

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

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

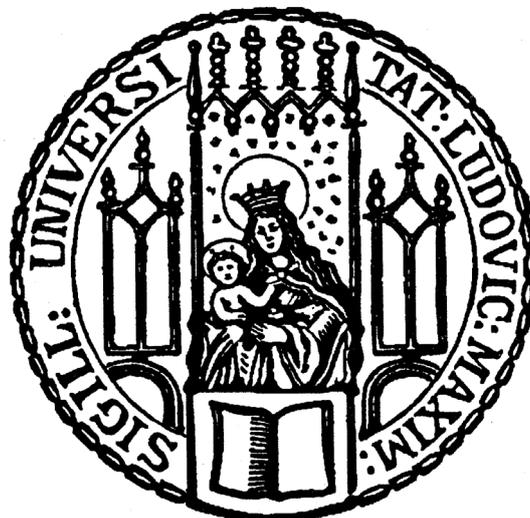
Untersuchung von Methyltransferasen des Histon H3 Lysins 56

Dissertation

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

Vorgelegt von
Raphael Bariş Sami Kunisch
aus
München

2021



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Aloys Schepers

Prof. Dr. Robert Schneider

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. rer. nat. Sandra B. Hake

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Datum der mündlichen Prüfung: 18.11.2021

*Meinen Eltern,
die mir die Gene
&
meiner Familie sowie meinen Freunden,
die mir die Umwelt schenken*

Der wichtigste Versuch

„Wenn es die Verwirklichung von Urträumen ist, fliegen zu können und mit den Fischen zu reisen, sich unter den Leibern von Bergriesen durchzubohren, mit göttlichen Geschwindigkeiten Botschaften zu senden, das Unsichtbare und Ferne zu sehen und sprechen zu hören, Tote sprechen zu hören, sich in wundertätigen Genesungsschlaf versenken zu lassen, mit lebenden Augen erblicken zu können, wie man zwanzig Jahre nach seinem Tode aussehen wird, in flimmernden Nächten tausend Dinge über und unter dieser Welt zu wissen, die früher niemand gewußt hat, wenn Licht, Wärme, Kraft, Genuß, Bequemlichkeit Urträume der Menschheit sind, – dann ist die heutige Forschung nicht nur Wissenschaft, sondern ein Zauber, eine Zeremonie von höchster Herzens- und Hirnkraft, vor der Gott eine Falte seines Mantels nach der anderen öffnet, eine Religion, deren Dogmatik von der harten, mutigen, beweglichen, messerkühlen und -scharfen Denklehre der Mathematik durchdrungen und getragen wird. [...]

Er war weniger wissenschaftlich als menschlich verliebt in die Wissenschaft. Er sah, daß sie in allen Fragen, wo sie sich für zuständig hält, anders denkt als gewöhnliche Menschen. Wenn man statt wissenschaftlicher Anschauungen Lebensanschauung setzen würde, statt Hypothese Versuch und statt Wahrheit Tat, so gäbe es kein Lebenswerk eines ansehnlichen Naturforschers oder Mathematikers, das an Mut und Umsturzkraft nicht die größten Taten der Geschichte weit übertreffen würde. Der Mann war noch nicht auf der Welt, der zu seinen Gläubigen hätte sagen können: Stehlt, mordet, treibt Unzucht – unsere Lehre ist so stark, daß sie aus der Jauche eurer Sünden schäumend helle Bergwässer macht; aber in der Wissenschaft kommt es alle paar Jahre vor, daß etwas, das bis dahin als Fehler galt, plötzlich alle Anschauungen umkehrt oder daß ein unscheinbarer und verachteter Gedanke zum Herrscher über ein neues Gedankenreich wird, und solche Vorkommnisse sind dort nicht bloß Umstürze, sondern führen wie eine Himmelsleiter in die Höhe. Es geht in der Wissenschaft so stark und unbekümmert und herrlich zu wie in einem Märchen. Und Ulrich fühlte: die Menschen wissen das bloß nicht; sie haben keine Ahnung, wie man schon denken kann; wenn man sie neu denken lehren könnte, würden sie auch anders leben.“

Robert Musil, *Der Mann ohne Eigenschaften*, Erstes Buch -Kapitel 11

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Zusammenfassung	9
1. Einleitung	10
1.1 Genetik.....	10
1.1.1 Die Entdeckung der Erbinformation und ihrer Codierung.....	10
1.1.2 Organisation und Regulation der DNA in Form von Chromatin	11
1.2 Mechanismen der Chromatinmodifikation	14
1.2.1 DNA-Methylierung	16
1.2.2 Chromatin-Remodeling	17
1.2.3 RNA-basierende Mechanismen.....	17
1.2.4 Nukleäre Architektur	18
1.2.5 Histonvarianten	19
1.2.6 Posttranslationale Histonmodifikationen	21
2. Zielsetzung	31
2.1 Welche Histonmethyltransferasen sind an der Methylierung von H3K56 beteiligt? 31	
2.1.1 Untersuchung von Ähnlichkeiten der H3K9- & K56-Methylierung.....	31
2.1.2 Explorative Identifikation neuer H3K56-KMTs mittels RNAi-Screenings	31
3. Material	32
3.1 Labor und Verbrauchsmaterialien	32
3.1.1 Einweg- und Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.2 Reaktionsgefäße und Kulturschalen.....	32
3.1.3 Pipetten- und Pipettenspitzen	33
3.1.4 Entwicklungs-, Reinigungs-, Träger- und Waschlösungen	33
3.1.5 Filme und Membranen.....	34
3.2 Geräte	34
3.2.1 Autoklaven, Bunsenbrenner und Destillatoren	34
3.2.2 Brut- und Kühlschränke	34
3.2.3 Entwickler, Trennsäulen, Blot- und Gelkammern	35
3.2.4 Chromatograph, Mikroskope, Scanner, Spektrometer, Thermocycler und Zytometer.....	35
3.2.5 Mikrowellen und Strahler.....	36
3.2.6 Mischer, Rotatoren und Zentrifugen.....	36
3.2.7 Pipetten	37
3.2.8 Software	37
3.2.9 Waagen	37
3.3 Chemikalien & Reagenzien	37

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Antibiotika und Zytostatika	37
3.3.2	Salze	38
3.3.3	Säuren und Basen	39
3.3.4	Organische Reagenzien und Lösungsmittel	39
3.4	Kits	41
3.5	Enzyme	41
3.6	Substrate	42
3.7	Standardpuffer und -lösungen	42
3.7.1	Denaturierungs-Puffer für Western Blot Membranen	42
3.7.2	Nukleasefreies Wasser	42
3.7.3	PBS-Puffer, 10x	42
3.7.4	Transfer Puffer für Western Blots (Bjerrum Schafer-Nielsen Puffer mit SDS)	43
3.7.5	HILIC-Puffer A für Hochdruck Säulenchromatographie	43
3.7.6	HILIC-Puffer B für Hochdruck Säulenchromatographie	43
3.7.7	HILIC-Lagerungspuffer für Hochdruck Säulenchromatographie	44
3.7.8	Hypotoner Lysepuffer zur Histonextraktion	44
3.7.9	PBS-Tween Blocklösung für qualitative Western Blots	44
3.7.10	PBS Blocklösung für quantitative Western Blots	45
3.7.11	PBS-Tween Waschlösung für qualitative Western Blots	45
3.7.12	SDS-PAGE Ladepuffer, 5x	45
3.7.13	SDS-PAGE Laufpuffer, 10x	46
3.7.14	TBE-Puffer	46
3.7.15	TBS-Puffer, 10x	47
3.8	si-RNAs	47
3.9	Oligonukleotide	48
3.10	Primer	48
3.11	Peptide & Proteine	50
3.12	Plasmide	50
3.13	Antikörper	50
3.14	Fluoreszenzfarbstoffe	51
3.15	Kultur-, Nährmedien und Zusätze	51
3.16	Bakterien- und Zelllinien	52
4.	Methoden	53
4.1	Zellbiologische Methoden	53
4.1.1	Kultivierung und Ernte von Zellen	53
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl	54
4.1.3	Gefrierlagerung	54
4.1.4	Auftauen	54
4.1.5	Durchflusszytometrie (FACS)	54

Inhaltsverzeichnis

4.2 Biochemische Methoden	56
4.2.1 Säureausfällung von Histonen.....	56
4.2.2 Acrylamid-Gelelektrophorese.....	56
4.2.3 Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau	58
4.2.4 Westernblot-Analyse	58
4.2.5 Hochdruck Säulenchromatographie (RP-HPLC)	60
4.3 Molekularbiologische Methoden	61
4.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	61
4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	62
4.3.3 Gezielte Herstellung von DNA in Bakterienzellen.....	63
4.3.4 Stabile Transfektion von HeLa-Zellen	66
4.3.5 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	66
4.3.6 Transfektionen mit siRNA	66
4.3.7 mRNA-Expressionsanalyse	67
5. Ergebnisse.....	70
5.1 G9a vermittelt die Monomethylierung von H3K9 und H3K56 in embryonalen Stammzellen der Maus	70
5.1.1 Verringerte Methylierung von H3K9 und H3K56 in G9a ^{-/-} mES Zellen.....	70
5.1.2 Nachweis der Isolierung von H3 aus Wildtyp- und G9a ^{-/-} mES Zellen mittels Säulenchromatographie	72
5.1.3 Verlust der Monomethylierung von K9 & K56 in Histonvarianten H3.2 & H3.3 bei G9a ^{-/-} mES Zellen	75
5.2 Antikörper gegen Methylierungen von H3K9 & H3K56 zeigen unterschiedliche Spezifitäten	76
5.2.1 Nachweis hochgradiger Spezifität des Antikörpers gegen H3K56me3	76
5.2.2 Befriedigender Spezifitätsnachweis des Antikörpers gegen H3K56me1	79
5.2.3 HeLa-Zellen exprimieren exogene GFP-H3 Proteine nach Transfektion	81
5.2.4 α -H3K9me1 und α -H3K56me1 können Histone mit Punktmutation nicht unterscheiden.....	85
5.3 Identifikation von Methyltransferasen deren siRNA-Knockdown H3K56me3 verringert.....	87
5.3.1 Screening von 43 Kandidaten mittels siRNA-Knockdown zeigt vielfache Abnahme des H3K56me3-Signals.....	88
5.3.2 Bestätigung der H3K56me3-Signalreduktion in biologischen Replikaten	89
5.3.3 Nachweis des Knockdowns auf Genexpressionsebene bei vier Kandidaten..	90
6. Diskussion	93
6.1 Interpretation von Veränderungen der Methylierung von H3K9 & K56 in G9a Knockout mES Zellen.....	93

Inhaltsverzeichnis

6.2 Bewertung der verwendeten Antikörper & Diskussion des Verifikationsversuchs an punktmutierten exogenen Histonen	95
6.3 Identifizierung potenzieller Histonmethyltransferasen der Trimethylierung von Histon 3 Lysin 56 mit Literaturvergleich	97
Abkürzungsverzeichnis	102
Abbildungsverzeichnis	107
Tabellenverzeichnis	108
Anhang	109
Literaturverzeichnis	112
Danksagung	124
Affidavit	125
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Zusammenfassung

Die Genetik hat sich nach der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahr 2001 zunehmend der strukturellen Organisation und der daraus resultierenden Regulation der DNA zugewendet. Im Zentrum dieser Forschung steht dabei die räumliche Komprimierung des Erbguts zu Chromatin, welches, neben der verdichteten DNA, spezielle basische Proteine, die sogenannten Histone, enthält. Posttranslationale Modifikationen von Histonproteinen können die räumliche Anordnung von Chromatin verändern und somit regulatorisch auf die DNA einwirken. Dies erfolgt entweder durch direkte Beeinflussung der Interaktion zwischen DNA und Histon oder durch Rekrutierung von Effektorproteinen welche ihrerseits weitere Wirkungen entfalten. Eine dieser Modifikationen ist die Methylierung des Histons H3 an seinem Lysin 56, das im Kernbereich der Einheit aus Histonoktamer und DNA, dem Nukleosom, liegt und deren enzymatische Entstehung in dieser Arbeit untersucht wurde. Es wurde die Hypothese überprüft, dass H3K56, analog zum strukturell ähnlichen H3K9, ebenfalls durch die KMT *G9a* methyliert wird. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen säureextrahierter sowie säulen-chromatographisch aufgereinigter Histone aus mES Zellen mit homozygotem Knockout des Gens für *G9a* konnte gezeigt werden, dass diese gegenüber Wildtyp-Kontrollen einen Verlust der Mono- sowie Dimethylierung von H3K56 aufwiesen, und es sich somit bei *G9a* um eine KMT von H3K56 handelt. Die Güte der verwendeten Antikörper wurden an mehreren Experimenten erfolgreich verifiziert, wobei der Versuch einer Überprüfung an exogen exprimierten punktmutierten Histonen nicht gelang und dieser Ansatz verworfen wurde. Es folgte eine explorative Untersuchung der Trimethylierung von H3K56 mittel RNA-Interferenz. Hierzu wurden von 43 Proteinen, welche die für Histonmethylierung verantwortliche Proteindomäne SET enthalten, ein Knockdown-Screen durchgeführt, um gänzlich neue KMTs von H3K56 zu identifizieren. Bei 17 dieser Kandidaten zeigte sich hier immunhistochemisch ein replizierbarer Signalverlust für H3K56me₃, wobei für vier dieser potenziellen KMTs durch RT-qPCR Analyse auch eine reduzierte Genexpression zur Verifikation des Knockdowns gelang. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Enzym *G9a* die Monomethylierung von H3K56 katalysiert und hierbei in mES Zellen die Histonvarianten H3.2 & H3.3 zu bevorzugen scheint. Zudem wurden für mehrere Enzyme Hinweise auf deren Beteiligung an der Trimethylierung von H3K56 entdeckt.

1. Einleitung

1.1 Genetik

1.1.1 Die Entdeckung der Erbinformation und ihrer Codierung

Genetik, die Lehre der Erbanlage von Lebewesen als Wissenschaft, geht zurück auf die Beobachtungen und Kreuzungsexperimente von Gregor Mendel an Erbsen, welche dieser 1866 erstmals veröffentlichte und von denen sich die, bis heute für die Mehrzahl der genetischen Merkmale gültigen, „Mendel’schen Regeln“ der Vererbungslehre ableiten (Mendel, 1866). Diese bilden das mechanistische Rückgrat für die von Charles Darwin 1859 postulierte Evolutionstheorie, wobei der Zusammenhang zwischen den Mechanismen der Vererbung einerseits sowie der Theorie der natürlichen Selektion und dem Überleben des Bestangepassten („survival of the fittest“) (Darwin, 1859) andererseits erst Jahrzehnte später hergestellt wurde (Correns, 1924). 1871, fünf Jahre nach Mendels Publikation, veröffentlichte Friedrich Miescher seine Entdeckung des „Nucleins“ aus Zellkernen, dessen Funktion und Zusammensetzung damals jedoch noch völlig unbekannt waren (Miescher-Rüsch, 1871). Es folgten viele Jahre intensiver Forschung, in denen sich die Genetik als eigenständiger Wissenschaftszweig etablierte. Den nächsten großen Durchbruch im noch immer jungen Forschungsfeld der Genetik stellte im Jahr 1928 das Griffith-Experiment dar. In diesem wurde erstmals der nicht erbliche Austausch von genetischer Information zwischen Bakterien, die sogenannte Transformation, beschrieben (Griffith, 1928). 16 Jahre später wies der kanadische Mediziner Oswald Avery mit seinen Kollegen nach, dass es sich bei der Desoxyribonukleinsäure (DNS/DNA), welche man im Zellkern entdeckt hatte, um den Träger der Erbinformation handelt und nicht, wie bis dahin mehrheitlich angenommen, Proteine diese Erbanlagen transportieren (Avery et al., 1944). Die räumliche Struktur dieses Speichermediums, der DNA, wurde 1953 durch James Watson und Francis Crick erstmals in ihrer korrekten Form als Doppelhelix postuliert (Watson and Crick, 1953). Im folgenden Jahrzehnt gelangt es durch Dechiffrierung des genetischen Codes die Sprache der Erbinformationen und ihre Übersetzung in Proteinsequenzen zu verstehen (Nirenberg and Matthaei, 1961). Mit der Entdeckung der ersten DNA-Sequenzierungsmethode durch Frederick Sanger 1975 konnte nun erstmals der genetische Code ausgelesen werden (Sanger and Coulson, 1975) . Nicht zuletzt aufgrund der immensen Größe des menschlichen Genoms, welches aus mehr als

Einleitung

3,2 Mrd. Basenpaaren besteht, dauerte es jedoch mehr als ein weiteres Vierteljahrhundert, die vollständige Sequenz der menschlichen DNA zu entdecken (Lander et al., 2001).

Die Entschlüsselung des Genoms hatte gezeigt, dass lediglich 1,22 % des menschlichen Erbguts für Proteine codieren. Auch wurden mit etwas mehr als 20.000 deutlich weniger als die 60.000 – 120.000 prognostizierten Gene, also Abschnitte der DNA die für eine biologisch aktive RNA codieren, als ursprünglich vermutet, entdeckt (Dunham et al., 2012; Fields et al., 1994; Liang et al., 2000). Damit war und ist weiterhin ein Großteil der für die Komplexität lebender Organismen nötigen Information unverstanden. Die genetische Forschung begann deshalb, sich vermehrt auf die außerhalb der Abfolge der Basensequenzen stehende Information zu konzentrieren. Nach der Veröffentlichung des menschlichen Genoms rückten somit zunehmend regulatorische Mechanismen in den Vordergrund der Forschung und der Begriff der Epigenetik kam auf.

1.1.2 Organisation und Regulation der DNA in Form von Chromatin

Bereits 1879 hatte Walther Flemming lichtmikroskopisch Strukturen innerhalb des Zellkerns entdeckt und den Begriff des Chromatins geprägt (Flemming, 1879). Dieses Chromatin stellt die komprimierte Form des menschlichen Erbguts dar, kommt nur in Eukaryoten vor und besteht aus DNA sowie basischen Proteinen, den sogenannten Histonen. Diese bestimmen durch Interaktion mit den sauren Phosphatgruppen der DNA die räumliche Anordnung des Chromatins. (McGhee and Felsenfeld, 1980)

Die kleinste Organisationseinheit innerhalb des Chromatins stellt das Nukleosom dar. Dieses besteht aus acht Proteinen die sich zu einer Quartärstruktur, dem basischen Histonoktamer, zusammenlagern, sowie der um das Histonoktamer gewundenen DNA. Typischerweise sind Histonoktamere aus jeweils zwei Paaren der Histondimere H2A & H2B sowie H3 & H4 aufgebaut. Die DNA umschließt das Histonoktamer in einer Länge von etwa 146 bp, was 1,65 Windungen entspricht (Kornberg, 1974).

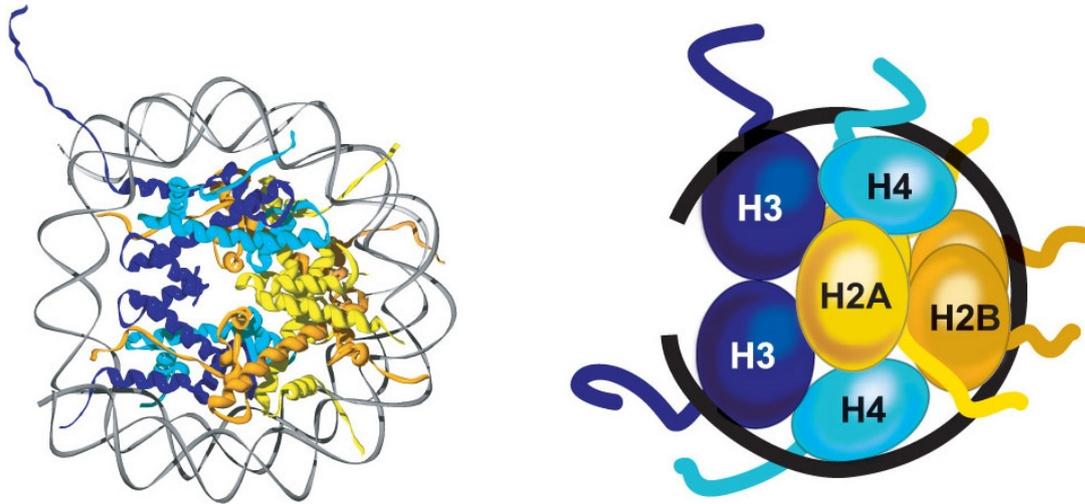


Abbildung 1-1: Histonoktamer mit umschließender DNA

Links abgebildet ein Schema der räumlichen Struktur eines Histonoktamers mit umgebender DNA, rechts dargestellt die gleiche Struktur stärker abstrahiert. In gelb und orange abgebildet die beiden Histondimere von H2A & H2B sowie in dunkel- und hellblau die Histondimere von H3 & H4, welche von der DNA, in schwarz dargestellt, umwunden werden.

Mit freundlicher Genehmigung durch: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Epigenetics), copyright (2007).

Die einzelnen Nukleosomenabschnitte werden durch die Linker-DNA miteinander verbunden. Dies ist ein in seiner Länge variabler Abschnitt der DNA, der zwischen den Histonoktamern steht und diese wie Perlen an einer Kette miteinander verbindet, weshalb diese Struktur auch als „Perlschnur“-Form des Chromatins bezeichnet wird (Olins and Olins, 1974). Durch das Hinzufügen von weiteren Proteinen, insbesondere des sogenannten „Linker-Histons“ H1, das 20 bp der Linker-DNA bindet, kommt es zur weiteren Verdichtung des Chromatins, und zur Ausbildung der nächst höheren Verpackungseinheit, der 30nm Solenoid-Faser, deren Existenz und räumliche Form *in vivo* jedoch umstritten ist (Maeshima et al., 2010). Mit der zunehmenden Verdichtung des Chromatins, nimmt die Zugänglichkeit der DNA für die RNA-Polymerase ab, welche die genetische Information in RNA abschreibt und mit diesem als Transkription bezeichneten Vorgang den ersten Schritt der Genexpression darstellt (Cedar and Felsenfeld, 1973). Auch andere DNA-bindende Proteine, die sogenannten Transkriptionsfaktoren, welche regulatorisch auf die Transkription einwirken, sind in Ihrer Funktion von der Zugänglichkeit bestimmter DNA-Abschnitte abhängig (Darnell, 1982). Hierbei lässt sich jedoch keine einheitliche Wirkung von Verdichtung oder Auflockerung der DNA ableiten,

Einleitung

da sowohl verstärkende als auch hemmende Transkriptionsfaktoren bekannt sind. (Latchman, 1997)

Durch bisher nur teilweise erforschte Prozesse verdichtet sich das Chromatin weiter bis hin zu seiner maximalen Kondensationsform, in welcher die Chromosomen während der Mitose sichtbar werden. Abbildung 1-2 zeigt eine hierarchische Visualisierung des Chromatins. Klassischerweise werden zwei Zustandsformen des Chromatins im Chromosom unterschieden: das dichter gepackte Heterochromatin und das eher locker verpackte Euchromatin (Elgin, 1996). Heterochromatin weist durch seine dichtere Verpackung und damit geringeren Zugänglichkeit einen geringeren Grad an Transkription auf. Zusätzlich unterschieden wird zwischen konstitutivem Heterochromatin, das stets in dieser Form verbleibt und fakultativem Heterochromatin, das, je nach Regulationszustand, auch in Euchromatin umgewandelt werden kann (Grewal and Jia, 2007). Euchromatin ist durch seine weniger dichte Verpackung der Transkriptionsmaschinerie besser zugänglich und enthält eine größere Dichte an Genen, die zudem transkriptionell aktiver sind als das Heterochromatin (Huisinga et al., 2006).

Einleitung

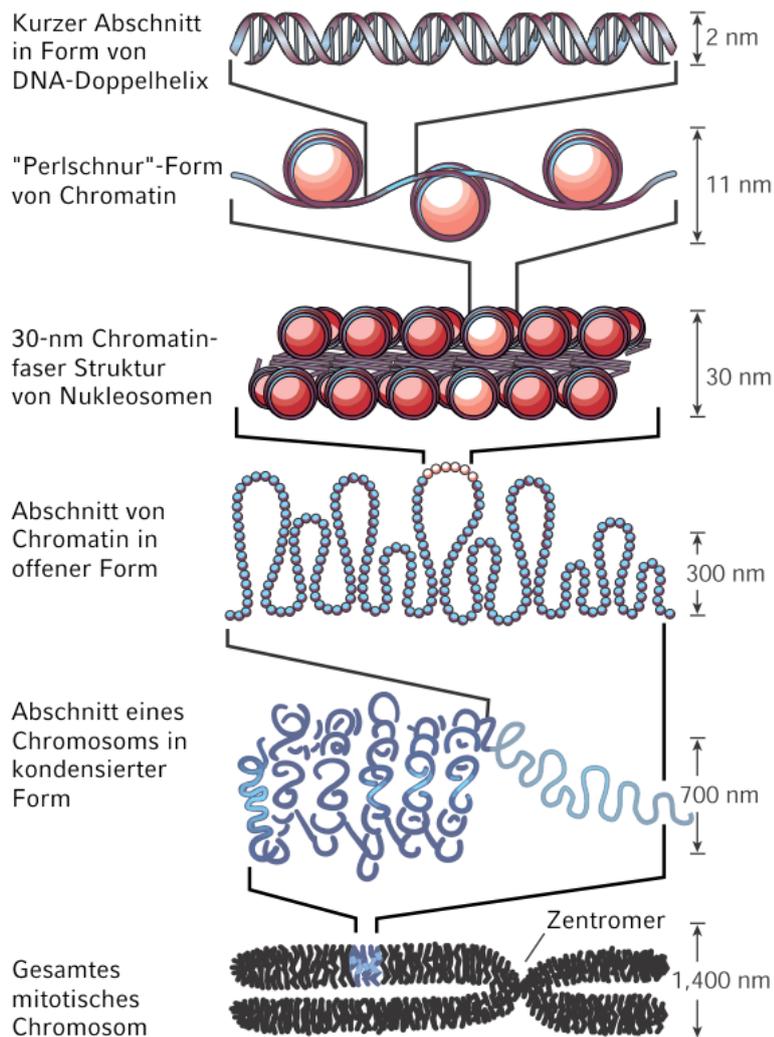


Abbildung 1-2 Verpackungsstadien der Chromatinstruktur

Visualisierung der unterschiedlichen Kondensationsstufen der DNA sowie der spezifischen Größen der jeweiligen Strukturebenen, beginnend mit freier DNA in Doppelhelix-Form bis hin zur Organisation im Chromosom. Mit freundlicher Genehmigung durch: Macmillan Publishers Ltd: Nature (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Tatsächlich handelt es sich bei den genannten Chromatinformen lediglich um eine grobe Unterteilung. Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese Kategorien weitere spezifische Unterformen besitzen, die sich in den ihren Aufbau bestimmenden Faktoren unterscheiden (Li and Reinberg, 2011).

1.2 Mechanismen der Chromatinmodifikation

Die bislang identifizierten Mechanismen, welche die räumliche Anordnung von Chromatin beeinflussen und hierdurch seine Aktivität regulieren, lassen sich in sechs Klassen

Einleitung

einordnen, wie in Abbildung 1-3 dargestellt ist. Diese sind in ihrer Funktionsweise eng miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig stark, was teilweise ihre Abgrenzung sowie die Identifikation einer kausalen Reihenfolge erschwert, sodass erst in der Gesamtschau ein vollständiges Bild der Chromatinregulation entsteht (Bonisch et al., 2008). Häufig wird im Kontext der Variabilität von Chromatin der Begriff der Epigenetik angeführt. Dieser wird nicht immer präzise verwendet, bezeichnet jedoch in seiner sorgfältigen Definition, stabil vererbare Zustände des Chromosoms, die über die DNA-Sequenz hinaus codiert und weitergegeben werden und den Phänotyp beeinflussen (Berger et al., 2009). Dies ist bisher für DNA-Methylierungen sowie einzelne Histonmodifizierungen gezeigt worden (Haig, 2004).

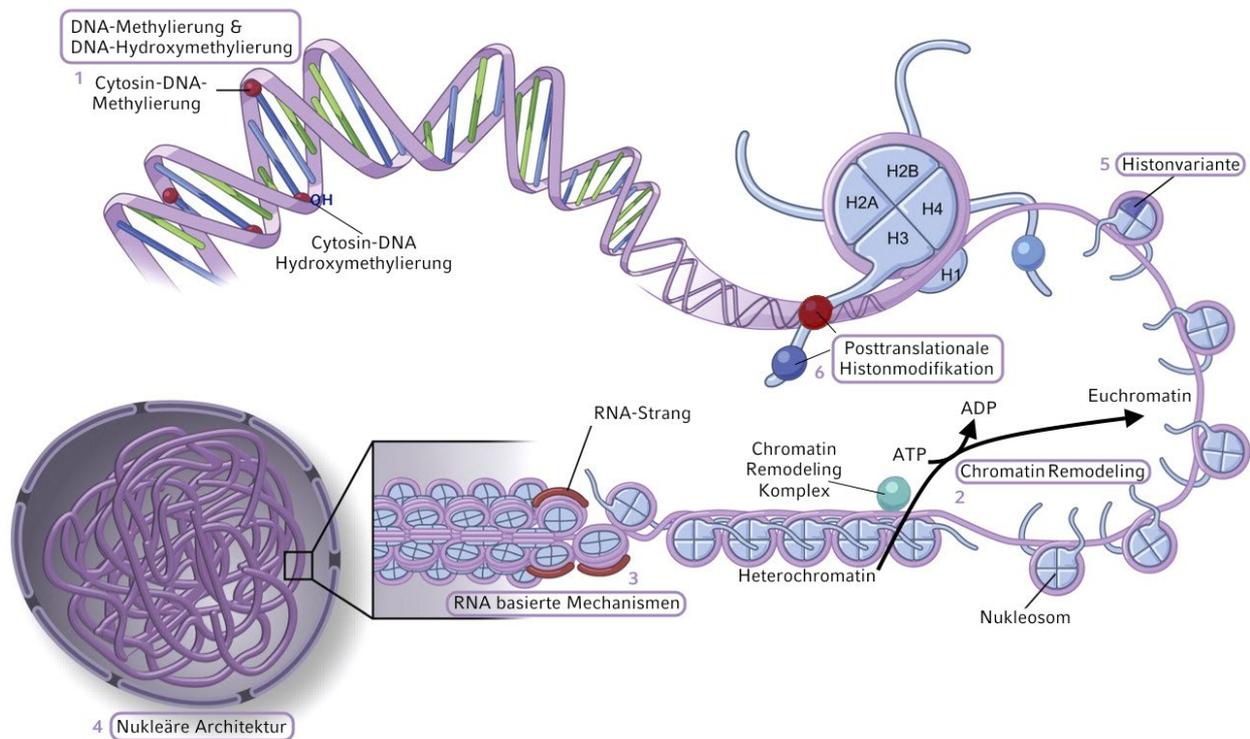


Abbildung 1-3: Mechanismen der Chromatinstrukturveränderung

Darstellung der sechs unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Chromatinstruktur. 1) DNA-Methylierung sowie DNA-Hydroxymethylierung durch Hinzufügen einer entsprechenden chemischen Modifikation an einer Cytosinbase. 2) Chromatin Remodeling durch spezielle Proteinkomplexe unter Energieverbrauch in Form von ATP-Hydrolyse zur Umwandlung von Heterochromatin in Euchromatin und vice versa. 3) Regulation durch nicht-codierende RNAs (ncRNA). 4) Nukleäre Architektur kann im Sinne eines Effektes der anderen Mechanismen der Chromatinmodifikation als Phänotyp betrachtet werden, besitzt aber darüber hinaus auch eine intrinsische regulative Aktivität z.B. durch Interaktion des Chromatins mit Strukturelementen des Nucleus wie dem Lamin.

Einleitung

5) Histonvarianten können kanonische Histone innerhalb des Oktamers ersetzen und auf diese Weise zu vielfältigen Änderungen der Chromatinstruktur führen. 6) Posttranslationale Histonmodifikationen umfassen eine Vielzahl an Molekülen, von chemischen Gruppen bis hin zu Peptiden, die an unterschiedlichen Aminosäureseitenketten der Histone angehängt werden können und unterschiedliche Einflüsse auf die Chromatinstruktur und Genaktivität haben. Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung durch: Yan, M. S. C., Matouk, C. C., & Marsden, P. A. (2010). *Epigenetics of the vascular endothelium. Journal of applied physiology*, 109(3), 916-926., copyright (2010) (Yan et al., 2010).

1.2.1 DNA-Methylierung

Die Methylierung der menschlichen DNA erfolgt durch S-Adenosylmethionin-abhängige Anknüpfung an Cytosinbasen innerhalb der DNA, vorwiegend im Bereich von CpG-Dinukleotiden (Chiang et al., 1996). Den Methylierungsmustern der DNA werden wichtige Funktionen bei den Prozessen des Alterns, der Krankheitsentstehung, insbesondere der Karzinogenese, sowie in der Embryogenese im Rahmen der Differenzierung von Stammzellen zugeschrieben (Suzuki and Bird, 2008). Da Methylierungsmuster der DNA mitotisch an Tochterzellen und meiotisch auch an Nachwuchs vererbt werden können, gilt die DNA-Methylierung als klassisches Beispiel für einen epigenetischen Mechanismus, also eine Vererbung genetischer Merkmale ohne Änderung in der Abfolge der Nukleotidbasen der DNA (Bird, 2002). Darüber hinaus existieren bei einigen Genen an den Chromatiden unterschiedliche Methylierungsmuster, abhängig davon, ob diese mütterlichen oder väterlichen Ursprungs sind, was als Imprinting bezeichnet wird (Tucci et al., 2019). In somatischen menschlichen Zellen liegt der Großteil der Cytosinbasen in methylierter Form vor, welche generell mit Repression assoziiert ist. Entsprechend finden sich speziell in den Promotorregionen aktiver Gene CpG reiche Abschnitte, sogenannte CpG-Inseln, unmethylierter Cytosinbasen (Bird, 1985). Durch die enzymvermittelte Oxidation von methylierten Cytosinbasen entstehen hydroxymethylierte Cytosinbasen (Tahiliani et al., 2009). Diese DNA-Modifikation kommt vor allem in Zellen des Nervensystems vor (Kriaucionis and Heintz, 2009) und kann noch weiter umgewandelt werden zu Formylcytosin und Carboxylcytosin (Ito et al., 2011; Kriaucionis and Heintz, 2009). Da diese oxidierten Cytosinmodifikationen alle zur DNA-Demethylierung führen können, wird vermutet, dass ihnen eine führende Funktion bei der Regulation der DNA-Methylierung zukommt (Weber et al., 2016). (Lio et al., 2020).

1.2.2 Chromatin-Remodeling

Chromatin Remodeling beschreibt den Prozess der Änderung der Anordnung von Nukleosomen im Chromatin durch Verbrauch von Energie in Form von ATP (Becker and Workman, 2013). Spezielle Multiproteinagglomerate, die sogenannten Chromatin-Remodeling-Komplexe, verschieben oder entfernen Nukleosomen und verändern somit die Zugänglichkeit der Erbinformation für DNA-bindende Faktoren (Becker and Hörz, 2002). Dies kann sowohl eine Aktivierung als auch Repression bewirken, je nach Lokalisation und dem Chromatingesamtkontext (Gangaraju and Bartholomew, 2007). Chromatin-Remodeling-Komplexe werden nach der katalytischen Untereinheit ihrer ATPase in vier Familien eingeteilt: SWI/SNF, ISWI, CHD und Ino80 (Becker and Workman, 2013).

