

**Aus dem Adolf-Butenandt-Institut für Biochemie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Peter B. Becker**

**DIE SUCHE NACH INHIBITOREN DER  
HISTONMETHYLTRANSFERASE SU(VAR)3-9  
AUS *DROSOPHILA MELANOGASTER***

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

**vorgelegt von  
Dorothea Elisabeth Greiner  
aus  
Heilbronn**

**2008**

# **Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Axel Imhof

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Robert Kammerer  
Priv. Doz. Dr. Elke Holinski-Feder

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Herr Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2008

**Für meine Eltern und Großeltern**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DIE ORGANISATION DER DNA IM ZELLKERN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>WAS IST EPIGENETIK? .....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Heterochromatin und Euchromatin .....	6
1.2.2	Histonmodifikationen .....	9
1.2.2.1	Methylierung .....	10
1.2.2.2	SU(VAR)3-9 .....	19
1.2.2.3	Acetylierung .....	22
1.2.3	DNA-Methylierung .....	24
1.2.4	Imprinting .....	25
1.2.5	Epigenetisches Zusammenspiel: Ein Histon-Code? .....	26
<b>1.3</b>	<b>EPIGENETIK IM KONTEXT MENSCHLICHER ERKRANKUNGEN.....</b>	<b>29</b>
1.3.1	Pränatale Periode .....	29
1.3.2	Immunsystem und Autoimmunerkrankungen .....	30
1.3.3	Neurologie und Neuropsychiatrie .....	31
<b>1.4</b>	<b>ROLLE DER EPIGENETIK IN DER KANZEROGENESE .....</b>	<b>34</b>
1.4.1	DNA-Methylierung in Tumoren .....	35
1.4.2	Histonacetylierung in Tumoren .....	36
1.4.3	Die Bedeutung von Histonmethyltransferasen .....	38
<b>1.5</b>	<b>MODULATOREN DER EPIGENETIK: EPIGENETISCHE THERAPEUTIKA? .....</b>	<b>44</b>
1.5.1	DNA-Methyltransferase-Inhibitoren .....	44
1.5.2	Histondeacetylase-Inhibitoren .....	46
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>48</b>
3.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	48
3.1.2	Chemikalien und Enzyme .....	49
3.1.3	Naturstoff-Bibliothek .....	49
3.1.4	Medien .....	50
3.1.5	Verwendete Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien.....	50
3.1.6	Verwendete Fliegenstämme .....	51
3.1.7	DNA-Konstrukte .....	52

3.1.8	Antikörper.....	53
3.1.9	Geräte .....	53
<b>3.2</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Arbeiten mit Proteinen.....	55
3.2.1.1	Protein-Analyse mittels SDS-PAGE .....	55
3.2.1.2	Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau.....	56
3.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	57
3.2.2	Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	57
3.2.3	Expression von Histonmethyltransferasen in BL-21 .....	58
3.2.3.1	His-tag .....	58
3.2.3.2	Intein-tag.....	60
3.2.3.3	GST-tag .....	61
3.2.4	HIM-Assay/HMT-Assay .....	63
3.2.4.1	„Spot-and-count“-Methode .....	63
3.2.4.2	Autoradiographische Methode .....	65
3.2.4.3	Massenspektrometrische Methode .....	65
3.2.5	Zellkultur .....	66
3.2.6	Proteinexpression von E(z)-Komplex im Baculo-System.....	67
3.2.7	Behandlung von Zellen mit Chaetocin .....	69
3.2.8	Zellwachstumsassay .....	69
3.2.9	Saure Extraktion von Histonen.....	70
3.2.10	Massenspektrometrie.....	72
3.2.10.1	Propionylierung und Trypsinverdau.....	72
3.2.10.2	Peptidextraktion.....	73
3.2.10.3	Zip-Tip-Präparation.....	73
3.2.11	Western Blot.....	75
3.2.12	Fliegenhaltung .....	77
3.2.13	Behandlung von Fliegen mit Chaetocin .....	77
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>MODULATOREN DER HISTONMETHYLTRANSFERASE SU(VAR)3-9.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>WIRKUNG VON CHAETOCIN AUF VERSCHIEDENE HISTONMETHYLTRANSFERASEN <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>84</b>

4.2.1	Chaetocin hemmt <i>Drosophila melanogaster</i> SU(VAR)3-9 delta 213 und Wildtyp .....	84
4.2.2	Chaetocin hemmt SU(VAR)3-9 kompetitiv .....	87
4.2.3	Chaetocin hemmt auch nach Spaltung seiner Disulfidbrücken SU(VAR)3-9 .....	90
4.2.4	Das menschliche SU(VAR)3-9-Ortholog SUV39H1 wird durch Chaetocin gehemmt.....	92
4.2.5	Wirkung von Chaetocin auf die nicht für Histon H3 Lysin 9 spezifischen Methyltransferasen E(z)-Komplex, PR-SET7 und SET7/9 .....	94
4.2.6	Chaetocin hemmt G9a und DIM-5 erst in höheren Konzentrationen .....	96
<b>4.3</b>	<b>WIRKUNG VON CHAETOCIN IN VIVO.....</b>	<b>98</b>
4.3.1	Zelldichteabhängige Toxizität von Chaetocin .....	98
4.3.2	Effekte von Chaetocin auf Histonmodifikationen .....	100
4.3.3	Effekte von Chaetocin auf <i>Drosophila melanogaster</i> Fliegen.....	105
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>107</b>
<b>5.1</b>	<b>DISKUSSION DER METHODEN.....</b>	<b>107</b>
5.1.1	Screening der Naturstoffbibliothek.....	107
5.1.2	<i>Spot and Count Assay</i> verschiedener Histonmethyltransferasen mit Chaetocin..	110
5.1.3	In vivo Testung von Chaetocin an SL2-Zellen .....	111
<b>5.2</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>112</b>
5.2.1	Modulatoren von SU(VAR)3-9 .....	112
5.2.2	Spezifität von Chaetocin: Hemmung von SU(VAR)3-9 oder Hemmung der Methylierung von Histon H3-K9? .....	114
5.2.3	Kompetitive Hemmung von SU(VAR)3-9 durch Chaetocin .....	116
5.2.4	Zelldichteabhängige Toxizität von Chaetocin .....	119
5.2.5	Effekte von Chaetocin auf die Methylierung von Histon H3 .....	120
<b>5.3</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>121</b>
5.3.1	Effekte von Chaetocin auf <i>Drosophila melanogaster</i> $ln(1)w^{m4}/Su(var)3-9/+$ .....	121
5.3.2	Die Bedeutung von Chaetocin als wissenschaftliches Hilfsmittel oder zukünftiges Medikament.....	122
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>

**8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... 155**

**9 DANKSAGUNG ..... 157**

**10 ANHANG ..... 159**

**PUBLIKATION**

**CURRICULUM VITAE**





# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DIE ORGANISATION DER DNA IM ZELLKERN

