]. Es ist also sehr wahrschein-

A: Vergleich der beiden hypothetischen Bindesites (rot/ grün) in GAG 2.22 mit für die Repressionsaktivität kritischen Mutationen (blau)

GAG 2.22

```

cgtaaatacggaaccaatgctaattttaccttgggtgcagtttagacaggctcgccggcatggcactaactcctgctgactg
gcaaacgattgtaaaagccgctctccctagtagtgggcaataatatggaaatggagagcgcttggcatgaagctgcacaag

```

77/160bp ↓

94/160bp ↑

118-119/160bp ↑

B: Modellvorstellung einer Interaktion zwischen den beiden Bindefaktoren an GAG 2.22

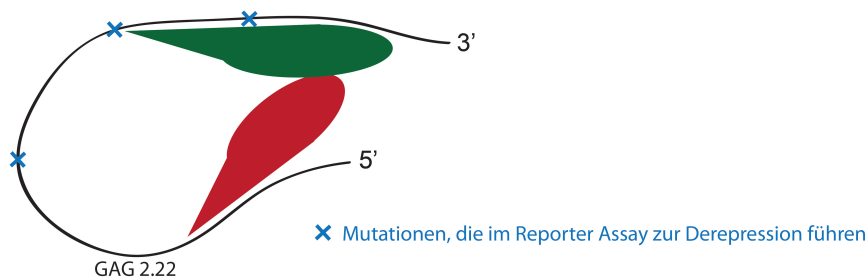


Abbildung 5.2: Vergleich der beiden hypothetischen Bindebereiche mit für die Repressionsaktivität kritischen Mutationen

A: Nur eine der gefundenen Mutationen, welche die Silencing-Fähigkeit von GAG 2.22 beeinträchtigen, liegt in einem der vermuteten Transkriptionsfaktor-Bindebereiche. Eine weitere befindet sich direkt angrenzend, während die dritte mitten im Abstand zwischen den beiden hypothetischen Bindeelementen liegt.

B: Eine mögliche Erklärung für die große Relevanz der Mutation im Spacer-Bereich wäre die Notwendigkeit einer Konformationsänderung der DNA beim Erkennungsmechanismus von GAG 2.22, welche durch die Mutation beeinträchtigt wird.

lich, dass auch für GAG 2.22-abhängiges Silencing von IAP-Elementen in embryonalen Stammzellen der Maus KRAB-Zinkfinger-Proteine verantwortlich sind. Viele dieser Proteine werden spezifisch in mES-Zellen exprimiert [59]. Ein möglicher Ansatz zur Ermittlung des oder der GAG 2.22 erkennenden Protein(e) wäre es demnach, aus der Gruppe dieser ES-Zell-spezifischen KRAB-Domänen-Proteine verschiedene Kandidaten im Hinblick auf ihre Fähigkeit zum GAG 2.22-Silencing zu untersuchen.

Neben Kap1 konnte auch Setdb1 als erforderlicher Faktor für die Repressionsvorgänge an GAG 2.22 identifiziert werden (siehe Abbildung 4.4 B). Setdb1 ist bekannt als H3K9-Methyltransferase und wird mittels Sumoylierung von Kap1 rekrutiert [72]. Darüber hinaus ist sowohl für Kap1 als auch für Setdb1 eine wichtige Rolle als Regulator endogener IAP-Elemente und anderer Retrotransposons in mES-Zellen nachgewiesen [18, 19, 98]. Sehr wahrscheinlich wird also Kap1 über ein bzw. mehrere KRAB-Zinkfinger-Protein(e) an GAG 2.22 rekrutiert, wodurch anschließend Setdb1 gebunden wird und mittels H3K9-Methylierung zur Etablierung repressiven Chromatins beiträgt. Aus der Literatur geht hervor, dass Setdb1 zur Trimethylierung von H3K9 den Kofaktor mAM (auch bekannt als MCAF1 oder Atf7ip) benötigt [95]. Mit Hilfe des in dieser Arbeit verwendeten Reportersystems könnte nun in einem nächsten Schritt die Frage geklärt werden, ob mAM ebenfalls ein erforderlicher Faktor für GAG 2.22-Silencing ist.

Die wichtigste Methode zur Stilllegung endogener Retroviren in der Embryonalentwicklung ab dem Postimplantationsstadium ist die DNA-Methylierung, wohingegen dieser Mechanismus zur Repression von IAP-Elementen in mES-Zellen nicht erforderlich ist [79, 96, 163, 166, 167] (siehe Kapitel 2.2.1). Damit konsistent kann GAG 2.22-abhängiges Silencing auch in Dnmt1-Knockout- sowie Dnmt3a/b-Doppelknockout-ES-Zellen uneinträchtigt ablaufen (siehe Abbildung 4.4 A). Kap1 dagegen ist nicht nur erforderlich für die Stilllegung endogener Retroviren im ES-Zell-Stadium, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von DNA-Methylierungsmustern an endogenen retroviralen Elementen sowie für die Zfp57-abhängige DNA-Methylierung bei den Imprinting-Vorgängen der frühen Embryogenese [78, 79, 96, 176]. Die Rekrutierung von Kap1 an IAP-Retrotransposons ist also höchstwahrscheinlich nicht nur relevant für deren Repression in der frühen Embryonalentwicklung, sondern stellt auch die nötigen Weichen für die Etablierung der DNA-Methylierung, die in späteren Entwicklungsstadien dann die Unterdrückung der IAP-Elemente gewährleistet [177].

Ähnlich wie die hier untersuchte GAG 2.22-Sequenz ist auch die UTR-Region von IAP-Retrotransposons in der Lage, Kap1- und Setdb1-abhängige Repression und de novo Methylierung der DNA zu initiieren [19, 96]. Im Vergleich zum bereits beschriebenen UTR-Element konnten in dieser Arbeit an GAG 2.22 sehr viel stärkere Silencing-Effekte im Reporter-Assay beobachtet werden (siehe Abbildung 4.1). Der GAG 2.22-abhängige Repressionsmechanismus stellt also sehr wahrscheinlich den vorherrschenden Mechanismus der Stilllegung von IAP-Retrotransposons in embryonalen Mauszellen dar. Dazu passend handelt es sich beim GAG 2.22-Element um einen Teil der IAP-GAG-Region, die

das virale Capsid-Protein kodiert und evolutionär weitaus stärker konserviert ist als das UTR-Element [178]. Die Tatsache, dass das GAG 2.22-Element einen relativ großen Teil eines wichtigen, kodierenden Bereichs des IAP-Genes umfasst, könnte es wirkungsvoll vor Mutationen bewahren und so die Funktionalität dieses sequenzspezifischen Mechanismus erhalten.

5.4 Atrx katalysiert GAG 2.22-Silencing und interagiert dabei mit Kap1 und Setdb1

Die SNF2-Typ ATPase Atrx ist für eine schnelle Etablierung des Silencings an GAG 2.22 erforderlich (siehe Abbildung 4.5). In den getesteten Atrx-KO-Zellen war die grundsätzliche Fähigkeit zur Repression des Reporters zwar erhalten, der Stilllegungs-Prozess lief aber stark verzögert ab. Atrx scheint also die Fähigkeit zu haben, heterochromatisches Silencing erheblich zu beschleunigen.

Bezüglich der Rekrutierung von Atrx ist bekannt, dass es mit Hilfe seiner ADD-Domäne an unmodifiziertes H3K4 in Kombination mit di- oder trimethyliertem H3K9 bindet [114–116]. Zusätzlich besitzt Atrx ein HP1-Interaktionsmotiv, worüber ebenfalls eine Rekrutierung an heterochromatische Regionen stattfinden kann [115, 116]. Darüber hinaus ist nachgewiesen, dass Atrx mit Daxx interagiert und beide gemeinsam einen ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplex bilden [124, 179]. Es wäre demnach denkbar, dass die beiden Proteine auch in diesem Fall als stabiler Komplex an ihren Zielort rekrutiert werden. Dazu passend kommt es in Daxx-Knockout-Zellen zur gleichen Verzögerung des Reporter-Silencings an GAG 2.22 wie bei Atrx-Defizienz [17]. Genauso könnten hier aber auch die erst seit Kurzem bekannt werdenden Atrx-unabhängigen Funktionen von Daxx eine Rolle spielen. Im Komplex mit unter anderem Kap1 und Setdb1 scheint Daxx auch ohne direkte Interaktion mit Atrx einen wichtigen Beitrag zur Repression endogener Retroviren zu leisten [126]. In Rescue-Experimenten mit Daxx-Knockout-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass das Sumo-Interaktionsmotiv von Daxx intakt sein muss, damit es seine beschleunigende Wirkung auf die Repression entfalten kann [17]. Dies legt nahe, dass Daxx bzw. der Komplex aus Atrx und Daxx über einen Sumo-abhängigen Mechanismus an GAG 2.22 rekrutiert wird.

Im *in vitro* Experiment sorgte Atrx zwar für eine schnellere Etablierung der Repression des Reporters, war insgesamt aber nicht zwingend für den Silencing-Vorgang erforderlich (siehe Abbildung 4.5). Daraus ergibt sich die Theorie, dass Atrx auch *in vivo* nur für die Initiation des Silencings an IAP-Elementen, nicht jedoch für die Aufrechterhaltung des reprimierten Zustandes von Bedeutung ist. Damit konsistent ergab sich in Atrx-Knockout-Zellen keine Hochregulation endogener IAP-Transkripte im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 4.7). Es wäre allerdings auch möglich, dass Atrx zwar eine Aufgabe in der Aufrechterhaltung des repressiven Chromatins hat, sein Fehlen aber

durch die übrige Heterochromatin-Maschinerie ausgeglichen werden kann. Denkbar wäre hier beispielsweise eine gesteigerte Aktivität von Setdb1 und/ oder Kap1. Dafür spricht, dass in Knockdown-Experimenten die Reduktion des Kap1- oder des Setdb1-Levels in Atrx-defizienten Zellen zu einer deutlich stärkeren Beeinträchtigung des Reporter-Silencings führte als in Wildtyp-ES-Zellen (siehe Abbildung 4.6). Auch die endogenen IAP-Transkripte zeigten im Gegensatz zur reinen Atrx-Knockout-Situation eine Hochregulation, wenn zusätzlich das Kap1-Level reduziert wurde (siehe Abbildung 4.7).

Insgesamt ergibt sich für Atrx eine Heterochromatin-stabilisierende Funktion, die insbesondere bei der Neuetablierung und bei Beeinträchtigungen des Heterochromatin-Status von Bedeutung ist [158]. In vivo ist die schnelle Reetablierung von Heterochromatin zum Beispiel in folgender Situation erforderlich: Es gibt IAP-Retrotransposons, die sich zwischen zwei Exons eines transkribierten Gens befinden [1, 2]. Bei der Transkription eines solchen Gens muss die RNA-Polymerase das IAP-Element also mit durchlaufen, wozu der heterochromatische Status dieses Bereiches kurzfristig aufgelöst werden muss. Um anschließend die Repression des IAP-Elementes schnellstmöglich zu reetablieren könnte die katalysierende Funktion von Atrx erforderlich sein.

5.5 Zusammenfassendes Modell des möglichen Ablaufes der Repressionsvorgänge an GAG 2.22

Die in den bisherigen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse lassen sich vor dem Hintergrund der Literatur zusammenfassen zu einer Modellvorstellung über den Ablauf der Repressionsvorgänge an GAG 2.22, die zur Stilllegung von IAP-Retrotransposons führen. Zur übersichtlicheren Darstellung wird der Vorgang in drei Schritte unterteilt: 1. Die Erkennung der GAG 2.22-Sequenz, 2. Die Initiationsphase der Repression und 3. die Stabilisierung des reprimierten Zustandes (siehe Abbildung 5.3).

Im dargestellten Modell startet die Stilllegung eines neu integrierten IAP-Retrotransposons mit der Erkennung der GAG 2.22-Sequenz durch einen bzw. mehrere sequenzspezifisch bindende(n) Transkriptionsfaktor(en); vermutlich handelt es sich um ein bzw. mehrere KRAB-Zinkfinger-Protein(e) (siehe Kapitel 5.3). Eine derartige Bindung ist zusätzlich zu GAG 2.22 auch an anderen Bereichen des IAP-Retrotransposons denkbar; beispielsweise an der UTR-Region, die im Reporter-Assay ebenfalls in der Lage war, repressives Chromatin zu rekrutieren (siehe Abbildung 4.1).