1.2.3 RNA-basierende Mechanismen

Nicht-kodierende RNAs, Ribonukleinsäuren, die nicht zu Protein translatiert werden, machen einen Großteil des Transkriptoms, also der Gesamtzahl der transkribierten RNAs, aus (Birney et al., 2007). Diese nicht-kodierenden RNAs können unter anderem regulatorische Eigenschaften besitzen und die Chromatinstruktur beeinflussen. Unterschieden werden hierbei die sogenannten „langen-nicht-kodierenden-RNAs“ (lncRNAs) welche sich durch eine Länge von 200 bis vielen tausend Nukleotiden auszeichnen und die „kleinen-nicht-kodierenden-RNAs“ (sncRNAs) mit einer Größe zwischen 20 und 30 Nukleotiden (Ghildiyal and Zamore, 2009).

Die für die Chromatinstruktur relevanten sncRNAs werden subklassifiziert in drei Untergruppen: die short interfering RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs) und piwi-interacting RNAs (piRNAs). siRNAs und miRNAs fungieren primär als Repressoren von Genen auf posttranskriptioneller Ebene durch Abbau von mRNAs (siRNAs) oder der Verhinderung ihrer Translation (miRNAs) (Ambros, 2004; Meister and Tuschl, 2004). piRNAs hingegen kommen spezifisch in den Zellen der Keimbahn vor und wirken innerhalb des Zellkerns genregulatorisch durch Interaktion mit PIWI-Proteinen aus der Argonautfamilie (Mani and Juliano, 2013).

Die regulatorischen Effekte der lncRNAs werden in geringem Maße ausschließlich über direkte Basenpaarung mit komplementären Sequenzen vermittelt, zum Großteil jedoch durch die Rekrutierung von Hilfsproteinen (Wang and Chang, 2011). Hierzu leiten die lncRNAs ihre Effektorproteine zu den relevanten DNA Abschnitten, wo diese regulatorisch aktiv werden können (Rinn, 2014). Eines der prominentesten Beispiele für eine solche

Regulation, stellt die lncRNA Xist (X inactive specific transcript) da, eine 15 – 17 kb lange RNA, die in weiblichen Säugetieren an der Dosiskontrolle, also der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen zum Barr-Körperchen beteiligt ist (Clemson et al., 1996; Moindrot and Brockdorff).

1.2.4 Nukleäre Architektur

Der räumlichen Anordnung des Chromatins innerhalb des Zellkerns kommt eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der genetischen Aktivität zu. Das basalste Beispiel hierfür stellen DNA-Schleifen dar, die exemplarisch Promotorregionen und Enhancerregionen der DNA in räumliche Nähe bringen und hierdurch Transkription fördern (Bickmore, 2013). Innerhalb des Nukleus existieren sogenannte „Topologisch-assoziierte Domänen“ (TADs), chromatinreiche Regionen, in denen, durch Interaktion und Anordnung der DNA-Abschnitte, Genaktivität reguliert wird. Dabei befinden sich in der Mehrzahl gewebespezifische Genabschnitte innerhalb der interaktionsreicheren zentralen Regionen der TADs, aktive Gene sind hingegen vor allem am Rand der TADs lokalisiert (Dixon et al., 2012).

Eine weitere räumliche Organisationseinheit des Chromatins stellen „Chromosomen Territorien“ (CTs) dar, Regionen innerhalb des Zellkerns, in denen jeweils ein spezifisches Chromosom lokalisiert ist (Boveri, 1909). Innerhalb dieser CTs herrscht eine spezifische Struktur vor, wobei sich generell feststellen lässt, dass Heterochromatin die inneren Bereiche der CTs dominiert. Die Außenbereiche der CTs stellen die Berührungsfläche zu weiteren CTs dar, welche durch die Interchromosomale Domäne (ICD) verbunden werden (Cremer et al., 2006). An dieser Grenzfläche zeigt sich das Chromatin für weitere Effektor Komplexe zugänglicher (Pombo and Dillon, 2015).

Innerhalb des Zellkerns existieren zudem diverse Suborganellen, die sogenannten „nuclear bodies“, die durch Chromatin-, Protein- und RNA-Interaktion zustande kommen. Es sind eine Vielzahl solcher nuklearen Unterstrukturen beschrieben, von denen hier eine Auswahl aufgezählt wird: Nukleoli, Cajal-Körper, „Nuclear Speckles“ und „PML nuclear bodies“ (Handwerger and Gall, 2006). Die Funktionen dieser Suborganellen sind divers und reichen von Regulation der Transkription und des RNA-Splicings bis hin zur Replikationskontrolle (Dundr, 2012). Gemeinsames Merkmal der „nuclear bodies“ ist, dass sie durch Herstellung räumlicher Nähe die Effizienz ihrer spezifischen Vorgänge steigern (Zhu and Brangwynne, 2015).

Insgesamt ist das Chromatin innerhalb des Nukleus nicht gleichmäßig verteilt. Es zeigt

sich insbesondere eine Konzentration von Heterochromatin in der nukleären Peripherie (Finlan et al., 2008). Dies gilt jedoch nicht für Chromatin, das peripher in Nähe einer Kernpore lokalisiert ist. Im Bereich dieser Verbindungsstellen zwischen Zytosol und Zellkern findet sich überwiegend Euchromatin, häufig assoziiert mit für die Zelle essentiellen, hochgradig aktiven Genen (Strambio-De-Castillia et al., 2010).

Einfluss auf die räumliche Anordnung des Chromatins nimmt im Bereich der nukleären Peripherie auch die als Lamina bezeichnete innere Membran des Zellkerns. Spezielle DNA-Sequenzen, die sogenannten „Lamina-assoziierten Domänen“ (LADs), die häufig spezifische repressive Histonmodifikationen (siehe 1.2.6) aufweisen, vermitteln eine Bindung an Laminaproteine (Lund et al., 2013; Van Steensel and Belmont, 2017). Diese LADs scheinen somit eine wichtige Rolle bei der nukleären Lokalisation ihrer benachbarten Gene und damit der Zelldifferenzierung zu spielen (Reddy et al., 2008).

1.2.5 Histonvarianten

Neben den kanonischen Histonen existieren zudem Histonvarianten, sowohl der Core-Histone, die das Histonoktamer bilden, als auch des Linker-Histons H1. Die Gene der kanonischen Histone des Menschen sind in zwei Genclustern auf den Chromosomen 1 und 6 gruppiert und ihre Aktivität ist stark mit der DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus verknüpft (Harris et al., 1991). Im Gegensatz hierzu sind die für Histonvarianten kodierenden Gene im Genom verstreut und ihre Exprimierung erfolgt Zellzyklus unabhängig. Auch bei ihrer Inkorporation ins Chromatin verhalten sich kanonische Histone anders als ihre Varianten. Während erstere primär in freie DNA-Abschnitte eingebaut werden, erfolgt die Integration von Histonvarianten durch Austausch von bestehenden Nukleosomenuntereinheiten (Marzluff et al., 2002). Histonvarianten unterscheiden sich zudem von ihren kanonischen Standardformen in ihrer Primärstruktur. Das Spektrum reicht hierbei von wenigen Aminosäuren bis hin zu ganzen Domänen. Durch den Einbau von Histonvarianten kann sowohl direkt als auch im Zusammenspiel mit den anderen aufgeführten Mechanismen, die Struktur des Chromatins und somit die Genregulation beeinflusst werden (Bonisch et al., 2008).

Es ist eine Vielzahl von Histonvarianten bekannt, mit unterschiedlichen und teilweise nur rudimentär erforschten Funktionen. Eine Auswahl der wichtigsten menschlichen Histone mit Funktion und Vorkommen ist in Tabelle 1-1 aufgelistet.

Einleitung

Familie	Variante	Funktion/Vorkommen
H2A	Kanonisch	Genomverpackung
H2A	H2A.X	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur
H2A	H2A.Z.1	Genregulation/Genomstabilität/DNA-Reparatur
H2A	H2A.Z.2.1	Genregulation/Genomstabilität/DNA-Reparatur
H2A	H2A.Z.2.2	Nukleosomendestabilisierung
H2A	macroH2A.1.1	Genrepression/Metabolom
H2A	macroH2A.1.2	Genrepression
H2A	macroH2A.2	Genrepression
H2A	H2A.Bbd	Genaktivierung
H2B	Kanonisch	Genomverpackung
H2B	TH2B	Testis-spezifisch
H2B	H2BFWT	Testis-spezifisch
H3	H3.1 (kanonisch)	Genomverpackung
H3	H3.2 (kanonisch)	Genomverpackung
H3	H3.3	Genaktivierung/Telomer-Silencing
H3	H3.Y	Genaktivierung
H3	CENP-A	Zentromerassoziation
H3	H3t	Testis-spezifisch
H4	Kanonisch	Genomverpackung
H4	H4G	rDNA Transkriptionsregulation/Brustkrebszellen

Tabelle 1-1: Auswahl wichtiger Core-Histone und ihrer Varianten beim Menschen.

Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung durch: Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Molecular Cell Biology] (Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome, Talbert PB, Henikoff S.), copyright (2010) (Long et al., 2019; Talbert and Henikoff, 2010).

Der Einbau von Histonen in Nukleosomen erfolgt gezielt durch spezielle Histonchaperone. Hierbei handelt es sich um Proteine, die Histone und ihre Multimere binden, bis diese an entsprechender Stelle mit der DNA assoziiert wurden um Chromatin zu formen (Laskey et al., 1978). Neben den Histonchaperonen, die an der Ausbildung und dem Chromatineinbau kanonischer Histonoktamere beteiligt sind, existieren auch Histonchaperone, die gezielt Histonvarianten in Nukleosomen platzieren, wie z.B. „Holliday junction-recognizing protein“ (HJURP) das mit dem Einbau der Histonvariante CENP-A im Bereich von Zentromeren assoziiert ist (siehe Tabelle 1-1:) (Dunleavy et al., 2009). Ein weiterer Mechanismus, über den Histonvarianten ins Chromatin implementiert werden, sind Aktivitäten der Chromatin Remodeling Komplexe. Ein Beispiel hierfür stellen die Multiproteinkomplexe EP400 und SRCAP da, die H2A.Z in Chromatin einbauen (Gévry et al., 2007; Wong et al., 2007).

1.2.6 Posttranslationale Histonmodifikationen

1.2.6.1 Allgemeine Histonmodifikationen

Histone können als Proteine posttranslationale chemische Modifikationen an ihren Aminosäureinheiten aufweisen. Insgesamt sind eine Vielzahl solcher posttranslationalen Histonmodifikationen (PTMs) entdeckt worden, die an unterschiedlichen Aminosäureresten der Histone ansetzen und deren Funktionen und teilweise sogar Vorkommen *in vivo* noch unbekannt sind (Kouzarides, 2007). In Tabelle 1-2 sind einige ausgewählte PTMs zur Übersicht aufgezählt.

Histonmodifikation	Aminosäurerest	Abkürzung	Funktion	Beispiel
Acetylierung	Lysin	Kac	Transkription, Reparatur, Replikation, Chromatinverdichtung	H3K14ac
Methylierung (mono, di & tri)	Lysin	K-me1, K-me2, K-me3	Transkription, Reparatur	H3K9me1
Methylierung (mono, di-symmetrisch & di-asymmetrisch)	Arginin	R-me1, R-me2a, R-me2s	Transkription	H3R17me1
Phosphorylierung	Serin, Threonin und Tyrosin	S-ph, T-ph, Y-ph	Transkription, Reparatur, Chromatinverdichtung	H3S10ph
Ubiquitinierung	Lysin	K-ub	Transkription, Reparatur	H2AK119ub
Sumoylierung	Lysin	K-su	Transkription	H2BK16su
ADP-ribosylierung	Glutamat	E-ar	Transkription	H2BE2ar1
Deiminierung	Arginin	R → Cit	Transkription	H3Cit26
Prolin-Isomerisation	Prolin	P-cis → P-trans	Transkription	H3P38trans
Biotinylierung	Lysin	K-bio	Transkription, Reparatur	H2AK126bio

Tabelle 1-2: Posttranslationale Modifikationen von Histonen

Unterschiedliche chemische Klassen und Formen der Histonmodifikation mit jeweils betroffenem Aminosäurerest, typischer Abkürzung, bisher bekannten Funktionen und bekanntem Beispiel..

Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung durch: Elsevier: [Chromatin modifications and their function, Kouzarides T.] (Cell. 2007 Feb 23;128(4):693-705. Review), copyright (2007) (Kouzarides, 2007)

Ergänzt nach (Zhao and Garcia, 2015)

Die Funktionen dieser Modifikationen sind sehr unterschiedlich, wobei diese ihre Wirkungen über zwei Mechanismen entfalten können. Der erste Mechanismus erfolgt über eine direkte Interaktion zwischen der DNA und den Histonen. Beispielsweise reduziert

Einleitung

Acetylierung die elektrostatische Anziehung zwischen den sonst positiv geladenen Histonen und der negativen DNA. Hierdurch lösen sich Histone und die freie DNA wird dadurch zugänglicher für Transkriptionsfaktoren, was meist, jedoch nicht immer, mit einer Aktivierung der Genaktivität assoziiert ist (Brownell and Allis, 1996). Der zweite Wirkmechanismus von Histonmodifikationen erfolgt über Effektorproteine, die durch die Modifikation rekrutiert werden und entweder eigenständig oder über weitere Interaktionen wirken. Ein Beispiel hierfür stellt die Trimethylierung des Histons H3 am Lysin der Position 9 (H3K9me3) dar, die im folgenden Kapitel 1.2.6.2 „Histonmethylierung an Lysinresten“ ausführlich erörtert wird (Seet et al., 2006).

Insgesamt wurden mehr als 70 unterschiedliche Aminosäurereste von Histonen als Ziele von Modifikationen entdeckt, was mehr als zwei Dritteln aller potentiell möglichen Abschnitte der Histone entspricht (Taverna et al., 2007). Zudem sind an einigen Aminosäureresten auch mehrere PTMs oder Formen einer Modifikation möglich. Beispielsweise kann an Lysinresten neben der unmodifizierten Form die Methylierung in drei Stufen vorkommen sowie die häufige Acetylierung, aber auch seltenere PTMs (siehe Tabelle 1-2:). Allein hierdurch ergibt sich bereits an einer einzigen Seitengruppe eine Vielzahl von Zustandsformen, die potenziell jeweils ein anderes Signal vermitteln können. In Kombination mit den über 70 bekannten Aminosäureresten an Histonen, an denen solche PTMs bereits nachgewiesen wurden und der Interaktion solcher Modifikationen untereinander, ergibt sich somit eine enorme Vielfalt. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von H3S10 die Methylierung von H3K9 hemmt (Rea et al., 2000). Durch das Zusammenspiel all dieser PTMs wird die komplexe Verschlüsselung einer möglicherweise epigenetischen Information im Sinne der Histon-Code-Hypothese veranschaulicht (Strahl and Allis, 2000).

Unterteilen lassen sich die PTMs nicht nur nach der Art ihrer Modifikation, sondern auch nach ihrer Lokalisation in der Sequenz des Histons. Hierbei unterscheidet man Modifikationen im Bereich des N-terminalen Endes des Histons, welches als Abschnitt frei aus dem Histonoktamer herausragt (siehe Abbildung 1-1), von PTMs im Kernbereich des Histonoktamers, in dem die Histone untereinander und mit der DNA Bindungen eingehen, um Nukleosomen zu formen (Jack and Hake, 2014). Aufgrund der leichteren Zugänglichkeit für weitere Interaktionen sind PTMs im Bereich der N-terminalen Domänen häufig mit der Rekrutierung von Effektormolekülen assoziiert, während Modifikationen in den Kernbereichen eher direkten Einfluss auf die Struktur der Nukleosomen zu haben scheinen (Tessarz and Kouzarides, 2014). Die PTMs der Histone

Einleitung

stellen hierbei kein festes Merkmal dar, sondern werden durch Enzyme spezifisch gesetzt, ausgelesen und entfernt. Hierdurch ergibt sich durch die Modifikation der Histone ein variabler Code, der die Zustandsform des Chromatins und damit aller DNA basierenden Mechanismen dynamisch beeinflusst (Jenuwein and Allis, 2001). Tabelle 1-3: vermittelt eine Übersicht einiger der vielen bekannten Enzyme, die PTMs an Histonen setzen bzw. entfernen und der spezifischen Positionen, an denen diese wirken um in ihrem Zusammenspiel das dynamische Gleichgewicht des „Histon Codes“ zu schreiben.

Enzymaktivität	Enzymname	Histon & Position der Modifikation
Acetyltransferase	HAT1	H4 (K5, K12)
Acetyltransferase	CBP/P300	H3 (K14, K18), H4 (K5, K8), H2AK5, H2B (K12, K15)
Acetyltransferase	PCAF/GCN5	H3 (K9, K14, K18)
Acetyltransferase	TIP60	H4 (K5, K8, K12, K16), H3K14
Acetyltransferase	HB01	H4 (K5, K8, K12)
Deacetylase	SirT2	H4K16
Deacetylase	HDAC1	H3K56
Deacetylase	HDAC2	H3K56
Lysin Methyltransferase	SUV39H1	H3K9
Lysin Methyltransferase	SUV39H2	H3K9
Lysin Methyltransferase	EHMT2/G9a	H3K9
Lysin Methyltransferase	ESET/SETDB1	H3K9
Lysin Methyltransferase	EHMT1/GLP	H3K9
Lysin Methyltransferase	CLL8	H3K9
Lysin Methyltransferase	MLL1	H3K4
Lysin Methyltransferase	MLL2	H3K4
Lysin Methyltransferase	MLL3	H3K4
Lysin Methyltransferase	MLL4	H3K4
Lysin Methyltransferase	MLL5	H3K4
Lysin Methyltransferase	SET1A	H3K4
Lysin Methyltransferase	SET1B	H3K4
Lysin Methyltransferase	ASH1	H3K4
Lysin Methyltransferase	SET1	H3K4
Lysin Methyltransferase	SET2	H3K36
Lysin Methyltransferase	NSD1	H3K36
Lysin Methyltransferase	SYMD2	H3K36
Lysin Methyltransferase	DOT1	H3K79
Lysin Methyltransferase	DOT1	H3K79
Lysin Methyltransferase	Pr-SET 7/8	H4K20
Lysin Methyltransferase	SUV420H1	H4K20
Lysin Methyltransferase	SUV420H2	H4K20
Lysin Methyltransferase	EZH2	H3K27
Lysin Methyltransferase	RIZ1	H3K9
Lysin Demethylase	LSD1/BHC110	H3K4
Lysin Demethylase	JHDM1a	H3K36
Lysin Demethylase	JHDM1b	H3K36
Lysin Demethylase	JHDM2a	H3K9
Lysin Demethylase	JHDM2b	H3K9
Lysin Demethylase	JMJD2A/JHDM3A	H3K9, H3K36

Einleitung

Lysin Demethylase	JMJD2B	H3K9
Lysin Demethylase	JMJD2C/GASC1	H3K9, H3K36
Lysin Demethylase	JMJD2D	H3K9
Arginin Methytransferase	CARM1	H3 (R2, R17, R26)
Arginin Methytransferase	PRMT4	H4R3
Arginin Methytransferase	PRMT5	H3R8, H4R3
Serin/Threonin Kinase	Haspin	H3T3
Serin/Threonin Kinase	Aurora-B	H3S10
Serin/Threonin Kinase	MSK1	H3S28
Serin/Threonin Kinase	MSK2	H3S28
Serin/Threonin Kinase	CKII	H4S1
Serin/Threonin Kinase	Mst1	H2BS14
Ubiquitinligase	Bmi/Ring1A	H2AK119
Ubiquitinligase	RNF20/RNF40	H2BK120

Tabelle 1-3: Histonmodifizierende Enzyme und ihre Angriffspunkte

Bekannte humane Enzyme der posttranslationalen Histonmodifikation, angeordnet nach ihrer Enzymaktivität mit Angabe ihrer Wirkorte. Bei mehreren Modifikationszielen am gleichen Histon sind die betroffenen Aminosäurereste sowie ihre Abfolge in der Histon-Primärsequenz in Klammern angegeben. Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung durch: Elsevier: [Chromatin modifications and their function, Kouzarides T.] (Cell. 2007 Feb 23;128(4):693-705. Review), copyright (2007) (Kouzarides, 2007).

1.2.6.2 Histonmethylierung an Lysinresten

Die Erstbeschreibung der Methylierung von Histonen erfolgte 1964 am Beispiel von Histon-Methyllysin (Murray, 1964). Grundsätzlich ist die Methylierung aller basischen Aminosäurereste von Histonen, also Lysin, Arginin und Histidin beschrieben (Gershey et al., 1969). Vorkommen und Funktion der Letzteren *in vivo* ist jedoch nicht klar erwiesen und spielt in der aktuellen Forschung kaum eine Rolle. Argininmethylierung geht grundsätzlich mit einer Aktivierung der Genaktivität einher und kann als Monomethylierung und, je nach Lokalisation der Methylgruppen an der Guanidinogruppe, als symmetrische und asymmetrische Dimethylierung vorkommen (Di Lorenzo and Bedford, 2011). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Methylierung des Histons H3 am Lysinrest 56 (H3K56me) liegt, wird im Weiteren die Methylierung von Lysinresten ausführlicher besprochen.

Im Vergleich mit anderen PTMs, wie beispielsweise der Acetylierung, ist die Histonmethylierung weniger dynamisch und wurde lange Zeit, bis zur Entdeckung der ersten Lysin Histon Demethylase, LSD1, im Jahr 2004, als irreversibel diskutiert (Shi et al., 2004b). Zur Arginindemethylierung ist, neben der Möglichkeit der Deiminierung zu

Einleitung

Citrullin, 2007 auch die erste originäre Demethylase, Jmjd6, beschrieben worden (Chang et al., 2007). Lysinreste können an ihrer ϵ -Aminogruppe neben den anderen PTMs (siehe Tabelle 1-2:) einfach, zweifach und dreifach methyliert werden, wobei die Methylierungsgrade meist durch unterschiedliche Effektorproteine erkannt werden und daher auch andere funktionelle Auswirkungen haben. Ein Beispiel hierfür stellen die unterschiedlichen Methylierungsmuster von H3K4 in HeLa-Zellen dar. In diesen wurde nachgewiesen, dass Di- und Trimethylierungen ein Merkmal von aktiven Genen darstellt, während die entsprechende Monomethylierung in Enhancerregionen auftritt (Heintzman et al., 2007).

Histon Lysinmethylierungen werden durch zwei Enzymfamilien vermittelt. Erstens die zahlreichen und ausführlich erforschten Vertreter der SET-Familie, die sich alle durch eine katalytische SET-Domäne auszeichnen welche die Methylierung vornimmt (Rea et al., 2000). Zweitens die DOT1L-Familie, die als katalytische Gruppe die DOT-Domäne aufweist, vergleichsweise wenig erforscht ist und bisher nur einen bekannten Vertreter, das namensgebende DOT1L im Menschen aufweist (Feng et al., 2002). Neben der anderen katalytischen Sequenz scheinen sich die Vertreter der beiden Enzym-Familien auch dahingehend zu unterscheiden, dass KMTs (Lysinmethyltransferasen) mit SET-Domäne jeweils eine spezifische Methylierung katalysieren, während DOT1L alle Grade an H3K79 Methylierung vermitteln kann (Frederiks et al., 2008). Innerhalb der SET-Gruppe werden folgende Unterfamilien unterschieden: SUV39, SET1/MLL, SET2/NSD; RIZ/PRDM, EZH, SMYD, SUV4-20 sowie „andere“, bestehend aus SET7/9 und SET8 (siehe Tab. 4) (Dillon et al., 2005). Um die Übersichtlichkeit der wachsenden Zahl an entdeckten Chromatin-modifizierenden Enzymen zu erhöhen, wurde 2007 eine systematische Nomenklatur vorgeschlagen (Allis et al., 2007), welche die Enzyme nach gemeinsamen Merkmalen ordnet, bisher in der Literatur jedoch kaum Anwendung findet.

<u>Familie & Enzymname</u>	<u>Domänen</u>	<u>Familie & Enzymname</u>	<u>Domänen</u>	<u>Familie & Enzymname</u>	<u>Domänen</u>
<u>SUV39 Familie</u>	Pre-SET (9 Cys, 3 Zn), post-SET (CXCX ₄ C)	<u>SET1 Familie (MLL Familie)</u>	Post-SET (CXCX ₄ C)	<u>SET2 Familie (NSD Familie)</u>	Pre-SET (7-9 Cys); post-SET (CXCX ₄ C)
SUV39H1	4 Cys, Chromo	MLL1 (HRX, ALL1)	AT hook, Bromo, PHD, CXXC	WHSC1 (NSD2)	PWWP, PHD, HMG, RING

Einleitung

SUV39H2	4 Cys, Chromo	HRX2 (MLL4)	AT hook, Bromo PHD, CXXC	WHSC1 (NSD3)	PWWP, PHD, RING
G9a	E/KR- reich, NRSF- binding, ankyrin repeats	ALR (MLL2)	PHD, RING	NSD1	PWWP, PHD, RING
GLP1 (EuHMT1)	E/KR- reich, NRSF- Bindung, Ankyrin repeats	MLL3	PHD, RING	HIF1 (HYPB)	WW
ESET (SETDB1)	Tudor, MBD	SET1 (ASH2)	RRM, poly-S/E/P	ASH1	AT hook, Bromo, BAH, PHD
CLLL8 (SETDB2)	MBD	SET1L	RRM, Poly-S/E/P		
<u>RIZ Familie</u> (<u>PRDM Familie</u>)		<u>EZH Familie</u>	Pre-SET (~15 Cys)	<u>SMYD Familie</u>	Post-SET (CXCX ₂ C)
RIZ (PRDM2)	C2H2 Zink- Finger	EZH1	2 SANT	SMYD3	Zf-MYND
BLIMP1 (PRDM1)	C2H2 Zink- Finger	EZH2	2 SANT	SMYD1	Zf-MYND
<u>SUV4-20 Familie</u>	Post-SET (CXCX ₂ C)	<u>Andere</u>			
SUV4-20H1		SET7/9	MORN		
SUV4-20H2		SET8 (PR-SET7)			

Tabelle 1-4: SET-Domänen enthaltende Histonmethyltransferasen und ihre Unterfamilien

Aufgelistet sind die acht Unterfamilien der SET-Domänen enthaltenden Lysinmethyltransferasen mit ihren wichtigsten Vertretern. Neben dem Namen der Familie bzw. des Enzyms ist jeweils die für die Unterfamilie/Enzym spezifische weitere(n) Domäne(n) angegeben.

Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung durch: BioMed Central Ltd: [The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases., Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. (Genome Biol. 2005;6(8):227 Review), copyright (2005)] (Dillon et al., 2005).

Da die Methylierung von Lysinresten zu keiner Änderung in der Ladung des Histons führt, stehen hier direkte elektrostatische Effekte der Chromatinregulation, wie beispielsweise bei der Acetylierung und Phosphorylierung (negative Ladung am Histon und dadurch Auflockerung des Chromatins mit Genaktivierung), im Hintergrund (Bonisch et al., 2008). Stattdessen erfolgt die Wirkung der Methylierung von Histonen über Effektorproteine,

Einleitung

welche die methylierten Aminosäurereste über bestimmte Domänen binden.

Die größte Gruppe solcher Effektorproteine stellt die „Royal“-Proteinsuperfamilie dar, deren Mitglieder strukturelle Verwandtschaft in ihren katalytischen Domänen aufweisen und deren wichtigste Motive die Chromo-, Doppelchromo-, Chromo-Barrel-, Tudor-, Doppeltudor-, MBT- und PWWP-Domänen sind (Maurer-Stroh et al., 2003). Daneben existieren noch weitere Domänen, die Lysinmethylierungen binden können, wie PHD-Finger (Mellor, 2006), Zink-Finger CW (He et al., 2010), WD40- (Margueron et al., 2009) und Ankyrin-Repeats (Collins et al., 2008). Ihre Bindung ist sowohl abhängig vom Methylierungsgrad als auch weiteren benachbarten PTMs. So divers wie die Effektorproteine, kann auch die Wirkung der Methylierung sein. Beispielsweise ist H3K4 Methylierung generell mit Genaktivierung assoziiert, während H3K9 eher ein Merkmal inaktiven Heterochomatins darstellt, wobei auch hier Ausnahmen beschrieben sind (Lachner et al., 2003).

Die letzte mit der Histonmethylierung-assozierten Enzymklasse sind die Histondemethylasen, welche diese PTM entfernen. Bisher wurden zwei Familien von Histondemethylasen entdeckt, die sich ebenfalls in ihrer katalytischen Domäne unterscheiden. Die erste Gruppe zeichnet sich durch die gemeinsame Amin-Oxidase-Domäne aus, und beinhaltet die erste entdeckte Histondemethylase LSD1 (Fang et al., 2010; Shi et al., 2004a). Die Vertreter dieser Gruppe können jedoch lediglich Mono- und Dimethylierungen entfernen. Mitglieder der zweiten, „Jumonji“ genannten Gruppe, beherrschen die Demethylierung aller drei Methylierungsgrade (Klose et al., 2006) und insgesamt weist diese Familie deutlich mehr bekannte Vertreter auf. Ihr gemeinsames namensgebendes Motiv ist die Jumonji-C-Domäne, welche eine Eisen-abhängige Dioxygenase darstellt (Tsukada et al., 2006).

Durch die Interaktion von Histonmethyltransferasen, Histonmethylierung-bindenden Effektorproteinen sowie Histondemethylasen ist die Methylierung von Lysinresten eine dynamische Markierung, durch die Chromatin-relevante Information geschrieben, ausgelesen und gelöscht werden kann. Der spezifische funktionelle Effekt ist jedoch sehr abhängig vom Kontext aller assoziierten Chromatin regulierenden Mechanismen (Cedar and Bergman, 2009). Insbesondere die Interaktion, der sogenannten „Crosstalk“, mit anderen PTMs (Lee et al., 2010), aber auch die genaue Lokalisierung der Methylierung und ihr Methylierungsgrad (Santos-Rosa et al., 2002) beeinflussen die assoziierte Funktion. Die PTMs im Bereich der frei aus dem Nukleosom herausragenden N-Termini der Histone und ihre meist durch Effektormoleküle vermittelten Wirkungen wurden bereits

ausführlich erforscht (Musselman et al., 2012). Über die schwerer zugänglichen PTMs im Bereich des Nukleosomenkerns, die ihre Wirkung vermutlich mehr über direkte Interaktion zwischen Histonoktamer und umschlingender DNA vermitteln, ist vergleichsweise weniger bekannt (Tessarz and Kouzarides, 2014). H3K56-Methylierung, eine dieser PTMs im Bereich des Nukleosomenkerns ist der Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit, und wird daher im Weiteren ausführlich besprochen.

1.2.6.3 Histon-H3-Lysin-56 Modifikationen

Die bestbeschriebene PTM von H3K56 ist die Acetylierung, die in Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) mit einer Häufigkeit von etwa 28% aller H3 Histone auftritt (Xu et al., 2005) und deren vielfältige Funktionen in diesem Organismus ausführlich untersucht sind. Diese umfassen unter anderem Genaktivierung (Williams et al., 2008) und Reprimierung (Miller et al., 2008), DNA-Replikation (Han et al., 2007) und Reparatur (Das et al., 2009), sowie den Austausch von Histonvarianten (Rufiange et al., 2007). Im Menschen tritt diese Modifikation jedoch mit etwa 1% auf H3 deutlich seltener auf (Xie et al., 2009). Dafür existiert hier jedoch eine in Hefen unbekannte Modifikation, die Lysinmethylierung von H3K56 (Garcia et al., 2006), deren monomethylierte Form mit beinahe ebenso großer Häufigkeit vorkommt wie die H3K56-Acetylierung in menschlichen Zellen (Xu et al., 2005).

H3K56 liegt im Kernbereich des Nukleosoms, am Ende der ersten von drei α -Helices, welche, neben zwei Loop-Abschnitten, die globuläre Domäne von H3 bilden (Luger et al., 1997). H3K56 ist durch seine Position sowohl an der Bindung zum Histon H2A als auch an der Interaktion mit der umgebenden DNA beteiligt, siehe Abbildung 1-4.

Einleitung

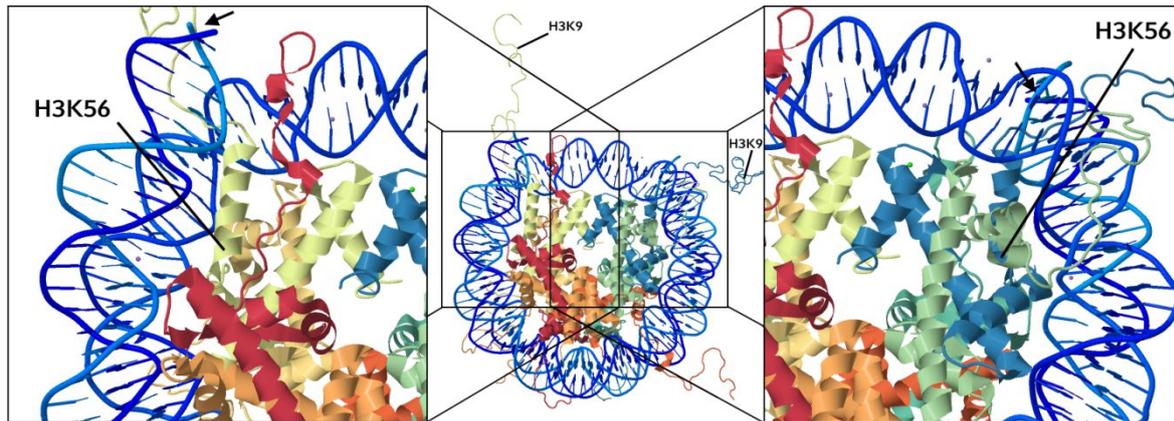


Abbildung 1-4: Nucleosomenstruktur mit Hervorhebung von H3K56 & H3K9

Visualisierung der Quartärstruktur eines Nucleosoms, bestehend aus dem zentralen Histonoktamer, dessen Histone jeweils in einer eigenen Farbe visualisiert sind, sowie der außen angelagerten DNA, welche als blaue Doppelhelix dargestellt ist. In den Vergrößerungen (links und rechts) ist das Lysin 56 am jeweiligen Histon H3, links (gelb) sowie rechts (blau), hervorgehoben. Seine Lokalisation zeigt sich im Kern des Nucleosoms in räumlicher Nähe zur DNA Ein- sowie Austrittsregion, markiert durch schwarze Pfeile. Im Übersichtsbild (Mitte) sind die flexiblen N-Termini der H3 Histone, die frei aus der Kernregion herausragen, gut zu erkennen. Hier befindet sich ein Großteil der bekannten PTMs, so auch das Lysin 9 am Histon H3.