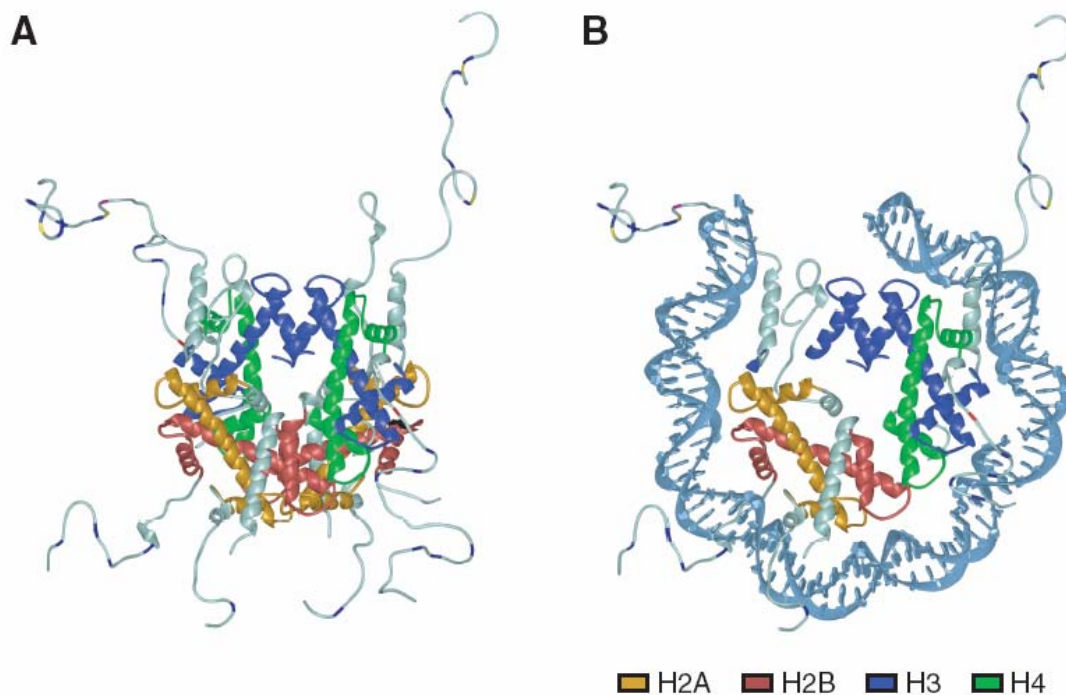
Die Länge der genomischen DNA ist in jedem höheren Organismus um ein Vielfaches größer als der Zelldurchmesser. So ist z.B. die menschliche DNA eines haploiden Chromosomensatzes fast 94 cm lang ( $2,75 \cdot 10^9$  Basenpaare), das ist fast zehn Millionen Mal der Durchmesser einer durchschnittlichen menschlichen Zelle. Deshalb muss die DNA gut verpackt werden. In eukaryoten Zellen geschieht dies mittels einer Struktur, die als Chromatin bezeichnet wird (Vaquero et al., 2003).

Chromatin setzt sich aus Nucleosomen zusammen. Ein Nucleosom besteht aus etwa 145 bis 147 Basenpaaren DNA, die 1,75 Mal um ein Histonoktamer gewickelt sind. Es hat einen Durchmesser von etwa 12,4 bis 13 nm (Khorasanizadeh, 2004) und ist zusammengebaut aus jeweils zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4, wobei ein H3/H4-Tetramer im Kern liegt und mit zwei H2A-H2B-Dimeren interagiert (Abbildung 1-1).

Histon H1, ein sogenanntes „Linker-Histon“, befindet sich zwischen zwei Nucleosomen und dient v.a. der Stabilisierung höher geordneter Chromatinstrukturen (Marmorstein, 2001).

Jedes der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 hat zwei Domänen: Einen globulären, helikal gewundenen Carboxyterminus, der etwa 75% der Aminosäuresequenz ausmacht, und einen N-Terminus, der aus dem Nucleosomenkernpartikel herausragt. Am C-Terminus spielen sich v.a. die Histon-Histon-Interaktionen ab. Die N-terminalen Enden (etwa 15 bis 30 v.a. basische Aminosäuren) können durch verschiedene Enzyme modifiziert werden.

Die Zusammenlagerung der Histone und die Umwicklung mit DNA erfolgt in der Mehrzahl der Fälle während der S-Phase des Zellzyklus. Dabei sorgen Chaperone dafür, dass die Histon-H3/H4-Tetramere als erstes auf die DNA gesetzt werden. Es folgt die schnelle Assoziation von zwei Histon-H2A/H2B-Dimeren mit den Tetrameren, wiederum Chaperonvermittelt. Im letzten Schritt wird dann die DNA um die Histone gewickelt (Ladoux et al., 2000; Nakagawa et al., 2001). Daneben gibt es auch noch eine weniger häufige, von der Replikation unabhängige Nucleosomenzusammenlagerung, die wohl v.a. während der Transkription und im Rahmen der DNA-Reparatur auftritt (Martini et al., 1998; Verreault, 2000).



**Abbildung 1-1: Die Struktur des Nucleosomenkernpartikels (Vaquero *et al.*, 2003).**

**(A) Histonoktamer.**

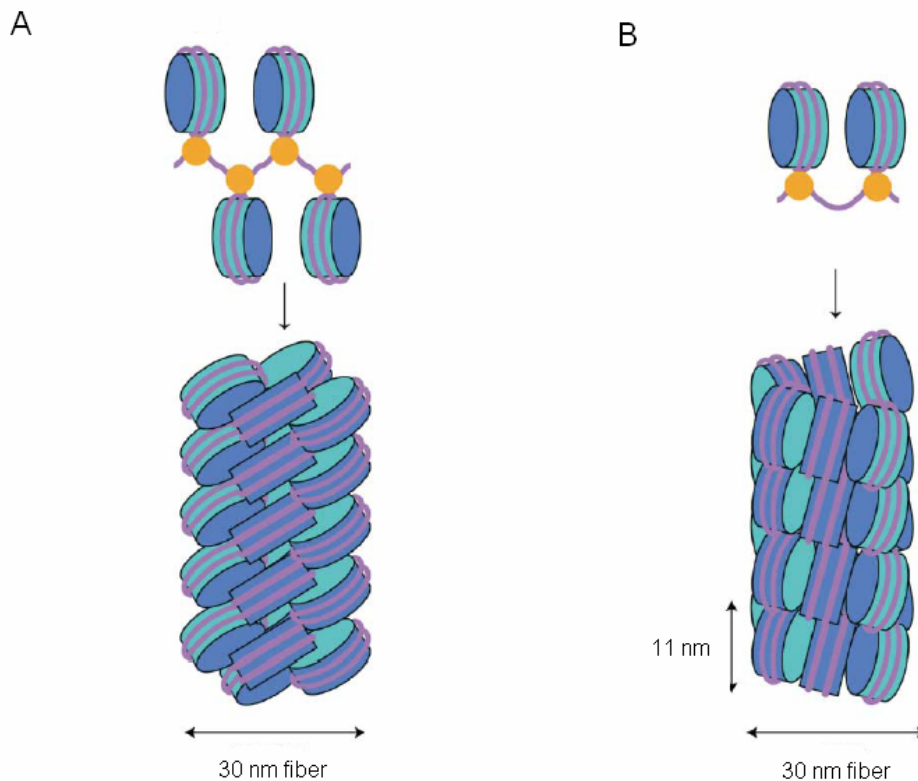
Histonoktamerstruktur, wie sie aus kristallographischen Studien des Nucleosomenkernpartikels ermittelt wurde. Im Zentrum aller vier Histone befindet sich ein Strukturmotiv, das als Histon-fold-Domäne bezeichnet wird und aus 3 Alpha-Helices besteht, die durch 2 Loops verbunden werden. Die Histon-fold-Domänen sind in verschiedenen Farben hervorgehoben (H2A: gelb, H2B: rot, H3: blau, H4: grün). Der Rest des Proteins ist hellblau koloriert.

**(B) Nucleosomenkernpartikel.**

Abgebildet sind DNA (73 Basenpaare) und jeweils eine Kopie jedes Kernhistons, was zusammen der Hälfte eines Nucleosomenkernpartikels entspricht. Die DNA ist hellblau koloriert. DNA und Histone interagieren v.a. über das DNA-Phosphodiester-Rückgrat und die paarigen Histon-folds. Der N-Terminus der Histone ragt aus dem Nucleosomenkernpartikel hervor.