Die Initiationsphase beginnt im vorliegenden Modell mit der Bindung von Kap1 an die KRAB-Domäne eines hypothetischen Zinkfinger-Proteins. An Kap1 wiederum bindet das Adaptermolekül HP1 und die intramolekulare Sumoylierung der Bromodomäne von Kap1 sorgt für die Rekrutierung der H3K9-Methyltransferase Setdb1 (siehe Abbildung 2.2). Diese katalysiert zunächst eine H3K9-Monomethylierung, worauf aufbauend

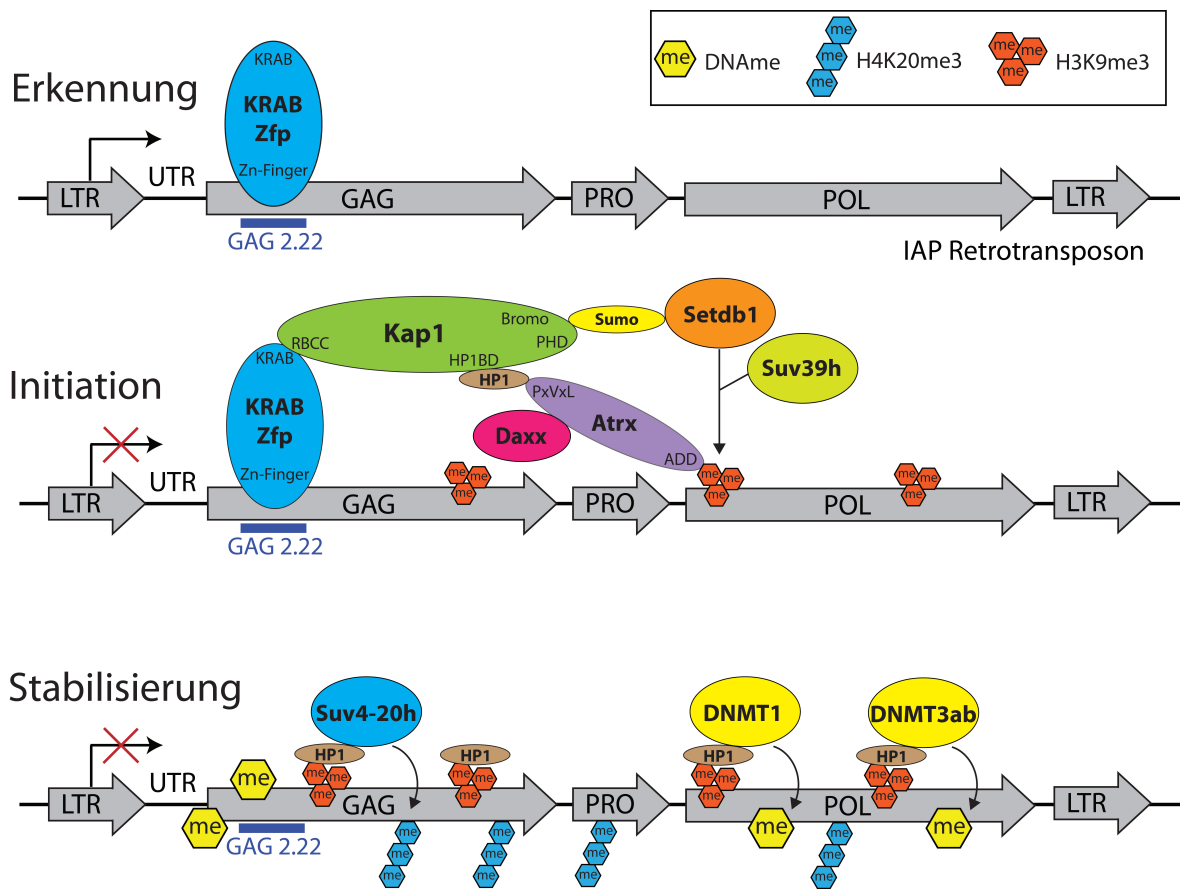


Abbildung 5.3: Zusammenfassendes Modell des möglichen Ablaufes der Repressionsvorgänge an GAG 2.22

Erkennung: Ein bzw. mehrere KRAB-Zinkfinger-Proteine binden an GAG 2.22.

Initiation: Kap1 bindet an die KRAB-Domäne des Zinkfinger-Proteins und rekrutiert das Adaptermolekül HP1. Außerdem erfolgt eine intramolekulare Sumoylierung der Bromodomäne von Kap1 zur Rekrutierung der H3K9-Methyltransferase Setdb1. Durch Setdb1 entsteht zunächst eine Monomethylierung von H3K9. Darauf aufbauend kann die Histon-Methyltransferase Suv3-9h Trimethyl-H3K9 generieren. Für den Atrx/Daxx-Komplex sind in diesem Zusammenhang verschiedene Rekrutierungsmechanismen denkbar. Atrx kann über seine N-terminale ADD-Domäne an H3K9me3 gebunden werden oder über sein PxVxL-Motiv an Kap1-assoziiertes HP1 rekrutiert werden. Die Daxx-Untereinheit kann über ihr C-terminales Sumo-interaction-motif an autosumoyliertes Kap1 binden.

Stabilisierung: Nach der Etablierung von H3K9me3 werden weitere Faktoren wie Dnmts und Suv4-20h mit Hilfe des Adaptermoleküls HP1 rekrutiert. Die durch sie eingeführten Modifikationen sind allerdings höchstwahrscheinlich nicht zwingend erforderlich für heterochromatisches Silencing in ES-Zellen der Maus.

die Histon-Methyltransferase Suv3-9h Trimethyl-H3K9 generieren kann [51]. Für den Atrx/Daxx-Komplex sind nun verschiedene Rekrutierungsmechanismen denkbar. Es ist bekannt, dass Atrx über seine N-terminale ADD-Domäne an H3K9me3 gebunden wird [117]. Zusätzlich besitzt Atrx aber auch ein PxVxL-Motiv, über das es mit dem an Kap1 gebundenen HP1 interagieren könnte [118]. Alternativ könnte die Interaktion aber auch über die Daxx-Untereinheit des Komplexes hergestellt werden, indem sie über ihr C-terminales Sumo-interaction-motif an autosumoyliertes Kap1 gebunden wird [180, 181]. Es ist nachgewiesen, dass in Daxx-Knockout-ES-Zellen die gleiche Verlangsamung der Repressionskinetik an GAG 2.22 auftritt wie beim Fehlen von Atrx [17]. In Rescue-Experimenten war die Repressionsgeschwindigkeit komplett wiederherstellbar mit Hilfe von Wildtyp-Daxx, nicht jedoch mit einer Daxx-Mutante ohne Sumo-interaction-motif [17]. Möglicherweise spielen aber auch mehrere Rekrutierungswege eine Rolle bei der Lokalisierung von Atrx und Daxx an das neu entstehende Heterochromatin. Der ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Komplex aus Atrx und Daxx beschleunigt über einen bisher ungeklärten Mechanismus die bereits begonnene Formierung von Heterochromatin am IAP-Retrotransposon. Über die genaue Aufgabe des Atrx/Daxx-Komplexes in diesem Zusammenhang kann nur spekuliert werden. Es ist bekannt, dass die beiden Faktoren eine wichtige Rolle bei der Inkorporation von Histon 3.3 an Telomeren und auch anderen DNA-Bereichen spielen [125, 139, 140]. Dennoch zeigte sich das Silencing des Reportergens unbeeinträchtigt in Experimenten mit Daxx-Mutanten, welche nicht in der Lage waren, H3.3 zu binden, genauso wie bei Versuchen mit komplett H3.3-defizienten Zellen [17]. Es muss also weitere Funktionen von Atrx und Daxx geben, durch die sie Einfluss auf die Repression von Retroelementen nehmen.

Zur Stabilisierung des neu geschaffenen heterochromatischen Zustandes werden nach der Etablierung von H3K9me3 weitere Faktoren wie Dnmts und Suv4-20h mit Hilfe des Adaptermoleküls HP1 rekrutiert. Die durch sie eingeführten Modifikationen sind allerdings höchstwahrscheinlich nicht zwingend erforderlich für heterochromatisches Silencing in ES-Zellen der Maus. Zumindest in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit entsprechenden Knockout-Zellen konnte die Stilllegung des Reportergens weiterhin ungestört ablaufen (siehe Abbildung 4.4 A).

5.6 Ausblick auf die pathophysiologische Bedeutung der epigenetischen Regulation von Retrotransposons im Menschen und mögliche klinische Anwendungen

In der modernen Medizin wird es immer wichtiger, die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge im menschlichen Körper bis auf molekulare Ebene zu verstehen [182]. Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben müssen in allen Körperzellen die zelltypspezifischen Transkriptionsprogramme durch epigenetische Mechanismen aufrechterhalten werden, damit Zellwachstum und -entwicklung korrekt ablaufen und jede Zelle ihre je-

weilige Aufgabe im Organismus erfüllen kann [27]. Abweichungen in diesem komplexen Regulationssystem können zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen [183]. Bekannt ist dies bisher vor allem für verschiedene pädiatrische Syndrome [184], Krebserkrankungen [185], neurologische Störungen [186] und Defekte des Immunsystems [187–189]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Grundlagenforschung soll einen kleinen Beitrag zur Entschlüsselung der involvierten Mechanismen leisten. Im Folgenden wird die Bedeutung der epigenetischen Regulation von Retrotransposons in der Kanzerogenese überblicksartig dargestellt.

Es ist mittlerweile hinreichend bekannt, dass die Entstehung und das Fortschreiten von Krebserkrankungen nicht wie zunächst vermutet allein als Folge einer Akkumulation genetischer Defekte zu betrachten ist, sondern auch epigenetische Ereignisse dabei eine wichtige Rolle spielen [185]. Bereits im Jahr 1983 konnte gezeigt werden, dass maligne Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen oder benignen Neoplasien insgesamt ein deutlich geringeres Maß an DNA-Methylierung aufweisen. Die globale Hypomethylierung zeigte sich noch ausgeprägter in Zellen, welche aus Metastasengewebe gewonnen worden waren [190]. Spätere Arbeiten konnten dieses Phänomen vielfach bestätigen und für die fehlende DNA-Methylierung je nach Lokalisation im Genom unterschiedliche Effekte beobachten [191–193].

Findet die Demethylierung an einer regulatorischen Region für ein bestimmtes Gen statt, so kommt es zu einer vermehrten Expression des entsprechenden Genproduktes. Eine Hochregulation von mit der Kanzerogenese assoziierten Faktoren durch Hypomethylierung von Genregionen ließ sich bereits in zahlreichen Tumorentitäten nachweisen (z. B. in Pankreaskarzinomen [194], Magenkarzinomen [195], Prostatakarzinomen [196], Ovarialkarzinomen [197] und Mammakarzinomen [198]). Unter den betroffenen Genen finden sich unter anderem klassische Onkogene wie R-Ras, nachweisbar zum Beispiel in Magenkarzinomen [195]. Die Überexpression von Faktoren, die invasives Tumorstadium und Metastasierung ermöglichen, scheint besonders häufig durch Demethylierung entsprechender Genregionen aktiviert zu werden [199, 200]. Beispielsweise findet sich die Expression des zum Abbau von Basalmembranen und extrazellulärer Matrix benötigten Enzyms Heparanase in Prostatakarzinomen auf diese Weise hochreguliert [196]. Auch die Aktivierung des neuronalen Proteins Synuclein γ durch DNA-Demethylierung lässt sich mit der Fernmetastasierung verschiedener Tumoren assoziieren, auch wenn seine Funktion in diesem Prozess noch weitgehend ungeklärt ist [198, 201]. Für beide Faktoren wird daran gearbeitet, diese Zusammenhänge im Sinne einer personalisierten Medizin diagnostisch und therapeutisch anwendbar zu machen [202–206]. Sowohl als Biomarker für die bevorstehende oder bereits eingetretene Metastasierung eines Malignoms als auch als potentielle Ziele für inhibitorische Therapeutika könnten sie sich klinisch als sehr wertvoll erweisen.