Eigene Erstellung mit der Software „Jmol“ unter Verwendung der Datei „1KX5“ aus der RCSB Proteindatenbank

Die Effekte der Acetylierung von H3K56 umfassen eine Verminderung der Verpackungsdichte der DNA innerhalb des Nucleosoms, verbunden mit transkriptioneller Aktivierung (Shimko et al., 2011). Auch eine Interaktion dieser Region mit dem Linker-Histon H1, die durch Acetylierung unterbunden wird, wurde berichtet (Bernier et al., 2015). Die Effekte der H3K56 Methylierung sind bislang weniger untersucht, jedoch wurden alle drei Methylierungszustände in menschlichen Zellen nachgewiesen (Chen et al., 2015; Garcia et al., 2006). Die biologische Funktion von H3K56me2 ist bislang unbekannt, diese Modifizierung wurde jedoch in der massenspektroskopischen Untersuchung menschlicher Zelllinien *in vivo* nachgewiesen (Chen et al., 2015). Bezüglich der Monomethylierung von H3K56 ist publiziert, dass diese durch die KMT G9a gesetzt wird und essenziell für die DNA-Replikation ist (Yu et al., 2012). Hierfür scheint die Interaktion mit dem die DNA während der Replikation ringförmig umschließenden Effektorprotein PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) (Waga and Stillman, 1998) nötig zu sein, das die Monomethylierung spezifisch erkennt (Lee et al., 2012). H3K56me3 hingegen scheint diese Interaktion zu stören (Yu et al., 2012) und muss anscheinend zunächst auf die Monomethylierung reduziert werden, um erfolgreiche Replikation in der

Einleitung

S-Phase zu ermöglichen. Dies könnte begründen, weshalb H3K56me3 spezifisch in dieser Phase des Zellzyklus stark verringert ist, während die Trimethylierung in sämtlichen anderen Zellzyklusphasen deutlich mit perizentrischem Heterochromatin assoziiert ist (Jack et al., 2013b).

Bezüglich der Methylierung von H3K56 wurde festgestellt, dass in embryonischen Mausfibroblasten (MEF) der Doppel-Knockout (DKO) des Gens der KMT „SUV39h“ zu einem Verlust von H3K56me3 führt, weshalb diese möglicherweise die Bildung von H3K56me3 katalysiert oder zumindest auf eine hieran beteiligten Effektkaskade einwirkt. Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurden zudem die Enzyme „met-1“, „met-2“, „set-6“, „set-25“ und „set-32“ durch si-RNA Knockdown Experimente mit H3K56me3 assoziiert. Zur Demethylierung von H3K56me3 wurde gezeigt, dass die Entfernung von zwei Methylgruppen zu H3K56me1 durch die murinen Enzyme „mJmjd2D“ und „mJmjd2E“ sowie seinem humanen Analogon „hKDM4DL“ katalysiert wird (Jack et al., 2013b).

2. Zielsetzung

2.1 Welche Histonmethyltransferasen sind an der Methylierung von H3K56 beteiligt?

Zielsetzung dieser Arbeit ist, die an der Methylierung des Lysinrests 56 am Histon H3 beteiligten Enzyme zu identifizieren und zu untersuchen.

2.1.1 Untersuchung von Ähnlichkeiten der H3K9- & K56-Methylierung

Die Lysinreste 9 und 56 am Histon H3 weisen, trotz ihrer sehr unterschiedlichen Lokalisationen im Kern und der Schwanzregion des Histons, eine strukturelle Gemeinsamkeit auf. In der Primärsequenz zeigt sich ein identischer Aufbau in der diesen Lysinen nachfolgenden Sequenz „KST“. Die Monomethylierung von H3K9 wurde als durch die Histonmethyltransferase G9a katalysiert beschrieben (Tachibana et al., 2001). Zum Zeitpunkt der Forschung dieser Arbeit war jedoch nicht bekannt, ob auch die Monomethylierung von H3K56 über G9a vermittelt wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, dass die KMT G9a auch an der Methylierung von H3K56 beteiligt ist.

2.1.2 Explorative Identifikation neuer H3K56-KMTs mittels RNAi-Screenings

Zudem sollten explorativ KMTs, bekannt oder unbekannt, in einem unvoreingenommenen Screen identifiziert werden, die spezifisch H3K56 methylieren. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde hierzu durch Frau Dr. A. Jack das humane Genom mittels BLAST-Analyse (Altschul et al., 1990) auf Gene hin untersucht, deren Proteinprodukt die SET-Domäne enthalten. Hierdurch wurden 55 Gene identifiziert, von denen 32 bereits bekannte Methyltransferasen codierten. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde von 41 dieser die SET-Domäne enthaltenden Enzyme, eine RNA-Interferenz (RNAi) Bibliothek angefertigt. Mithilfe von RNAi wurde dann untersucht, ob sich unter diesen die SET-Domänen-enthaltenden Proteinen KMTs befinden, welche die Methylierung von H3K56 beeinflussen.

3. Material

3.1 Labor und Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Einweg- und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser aus Borosilikatglas (Ø: 12mm)	Roth (D)
Einmalspritzen Omnifix (3ml, 5ml, 10ml, 20ml)	Braun (D)
Filter 500ml Bottle Top Filter	Corning Inc. (USA)
Filterpapier Cellulose Chromatography Paper	Whatman International (UK)
Objektträger SuperFrost®	Roth (D)
Verschlussfolie Parafilm® "M" Laboratory Film	Pechiney (USA)
Einmalkanüle Neolus (1.1x40mm)	Terumo Europe (B)
Filter Syringe 0,22µm	Millipore (USA)

3.1.2 Reaktionsgefäße und Kulturschalen

Gewebekulturplatte 24-Loch FALCON MULTIWELL	BD Labware (USA)
Gewebekulturplatte 6-Loch FALCON MULTIWELL	BD Labware (USA)
Gewebekulturplatte 96-Loch BioBind + Streptavidin	Thermo Scientific (FN)
Gewebekulturschale (100,145, 200mm)	Greiner (D)
Glasflaschen (50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1.000ml)	Duran Group (D)
Kryogefäß Cryovial sterile 1,20ml	Simport (CA)

Material

MS-Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt AG (D)
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt AG (D)
Reaktionsgefäß 2ml	Greiner (D)
Rundboden-Polystyrolröhrchen BD Falcon 5ml	BD Biosciences (USA)
Schraubröhre 15ml (120x17mm)	Sarstedt AG (D)
Schraubröhre 50ml (114x28mm)	Sarstedt AG (D)

3.1.3 Pipetten- und Pipettenspitzen

Glaspipetten (5ml, 10ml, 20ml, 25ml)	Brand (D)
Pasteurpipetten (150mm)	Carl Roth (D)
Pipettenspitzen 1.000 μ l	Sarstedt AG (D)
Pipettenspitzen ART200 20-200 μ l	Molecular Bio Products (USA)
Pipettenspitzen M μ LTIFit Research 0,1-10 μ l	Sorenson BioScience (USA)
Pipettenspitzen Plastibrand 10 μ l	Brand (D)
Pipettenspitzen ZipTip μ -C18 10 μ l	Millipore (USA)

3.1.4 Entwicklungs-, Reinigungs-, Träger- und Waschlösungen

Entwickler Flüssigkeit G153 A	AGFA-Gevaert (B)
Isotonische Zählpufferlösung CASYTon	Schärfe System GmbH (D)
Reinigungslösung BD FACS Shutdown Solution	BD Biosciences (USA)

Material

Reinigungslösung FACS Clean	BD Biosciences (USA)
Schnellfixierbad G354	AGFA-Gevaert (B)
Trägerflüssigkeit BD FACSTlow	BD Biosciences (USA)
Waschpufferlösung CellWASH	BD Biosciences (USA)

3.1.5 Filme und Membranen

PVDF-Membran Amersham Hybond-P	GE Healthcare (USA)
Röntgenfilm Super RX Medical X-Ray Film 100 NIF	FujiFilm Co. (JP)

3.2 Geräte

3.2.1 Autoklaven, Bunsenbrenner und Destillatoren

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

3.2.2 Brut- und Kühlschränke

Eismaschine AF30 AS-E 230/50/1	SCOTSMAN FRIMONT (IT)
Gefrierschrank -20°C Typ Nr. GSD11V20	Bosch (D)
Gefrierschrank -80°C Typ Nr. 6485	GFL (D)
Inkubator 37°C	Heraeus (D)

Material

Kühlschrank 4°C	SIEMENS AG (D)
Schüttelinkubator Multitron	Infors (D)

3.2.3 Entwickler, Trennsäulen, Blot- und Gelkammern

Elektrophoresekammer XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen (USA)
Entwickler AGFA CURIX 60 Röntgen Bender	AGFA-Gevaert (B)
Gelkassette Novex Mini-Cell	Invitrogen (USA)
Trennsäule 10 µm, C4, 250 × 4.6-mm, 300 Å Jupiter	Phenomex (D)
Westernblot-Apparat TRANS-BLOT SD CELL	BIO RAD (USA)

3.2.4 Chromatograph, Mikroskope, Scanner, Spektrometer, Thermocycler und Zytometer

Durchflusszytometer BD FACSCanto	BD Biosciences (USA)
Infrarots scanner Odyssey	Li-Cor Biosciences (USA)
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss (D)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (D)
Photospektrometer Biotek	Biotek Instruments (USA)
Photospektrometer NanoDrop	peQLab Biotechnologie (D)
Photospektrometer Ultrospect 2000	Pharmacia Biotech (USA)
Thermocycler mit Fluorimetroptik LightCycler 480	Roche (D)
Umkehrphasenchromatograph Biotek Ettan micLC	GE Healthcare (D)

Material

UV-Transilluminator	peQLab Biotechnologie (D)
Zytometer Bright-Line Hemacytometer	Hausser Scientifix (USA)
Zytometer CASY -Counter	Schärfe System GmbH (D)

3.2.5 Mikrowellen und Strahler

Mikrowelle IntelloWave 2,45MHz, 700W	LG (ROK)
US-Strahler Bioruptor 200	Diagenode (B)
UV-Strahler Stratalinker 1.800	Stratagene (NL)

3.2.6 Mischer, Rotatoren und Zentrifugen

Heizmischer ThermoMixer 5436	Eppendorf AG (D)
Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2	Bachofer (D)
Rotator für Probenröhrchen Model-Nr. 76.000	Labor-Brand (D)
Schüttler Gyrotory Shaker-Model G2	New Brunswick (USA)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (D)
Vakuumkonzentrator Concentrator plus	Eppendorf AG (D)
Zentrifuge 5.417 R	Eppendorf AG (D)
Zentrifuge 5.810 R	Eppendorf AG (D)

3.2.7 Pipetten

Elektronischer Pipettierer Portable Pipet-Aid XP	Drummond (USA)
Pipetten PIPETMAN Classic 2µl/20µl/200µl/1.000µl	Gilson (FR)

3.2.8 Software

ELISA: Gen5 v1.045	Biotek Instruments (USA)
Primerdesign: Primer3 0.4.0	Rozen S. & Skaletsky H. (Rozen and Skaletsky, 2000)
Infrarots scanner: Odyssey Application Software v2.1	Li-Cor Biosciences (USA)
Transilluminator: Vision-Capt v14.1A	Vilber Lourmat (D)
Immunfluoreszenz: Axiovision v4.6	Zeiss (D)
Durchflusszytometrie: FlowJo v7.24	TreeStar (USA)
Durchflusszytometrie: BD FACSDiva Software v5.0.3	BD Biosciences (USA)

3.2.9 Waagen

Analysenwaage Extend ED224S	Sartorius AG (D)
Präzisionswaage Talent TE313S	Sartorius AG (D)

3.3 Chemikalien & Reagenzien

3.3.1 Antibiotika und Zytostatika

Neomycin (G418)	Sigma (USA)
-----------------	-------------

Material

Nocodazol Sigma (USA)

3.3.2 Salze

Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3) Merck (D)

Ammoniumperoxidsulfat (APS) Merck (D)

Anhydrit (CaSO_4) Merck (D)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) Merck (D)

Kaliumchlorid (KCl) Merck (D)

Kaliumcyanoferrat Merck (D)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) Merck (D)

Magnesiumchlorid (MgCl_2) Merck (D)

Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) Merck (D)

Natriumcarbonat (Na_2CO_3) Merck (D)

Natriumchlorid (NaCl) Merck (D)

Natriumdodecylsulfat (SDS) Sigma-Aldrich Chemie (D)

Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) Sigma (USA)

Protaminsulfat Sigma (USA)

Silbernitrat (AgNO_3) Roth (D)

3.3.3 Säuren und Basen

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Merck (D)
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma (USA)
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck (D)
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂), 100% [v/v]	Merck (D)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck (D)
Salzsäure (HCl), 37% [v/v]	Merck (D)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck (D)
Trichloressigsäure (TCA)	Roth (D)
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck (D)
Ultrapure Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Invitrogen (USA)
α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA)	Sigma (USA)

3.3.4 Organische Reagenzien und Lösungsmittel

Aceton (C ₃ H ₆ O)	Roth (D)
Acetonitril (C ₂ H ₃ N)	Sigma (USA)
Acrylamid (30%, Rotiphorese Gel 30)	Roth (D)
Agarose	Biozym (D)
Bacto-Agar	Serva Electrophoresis (D)
Bisacrylamid	Merck (D)

Material

Bromphenol Blau	Roth (D)
Chloroform (CHCl ₃)	Merck (D)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (D)
Coomassie Brilliant Blue (R250)	Sigma-Aldrich Chemie (D)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (D)
Ethanol (C ₂ H ₆ O), 100% [v/v]	Merck (D)
Ethidiumbromid	Merck (D)
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium (EDTA-Na ₂)	Sigma (USA)
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma (USA)
Formaldehyd (CH ₂ O), 37% [v/v]	Merck (D)
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega (USA)
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃), 100% [v/v]	Merck (D)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck (D)
Glykogen	Merck (D)
Harnstoff (CH ₄ N ₂ O)	Invitrogen (USA)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Merck (D)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (D)
Methanol (CH ₄ O), 100% [v/v]	Merck (D)
Milchpulver	Roth (D)
N,N,N',N',-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma (USA)

Material

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (USA)
Phosstop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (CH)
Pyronin Y	Sigma (USA)
ThermoPol Reaktionspuffer	New England Biolabs (USA)
TritonX-100	Sigma (USA)
Trypan Blau	Sigma (USA)
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie (D)
Xylen Cyanol	Sigma (USA)
β -Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich Chemie (D)

3.4 Kits

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit (100 U)	Biozym (D)
Promega Wizard Miniprep System	Promega (USA)
ProtoScript M-MuLV 1 st Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs (USA)
QIAGEN RNeasy Mini Kit	QIAGEN (NL)
Qproteome Nuclear Protein Kit	QIAGEN (NL)

3.5 Enzyme

DPN1 Restriktionsendonuklease	New England Biolabs (USA)
Micrococcal Nuclease (MNAse)	New England Biolabs (USA)
Phusion HF DNA-Polymerase	Biozym (D)

Material

RNaseA	Roche (CH)
SigmaFAST OPD Substrat	Sigma-Aldrich Chemie (D)
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs (USA)
Trypsin	Invitrogen (USA)

3.6 Substrate

SigmaFAST OPD Substrat	Sigma-Aldrich Chemie (D)
------------------------	--------------------------

3.7 Standardpuffer und -lösungen

3.7.1 Denaturierungs-Puffer für Western Blot Membranen

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
2-β-Mercaptoethanol (gelöst in H ₂ O _{bidest.} ; gelagert bei RT; *unmittelbar vor Verwendung hinzugefügt)	100 mM
SDS	2% [w/v]
TRIS (pH 6,7)	62,5mM

3.7.2 Nukleasefreies Wasser

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
DEPC (12h gelöst in H ₂ O (filtriert durch Umkehrosiose), 1h autoklaviert; gelagert bei RT)	0.1% [v/v]

3.7.3 PBS-Puffer, 10x

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
KCl	27mM

Material

KH_2PO_4 91mM

(mit HCl titriert auf pH 7,4; gelöst in H_2O ; gelagert bei 4°C)

Na_2HPO_4 100mM

NaCl 1,4M

3.7.4 Transfer Puffer für Western Blots (Bjerrum Schafer-Nielsen Puffer mit SDS)

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
------------------------	----------------------

Glycin	39mM
--------	------

Methanol	20% [v/v]
----------	-----------

SDS	1,3mM
-----	-------

TRIS Base	48mM
-----------	------

(gelöst in H_2O ; gelagert bei Raumtemperatur)

3.7.5 HILIC-Puffer A für Hochdruck Säulenchromatographie

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
------------------------	----------------------

Trifluoressigsäure	0,1% [v/v]
--------------------	------------

(gelöst in H_2O ; gelagert bei 4°C)

3.7.6 HILIC-Puffer B für Hochdruck Säulenchromatographie

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
------------------------	----------------------

Trifluoressigsäure	0,08% [v/v]
--------------------	-------------

(gelöst in Acetonitril; gelagert bei 4°C)

3.7.7 HILIC-Lagerungspuffer für Hochdruck Säulenchromatographie

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
Acetonitril (gelöst in H ₂ O; gelagert bei 4°C)	70% [v/v]

3.7.8 Hypotoner Lysepuffer zur Histonextraktion

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)	0,08% [v/v]
Dithiothreitol (DTT)	1mM
KCl	1mM
MgCl ₂	1,5mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	91mM
TRIS (pH 8)	10mM

3.7.9 PBS-Tween Blocklösung für qualitative Western Blots

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
KCl	27mM
KH ₂ PO ₄	91mM
Milchpulver (gelöst in H ₂ O; gelagert bei 4°C)	5% [w/v]
Na ₂ HPO ₄	100mM
NaCl	1,4M

Material

Tween 20	0,001% [v/v]
----------	--------------

3.7.10 PBS Blocklösung für quantitative Western Blots

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
KCl	27mM
KH ₂ PO ₄	91mM
Milchpulver (gelöst in H ₂ O; gelagert bei 4°C)	5% [w/v]
Na ₂ HPO ₄	100mM
NaCl	1,4M

3.7.11 PBS-Tween Waschlösung für qualitative Western Blots

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
KCl	27mM
KH ₂ PO ₄	91mM
Na ₂ HPO ₄	100mM
NaCl	1,4M
Tween 20 (gelöst in H ₂ O; gelagert bei Raumtemperatur)	0,001% [v/v]

3.7.12 SDS-PAGE Ladepuffer, 5x

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
------------------------	----------------------

Material

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

3.7.13 SDS-PAGE Laufpuffer, 10x

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
Glycerin	1,9M
SDS (gelöst in H ₂ O; gelagert bei Raumtemperatur)	35mM
TRIS (pH 8,8)	250mM

3.7.14 TBE-Puffer

<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>
Borsäure	450mM
EDTA-Na	8mM
TRIS (gelöst in H ₂ O; gelagert bei Raumtemperatur)	450mM

Material

3.7.15 TBS-Puffer, 10x

Zusammensetzung

Konzentration

NaCl

150 mM

TBS + 0,1% [v/v] Tween20

TRIS

50mM

(mit HCl titriert auf pH 8,8; gelagert bei Raumtemperatur)

3.8 si-RNAs

<u>Oligo Name</u>	<u>Len</u>	<u>MW</u>	<u>Tm°</u>	<u>pg</u>	<u>nmol</u>	<u>GC %</u>	<u>Sequence(5'-3')</u>
SETDB2	19	1327	52	1814	136,7	33,30%	GUGCAAUGUAAUCGACAA
SUV39H1	19	1330	55,9	2255	169,6	42,90%	GGUGAAAUGGCGUGGAUUA
MLL	19	1327	52	1696	127,8	33,30%	GGCAAUAGUUCUAAGCAAA
WHSC1	19	1331	57,9	887	66,6	47,60%	GUCCAAAGUGUCGGGUUA
WHSC1L1	19	1328	54	1491	112,3	38,10%	GGGAAGAACCAGUACUAAA
NSD1	19	1330	55,9	1985	149,3	42,90%	CAGCCAAGAUGCAGUGUAA
PRDM1	19	1327	52	2024	152,5	33,30%	CGGCUUUAUGAAGAGAAA
MECOM	19	1327	52	2198	165,6	33,30%	GAUAAAACGUCCAUGGUUA
PRDM4	19	1330	55,9	2251	169,3	42,90%	AGGACAUGGUGGUGUGAUA
PRDM5	19	1328	54	1563	117,7	38,10%	GGACAAUAUCCAUGGUGUA
PRDM7	19	1330	55,9	1434	107,8	42,90%	GGGAGAAACUGCUAUGAGU
PRDM8	19	1328	54	2255	169,7	38,10%	CAAGAGAACAGUACCGUAU
PRDM9	19	1330	55,9	1945	146,2	42,90%	GGACAGCACUCAAGACUAA
PRDM10	19	1327	52	1736	130,8	33,30%	GGAAGCAAUUUAAGCGAA
PRDM11	19	1328	54	1891	142,4	38,10%	GGUAAGUUGGUUUGGAUGA
PRDM12	19	1328	54	1974	148,6	38,10%	ACAUCAAGUGUGCACGUAA
PRDM13	19	1328	54	2075	156,2	38,10%	GCUUAUUACCCGCUCAAUU
PRDM14	19	1330	55,9	1044	78,5	42,90%	CCAGUGAAGUGAAGACCUA
PRDM15	19	1334	61,8	2175	163	57,10%	CCACAGCAGCCGAGAGCAA
PRDM16	19	1333	59,8	2469	185,2	52,40%	CCACGAAGGCGGUCUGUUA
PRDM17	19	1333	59,8	2139	160,5	52,40%	GAGAAGGGCGAGGGAGUAA
SMYD4	19	1325	50,1	1173	88,5	28,60%	CCAAGAUUAUGUUACGUAA
SMYD5	19	1325	50,1	1317	99,4	28,60%	GGAAAUUGUCCAUAACUU
CXXC1	19	1331	57,9	1298	97,5	47,60%	GCACUCGCCUUCAGGAAAU
SETD3	19	1327	52	2020	152,2	33,30%	GCUAAUGACUGUUGAAUCU
SETD4	19	1328	54	2089	157,3	38,10%	GCUGAAAGCUAGGAAGUUU
SETD5	19	1331	57,9	1786	134,1	47,60%	GUGAAUACCCGGAGGUCUU
SETD6	19	1330	55,9	1949	146,5	42,90%	GCAAUGGCUAACUGGCAA

Material

EHMT1	19	1333	59,8	521	39,1	52,40%	GCACAGCCCUUGAGGACUA
EHMT2	19	1330	55,9	146	11	42,90%	CCAUGAACAUUGAUCGCAA
SETDB1	19	1328	54	2262	170,3	38,10%	GAGUUAGAGACAUGGGUAA
MLL2	19	1330	55,9	2051	154,2	42,90%	CGGAGUGGUUUGAGAACUA
MLL3	19	1325	50,1	1886	142,3	28,60%	GUACAGAAUUAGAGAACAA
ASH1L	19	1325	50,1	1984	149,7	28,60%	CGAUUAAGCAUAAGGAAA
PRDM6	19	1330	55,9	701	52,7	42,90%	GGGCAGUGCUUUAAGACUU
SMYD2	19	1327	52	1636	123,3	33,30%	AGAUAGAAAUGACCGGUUA
EZH1	19	1330	55,9	1693	127,3	42,90%	GCGGAAAGGUCUAUGAAA
SUV39H2	19	1328	54	2658	200,1	38,10%	GGAUAUUGUUGGAGAGUA
SUV420H1	19	1330	55,9	175	132	42,90%	CCUGUGAGAUUUAGGCCUA
SUV420H2	19	1333	59,8	1926	144,4	52,40%	CGACAGAGUGACAGCACGA
SETMAR	19	1328	54	1949	146,7	38,10%	AAGGCUAGAUCAUGGGAAA

Tabelle 3-1: siRNAs gegen Genprodukte mit SET-Domäne

Hersteller: Eurofins Genomics (D), Bestellnummer: 2043462

3.9 Oligonukleotide

Adenosintriphosphat (ATP)

Amersham (USA)

Desoxyribonukleotidtriphosphat Solution Mix 10mM

New England Biolabs (USA)

DNA Längenstandard 100bp Ladder

New England Biolabs (USA)

3.10 Primer

Oligo Name	BP	MW	Tm°	pg	nmol	GC %	Sequenz (5'-3')
PRDM10 Seq1 Forward	20	6193	74.1	233.5	37.7	70%	GGGCGGGGTGTTCTCCAAGC
PRDM10 Seq1 Reverse	20	6091	72.4	322.9	53.0	70%	AGCTCCGAGCCCCTGACGAG
PRDM10 Seq2Forward	20	6017	75.6	158.2	26.3	65%	TTCTCCAAGCGGCGCATCCC
PRDM10 Seq2Reverse	20	6091	73.5	263.9	43.3	70%	GCTCCGAGCCCCTGACGAGA
PRDM10 Seq3Forward	20	6057	73.6	318.0	52.5	65%	CAGTGCCACCCAGCGGTTT
PRDM10 Seq3Reverse	20	6208	72.7	278.0	44.7	65%	TGGGTGAGCAGGTCCGTCGT
SETD4 Seq1 Forward	23	6936	72.9	335.9	48.4	60.8%	GCCTCTCCCTCTGCAGTTTTGGC
SETD4 Seq1 Reverse	22	6822	74.3	235.8	34.5	59.0%	GGGCCAAGGCACGTGGAATA
SETD4 Seq2Forward	23	6976	75.0	263.3	37.7	60.8%	CCTCTGCAGTTTTGGCCGTTCC
SETD4 Seq2Reverse	22	6909	75.4	199.8	28.9	63.6%	AAGATGGAGGCTGCAGTGGGCG
SETD4 Seq3Forward	22	6545	68.7	284.8	43.5	59.0%	ACAGCCTTCAGCCTCTCCCTCT
SETD4 Seq3Reverse	23	7024	74.7	195.9	27.8	56,5%	CCAAACAGCCCCAGATGAAGGCA
CXXC1 Seq1 Forward	22	6749	73.5	343.7	50.9	63.6%	CTGCCCTGGAT GAGCGACACAG
CXXC1 Seq1 Reverse	24	7074	73.8	252.9	35.7	62.5%	CGCTCCTCCTCCTCTCCATCAC
CXXC1 Seq2Forward	22	6782	72.8	262.2	38.6	59.0%	GCCCTGGATGAGCGACACAGAA
CXXC1 Seq2Reverse	23	6800	72.3	259.3	38.1	56.5%	TCGCTCCTCCTCCTCTCCATCA
CXXC1 Seq3Forward	24	7625	72.6	271.6	35.6	58.3%	GTGATGGAGAGGAAGGAGGAGC
CXXC1 Seq3Reverse	22	6641	72.2	247.6	37.2	63.6%	GGTCCTTGGCATCAGCCCTCTC

Material

PRDM12 Seq1 Forward	20	6242	72.7	223.1	35.7	70%	GGTGTGCCCGGGCTAGAGGA
PRDM12 Seq1 Reverse	20	6192	72.6	203.1	32.8	60%	ATGTGCGAGCGCAGGTTGCT
PRDM12 Seq2Forward	20	6002	73.3	213.6	35.5	70%	TCCTCCGCCACCGAGAGTCC
PRDM12 Seq2Reverse	20	6100	75.1	225.6	36.9	70%	GGAGATGGCGCCCCACAAC
PRDM12 Seq3Forward	20	6097	73.0	229.5	37.6	65%	AAGCGCTTCCGAGCTGTGCC
PRDM12 Seq3Reverse	20	6254	74.0	196.4	31.4	65%	AGGAAACGGGCAGGGACCGA
PRDM14 Seq1 Forward	20	6122	74.1	294.9	48.1	70%	GGGACCGGCTTCGGATCCAC
PRDM14 Seq1 Reverse	25	7713	70.6	279.3	36.2	48%	ACTCGCATGTGTTTGTGGTAGGCTG
PRDM14 Seq2Forward	25	7617	70.6	277.7	36.4	48%	CCAGCCTAAACAAACACATGCG
PRDM14 Seq2Reverse	20	6199	72.7	266.0	42.9	65%	GCTGCCTGATGTGTGTGCGG
PRDM14 Seq3Forward	24	7288	71.1	236.2	32.4	45.8%	TCCAGCCTAAACAAACACATGCG
PRDM14 Seq3Reverse	20	6174	72.3	255.0	41.3	60%	TGCT GCCT GAT GTGTGTGCG
MLL2 Seq1 Forward	20	6075	75.9	363.6	59.8	65%	CGGGCAGCTCACCGCATCAA
MLL2 Seq1 Reverse	20	6057	71.9	292.7	48.3	65%	ACGGGCTATGTCGCCACCT
MLL2 Seq2Forward	20	6057	72.4	266.1	43.9	65%	ACCAGGCTCGGTGCCTCCAT
MLL2 Seq2Reverse	20	6251	74.5	283.9	45.4	70%	CAGTCGCGCAGGGGAAGTGG
MLL2 Seq3Forward	20	5993	74.5	185.1	30.8	70%	CCACTTCCCCTGCGCGACTG
MLL2 Seq3Reverse	20	5922	74.1	204.6	34.5	70%	TCCCCTGGCCCCTCACACAC
SETD5 Seq1 Forward	21	6379	73.0	247.0	38.7	61.9%	ACCCGGAGGTCTTCCAAGCA
SETD5 Seq1 Reverse	20	6202	74.9	241.5	38.9	70%	TTCGGCCGGGGCCTAGAAGG
SETD5 Seq2Forward	20	6140	76.5	283.8	46.2	70%	GCCCCGGCCGAAGAGTCGAA
SETD5 Seq2Reverse	21	6383	73.8	353.7	55.4	61.9%	CTGCCTGCTGTGCATTGGCCT
SETD5 Seq3Forward	22	6829	72.6	268.2	39.2	63.6%	GGGACCACTCAGAGGCATGGGT
SETD5 Seq3Reverse	20	6131	71.5	258.8	42.2	70%	CTCTACAGGCGACGGCAGGC
PRDM8 Seq1 Forward	20	6239	72.8	323.6	51.8	65%	GGTTTGGTAGGGGCCGCGTT
PRDM8 Seq1 Reverse	20	6155	72.2	229.1	37.2	65%	AGGCCGAAGTAGCTGCCCGA
PRDM8 Seq2Forward	22	6856	72.3	244.4	35.6	59.0%	GTTTGGTAGGGGCCGCGTTGTA
PRDM8 Seq2Reverse	20	6159	72.0	206.7	33.5	65%	TCGGTACTGCTGCGGTGTGC
PRDM8 Seq3Forward	19	5909	71.8	294.9	49.9	63.1%	TTGGTAGGGGCCGCGTTGT
PRDM8 Seq3Reverse	20	6159	69.9	254.6	41.3	65%	GCTCGGTACTGCTGCGGTGT
PRDM15 Seq1Forward	20	5983	75.8	272.7	45.5	70%	TCGTTATCCCCGCCCTCGG
PRDM15 Seq1 Reverse	21	6546	73.9	218.6	33.4	66.6%	CTAAACGCGGGTTGGGGGTC
PRDM15 Seq2Forward	20	6106	75.5	147.4	24.1	65%	TTCCGGAGCGGATCGCAACC
PRDM15 Seq2Reverse	20	6115	73.6	190.0	31.0	65%	CCGCAGCCGGCGAATGTAAC
PRDM15 Seq3Forward	20	6048	73.9	222.9	36.8	65%	GCCGCCATGCCGACTGTTCT
PRDM15 Seq3Reverse	21	6401	74.2	213.9	33.4	61.9%	CCAGCCGGGTTTTGACTCCGA

Tabelle 3-2: Primer für Gene deren Produkte die SET-Domäne enthalten

Fett hervorgehoben: Primerpaare die nach Funktionskontrolle für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden. Hersteller: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D); Bestellnummer: 8011049170

Material

<u>Oligo Name</u>	<u>BP</u>	<u>T_m°</u>	<u>GC %</u>	<u>Sequenz (5'-3')</u>
GAPDH Forward	20	59.1	55%	CTGCACCACCAACTGCTTAG
GAPDH Reverse	21	56.5	48.6%	CTTCACCACCTTCTTGATGTC
HPRT1 Forward	22	57.1	57%	AAGGGTGTTTATTCCTCATGGA
HPRT1 Reverse	20	58.5	58,5%	AATCCAGCAGGTCAGCAAAG
HMBS Forward	20	58.2	45%	AGTGTGGTGGCAACATTGAA
HMBS Reverse	20	58.8	50%	GCATGTTCAAGCTCCTTGGT

Table 3-3: Primer für nicht regulierte Gene

Als Kontrolle und Referenz für PCR-Versuche verwendet. Hersteller: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)

3.11 Peptide & Proteine

peqGOLD V Protein Marker

peQLabs (D)

Rekombinante Histone H2AZ

Dr. Clemens Bönisch, AG Hake

Rekombinante Histone H3.1

Dr. Clemens Bönisch, AG Hake

3.12 Plasmide

pET 21 Vektor

EMD Biosciences (USA)

3.13 Antikörper

Primärantikörper

<u>Name</u>	<u>Antigen</u>	<u>Spezies</u>	<u>Typ</u>	<u>Hersteller</u>
α-GFP	aequorea victoria GFP	Maus	monoklonal	Roche (CH)
α-H2A	humanes H2A typ 1B/E	Kaninchen	polyklonal	Abcam (USA)
α-H3 (CT)	humanes H3 (100-135)	Kaninchen	polyklonal	Abcam (USA)
α-H3S10ph	humanes H3S10ph	Kaninchen	monoklonal	Millipore (USA)
αH3K4me3	humanes H3S10ph	Kaninchen	polyklonal	Abcam (UK)
α-H3K9me1	humanes H3K9me1	Kaninchen	monoklonal	Millipore (USA)
α-H3K9me2	humanes H3K9me2	Kaninchen	polyklonal	Active Motif (USA)
α-H3K9me3	humanes H3K9me3	Kaninchen	polyklonal	Active Motif (USA)

Material

Lysogeny Broth (LB)-Agar	Serva Electrophoresis (D)
OptiMEM with Glutamax	Invitrogen (USA)
Penicillin/Streptomycin, 100x (P/S)	PAA (AT)
Trypsin/EDTA, 10x (0,5% [v/v] / 0,2% [w/v] in PBS)	PAA (AT)

3.16 Bakterien- und Zelllinien

Bakterien

Spezies	Stamm	Genotyp/Zelltyp	Referenz
Escherichia coli	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene (NL)

Zellen

Typ	Genotyp/Zelltyp	Referenz
HeLa-Kyoto	Humane Zervixkarzinomzellen	ATCC (CCL-2)
mES B5.3	Murine Embryonale Stammzellen (mES)	Schotta Labor (Sadic, 2014)

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung und Ernte von Zellen

4.1.1.1 Humane HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind adhärent wachsende Zellen, die 1952 aus einem humanen Zervixcarcinom gewonnen und immortalisiert wurden (Gey, 1952; Masters, 2002). Die Zelllinie (ATCC CCL-2) wurde in glukosehaltigem Medium (DMEM High Glucose + 10% [v/v] FCS + 1% [w/v] P/S) bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ in Gewebekulturschalen unterschiedlicher Größen angezchtet. Bei Konfluenz von etwa 70% – 90% wurden die Kulturen gelöst und in eine Suspension überführt und so für weitere Verarbeitung geerntet oder durch Verdünnung reduziert und anschließend in eine frische Kulturschale zur erneuten Anzchtung überführt. Hierbei wurde das vorhandene Medium abgesaugt, die adhärenen Zellen mit PBS gespült und anschließend durch Hinzugabe von Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Durch Zugabe von frischem Medium wurde durch die enthaltenen Proteaseinhibitoren die Trypsin-EDTA-Lösung inaktiviert. Die Konzentration der Zellen in dieser Suspension wurde gemäß 4.1.2 ermittelt. Danach wurde ein 10⁵ Zellen entsprechendes Volumen der so erzeugten Zell-Suspension in eine neue Gewebekulturschale überführt und diese mit frischem Medium aufgefüllt. Standardmäßig erfolgte die Kultivierung von HeLa-Zellen in runden Gewebekulturschalen mit 145mm oder 200mm Durchmesser. Bei einigen speziellen Fragestellungen wurde jedoch auf 6-Loch- und 24-Loch-Gewebekulturplatten als Kulturgefäß zurückgegriffen.