Mehrere Nucleosomen bilden miteinander eine Struktur, die als „11-nm-Fiber“ oder im Englischen als „beads on a string“ bezeichnet wird. Dadurch wird eine Kompaktierung der DNA um den Faktor 7 erreicht. Die nächsthöhere Organisationsstufe ist die „30-nm-Fiber“, sie führt zu einer weiteren Verdichtung um den Faktor 6. Abbildung 1-2 zeigt zwei verschiedene Konzepte, die in verschiedensten Experimenten entwickelt wurden: das Zick-Zack- (Schalch *et al.*, 2005; Woodcock and Dimitrov, 2001) und das in früheren Studien entwickelte Solenoid-Modell (Thoma *et al.*, 1979; Widom and Klug, 1985). Biochemische und elektronenmikroskopische Studien favorisieren das Zick-Zack-Modell (Bednar *et al.*,

1998). Für die „30-nm-Fiber“ sind zum einen die N-terminalen Enden der Histone notwendig, da ihre basischen Aminosäuren die negative DNA-Ladung neutralisieren und deshalb eine bessere Zusammenlagerung ermöglichen (Hansen, 2002). Außerdem befindet sich das Linker-Histon H1 an der Stelle eines jeden Nucleosoms, an der Beginn und Ende der DNA-Wicklung einander kreuzen (Hansen, 2002). Es scheint eine Bedeutung in der Modulation der Chromatinstruktur zu haben und wichtig für höher geordnete Chromatinstrukturen zu sein.



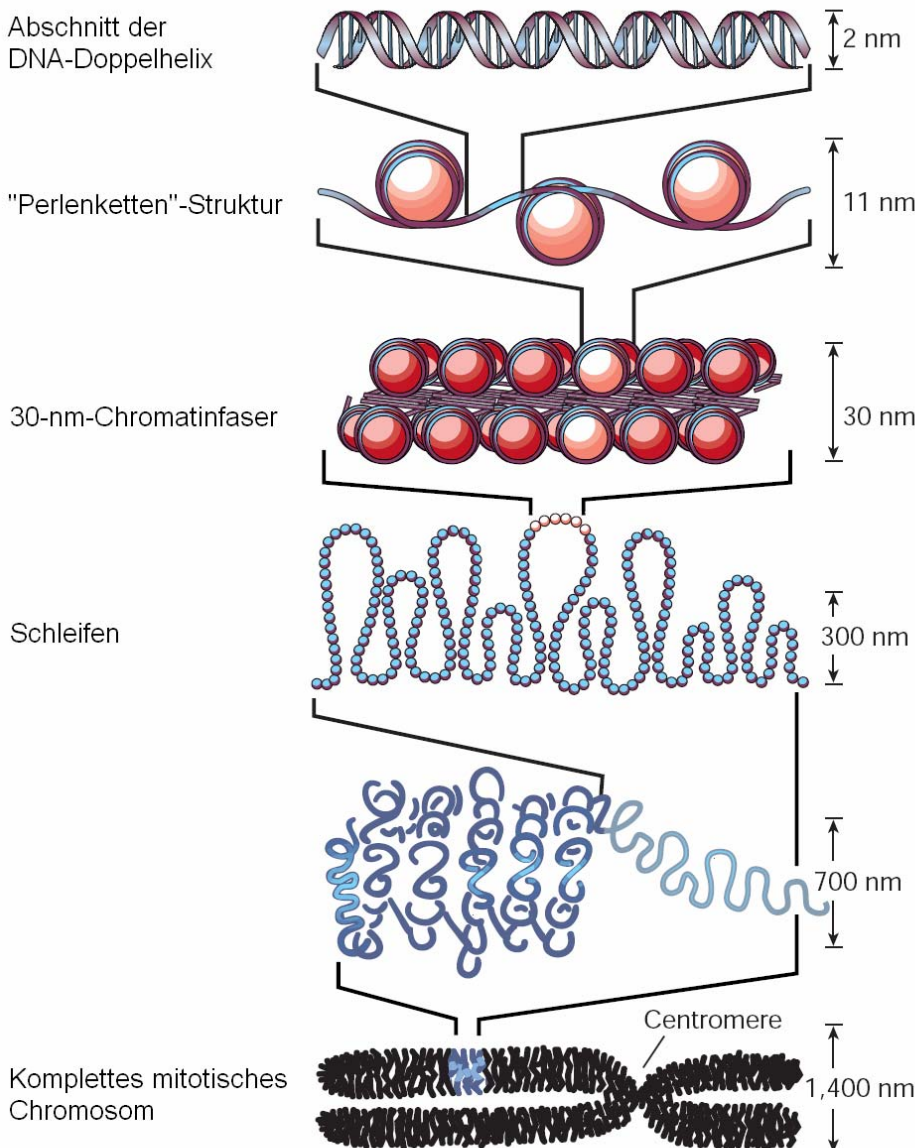
**Abbildung 1-2: Schema der „30-nm-Fiber“ im Zick-Zack- und im Solenoid-Modell.**

Histonoktamere sind blau, die DNA lila dargestellt. Linker-Histon H1 ist gelb koloriert.

(A) Zick-Zack-Modell

(B) Solenoid-Modell

Wenn sich die Chromosomen in der Mitose 200 bis 500fach kompaktieren, sind noch höhere Organisationsstufen als die „30-nm-Fiber“ vonnöten. Es wird angenommen, dass ein „Chromosomen-Gerüst“ aus DNA und/oder Protein die grobe Chromosomenform bestimmt.



**Abbildung 1-3: Verpackungsstufen der DNA (Felsenfeld and Groudine, 2003).**

DNA-Regionen, die etwa 100 kb voneinander entfernt sind, binden nebeneinander an das zentrale, longitudinal im Chromosom gelegene Gerüst und die dazwischenliegende DNA bildet Schleifen. Die DNA-Sequenzen, die an das Gerüst binden, heißen SAR (scaffold attachment regions) (Swedlow and Hirano, 2003). Da die Chromatinschleifen an ihrer Basis im Gerüst verankert sind, sind sie dementsprechend nach außen gewunden, so dass sich ein sternartiges Aussehen ergibt (Maeshima et al., 2005). An der Aufrechterhaltung des Gerüsts und der Schleifen sind die ATP-abhängigen Komponenten Topoisomerase II $\alpha$  und Condensin, die entlang einer longitudinalen Achse im Chromosom orientiert sind, beteiligt (Maeshima et al., 2005).

## 1.2 WAS IST EPIGENETIK?

Lange Zeit wurde Chromatin als eine statische Struktur angesehen, die lediglich der Verpackung der DNA diene. Viele neuere Erkenntnisse weisen aber darauf hin, dass Chromatin komplexer und dynamisch ist und in eine Vielzahl von Zellfunktionen eingreift. Mit der Entwicklung dieses neuen Modells wurde auch ein neuer Begriff geprägt: der der Epigenetik. Waddington, der den Terminus als erster verwendete, bezeichnete damit die Kausalzusammenhänge, aufgrund derer Gene des Genotyps phänotypische Effekte hervorbrächten. Nanney benutzte den Begriff Epigenetik später, um das Phänomen zu erklären, dass Zellen desselben Genotyps unterschiedliche Phänotypen haben können, die über viele Generationen bestehen bleiben (Gottschling, 2004).