Für die globale Hypomethylierung in Krebszellen macht die Demethylierung von Genregionen nur einen geringen Anteil aus. Vor allem die in gesunden Zellen stark methylierten

repetitiven DNA-Sequenzen (DNA-Repeats) zeigen sich in malignen Zellen oft hypomethyliert [207]. Hierzu zählen sowohl die Satelliten-DNA im Bereich der Zentromere und Telomere als auch die verschiedenen Familien der Retrotransposons (LINEs, SINEs, LTR-Transposons, siehe Kapitel 2.2) [192]. So zeigt sich beispielsweise in Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen die zentromerische Satelliten-DNA deutlich hypomethyliert im Vergleich zu gesunden Zellen [208, 209]. Ähnliches gilt für LINE1-Retrotransposons in zahlreichen Tumorentitäten, beispielsweise in Bronchialkarzinomen [210], hepatozellulären Karzinomen [211] und kolorektalen Karzinomen [212]. Unter anderem für letztere wird daran gearbeitet, derartige Tumor-typische Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster zu diagnostischen Zwecken nutzbar zu machen [213, 214]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich die LINE-1-Hypomethylierung in zellfreier DNA im Plasma bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien signifikant von gesunden Kontrollen unterscheidet [215]. Sollte sich dieser LINE-1-Hypomethylierungsstatus im Plasma als Biomarker zu Screeningzwecken etablieren lassen, so würde dies die Früherkennung von kolorektalen Karzinomen deutlich vereinfachen.

Auch die Aktivierung von LTR-Retrotransposons durch Hypomethylierung ließ sich bereits vielfach mit Entstehung und Fortschreiten verschiedener Krebserkrankungen assoziieren (z. B. Mammakarzinome [216], Lymphome [217] und Prostatakarzinome [218]). Es befinden sich verschiedene Mechanismen unter Erforschung, wie aktivierte LTR-Transposons zur Karzinogenese beitragen. Grundsätzlich können Retrotranspositionsergebnisse sowohl exogener als auch endogener Retroviren durch Insertionen in das Wirtsgenom zur Aktivierung von Onkogenen und/ oder Beschädigung von Tumorsuppressorgenen führen. Für karzinogene exogene Retroviren konnten solche Prozesse bereits vor Jahrzehnten beobachtet werden, was zur Entdeckung zahlreicher Onkogene und Tumorsuppressorgene führte [219]. Die meisten Retrotransposons haben jedoch im Laufe der Evolution die Fähigkeit zur vollständigen Retrotransposition verloren, weshalb hier andere pathogenetische Mechanismen im Vordergrund stehen [12, 220]. Nachweislich beteiligt sind Retrotransposons an chromosomalen Umlagerungen wie Deletionen, Duplikationen und Translokationen [221, 222]. Diese kommen durch ein fehlerhaftes Alignment bei DNA-Replikationsprozessen aufgrund der zahlreichen nahezu identischen Kopien einer Retrotransposon-Sequenz (Non-allelic homologous recombination (NAHR)) zustande. Doch auch ohne strukturelle Veränderung der DNA-Sequenz können deregulierte LTR-Transposons die Expression zelleigener Gene stark beeinflussen. Insbesondere ist hier die starke Promoteraktivität der long terminal repeats zu nennen, welche bei Deregulation zur massiven Überexpression eines strangabwärts gelegenen Onkogens führen kann [12].

Die Hochregulation von LTR-Retrotransposons in malignen Zellen wurde in den letzten Jahren auch im Hinblick auf ihren möglichen Einsatz als Biomarker zur Früherkennung, zum Staging und zur Prognoseabschätzung von Krebserkrankungen untersucht (z. B. in Prostatakarzinomen [223], kolorektalen Karzinomen [224] und hepatozellulären Karzinomen [225]). Besonders vielversprechend zu diagnostischen Zwecken erscheint

das Hüllprotein des humanen endogenen Retrovirus Typ K (HERV-K), welches sich in Brustkrebszellen deutlich hochreguliert zeigt im Vergleich zu entsprechendem gesundem Gewebe [226]. Besonders interessant als Biomarker wird es dadurch, dass HERV-K-Antikörper und -mRNA bereits in sehr frühen Erkrankungsstadien erhöht im Blut nachweisbar sind [227]. Damit könnten diese Parameter in Zukunft als einfaches und kaum invasives Instrument zur Früherkennung von Mammakarzinomen Verwendung finden. Während lange Zeit lediglich eine Korrelation zwischen der Hochregulation von Retrotransposons und der malignen Transformation von Zellen nachweisbar war, lassen sich in neueren Studien auch erste kausale Zusammenhänge herstellen. Zum Beispiel scheint das in Brustkrebszellen hochregulierte HERV-K-Hüllprotein einen wichtigen Einfluss auf die Ras-Signalkaskade auszuüben, die neben Mammakarzinomen auch in zahlreichen anderen Malignomen eine wichtige pathogenetische Rolle spielt [216, 228]. Dadurch wird das humane endogene Retrovirus K zu einem vielversprechenden Ziel für zukünftige onkologische Therapien.

Während der Beitrag von deregulierten Retroelementen zur malignen Transformation von Zellen bereits seit einigen Jahren intensiv untersucht wird, ergeben sich erst seit Kurzem auch Anzeichen für eine antitumorale Wirkung aktivierter endogener Retroviren [229, 230]. Ähnlich der Reaktion auf einen exogenen Retrovirus lösen auch die Transkripte endogener Retroelemente eine Immunantwort aus („viral mimicry“), welche eine Hemmung des Tumorwachstums vermitteln kann [231, 232]. Dieser Effekt scheint eine wichtige Rolle für den Therapieerfolg bei der Behandlung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (z. B. 5-Azacytidin) zu spielen [233]. Jene wurden ursprünglich vor allem unter dem Gedanken einer Reaktivierung hypermethylierter Tumorsuppressorgene als Therapeutika entwickelt [234, 235]. Sie bewirken aber gleichzeitig auch eine Hypomethylierung und damit transkriptionelle Aktivierung endogener Retroviren [231, 232]. Die Hochregulation der Transkription von Retroelementen zu immunmodulatorischen Zwecken stellt einen sehr interessanten Ansatz zur Therapie maligner Erkrankungen dar. Allerdings müsste dieser Effekt zum erfolgreichen und sicheren Einsatz solcher Therapien sehr gezielt in neoplastischen Zellen erfolgen. Das Risiko einer aberranten Reaktivierung von Retroelementen in zuvor gesunden Zellen mit daraus folgender neuer maligner Transformation darf hier nicht vernachlässigt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

Atf7ip Activating transcription factor 7-interacting protein 1

ATP Adenosintriphosphat

ATPase Adenosintriphosphatase

Atrx Alpha thalassemia/ mental retardation/ X-linked

ADD Atrx-Dnmt3-Dnmt3L

ALT Alternative lengthening of telomeres

bp Base pair

CAF-1 Chromatin assembly factor-1

cDNA Complementary DNA

CSD Chromoshadow-Domäne

Chd3 Chromodomain helicase DNA binding protein 3

CpG Cytosin-Guanin-Dinukleotid

Daxx Death domain-associated protein 6

dNTP Desoxynukleosidtriphosphat

DNA Deoxyribonucleic acid

DMSO Dimethylsulfoxid

Dnmt DNA-Methyltransferase

EGFP Enhanced green fluorescent protein

EDTA Ethylendiamintetraacetat

PBS Phosphate buffered saline

ESET ERG-associated protein with SET domain

FACS Fluorescence-activated cell sorting/ scanning

GAG Group-specific antigen

H2A Histon 2A
H2B Histon 2B
H3 Histon 3
H4 Histon 4
H3.3 Histon 3.3
H3K4 Histon 3 Lysin 4
H3K4me3 Histon 3 Lysin 4 Trimethylierung
H3K9 Histon 3 Lysin 9
H3K9me3 Histon 3 Lysin 9 Trimethylierung
H3K27 Histon 3 Lysin 27
H3K36 Histon 3 Lysin 36
H3K79 Histon 3 Lysin 79
H4K20 Histon 4 Lysin 20
H4K20me3 Histon 4 Lysin 20 Trimethylierung
HP1 Heterochromatin-Protein 1
HIV Humanes Immundefizienz-Virus
SLC7A1 Solute carrier family 7 member 1
HP1BD Heterochromatin protein 1 binding domain
HERV-K Humanes endogenes Retrovirus K
HEK Human embryonic kidney
HBS HEPES buffered saline
IAP Intracisternal A-type particle
IN Integrase
Kap1 KRAB-associated protein 1
KO Knockout

KRAB Krüppel-associated box

KMT1E Lysin N-methyltransferase 1 E

LINE Long interspersed nucleotide element

LTR Long terminal repeat

LIF Leukemia inhibitory factor

mAM Murine Atf7a-associated modulator

MBD1 Methyl-CpG-binding domain protein 1

MCAF1 MBD1-containing chromatin-associated factor 1

MEF Mouse embryonic fibroblasts

mES-Zellen Embryonale Stammzellen der Maus

M-MLV Moloney murine leukemia virus

MeCP2 Methyl-CpG-binding protein 2

mRNA Messenger-RNA

MusD Maus-Retrotransposon Typ D

ETn Early Transposon

MuERV Murine edogenous retrovirus

MMTV Mouse mammary tumor virus

NuRD Nucleosome remodeling deacetylase

NAHR Non-allelic homologous recombination

PaNET Neuroendokriner Tumor des Pankreas

Pax Paired box

PCR Polymerase chain reaction

PHD Plant homeodomain

Prdm Positive regulatory domain zinc finger protein

PxVxL Prolin-(unbekannt)-Valin-(unbekannt)-Leucin

PML-NB Promyelocytic leukemia nuclear body

qPCR Quantitative PCR

RBCC RING finger/ B-box/ coiled-coil

RING Really Interesting New Gene

RNA Ribonucleic acid

RNase Ribonuklease

RT Reverse transkriptase

Setdb1 SET domain bifurcated 1

SET Suv3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax

SNF2 Sucrose non-fermenting

shRNA Short hairpin RNA

SINE Short interspersed nucleotide element

SIM Sumo interaction motif

Sumo Small ubiquitin-like modifier

Suv3-9h Suppressor of variegation 3-9 homologues

Suv4-20h Suppressor of variegation 4-20 homologues

Tif1 β Transcription intermediary factor 1-beta

Trim28 Tripartite motif containing protein 28

YY1 Yin Yang 1

UTR Untranslated region

Zfp Zinc finger protein

7 Literatur

- [1] E.S. Lander; L.M. Linton; B. Birren; C. Nusbaum; M.C. Zody; J. Baldwin; K. Devon; K. Dewar; M. Doyle; W. FitzHugh u. a.: „Initial sequencing and analysis of the human genome“. In: *Nature* 409, Nr. 6822 (2001), S. 860–921 (siehe S. 7, 17, 56).
- [2] Mouse Genome Sequencing Consortium; R.H. Waterston; K. Lindblad-Toh; E. Birney; J. Rogers; J.F. Abril; P. Agarwal; R. Agarwala; R. Ainscough; M. Alexandersson u. a.: „Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome“. In: *Nature* 420, Nr. 6915 (2002), S. 520–562 (siehe S. 7, 17, 56).
- [3] R.N. Platt; M.W. Vandeweye und D.A. Ray: „Mammalian transposable elements and their impacts on genome evolution“. In: *Chromosome Research* 26, Nr. 1-2 (2018), S. 25–43 (siehe S. 7, 17).
- [4] A.D. Greenwood; Y. Ishida; S.P. O’Brien; A.L. Roca und M.V. Eiden: „Transmission, evolution, and endogenization: lessons learned from recent retroviral invasions“. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82, Nr. 1 (2018) (siehe S. 7, 17).
- [5] D. Ribet; F. Harper; A. Dupressoir; M. Dewannieux; G. Pierron und T. Heidmann: „An infectious progenitor for the murine IAP retrotransposon: emergence of an intracellular genetic parasite from an ancient retrovirus“. In: *Genome Research* 18, Nr. 4 (2008), S. 597–609 (siehe S. 7, 17).
- [6] B. Brouha; J. Schustak; R.M. Badge; S. Lutz-Prigge; A.H. Farley; J.V. Moran und H.H.Jr. Kazazian: „Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, Nr. 9 (2003), S. 5280–5285 (siehe S. 7, 17, 18).
- [7] C.R. Beck; P. Collier; C. Macfarlane; M. Malig; J.M. Kidd; E.E. Eichler; R.M. Badge und J.V. Moran: „LINE-1 retrotransposition activity in human genomes“. In: *Cell* 141, Nr. 7 (2010), S. 1159–1170 (siehe S. 7, 17, 18).
- [8] R. Belshaw; A.L. Dawson; J. Woolven-Allen; J. Redding; A. Burt und M. Tristem: „Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERVK(HML2): implications for present-day activity“. In: *Journal of Virology* 79, Nr. 19 (2005), S. 12507–12514 (siehe S. 7, 17, 18).
- [9] I.A. Maksakova; M.T. Romanish; L. Gagnier; C.A. Dunn; L.N. van de Lagemaat und D.L. Mager: „Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line“. In: *PLOS Genetics* 2, Nr. 1 (2006) (siehe S. 7, 17, 18).
- [10] J.M. Coffin; S.H. Hughes und H. Varmus: *Retrotransposons*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997 (siehe S. 7, 17).
- [11] D.C. Hancks und H.H.Jr. Kazazian: „Active human retrotransposons: variation and disease“. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 22, Nr. 3 (2012), S. 191–203 (siehe S. 7, 18).
- [12] G. Kassiotis und J.P. Stoye: „Making a virtue of necessity: the pleiotropic role of human endogenous retroviruses in cancer“. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 372, Nr. 1732 (2017) (siehe S. 7, 18, 60).