4.1.1.2 Murine embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (mES) der Maus, die einen homozygoten Knock-out des Gens für G9a (G9a^{-/-}) aufweisen, sowie entsprechende Wildtyp-Zellen, wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Hahn und Prof. Gunnar Schotta zur Verfügung gestellt (Hahn et al., 2013; Sadic, 2014). mES sind adhärenent wachsende Zellen welche auf gelatinierten Kulturschalen unterschiedlicher Größe in glukosehaltigem Medium (DMEM High Glucose + 15% [v/v]

FCS + 1% [w/v] P/S + 0.1% [v/v] β -Mercaptoethanol + LIF 1 μ g) bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ angezüchtet wurden. Die Ernte der Zellen erfolgte analog zu 4.1.1.1.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl in Suspensionen wurde automatisiert durch ein Impedanzmessverfahren (Coulter, 1956) mit Hilfe eines CASY-Counters durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.1.1 beschrieben gelöst und 50 μ l der Zellsuspension mit 10ml CasyTon-Lösung vermischt, geschwenkt und in den CASY-Counter zur Zählung eingebracht.

4.1.3 Gefrierlagerung

Die Zellen wurden langfristig in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden Zellen mit Konfluenz von 70% analog zu 4.1.1 in Suspension gebracht und durch Zentrifugation (10min, 310xg) in einem 50ml Röhrchen pelletiert. Nach Verwerfen des flüssigen Überstandes wurde das Zell-Pellet in 2ml Einfriermedium (10% [v/v] DMSO in FCS) resuspendiert und auf zwei Kryoröhrchen von je 1ml Volumen verteilt. Die Zellen wurden so zunächst für einige Wochen bei -80°C gelagert, bevor sie langfristig in einen Flüssigstickstofftank überführt wurden.

4.1.4 Auftauen

Die Zelllösung aus den Kryoröhrchen wurde zum Auftauen nach Entnahme aus dem Stickstofftank, bei kürzerer Lagerung aus dem -80°C Gefrierschrank, rasch in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut, in 10ml warmem Medium (RT) aufgenommen und zur Entfernung des zytotoxischen DMSOs aus der Einfrierlösung durch Zentrifugation (10min, 310xg) pelletiert. Nach Verwerfen des flüssigen Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf Gewebekulturschalen ausgesät gemäß 4.1.1.

4.1.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) dient der Charakterisierung von Zellen durch Laserstreulicht und Fluoreszenz. Es beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zelle, wenn diese Laserstrahlen passiert. Das

Methoden

Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über das Zellvolumen, während das Seitwärtsstreulicht die Granularität der Zelle beschreibt. Weitere Eigenschaften können mittels freier oder Antikörper-gekoppelter Fluoreszenz untersucht werden (Cormack et al., 1996). In dieser Arbeit wurde das BD FACSCanto benutzt. 1×10^6 HeLa Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben kultiviert, je nach Fragestellung teilweise mit unterschiedlichen Vektoren transient oder stabil transfiziert, wie unter 4.3.7 beschrieben, in Suspension gebracht und durch Zentrifugation (10min, 5000 rpm) pelletiert. Dieses Pellet wurde in PBS aufgenommen, in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert (10min, 2000 rpm), das Pellet in 300µl PBS gelöst, 700µl Methanol tropfenweise unter konstantem Schütteln hinzugefügt und für eine Stunde bei -20°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS und Zentrifugation (10min, 2000 rpm) wurde das Pellet mit einem Primärantikörper resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde hierbei je nach Fragestellung passend gewählt. Zum Waschen der Zellen erfolgte eine weitere Zentrifugation (10min, 385xg), Resuspension des Pellets in PBS und erneuter Zentrifugation (10min, 385xg). Danach wurde das Pellet in Dunkelheit mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Zweitantikörper gegen den Erstantikörper in PBS erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurden im Anschluss die Zellen durch Zentrifugation (10min, 385xg), Resuspension in PBS und Zentrifugation (10min, 385xg) gewaschen. Je nach Fragestellung wurde zur Bestimmung der Zellzyklusphase die DNA der Zellen für eine halbe Stunde bei 37°C in Propidiumiodid-Lösung (100µg/ml RNaseA + 50µg/ml Propidiumiodid in PBS) gefärbt. Dieser wurde RNaseA zugefügt, um die RNA zu zersetzen und so die unerwünschte Färbung von RNA statt DNA durch Propidiumiodid zu vermeiden. Zur Analyse wurde die Zellsuspension in 5ml Rundboden-Polystyrolröhrchen überführt und in das Durchflusszytometer eingesetzt. Bei einigen Fragestellungen wurde auf die Antikörper-Inkubation und -Detektion sowie die Propidiumiodid-Färbung verzichtet. Die Signale wurden mit BD FACSDiva Software v5.0.3, bzw. FlowJo v7.24 ausgewertet. Hierbei wurde anhand einer Eichung mit Wildtyp-Zellen ein Gate um die Population der Zellen mit normaler Lichtstreuung definiert. Die Populationen dieser definierten Größe und Granularität wurden dann je nach Fragestellung in den unterschiedlich transfizierten Zellgruppen auf ihre Fluoreszenz und Zellzahl untersucht. Mittels der Referenzdaten der Wildtypzellen wurde ein weiteres Gate gesetzt, um das von den Zellen selbst emittierte Lichtsignal von der Fluoreszenz eingebrachten GFPs zu differenzieren.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Säureausfällung von Histonen

Histone wurden durch Säureausfällung aus hypoton lysierten Zellkernen extrahiert gemäß Protokoll (Shechter et al., 2007). Hierzu wurden 8×10^5 Zellen, wie unter 4.1.1.2 beschrieben, geerntet und zentrifugiert (10min, 310xg). Das so entstandene Pellet wurden in 1ml PBS aufgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut pelletiert (5min, 385xg). Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde in eiskaltem hypotonen Lysepuffer aufgenommen und unter ständiger Rotation (30min, 4°C) lysiert. Es folgte die erneute Zentrifugation (10.500xg, 10 min, 4°C) und Resuspendierung des Pellets (Zellkerne) in 400µl eiskalter Schwefelsäure (0,4N). Diese Suspension wurde zur Hydrolyse der Zellkerne unter ständiger Rotation (über Nacht, 4°C) inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile des Lysats sowie saure und nur leicht basische Proteine durch Zentrifugation (10min, 18.000xg, 4 °C) präzipitiert, wobei die stark basischen Histone gelöst blieben. Dieser Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Zur darauffolgenden Histonextraktion wurden 132µl eisgekühlte Trichloressigsäure hinzugefügt, das Gefäß mehrfach invertiert und anschließend auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Die ausgefallenen Bestandteile wurden abzentrifugiert (10min, 18.000xg, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die an der Wand des Reaktionsgefäßes anhaftenden Histone wurden durch zweimaliges Waschen mit 500µl eiskaltem Aceton, gefolgt von jeweils einer Zentrifugation (5min, 18.000xg, 4°C), ausgefällt. Die pelletierten Histone wurde luftgetrocknet (RT) und anschließend in 50µl bis 100µl H₂O_{dest} aufgenommen um bei -20°C gelagert zu werden.

4.2.2 Acrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen mit molaren Massen zwischen 5kDa und 500kDa. Die Besonderheit der Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE) ist, dass sich hierdurch Proteinmolekülmischungen unter Einfluss eines elektrischen Feldes im Gel auftrennen lassen, wobei durch die Anlagerung von SDS sämtliche Proteine unter Verlust ihrer ursprünglichen Ladung stark negativ geladen werden. Aufgrund dieser Wirkung des Natriumdodecylsulfats wandern nun alle Moleküle zur Anode, wobei die Geschwindigkeit der Wanderung jetzt ausschließlich vom Molekulargewicht abhängt. Je höher die molare Masse, desto langsamer verläuft die

Methoden

Wanderung der Moleküle (Laemmli, 1970). Zur Auftrennung von Proteinen, insbesondere Histonen, wurde, wenn nicht anders angegeben, ein 15%iges Polyacrylamidgel verwendet (15% SDS-PAGE). Dieses wurde in eine Novex Mini Kassette (Invitrogen) gegossen, wobei das Trenngel bis etwa 1,5cm unter der Oberkante der Gelkammer aufgefüllt und bis zur Aushärtung mit H₂O_{dest} abgedeckt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung des Gels in der Kammer zu gewährleisten. Danach wurde das Wasser abgegossen und Sammelgel eingefüllt sowie bis zum Aushärten ein Kamm eingesteckt, welcher Aussparungen erzeugte, die der späteren Beladung des Gels dienen. Die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele ist in Tabelle 4-1 aufgeführt.

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

Tabelle 4-1: Zusammensetzung: SDS-Polyacrylamid-Sammelgel & -Trenngel

Die fertig gegossenen Gelkassetten wurden in „XCell SureLock Mini-Cell“ (Invitrogen) Elektrophoresekammer eingesetzt (siehe Abbildung 4-1). Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der negativen Ladungen in den Proteinen zu erreichen, wurden diese in SDS-Ladepuffer aufgenommen, der als Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol enthält, und im Thermoblock (5min, 95°C) denaturiert, bevor sie in das SDS-Polyacrylamidgel geladen wurden. Neben den Proben wurde ein Proteinmarker (peqGOLD Marker V) als Größenstandard geladen. Die Elektrophoresekammer wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt und zunächst eine Spannung von 100V angelegt (20min), die nach Passage der Proteine aus dem Sammelgel auf 180V (60min) erhöht wurde. Nach vollständigem Durchlaufen des Gels, abzulesen an der Lauffront des Proteinmarkers, wurde das SDS-Gel zur optischen Analyse der Proteine gefärbt (siehe 4.2.3) oder zur Immundetektion, mittels Westernblot, auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran übertragen (siehe 4.2.4).

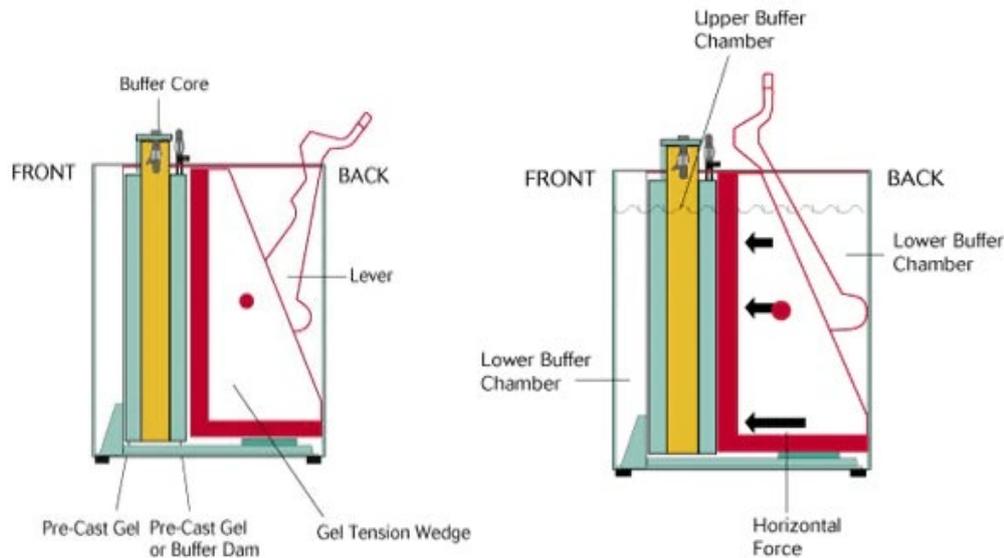


Abbildung 4-1: Gelelektrophorese-Kammer

Schemazeichnung einer Gelelektrophorese-Kammer im offenen Zustand (links) sowie arretierten Zustand (rechts). Mit freundlicher Genehmigung durch: Thermo Fisher Scientific Inc.

4.2.3 Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau

Zur optischen Detektion von Proteinen in SDS-PAGE-Gele wurden diese durch Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau sichtbar gemacht. Dieser Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an und färbt Proteine somit unspezifisch blau an. Hierdurch lassen sich Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 200ng bis 400ng je Bande sichtbar machen (Fazekas de St Groth et al., 1963). Zur Anfärbung wurden Gele nach Elektrophorese in Coomassie-Lösung (50% [v/v] CH_4O + 10% [v/v] $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ + 1,21mM Brilliant Blau R250 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) inkubiert (60min, RT). Durch nachfolgendes mehrmaliges Waschen ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ + 40% [v/v] $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ + 10% [v/v] $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) wurden die Proteinbanden optisch sichtbar gemacht. Zur Beseitigung von Rückständen der enthaltenen Essigsäure wurden die Gele mehrfach mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen, bevor sie eingescannt und zur weiteren Aufbewahrung getrocknet wurden.

4.2.4 Westernblot-Analyse

Bei der Westernblot-Analyse handelt es sich um ein sowohl sehr sensitives als auch hochgradig spezifisches Protein-Nachweis-Verfahren dessen Nachweisgrenze bei bis zu 1pg Protein liegt. Durch die Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran, das sogenannte „Blotten“, werden die Proteinbanden

Methoden

immunologisch detektierbar (Renart et al., 1979). Hierfür wurde ein „Semi-dry“-Verfahren mithilfe des Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell-Apparates verwendet. Je nach Experiment wurde entweder eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran verwendet. PVDF-Membranen wurden dabei zunächst in Methanol aktiviert (30s, RT). Beide Membrantypen wurden dann zusammen mit dem Polyacrylamidgel in Transferpuffer (siehe 3.7.2) äquilibriert (15min, RT). Anschließend wurden Gel und Membran von in Transferpuffer getränkten Filterpapieren umgeben, die als Ionen-Reservoir fungierten. Vertikal des Polyacrylamidgels wurde ein elektrisches Feld angelegt, wodurch ein Proteintransfer über eine Stunde bei 200mA erfolgte (siehe Abbildung 4-2). Für die Immundetektion der Proteine wurde die Membran im Anschluss auf dem Schüttler in entsprechender Blockierlösung (siehe 3.7.7 & 3.7.8) inkubiert (60min, 4°C), um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Danach wurde die Membran dreifach mit PBS-Tween Waschlösung (siehe 3.7.9) gereinigt (10min, RT), bevor sie mit einem der Fragestellung entsprechenden Primärantikörper in Blocklösung (siehe 3.7.7) inkubiert wurde (je nach Fragestellung: ü.N., 4°C / 1h, RT). Vor der weiteren Inkubation mit einem passenden Sekundärantikörper (1h, 4°C), wurde die Membran erneut dreimal mit PBS-T gewaschen (10min, RT). Der Sekundärantikörper erkannte den jeweiligen Primärantikörper und war je nach Fragestellung mit Meerrettich-Peroxidase oder einem Immunfluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Nach drei letzten Waschschritten in PBS-T (15min, RT) wurde die Membran entweder zur Detektion mittels Röntgenfilmen in der Dunkelkammer mit Lumineszenzreagenz (ECL) als Substrat benetzt oder mittels Infrarotscanner Odyssey (Li-Cor Biosciences) ausgelesen und unter Verwendung der Odyssey Application Software v2.1.12 ausgewertet. Je nach Signalstärke wurden unterschiedliche Expositionszeiten gewählt. Aufgrund der unterschiedlichen Lichtspektren verschiedener sekundären Antikörper war es, je nach Fragestellung, auch möglich eine simultane Fluoreszenzdetektion am Infrarotscanner durchzuführen und somit mehrere Antikörpersignale zeitgleich zu detektieren.

Für einige Fragestellungen wurde die Blotting-Membran sequentiell mit unterschiedlichen Antikörpern behandelt. Um zuvor benutzte Antikörper zu entfernen, wurden diese mit der Membran zunächst in Denaturierungs-Puffer (3.7.3) in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt und dann nach Zugabe von β -Mercaptoethanol für 10min geschüttelt, um die Antikörper zu denaturieren. Anschließend wurde die Membran dreimal in PBS-T (10 min, RT) gewaschen, um die denaturierten Antikörper zu entfernen. Danach wurde die

Membran mit dem gebundenen Protein erneut mit einem Antikörper gemäß Fragestellung inkubiert.

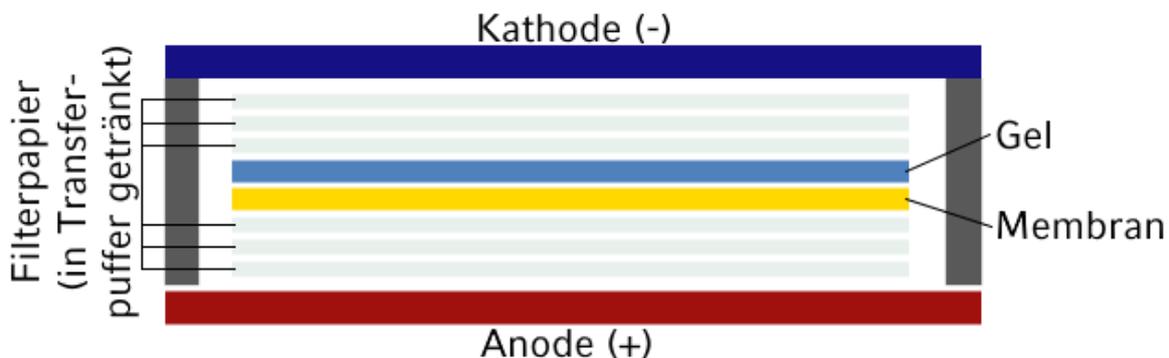


Abbildung 4-2: Westernblot

Schemazeichnung einer Westernblot-Kammer mit markierter Anode (+) und Kathode (-).

Eigene Erstellung

4.2.5 Hochdruck Säulenchromatographie (RP-HPLC)

Zur Gewinnung unterschiedlicher Histonvarianten wurden säuregefällte Histone (4.2.1) über Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) weiter aufgetrennt (Gurley et al., 1983). Hierzu wurden die hydrophilen Interaktionschromatographie-Puffer A (3.7.4) und B (3.7.5) sowie der Lagerungspuffer (3.7.6) an einen Umkehrphasenchromatographen (GE Healthcare) angeschlossen. Durch Säureextraktion gewonnene Histone (4.2.1) wurden dann in 500µl H₂O_{dest.} suspendiert, in eine luftfreie Hamilton-Spritze aufgenommen und in dieser mit dem Chromatographen verbunden. Durch Kombination der HILIC Puffer A und B erzeugte das Chromatographiesystem ein Gemisch aus Acetonitril und Trifluoressigsäure mit ansteigendem Acetonitril-Gradienten, welches als mobile Phase diente. Hierbei wurden die Histone über polare Wechselwirkungen mit stationären und mobilen Phasen an einer Jupiter-Trennsäule (Phenomex) separiert. Durch kontinuierliche Messung der UV-Absorption wurden die Konzentrationen der aufgetrennten Proteine und somit deren Fraktionen bestimmt. Dabei wurden die Histone über den kontinuierlichen Wechsel der Probengefäße über die Zeit in unterschiedliche Fraktionen separiert. Die unterschiedlichen Histonsubtypen-Fraktionen wurden dann gemäß ihrer Peakmuster und Reihenfolge identifiziert, die entsprechenden Probengefäße jeweils in eine Histonsubtyp-Fraktion zusammengeführt und beschriftet. Zur weiteren Verwendung wurden die Histonfraktionen

dann in einem Vakuumkonzentrator (Eppendorf) vom verbliebenen Acetonitril befreit, in H₂O_{dest.} aufgenommen, aliquoutiert und bei -80° C gelagert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient primär der Vermehrung, aber auch der Veränderung von DNA wie unter 4.3.3.1 beschrieben. Hierbei lagern sich kurze einzelsträngige DNA-Fragmente, sogenannte Primer, an die zu vervielfältigende DNA-Sequenz an. Unter Zugabe von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs), eines hitzestabilen DNA-Polymeraseenzym sowie eines Puffers werden DNA-Einzelstränge unter Durchlaufen verschiedener Temperaturen in einem sogenannten Thermocycler zu DNA-Doppelsträngen repliziert. Die Temperaturprofile sind abhängig von der Fragestellung und der sogenannten Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Hierbei handelt es sich um jene Temperatur, bei der die Hälfte der Primermoleküle mit der DNA-Matrize hybridisiert vorliegen. Maßgeblich für die Schmelztemperatur sind die Länge des Primers und der Anteil der enthaltenen Nukleotidbasen Cytosin und Guanin (GC-Anteil). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Primern (3.10) wurde bewusst ein ähnlicher Schmelzpunkt gewählt, um diese parallel einsetzen zu können. Die Parameter dieser PCR-Reaktionen sind in Tabelle 4-3 aufgeführt. Etwaige in speziellen Fragestellungen hiervon abweichende Spezifikationen sind bei der jeweiligen Methode separat aufgelistet.

Zusammensetzung	Volumen
DNA-Matrize	1µl
Forward-Primer	1µl
Reverse-Primer	1µl
dNTP-Mischung (10mM)	0,4µl
ThermoPol Reaktionspuffer	2µl
Taq-Polymerase	0,1µl

Methoden

H ₂ O (nucleasenfrei)	14,5µl
----------------------------------	--------

Tabelle 4-2: Ansatz für PCR

Temperatur	Dauer	Phase	
94°C	120s	Initialisierung	
94°C	30s	Denaturierung	35 Zyklen
65°C	30s	Primer-Anlagerung	
72°C	20s	Elongation	
72°C	300s	Abschluss	
4°C	∞	Lagerung	

Tabelle 4-3: PCR-Schritte mit Temperaturprofilen

4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zum optischen Nachweis erfolgreicher Amplifikation mittels PCR wurden linearisierte DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese in 1% [w/v] Agarosegelen aufgetrennt, denen 500µg Ethidiumbromid je Gel zur Fragmentdetektion beigemischt worden war. Nukleinsäuren werden durch Ethidiumbromid interkaliert und fluoreszieren dann bei Anregung mit UV-Licht (LePecq and Paoletti, 1967). Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden auf das Gel geladen und elektrophoretisch unter Anlage einer elektrischen Spannung (120V, 20min) analog zu 4.2.2 aufgetrennt, mit TBE als Laufpuffer der Elektrophorese. DNA wandert im Gel aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit abhängig von der jeweiligen DNA-Fragmentlänge ist (Peacock and Dingman, 1968). Um die Lauffront des Gels optisch zu markieren, wurde den DNA-Proben ein Ladepuffer (0,25% [w/v] Bromphenol Blau + 0,25% [w/v] Xylen Cyanol + 30% [v/v] C₃H₈O₃ in H₂O_{dest}) zugegeben. Zusätzlich wurde ein DNA-Standard

geladen, über den die Längen der aufgetrennten DNA-Fragmente anhand ihrer Position im Agarosegel bestimmt wurden.

4.3.3 Gezielte Herstellung von DNA in Bakterienzellen

Zur Untersuchung von Histonen mit der Fragestellung entsprechenden Aminosäureaustauschen wurde für diese codierende DNA in Bakterienzellen exprimiert. Diese wurde später durch transiente und stabile Transfektion in Säugetierzellen eingebracht.

4.3.3.1 PCR-Mutagenese (Site-directed-mutagenesis)

Mittels einer speziellen PCR-basierten Methode wurde eine Punktmutation in ein Gen eingebracht. Hierfür wurden kurze einzelsträngige DNA-Fragmente, sogenannte Primer generiert, um die entsprechende Mutation in der PCR hervorzubringen. Zwei Primer wurden dabei paarweise so entworfen, dass Ihre Sequenz komplementär war zu der Matrize des Plasmids, also der DNA-Region, die mutiert werden sollte. Eine Base wurde jedoch unterschiedlich gewählt gegenüber der ursprünglichen Sequenz der Matrize, wodurch eine gezielte Punktmutation in den synthetisierten Tochtersträngen geschaffen wurde (Hutchison et al., 1978). Die beschriebenen Primer wurden von Frau Dr. Antonia Jack entworfen und kommerziell hergestellt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Als DNA-Matrizen dienten für das Histon H3.1 codierende Gensequenzen, die in einen pIRESneo-Vektor eingebracht worden waren (Zink et al., NAR, 2017). Die genauen Parameter der PCR-Mutagenese sind abhängig vom verwendeten Primer und finden sich in Tabelle 4-5. Zur Entfernung der Matrizen-Plasmide, welche die Punktmutation nicht enthielten, wurde dem PCR-Ansatz das Restriktionsenzym Dpn1 hinzugefügt (90min, 37°C). Dieses Enzym verdaut lediglich methylierte DNA, wie sie von Bakterien synthetisiert wird, somit auch den verwendeten Vektor. In der PCR neu synthetisierte DNA trug keine Methylierung und wurde daher auch nicht degradiert. Die so produzierte DNA wurde mittels Transformation in Bakterien eingebracht (4.3.3.3), Plasmide aus selektionierten Klonen gewonnen und kommerziell sequenziert (4.3.3.4).

Zusammensetzung	Volumen
DNA-Matrize	1 μ l
Forward-Primer	1 μ l
Reverse-Primer	1 μ l
dNTP-Mischung (10mM)	0,4 μ l
Phusion HF Puffer, 5x	4 μ l
Phusion DNA-Polymerase	0,1 μ l
H ₂ O (nucleasenfrei)	11,6 μ l

Tabelle 4-4: Ansatz für PCR-Mutagenese

Temperatur	Dauer	Phase	
98°C	30s	Initialisierung	
98°C	30s	Denaturierung	17 Zyklen
57°C	20s	Primer-Anlagerung	
68°C	165s	Elongation	
4°C	∞	Lagerung	

Tabelle 4-5: PCR-Mutagenese-Schritte mit Temperaturprofilen

4.3.3.2 Kultivierung von Bakterienzellen

Der Bakterienstamm „Comp. XL1-Blue“, der in dieser Arbeit verwendet wurde, gehört zur Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*) und kann sowohl auf festen als auch in flüssigen Medien angezüchtet werden. Bei *E. coli* handelt es sich um gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, welche der Familie „Enterobacteriaceae“ angehören. *Escherichia coli* können freie DNA in Form von Plasmiden aus ihrer Umwelt aufnehmen. Dies wird als „horizontaler Gentransfer“ bezeichnet und kann zur Transformation wie unter 4.3.3.3 beschrieben genutzt werden, um durch Plasmide mit Selektionsmarkern gezielt Proteine rekombinant herzustellen (Hanahan et al., 1991). Zur Selektion erfolgreich transformierten Bakterien wurde LB-Medium mit Antibiotikallösung (Ampicillin 5µg/ml, Chloramphenicol 3,4 µg/ml & Kanamycin 5µg/ml) verwendet, das durch Zugabe von 1,5% [w/v] Bacto-Agar aushärtete. Diese Agarplatten wurden bei 4°C gelagert und mittels eines sterilisierten Trigalskispatels mit jeweils 100µl Bakteriensuspension gleichmäßig beimpft. Danach wurden die Agarplatten mit dem Deckel nach unten über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.3.3.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterienstämmen

Bakterien des Stammes „Comp. XL1-Blue“ sind, wie unter 4.3.3.2 beschrieben, in der Lage freie DNA aufzunehmen. Hierfür wurden 60µl der „Comp. XL1-Blue“ mit 5µl der gemäß 4.3.3.1 erzeugten DNA vermischt (30min, 4°C), zur Aktivierung einem Hitzeschock zur Aufnahme der Plasmid-DNA ausgesetzt (90sec, 42°C) und dann sofort auf Eis gelagert. Nun wurde dem Ansatz 200µl LV-Medium hinzugefügt und die Bakterien zur Vermehrung inkubiert (60min, 37°C). Schließlich wurden die „Comp. XL1-Blue“ gemäß 4.3.3.2 ausgesät und erfolgreich transformierte Bakterien durch die im Vektor enthaltene Ampicillinresistenz selektioniert.

4.3.3.4 DNA-Aufreinigung

Eine wie unter 4.3.3.3 beschrieben erzeugte Bakterienkolonie wurde von der Agarplatte aufgenommen und in 5ml LB-Medium mit Ampicillin unter Schütteln mit 200rpm inkubiert (ü.N., 37°C). Unter Verwendung des *Promega Wizard® Miniprep Systems* wurde, gemäß den Angaben des Herstellers, mittels alkalischer Lyse der Zellen mit anschließender Fällung von genomischer DNA und Proteinen die Plasmid-DNA isoliert (Birnboim and Doly, 1979). Sämtliche vorhandene RNA wurde durch Zusatz von RNaseA abgebaut und

die verbleibende Plasmid-DNA wurde zur Qualitätskontrolle sequenziert (Sigma Eurofins MWG). Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch durch ein NanoDrop-System (peQLab Biotechnologie) ermittelt und die Proben dann bei -20°C aufbewahrt.

4.3.4 Stabile Transfektion von HeLa-Zellen

Um die gemäß 4.3.2 erzeugte DNA in HeLa-Zellen zu transferieren und stabil zu exprimieren, wurden HeLa-Zellen, wie unter 4.1.1.1 beschrieben, in 6-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät und bei Erreichen von ca. 80% Konfluenz transfiziert. Dafür wurde je Ansatz eine Transfektions-Suspension (1µg Plasmid, 6µl FuGENE HD Transfection Reagent und 100µl Opti-MEM-Medium) angesetzt und inkubiert (15min, RT). Dann wurde das Zellmedium entfernt, die Transfektions-Suspension hinzugefügt und die Zellen gemäß 4.1.1.1 ü.N. inkubiert. Nach 24h wurde die Suspension entfernt, um bei den Zellen mittels Neomycin-haltigem Mediums (Neomycin-Konzentration: 600µg/ml) über zwei Wochen durch einen Selektionsdruck eine stabile Expression der Konstrukte zu erzielen.

4.3.5 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Um die gemäß 4.3.3.1 erzeugte DNA in HeLa-Zellen zu transferieren, wurden diese, wie unter 4.1.1.1 beschrieben, in 10cm Kulturplatten ausgesät und bei Erreichen von ca. 80% Konfluenz transfiziert. Dafür wurde je Ansatz eine Transfektions-Suspension (10µl Plasmid, 15µl FuGENE HD Transfection Reagent und 475µl Opti-MEM-Medium) angesetzt, durch kurzes Schütteln vermischt und dann inkubiert (15min, RT). Danach wurde die Transfektions-Suspension den Kulturschalen, tropfenweise unter leichtem Schwenken, hinzugefügt und je nach Fragestellung, meist für 48h, inkubiert, bevor die Zellen gemäß 4.1.1 geerntet wurden.

4.3.6 Transfektionen mit siRNA

Zur gezielten Reduktion von Genprodukten auf mRNA-Ebene wurde die RNA-Interferenz (RNAi) Technik genutzt. Kurze (21nt) doppelsträngige RNA-Fragmente, sogenannte small interfering RNAs (siRNAs), wurden hierzu in die Zielzellen eingeschleust. Endonukleasen wurden dadurch angeregt, die zur siRNA komplementäre zelleigene mRNA zu zerschneiden [92]. Hierdurch entstehen neue siRNA-Fragmente, wodurch sich dieser

Methoden

Vorgang selbst verstärkt. siRNAs gegen unterschiedliche Histonmethyltransferasen wurden durch Frau Dr. A. Jack konstruiert, mittels einer BLAST-Suche auf ihre Sequenzspezifität hin überprüft und kommerziell erstellt (Sigma Eurofins MWG). Unter 3.8 finden sich alle verwendeten siRNAs tabellarisch aufgelistet. Um HeLa-Zellen mit siRNA zu transfizieren, wurden diese, wie unter 4.1.1.1 beschrieben, in unterschiedlichen Kulturgefäße, je nach benötigter Zellmenge, ausgesät und bei Erreichen von ca. 80% Konfluenz transfiziert. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze gemäß Kulturgefäß sind in Tabelle 4-5 aufgeführt. Hierfür wurde Oligofectamin mit OPTIMEM in einem Eppendorfröhrchen vermischt und dann inkubiert (5min, RT). siRNA wurde in Wasser gelöst, in dem durch Zugabe von Diethyldicarbonat (DEPC) RNasen deaktiviert wurden. Alle Bestandteile wurden dann zusammengeführt und inkubiert (20min, RT). Diese Suspension wurde dann den Zellen zusammen mit Start-Medium (DMEM + Glutamax) hinzugefügt und inkubiert (4,5h, 37°C). Abschließend wurde Zusatz-Medium (DMEM + Glutamax + FCS 30%) hinzugefügt und die Zellen bis zur Ernte im Inkubator bei 37°C gelagert.

<u>Kulturgefäß</u>	<u>siRNA</u>	<u>DEPC- H₂O</u>	<u>Oligofect -amine</u>	<u>Optimem</u>	<u>Start- Medium</u>	<u>Zusatz- Medium</u>
96-Loch Platte	4pg in 1µl	16µl	0,5µl	2,5	80µl	50µl
24-Loch Platte	10pg in 2,5µl	40µl	2µl	5,5µl	200µl	125µl
6-Loch Platte	40pg in 10 µl	175µl	4µl	11µl	800µl	500µl
10cm Schale	200pg in 10 µl	840 µl	40µl	110	4ml	2,5ml

Tabelle 4-6: Transfektions-Suspensionen

Bei Transfektionen mit zwei siRNAs wurde von jeder siRNA-Lösung jeweils die halbe Menge eingesetzt.

4.3.7 mRNA-Expressionsanalyse

Zur Untersuchung der Effekte der RNA-Interferenz wurde nach entsprechender Behandlung (4.3.6) die Konzentration unterschiedlicher mRNAs durch nachfolgendes Vorgehen bestimmt.

4.3.7.1 RNA-Extraktion

Unter Verwendung des RNeasy mini kits (QIAGEN) wurde gemäß Herstellerangaben Gesamt-RNA aus Zellextrakten (4.1.1) isoliert. Verunreinigungen mit genomischer DNA wurden durch DNase-Verdau mittels RNase-free DNase abgebaut.

4.3.7.2 cDNA-Synthese

Gewonnene RNA wurde mithilfe eines ProtoScript M-MuLV 1st Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs) entsprechend den Herstellangaben in cDNA umgeschrieben. Die erfolgreiche Synthese wurde durch Amplifikation einer GAPDH-Kontrolle mittels PCR (4.3.1) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (4.3.2) überprüft. Im Anschluss wurde die cDNA bei -80°C eingelagert.