Noch heute sind viele unterschiedliche Meinungen zur Begriffsdefinition vorhanden. Sie lassen sich aber zu drei Hauptdefinitionen zusammenfassen:

- (1) Epigenetik ist die Transmission und Vererbung von Information über Meiose und Mitose hinweg, die nicht auf der Sequenz der DNA basiert (Gottschling, 2004; Levenson and Sweatt, 2005; Lund and van Lohuizen, 2004).
- (2) Epigenetik bedeutet: Meiotisch und mitotisch erbliche Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind (Levenson *et al.*, 2005; Wolffe and Hayes, 1999).
- (3) Epigenetik ist der Mechanismus, der der Aufrechterhaltung einer stabilen Genexpression dient und physikalische Markierung der DNA oder ihrer assoziierten Proteine beinhaltet (Levenson *et al.*, 2005).

Die Epigenetik hat Auswirkungen auf mannigfaltige Bereiche der angewandten Wissenschaften wie Gentherapie, Klonierung, transgene Technologien, Tumorbilogie, genomisches Imprinting, die Aktivität mobiler Elemente usw. (Wolffe and Hayes, 1999).

### 1.2.1 Heterochromatin und Euchromatin

Die Organisation eukaryotischer Genome erfordert ein harmonisches Gleichgewicht zwischen effektiver Verpackung und Ablesbarkeit von Genen. Dies wird durch die Chromatinstruktur erreicht. Chromatin kann in zwei funktionell und strukturell verschiedene Kompartimente unterteilt werden: Heterochromatin und Euchromatin. Euchromatin umfasst die meisten aktiven Gene. Heterochromatin ist an der Bildung für das Chromosom essentieller Strukturen wie Zentromeren und Telomeren beteiligt (Horn and Peterson, 2006). Ursprünglich wurde es definiert als die chromosomalen Regionen, die während des Zellzyklus kondensiert bleiben (Grunstein, 1998). Beide Chromatinkompartimente unterscheiden sich strukturell durch unterschiedliche Histonmodifikationen, den Grad der DNA-Methylierung, verschiedene Histonvarianten und spezifische Enzyme für die jeweiligen Modifikationen (Gibbons, 2005). Einen Überblick über wichtige Merkmale beider Chromatinformen gibt Tabelle 1-1.

**Tabelle 1-1: Charakteristika verschiedener Chromatinformen (Elgin and Grewal, 2003).**

<b>Merkmal</b>	<b>Euchromatin</b>	<b>Heterochromatin</b>
<b>Packung in der Interphase</b>	fein verteilt	kondensiert
<b>DNA-Sequenz</b>	genreich	repetitiv (Satelliten, Abkömmlinge von Viren, Transposons), genarm
<b>Replikationszeitpunkt</b>	während der S-Phase	späte S-Phase
<b>Meiotische Rekombination</b>	Normale Frequenz	Niedrige Frequenz
<b>Charakteristische Modifikationen</b>	Histonhyperacetylierung Histon-H3-K4-Methylierung DNA-Hypomethylierung	Histonhypoacetylierung Histon-H3-K9-Methylierung DNA-Hypermethylierung
<b>Chromatinstruktur</b>	Hypersensitive Sites, irreguläre Nucleosomenlokalisierung, Zugänglichkeit für Nukleasen	Verlust der hypersensitiven Sites, regelmäßige Nucleosomenanordnung, geringe Zugänglichkeit für Nukleasen

Heterochromatin kann außerdem unterteilt werden in konstitutives/perizentrisches Heterochromatin, fakultatives Heterochromatin oder auch Sexchromatin und funktionelles Heterochromatin.

**Konstitutives/Perizentrisches Heterochromatin** liegt im Bereich der Zentromere und der Telomere vor. Die dortigen Histone sind reich an durch SU(VAR)3-9 trimethyliertem Histon H3 Lysin 9, monomethyliertem Histon H3 Lysin 27 und durch SUV4-20H1 und 2 trimethyliertem Histon H4 Lysin 20 (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003; Schotta et al., 2004). Sie sind hypoacetyliert, darüber hinaus herrschen die zentromerspezifischen Histone CENP A, B und C vor (Earnshaw and Cooke, 1989; Sugata et al., 2000). Diese Chromatinart kommt in allen Zellen gleichermaßen vor und wird auch über Replikation und Mitose hinaus aufrechterhalten (Elgin *et al.*, 2003).

**Fakultatives Heterochromatin** liegt in Regionen des Chromosoms vor, die ihre Genexpression verloren haben. Die Entscheidung, die DNA zu verpacken, ist dabei selektiv und zellspezifisch und wird klonal vererbt (Elgin *et al.*, 2003). Ein Beispiel für fakultatives Heterochromatin ist z.B. das inaktivierte X-Chromosom in Zellen weiblicher Individuen. Im Unterschied zum konstitutiven Heterochromatin dominieren hier die Dimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 und die durch EZH2 vermittelte Histon-H3-Lysin-27-Trimethylierung (Gibbons, 2005).

Abbildung 1-4 zeigt eine Übersicht des Methylierungsmusters und der spezifischen Histonmethyltransferasen der verschiedenen Chromatinkompartimente.

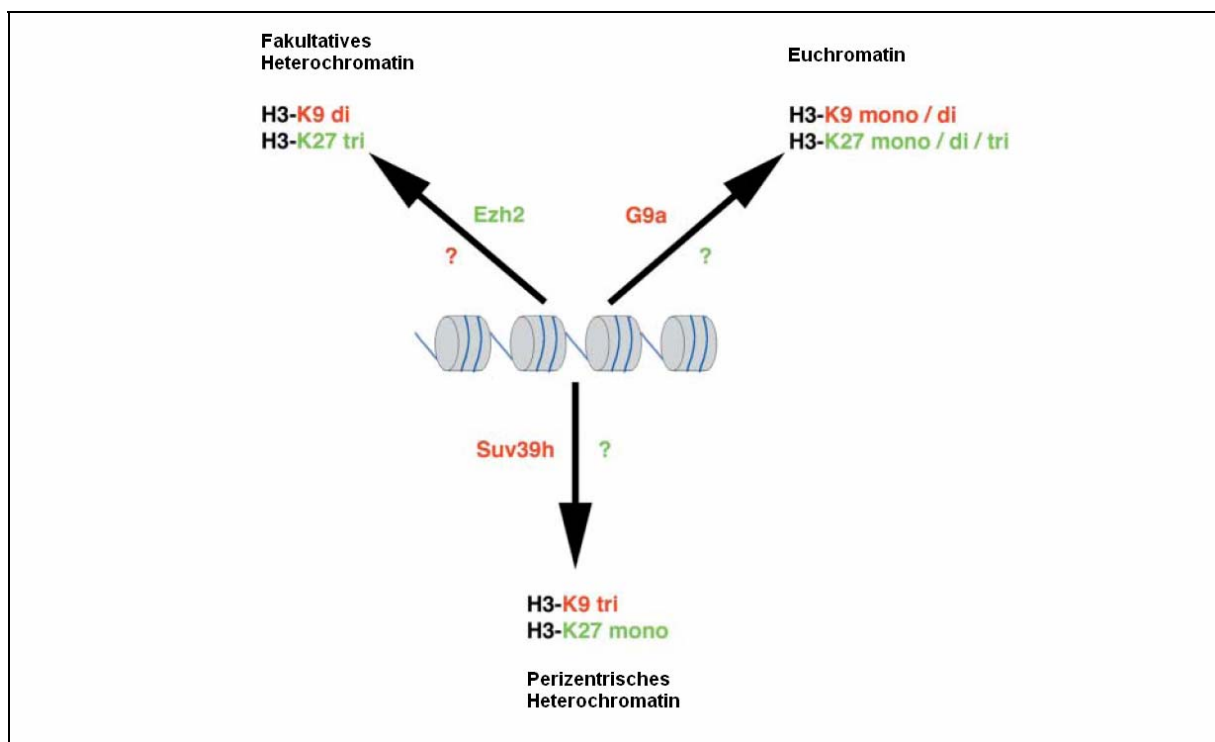


Abbildung 1-4: Methylierungsmuster der verschiedenen Chromatinkompartimente (Gibbons, 2005).