- [13] M. Dewannieux; A. Dupressoir; F. Harper; G. Pierron und T. Heidmann: „Identification of autonomous IAP LTR retrotransposons mobile in mammalian cells“. In: *Nature Genetics* 36, Nr. 5 (2004), S. 534–539 (siehe S. 7, 18).
- [14] A.A. Poznanski und P.G. Calarco: „The expression of intracisternal A particle genes in the preimplantation mouse embryo“. In: *Developmental Biology* 143, Nr. 2 (1991), S. 271–281 (siehe S. 7).
- [15] P. Svoboda; P. Stein; M. Anger; E. Bernstein; G.J. Hannon und R.M. Schultz: „RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos“. In: *Developmental Biology* 269, Nr. 1 (2004), S. 276–285 (siehe S. 7).
- [16] D. Sadic; K. Schmidt; S. Groh; I. Kondofersky; J. Ellwart; C. Fuchs; F.J. Theis und G. Schotta: „Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons“. In: *EMBO Reports* 16, Nr. 7 (2015), S. 836–850 (siehe S. 7, 41, 43, 44, 49).
- [17] D. Sadic: „Regulation of heterochromatic gene silencing in mouse“. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014 (siehe S. 7, 12, 13, 36, 41, 43, 44, 49, 52, 55, 58).
- [18] T. Matsui; D. Leung; H. Miyashita; I.A. Maksakova; H. Miyachi; H. Kimura; M. Tachibana; M.C. Lorincz und Y. Shinkai: „Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET“. In: *Nature* 464, Nr. 7290 (2010), S. 927–931 (siehe S. 7, 14, 19, 41, 45, 54).
- [19] H.M. Rowe; J. Jakobsson; D. Mesnard; J. Rougemont; S. Reynard; T. Aktas; P.V. Mailard; H. Layard-Liesching; S. Verp; J. Marquis u. a.: „KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells“. In: *Nature* 463, Nr. 7278 (2010), S. 237–240 (siehe S. 7, 14, 19, 20, 36, 41, 45, 49, 52, 54).
- [20] W. Flemming: *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. F.C.W. Vogel, 1882 (siehe S. 9).
- [21] S.C. Elgin und S.I. Grewal: „Heterochromatin: silence is golden“. In: *Current Biology* 13, Nr. 23 (2003), R895–R898 (siehe S. 9).
- [22] A.P. Wolffe und H. Kurumizaka: „The nucleosome: a powerful regulator of transcription“. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 61 (1998), S. 379–422 (siehe S. 9).
- [23] A.G. Larson und G.J. Narlikar: „The role of phase separation in heterochromatin formation, function, and regulation“. In: *Biochemistry* 57, Nr. 17 (2018), S. 2540–2548 (siehe S. 9).
- [24] Y. Shechtman; A.K. Gustavsson; P.N. Petrov; E. Dultz; M.Y. Lee; K. Weis und W.E. Moerner: „Observation of live chromatin dynamics in cells via 3D localization microscopy using Tetrapod point spread functions.“ In: *Biomedical Optics Express* 8, Nr. 12 (2017), S. 5735–5748 (siehe S. 9).
- [25] K. Luger; A.W. Mader; R.K. Richmond; D.F. Sargent und T.J. Richmond: „Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution“. In: *Nature* 389, Nr. 6648 (1997), S. 251–260 (siehe S. 9).
- [26] N. Korolev; A.P. Lyubartsev und L. Nordenskiöld: „A systematic analysis of nucleosome core particle and nucleosome-nucleosome stacking structure“. In: *Scientific Reports* 8, Nr. 1543 (2018) (siehe S. 9).

- [27] C.D. Allis; M. Caparros; T. Jenuwein; D. Reinberg und M. Lachlan: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015 (siehe S. 9, 10, 59).
- [28] P.A. Jones: „Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond“. In: *Nature Reviews Genetics* 13, Nr. 7 (2012), S. 484–492 (siehe S. 9, 10).
- [29] T. Kouzarides: „Chromatin modifications and their function“. In: *Cell* 128, Nr. 4 (2007), S. 693–705 (siehe S. 9, 10).
- [30] P.B. Becker und W. Hörz: „ATP-dependent nucleosome remodeling“. In: *Annual Review of Biochemistry* 71 (2002), S. 247–273 (siehe S. 9).
- [31] E. Bernstein und C.D. Allis: „RNA meets chromatin“. In: *Genes & Development* 19, Nr. 14 (2005), S. 1635–1655 (siehe S. 9).
- [32] M.K.Y. Seah und D.M. Messerschmidt: „From germline to soma: epigenetic dynamics in the mouse preimplantation embryo“. In: *Current Topics in Developmental Biology* 128 (2018), S. 203–235 (siehe S. 9).
- [33] M. Saitou; S. Kagiyada und K. Kurimoto: „Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells“. In: *Development* 139, Nr. 1 (2012), S. 15–31 (siehe S. 9).
- [34] P. Hajkova; S. Erhardt; N. Lanec; T. Haaf; O. El-Maarri; W. Reik; J. Walter und A. Surani: „Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells“. In: *Mechanisms of Development* 117, Nr. 1-2 (2002), S. 15–23 (siehe S. 9).
- [35] M. Okano; D.W. Bell; D.A. Haber und E. Li: „DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development“. In: *Cell* 99, Nr. 3 (1999), S. 247–257 (siehe S. 9).
- [36] Z.M. Zhang; R. Lu; P. Wang; Y. Yu; D. Chen; L. Gao; S. Liu; D. Ji; S.B. Rothbart; Y. Wang u. a.: „Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation“. In: *Nature* 554, Nr. 7692 (2018), S. 387–391 (siehe S. 9).
- [37] P.A. Jones und G. Liang: „Rethinking how DNA methylation patterns are maintained“. In: *Nature Reviews Genetics* 10, Nr. 11 (2009), S. 805–811 (siehe S. 10).
- [38] T. Li; L. Wang; Y. Du; S. Xie; X. Yang; F. Lian; Z. Zhou und C. Qian: „Structural and mechanistic insights into UHRF1-mediated DNMT1 activation in the maintenance DNA methylation.“ In: *Nucleic Acids Research* 46, Nr. 6 (2018), S. 3218–3231 (siehe S. 10).
- [39] A. Bird: „DNA methylation patterns and epigenetic memory“. In: *Genes & Development* 16, Nr. 1 (2002), S. 6–21 (siehe S. 10).
- [40] D. Schübeler: „Function and information content of DNA methylation“. In: *Nature* 517, Nr. 7534 (2015), S. 321–326 (siehe S. 10).
- [41] A.J. Bannister; R. Schneider und T. Kouzarides: „Histone methylation: dynamic or static?“ In: *Cell* 109, Nr. 7 (2002), S. 801–806 (siehe S. 10).
- [42] Y. Zhang und D. Reinberg: „Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails“. In: *Genes & Development* 15, Nr. 8 (2001), S. 2343–2360 (siehe S. 10).
- [43] A. Bannister und T. Kouzarides: „Reversing histone methylation“. In: *Nature* 436, Nr. 7054 (2005), S. 1103–1106 (siehe S. 10).

- [44] K. Hyun; J. Jeon; K. Park und J. Kim: „Writing, erasing and reading histone lysine methylations“. In: *Experimental & Molecular Medicine* 49, Nr. 4 (2017) (siehe S. 10).
- [45] A. Barski; S. Cuddapah; K. Cui; T.Y. Roh; D.E. Schones; Z. Wang; G. Wei; I. Chepelev und K. Zhao: „High-resolution profiling of histone methylations in the human genome“. In: *Cell* 129, Nr. 4 (2007), S. 823–837 (siehe S. 10).
- [46] T.S. Mikkelsen; M. Ku; D.B. Jaffe; B. Issac; E. Lieberman; G. Giannoukos; P. Alvarez; W. Brockman; T.K. Kim; R.P. Koche u. a.: „Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells“. In: *Nature* 448, Nr. 7153 (2007), S. 553–560 (siehe S. 11, 19, 39).
- [47] G. Nishibuchi und J. Déjardin: „The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals“. In: *Chromosome Research* 25, Nr. 1 (2017), S. 77–87 (siehe S. 11).
- [48] A. Bulut-Karslioglu; V. Perrera; M. Scaranaro; I.A. de la Rosa-Velazquez; S. van de Nobelen; N. Shukeir; J. Popow; B. Gerle; S. Opravil; M. Pagani u. a.: „A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation“. In: *Nature structural & molecular biology* 19, Nr. 10 (2012), S. 1023–1030 (siehe S. 11).
- [49] A. Loyola; H. Tagami; T. Bonaldi; D. Roche; J.P. Quivy; A. Imhof; Y. Nakatani; S.Y. Dent und G. Almouzni: „The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin“. In: *EMBO Reports* 10, Nr. 7 (2009), S. 769–775 (siehe S. 11).
- [50] I. Pinheiro; R. Margueron; N. Shukeir; M. Eisold; C. Fritzschi; F.M. Richter; G. Mittler; C. Genoud; S. Goyama; M. Kurokawa u. a.: „Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity“. In: *Cell* 150, Nr. 5 (2012), S. 948–960 (siehe S. 11).
- [51] A.H. Peters; D. O’Carroll; H. Scherthan; K. Mechtler; S. Sauer; C. Schofer; K. Weipoltshammer; M. Pagani; M. Lachner; A. Kohlmaier u. a.: „Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability“. In: *Cell* 107, Nr. 3 (2001), S. 323–337 (siehe S. 11, 58).
- [52] A.J. Bannister; P. Zegerman; J.F. Partridge; E.A. Miska; J.O. Thomas; R.C. Allshire und T. Kouzarides: „Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain“. In: *Nature* 410, Nr. 6824 (2001), S. 120–124 (siehe S. 11).
- [53] M. Lachner; D. O’Carroll; S. Rea; K. Mechtler und T. Jenuwein: „Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins“. In: *Nature* 410, Nr. 6824 (2001), S. 116–120 (siehe S. 11).
- [54] M. Hahn; S. Dambacher; S. Dulev; A.Y. Kuznetsova; S. Eck; S. Worz; D. Sadic; M. Schulte; J.P. Mallm; A. Maiser u. a.: „Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin“. In: *Genes & Development* 27, Nr. 8 (2013), S. 859–872 (siehe S. 11).
- [55] G. Schotta; M. Lachner; K. Sarma; A. Ebert; R. Sengupta; G. Reuter; D. Reinberg und T. Jenuwein: „A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin“. In: *Genes & Development* 18, Nr. 11 (2004), S. 1251–1262 (siehe S. 11, 12).