4.3.7.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Mittels der relativen Quantifizierung kann die Expression eines Gens im Verhältnis zu Referenzgenen analysiert werden, wenn hierfür, wie unter 4.3.7.1 und 4.3.7.2 beschrieben, gewonnene cDNA analysiert wird. Das hierfür verwendete LightCycler Instrument (Roche Diagnostics) ist ein an einen PC angeschlossener Thermocycler mit einer Fluorimeteroptik und ermöglicht eine quantitative Echtzeitmessung der zyklisch entstehenden DNA-Produkte im geschlossenen System. Die anfallenden PCR-Produkte wurden durch einen fluoreszierenden Farbstoff, SYBR Green (Roche Diagnostics), markiert und so über die Fluorimeteroptik in Echtzeit gemessen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR ist in Tabelle 4-7 und die Einstellungen des Thermocyclers in Tabelle 4-3 angegeben. Alle Reaktionen wurden in drei technischen Replikaten jedes Primerpaars gemessen. Im Anschluss jeder qPCR wurde eine Schmelzkurvenanalytik durchgeführt, um unspezifische Reaktionen zu identifizieren. Die gewonnenen Daten wurden mittels der LightCycler 480 Software unter Normalisierung gegen die Aktivität der parallel bestimmten Haushaltsgene HMBS und HPRT1 analysiert.

Zusammensetzung	Volumen
cDNA-Matrize	0,6µl

Methoden

Forward-Primer	0,75µl
Reverse-Primer	0,75µl
FastStart DNA Master SYBR Green I	7,5µl
DEPC-H ₂ O	5,4µl

Tabelle 4-7: Ansatz für qPCR

Temperatur	Dauer	Phase	
95°C	120s	Initialisierung	
95°C	10s	Denaturierung	45 Zyklen
65°C	10s	Primer-Anlagerung	
72°C	10s	Elongation	
95°C	5s	Denaturierung	
65°C	60s	Primer-Anlagerung	
Δ +2,5° C	60s	Schmelzkurvenanalyse	12 Zyklen

Tabelle 4-8: qPCR-Schritte mit Temperaturprofilen

5. Ergebnisse

5.1 G9a vermittelt die Monomethylierung von H3K9 und H3K56 in embryonalen Stammzellen der Maus

Zum Zeitpunkt der Forschung, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit erfolgte, war bereits bekannt, dass die Histonmethyltransferase G9a (EHMT2/ KMT1C) die Mono- und Dimethylierung von H3K9 katalysiert (Collins et al., 2008), jedoch nicht, ob diese ebenfalls für die Methylierung von H3K56 verantwortlich ist. Aufgrund der Ähnlichkeit im Motiv der Primärsequenz (KST), lag diese Annahme nahe, weshalb hierzu Untersuchungen angestellt wurden. Als Grundlage der Experimente dienten Stämme embryonaler Stammzellen (mES) der Maus, die einen homozygoten Knockout des Gens für G9a ($G9a^{-/-}$) aufweisen sowie entsprechende Wildtyp-Zellen. Falls das Enzym G9a eine KMT für H3K56me1 darstellt, sollte in diesen Zellen aufgrund des Knockouts die Histonmethylierung von H3 an Position 56 im Vergleich mit den Wildtyp-Zellen verringert sein. Diese These wurde im Folgenden untersucht.

5.1.1 Verringerte Methylierung von H3K9 und H3K56 in $G9a^{-/-}$ mES Zellen

Um einerseits die bereits beschriebene Funktion von G9a als KMT von H3K9 als Positivkontrolle zu demonstrieren und andererseits die Funktion des Enzyms in Bezug auf H3K56 zu untersuchen, wurden Histone aus WT und $G9a^{-/-}$ mES Zellen durch Säureextraktion gewonnen. In vier Ansätzen wurde jeweils eine Probe der WT- und $G9a^{-/-}$ -Histone auf einem 15 % SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Diese wurden jeweils mit einem der folgenden Antikörper inkubiert: α -H3K9me1, α -H3K9me2, α -H3K56me1 und α -H3K56me2 und anschließend entwickelt. In den entsprechenden Blots zeigte sich ein schwächeres Signal in allen Banden der Histone der $G9a^{-/-}$ mES Zellen im Vergleich mit den Signalbanden der Histone der WT mES Zellen (Abbildung 5-1A). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auf unterschiedliche Lademengen an Histonen zurückzuführen ist, wurden die Antikörper von den Membranen entfernt und diese erneut mit einer Antikörperlösung inkubiert, die gegen α -H3 gerichtet ist. Hierbei zeigte sich in den zuvor gegen α -H3K9me2 und α -H3K56me2 inkubierten Membranen ein verstärktes Hintergrundsignal, wobei die Banden weiter klar erkennbar sind. In der Detektion zeigte sich ein etwas geringeres Signal bei den Banden

Ergebnisse

der $G9a^{-/-}$ mES-Histonen, was auf nicht ganz ausgeglichene Lademengen schließen lässt, jedoch nicht ausgeprägt genug erscheint, um ausschließlich für die Signal-Unterschiede in der vorherigen Entwicklung verantwortlich zu sein, insbesondere bei der H3K56-Methylierung. (Abbildung 5-1B).

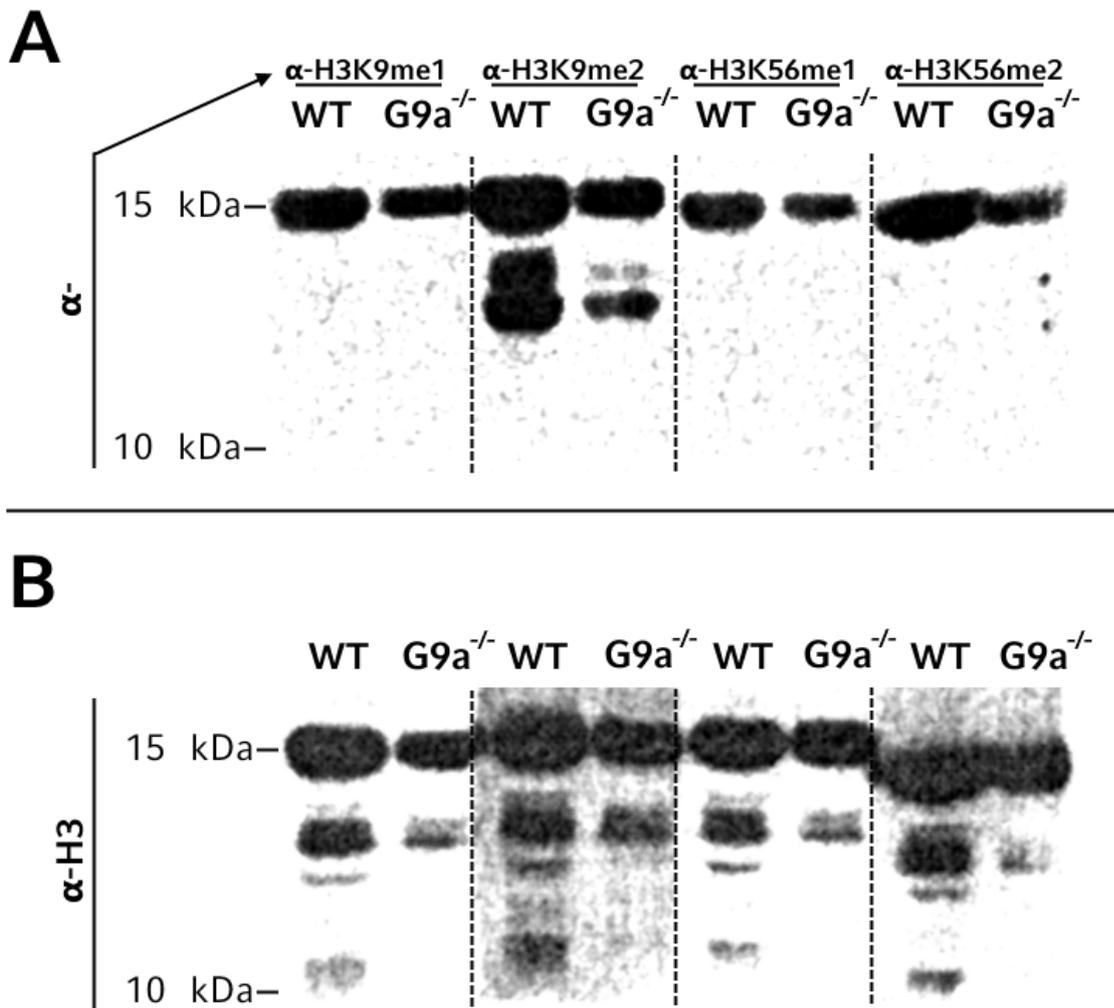


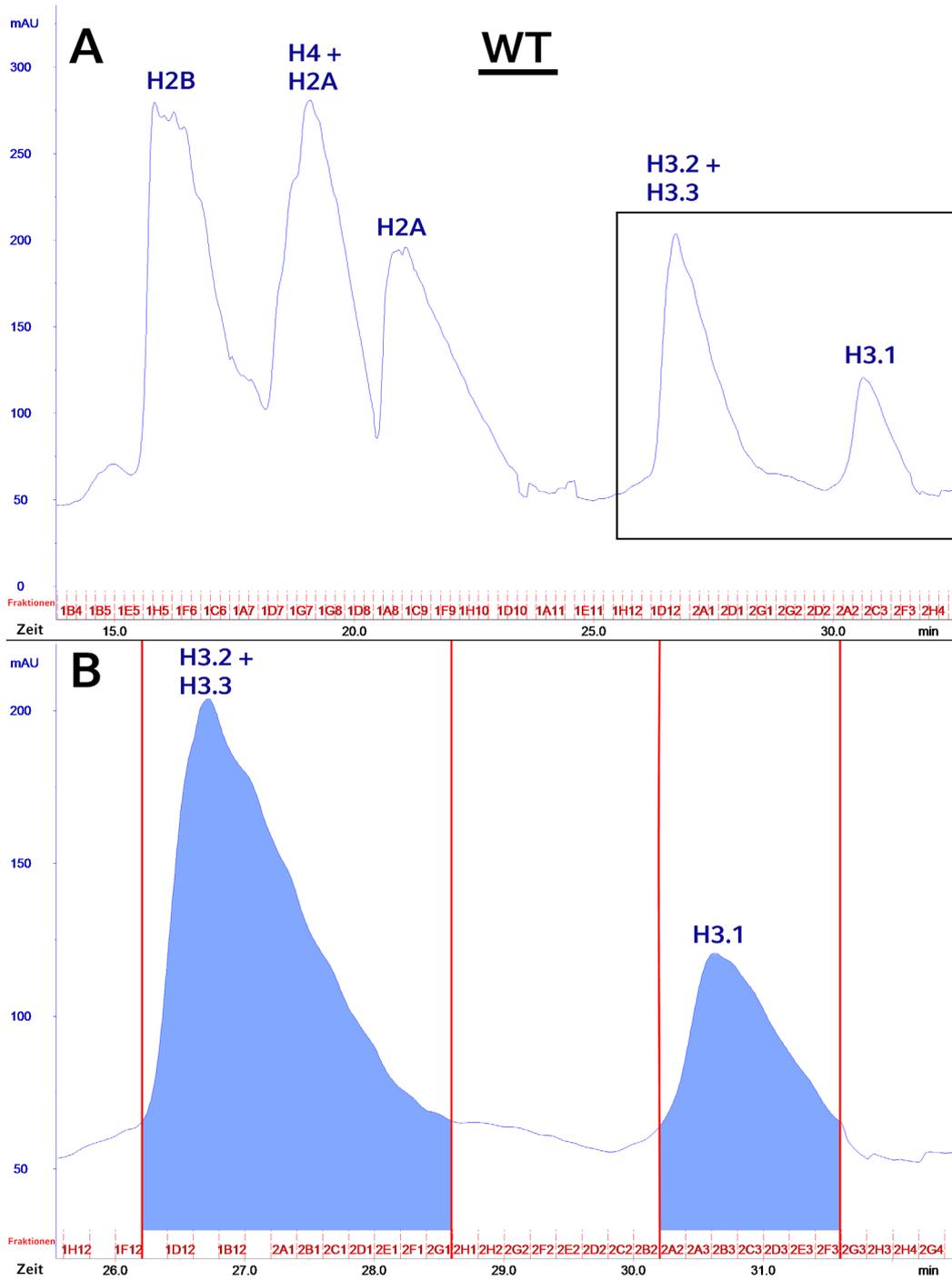
Abbildung 5-1: Verringerter Antikörpernachweis von Histonmethylierung in $G9a^{-/-}$ mES Zellen

Westernblot Analyse, nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 15% SDS-Gel, von Histonen aus embryonalen Stammzellen der Maus mit Wildtyp (WT) sowie homozygotem Knockout des Gens für $G9a$ ($G9a^{-/-}$) im Vergleich. Die Blottingmembran wurde an den gestrichelten Linien geschnitten. Das Molekulargewicht wurde über das Auftragen eines bekannten Protein-Größenstandards ermittelt (nicht abgebildet). (A): Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen α -H3K9me1, α -H3K9me2, α -H3K56me1 und α -H3K56me2 wie in der Überschrift angegeben. (B): Kontrolle der Lademengen mit einem Antikörper gegen α -H3 nach Entfernung der zuvor verwendeten Antikörper von der Membran.

5.1.2 Nachweis der Isolierung von H3 aus Wildtyp- und G9a^{-/-} mES Zellen mittels Säulenchromatographie

Da bei den verwendeten Antikörpern Hinweise auf Kreuzreaktivität bestanden, sollten die zu untersuchenden Histone weiter aufgereinigt werden. Zudem sollte bestimmt werden, ob sich das Methylierungsmuster verschiedener Histonvarianten voneinander unterschied. Hierfür wurde eine Isolation dieser durch „Reversed phase-high performance liquid chromatography“ (RP-HPLC) durchgeführt (Gurley et al., 1983). Zunächst wurden durch Säureextraktion aus mES Zellen erneut WT-Histone sowie G9a^{-/-}-Histone gewonnen (siehe 5.2.1). Diese wurden dann in einer RP-HPLC weiter aufgetrennt. Das Histon H3 lässt sich in zwei aus der Literatur bekannte typische Fraktionen separieren, die sich im UV₂₁₄-Absorptions-Chromatogramm in Form zweier Gipfel darstellen und von denen der erste und größere H3.2- und H3.3 enthält und der folgende kleinere Gipfel H3.1 enthält (Hake et al., 2006). Diese Gipfel ließen sich wie erwartet auch im Chromatogramm der durchgeführten Säulenchromatographie eindeutig nachvollziehen (Abbildung 5-2). Die hierbei maschinell gewonnenen Fraktionen wurden anhand ihrer Zugehörigkeit zu einer bestimmtem Histonvariante entsprechend dem Chromatogramm zusammengeführt, sodass sich insgesamt vier Proben ergaben. Diese enthielten: WT H3.1, WT H3.2+H3.3, G9a^{-/-} H3.1 und G9a^{-/-} H3.2+H3.3. Zur Verifikation der Auftrennung der Histonvarianten wurden die Histonproben in jeweils einfacher und doppelter Lademenge auf einem 15%-igen SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte eine Coomassie-Färbung zur Proteindetektion. Hierbei ließ sich wie erwartet, jeweils lediglich eine einzige Bande mit einer H3 entsprechenden Masse von etwa 16 kDa nachweisen, weshalb eine erfolgreiche Extraktion der gewünschten Histone angenommen wurde. Die so gewonnenen Proben wurden aliquotiert, gefriergetrocknet und bei -80° C für weitere Untersuchungen gelagert.

Ergebnisse



Ergebnisse

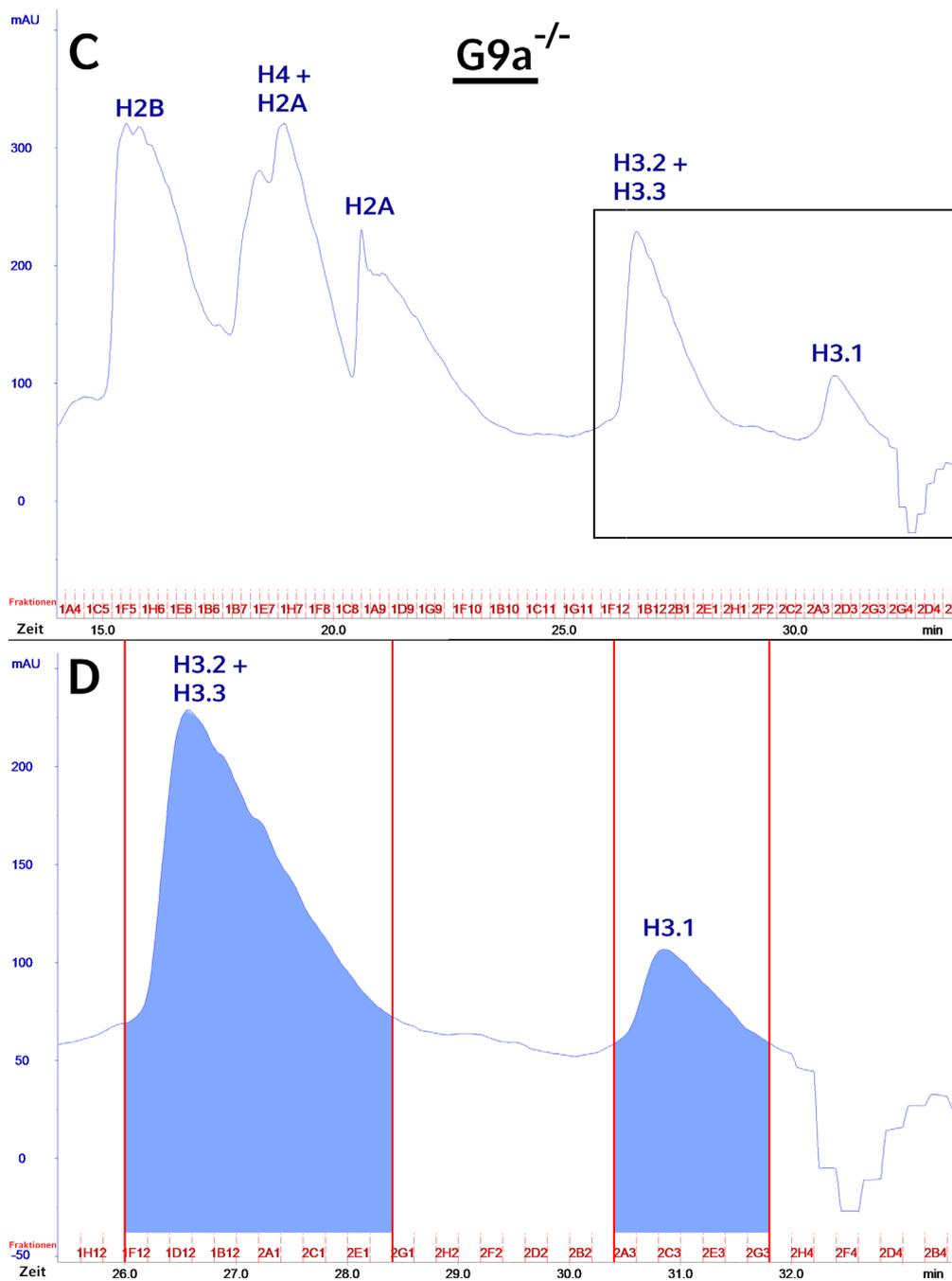


Abbildung 5-2: Isolierung von Histonvarianten aus $G9a^{-/-}$ -mES und WT-mES durch RP-HPLC
 Chromatogrammausschnitt nach Isolierung unterschiedlicher Histonvarianten aus mES Zellen. Abszisse: Auftrennung der Proteine gemäß Retention über die Zeit (schwarz) und korrespondierend die spezifischen Probengefäße, in welche die Proteinfractionen separiert wurden (rot). Ordinate: Proteinkonzentration bestimmt durch UV-Absorption (blau); Histonvarianten-Fractionen gemäß ihrer Peakmuster und Reihenfolge beschriftet (blau). **(A)**: Histone aus WT-mES Zellen mit typischem Verteilungsmuster; **(C)**: Histone aus $G9a^{-/-}$ -mES Zellen mit typischem Verteilungsmuster. **(B) & (D)**: Vergrößerte Ausschnitte aus (A) & (C) in dem rote Linien Grenzen der jeweils zu einem Peak gehörenden Probengefäße, die für weitere Analysen zusammengeführt wurden (hellblau).

5.1.3 Verlust der Monomethylierung von K9 & K56 in Histonvarianten H3.2 & H3.3 bei G9a^{-/-} mES Zellen

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob sich der Methylierungsgrad der unterschiedlichen H3-Varianten unterscheidet, wurden die über RP-HPLC gewonnenen Proben mittels Western Blot durch Nah-Infrarot-Fluoreszenzdetektion weiter untersucht. Hierzu wurden Teile der Histonproben in H₂O_{dd} resuspendiert und über zwei 15 % SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Von diesen erfolgte die Übertragung auf zwei Nitrozellulose-Membranen und die anschließende Inkubation mit zwei unterschiedlichen Antikörperlösungen. Eine Antikörperlösung enthielt α -H3K9me und die andere Antikörperlösung α -H3K56me₁, jeweils aus Kaninchenserum gewonnen. Beide Antikörperlösungen enthielten zusätzlich auch α -H3 aus Rattenserum. Die sekundäre Inkubation erfolgte mit zwei Antikörpern unterschiedlicher Fluoreszenzspektren, die sich jeweils gegen den FC-Teil der Kaninchen- und Rattenantikörper richten. So war es möglich, gleichzeitig über das Signal von α -H3 eine Lademengenkontrolle zu gewinnen und auch über die Signalintensität des zweiten Lichtspektrums Informationen zu den Histonmethylierungen H3K9me₁ und H3K56me₁ zu erhalten. Es zeigte sich, dass für H3.1 bereits in WT-mES Zellen für K9 nur eine minimale und für K56 keine Methylierung nachweisbar war. Im Kontrast hierzu ließ sich bei den Varianten H3.2 und H3.3 sowohl an Position K9 als auch K56 in WT-mES Zellen eine Monomethylierung detektieren, die in den Histonen der G9a^{-/-}-mES Zellen fehlte (Abbildung 5-3). Das stützte die Hypothese, dass es sich bei dem Enzym G9a um eine Histonmethyltransferase handelt, die zusätzlich zur bekannten Methylierung von H3K9 auch die H3K56-Monomethylierung katalysiert und hierbei in mES Zellen die Histonvarianten H3.2 & H3.3 zu bevorzugen scheint.

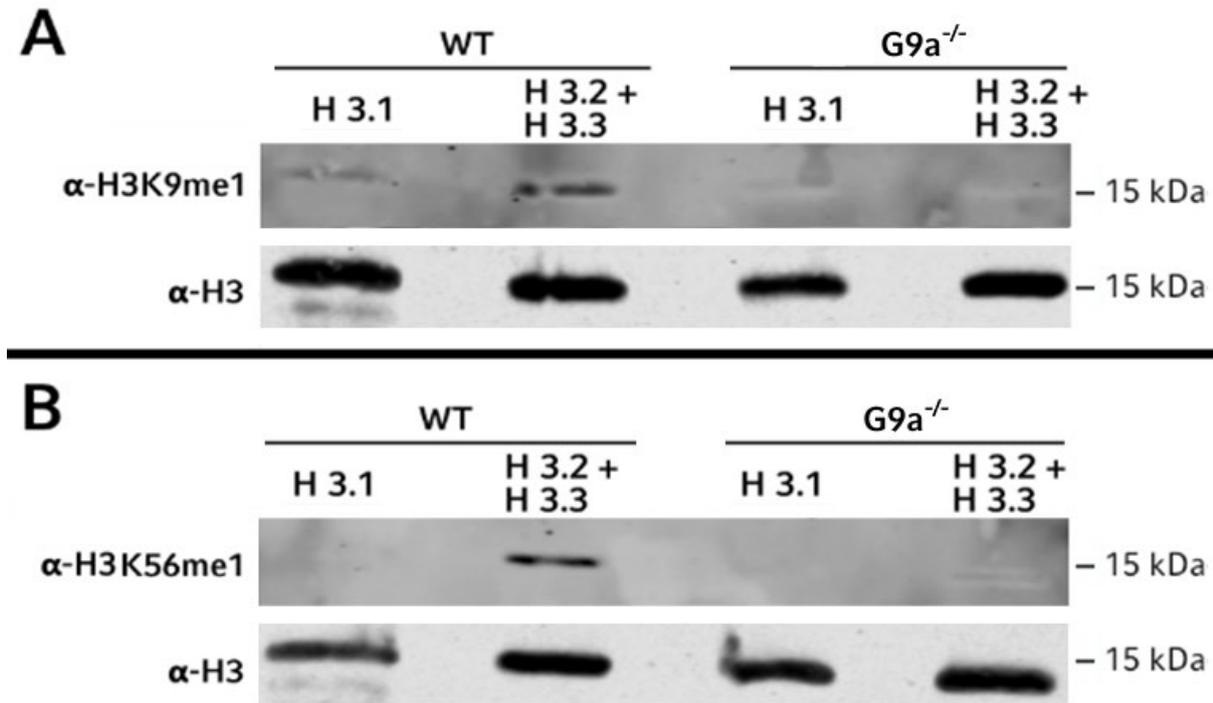


Abbildung 5-3: Verlust der Monomethylierung von K9 & K56 in Histonvarianten H3.2 & H3.3 bei G9a^{-/-} mES Zellen

Westernblot Analyse mittels Nah-Infrarot-Fluoreszenzdetektion, nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 15% SDS-Gel von Histonvarianten aus mES Zellen. (WT): Histonvarianten aus Wildtyp mES Zellen; (G9a^{-/-}): Histonvarianten aus mES Zellen mit Knockout des Gens für G9a; Das Molekulargewicht wurde über das Auftragen eines bekannten Protein-Größenstandards ermittelt (nicht abgebildet). (A): Verlust des Signals für H3K9me1 in allen Histonvarianten aus G9a^{-/-}-mES Zellen insbesondere für H3.2 & H3.3. (B): H3K56me1 in WT-mES Zellen lediglich in den Histonvarianten H3.2 & H3.3 nachweisbar. Es zeigt sich ein Verlust des Signals für α-H3K56me1 in H3.2 & H3.3 für G9a^{-/-}-mES.

5.2 Antikörper gegen Methylierungen von H3K9 & H3K56 zeigen unterschiedliche Spezifitäten

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, an der Methylierung von Lysinresten des Histons H3 beteiligte Enzyme zu identifizieren. Zur Untersuchung der Methylierung von H3K56 und H3K9 im Vergleich wird für diverse Methoden auf entsprechende Antikörper zum Nachweis zurückgegriffen, weshalb diese näher auf ihre Eignung untersucht wurden.

5.2.1 Nachweis hochgradiger Spezifität des Antikörpers gegen H3K56me3

Ein von unserer Arbeitsgruppe kommerziell in Auftrag gegebener polyklonaler Antikörper gegen H3K56me3 wurde in mehreren Experimenten von Frau Dr. A. Jack auf seine

Ergebnisse

Spezifität hin untersucht. Der Antikörper wurde hierzu in getrennten Ansätzen mit synthetisch hergestellten Histon H3 Peptiden unterschiedlicher Methylierungsgrade inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde dann die Antikörperlösung jeweils in einem Immunfluoreszenz- (IF) und Westernblot-Ansatz (WB), die jeweils Histone mit dem zu bindenden Epitop H3K56me3 enthielten, inkubiert. Falls bereits in der ersten Inkubation eine Bindung an die synthetischen Peptide erfolgte, sollten alle Bindungsstellen der Antikörper besetzt sein und in der folgenden IF bzw. WB kein Signal nachweisbar sein. Falls jedoch keine Bindung an das synthetische Peptid erfolgt ist, sollte in der IF bzw. WB eine Erkennung des Epitops erfolgen und somit ein Signal detektierbar sein. Als Negativkontrolle im Westernblot-Ansatz wurden zudem Rekombinante Histon H3 Proteine verwendet, die keine (Tri-)Methylierung aufweisen. Hier zeigte sich lediglich eine Signalauslöschung durch eine vorherige Inkubation mit H3K56me3-Peptid, was für eine hochgradige Spezifität des Antikörpers spricht. (Abbildung 5-4A) Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in der Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen, wo sich ebenfalls nach vorheriger Inkubation mit H3K56me3-Peptid ein Signalrückgang in der zweiten Inkubation zeigte. (Abbildung 5-4B) In einem Spot Blot wurden sowohl Sensitivität als auch Spezifität des Antikörpers weiter untersucht, indem unterschiedliche Mengen verschiedener Histon H3-Peptide auf eine Blotting-Membran aufgebracht wurden. Nach der Inkubation mit α -H3K56me3 ließ sich für das H3K56me3 Peptid ab einer Proteinmenge von 50 ng ein klares Signal detektieren sowie ein deutlich schwächeres Signal für H3K56me2 ab einer Proteinmenge von 200 ng. (Abbildung 5-4C) Somit zeigte sich in den Experimenten eine hohe Sensitivität und Spezifität des untersuchten Antikörpers.

Ergebnisse

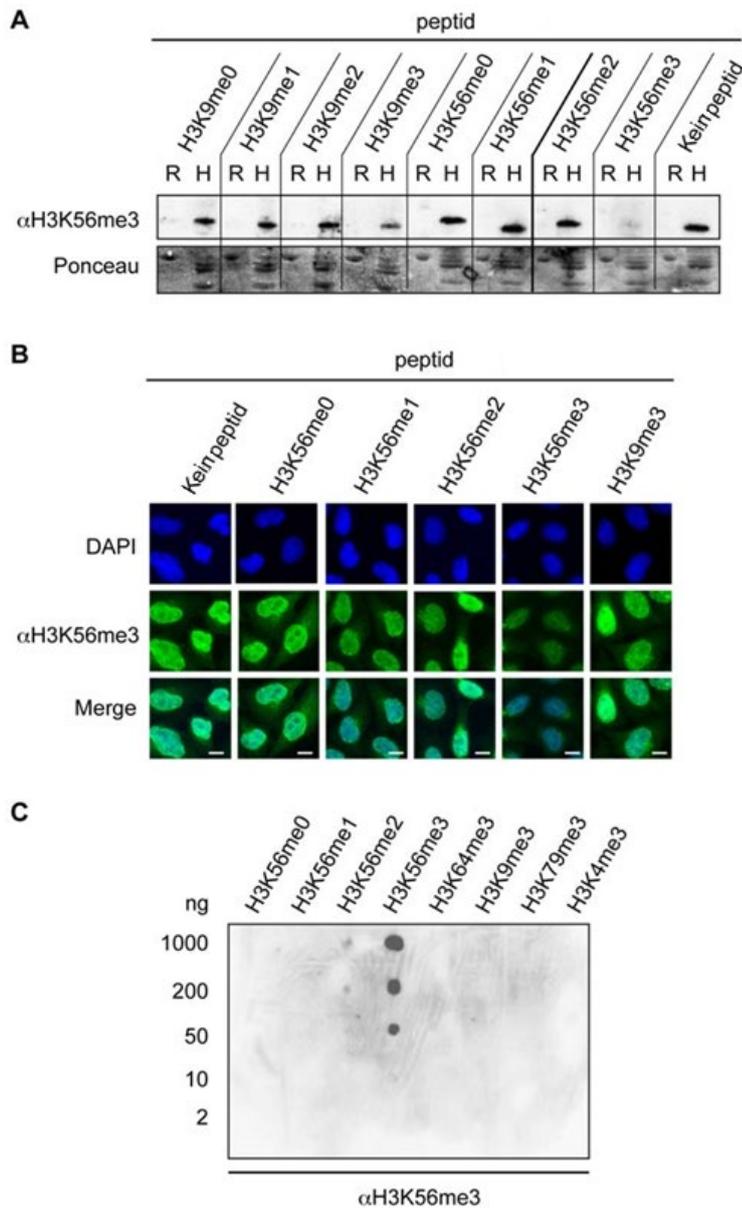


Abbildung 5-4: Nachweis der Spezifität des Antikörpers gegen α -H3K56me3

(A) WB-Analyse nach „Peptide Competition Assay“. Im Anschluss an die Inkubation des Antikörpers gegen α -H3K56me3 mit unterschiedlichen Peptiden. Wie in der oberen Spalte jeweils angegeben, wurde Antikörperlösung gegen α -H3K56me3 mit säureextrahierten Histonen von WT HeLa-Zellen auf einem WB inkubiert (H). Als Negativkontrolle dienten rekombinant hergestellte Histone, die keine Modifikationen aufweisen (R). Zum Nachweis gleichmäßiger Lademengen diente eine Färbung mit Ponceaulösung (unten).

(B) IF-Analyse von HeLa-Zellen, angefärbt durch Antikörper gegen α -H3K56me3 nachdem dieser in einem „Peptide Competition Assay“ mit unterschiedlichen Peptiden wie oben angegeben inkubiert worden war. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI (blau) und von H3K56me3 mit dem Antikörper α -H3K56me3 als Markerprotein (grün).

(C) Spot-Blot unterschiedlicher H3 Peptide, wie oben angegeben, in steigender Konzentration, wie links angegeben. Inkubiert mit Antikörper gegen α -H3K56me3. (Quelle: Dr. A. Jack; (Jack et al., 2013a))

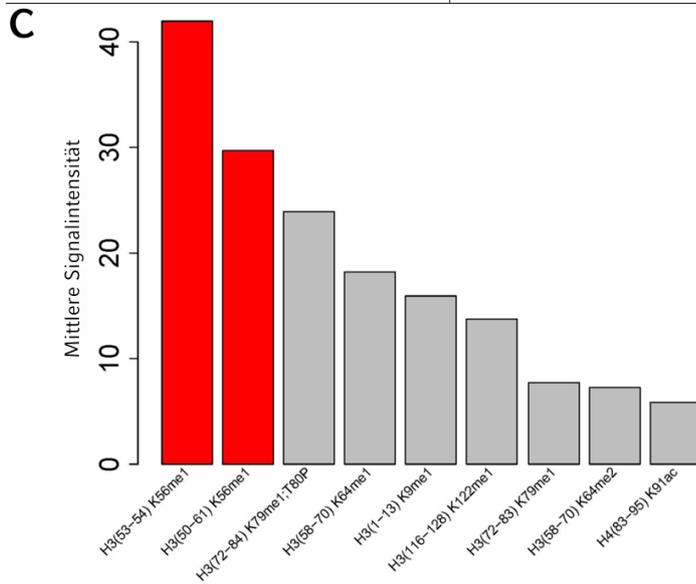
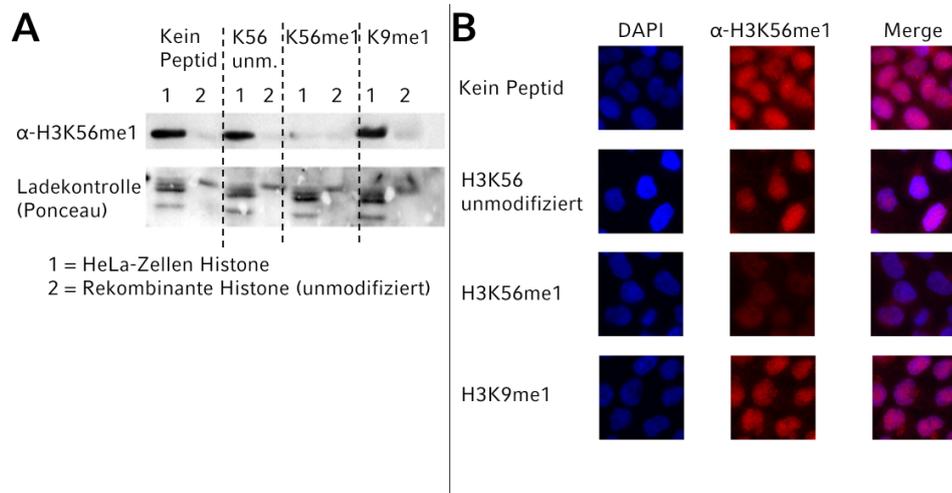
5.2.2 Befriedigender Spezifitätsnachweis des Antikörpers gegen H3K56me1

Um auch die Eigenschaften des kommerziell erhältlichen Antikörpers gegen H3K56me1 zu untersuchen, wurde dieser gegen das Epitop H3K56me1 in einem „Peptide Competition“ sowie „Peptide-Array“ Experiment durch Frau Dr. A. Jack auf seine Antigenspezifität getestet. Hierzu wurden analog zu 5.2.1 Ansätze von Antikörperlösung mit unterschiedlichen synthetisch hergestellten Peptiden inkubiert, gefolgt von einer zweiten Inkubation in jeweils einem Immunfluoreszenz- sowie Westernblot- Ansatz, die beide das zu bindende Epitop H3K56me1 enthielten. Im Westernblot zeigte sich nach Inkubation mit synthetischem H3(53-54)K56me1 eine beinahe vollständige Signalauslöschung in säureextrahierten HeLa-Zell Histonen. Die Ansätze welche mit H3(53-54)K56-unmodifiziert und H3(1-13)K9me1 vorinkubiert worden waren, zeigten keinen Rückgang der Signalintensität im WB, was insgesamt auf eine gute Spezifität schließen lässt. Als Negativkontrolle diente eine Inkubation ohne Peptid vor WB (Abbildung 5-5A). In der Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen zeigte sich konkordant zum WB eine Signalabschwächung im entsprechenden Kanal bei den Zellen, deren Antikörperansatz zunächst mit synthetischem H3K56me1 inkubiert worden war. In den Färbungen der Ansätze, die mit anderen Peptiden vorinkubiert worden waren, zeigte sich kein Unterschied im Antikörperfluoreszenz-Signal gegenüber der Kontrollgruppe, die ohne Peptid inkubiert worden war (Abbildung 5-5B). Eine stärker bläulichere Färbung des „Merge“-Kanals im Ansatz von H3K56(unmodifiziert) ist bei näherer Betrachtung durch ein vergleichsweise stärkeres DAPI Signal und nicht eine verminderte Färbung mit α -H3K56me1 hervorgerufen. Es bestätigte sich somit auch in der Immunfluoreszenz die Spezifität des getesteten Antikörpers.