Der Prozess des Silencing von Heterochromatin wurde zuerst in Hefen, Fruchtfliegen und Pflanzen entdeckt, weist aber einen hohen Grad der Konservierung auf. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch die gleichen Prozesse und Faktoren in Säugern auftreten (Gibbons, 2005).

Bei der Heterochromatinbildung in *Schizosaccharomyces pombe* werden zunächst zentromer-nahe Repeatsequenzen durch die RNA-Polymerase II bidirektional transkribiert. Das Enzym RDRP wandelt die dabei entstehende doppelsträngige RNA in dsRNA um. Das Enzym Dicer wandelt die dsRNA in small interfering RNAs (siRNAs) um. Diese wiederum geleiten histonmodifizierende Komplexe wie RIST bzw. RISC (RNA-induzierter Silencing Komplex) zur DNA. RISC wird zum einen dafür benötigt, die Histonmethyltransferase CLR4 (SU(VAR)3-9-Homolog) zu rekrutieren. CLR4 methyliert Histon H3 an Lysin 9 und schafft so eine Bindungsstelle für SWI6 (HP1-Homolog) (Lachner et al., 2001; Martin and Zhang, 2005). Zum anderen führt RISC zum Andocken eines anderen Komplexes, RDRP, der zusätzliche Doppelstrang-RNA bildet und so den RNAi-Signalweg unterhält. Letztendlich verstärkt sich also der RNAi-Signalweg durch positives Feedback selbst (Sugiyama et al., 2005). Abbildung 1-5 zeigt den gesamten Mechanismus der siRNA-abhängigen Heterochromatinbildung.

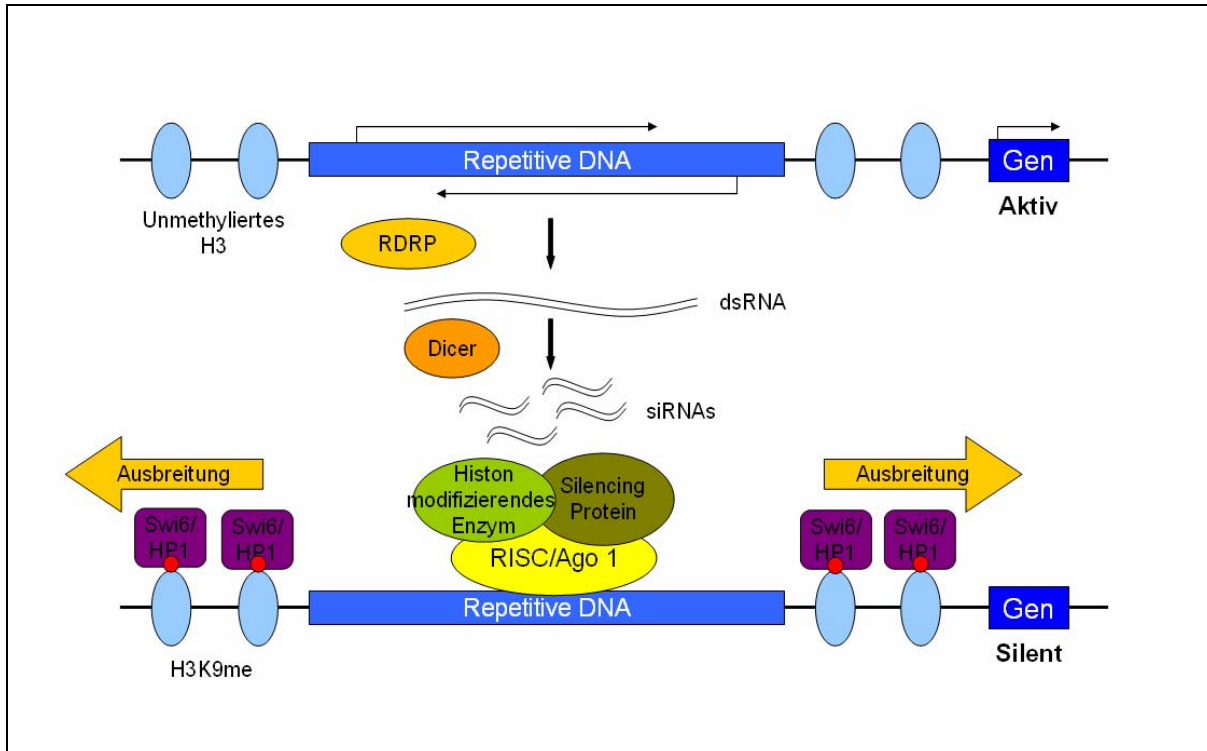


Abbildung 1-5: RNAi-Mechanismus der Heterochromatinbildung in *Schizosaccharomyces pombe*.

Heterochromatin hat verschiedene (mögliche) biologische Bedeutungen. Zunächst ist die adäquate Bildung von Heterochromatin im Bereich des Zentromers wichtig für die richtige



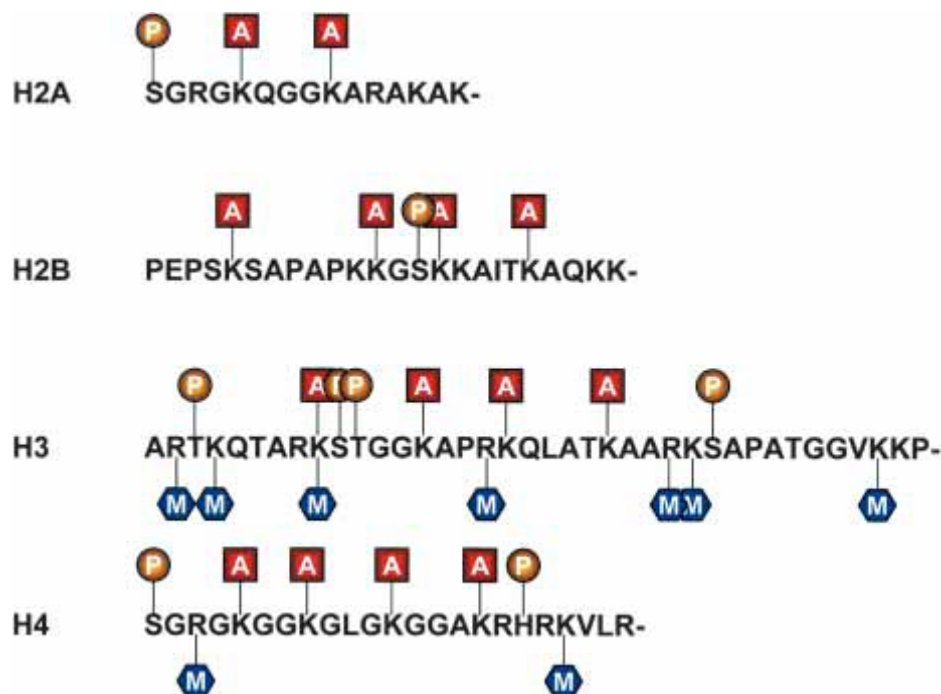
Aufteilung der Chromosomen während der Mitose (Pidoux and Allshire, 2005). Außerdem ist Heterochromatin im Rahmen von Rekombinationsereignissen, die mit dem Mating-Type-Switching in *S. pombe* assoziiert sind, wichtig (Jia et al., 2004). Eine weitere These ist eine Rolle in der Verteidigung gegen die Aktivität invasiver Retrotransposons und transposibler Elemente (Elgin *et al.*, 2003).