- [56] B. Lehnertz; Y. Ueda; A.A. Derijck; U. Braunschweig; L. Perez-Burgos; S. Kubicek; T. Chen; E. Li; T. Jenuwein und A.H. Peters: „Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin“. In: *Current Biology* 13, Nr. 14 (2003), S. 1192–1200 (siehe S. 11).
- [57] S. Dambacher; M. Hahn und G. Schotta: „Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation“. In: *Heredity* 105, Nr. 1 (2010), S. 24–37 (siehe S. 12).
- [58] G. Ecco; M. Imbeault und D. Trono: „KRAB zinc finger proteins“. In: *Development* 144, Nr. 15 (2017), S. 2719–2729 (siehe S. 11).
- [59] A. Corsinotti; A. Kapopoulou; C. Gubelmann; M. Imbeault; F.R. Santoni de Sio; H.M. Rowe; Y. Mouscaz; B. Deplancke und D. Trono: „Global and stage specific patterns of Kruppel-associated-box zinc finger protein gene expression in murine early embryonic cells“. In: *PLOS ONE* 8, Nr. 2 (2013) (siehe S. 11, 54).
- [60] R.O. Emerson und J.H. Thomas: „Adaptive evolution in zinc finger transcription factors“. In: *PLOS Genetics* 5, Nr. 1 (2009) (siehe S. 11).
- [61] H.D. Tadepally; G. Burger und M. Aubry: „Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains“. In: *BMC Evolutionary Biology* 8, Nr. 176 (2008) (siehe S. 11).
- [62] J.H. Thomas und R.O. Emerson: „Evolution of C2H2-zinc finger genes revisited“. In: *BMC Evolutionary Biology* 9, Nr. 51 (2009) (siehe S. 11).
- [63] E.J. Bellefroid; D.A. Poncelet; P.J. Lecocq; O. Revelant und J.A. Martial: „The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, Nr. 9 (1991), S. 3608–3612 (siehe S. 11).
- [64] J.F. Margolin; J.R. Friedman; W.K. Meyer; H. Vissing; H.J. Thiesen und F.J. Rauscher: „Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, Nr. 10 (1994), S. 4509–4513 (siehe S. 11).
- [65] J.R. Friedman; W.J. Fredericks; D.E. Jensen; D.W. Speicher; X.P. Huang; E.G. Neilson und F.J. Rauscher: „KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain“. In: *Genes & Development* 10, Nr. 16 (1996), S. 2067–2078 (siehe S. 11).
- [66] P. Moosmann; O. Georgiev; B. Le Douarin; J.P. Bourquin und W. Schaffner: „Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1“. In: *Nucleic Acids Research* 24, Nr. 24 (1996), S. 4859–4867 (siehe S. 11).
- [67] P. Czerwinska; S. Mazurek und M. Wiznerowicz: „The complexity of TRIM28 contribution to cancer“. In: *Journal of Biomedical Science* 24, Nr. 63 (2017) (siehe S. 11, 52).
- [68] H. Peng; G.E. Begg; S.L. Harper; J.R. Friedman; D.W. Speicher und F.J. Rauscher: „Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 175, Nr. 24 (2000), S. 18000–18010 (siehe S. 11).

- [69] S.V. Brasher; B.O. Smith; R.H. Fogh; D. Nietlispach; A. Thiru; P.R. Nielsen; R.W. Broadhurst; L.J. Ball; N.V. Murzina und E.D. Laue: „The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer“. In: *The EMBO Journal* 19, Nr. 7 (2000), S. 1587–1597 (siehe S. 11).
- [70] M.S. Lechner; G.E. Begg; D.W. Speicher und F.J. Rauscher: „Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential“. In: *Molecular and cellular biology* 20, Nr. 17 (2000), S. 6449–6465 (siehe S. 11).
- [71] A.V. Ivanov; H. Peng; V. Yurchenko; K.L. Yap; D.G. Negorev; D.C. Schultz; E. Psulkowski; W.J. Fredericks; D.E. White; G.G. Maul u. a.: „PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing“. In: *Molecular Cell* 28, Nr. 5 (2007), S. 823–837 (siehe S. 11, 14).
- [72] D.C. Schultz; K. Ayyanathan; D. Negorev; G.G. Maul und F.J. Rauscher: „SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins“. In: *Genes & Development* 16, Nr. 8 (2002), S. 919–932 (siehe S. 11, 14, 54).
- [73] D.C. Schultz; J.R. Friedman und F.J. Rauscher: „Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD“. In: *Genes & Development* 15, Nr. 4 (2001), S. 428–443 (siehe S. 11).
- [74] L. Zeng; K.L. Yap; A.V. Ivanov; X. Wang; S. Mujtaba; O. Plotnikova; F.J. Rauscher und M.M. Zhou: „Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing“. In: *Nature structural & molecular biology* 15, Nr. 6 (2008), S. 626–633 (siehe S. 11).
- [75] Y. Xue; J. Wong; G.T. Moreno; M.K. Young; J. Côté und W. Wang: „NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities“. In: *Molecular Cell* 2, Nr. 6 (1998), S. 851–861 (siehe S. 11).
- [76] S. Iyengar und P.J. Farnham: „KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286, Nr. 30 (2011), S. 26267–26276 (siehe S. 13, 52).
- [77] X. Li; M. Ito; F. Zhou; N. Youngson; X. Zuo; P. Leder und A.C. Ferguson-Smith: „A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints“. In: *Developmental Cell* 15, Nr. 4 (2008), S. 547–557 (siehe S. 14).
- [78] S. Quenneville; G. Verde; A. Corsinotti; A. Kapopoulou; J. Jakobsson; S. Offner; I. Baglivo; P.V. Pedone; G. Grimaldi; A. Riccio u. a.: „In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions“. In: *Molecular Cell* 44, Nr. 3 (2011), S. 361–372 (siehe S. 14, 54).
- [79] S. Quenneville; P. Turelli; K. Bojkowska; C. Raclot; S. Offner; A. Kapopoulou und D. Trono: „The KRAB-ZFP/KAP1 system contributes to the early embryonic establishment of site-specific DNA methylation patterns maintained during development“. In: *Cell Reports* 2, Nr. 4 (2012), S. 766–773 (siehe S. 14, 19, 54).

- [80] M. Shibata; K.E. Blauvelt; K.F.Jr. Liem und M.J. Garcia-Garcia: „TRIM28 is required by the mouse KRAB domain protein ZFP568 to control convergent extension and morphogenesis of extra-embryonic tissues“. In: *Development* 138, Nr. 24 (2011), S. 5333–5343 (siehe S. 14).
- [81] I. Barde; B. Rauwel; R.M. Marin-Florez; A. Corsinotti; E. Laurenti; S. Verp; S. Offner; J. Marquis; A. Kapopoulou; J. Vanicek u. a.: „A KRAB/KAP1-miRNA cascade regulates erythropoiesis through stagespecific control of mitophagy“. In: *Science* 340, Nr. 6130 (2013), S. 350–353 (siehe S. 14).
- [82] J. Jakobsson; M.I. Cordero; R. Bisaz; A.C. Groner; V. Busskamp; J.C. Bensadoun; F. Cammas; R. Losson; I.M. Mansuy; C. Sandi u. a.: „KAP1-mediated epigenetic repression in the forebrain modulates behavioral vulnerability to stress“. In: *Neuron* 60, Nr. 5 (2008), S. 818–831 (siehe S. 14).
- [83] D.A. Grassi; M.E. Jönsson; P.L. Brattas und J. Jakobsson: „TRIM28 and the control of transposable elements in the brain“. In: *Brain Research* (2018, in press) (siehe S. 14).
- [84] D. Wolf und S.P. Goff: „TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells“. In: *Cell* 131, Nr. 1 (2007), S. 46–57 (siehe S. 14, 20).
- [85] D. Wolf und S.P. Goff: „Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs“. In: *Nature* 458, Nr. 7242 (2009), S. 1201–1204 (siehe S. 14, 20).
- [86] A. Lee; O. CingÖz; Y. Sabo und S.P. Goff: „Characterization of interaction between Trim28 and YY1 in silencing proviral DNA of Moloney murine leukemia virus“. In: *Virology* 516 (2018), S. 165–175 (siehe S. 14).
- [87] H.M. Rowe; A. Kapopoulou; A. Corsinotti; L. Fasching; T.S. Macfarlan; Y. Tarabay; S. Viville; J. Jakobsson; S.L. Pfaff und D. Trono: „TRIM28 repression of retrotransposon-based enhancers is necessary to preserve transcriptional dynamics in embryonic stem cells“. In: *Genome Research* 23, Nr. 3 (2013), S. 452–461 (siehe S. 14, 19).
- [88] P.L. Brattas; M.E. Jönsson; L. Fasching; J. Nelander-Wahlestedt; M. Shahsavani; R. Falk; A. Falk; P. Jern; M. Parmar und J. Jakobsson: „TRIM28 controls a gene regulatory network based on endogenous retroviruses in human neural progenitor cells“. In: *Cell Reports* 18, Nr. 1 (2017), S. 1–11 (siehe S. 14).
- [89] D.E. White; D. Negorev; H. Peng; A.V. Ivanov; G.G. Maul und F.J. Rauscher: „KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions“. In: *Cancer Research* 66, Nr. 24 (2006), S. 11594–11599 (siehe S. 14).
- [90] X. Li; Y.K. Lee; J.C. Jeng; Y. Yen; D.C. Schultz; H.M. Shih und D.K. Ann: „Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282, Nr. 50 (2007), S. 36177–36189 (siehe S. 14).
- [91] F. Cammas; M. Mark; P. Dolle; A. Dierich; P. Chambon und R. Losson: „Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development“. In: *Development* 127, Nr. 13 (2000), S. 2955–2963 (siehe S. 14).
- [92] G. Hu; J. Kim; Q. Xu; Y. Leng; S.H. Orkin und S.J. Elledge: „A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal“. In: *Genes & Development* 23, Nr. 7 (2009), S. 837–848 (siehe S. 14).

- [93] M. Klimczak; P. Czerwinska; S. Mazurek; B. Sozanska; P. Biecek; A. Mackiewicz und M. Wiznerowicz: „TRIM28 epigenetic corepressor is indispensable for stable induced pluripotent stem cell formation“. In: *Stem Cell Research* 23 (2017), S. 163–172 (siehe S. 14).
- [94] S.C. Dillon; X. Zhang; R.C. Trievel und X. Cheng: „The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases“. In: *Genome Biology* 6:8, Nr. 227 (2005) (siehe S. 14).
- [95] H. Wang; W. An; R. Cao; L. Xia; H. Erdjument-Bromage; B. Chatton; P. Tempst; R.G. Roeder und Y. Zhang: „mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression“. In: *Molecular Cell* 12, Nr. 2 (2003), S. 475–487 (siehe S. 14, 54).
- [96] H.M. Rowe; M. Friedli; S. Offner; S. Verp; D. Mesnard; J. Marquis; T. Aktas und D. Trono: „De novo DNA methylation of endogenous retroviruses is shaped by KRAB-ZFPs/KAP1 and ESET“. In: *Development* 140, Nr. 3 (2013), S. 519–529 (siehe S. 14, 19, 54).
- [97] S.P. Sripathy; J. Stevens und D.C. Schultz: „The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression“. In: *Molecular and Cellular Biology* 26, Nr. 22 (2006), S. 8623–8638 (siehe S. 14, 15).
- [98] M.M. Karimi; P. Goyal; I.A. Maksakova; M. Bilenky; D. Leung; J.X. Tang; Y. Shinkai; D.L. Mager; S. Jones; M. Hirst u. a.: „DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mESCs“. In: *Cell stem cell* 8, Nr. 6 (2011), S. 676–687 (siehe S. 14, 19, 54).
- [99] H.M. Rowe und D. Trono: „Dynamic control of endogenous retroviruses during development“. In: *Virology* 411, Nr. 2 (2011), S. 273–287 (siehe S. 14, 18).
- [100] M. Kato; K. Takemoto und Y. Shinkai: „A somatic role for the histone methyltransferase Setdb1 in endogenous retrovirus silencing“. In: *Nature Communications* 9, Nr. 1683 (2018) (siehe S. 15).
- [101] P.J. Verschure; I. van der Kraan; W. de Leeuw; J. van der Vlag; A.E. Carpenter und A.S. Belmont: „In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation“. In: *Molecular and Cellular Biology* 25, Nr. 11 (2005), S. 4552–4564 (siehe S. 15).
- [102] B. Stielow; A. Sapetschnig; C. Wink; I. Kruger und G. Suske: „SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing“. In: *EMBO Reports* 9, Nr. 9 (2008), S. 899–906 (siehe S. 15).
- [103] M.J. Lyst; X. Nan und I. Stancheva: „Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins“. In: *The EMBO Journal* 25, Nr. 22 (2006), S. 5317–5328 (siehe S. 15).
- [104] S.A. Sarraf und I. Stancheva: „Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly“. In: *Molecular Cell* 15, Nr. 4 (2004), S. 595–605 (siehe S. 15).