Zur weiteren Untersuchung der Antikörperspezifität erfolgte durch Frau Dr. A. Jack zudem ein „Peptide-Microarray“-Experiment, in dem unterschiedliche Peptide aus dem Histon H3 mit Monomethylierung an definierten Positionen auf eine „Chip-Platte“ aufgetragen wurden. Diese wurde anschließend mit einer Lösung des getesteten Antikörpers inkubiert, gewaschen und mit einem sekundären Fluoreszenz gekoppelten Antikörper, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, erneut inkubiert. Durch Auslesen des Fluoreszenzsignals konnte so bestimmt werden, an welchen Positionen und somit Peptiden der primäre, zu untersuchende Antikörper gebunden hatte. Es zeigte sich die höchste Signalintensität bei den gewünschten Epitopen H3(53-54)K56me1 und H3(50-61)K56me1, jedoch auch Kreuzaktivität mit anderen Epitopen, insbesondere H3(72-84)K79me1;T80P,

Ergebnisse

H3(58-70)K64me1, H3(1-13)K9me1 und H3(116-128)K122me, die jedoch schwächer ausfiel (Abbildung 5-5C).



Ergebnisse

Abbildung 5-5: Untersuchung der Spezifität des Antikörpers gegen α -H3K56me1 anhand von „Peptide-Competition“- und „Peptide-Chip“-Experimenten

(A) WB-Analyse nach „Peptide Competition Assay“ von Histonen aus WT HeLa-Zellen (1) und rekombinanten Histonen (2). Nach Inkubation des Antikörpers gegen α -H3K56me1 mit unterschiedlichen Peptiden, wie in der oberen Spalte jeweils angegeben, wurde die Antikörperlösung mit säureextrahierten Histonen von WT HeLa-Zellen auf einem WB inkubiert. Als Negativkontrolle dienten rekombinant hergestellte Histone, die keine Modifikationen aufweisen. Zum Nachweis gleichmäßiger Lademengen diente eine Färbung mit Ponceaulösung. (B) IF-Analyse von HeLa-Zellen angefärbt durch Antikörper gegen α -H3K56me1 nachdem dieser in einem „Peptide Competition Assay“ mit unterschiedlichen Peptiden, wie in der linken Spalte angegeben, inkubiert worden war. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI (blau) und von H3K56me1 mit dem Antikörper α -H3K56me1 als Markerprotein (rot). (C) Peptide-Mikroarray-Analyse neun verschiedener monomethylierter Peptide entsprechend bekannter Histonmonomethylierungen von H3 mit Detektion durch den untersuchten Antikörper gegen α -H3K56me1. Zielstruktur (Epitope von H3K56me1) in Rot dargestellt. Abszissenachse: Getestete Peptide, Ordinatenachse: Gemessene Signalintensität. (Quelle: Dr. A. Jack).

Somit ließ sich eine insgesamt befriedigende, wenn auch nicht optimale Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen α -H3K56me1 zeigen, weshalb im Rahmen dieser Arbeit weitere Untersuchungen zur näheren Analyse der Antikörperspezifität durchgeführt wurden.

5.2.3 HeLa-Zellen exprimieren exogene GFP-H3 Proteine nach Transfektion

Bei idealer Spezifität der verwendeten Antikörper gegen Methylierungen von H3K9 und H3K56 sollte es zu keiner Antigenerkennung kommen, wenn am Histon H3 an den jeweiligen Positionen keine Methylmarke vorhanden ist. Um die Antikörperspezifität zu überprüfen, wurden daher Histone benötigt, die frei von dieser Methylierung sind. Da die posttranslationale Methylierung von Histonen lediglich an den Aminosäureresten von Lysin und Arginin bekannt ist, wurden durch Transfektion HeLa-Zellen generiert, die exogen Histon H3 exprimierten, das entweder an Position 9, 56 oder beiden Positionen Alanin anstelle von Lysin enthielt (Abbildung 5-6). Dies erfolgte über die Einbringung von entsprechenden Punktmutationen aufweisenden Genen in Plasmide, die durch PCR-Mutagenese hergestellt wurden. Als Kontrolle dienten Plasmide für kanonisches Histon H3.1. Die Plasmide wurden zunächst in E. coli Bakterien transformiert und von diesen vervielfältigt, um dann in HeLa-Zellen transfiziert zu werden.

Ergebnisse

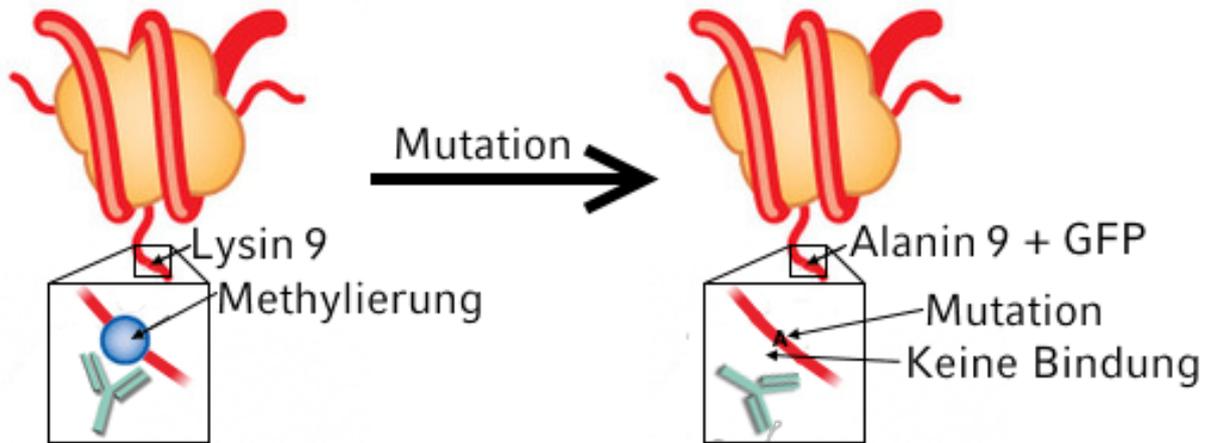


Abbildung 5-6: Mutation von H3K9 zu H3A9

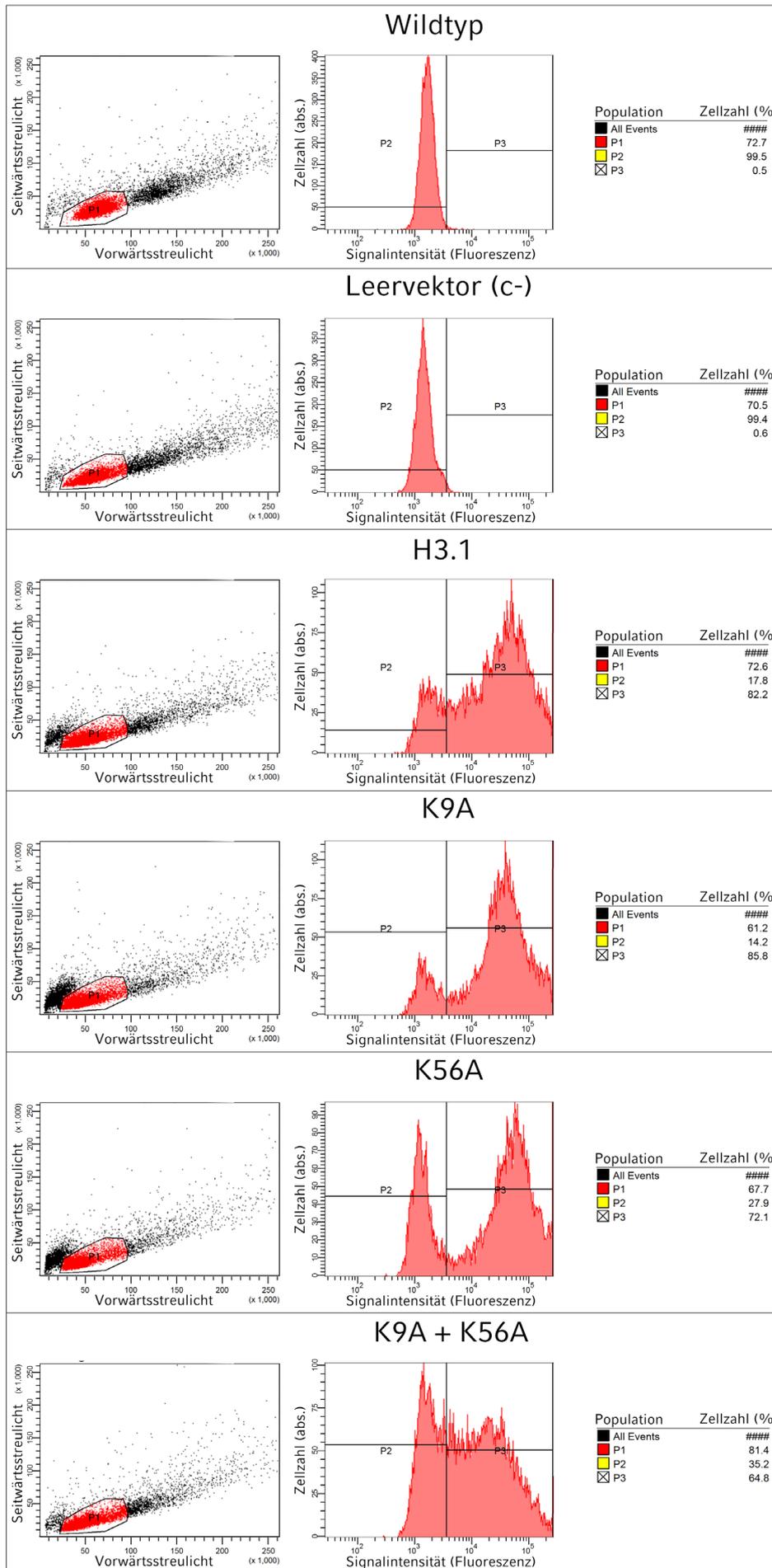
Um die Spezifität der untersuchten Antikörper gegen H3K9me1&2 und H3K56me1&2 zu untersuchen, wurden Gene für Histon H3 dahingehend mutiert, dass an den Positionen 9 und 56 Lysin gegen Alanin ausgetauscht sowie zur Erfolgskontrolle eine GFP-Sequenz eingebracht wurde (exemplarisch dargestellt durch die Mutation an Position 9). Die mutierten Zellen sollten bei idealer Spezifität durch die entsprechenden Antikörper keine Bindung erfahren, da eine Methylierung an Alanin nicht möglich ist.

Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung durch: Tarakhovsky A (2010). Tools and landscapes of epigenetics. Nat Immunol. 2010 Jul;11(7):565-8., copyright (2010)

Als Markierung diente eine im Vektor enthaltene Sequenz, die für GFP codiert, ein sogenanntes GFP-Tag, welches N-terminal mit der Histonsequenz fusioniert wurde. Dies erlaubte die Erkennung von erfolgreich transfizierten HeLa-Zellen über deren durch GFP vermittelte Fluoreszenz.

Die Bestimmung des Anteils erfolgreich transfizierter Zellen erfolgte durchflusszytometrisch, nach Trypsinisierung und Suspension in Pufferlösung im Rahmen der Passagierung. Die Erzeugung von stabil transfizierten Zelllinien war nicht erfolgreich. Zwei Wochen nach Transfektion waren innerhalb der Kolonien keine Zellen mehr vorhanden, bei denen sich ein GFP-Signal durchflusszytometrisch nachweisen ließ. Daher wurde zur weiteren Untersuchung auf transiente Transfektion zurückgegriffen. In der Auswertung der FACS-Daten wurde anhand von Wildtyp-Zellen ein Gate um die Population der Zellen mit normaler Lichtstreuung definiert. Die Populationen dieser definierten Größe und Granularität wurden dann in den unterschiedlich transfizierten Zellgruppen auf ihre Fluoreszenz hin untersucht. An den Daten der Wildtypzellen wurde ein weiteres Gate gesetzt, um zwischen dem von den Zellen selbst emittierten Signal und dem GFP-Signal der erfolgreich transfizierten Zellen zu differenzieren.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 5-7: Erfolgreiche Expression von GFP und GFP-Histon H3 Mutanten in transient transfizierten HeLa-Zellen

Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen 48 Stunden nach transienter Transfektion mit unterschiedlichen Vektoren, wie jeweils in der Überschrift angegeben. P1= Referenzpopulation anhand von Wildtyp-Zellen ermittelt; P2= Subpopulation ohne GFP-Fluoreszenzsignal; P3= Subpopulation mit GFP-Fluoreszenzsignal. Für jede unterschiedlich transfizierte Zellgruppe ist jeweils in der linken Grafik das Vorwärtsstreulicht in der Abszissenachse und Seitwärtsstreulicht in der Ordinatenachse aufgetragen und für jede registrierte Zelle ein Punkt eingezeichnet. Die mittlere Grafik zeigt Population P1, deren Signalintensität der Eigenfluoreszenz in der Abszissenachse aufgetragen ist, gegen die absolute Zellzahl in der Ordinatenachse. Die rechte Tabelle zeigt die Zellzahlen der jeweiligen Populationen als prozentualen Anteil aller Zellen (P1) sowie von P1 (P2 & P3).

Im Vergleich verschiedener Erntezeitpunkte wurde eine Transfektionsdauer von 48 Stunden als optimal identifiziert, mit Transfektionsraten von durchschnittlich 76,2 %, bei einer Varianz von 64,8 % – 85,8 %. Als Negativkontrolle dienten Zellen, in denen die Transfektion mit Leervektor durchgeführt wurde und, wie zu erwarten, kein GFP-Signal detektierbar war. (siehe Abbildung 5-7).

Um eine zweite unabhängige Kontrolle der erfolgreichen Transfektion durch eine weitere Methode, dem Westernblot, anzufertigen, wurden zunächst unterschiedliche Extrakte aus einer der Zelllinien, die, wie beschrieben, GFP-gekoppeltes-H3.1 exprimieren, gewonnen. Zudem sollte untersucht werden, in welchen Zellextraktionen die GFP-gekoppelten Histone nachweisbar waren. Hierzu wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion geerntet und aus einem Drittel der Zellen durch Säureextraktion Histone gewonnen. Aus einem weiteren Drittel der Zellen wurde, mittels eines *Qproteome Nuclear Protein Kits* (QUIAGEN), die nukleären Proteine extrahiert und aus dem verbleibenden Drittel der Zellen Ganzzellextrakt gewonnen, um zu überprüfen, inwieweit die modifizierten Histone in den jeweiligen Proteinextraktionen nachweisbar waren. Als Positivkontrolle dienten Zellkernextrakte von HeLa-Zellen, die exogen Histone der Variante H2A.Z exprimierten, an die bereits nachgewiesen erfolgreich GFP gekoppelt worden war. (Bönisch and Hake, 2012). Als Negativkontrolle wurden Histone aus WT HeLa-Zellen mittels Säureextraktion gewonnen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben über ein 15% SDS-Page wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem Antikörper gegen α -GFP inkubiert. In der anschließenden Entwicklung zeigte sich ein positiver Antigennachweis in allen drei Proteinextraktionen sowie der Positivkontrolle und kein Nachweis in der Negativkontrolle, wie erwartet (Abbildung 5-8). Somit bestätigte sich auch im WB das Ergebnis der FACS-Analyse, dass die transiente Transfektion der HeLa-Zellen mit GFP-

Ergebnisse

H3.1 primär erfolgreich war. Die markierten Histone ließen sich somit immunologisch in allen Extraktionen erfolgreich nachweisen, wobei die Histoneproben, insbesondere die Positivkontrolle, zusätzliche Banden aufwiesen.

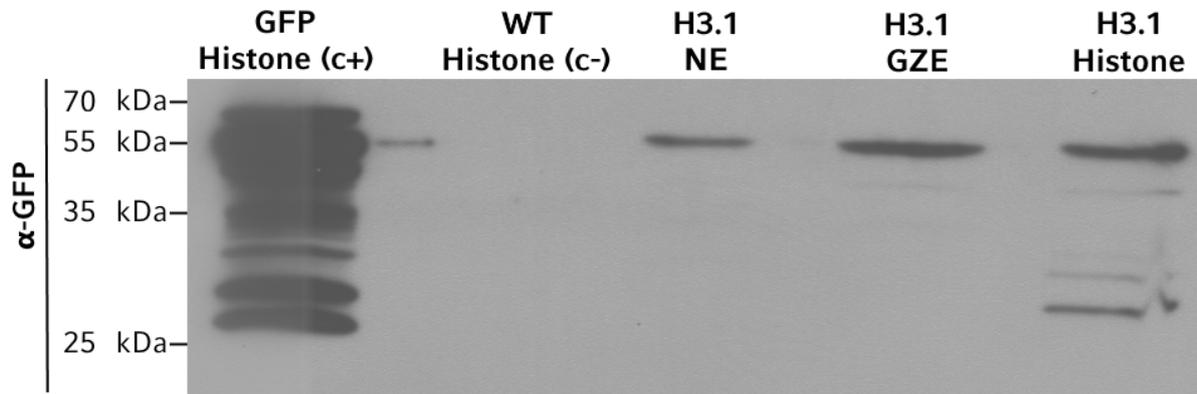


Abbildung 5-8: Immunologischer Nachweis von GFP in transient transfizierten HeLa-Zellen
Westernblot Analyse nach elektrophoretischer Auftrennung von nukleärem Extrakt (NE), Ganzzellextrakt (GZE) und Histonen auf einem 15% SDS-Gel aus transient transfizierten HeLa-Zellen. GFP Histone (c+): H2A.Z mit GFP-Markierung als Positivkontrolle; (c-): Histone von WT HeLa-Zellen als Negativkontrolle. Die Detektion erfolgte mit Antikörper gegen α -GFP. Das Molekulargewicht wurde über das Auftragen eines bekannten Protein-Größenstandards ermittelt (nicht abgebildet).

5.2.4 α -H3K9me1 und α -H3K56me1 können Histone mit Punktmutation nicht unterscheiden

Nun wurden aus den Zellstämmen, die exogen GFP-gekoppeltes H3.1, H3K9A, H3K56A und H3K9AK56A exprimierten, durch Säureextraktion Histone gewonnen und auf einem 15% SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle der Lademengen wurden zuvor an einem weiteren 15% SDS-Page durch Coomassie-Färbung die relativen Histonzkonzentrationen der unterschiedlichen Lösungen bestimmt. Die aufgetrennten Proteine wurden vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und diese mit einem Antikörper gegen α -GFP zur Kontrolle der Beladung inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Wildtyp-Histone von Zellen, die mit Leervektor transfiziert worden waren. Bei allen erwarteten Proben, in deren Ursprungszellen GFP-codierende Sequenzen eingebracht worden waren, zeigte sich ein Signal, das in der Negativkontrolle nicht nachweisbar war (Abbildung 5-9A). Jedoch war nicht jeweils eine einzelne Fraktion mit dem zu erwartenden Molekulargewicht von etwa 55 kDa detektierbar, sondern multiple Fraktionen mit Molekülgrößen zwischen 40 kDa und 10 kDa. Diese multiplen Banden

Ergebnisse

zeigten sich in allen Proben außer der Negativkontrolle entsprechen jedoch keinem typischen Muster von GFP-gekoppelten Histonproben.

Aus den gleichen Proben wurden Histone zur Untersuchung der Spezifität der verwendeten Antikörper gegen α -H3K9me1 und α -H3K56me1 auf zwei 15%-ige SDS-Page Gele geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte die Übertragung auf PVDF-Membranen. Jeweils eine dieser Membranen wurde dann mit einer Antikörperlösung gegen α -H3K9me1 und α -H3K56me1 inkubiert und danach entwickelt. In den Proben der GFP-Histone, die eine Mutation im Bereich des Epitops aufwiesen, gegen die sich der jeweilige Antikörper richtete, wurde ein Signalverlust an der Bande der mutierten Histone lokalisiert und bei einer Molekülgröße von etwa 50 kDa erwartet. Zusätzlich wurde in allen Proben ein Signalnachweis durch das kanonische H3 bei einer Molekülgröße von etwa 15 kDa vorhergesagt. Im Westernblot zeigte sich nach der Entwicklung jedoch in allen Proben, unabhängig von der spezifischen Mutation der Histone, ein Antigennachweis, der jedoch ebenfalls nicht bei der Molekülgröße der mutierten GFP-Histone auftrat sondern im Bereich von etwa 40 kDa, was nahelegt, dass diese durch dimerisierte Wildtyp-Histone hervorgerufen wurde. Wie erwartet zeigte sich bei der Molekülgröße endogener Histone H3 etwas oberhalb von 15 kDa in allen Proben ein Signal. (Abbildung 5-9B & C). Insgesamt legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass die Extraktion der GFP-gekoppelten Histone nicht gelungen ist. Eine weitere Aufreinigung mittels GFP-Trap verlief ebenfalls frustan (nicht gezeigt). In Ermangelung von Zeit für eine Modifikation und Wiederholung wurde die Untersuchung der Antikörpereigenschaften an dieser Stelle beendet.

Ergebnisse

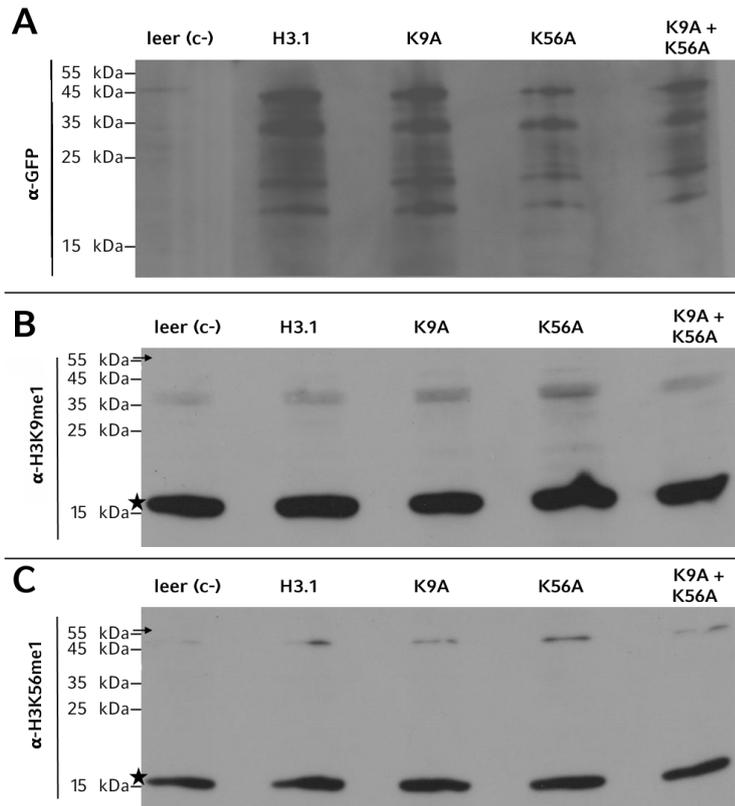


Abbildung 5-9: Erfolgreiche Überprüfung der Antikörperspezifitäten von α -H3K9me1 & H3K56me1
Westernblot Analysen nach elektrophoretischer Auf-trennung von Histonen auf einem 15% SDS-Gel aus transient transfizierten Zellen mit unterschiedlichen Vektoren, wie in der Überschrift angegeben. WT: Histone von mit Leervektor transfizierten HeLa-Zellen als Negativkontrolle; Die erwarteten Positionen der mit GFP markierten Histone sind durch einen Pfeil (\rightarrow) markiert. Die Signalbanden der endogenen Histon H3 Proteine sind durch einen Stern (*) hervorgehoben. Das Molekulargewicht wurde über das Auftragen eines bekannten Protein-Größenstandards ermittelt (nicht abgebildet). (A) Die Detektion erfolgte mit Antikörper gegen α -GFP; (B) α -H3K9me1; oder C) α -H3K56me1

5.3 Identifikation von Methyltransferasen deren siRNA-Knockdown H3K56me3 verringert

Nachdem sich in den Voruntersuchungen der polyklonale Antikörper gegen H3K56me3 als hochgradig spezifisch erwiesen hatte, wurde dieser verwendet, um zu untersuchen, welche der eine SET-Domäne enthaltenden Enzyme an der Trimethylierung von H3K56 beteiligt sind.

5.3.1 Screening von 43 Kandidaten mittels siRNA-Knockdown zeigt vielfache Abnahme des H3K56me3-Signals

In 43 identischen Ansätzen wurden Kulturen von HeLa-Zellen mit siRNAs gegen jeweils eine potenzielle KMT (siehe Tabelle 3-1) transfiziert, um so ein Knockdown der entsprechenden Enzyme zu erreichen. Als Negativkontrolle diente siRNA gegen Luciferase, einem Enzym, das in HeLa Zellen nicht vorkommt. Die Ernte der Zellen erfolgte 72 Stunden nach Transfektion, gefolgt von einer Säureextraktion der Histone. Nach elektrophoretischer Auftrennung dieser über 15%-ige SDS-PAGE, erfolgte die Übertragung auf Nitrocellulose-Membranen. Diese wurden mit Antikörperlösung inkubiert, die α -H3K56me3 sowie α -H2A aus Kaninchenserum enthielt. Nach sekundärer Inkubation mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper erfolgte die Messung mittels Nah-Infrarot-Fluoreszenzdetektion. Unterschiede in der Lademenge wurden gegen das α -H2A Signal normalisiert (Abbildung 5-10). Es zeigte sich eine Signalreduktion in beinahe allen Ansätzen, weshalb eine Eingrenzung auf Kandidaten mit einer Signalreduktion von > 50 % erfolgte, um von diesen unabhängige biologische Replikate zu erstellen und das Ergebnis so zu verifizieren. Dies wurde auch für *ASH1L* durchgeführt, dessen siRNA-Knockdown beinahe keine Signaländerung erbracht hatte. Zusätzlich wurden für alle siRNAs, deren Knockdown eine starke Signalreduktion (> 25 %) gezeigt hatte, Primer designt, um die Effizienz des Knockdowns zu messen.

Ergebnisse

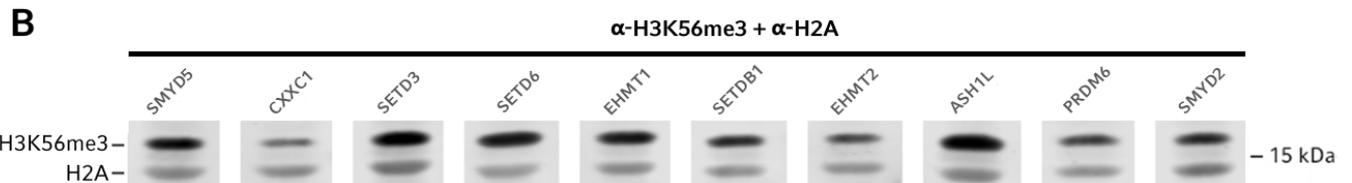
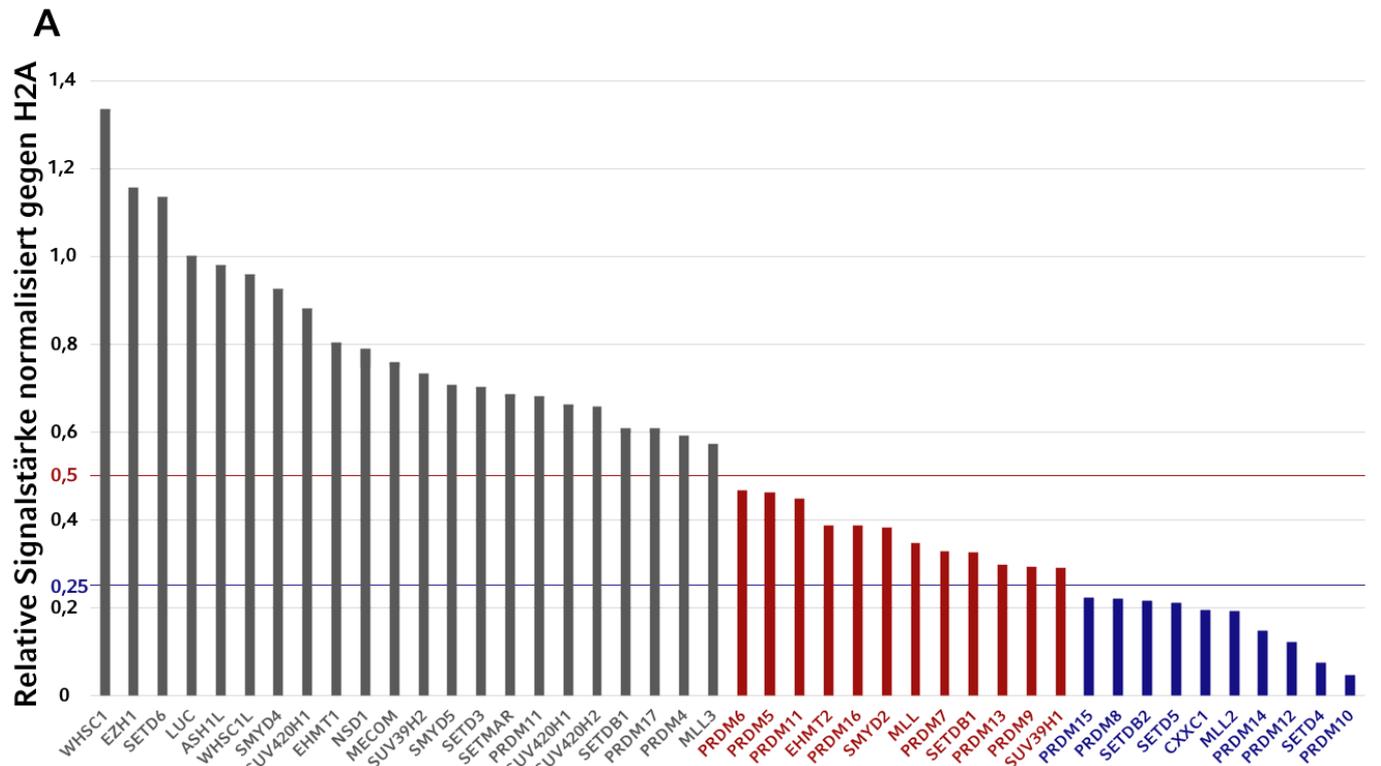


Abbildung 5-10: H3K56me3-Signalverlust von jeweils mehr als 50 % nach siRNA-Knockdown bei 22 Enzymen mit SET-Domäne.

(A) Quantitative Westernblot Analyse der Signalstärke von α -H3K56me3 aus Histonen von HeLa-Zellen, die mit unterschiedlichen siRNAs transfiziert wurden. Abszisse: Im jeweiligen Ansatz verwendete siRNA; Ordinate: Signalintensität von α -H3K56me3 normalisiert gegen α -H2A im relativen Vergleich zur Negativkontrolle siRNA gegen Luciferase (LUC). Rot: Grenze eines relativen Signalverlusts > 50 % mit den entsprechenden sechs siRNAs. Blau: Grenze eines relativen Signalverlusts > 25 % mit den entsprechenden neun siRNAs (B) Westernblot Analysen von Histonen nach siRNA Knockdown des jeweils oben angegebenen Enzyms und Inkubation gegen α -H3K56me3 & α -H2A. Links: Bezeichnung der jeweiligen Histonbande. Rechts: Molekulargewicht (Ermittelt über das Auftragen eines bekannten -nicht abgebildeten- Protein-Größenstandards). Liste aller Signalwerte siehe Anlage (Tabelle 7-2)

5.3.2 Bestätigung der H3K56me3-Signalreduktion in biologischen Replikaten

Mit Ausnahme von EHMT2 für das nicht mehr ausreichend siRNA vorlag, wurde von allen 21 Kandidaten, die eine Reduktion von mehr als 50% in der ersten Untersuchung zeigten,

Ergebnisse

biologische Replikate angefertigt und der Standardfehler des Mittelwerts (Standard deviation of the mean, SDM) mathematisch aus zwei unabhängigen biologischen Experimenten ermittelt. Hierbei bestätigte sich bei 17 untersuchten siRNAs ein Signalverlust für H3K56me3 nach Knockdown um mehr als 50 % innerhalb des Konfidenzintervalls. Bei sechs siRNAs war ein starker Signalverlust auf unter 25 % innerhalb des Konfidenzintervalls messbar. Die Negativkontrolle zeigte, wie erwartet, kaum Signalabfall mit einem Mittelwert von 86 %. Somit bestätigten sich die Ergebnisse des ersten Screenings in der Replikation auch in Bezug auf ASH1L als Negativkontrolle (Abbildung 5-11).