### 1.2.2 Histonmodifikationen

Histone können in verschiedenen Regionen posttranslational modifiziert werden. Die N-terminalen Regionen werden allerdings, wahrscheinlich weil sie aus dem Nucleosomenkern herausragen, bevorzugt.

Einige Histonmodifikationen sind: Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Ubiquitylierung, Biotinylierung und Sumoylierung.

Abbildung 1-6 zeigt einen Überblick über Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der Histone H2A, H2B, H3 und H4.



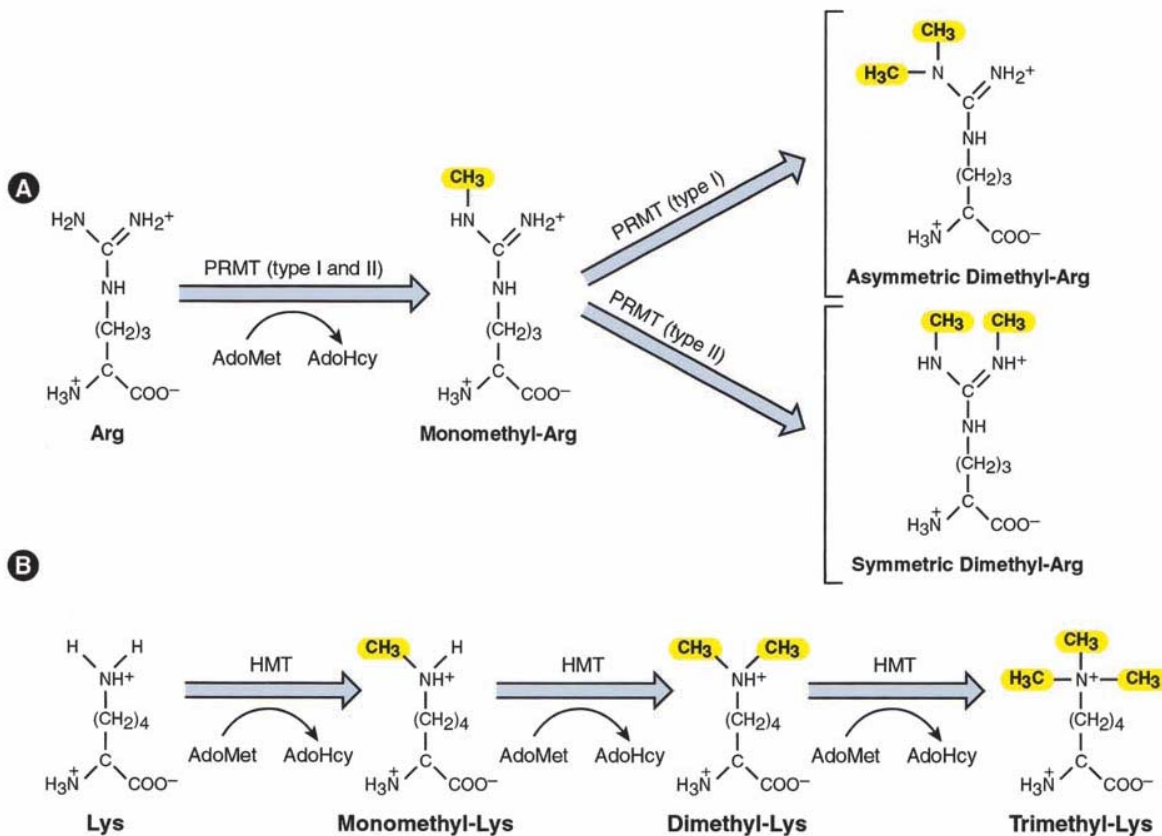
**Abbildung 1-6: Modifikationen der N-terminalen Enden der Histone H2A, H2B, H3 und H4.** Abgebildet sind Acetylierung (Quadrat, A), Methylierung (Sechseck, M) und Phosphorylierung (Kreis, P). Aus (Lund *et al.*, 2004).

### 1.2.2.1 Methylierung

Die Histonlysinmethylierung wurde schon vor 40 Jahren entdeckt (MURRAY, 1964). Allerdings war ihre Funktion lange Zeit unklar. Es dauerte auch bis zum Jahr 2000, bis das erste histonmethylierende Enzym identifiziert wurde, SUV39H1 (Rea et al., 2000).

Histonmethyltransferasen katalysieren die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf spezifische Lysin- oder Argininreste der Histone (Abbildung 1-6). Arginine werden durch die Familie der Proteinargininmethyltransferasen (PRMT) mono- oder dimethyliert, Lysinreste können durch Histonmethyltransferasen mono-, di- oder trimethyliert werden (Abbildung 1-7).

Einen Überblick über alle zur Zeit bekannten PRMTs und Histonmethyltransferasen geben Tabelle 1-2 und Tabelle 1-3. Im weiteren wird nur die Lysinmethylierung näher erklärt, da im Rahmen dieser Arbeit nur mit Lysin-methylierenden Histonmethyltransferasen experimentiert wurde.



**Abbildung 1-7: Methylierung von Arginin und Lysin (Zhang and Reinberg, 2001).**

AdoMet: S-Adenosyl-L-Methionin. AdoHcy: S-Adenosylhomocystein.

**A:** Proteinargininmethyltransferasen (PRMT) katalysieren die Methylierung von Argininresten (Arg).

**B:** Histonmethyltransferasen (HMT) katalysieren die Methylierung von Lysinresten (Lys).

**Tabelle 1-2: Proteinargininmethyltransferasen (PRMT).** Modifiziert nach (Bannister and Kouzarides, 2005; Vaquero *et al.*, 2003).

<b>HMT</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Funktion</b>
PRMT1	H4-R3 (und Nicht-Histon-Proteine)	Transkriptionsaktivierung (Signaltransduktion etc.)
PRMT2	Unbekannt	Koaktivator des Östrogenrezeptors
PRMT3	Unbekannt	Zytoplasmatisch (Mitose?)
PRMT4/CARM1	H3-R2, -R17, -R26 (Auch C-terminal)	Transkriptionskoaktivator
PRMT5	H2A, H4 ( und Nicht-Histon-Proteine), H3R8 (Bannister <i>et al.</i> , 2005)	Transkriptionsrepressor und Bildung des Spliceosoms

**Tabelle 1-3: Lysin-methylierende Histonmethyltransferasen (HMT).** Modifiziert nach (Bannister *et al.*, 2005; Lachner *et al.*, 2003; Sims, III *et al.*, 2003; Vaquero *et al.*, 2003). Hs: Homo sapiens; Mm: Mus musculus; Dm: Drosophila melanogaster; Sc: Saccharomyces cerevisiae; Sp: Schizosaccharomyces pombe; Nc: Neurospora crassa.