- [105] Y. Uchimura; T. Ichimura; J. Uwada; T. Tachibana; S. Sugahara; M. Nakao und H. Saitoh: „Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281, Nr. 32 (2006), S. 23180–23190 (siehe S. 15).
- [106] S. Cho; J.S. Park und Y.K. Kang: „Dual functions of histone-lysine N-methyltransferase Setdb1 protein at promyelocytic leukemia-nuclear body (PML-NB): maintaining PML-NB structure and regulating the expression of its associated genes“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286, Nr. 47 (2011), S. 41115–41124 (siehe S. 15).
- [107] S. Bilodeau; M.H. Kagey; G.M. Frampton; P.B. Rahl und R.A. Young: „SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state“. In: *Genes & Development* 23, Nr. 21 (2009), S. 2484–2489 (siehe S. 15, 34).
- [108] J.E. Dodge; Y.K. Kang; H. Beppu; H. Lei und E. Li: „Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development“. In: *Molecular and cellular biology* 24, Nr. 6 (2004), S. 2478–2486 (siehe S. 15, 34).
- [109] R.J. Gibbons; D.J. Picketts; L. Villard und D.R. Higgs: „Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome)“. In: *Cell* 80, Nr. 6 (1995), S. 837–845 (siehe S. 15, 41).
- [110] R. Gibbons: „Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. Orphanet journal of rare diseases“. In: *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1, Nr. 15 (2006) (siehe S. 15).
- [111] R.J. Gibbons; T. Wada; C.A. Fisher; N. Malik; M.J. Mitson; D.P. Steensma; A. Fryer; D.R. Goudie; I.D. Krantz und J. Traeger-Synodinos: „Mutations in the chromatin-associated protein ATRX“. In: *Human Mutation* 29, Nr. 6 (2008), S. 796–802 (siehe S. 15).
- [112] M.A. Dyer; Z.A. Qadeer; D. Valle-Garcia und E. Bernstein: „ATR-X and DAXX: Mechanisms and Mutations“. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7, Nr. 3 (2017) (siehe S. 15).
- [113] D. Garrick; V. Samara; T.L. McDowell; A.J. Smith; L. Dobbie; D.R. Higgs und R.J. Gibbons: „A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain“. In: *Gene* 326 (2004), S. 23–34 (siehe S. 15).
- [114] R.C. Dash; A.M. Zaino und M.K. Hadden: „A metadynamic approach to understand the recognition mechanism of the histone H3 tail with the ATRX_{ADD} domain“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* (2018, in press) (siehe S. 15, 55).
- [115] S. Eustermann; J.C. Yang; M.J. Law; R. Amos; L.M. Chapman; C. Jelinska; D. Garrick; D. Clynes; R.J. Gibbons; D. Rhodes u. a.: „Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 18, Nr. 7 (2011), S. 777–782 (siehe S. 16, 41, 55).
- [116] S. Iwase; B. Xiang; S. Ghosh; T. Ren; P.W. Lewis; J.C. Cochrane; C.D. Allis; D.J. Picketts; D.J. Patel; H. Li u. a.: „ATR-X ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mentalretardation syndrome“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 18, Nr. 7 (2011), S. 769–776 (siehe S. 16, 41, 55).
- [117] A. Dhayalan; R. Tamas; I. Bock; A. Tattermusch; E. Dimitrova; S. Kudithipudi; S. Ragozin und A. Jeltsch: „The ATR-X-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9“. In: *Human Molecular Genetics* 20, Nr. 11 (2011), S. 2195–2203 (siehe S. 16, 58).

- [118] T.L. McDowell; R.J. Gibbons; H. Sutherland; D.M. O'Rourke; W.A. Bickmore; A. Pombo; H. Turley; K. Gatter; D.J. Picketts; V.J. Buckle u. a.: „Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, Nr. 24 (1999), S. 13983–13988 (siehe S. 16, 58).
- [119] X. Nan; J. Hou; A. Maclean; J. Nasir; M.J. Lafuente; X. Shu; S. Kriaucionis und A. Bird: „Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, Nr. 8 (2007), S. 2709–2714 (siehe S. 16).
- [120] S. Pandey; G.E.Jr. Simmons; S. Malyarchuk; T.N. Calhoun und K. Pruitt: „A novel MeCP2 acetylation site regulates interaction with ATRX and HDAC1“. In: *Genes & Cancer* 6, Nr. 9-10 (2015), S. 408–421 (siehe S. 16).
- [121] R.J. Gibbons; T.L. McDowell; S. Raman; D.M. O'Rourke; D. Garrick; H. Ayyub und D.R. Higgs: „Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation“. In: *Nature Genetics* 24, Nr. 4 (2000), S. 368–371 (siehe S. 16, 41).
- [122] D. Garrick; J.A. Sharpe; R. Arkell; L. Dobbie; A.J. Smith; W.G. Wood; D.R. Higgs und R.J. Gibbons: „Loss of Atrx affects trophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues“. In: *PLOS Genetics* 2, Nr. 4 (2006) (siehe S. 16).
- [123] L.C. Schenkel; K.D. Kernohan; A. McBride; D. Reina; A. Hodge; P. Ainsworth; D. Rodenhiser; G. Pare; N.G. Berube; C. Skinner u. a.: „Identification of epigenetic signature associated with alpha thalassemia/mental retardation X-linked syndrome“. In: *Epigenetics & Chromatin* 10, Nr. 10 (2017) (siehe S. 16).
- [124] J. Tang; S. Wu; H. Liu; R. Strat; O.G. Barak; R. Shiekhattar; D.J. Picketts und X. Yang: „A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 19 (2004), S. 20369–20377 (siehe S. 16, 55).
- [125] P. Drane; K. Ouarrhni; A. Depaux; M. Shuaib und A. Hamiche: „The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3“. In: *Genes & Development* 24, Nr. 12 (2010), S. 1253–1265 (siehe S. 16, 58).
- [126] D. Hoelper; H. Huang; A.Y. Jain; D.J. Patel und P.W. Lewis: „Structural and mechanistic insights into ATRX-dependent and -independent functions of the histone chaperone DAXX“. In: *Nature Communications* 8, Nr. 1 (2017) (siehe S. 16, 55).
- [127] J. Schwartzentruber; A. Korshunov; X.Y. Liu; D.T. Jones; E. Pfaff; K. Jacob; D. Sturm; A.M. Fontebasso; D.A. Quang; M. Tonjes u. a.: „Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma“. In: *Nature* 482, Nr. 7384 (2012), S. 226–231 (siehe S. 16).
- [128] J.J. Molenaar; J. Koster; D.A. Zwiijnenburg; P. van Sluis; L.J. Valentijn; I. van der Ploeg; M. Hamdi; J. van Nes; B.A. Westerman; J. van Arkel u. a.: „Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes“. In: *Nature* 483, Nr. 7391 (2012), S. 589–593 (siehe S. 16).

- [129] N.K. Cheung; J. Zhang; C. Lu; M. Parker; A. Bahrami; S.K. Tickoo; A. Heguy; A.S. Pap-
po; S. Federico; J. Dalton u. a.: „Association of age at diagnosis and genetic mutations
in patients with neuroblastoma“. In: *The Journal of the American Medical Association*
307, Nr. 10 (2012), S. 1062–1071 (siehe S. 16).
- [130] J. He; A. Mansouri und S. Das: „Alpha thalassemia/ mental retardation syndrome X-
linked, the alternative lengthening of telomere phenotype, and gliomagenesis: current
understandings and future potential“. In: *Frontiers in Oncology* 322, Nr. 322 (2018)
(siehe S. 16).
- [131] Y. Jiao; P.J. Killela; Z.J. Reitman; A.B. Rasheed; C.M. Heaphy; R.F. de Wilde; F.J.
Rodriguez; S. Rosemberg; S.M. Oba-Shinjo; M.S.K. Nagahashi u. a.: „Frequent ATRX,
CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas“. In:
Oncotarget 3, Nr. 7 (2012), S. 709–722 (siehe S. 16).
- [132] D. Chatterjee; B.D. Radotra; N. Kumar; R.K. Vasishta und S.K. Gupta: „IDH1, ATRX,
and BRAFV600E mutation in astrocytic tumors and their significance in patient outcome
in north Indian population“. In: *Surgical Neurology International* 9, Nr. 29 (2018) (siehe
S. 16).
- [133] H. Ohgaki und P. Kleihues: „The definition of primary and secondary glioblastoma“. In:
Clinical Cancer Research 19, Nr. 4 (2013), S. 764–72 (siehe S. 16).
- [134] C.J. VandenBussche; D.B. Allison; M.K. Graham; V. Charu; A.M. Lennon; C.L. Wolf-
gang; R.H. Hruban und C.M. Heaphy: „Alternative lengthening of telomeres and ATRX/
DAXX loss can be reliably detected in FNAs of pancreatic neuroendocrine tumors“. In:
Cancer Cytopathology 125, Nr. 7 (2017), S. 544–551 (siehe S. 16).
- [135] X. Ren; C. Tu; Z. Tang; R. Ma und Z. Li: „Alternative lengthening of telomeres pheno-
type and loss of ATRX expression in sarcomas“. In: *Oncology Letters* 15, Nr. 5 (2018),
S. 7489–7496 (siehe S. 16).
- [136] T.B. Gaspar; A. Sa; J.M. Lopes; M. Sobrinho-Simoes; P. Soares und J. Vinagre: „Telo-
mere Maintenance Mechanisms in Cancer“. In: *Genes* 9, Nr. 5 (2018) (siehe S. 16).
- [137] C.M. Heaphy; R.F. de Wilde; Y. Jiao; A.P. Klein; B.H. Edil; C. Shi; C. Bettgowda; F.J.
Rodriguez; C.G. Eberhart; S. Hebbar u. a.: „Altered telomeres in tumors with ATRX and
DAXX mutations“. In: *Science* 333, Nr. 6041 (2011), S. 425 (siehe S. 16).
- [138] C.A. Lovejoy; W. Li; S. Reisenweber; S. Thongthip; J. Bruno; T. de Lange; S. De; J.H.
Petrini; P.A. Sung; M. Jasin u. a.: „Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA
damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway“. In:
PLOS Genetics 8, Nr. 7 (2012) (siehe S. 16).
- [139] L.H. Wong; J.D. McGhie; M. Sim; M.A. Anderson; S. Ahn; R.D. Hannan; A.J. George;
K.A. Morgan; J.R. Mann und K.H. Choo: „ATRX interacts with H3.3 in maintaining
telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells“. In: *Genome Research*
20, Nr. 3 (2010), S. 351–360 (siehe S. 16, 58).
- [140] P.W. Lewis; S.J. Elsaesser; K.M. Noh; S.C. Stadler und C.D. Allis: „Daxx is an H3.3-
specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chro-
matin assembly at telomeres“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of
the United States of America* 107, Nr. 32 (2010), S. 14075–14080 (siehe S. 16, 58).