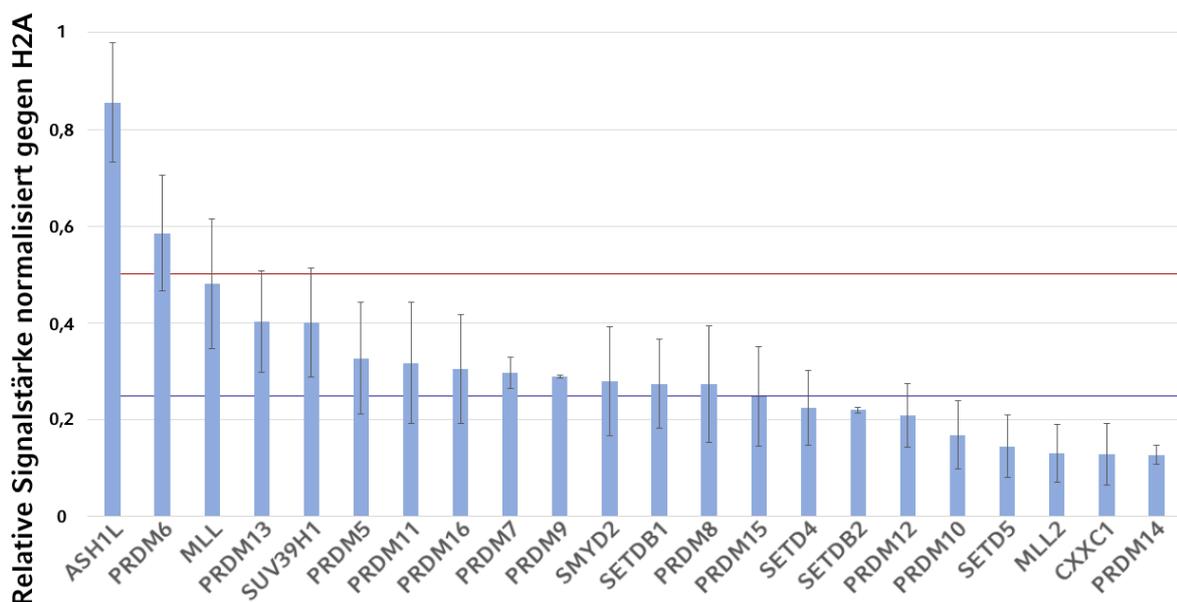


Abbildung 5-11: Replizierbarer H3K56me3-Signalverlust durch siRNA-Knockdown von 17 Enzymen mit SET-Domäne

Quantitative Westernblot Analyse der Signalstärken von α -H3K56me3 aus Histonen von HeLa-Zellen, die mit unterschiedlichen siRNAs transfiziert wurden, zeigen einen replizierbaren Signalverlust. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) zweier biologisch unabhängiger Replikate. Abszisse: Im jeweiligen Ansatz verwendete siRNA; Ordinate: Signalintensität von α -H3K56me3 normalisiert gegen α -H2A im relativen Vergleich zur Negativkontrolle -siRNA gegen Luciferase (LUC). Rot: Grenze eines relativen Signalverlusts > 50 %. Blau: Grenze eines relativen Signalverlusts > 25 %. Liste aller Signalwerte mit Standardfehlern siehe Anlage (**Tabelle 7-3**)

5.3.3 Nachweis des Knockdowns auf Genexpressionsebene bei vier Kandidaten

Um die RNA-Spiegel nach siRNA Knockdown zu bestimmen, wurden jeweils drei Vorwärts- und Rückwärtsprimer für jede der zehn zur weiteren Untersuchung

Ergebnisse

ausgewählten KMTs designt. Die so erstellten Primer wurden bezüglich Sequenzlänge und Schmelzpunkt möglichst ähnlich gewählt und kommerziell synthetisiert (Tabelle 3-2). Um „off-target“ Effekte auszuschließen und die Funktion der Primer zu überprüfen, erfolgte eine Testung jedes Primerpaars (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) an cDNA, die aus der RNA von WT HeLa Zellen umgeschrieben worden war. Als Negativkontrolle dienten Proben, die lediglich RNA enthielten nicht jedoch cDNA, da dem Ansatz keine reverse Transkriptase zugefügt worden war. Nach Amplifikation mittels PCR-Reaktion wurden die Proben über ein Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Produkte unter UV-Licht auf Fluoreszenz analysiert. So wurde jeweils ein Primerpaar selektiert, das ein eindeutiges Produkt der Amplifikation zeigte. Die einzige Ausnahme bildete *PRDM8*, bei dem sich durch keines der drei Primerpaare eine erfolgreiche Amplifikation nachweisen ließ und daher willkürlich Primerpaar 1 zur weiteren Untersuchung verwendet wurde. Nachdem somit jeweils ein Primerpaar ermittelt war, sollte der siRNA-Knockdown der neun potenziellen KMTs nun via qPCR untersucht werden. Dazu wurde aus HeLa-Zellen 72 Stunden nach Transfektion mit siRNAs gegen die potenziellen KMTs sowie Luciferase als Negativkontrolle (siehe 5.3.1) RNA mittels des *RNeasy Kits* (Qiagen) extrahiert und in cDNA umgeschrieben, wobei für jeden Ansatz auch eine Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase erstellt wurde, um eine Verunreinigung mit DNA auszuschließen. Sämtliche cDNA Proben wurden gemeinsam mit Ihren Negativkontrollen durch PCR amplifiziert. Hierfür wurden Primer für ein konstant exprimiertes Haushaltsgen, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. In der anschließenden Fluoreszenzanalyse der Proben nach Agarose-Gelelektrophorese zeigte sich in allen cDNA Synthesen ein Produkt der Amplifikation ohne Nachweis in den Negativkontrollen. Somit war von einer erfolgreichen cDNA-Synthese ohne Verunreinigung mit genomischer DNA auszugehen.

Die so gewonnene cDNA wurde nun mittels qPCR analysiert. Dies erfolgte unter Verwendung eines Primerpaars für das Zielgen, gegen das sich der siRNA-Knockdown der HeLa Zellen gerichtet hatte, aus denen die jeweilige cDNA stammt. So konnten über den Genexpressionsspiegel Rückschlüsse auf die Effizienz des Knockdowns gezogen werden. Die Messwerte wurden normalisiert gegen die Aktivität von zwei Haushaltsgenen (HPRT1 & HMBS) und analysiert, in Relation zu Messwerten aus Negativkontrollen. Hierzu wurden qPCRs, unter Verwendung der gleichen Primerpaare, mit cDNA aus HeLa-Zellen nach siRNA Knockdown gegen Luciferase durchgeführt. In einigen Ansätzen lag der „crossing point“ (CP) der Amplifikationsreaktion außerhalb des zulässigen Bereichs, weshalb die

Ergebnisse

Messungen dieser Reaktionen verworfen werden mussten. Da dies sowohl in den Proben als auch den dazugehörigen Kontrollen auftrat, könnten ursächlich eine zu geringe Genexpression oder Effektivität der Primer zu Grunde liegen. Um Letzteres zu überprüfen, wurde für die entsprechenden Gene eine Wiederholung mit alternativen Primerpaaren durchgeführt, was jedoch ebenfalls keine regelrechte Amplifikation über den Schwellenwert erbrachte. Von den fünf verbleibenden Genen konnte für vier eine Reduktion der mRNA Menge gemessen werden. Die relative Genexpression lag hier bei 48–66 % (Tabelle 7-4), wohingegen sich für *PRDM10* eine Erhöhung der Genexpression auf 170 % \pm 1 % zeigte. Sämtliche Experimente wurden zur Verifikation der Ergebnisse in drei biologisch unabhängigen Ansätzen wiederholt und auf dieser Datenbasis Mittelwerte und Standardfehler (SEM) ermittelt. (Abbildung 5-12)

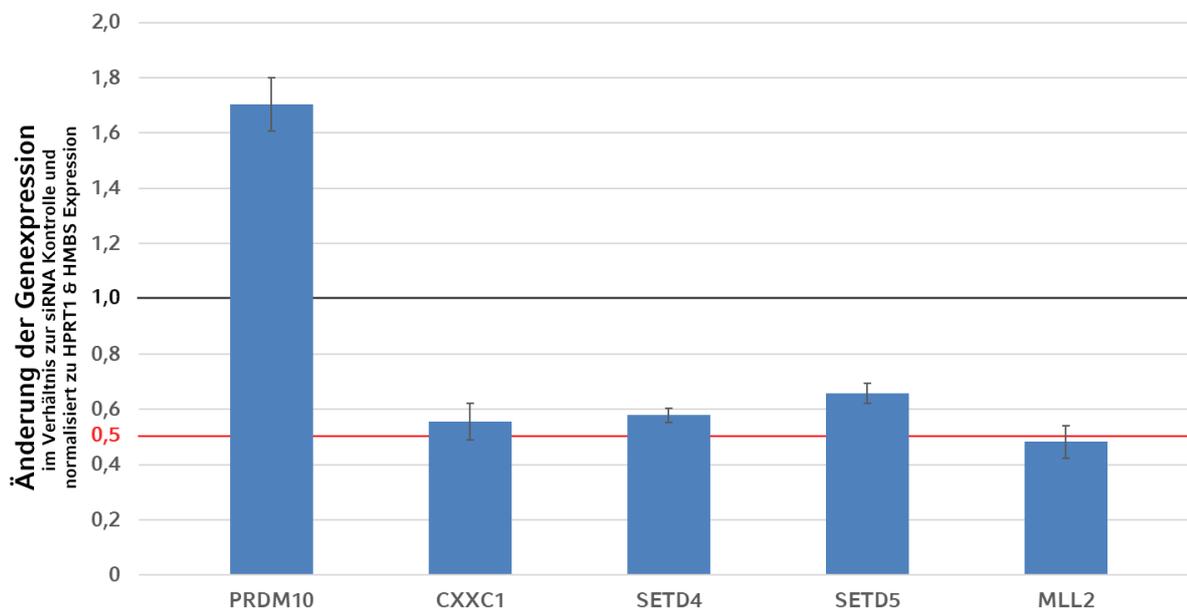


Abbildung 5-12: Reduzierte Genexpression nach RNA-Interferenz bei vier Enzymen

RT-qPCR Analyse von cDNA aus HeLa Zellen nach siRNA-Knockdown unter Verwendung von Primern gegen das jeweilige Zielgen des Knockdowns zeigt eine Herabsetzung der Genexpression mit Ausnahme von *PRDM10*. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) dreier biologisch unabhängiger Replikate. Abszisse: Zielgen der RNA-Interferenz und des Primers der qPCR; Ordinate: Genexpressionsniveau errechnet unter Normalisierung gegen die Haushaltsgene: *HPRT1* & *HMBS* sowie kalibriert an cDNA der Negativkontrolle -HeLa Zellen mit Knockdown gegen Luciferase. Rot: Grenze einer relativen Genexpression < 50 %. Liste aller Signalwerte mit Standardfehlern siehe Anhang (Tabelle 7-4).

6. Diskussion

6.1 Interpretation von Veränderungen der Methylierung von H3K9 & K56 in *G9a* Knockout mES Zellen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Histonextrakten aus WT- und *G9a*^{-/-} mES Zellen wurden diese mittels Westernblot auf ihre PTMs analysiert, um zu untersuchen, inwieweit die H3K9-Methyltransferase *G9a* (*EHMT2*) auch die Methylierung von K56 beeinflusst. Hierbei zeigte sich bei Fehlen von *G9a* ein Signalrückgang der Mono- und Dimethylierung von sowohl H3K9 als auch H3K56, jedoch kein vollständiger Signalverlust. Für H3K9me1 musste das Ergebnis aufgrund ungleicher Lademengen zunächst in Frage gestellt werden, bestätigte sich aber in der Analyse von Histonvarianten auf H3K9me1.

Diese Befunde stimmen überein mit Beschreibungen aus der Literatur für H3K9me1 & -me2 sowie H3K56me1, bei denen sowohl Knockout als auch Knockdown von *G9a* zu einer Reduktion, aber nicht einem kompletten Verlust der Histonmethylierung geführt haben (Tachibana et al., 2005; Yu et al., 2012). Für dieses Ergebnis sind mehrere Ursachen denkbar. Zunächst einmal sind vielfach Redundanzen bei der Ausbildung von PTMs beschrieben, spezifisch auch für die Methylierung von H3K9 an der neben *G9a* die KMTs: *SUV39H1*, *SUV39H2*, *GLP*, *SETDB1*, *SETDB2*, *PRDM3* und *PRDM16* beteiligt sind. Dies geschieht teilweise unter Ausbildung von Proteinkomplexen (Herz et al., 2013). So bildet *GLP* (*EHMT1*) Heterodimere mit *G9a* und einem Zink-Finger Protein, um Mono- und Dimethylierung von H3K9 zu katalysieren (Ueda et al., 2006). Durch in vitro Methylierungsassays konnte jedoch gezeigt werden, dass die beteiligten KMTs auch eigenständige katalytische Aktivität besitzen (Tachibana et al., 2001). Zudem wurde beschrieben, dass ein Knockout von *GLP* die zelluläre Konzentration von *G9a* massiv vermindert, umgekehrt jedoch ein *G9a* Knockout keine Veränderung der *GLP*-Konzentration *in vivo* hervorruft (Tachibana et al., 2005). Vermutlich ist ein solcher Effekt jedoch stärker auf weitere KMTs zurückzuführen, da ein zusätzlicher Knockdown von *GLP* in Zellen mit *G9a* Knockout keine weitere Veränderung der H3K56me1 hervorgebracht hat (Yu et al., 2012). Somit wäre der teilweise Erhalt des Methylierungssignals für H3K9 trotz *G9a* Knockouts durch die Aktivität anderer *G9a* unabhängiger KMTs erklärlich und potenziell auch für K56 denkbar. Dies wäre insofern bemerkenswert, als bisher keine weiteren Enzyme neben *G9a* beschrieben sind, welche die Bildung von H3K56me1

Diskussion

katalysieren, und darüber hinaus auch schon mehrere KMTs von H3K9 vergeblich auf eine solche Aktivität hin untersucht wurden (Yu et al., 2012). Bei Interpretation der Ergebnisse muss jedoch auch in Erwägung gezogen werden, dass die verwendeten *G9a*^{-/-} mES Zellen nicht nochmals auf ihren Knockout hin überprüft worden waren. Somit wäre denkbar, dass diese doch *G9a*, vielleicht auch nur teilweise, exprimierten und hierdurch die verminderte Methylierung von H3K9 und -K56 bedingt haben. Auch kann anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht bestimmt werden, ob Veränderungen in der Methylierung durch primäre Interaktion von *G9a* mit den Histonen erfolgt ist, wobei dies im Einklang mit der Literatur stünde, die diese Interaktion durch Methylierungsassays nahelegt (Tachibana et al., 2001) (Yu et al., 2012).

Bei Betrachtung der Ergebnisse des Westernblots auf die Monomethylierung von H3K9 & -K56 der mittels RP-HPLC aufgetrennten Histonvarianten von H3, zeigt sich ein vollständiger Signalverlust beider Methylmarken in allen Histonvarianten aus *G9a*-Knockout Zellen. Interessanterweise bestätigt sich somit in diesem Experiment nicht nur die Assoziation der Monomethylierung von H3K9 & -K56. Darüber hinaus ergibt sich auch ein Hinweis darauf, dass in mES Zellen, H3.1K9me1 nur sehr geringfügig und in H3.1K56me1 gar nicht vorkommt, während in der kombinierten Probe von H3.2 & H3.3 beide Methylierungen deutlich nachweisbar sind. Dies entspricht auch den Erwartungen gemäß der Literatur, die beschreibt, dass unterschiedliche Histonvarianten sich im Muster ihrer PTMs unterscheiden (Hake et al., 2006). Leider war es nicht möglich zu differenzieren, ob die Monomethylierung auf der Histonvariante H3.2, H3.3 oder beiden Varianten lokalisiert ist. Doch auch das Fehlen von H3.1K56me1 ist ein interessanter Befund, insbesondere unter dem Aspekt, dass für die Monomethylierung von H3K56 beschrieben wurde, in transkriptionell inaktivem Heterochromatin muriner und humaner Zellen nicht vorzukommen (Yu et al., 2012). H3.1 wird in der Literatur mit irreversibel stillgelegtem Heterochromatin assoziiert, was sich gut mit dem Befund decken würde, dass in dieser Histonvariante kein H3K56me1 nachweisbar war (Hake and Allis, 2006). Der zusätzliche Nachweis der Histonmethylierung in der massenspektroskopischen Analyse der Histonvarianten hätte eine unabhängige Bestätigung der Resultate liefern können, war aber in keiner der Proben erfolgreich. Dies könnte auf den geringen Anteil an methyliertem H3K56 zurückzuführen sein, der für Monomethyllysin in HeLa Zellen mit 0,8 % beschrieben wurde (Yu et al., 2012).

6.2 Bewertung der verwendeten Antikörper & Diskussion des Verifikationsversuchs an punktmutierten exogenen Histonen

Zur Untersuchung von Sensitivität und Spezifität des Antikörpers α -H3K56me3 erfolgten mehrere Experimente. Im Peptide-Competition-Assay war in keiner Negativkontrolle aus rekombinanten Histonen eine Detektion nachweisbar, während ausschließlich H3K56me3-Peptid, aber keine Probe anderer Methylierungsgrade von H3K56 oder auch H3K9-Peptide zu einem Signalverlust in der anschließenden Inkubation mit WT Histonen führte, sowohl im Westernblot als auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie. In der Spot Blot Untersuchung zeigte sich zwar eine leichte Kreuzreaktivität mit H3K56me2 ab einer Menge von 200 ng, jedoch entsprach selbst die Signalintensität für 1 mg H3K56me2 nicht einmal im Ansatz derer von 50 ng H3K56me3. Für alle weiteren getesteten Epitope konnte eine relevante Kreuzreaktivität bis hin zu 1 mg ausgeschlossen werden. Hieraus lässt sich eine weitgehende Spezifität des verwendeten Antikörpers ableiten, die lediglich in geringem Maße durch Kreuzreaktivität mit H3K56me2 kompromittiert wird. In der Zusammenschau all dieser Untersuchungen zeigt sich zudem eine ausgeprägte Sensitivität von α -H3K56me3 für sein Antigen, womit dem getesteten Antikörper insgesamt eine hohe Güte bescheinigt werden kann.

Die Testung der Sensitivität und Spezifität von α -H3K56me1 erbrachte im Vergleich etwas weniger gute Ergebnisse. Im Peptide-Competition-Assay war sowohl im Westernblot als auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie ein hochgradiger Signalverlust nach Inkubation mit H3K56me1-Peptid feststellbar, was für eine gute Sensitivität spricht. Jedoch zeigte sich auch in der Negativkontrolle durch unmodifizierte rekombinante Histone ein schwacher Signalnachweis, der in seiner Intensität weitgehend mit dem Signal nach erfolgreichem Abbinden durch H3K56me1-Peptid übereinstimmte. Da kein Signalverlust in der Inkubation mit den anderen getesteten Peptiden detektierbar war, ist dies am ehesten als eine schwache Kreuzreaktivität mit anderen Epitopen als H3K9me1 & K56 (unmodifiziert) zu interpretieren, wobei die anschließende Peptide-Mikroarray-Analyse ein relativ starkes Signal für H3(72-84)K79me1-Peptid erbrachte. Da sich hier jedoch auch eine Reaktivität auf H3(1-13)K9me1-Peptid zeigte, die in der Peptide-Competition nicht nachweisbar gewesen war, ist es plausibel anzunehmen, dass auch eine gewisse zusätzliche Kreuzreaktivität mit weiteren nicht untersuchten Epitopen vorliegt.

Daher sollten die Sensitivitäten und Spezifitäten von α -H3K9me1 und α -H3K56me1 weiter überprüft werden. Hierfür wurde versucht Zellen herzustellen, welche stabil Histone

Diskussion

exprimierten, die an Stelle von Lysin durch Punktmutation Alanin enthielten und somit das Epitop der Antikörper so veränderte, dass eine Bindung an der entsprechenden Position der Histonsequenz nicht mehr möglich war. Als Marker wurde GFP gewählt, um durch die Fluoreszenz Zellen zu erkennen, welche die mutierten Histone exprimierten. Die Erzeugung entsprechender stabiler Zelllinien war nicht erfolgreich. Dies könnte potentiell auf Effekte der mutierten Histone zurückzuführen sein, zumal gezeigt wurde, dass es in HeLa Zellen zu Störungen der DNA-Replikation und nach Punktmutationen von H3K56 zu einem vermehrten Arrest in der S-Phase kam nach Punktmutationen von H3K56 (Yu et al., 2012). Jedoch ist sowohl in diesem Experiment als auch in anderen Publikationen eine grundsätzliche Erzeugung von Zellen, die entsprechend mutierte Histone stabil exprimierten als erfolgreich beschrieben (Yuan et al., 2009). In diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht GFP eingebracht, sondern die Histone mittels eines FLAG-Tags markiert. Somit ist möglich, dass die Schwierigkeit in der Herstellung stabil transfizierter Zelllinien auf eine Toxizität von GFP zurückzuführen ist, wie diese auch in der Literatur für Säugetierzellen beschrieben wurde. Nach transienter Transfektion ließ sich das GFP-Signal mittels FACS-Analyse in einem Großteil der untersuchten Zellen nachweisen, was für eine vorübergehende Toleranz gegenüber der exogenen Expressierung und ein grundsätzliches Gelingen der Transfektion spricht. Durch Western Blotting mit Antikörper gegen GFP konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl in Ganzzell- als auch Nukleärem Extrakt und aufgereinigten Histonen ein GFP-Signal auf Höhe der mutierten Histone bei 55 kDa nachweisbar war. Jedoch zeigten sich bei den säureextrahierten Histonen zusätzliche Banden bis zu einem Molekulargewicht von etwas mehr als 25 kDa, was mit dem Gewicht von reinem GFP-Protein korreliert und daher als Ausdruck von Degradierung interpretiert wurde (Shimomura, 1979). In den Histonen der Positivkontrolle zeigten sich ebenfalls solche Banden, wobei diese deutlich zahlreicher und ausgeprägter auftraten, was durch eine höhere Beladung erklärbar wäre.

Nachdem nun Histone aller unterschiedlichen Mutationen durch Western Blotting unter Inkubation mit α -H3K9me1 und α -H3K56me1 analysiert wurden, zeigte sich in den Proben ein Signalnachweis für beide Antikörper auf Höhe der endogenen Histone, wie antizipiert. Auf der erwarteten Höhe der mutierten GFP-gekoppelten Histone von 55 kDa ließ sich jedoch kein aussagekräftiges Signal nachweisen, was dafür spricht, dass Schwierigkeiten bei der Säureextraktion von GFP-gekoppelten Histonen aufgetreten waren. Dies deckt sich auch mit dem Ergebnis der Kontrollinkubation mit α -GFP, bei der ebenfalls keine Bande bei 55 kDa detektierbar war. Stattdessen zeigten sich multiple Banden abnehmender

Molekülgröße, beginnend mit einem Molekulargewicht von 45 kDa, was vorsichtig als Hinweis einer aktiven Degradierung der mutierten Histone interpretiert werden kann und im Einklang stünde mit dem vergeblichen Versuch eine stabile Expression dieser zu erreichen. In beiden Detektionen monomethylierten Histons zeigten sich zusätzlich Banden im Bereich von 40 kDa, die am ehesten auf Dimerisierung von Wildtyp H3 zurückzuführen sind, was ebenfalls die Anfärbung in allen Proben inklusive der Negativkontrolle erklären würde. Die Ursache für die fehlgeschlagene Aufreinigung der GFP-gekoppelten Histone könnte in deren veränderten Säure-Basen Eigenschaften liegen. Das GFP Molekül weist ein Molekulargewicht von 27 kDa auf, wohingegen das von Histon H3.1 lediglich 15 kDa beträgt, weshalb die Markierung mit GFP einen dominierenden Einfluss auf die Eigenschaften des so entstehenden Proteins hat. Es scheint daher plausibel, dass die Fusion beider Proteine die Säureextraktion behindert hat, die auf der basischen Eigenschaft von Histonprotein basiert. Aus Zeitmangel wurde auf weitere Wiederholung an anderen Extrakten verzichtet. Für zukünftige Untersuchungen lässt sich ableiten, dass anstelle von GFP besser auf alternative Markierungen mit geringerer Masse zurückgegriffen werden sollte, wie beispielsweise den bereits erwähnten FLAG-Tag, welcher mit einer Länge von acht Aminosäuren lediglich ein Molekulargewicht von 1 kDa aufweist (Hopp et al., 1988). Auch die Verwendung anderen Materials, wie beispielweise Kernextrakte, könnte angesichts der Ergebnisse (siehe Abbildung 5-8) eine erfolgversprechende Alternative zur Säureextraktion von Histonen darstellen. Die beabsichtigte Überprüfung der Antikörper ließ sich auf Basis dieser Ergebnisse nicht durchführen. Zumindest die Auswertung der Peptide-Competition-Assays und Peptide-Mikroarrays lässt jedoch auf eine hinreichende Güte von α -H3K56me1 schließen und bescheinigt α -H3K56me3 hervorragende Qualität, weshalb letzterer Antikörper in der weiteren Untersuchung potenzieller KMTs von H3K56 bevorzugt eingesetzt wurde.

6.3 Identifizierung potenzieller Histonmethyltransferasen der Trimethylierung von Histon 3 Lysin 56 mit Literaturvergleich

Um zu untersuchen, welche KMTs die Trimethylierung von H3K56 beeinflussen, wurde für 43 SET-Domänen enthaltende Gene in HeLa Zellen mittels RNA-Interferenz ein Knockdown-Screen durchgeführt. Bei der anschließenden Messung des Signals von H3K56me3 zeigte sich für 14 Gene nach Knockdown eine Abnahme der Signalintensität um mindestens 50 %, weshalb diese als mögliche Histonmethyltransferasen von H3K56 in

Diskussion

die engere Auswahl kamen (siehe 5.3.2). Als Negativkontrollen diente *Luciferase*, die in HeLa Zellen nicht vorkommt, und *ASH1L*. Bei letzterem handelt es sich um eine KMT, für die beschrieben wurde, dass sie die Methylierung von H3K36 katalysiert und in unserer Untersuchung keine relevante Reduktion von H3K56me₃ gezeigt hatte (Hou et al., 2019). Bei der Interpretation des Ergebnisses sollte bedacht werden, dass selbst bei erfolgreichem Knockdown eines Gens das gemessene H3K56me₃-Signal durch sekundäre Effekte, insbesondere „crosstalk“ (1.2.6.3), hervorgerufen sein kann und es sich daher trotz SET-Domäne aller untersuchten Enzyme nicht um das Fehlen einer direkten Methylierung durch die herabregulierte potenzielle KMT handeln muss. Insbesondere könnte es sein, dass KMTs, die Hinweise auf eine Steigerung der Trimethylierung von H3K56 zeigen, selbst eine Mono- oder Dimethylierung katalysieren, welche eine Voraussetzung für die Trimethylierung darstellt. Zudem sollte beachtet werden, dass aufgrund des hohen Aufwands nur für eine Auswahl besonders vielversprechender Kandidaten eine Verifikation des Knockdowns mittels Messung der RNA-Konzentration durchgeführt wurde, die zwar überwiegend, aber nicht ausschließlich eine Abnahme der RNA-Level erbrachte. Trotzdem ist interessant, dass sich für eine große Zahl von KMT-Kandidaten eine Reduktion des H3K56me₃-Signals nach Knockdown zeigte. Auch handelt es sich bei vielen der Proteine, deren Knockdown einen starken Signalverlust bewirkte, um potentielle KMTs, über deren Wirkung vergleichsweise wenig bekannt ist, wohingegen Proteine, deren Knockdown wenig Signalverlust oder sogar eine Signalsteigerung erbracht hatte, häufig gut beschriebene KMTs für andere Methylmarken wie H3K27 (*EZH1*) und H3K36 (*ASH1L*, *WHSC1/NSD2*, *WHSC1L/NSD3*) darstellten (Abbildung 5-10) (Herz et al., 2013).

Durch Messung der Effizienz des Knockdowns auf RNA-Ebene konnte für vier von fünf der mittels RT-qPCR untersuchten Gene eine Reduktion der mRNA um knapp die Hälfte gezeigt werden, was für einen erfolgreichen Knockdown spricht (Abbildung 5-12). Diesen Genen und ihren Produkten *MLL2*, *CXXC1*, *SETD4* und *SETD5* werden in der Literatur unterschiedliche Funktionen zugeschrieben, jedoch keine mit direktem Bezug auf H3K56-Methylierung, wobei zur PTM von H3K56 insgesamt wenig Informationen vorliegen.

Bei *MLL2* (*KMT2D*) handelt es sich um eine humane Methyltransferase von H3K4, von der beschrieben ist, dass deren Keimzellmutation das Kabuki Syndrom mit kongenitalen Fehlbildungen bedingt und dessen somatische Mutationen mit diversen Karzinomen vergesellschaftet sind (Banka et al., 2012; Rao and Dou, 2015).

CXXC1 ist ein Zinkfingerprotein, das einen Bestandteil des *SETD1*-Komplexes darstellt und mit diesem die Methylierung von DNA, aber auch von H3K4 vermittelt. Hierbei

Diskussion

scheint *CXXC1* den *SETD1*-Komplex zu hemmen, da ein Fehlen des Proteins eine Zunahme von H3K4 Methylierung bewirkt (Lee and Skalnik, 2005). Darüber hinaus ist beschrieben, dass *CXXC1* Cytosin-Methylierung von DNA auch unabhängig des *SETD1* Komplexes katalysiert (Butler et al., 2008).

SETD4 ist eine Histonmethyltransferase, für die in quieszenten Brustkrebsstammzellen eine Beteiligung an der Bildung von H4K20me3 und daraus resultierender Heterochromatinbildung beschrieben wurde (Dai et al., 2017). In murinen Makrophagen wurde zudem eine *SETD4* abhängige Mono- und Dimethylierung von H3K4 im Rahmen der inflammatorischen Aktivierung beschrieben (Zhong et al., 2019).

Für *SETD5* wurde berichtet, dass dieses keine Methyltransferaseaktivität aufweist, was auf ein Fehlen der, aus anderen KMTs der SET-Familie bekannten, Substrat-bindenden Domäne zurückgeführt wird. Konkret wurde bei *in vitro* Methylierungsassays ein Fehlen der Methyltransferaseaktivität für H3K4me1,-me2, -me3, K9me2, H3K36me2- und -me3 beschrieben (Deliu et al., 2018). Stattdessen wurde eine Deacetylierung durch *SETD5* an H4K16ac beschrieben, die rDNA Transkription und hierüber den Zellzyklus via Cyclin D1 hemmt (Nakagawa et al., 2020). Mutationen von *SETD5* sind sowohl in Mäusen als auch Menschen mehrfach mit Autismus-Spektrum-Störungen und Intelligenzminderung sowie heterotropen Fehlbildungen in Zusammenhang gebracht worden und waren in einer Kohortenstudie bei 0,7 % aller PatientInnen mit pathologischer Intelligenzminderung nachweisbar (Deliu et al., 2018; Fernandes et al., 2018; Grozeva et al., 2014).

Interessant ist, dass sich für das fünfte untersuchte Gen *PRDM10* ein konsistenter Anstieg des RNA-Spiegels auf 170 % (\pm 9,6 %) des Referenzwertes nach Knockdown zeigte. Solche Phänomene sind nach RNA-Interferenz wenig beschrieben, was aber einem Reporting-Bias geschuldet sein könnte (Scacheri et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für den paradoxen Anstieg des RNA-Spiegels von *PRDM10* nach Knockdown ist, dass das Oligonucleotid keine RNA-Interferenz bewirkt, sondern stattdessen im Sinne einer miRNA zwar die Translation durch Bindung der mRNA hemmt aber keine Degradierung dieser bewirkt (Ambros, 2004). Dies hätte zur Folge, dass die Translation gehemmt wird und in Folge die Proteinmenge abnimmt. Hierdurch wäre eine Reduktion des H3K56me3 Signals möglich, während gleichzeitig ein Feedback-Mechanismus die Transkription des Gens verstärken könnte, als Reaktion auf den erniedrigten Proteinspiegel. Somit wäre gleichzeitig ein erhöhter RNA-Spiegel und eine erniedrigte Proteinkonzentration mit den entsprechenden zellulären Effekten erklärbar. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre es hilfreich, die Proteinkonzentration von *PRDM10* zu bestimmen, was aber für keine der

Diskussion

potenziellen KMTs auf Grund der mangelnden Verfügbarkeit entsprechender Antikörper möglich war. Auch off-target Effekte des Knockdowns könnten das Ergebnis erklären, wobei für die gewählten siRNAs solche Effekte mittels BLAST-Analyse eigentlich im Vorfeld ausgeschlossen worden waren. Über *PRDM10* selbst ist wenig bekannt, bis auf einige Assoziationen mit Tumoren, insbesondere Sarkomen, sowie eine Replikationshemmung von HIV in HeLa Zellen durch *PRDM10*-Knockdown (Chen et al., 2019; Hofvander et al., 2015; Zhou et al., 2008).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ebenfalls beachtenswert ist, dass bei vier von neun Kandidaten-Knockdowns eine Analyse des RNA-Levels mittels RT-qPCR nicht möglich war, da es zu keiner angemessenen exponentiellen Amplifikation kam (5.3.5). Dies könnte an den verwendeten Primern liegen, wobei diese zuvor getestet worden waren (5.3.3) und auch ein Wechsel auf einen alternativen Primer keine Veränderung brachte (5.3.5). Deshalb ist am ehesten von einer zu geringen RNA-Konzentration in der Probe auszugehen, wobei unklar bleibt, ob dies dem Knockdown geschuldet ist oder auf eine insgesamt niedrige Genexpression zurückzuführen ist. Eine erfolglose cDNA-Synthese kann angesichts der multiplen Kontrollen weitgehend ausgeschlossen werden (5.3.4).

Bei SUV39H1&H2, für die später durch unsere Arbeitsgruppe eine Beteiligung an der Trimethylierung von H3K56 gezeigt wurde, konnte für beide Unterformen zwar eine Reduktion des H4K56me3-Signals nach Knockout gezeigt werden (5.3.1), jedoch fiel diese deutlich geringer aus als in späteren Untersuchungen. Dies ist vermutlich auf einen Rescue Effekt der beiden SUV39 Subtypen H1 & H2 zurückzuführen, da in dieser Arbeit jeweils nur ein Knockdown für eines der beiden Gene vorlag, wohingegen in späteren Versuchen MEF-Zellen mit einem DKO für SUV39H1/H2 immunhistochemisch einen deutlich ausgeprägteren Verlust von H3K56me3 aufwiesen (Jack et al., 2013a).

Für die beiden KMTs von H4K20me3 SUV4-20H1 & -2 wurde in der gleichen Publikation beschrieben, dass diese keinen Einfluss auf H3K56me3 haben. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der keine der beiden Knockdowns des Enzyms eine beachtenswerte Reduktion des H3K56me3-Signals erbrachte.