HMT	Spezifität	Funktion
SUV39H1 (Hs), Suv39h1 (Mm), SUV39H2 (Hs), Suv39h2 (Mm), SU(VAR)3-9 (Dm), DIM-5 (Nc), CLR4 (Sp)	H3-K9	Heterochromatinbildung, Silencing, DNA-Methylierung, perizentrisches Heterochromatin, PEV-Modifizierung
G9a (Hs, Mm), dG9a (Dm)	H3-K9, H3-K27, (H4 durch dG9a)	Rolle in der frühen Embryogenese, Transkriptionsrepression, Imprinting, euchromatische HMT
ASH1 (Dm)	H3-K4, -K9, H4-K20	Aufbau von epigenetischen aktiven Transkriptionsmustern
SET1 (Sc,Sp,Hs)	H3-K4	Silencing, Transkriptionsaktivierung
SET2 (Sc)	H3-K36	Silencing, Transkription
SET7	H4-K20	Entwicklung, Silentes Chromatin, beteiligt am Altern
PR-SET7/SET 8 (Hs, Dm)	H4-K20	Repression
SET9 (Hs)	H3-K4	Transkriptionsaktivierung
NSD1 (Hs, Mm)	H3-K36, H4-K20	
SUV4-20	H4-K20	Heterochromatin
ESC-E(z) (Dm), EZH2 (Mm)	H3-K27, H3-K9	Polycomb-vermitteltes Silencing
EZH2 (Hs)	H3-K27, H3-K9, H1-K26	Polycomb-vermitteltes Silencing
SETDB1 (Hs), ESET (Mm)	H3-K9	Durch den Korepressor KAP1 vermitteltes Silencing, DNA-Methylierung
Eu-HMTase1 (Hs)	H3-K9	Transkriptionsrepressor
ALL-1 (Hs)	H3-K4	
MLL (Hs), TRX (Dm)	H3-K4	(Trithorax-) Aktivator
ALR, ALR-1, ALR-2	H3-K4	

SMYD3 (Hs)	H3-K4	Aktivator
DOT1 (Sc), DOT1L (Hs)	H3-K79, keine SET-Domäne	

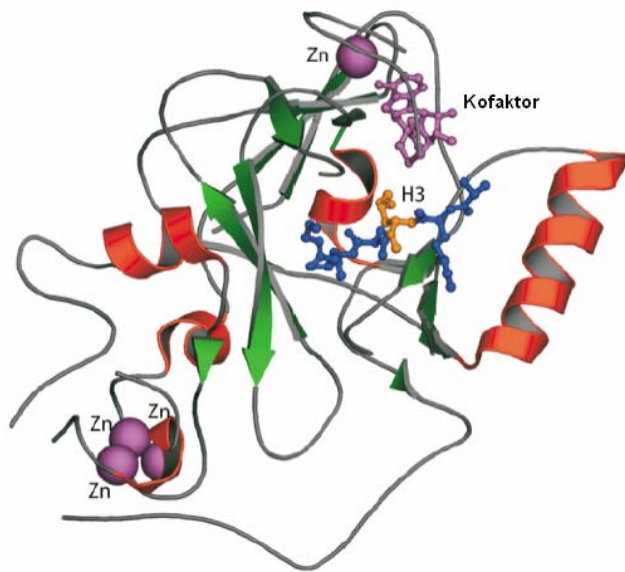
Fast alle Lysin-methylierenden Histonmethyltransferasen enthalten eine sogenannte SET-Domäne, die nach ihrem Auftreten in den Genen dreier Chromatinregulatoren **Su(var)**, **E(z)** und **Trithorax** benannt ist (Jenuwein et al., 1998). Zur Zeit ist nur ein Lysinrest bekannt, der von einer SET-losen HMT methyliert wird, H3 Lysin 79 (Feng et al., 2002).

Die **SET-Domäne** setzt sich aus etwa 130 Aminosäuren zusammen und katalysiert den Methylgruppentransfer von SAM auf das jeweilige Substrat (Rea *et al.*, 2000). Sie enthält zwei bezüglich der Primärsequenz und Struktur konservierte Bereiche, SET-N und SET-C, mit einer variablen Insertregion SET-I dazwischen. SET-C beherbergt das aktive Zentrum des Enzyms. SET-I, das erhebliche Längenunterschiede in verschiedenen Histonmethyltransferasen aufweist, scheint für die Substraterkennung und -spezifität eine Rolle zu spielen (Xiao et al., 2003b).

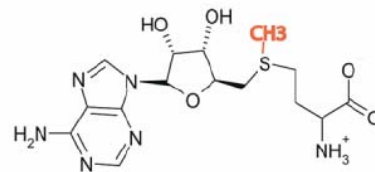
An N- und C-Terminus wird die SET-Domäne von den (bei SUV39H1 und DIM-5 cysteinreichen) Domänen pre-SET und post-SET eingerahmt. Beide scheinen für die Funktion der SET-Domäne essentiell zu sein: pre-SET für die strukturelle Stabilität, post-SET für die Komplettierung des aktiven Zentrums und für die Bildung des sogenannten Lysin-Zugangskanals (Xiao *et al.*, 2003b; Zhang et al., 2003). Dieser schmale Kanal verbindet die Kofaktorbindungsstelle für SAM auf der einen Seite der SET-Domäne mit der Substratbindungsstelle auf der gegenüber liegenden Seite. Die Form und Weite des Lysin-Zugangskanals bestimmen entscheidend mit, ob ein Substrat mono-, di- oder trimethyliert wird (Xiao *et al.*, 2003b; Xiao et al., 2003a; Zhang *et al.*, 2003).

Abbildung 1-8 zeigt die Struktur der SET-Domäne von DIM-5, dem Homolog des menschlichen SUV39H1 aus *Neurospora crassa*, in Verbindung mit dem Kofaktor S-Adenosyl-L-Methionin, Histon H3 und mehreren Zinkionen.

### A SET-H3-Komplex



### B SAM



**Abbildung 1-8: Die SET-Domäne (Khorasanizadeh, 2004).**

**(A) Struktur eines Dreierkomplexes aus der SET-Domäne der Histonmethyltransferase DIM-5, H3-Peptid und SAM.** Die Struktur von DIM-5, einem Ortholog des menschlichen SUV39H1, das Lysin 9 (orange) in H3 methyliert, wird im Komplex mit dem H3-N-Terminus (blau), dem Kofaktor SAM (lila) und vier Zinkionen (lila) abgebildet. Die Zinkionen stabilisieren die pre- und post-SET-Regionen, die beide wichtig für die katalytische Funktion sind.

**(B) Der Kofaktor der Histonmethyltransferasen: S-Adenosyl-L-Methionin.**

Eine Methylierung ändert nichts an der Ladung der basischen Histone und kann deshalb auch nicht durch Lockerung elektrostatischer Histoninteraktionen zu einer besseren Zugänglichkeit bestimmter Gene führen. Der **Effekt** einer Methylierung wird daher durch die Bindung von Proteinen vermittelt, die ihrerseits Auswirkungen auf unterschiedliche Zellvorgänge haben, indem sie die Genexpression beeinflussen (Sims, III *et al.*, 2003). Es sind drei Proteinmotive bekannt, die mit methylierten Lysinresten von Histonen interagieren: die Chromodomäne (Bannister *et al.*, 2001; Fischle *et al.*, 2003), die Tudor-Domäne und die WD40-repeat-Domäne (Martin *et al.*, 2005).

Eine Methylierung kann abhängig von ihrer Stelle sowohl Aktivierung als auch Repression bedeuten (Zhang *et al.*, 2001). Darüber hinaus kann bei bestimmten Prozessen, z.B. bei der X-Inaktivierung, eine Methylierung an einer bestimmten Stelle abhängig von der Zahl der angehängten Methylgruppen verschiedene Endstrecken haben (Martin *et al.*, 2005). Bei 24 bekannten Methylierungsstellen von Arginin und Lysin und jeweils 3 möglichen

Methylierungsstufen ergäben sich also  $3 \cdot 10^{11}$  verschiedene Methylierungszustände (Bannister *et al.*, 2005). Dieses Phänomen fügt sich in die im Jahr 2000 von Strahl und Allis erstmals propagierte Histon-Code-Hypothese (siehe 1.2.5) ein. Letztlich ist zu wenig über die definitiven Wirkungen der Methylierung und der anderen Histonmodifikationen bekannt, als dass man eine Entscheidung über die Existenz eines Codes treffen könnte (Martin *et al.*, 2005).