- [141] D. Clynes; C. Jelinska; B. Xella; H. Ayyub; C. Scott; M. Mitson; S. Taylor; D.R. Higgs und R.J. Gibbons: „Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX“. In: *Nature Communications* 6, Nr. 7538 (2015) (siehe S. 16).
- [142] D.T. Nguyen; H.P.J. Voon; B. Xella; C. Scott; D. Clynes; C. Babbs; H. Ayyub; J. Kerry; J.A. Sharpe; J.A. Sloane-Stanley u. a.: „The chromatin remodelling factor ATRX suppresses R-loops in transcribed telomeric repeats“. In: *EMBO Reports* 18, Nr. 6 (2017), S. 914–928 (siehe S. 16).
- [143] A.P. de Koning; W. Gu; T.A. Castoe; M.A. Batzer und D.D. Pollock: „Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome“. In: *PLoS Genetics* 7, Nr. 12 (2011) (siehe S. 17).
- [144] R. Gifford und M. Tristem: „The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses“. In: *Virus Genes* 26, Nr. 3 (2003), S. 291–315 (siehe S. 17).
- [145] C. Stocking und C.A. Kozak: „Murine endogenous retroviruses“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, Nr. 21 (2008), S. 3383–3398 (siehe S. 17, 37).
- [146] H.S. Malik und T.H. Eickbush: „Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses“. In: *Genome Research* 11, Nr. 7 (2001), S. 1187–1197 (siehe S. 17).
- [147] P. Medstrand und D.L. Mager: „Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family“. In: *Journal of Virology* 72, Nr. 12 (1998), S. 9782–9787 (siehe S. 18).
- [148] D. Ribet; M. Dewannieux und T. Heidmann: „An active murine transposon family pair: retrotransposition of "master" MusD copies and ETn trans-mobilization“. In: *Genome Research* 14, Nr. 11 (2004), S. 2261–2267 (siehe S. 18).
- [149] P. Jern und J.M. Coffin: „Effects of retroviruses on host genome function“. In: *Annual Review of Genetics* 42 (2008), S. 709–732 (siehe S. 18).
- [150] R. Kurth und N. Bannert: „Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses“. In: *International Journal of Cancer* 126, Nr. 2 (2010), S. 306–314 (siehe S. 18).
- [151] K. Kaer und M. Speek: „Retroelements in human disease“. In: *Gene* 518, Nr. 2 (2013), S. 231–241 (siehe S. 18).
- [152] L.N. van de Lagemaat; J.R. Landry; D.L. Mager und P. Medstrand: „Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions“. In: *Trends in Genetics* 19, Nr. 10 (2003), S. 530–536 (siehe S. 18).
- [153] C.N. Ting; M.P. Rosenberg; C.M. Snow; L.C. Samuelson und M.H. Meisler: „Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene“. In: *Genes & Development* 6, Nr. 8 (1992), S. 1457–1465 (siehe S. 18).
- [154] J.L. Blond; D. Lavillette; V. Cheynet; O. Bouton; G. Oriol; S. Chapel-Fernandes; B. Mandrand; F. Mallet und F.L. Cosset: „An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor“. In: *Journal of Virology* 74, Nr. 7 (2000), S. 3321–3329 (siehe S. 18).

- [155] S. Blaise; N. de Parseval; L. Benit und T. Heidmann: „Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, Nr. 22 (2003), S. 13013–13018 (siehe S. 18).
- [156] S. Blaise; N. de Parseval und T. Heidmann: „Functional characterization of two newly identified human endogenous retrovirus coding envelope genes“. In: *Retrovirology* 2, Nr. 19 (2005) (siehe S. 18).
- [157] A. Dupressoir; C. Vernochet; O. Bawa; F. Harper; G. Pierron; P. Opolon und T. Heidmann: „Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, Nr. 29 (2009), S. 12127–12132 (siehe S. 18).
- [158] S. Groh und G. Schotta: „Silencing of endogenous retroviruses by heterochromatin“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, Nr. 11 (2017), S. 2055–2065 (siehe S. 18, 56).
- [159] T.P. Hurst und G. Magiorkinis: „Epigenetic control of human endogenous retrovirus expression: focus on regulation of long-terminal repeats (LTRs)“. In: *Viruses* 9, Nr. 6 (2017) (siehe S. 18).
- [160] D.C. Leung und M.C. Lorincz: „Silencing of endogenous retroviruses: when and why do histone marks predominate?“ In: *Trends in Biochemical Sciences* 37, Nr. 4 (2012), S. 127–133 (siehe S. 18).
- [161] W.D. Gifford; S.L. Pfaff und T.S. Macfarlan: „Transposable elements as genetic regulatory substrates in early development“. In: *Trends in Cell Biology* 23, Nr. 5 (2013), S. 218–226 (siehe S. 18).
- [162] J.A. Yoder; C.P. Walsh und T.H. Bestor: „Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites“. In: *Trends in Genetics* 13, Nr. 8 (1997), S. 335–340 (siehe S. 19).
- [163] C.P. Walsh; J.R. Chaillet und T.H. Bestor: „Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation“. In: *Nature Genetics* 20, Nr. 2 (1998), S. 116–117 (siehe S. 19, 54).
- [164] D. Bourc'his und T.H. Bestor: „Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L“. In: *Nature* 431, Nr. 7004 (2004), S. 96–99 (siehe S. 19).
- [165] Y. Kato; M. Kaneda; K. Hata; K. Kumaki; M. Hisano; Y. Kohara; M. Okano; E. Li; M. Nozaki und H. Sasaki: „Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse“. In: *Human Molecular Genetics* 16, Nr. 19 (2007), S. 2272–2280 (siehe S. 19).
- [166] D. Pannell; C.S. Osborne; S. Yao; T. Sukonnik; P. Pasceri; A. Karaiskakis; M. Okano; E. Li; H.D. Lipshitz und J. Ellis: „Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code“. In: *The EMBO Journal* 19, Nr. 21 (2000), S. 5884–5894 (siehe S. 19, 39, 54).

- [167] L.K. Hutnick; X. Huang; T.C. Loo; Z. Ma und G. Fan: „Repression of retrotransposal elements in mouse embryonic stem cells is primarily mediated by a DNA methylation-independent mechanism“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285, Nr. 27 (2010), S. 21082–21091 (siehe S. 19, 54).
- [168] J.H. Thomas und S. Schneider: „Coevolution of retroelements and tandem zinc finger genes“. In: *Genome Research* 21, Nr. 11 (2011), S. 1800–1812 (siehe S. 20, 52).
- [169] P. Yang; Y. Wang und T.S. Macfarlan: „The Role of KRAB-ZFPs in Transposable Element Repression and Mammalian Evolution“. In: *Trends in Genetics* 33, Nr. 11 (2017), S. 871–881 (siehe S. 20, 52).
- [170] Inc. Clontech Laboratories: *In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual*. Protocol No. PT5162-1, Version No. 072012 (siehe S. 28).
- [171] J. Jurka; V.V. Kapitonov; A. Pavlicek; P. Klonowski; O. Kohany und J. Walichiewicz: „Rebase Update, a database of eukaryotic repetitive elements“. In: *Cytogenetic and Genome Research* 110, Nr. 1-4 (2005), S. 462–467 (siehe S. 39).
- [172] D.J. Picketts; D.R. Higgs; S. Bachoo; D.J. Blake; O.W. Quarrell und R.J. Gibbons: „ATR-X encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome“. In: *Human molecular genetics* 5, Nr. 12 (1996), S. 1899–1907 (siehe S. 41).
- [173] L. Noe und G. Kucherov: „YASS: enhancing the sensitivity of DNA similarity search“. In: *Nucleic Acids Research* 33 (2005), W540–543 (siehe S. 49, 50).
- [174] J.A. Law und S.E. Jacobsen: „Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals“. In: *Nature Reviews Genetics* 11, Nr. 3 (2010), S. 204–220 (siehe S. 51).
- [175] F. Butter; D. Kappei; F. Buchholz; M. Vermeulen und M. Mann: „A domesticated transposon mediates the effects of a single-nucleotide polymorphism responsible for enhanced muscle growth“. In: *EMBO Reports* 11, Nr. 4 (2010), S. 305–311 (siehe S. 52).
- [176] D.M. Messerschmidt; W. de Vries; M. Ito; D. Solter; A. Ferguson-Smith und B.B. Knowles: „Trim28 is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition“. In: *Science* 335, Nr. 6075 (2012), S. 1499–1502 (siehe S. 54).
- [177] P. Turelli; N. Castro-Diaz; F. Marzetta; A. Kapopoulou; C. Raclot; J. Duc; V. Tieng; S. Quenneville und D. Trono: „Interplay of TRIM28 and DNA methylation in controlling human endogenous retroelements“. In: *Genome Research* 24, Nr. 8 (2014), S. 1260–1270 (siehe S. 54).
- [178] E.L. Kuff und K.K. Lueders: „The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects“. In: *Advances in Cancer Research* 51 (1988), S. 183–276 (siehe S. 55).
- [179] Y. Xue; R. Gibbons; Z. Yan; D. Yang; T.L. McDowell; S. Sechi; J. Qin; S. Zhou; D. Higgs und W. Wang: „The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, Nr. 19 (2003), S. 10635–10640 (siehe S. 55).

- [180] A.M. Ishov; A.G. Sotnikov; D. Negorev; O.V. Vladimirova; N. Neff; T. Kamitani; E.T. Yeh; J.F. Strauss und G.G. Maul: „PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1“. In: *The Journal of Cell Biology* 147, Nr. 2 (1999), S. 221–234 (siehe S. 58).
- [181] C.C. Chang; D.Y. Lin; H.I. Fang; R.H. Chen und H.M. Shih: „Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of Smad4“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280, Nr. 11 (2005), S. 10164–10173 (siehe S. 58).
- [182] A.P. Feinberg: „The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation“. In: *New England Journal of Medicine* 378, Nr. 14 (2018), S. 1323–1334 (siehe S. 58).
- [183] D. Rodenhiser und M. Mann: „Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications“. In: *Canadian Medical Association Journal* 174, Nr. 3 (2006), S. 341–348 (siehe S. 59).
- [184] M.G. Butler: „Imprinting disorders: non-Mendelian mechanisms affecting growth“. In: *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 15, Nr. Suppl. 5 (2002), S. 1279–1288 (siehe S. 59).
- [185] R. Kanwal und S. Gupta: „Epigenetic modifications in cancer“. In: *Clinical Genetics* 81, Nr. 4 (2012), S. 303–311 (siehe S. 59).
- [186] C.J. Klein und E.E. Benarroch: „Epigenetic regulation: basic concepts and relevance to neurologic disease“. In: *Neurology* 82, Nr. 20 (2014), S. 1833–1840 (siehe S. 59).
- [187] M. Busslinger und A. Tarakhovsky: „Epigenetic control of immunity“. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, Nr. 6 (2014) (siehe S. 59).
- [188] V. Gröger und H. Cynis: „Human endogenous retroviruses and their putative role in the development of autoimmune disorders such as multiple sclerosis“. In: *Frontiers in Microbiology* 9, Nr. 265 (2018) (siehe S. 59).
- [189] M.G. Jasiulionis: „Abnormal epigenetic regulation of immune system during aging“. In: *Frontiers in Immunology* 9, Nr. 197 (2018) (siehe S. 59).
- [190] M.A. Gama-Sosa; V.A. Slagel; R.W. Trewyn; R. Oxenhandler; K.C. Kuo; C.W. Gehrke und M. Ehrlich: „The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors“. In: *Nucleic Acids Research* 11, Nr. 19 (1983), S. 6883–6894 (siehe S. 59).
- [191] M. Ehrlich: „DNA hypomethylation in cancer cells“. In: *Epigenomics* 1, Nr. 2 (2009), S. 239–259 (siehe S. 59).
- [192] A. Wilson; B. Power und P. Molloy: „DNA hypomethylation and human diseases“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1775, Nr. 1 (2007), S. 138–162 (siehe S. 59, 60).
- [193] R.F. Pérez; J.R. Tejedor; G.F. Bayón; A.F. Fernández und M.F. Fraga: „Distinct chromatin signatures of DNA hypomethylation in aging and cancer“. In: *Aging Cell* 17, Nr. 3 (2018) (siehe S. 59).
- [194] N. Sato; A. Maitra; N. Fukushima; N.T. van Heek; H. Matsubayashi; C.A. Iacobuzio-Donahue; C. Rosty und M. Goggins: „Frequent hypomethylation of multiple genes over-expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma“. In: *Cancer Research* 63, Nr. 14 (2003), S. 4158–4166 (siehe S. 59).