Für die KMT *EHMT2/G9a* wurde beschrieben, dass diese neben der Mono- und Dimethyltransferaseaktivität an H3K9 auch die Monomethylierung von H3K56 katalysiert (Yu et al., 2012). Dies erfolgt unter Ausbildung von Heteromeren mit der KMT *EHMT1/GLP* (Tachibana et al., 2005). Eine spezifische Ankyrin-Domäne, die eine hydrophobe Tasche enthält, welche in beiden Enzymen strukturell eine hohe Ähnlichkeit aufweist, wurde als für die Bindung von H3K9me1 & -me2 verantwortlich beschrieben,

Diskussion

kann jedoch aus sterischen Gründen keine Trimethylierung binden (Collins et al., 2008). Allerdings wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass Mutationen dieser hydrophoben Tasche keine Veränderung von H3K9me2-Spiegeln hervorbrachten, wohingegen eine Mutation eines anderen Abschnitts der Ankyrin-Domäne zu einem massiven Rückgang von H3K9me2 führte (Bittencourt et al., 2014). Hieraus lässt sich schließen, dass *EHMT2/G9a* möglicherweise doch auch die Bildung von H3K56me3 katalysieren kann, wobei eine indirekte Beeinflussung über den Zwischenschritt der Bildung von H3K56me1, die bereits beschrieben wurde, plausibler erscheint (Towbin et al., 2012). Beides stünde im Einklang unserer Messung eines H3K56me3-Signalverlustes auf 38,7 %. Dieser muss jedoch aufgrund fehlender Replikate mit Vorsicht interpretiert werden, wobei die Extrapolation des Mittelwerts aller Standardfehler der anderen replizierten Proben von $\pm 8,4$ % eine gewisse Aussagekraft nahelegt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang noch der Effekt eines kombinierten Knockdowns von *EHMT2/G9a* und *EHMT1/GLP*, nachdem sich für letztere im einzelnen Knockdown keine beachtenswerte Verringerung des H3K56me3-Signals gezeigt hatte, jedoch ES-Zellen mit dem entsprechenden DKO einen vollständigen Signalverlust für H3K56me1 aufweisen (Yu et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehrere interessante, potenziell an der Trimethylierung von H3K56 beteiligte Enzyme identifiziert werden konnten, jedoch weitere Forschung zur Verifizierung der Ergebnisse und Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen nötig ist. Der insgesamt niedrige Anteil an Histon H3 mit Trimethylierung am Lysin 56 in humanen Zellen erschwert Untersuchungen, bedeutet aber keineswegs, dass diese PTM unbedeutend für die epigenetische Regulation ist. Neben der intrinsisch faszinierenden Komplexität zeigt sich in der Korrelation vieler der auffälligen KMT-Kandidaten mit schlecht therapierbaren Krankheitsbildern auch das konkrete Potential weiterer Grundlagenforschung im Hinblick auf pathophysiologisches Verständnis und zukünftige Therapieoptionen.

Abkürzungsverzeichnis

A	
α	Anti
Abb.	Abbildung
ASH1L	ASH1 like histone lysine methyltransferase
B	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
C	
CP	Schwellenwertzyklus (Crossing Point)
CpG	Cytosin–Phosphat–Guanin–Abschnitt der DNA
CT(s)	Chromosomen Territorien (Chromosome territories)
CXXC1	CXXC Finger Protein 1
D	
ddH ₂ O	Doppeltdestilliertes Wasser
DEPC	Diethylcarbonat
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DNO	Doppel-Knockout
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat Solution Mix

Abkürzungsverzeichnis

E	
ECL	Elektrochemielumineszenz Detection Reagent
E. coli	Escherichia coli
ES	Embyronale Stammzellen
F	
FACS	fluorescence-activated cell sorting
G	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H	
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H1	Histon H1 (Linker-Histon)
H2A	Histon H2A
H2B	Histon H2B
H3	Histon H3
H4	Histon H4
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (human immunodeficiency virus)
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (Hydrophilic interaction liquid chromatography)
HJURP	Holliday junction-recognizing protein

Abkürzungsverzeichnis

HMBS	Porphobilinogen-Deaminase (Hydroxymethylbilane synthase)
HMT	Histon-Methyl-Transferase
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
I	
ICD	Interchromosomale Domäne (Interchromosome domain)
IF	Immunofluoreszenz
J	
K	
kb	Kilobasen
KMT	Lysinmethyltransferase
KMT2D	Lysinmethyltransferase 2D
L	
LAD(s)	Lamina assoziierten Domänen (Lamina associated domains)
lncRNA	lange-nicht-kodierende-RNA (Long-non-coding RNA)
M	
MEF	Embryonale Fibroblasten der Maus (murine embryonic fibroblasts)
mES	Embryonale <i>Stammzellen</i> der Maus (murine embryonic stemm cells)
miRNA	microRNA
min	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

MNAse	Micrococcal Nuclease
Mrd.	Milliarden
N	
ncRNA	Nichtkodierende RNA (Non-coding RNA)
O	
P	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PTM(s)	Posttranslationale Histonmodifikation(en)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
piRNA	piwi-interacting RNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	
R	
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Reversed phase-high performance liquid chromatography)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
S	

Abkürzungsverzeichnis

s	Sekunden
SETD4	SET domain containing 4
SETD5	SET domain containing 5
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium-dodecyl-sulfate)
siRNA	kleine-interferierende-RNA (Short interfering RNA)
sncRNAs	kleine-nicht-kodierende-RNA (Small-non-coding-RNA)
T	
TAD	Topologisch-assoziierte Domänen (Topological Associated Domains)
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	
V	
W	
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
X	
Xist	X inactive specific transcript
Y	
Z	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 1: Histonoktamer mit umschließender DNA	Seite: 12
Abbildung 1 2 Verpackungsstadien der Chromatinstruktur	Seite: 14
Abbildung 1 3: Mechanismen der Chromatinstrukturveränderung	Seite: 16
Abbildung 1 4: Nukleosomenstruktur mit Hervorhebung von H3K56 & H3K9	Seite:29
Abbildung 4 1: Gelelektrophorese-Kammer	Seite:58
Abbildung 4 2: Westernblot Schemazeichnung einer Westernblot-Kammer	Seite: 60
Abbildung 5 1: Verringerter Antikörpernachweis von Histonmethylierung in G9a ^{-/-} mES Zellen	Seite: 71
Abbildung 5 2: Isolierung von Histonvarianten aus G9a ^{-/-} mES und WT-mES durch RP-HPLC	Seite: 74
Abbildung 5 3: Verlust der Monomethylierung von K9 & K56 in Histonvarianten H3.2 & H3.3 bei G9a ^{-/-} mES Zellen	Seite: 76
Abbildung 5 4: Nachweis der Spezifität des Antikörpers gegen α -H3K56me3	Seite: 78
Abbildung 5 5: Untersuchung der Spezifität des Antikörpers gegen α -H3K56me1 anhand von „Peptide-Competition“- und „Peptide-Chip“-Experimenten	Seite: 81
Abbildung 5 6: Mutation von H3K9 zu H3A9	Seite: 82
Abbildung 5 7: Erfolgreiche Expression von GFP und GFP-Histon H3 Mutanten in transient transfizierten HeLa-Zellen	Seite: 85
Abbildung 5 8: Immunologischer Nachweis von GFP in transient transfizierten HeLa-Zellen	Seite: 86
Abbildung 5 9: Erfolglose Überprüfung der Antikörperspezifitäten von α -H3K9me1 & H3K56me1	Seite: 88
Abbildung 5 10: H3K56me3-Signalverlust von jeweils mehr als 50 % nach siRNA-Knockdown bei 22 Enzymen mit SET-Domäne.	Seite:90
Abbildung 5 11: Replizierbarer H3K56me3-Signalverlust durch siRNA-Knockdown von 17 Enzymen mit SET-Domäne.	Seite: 91
Abbildung 5 12: Reduzierte Genexpression nach RNA-Interferenz bei vier Enzymen	Seite: 93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Auswahl wichtiger Core-Histone und ihrer Varianten beim Menschen.	Seite: 20
Tabelle 1-2: Posttranslationale Modifikationen von Histonen	Seite: 21
Tabelle 1-3: Histonmodifizierende Enzyme und ihre Angriffspunkte	Seite: 24
Tabelle 1-4: SET-Domänen enthaltende Histonmethyltransferasen und ihre Unterfamilien	Seite: 26
Tabelle 3-1: siRNAs gegen Genprodukte mit SET-Domäne	Seite: 48
Tabelle 3-2: Primer für Gene deren Produkte die SET-Domäne enthalten	Seite: 49
Tabelle 3-3: Primer für nicht regulierte Gene	Seite: 50
Tabelle 4-1: Zusammensetzung: SDS-Polyacrylamid-Sammelgel & -Trenngel	Seite: 57
Tabelle 4-2: Ansatz für PCR	Seite: 62
Tabelle 4-3: PCR-Schritte mit Temperaturprofilen	Seite: 62
Tabelle 4-4: Ansatz für PCR-Mutagenese	Seite: 64
Tabelle 4-5: PCR-Mutagenese-Schritte mit Temperaturprofilen	Seite: 64
Tabelle 4-6: Transfektions-Suspensionen	Seite: 67
Tabelle 4-7: Ansatz für qPCR	Seite: 69
Tabelle 4-8: qPCR-Schritte mit Temperaturprofilen	Seite: 69
Tabelle 7-1: Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren des Menschen.	Seite: 109
Tabelle 7-2: Relative Signalstärken von H3K56me3 nach siRNA-Knockdown	Seite: 110

Anhang

Tabelle 7-3: Mittelwerte der Signalstärken von H3K56me3 nach siRNA-Knockdown mit Standardfehler Seite: 111

Tabelle 7-4: Mittelwerte der relativen Genexpressionsspiegel potenzieller KMTs nach ihrem siRNA-Knockdown mit Standardfehler Seite: 111

Anhang

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

Tabelle 7-1: Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren des Menschen.

siRNA Name	Signalstärke
WHSC1	1,334
EZH1	1,157
SETD6	1,135
LUC	1,001
ASH1L	0,979

Anhang

WHSC1L	0,957
SMYD4	0,925
SUV420H1	0,882
EHMT1	0,803
NSD1	0,789
MECOM	0,758
SUV39H2	0,733
SMYD5	0,707
SETD3	0,702
SETMAR	0,685
PRDM11	0,680
SUV420H1	0,662
SUV420H2	0,656
SETDB1	0,608
PRDM17	0,608
PRDM4	0,591
MLL3	0,573
PRDM6	0,467
PRDM5	0,461
PRDM11	0,448
EHMT2	0,387
PRDM16	0,385
SMYD2	0,382
MLL	0,347
PRDM7	0,329
SETDB1	0,325
PRDM13	0,298
PRDM9	0,293
SUV39H1	0,289
PRDM15	0,221
PRDM8	0,219
SETDB2	0,214
SETD5	0,210
CXXC1	0,193
MLL2	0,191
PRDM14	0,146
PRDM12	0,119
SETD4	0,074
PRDM10	0,045

Tabelle 7-2: Relative Signalstärken von H3K56me3 nach siRNA-Knockdown
(gerundet auf drei Nachkommastellen)

Anhang

siRNA Name	Mittelwert (MW)	Standartfehler (SEM)
PRDM14	0,127	0,020
CXXC1	0,129	0,064
MLL2	0,131	0,060
SETD5	0,145	0,065
PRDM10	0,169	0,071
PRDM12	0,208	0,066
SETDB2	0,220	0,006
SETD4	0,225	0,077
PRDM15	0,247	0,103
PRDM8	0,274	0,121
SETDB1	0,274	0,092
SMYD2	0,280	0,113
PRDM9	0,290	0,003
PRDM7	0,297	0,032
PRDM16	0,304	0,112
PRDM11	0,317	0,125
PRDM5	0,327	0,115
SUV39H1	0,401	0,112
PRDM13	0,403	0,105
MLL	0,481	0,135
PRDM6	0,585	0,119
ASH1L	0,856	0,124

Tabelle 7-3: Mittelwerte der Signalstärken von H3K56me3 nach siRNA-Knockdown mit Standartfehler (gerundet auf drei Nachkommastellen)

Gen Name	Mittelwert (MW)	Standartfehler (SEM)
PRDM10	1,702	0,096
CXXC1	0,556	0,067
SETD4	0,578	0,025
SETD5	0,658	0,036
MLL2	0,482	0,058

Tabelle 7-4: Mittelwerte der relativen Genexpressionsspiegel potenzieller KMTs nach ihrem siRNA-Knockdown mit Standartfehler (gerundet auf drei Nachkommastellen)

Literaturverzeichnis

(2007). Epigenetics (cold spring harbor laboratory press).

Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., and Shiekhatar, R. (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.

Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of experimental medicine* 79, 137-158.

Banka, S., Veeramachaneni, R., Reardon, W., Howard, E., Bunstone, S., Ragge, N., Parker, M.J., Crow, Y.J., Kerr, B., and Kingston, H. (2012). How genetically heterogeneous is Kabuki syndrome?: MLL2 testing in 116 patients, review and analyses of mutation and phenotypic spectrum. *European journal of human genetics* 20, 381-388.

Becker, P.B., and Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annual review of biochemistry* 71, 247-273.

Becker, P.B., and Workman, J.L. (2013). Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a017905.

Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R., and Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & development* 23, 781-783.

Bernier, M., Luo, Y., Nwokelo, K.C., Goodwin, M., Dreher, S.J., Zhang, P., Parthun, M.R., Fondufe-Mittendorf, Y., Ottesen, J.J., and Poirier, M.G. (2015). Linker histone H1 and H3K56 acetylation are antagonistic regulators of nucleosome dynamics. *Nat Commun* 6, 10152.

Bickmore, W.A. (2013). The spatial organization of the human genome. *Annual review of genomics and human genetics* 14, 67-84.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* 16, 6-21.

Bird, A.P. (1985). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Literaturverzeichnis

- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., and Thurman, R.E. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799-816.
- Bittencourt, D., Lee, B.H., Gao, L., Gerke, D.S., and Stallcup, M.R. (2014). Role of distinct surfaces of the G9a ankyrin repeat domain in histone and DNA methylation during embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Epigenetics & Chromatin* 7, 27.
- Bönisch, C., and Hake, S.B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic acids research* 40, 10719-10741.
- Bonisch, C., Nieratschker, S.M., Orfanos, N.K., and Hake, S.B. (2008). Chromatin proteomics and epigenetic regulatory circuits. *Expert Rev Proteomics* 5, 105-119.
- Boveri, T. (1909). Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität (Engelmann).
- Brownell, J.E., and Allis, C.D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-184.
- Butler, J.S., Lee, J.H., and Skalnik, D.G. (2008). CFP1 interacts with DNMT1 independently of association with the Setd1 Histone H3K4 methyltransferase complexes. *DNA Cell Biol* 27, 533-543.
- Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics* 10, 295-304.
- Cedar, H., and Felsenfeld, G. (1973). Transcription of chromatin in vitro. *Journal of molecular biology* 77, 237-254.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* 318, 444-447.
- Chen, N., Hu, T., Gui, Y., Gao, J., Li, Z., and Huang, S. (2019). Transcriptional regulation of Bcl-2 gene by the PR/SET domain family member PRDM10. *PeerJ* 7, e6941.
- Chen, S., Yang, Z., Wilkinson, Alex W., Deshpande, Aniruddha J., Sidoli, S., Krajewski, K., Strahl, Brian D., Garcia, Benjamin A., Armstrong, Scott A., Patel, Dinshaw J., *et al.* (2015). The PZP Domain of AF10 Senses Unmodified H3K27 to Regulate DOT1L-Mediated Methylation of H3K79. *Molecular Cell* 60, 319-327.
- Chiang, P., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G., Doctor, B., Pardhasaradhi, K., and McCann, P.P. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *The FASEB Journal* 10, 471-480.
- Clemson, C.M., McNeil, J.A., Willard, H.F., and Lawrence, J.B. (1996). XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *The Journal of cell biology* 132, 259-275.

Literaturverzeichnis

- Collins, R.E., Northrop, J.P., Horton, J.R., Lee, D.Y., Zhang, X., Stallcup, M.R., and Cheng, X. (2008). The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. *Nature structural & molecular biology* 15, 245-250.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Correns, C.E. (1924). G. Mendel's Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. In *Gesammelte Abhandlungen zur Vererbungswissenschaft aus Periodischen Schriften 1899–1924* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 9-18.
- Coulter, W.H. (1956). High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Paper presented at: Proceedings of the National Electronics Conference.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I., and Fakan, S. (2006). Chromosome territories—a functional nuclear landscape. *Current opinion in cell biology* 18, 307-316.
- Dai, L., Ye, S., Li, H.-W., Chen, D.-F., Wang, H.-L., Jia, S.-N., Lin, C., Yang, J.-S., Yang, F., and Nagasawa, H. (2017). SETD4 regulates cell quiescence and catalyzes the trimethylation of H4K20 during diapause formation in *Artemia*. *Molecular and cellular biology* 37.
- Darnell, J.E. (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297, 365-371.
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection*. Murray, London 502.
- Das, C., Lucia, M.S., Hansen, K.C., and Tyler, J.K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459, 113-117.
- Deliu, E., Arecco, N., Morandell, J., Dotter, C.P., Contreras, X., Girardot, C., Käsper, E.-L., Kozlova, A., Kishi, K., Chiaradia, I., *et al.* (2018). Haploinsufficiency of the intellectual disability gene SETD5 disturbs developmental gene expression and cognition. *Nature Neuroscience* 21, 1717-1727.
- Di Lorenzo, A., and Bedford, M.T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS letters* 585, 2024-2031.
- Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C., and Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome biology* 6, 227.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376-380.
- Dundr, M. (2012). Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome. *Current opinion in cell biology* 24, 415-422.

- Dunham, I., Birney, E., Lajoie, B.R., Sanyal, A., Dong, X., Greven, M., Lin, X., Wang, J., Whitfield, T.W., and Zhuang, J. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.
- Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137, 485-497.
- Elgin, S.C.R. (1996). Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development* 6, 193-202.
- Fang, R., Barbera, A.J., Xu, Y., Rutenberg, M., Leonor, T., Bi, Q., Lan, F., Mei, P., Yuan, G.-C., and Lian, C. (2010). Human LSD2/KDM1b/AOF1 regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation. *Molecular cell* 39, 222-233.
- Fazekas de St Groth, S., Webster, R.G., and Datyner, A. (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 71, 377-391.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Current Biology* 12, 1052-1058.
- Fernandes, I.R., Cruz, A.C.P., Ferrasa, A., Phan, D., Herai, R.H., and Muotri, A.R. (2018). Genetic variations on SETD5 underlying autistic conditions. *Dev Neurobiol* 78, 500-518.
- Fields, C., Adams, M.D., White, O., and Venter, J.C. (1994). How many genes in the human genome? *Nature genetics* 7, 345-346.
- Finlan, L.E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J.R., and Bickmore, W.A. (2008). Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet* 4, e1000039.
- Flemming, W. (1879). Beitrage zur Kenntniss der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 16, 302-436.
- Frederiks, F., Tzouros, M., Oudgenoeg, G., van Welsem, T., Fornerod, M., Krijgsveld, J., and van Leeuwen, F. (2008). Nonprocessive methylation by Dot1 leads to functional redundancy of histone H3K79 methylation states. *Nature structural & molecular biology* 15, 550-557.
- Gangaraju, V.K., and Bartholomew, B. (2007). Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 618, 3-17.
- Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Kauer, M., Morris, S.A., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2006). Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *Journal of Biological Chemistry*.

Literaturverzeichnis

- Gershey, E.L., Haslett, G.W., Vidali, G., and Allfrey, V.G. (1969). Chemical studies of histone methylation. Evidence for the occurrence of 3-methylhistidine in avian erythrocyte histone fractions. *J Biol Chem* 244, 4871-4877.
- Gévry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A. *Z. Genes & development* 21, 1869-1881.
- Gey, G. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12, 264-265.
- Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 10, 94-108.
- Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35-46.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene* 27, 113-159.
- Grozeva, D., Carss, K., Spasic-Boskovic, O., Parker, M.J., Archer, H., Firth, H.V., Park, S.M., Canham, N., Holder, S.E., Wilson, M., *et al.* (2014). De novo loss-of-function mutations in SETD5, encoding a methyltransferase in a 3p25 microdeletion syndrome critical region, cause intellectual disability. *Am J Hum Genet* 94, 618-624.
- Gurley, L.R., Prentice, D.A., Valdez, J.G., and Spall, W.D. (1983). High-performance liquid chromatography of chromatin histones. *Journal of chromatography* 266, 609-627.
- Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A.Y., Eck, S., Wörz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J.-P., and Maiser, A. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes & development* 27, 859-872.
- Haig, D. (2004). The (dual) origin of epigenetics. Paper presented at: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hake, S.B., and Allis, C.D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6428-6435.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Duncan, E.M., Kauer, M., Dellaire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D., and Hunt, D.F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* 281, 559-568.
- Han, J., Zhou, H., Horazdovsky, B., Zhang, K., Xu, R.-M., and Zhang, Z. (2007). Rtt109 Acetylates Histone H3 Lysine 56 and Functions in DNA Replication. *Science* 315, 653-655.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R. (1991). [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. In *Methods in enzymology* (Elsevier), pp. 63-113.
- Handwerger, K.E., and Gall, J.G. (2006). Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends in Cell Biology* 16, 19-26.

Literaturverzeichnis

- Harris, M.E., Böhni, R., Schneiderman, M.H., Ramamurthy, L., Schümperli, D., and Marzluff, W.F. (1991). Regulation of histone mRNA in the unperturbed cell cycle: evidence suggesting control at two posttranscriptional steps. *Molecular and cellular biology* 11, 2416-2424.
- He, F., Umehara, T., Saito, K., Harada, T., Watanabe, S., Yabuki, T., Kigawa, T., Takahashi, M., Kuwasako, K., and Tsuda, K. (2010). Structural insight into the zinc finger CW domain as a histone modification reader. *Structure* 18, 1127-1139.
- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., and Ching, K.A. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics* 39, 311-318.
- Herz, H.-M., Garruss, A., and Shilatifard, A. (2013). SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 621-639.
- Hofvander, J., Tayebwa, J., Nilsson, J., Magnusson, L., Brosjö, O., Larsson, O., Vult von Steyern, F., Mandahl, N., Fletcher, C.D., and Mertens, F. (2015). Recurrent PRDM10 gene fusions in undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Clin Cancer Res* 21, 864-869.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Pat Cerretti, D., Urdal, D.L., and Conlon, P.J. (1988). A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/Technology* 6, 1204-1210.
- Hou, P., Huang, C., Liu, C.P., Yang, N., Yu, T., Yin, Y., Zhu, B., and Xu, R.M. (2019). Structural Insights into Stimulation of Ash1L's H3K36 Methyltransferase Activity through Mrg15 Binding. *Structure* 27, 837-845.e833.
- Huisinga, K.L., Brower-Toland, B., and Elgin, S.C. (2006). The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 115, 110-122.
- Hutchison, C.A., Phillips, S., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, P., and Smith, M. (1978). Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry* 253, 6551-6560.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300-1303.
- Jack, A.P., Bussemer, S., Hahn, M., Punzeler, S., Snyder, M., Wells, M., Csankovszki, G., Solovei, I., Schotta, G., and Hake, S.B. (2013a). H3K56me3 is a novel, conserved heterochromatic mark that largely but not completely overlaps with H3K9me3 in both regulation and localization. *PLoS One* 8, e51765.
- Jack, A.P., Bussemer, S., Hahn, M., Pünzeler, S., Snyder, M., Wells, M., Csankovszki, G., Solovei, I., Schotta, G., and Hake, S.B. (2013b). H3K56me3 Is a Novel, Conserved Heterochromatic Mark That Largely but Not Completely Overlaps with H3K9me3 in Both Regulation and Localization. *PLoS one* 8, e51765.

Literaturverzeichnis

- Jack, A.P., and Hake, S.B. (2014). Getting down to the core of histone modifications. *Chromosoma* 123, 355-371.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* 442, 312-316.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929-930.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J., and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of cell science* 116, 2117-2124.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Laskey, R., Honda, B., Mills, A., and Finch, J. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420.
- Latchman, D.S. (1997). Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29, 1305-1312.
- Lee, J.-H., and Skalnik, D.G. (2005). CpG-binding Protein (CXXC Finger Protein 1) Is a Component of the Mammalian Set1 Histone H3-Lys4Methyltransferase Complex, the Analogue of the Yeast Set1/COMPASS Complex. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41725-41731.
- Lee, J.-S., Smith, E., and Shilatifard, A. (2010). The language of histone crosstalk. *Cell* 142, 682-685.
- Lee, S.-B., Jasencakova, Z., and Groth, A. (2012). H3K56me1 Marks a Spot for PCNA. *Molecular Cell* 46, 1-2.
- LePecq, J.-B., and Paoletti, C. (1967). A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical—chemical characterization. *Journal of molecular biology* 27, 87-106.
- Li, G., and Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* 21, 175-186.

Literaturverzeichnis

- Liang, F., Holt, I., Pertea, G., Karamycheva, S., Salzberg, S.L., and Quackenbush, J. (2000). Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nature genetics* 25, 239-240.
- Lio, C.-W.J., Yue, X., López-Moyado, I.F., Tahiliani, M., Aravind, L., and Rao, A. (2020). TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research. *Journal of Biosciences* 45, 21.
- Long, M., Sun, X., Shi, W., Yanru, A., Leung, S.T.C., Ding, D., Cheema, M.S., MacPherson, N., Nelson, C.J., Ausio, J., *et al.* (2019). A novel histone H4 variant H4G regulates rDNA transcription in breast cancer. *Nucleic Acids Research* 47, 8399-8409.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Lund, E., Oldenburg, A.R., Delbarre, E., Freberg, C.T., Duband-Goulet, I., Eskeland, R., Buendia, B., and Collas, P. (2013). Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes. *Genome research* 23, 1580-1589.
- Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M. (2010). Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Current opinion in cell biology* 22, 291-297.
- Mani, S.R., and Juliano, C.E. (2013). Untangling the Web: The Diverse Functions of the PIWI/piRNA Pathway. *Molecular reproduction and development* 80, 632-664.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury Iii, W.J., Voigt, P., Martin, S.R., Taylor, W.R., and De Marco, V. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461, 762-767.
- Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., and Maltais, L.J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* 80, 487-498.
- Masters, J.R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2, 315-319.
- Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C.P. (2003). The Tudor domain 'Royal Family': tudor, plant agenet, chromo, PWWP and MBT domains. *Trends in biochemical sciences* 28, 69-74.
- McGhee, J.D., and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annual review of biochemistry* 49, 1115-1156.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Mellor, J. (2006). It Takes a PHD to Read the Histone Code. *Cell* 126, 22-24.
- Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brunn* 4: 3 44.
- Miescher-Rüsch, F. (1871). Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen, Vol 4.

Literaturverzeichnis

- Miller, A., Yang, B., Foster, T., and Kirchmaier, A.L. (2008). Proliferating cell nuclear antigen and ASF1 modulate silent chromatin in *Saccharomyces cerevisiae* via lysine 56 on histone H3. *Genetics* 179, 793-809.
- Moindrot, B., and Brockdorff, N. RNA binding proteins implicated in Xist-mediated chromosome silencing. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Murray, K. (1964). The occurrence of ϵ -N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* 3, 10-15.
- Musselman, C.A., Lalonde, M.-E., Côté, J., and Kutateladze, T.G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature structural & molecular biology* 19, 1218-1227.
- Nakagawa, T., Hattori, S., Nobuta, R., Kimura, R., Nakagawa, M., Matsumoto, M., Nagasawa, Y., Funayama, R., Miyakawa, T., Inada, T., *et al.* (2020). The Autism-Related Protein SETD5 Controls Neural Cell Proliferation through Epigenetic Regulation of rDNA Expression. *iScience* 23, 101030.
- Nirenberg, M.W., and Matthaei, J.H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides
Proceedings of the National Academy of Sciences 47, 1588-1602.
- Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-332.
- Peacock, A.C., and Dingman, C.W. (1968). Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* 7, 668-674.
- Pombo, A., and Dillon, N. (2015). Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* 16, 245-257.
- Rao, R.C., and Dou, Y. (2015). Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer* 15, 334-346.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., and Allis, C.D. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Reddy, K., Zullo, J., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452, 243-247.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-3120.
- Rinn, J.L. (2014). lncRNAs: linking RNA to chromatin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6, a018614.

- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (Springer), pp. 365-386.
- Rufiange, A., Jacques, P.-É., Bhat, W., Robert, F., and Nourani, A. (2007). Genome-Wide Replication-Independent Histone H3 Exchange Occurs Predominantly at Promoters and Implicates H3 K56 Acetylation and Asf1. *Molecular Cell* 27, 393-405.
- Sadic, D. (2014). Regulation of heterochromatic gene silencing in mouse (Imu).
- Sanger, F., and Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94, 441-448.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.
- Scacheri, P.C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N.J., Wolfsberg, T.G., Umayam, L., Lee, J.C., Hughes, C.M., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., *et al.* (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1892-1897.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.-M., and Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 473-483.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., and Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols* 2, 1445-1457.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., and Casero, R.A. (2004a). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004b). Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shimko, J.C., North, J.A., Bruns, A.N., Poirier, M.G., and Ottesen, J.J. (2011). Preparation of fully synthetic histone H3 reveals that acetyl-lysine 56 facilitates protein binding within nucleosomes. *Journal of molecular biology* 408, 187-204.
- Shimomura, O. (1979). Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS letters* 104, 220-222.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 490-501.

- Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9, 465-476.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., and Shinkai, Y. (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *Journal of Biological Chemistry* 276, 25309-25317.
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T., and Shinkai, Y. (2005). Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19, 815-826.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., and Aravind, L. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 264-275.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology* 14, 1025-1040.
- Tessarz, P., and Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 703-708.
- Towbin, B.D., González-Aguilera, C., Sack, R., Gaidatzis, D., Kalck, V., Meister, P., Askjaer, P., and Gasser, S.M. (2012). Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery. *Cell* 150, 934-947.
- Tsukada, Y.-i., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.
- Tucci, V., Isles, A.R., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A.C., Bartolomei, M.S., Benvenisty, N., Bourc'his, D., Charalambous, M., Dulac, C., and Feil, R. (2019). Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell* 176, 952-965.
- Ueda, J., Tachibana, M., Ikura, T., and Shinkai, Y. (2006). Zinc finger protein Wiz links G9a/GLP histone methyltransferases to the co-repressor molecule CtBP. *Journal of Biological Chemistry* 281, 20120-20128.
- Van Steensel, B., and Belmont, A.S. (2017). Lamina-associated domains: links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell* 169, 780-791.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* 67, 721-751.
- Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell* 43, 904-914.

Literaturverzeichnis

- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Weber, A.R., Krawczyk, C., Robertson, A.B., Kuśnierczyk, A., Vågbø, C.B., Schuermann, D., Klungland, A., and Schär, P. (2016). Biochemical reconstitution of TET1–TDG–BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nature communications* 7, 1-13.
- Williams, S.K., Truong, D., and Tyler, J.K. (2008). Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 9000-9005.
- Wong, M.M., Cox, L.K., and Chrivia, J.C. (2007). The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A. Z at promoters. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26132-26139.
- Xie, W., Song, C., Young, N.L., Sperling, A.S., Xu, F., Sridharan, R., Conway, A.E., Garcia, B.A., Plath, K., Clark, A.T., *et al.* (2009). Histone h3 lysine 56 acetylation is linked to the core transcriptional network in human embryonic stem cells. *Mol Cell* 33, 417-427.
- Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2005). Acetylation in Histone H3 Globular Domain Regulates Gene Expression in Yeast. *Cell* 121, 375-385.
- Yan, M.S.-C., Matouk, C.C., and Marsden, P.A. (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of applied physiology* 109, 916-926.
- Ye, S., Ding, Y.F., Jia, W.H., Liu, X.L., Feng, J.Y., Zhu, Q., Cai, S.L., Yang, Y.S., Lu, Q.Y., Huang, X.T., *et al.* (2019). SET Domain-Containing Protein 4 Epigenetically Controls Breast Cancer Stem Cell Quiescence. *Cancer Res* 79, 4729-4743.
- Yu, Y., Song, C., Zhang, Q., DiMaggio, P.A., Garcia, B.A., York, A., Carey, M.F., and Grunstein, M. (2012). Histone H3 lysine 56 methylation regulates DNA replication through its interaction with PCNA. *Mol Cell* 46, 7-17.
- Yuan, J., Pu, M., Zhang, Z., and Lou, Z. (2009). Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle* 8, 1747-1753.
- Zhao, Y., and Garcia, B.A. (2015). Comprehensive catalog of currently documented histone modifications. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, a025064.
- Zhong, Y., Ye, P., Mei, Z., Huang, S., Huang, M., Li, Y., Niu, S., Zhao, S., Cai, J., Wang, J., *et al.* (2019). The novel methyltransferase SETD4 regulates TLR agonist-induced expression of cytokines through methylation of lysine 4 at histone 3 in macrophages. *Mol Immunol* 114, 179-188.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., *et al.* (2008). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4, 495-504.
- Zhu, L., and Brangwynne, C.P. (2015). Nuclear bodies: the emerging biophysics of nucleoplasmic phases. *Current opinion in cell biology* 34, 23-30.

Danksagung

Mein erster Dank geht an Frau Prof. Dr. Sandra B. Hake und Herrn Prof. Dr. Peter B. Becker für die Überlassung des Themas und ihre Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Beide verkörpern für mich das wissenschaftliche Ideal verbunden mit menschlicher Größe in herausragender Weise und es war mir eine Ehre und ein Vergnügen bei ihnen promovieren zu dürfen. Meiner direkten Betreuerin Frau Prof. Dr. Sandra B. Hake möchte ich darüber hinaus noch ausdrücklich für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft, unerschöpfliche Geduld und herzerwärmende Freundlichkeit danken. Ich hätte mir keine bessere Unterstützung wünschen können.

Ich danke darüber hinaus allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Molekularbiologie des Adolf-Butenandt-Instituts, mit denen ich in dieser Zeit zusammenarbeiten durfte und die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau Dr. Antonia Jack, welche mich in die Grundlagen der Laborarbeit eingeführt hat und auf deren Vorarbeiten meine Experimente aufbauen durften. Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Hake“, insbesondere Frau Dr. Sonja Wiedemann und Herrn Dr. Clemens Bönisch, möchte ich meinen Dank aussprechen für die freundliche Unterstützung und großzügige Überlassung von Forschungsmaterialien.

Zudem danke ich den Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima, namentlich Prof. Dr. Gunnar Schotta, Dr. Silvia Dambacher und Dr. Denis Sadic für konstruktive Anregungen und die Überlassung von Zellen zur weiteren Untersuchung. Auch dem „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ der Ludwig-Maximilians-Universität München gilt mein Dank, für die großzügige ideelle und finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit.

Last not least danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Mutter *Rosemarie* für die Bildung, meinem Vater *Zafer* für die Möglichkeit Medizin studieren zu können, meinem Onkel *Ayhan* fürs immer da sein, meiner Verlobten *Sarah* für ihre liebevolle Nachsicht, meinen Geschwistern *Ravşan*, *Rabia*, *Valentin* und *Valeska* für die familiäre Verbundenheit und nochmals meiner Mutter *Rosemarie* sowie meinem Freund *Thomas* für das Korrekturlesen dieser Arbeit. -Verbleibende Fehler bitte ich den beiden Letztgenannten zu melden.

Die nächste Seite bestätigt, dass bei der Erstellung auf keine *unerlaubte* Hilfe zurückgegriffen wurde. Aber ohne die hier Genannten und viele mehr, wäre mir die Anfertigung dieser Arbeit nicht gelungen. Ihnen allen gilt mein herzlichster Dank!

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Kunisch, Raphael Barış Sami

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung von Methyltransferasen des Histon H3 Lysins 56

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.

München, 30.03.2022

Ort, Datum

Raphael Kunisch

Unterschrift Doktorand