- [195] M. Nishigaki; K. Aoyagi; I. Danjoh; M. Fukaya; K. Yanagihara; H. Sakamoto; T. Yoshida und H. Sasaki: „Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays“. In: *Cancer Research* 65, Nr. 6 (2005), S. 2115–2124 (siehe S. 59).
- [196] T. Ogishima; H. Shiina; J.E. Breault; L. Tabatabai; W.W. Bassett; H. Enokida; L.-C. Li; T. Kawakami; S. Shinji Urakami; L.A. Ribeiro-Filho u. a.: „Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer“. In: *Clinical Cancer Research* 11, Nr. 3 (2005), S. 1028–1036 (siehe S. 59).
- [197] H. Y. Sung; S.-D. Yang; A.K. Park; W. Ju und J.-H. Ahn: „Aberrant hypomethylation of solute carrier family 6 member 12 promoter induces metastasis of ovarian cancer“. In: *Yonsei Medical Journal* 58, Nr. 1 (2017), S. 27–34 (siehe S. 59).
- [198] A. Gupta; A.K. Godwin; L. Vanderveer; A. Lu und J. Liu: „Hypomethylation of the synuclein γ gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma“. In: *Cancer Research* 63, Nr. 3 (2003), S. 664–673 (siehe S. 59).
- [199] S. Funaki; T. Nakamura; T. Nakatani; H. Umehara; N. Nakashima; M. Okumura; K. Oboki; K. Matsumoto; H. Saito und T. Nakano: „Global DNA hypomethylation coupled to cellular transformation and metastatic ability“. In: *FEBS Letters* 589, Nr. 24 Pt. B (2015), S. 4053–4060 (siehe S. 59).
- [200] B. Ateeq; A. Unterberger; M. Szyf und S. Rabbani: „Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes In vitro and in vivo“. In: *Neoplasia* 10, Nr. 3 (2008), S. 266–278 (siehe S. 59).
- [201] H. Liu; W. Liu; Y. Wu; Y. Zhou; R. Xue; C. Luo; L. Wang; W. Zhao; J.-D. Jiang und J. Liu: „Loss of epigenetic control of synuclein- γ gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers“. In: *Cancer Research* 65, Nr. 17 (2005), S. 7635–7643 (siehe S. 59).
- [202] A. Strohl; K. Mori; S. Akers; W. Bshara; B. Buttin; P.J. Frederick; I.B. Helenowski; C.D. Morrison; K. Odunsi; J.C. Schink u. a.: „Synuclein- γ (SNCG) expression in ovarian cancer is associated with high-risk clinicopathologic disease“. In: *Journal of Ovarian Research* 9, Nr. 75 (2016) (siehe S. 59).
- [203] C. Liu; B. Shi; C. Hao; Q. Wang; Q. Lv; N. Xing; J. Shou; L. Qu; Y. Gao; C. Qin u. a.: „Urine gamma-synuclein as a biomarker for the diagnosis of bladder cancer“. In: *Oncotarget* 7, Nr. 28 (2016), S. 43432–43441 (siehe S. 59).
- [204] L. Min; C. Zhang; R. Ma; X. Li; H. Yuan; Y. Li; R. Chen; C. Liu; J. Guo; L. Qu u. a.: „Overexpression of synuclein- γ predicts lack of benefit from radiotherapy for breast cancer patients“. In: *BMC Cancer* 16, Nr. 717 (2016) (siehe S. 59).
- [205] J. Shi; P. Chen; J. Sun; Y. Song; B. Ma; P. Gao; X. Chen und Z. Wang: „MicroRNA-1258: An invasion and metastasis regulator that targets heparanase in gastric cancer“. In: *Oncology Letters* 13, Nr. 5 (2017), S. 3739–3745 (siehe S. 59).
- [206] O. Vornicova; I. Boyango; S. Feld; I. Naroditsky; O. Kazarin; Y. Zohar; Y. Tiram; N. Ilan; O. Ben-Izhak; I. Vlodaysky u. a.: „The prognostic significance of heparanase expression in metastatic melanoma“. In: *Oncotarget* 7, Nr. 46 (2016), S. 74678–74685 (siehe S. 59).

- [207] M. Ehrlich: „DNA methylation in cancer: too much, but also too little“. In: *Oncogene* 21, Nr. 35 (2002), S. 5400–5413 (siehe S. 60).
- [208] M. Widschwendter; G. Jiang; C. Woods; H.M. Müller; H. Fiegl; G. Goebel; C. Marth; E. Müller-Holzner; A.G. Zeimet; P.W. Laird u. a.: „DNA hypomethylation and ovarian cancer biology“. In: *Cancer Research* 64, Nr. 13 (2004), S. 4472–4480 (siehe S. 60).
- [209] F.F. Costa; V.A. Paixão; F.P. Cavalher; K.B. Ribeiro; I.W. Cunha; J.A.Jr. Rinck; M. O’Hare; A Mackay; F.A. Soares; R.R. Brentani u. a.: „SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer“. In: *Cancer Genetics and Cytogenetics* 165, Nr. 2 (2006), S. 135–143 (siehe S. 60).
- [210] A. Daskalos; G. Nikolaidis; G. Xinarianos; P. Savvari; A. Cassidy; R. Zakopoulou; A. Kotsinas; V. Gorgoulis; J. Field und T. Liloglou: „Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer“. In: *International Journal of Cancer* 124, Nr. 1 (2009), S. 81–87 (siehe S. 60).
- [211] M. Kim; J. White-Cross; L. Shen; J. Issa und A. Rashid: „Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 in hepatocellular carcinomas“. In: *Modern Pathology* 22, Nr. 3 (2009), S. 442–449 (siehe S. 60).
- [212] E. Sunami; M. de Maat; A. Vu; R.R. Turner und D.S.B. Hoon: „LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression“. In: *PLoS one* 6, Nr. 4 (2011) (siehe S. 60).
- [213] A. Koch; S.C. Joosten; Z. Feng; T.C. de Ruijter; M.X. Draht; V. Melotte; K.M. Smits; J. Veeck; J.G. Herman; L. van Neste u. a.: „Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited“. In: *Nature Reviews Clinical Oncology* (2018, in press) (siehe S. 60).
- [214] H. Zeng; B. He; C. Yi und J. Peng: „Liquid biopsies: DNA methylation analyses in circulating cell-free DNA“. In: *Journal of Genetics and Genomics* (2018, in press) (siehe S. 60).
- [215] Y. Nagai; E. Sunami; Y. Yamamoto; K. Hata; S. Okada; K. Murono; K. Yasuda; K. Otani; T. Nishikawa; T. Tanaka u. a.: „LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer“. In: *Oncotarget* 8, Nr. 7 (2017), S. 11906–11916 (siehe S. 60).
- [216] F. Zhou; M. Li; Y. Wei; K. Lin; Y. Lu; J. Shen; G.L. Johanning und F. Wang-Johanning: „Activation of HERV-K Env protein is essential for tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells“. In: *Oncotarget* 7, Nr. 51 (2016), S. 84093–84117 (siehe S. 60, 61).
- [217] P. Fava; M. Bergallo; C. Astrua; M. Brizio; I. Galliano; P. Montanari; P.A. Tovo; M. Novelli; P. Savoia; P. Quaglino u. a.: „Human endogenous retrovirus expression in primary cutaneous T-cell lymphomas“. In: *Dermatology* 232, Nr. 1 (2016), S. 38–43 (siehe S. 60).
- [218] W. Goering; T. Ribarska und W. Schulz: „Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer“. In: *Carcinogenesis* 32, Nr. 10 (2011), S. 1484–1492 (siehe S. 60).
- [219] P.S. Moore und Y. Chang: „Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology“. In: *Nature Reviews Cancer* 10, Nr. 12 (2010), S. 878–889 (siehe S. 60).
- [220] G. Kassiotis: „Endogenous retroviruses and the development of cancer“. In: *The Journal of Immunology* 192, Nr. 4 (2014), S. 1343–1349 (siehe S. 60).

- [221] M.K. Rudd; J. Keene; B. Bunke; E.B. Kaminsky; M.P. Adam; J.G. Mülle; D.H. Ledbetter und C.L. Martin: „Segmental duplications mediate novel, clinically relevant chromosome rearrangements“. In: *Human Molecular Genetics* 18, Nr. 16 (2009), S. 2957–2962 (siehe S. 60).
- [222] J. Vogt; A. Wernstedt; T. Ripperger; B. Pabst; J. Zschocke; C. Kratz und K. Wimmer: „PMS2 inactivation by a complex rearrangement involving an HERV retroelement and the inverted 100-kb duplicon on 7p22.1“. In: *European Journal of Human Genetics* 24, Nr. 11 (2016), S. 1598–1604 (siehe S. 60).
- [223] T.A. Wallace; R.F. Downey; C. J. Seufert; A. Schetter; T.H. Dorsey; C.A. Johnson; R. Goldman; C.A. Loffredo; P. Yan; F.J. Sullivan u. a.: „Elevated HERV-K mRNA expression in PBMC is associated with a prostate cancer diagnosis particularly in older men and smokers“. In: *Carcinogenesis* 35, Nr. 9 (2014), S. 2074–2083 (siehe S. 60).
- [224] P. Pérot; C.S. Mullins; M. Naville; C. Bressan; M. Hühns; M. Gock; F. Kühn; J.-N. Volff; V. Trillet-Lenoir; M. Linnebacher u. a.: „Expression of young HERV-H loci in the course of colorectal carcinoma and correlation with molecular subtypes“. In: *Oncotarget* 6, Nr. 37 (2015), S. 40095–40111 (siehe S. 60).
- [225] W. Ma; Z. Hong; H. Liu; X. Chen; L. Ding; Z. Liu; F. Zhou und Y. Yuan: „Human endogenous retroviruses-K (HML-2) expression is correlated with prognosis and progress of hepatocellular carcinoma“. In: *BioMed Research International*, Nr. 8201642 (2016) (siehe S. 60).
- [226] J. Zhao; K. Rycaj; S. Geng; M. Li; J.B. Plummer; B. Yin; H. Liu; X. Xu; Y. Zhang; Y. Yan u. a.: „Expression of human endogenous retrovirus type K envelope protein is a novel candidate prognostic marker for human breast cancer“. In: *Genes & Cancer* 2, Nr. 9 (2011), S. 914–922 (siehe S. 61).
- [227] F. Wang-Johanning; M. Li; F.J. Esteva; K.R. Hess; B. Yin; K. Rycaj; J.B. Plummer; J.G. Garza; S. Ambs und G.L. Johanning: „Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer“. In: *International Journal of Cancer* 134, Nr. 3 (2014), S. 587–595 (siehe S. 61).
- [228] A.T. Baines; D. Xu und C.J. Der: „Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues“. In: *Future Medicinal Chemistry* 3, Nr. 14 (2011), S. 1787–1808 (siehe S. 61).
- [229] N. Bannert; H. Hofmann; A. Block und O. Hohn: „HERVs new role in cancer: from accused perpetrators to cheerful protectors“. In: *Frontiers in Microbiology* 9, Nr. 178 (2018) (siehe S. 61).
- [230] F. Wolff; M. Leisch; R. Greil; A. Risch und L. Pleyer: „The double-edged sword of (re)expression of genes by hypomethylating agents: from viral mimicry to exploitation as priming agents for targeted immune checkpoint modulation“. In: *Cell Communication and Signaling* 15, Nr. 13 (2017) (siehe S. 61).
- [231] D. Roulois; H.L. Yau; R. Singhania; Y. Wang; A. Danesh; S.Y. Shen; H. Han; G. Liang; T.J. Pugh; P.A. Jones u. a.: „DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts“. In: *Cell* 162, Nr. 5 (2015), S. 961–973 (siehe S. 61).

- [232] K.B. Chiappinelli; P.L. Strissel; A. Desrichard; H. Li; C. Henke; B. Akman; A. Hein; N.S. Rote; L.M. Cope; A. Snyder u. a.: „Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses“. In: *Cell* 162, Nr. 5 (2015), S. 974–986 (siehe S. 61).
- [233] K. Agrawal; V. Das; P. Vyas und M. Hajdúch: „Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs – A comprehensive review from discovery to clinic“. In: *Pharmacology & Therapeutics* (2018, in press) (siehe S. 61).
- [234] C. Balch; J.S. Montgomery; H.-I. Paik; S. Kim; T. H.-M. Huang und K.P. Nephew: „New anti-cancer strategies: epigenetic therapies and biomarkers“. In: *Frontiers in Bioscience* 10 (2005), S. 1897–1931 (siehe S. 61).
- [235] E. Kaminskas; A. Farrell; S. Abraham; A. Baird; L.-S. Hsieh; S.-L. Lee; J. K. Leighton; H. Patel; A. Rahman; R. Sridhara u. a.: „Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes“. In: *Clinical Cancer Research* 11, Nr. 10 (2005), S. 3604–3608 (siehe S. 61).