Lange Zeit interessierte bei der Charakterisierung einer Methylierungsstelle oder einer Histonmethyltransferase nur, ob sie mit Heterochromatin oder Euchromatin assoziiert sei. Mittlerweile ist aber klar, dass es nicht nur zwei Zustandsformen des Chromatins gibt. H3-K9, H3-K27 und H4-K20, Methylierungsstellen, die im Heterochromatin vorkommen, demarkieren Subdomänen. So sind trimethyliertes H3-K9, trimethyliertes H4-K20 und monomethyliertes H3-K27 im Heterochromatin um das Zentromer lokalisiert (Schotta *et al.*, 2004), trimethyliertes H3-K27, dimethyliertes H3-K9 und monomethyliertes H4-K20 werden in inaktivierten X-Chromosomen gefunden (Plath *et al.*, 2003; Schotta *et al.*, 2004).

Auch im Euchromatin gibt es Bereiche unterschiedlicher Aktivität. Methyliertes H3-K4, H3-K36 und H3-K79 sind Modifikationen, die v.a. im Euchromatin vorkommen. Wenn nun z.B. ein Gen in der Hefe exprimiert wird, ist das 5'-Ende des Gens an H3-K4 trimethyliert (Margueron *et al.*, 2005). Eine Analyse des menschlichen Euchromatins läßt eine ähnliche Korrelation dort vermuten (Bernstein *et al.*, 2005).

Interessant ist die Methylierung von H3-K9: Mono- und dimethyliert kommt es bei Säugern im silenten Euchromatin vor (Rice *et al.*, 2003). Für diese Methylierung scheint v.a. G9a zuständig zu sein (Tachibana *et al.*, 2005). Trimethyliert liegt H3-K9 im perizentrischen Heterochromatin vor (Peters *et al.*, 2003).

Barski *et al.* analysierten 2007 die genomweite Verteilung der Methylierung: Hierbei fiel auf, dass die Monomethylierung von H3-K9 sowie H3-K27 und H3-K79 jeweils mit Genaktivierung, die Trimethylierung hingegen mit Repression assoziiert war (Barski *et al.*, 2007).

Neben einer Auswirkung auf die Transkription kann die Histonmethylierung aber auch noch andere Rollen übernehmen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Methylierung von H4-K20 durch SET9 in *Schizosaccharomyces pombe* nach DNA-Schädigung für den Aufbau einer Checkpoint-Kontrolle notwendig ist (Sanders *et al.*, 2004). Dies führt dann zum Zellarrest und zur DNA-Reparatur.

Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen Histon- und DNA-Methylierung und auch zur RNA-Interferenz. Dieses Zusammenspiel wird in Kapitel 1.2.5 näher erläutert.

Lange Zeit wurde angenommen, die Histonmethylierung sei ein **irreversibler Prozess** und es gäbe keine histon-demethylierenden Enzyme. Dieser Vorstellung leistete zum einen die Tatsache Vorschub, dass trotz intensiver Suche kein demethylierendes Enzym entdeckt worden war, zum anderen ältere Berichte, dass die Histonmethylierung die gleiche Halbwertszeit wie Histone hätte (Byvoet, 1972). Weiterhin war bekannt, dass die H3-Lysin-9-Methylierung bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin eine Rolle spielt, was den Stabilitätsgedanken stützte (Bannister *et al.*, 2005).

Jedoch gab es von Beginn an Indizien, die gegen diese Hypothese sprachen: Schon 1973 war über ein Enzym mit Demethylase-Aktivität berichtet worden (Paik and Kim, 1973), die Aktivität konnte aber nie einem spezifischen Protein zugeordnet werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die H3-Lysin-9-Methylierung bestimmter inflammatorischer Gene bei Aktivierung entfernt werden konnte. Bei der auf die Induktion folgenden Repression wurde sie dann wieder hergestellt (Saccani and Natoli, 2002).

Daraufhin wurden einige Hypothesen zu Möglichkeiten, eine Histonmethylierung zu entfernen, aufgestellt:

- (1) Methylierte Histone sollten durch Histonaustausch an transkriptionell aktiven Orten durch die Histonvariante H3.3 ersetzt werden (Ahmad and Henikoff, 2002). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Histon-H3-Lysin-9-Methylierung mit assoziiertem HP1 in Zellen an aktiven Genorten entfernt wurde, sobald Histon H3.3 in diesen Bereich eingebaut wurde (Janicki *et al.*, 2004).
- (2) Methylierte N-Termini von Histonen könnten auch einfach „abgeschnitten“ werden. In *Tetrahymena* werden die N-Termini von Histon H3 und H4 offensichtlich durch proteolytische Prozessierung entfernt (Allis *et al.*, 1980).
- (3) Eine weitere Möglichkeit wäre die direkte Demethylierung durch eine Subfamilie der Histonacetyltransferasen, die mit ELP3 (Elongation Protein 3) verwandt sind (Chinenov, 2002). Der Reaktionsmechanismus würde auch die Entfernung einer Trimethylierung nicht ausschließen.

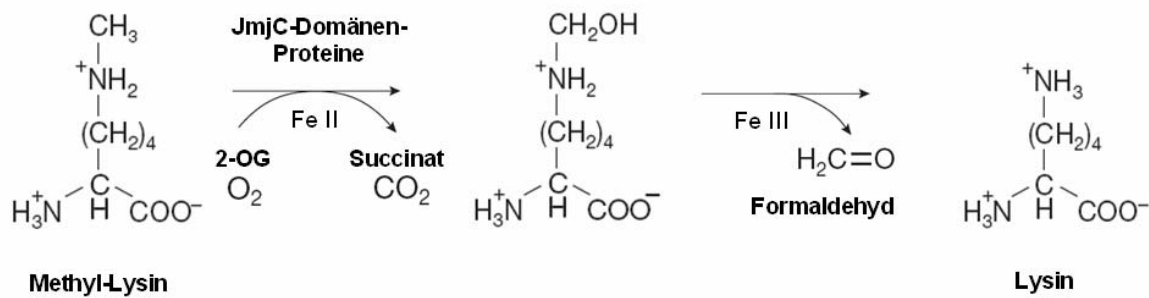
Vor einigen Jahren etablierte sich dann die Idee, dass Histonmethylierungen durch eine Aminoxidasereaktion entfernt werden könnten (Bannister *et al.*, 2002). Der Durchbruch kam mit der Entdeckung eines Enzyms (Peptidylarginindeiminase 4, PAD4), das Methylarginin in Citrullin durch Deimination umwandelt (Cuthbert *et al.*, 2004). Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass LSD1, eine Komponente verschiedener HDAC-Komplexe, durch Katalyse einer Aminoxidasereaktion mono- und dimethyliertes Histon H3-K4 demethylieren kann (Shi *et al.*, 2004). LSD1 kann durch mit ihm assoziierte Proteine wie z.B. CoREST



reguliert werden (Lee et al., 2005). Interagierende Proteine können über einen noch nicht bekannten Mechanismus sogar die Substratspezifität von LSD1 ändern. So kann es nicht nur H3-K4 demethylieren, eine Aktivität, die repressiv wirkt, sondern in Verbindung mit dem Androgenrezeptor auch als H3-K9-Demethylase fungieren. Dies führt zur Genaktivierung (Metzger et al., 2005).

Es ist nicht möglich, durch eine Aminoxidasereaktion eine Trimethylierung zu entfernen. Der Grund ist, dass das bei einer Aminoxidasereaktion entstehende Imin-Zwischenprodukt ein protoniertes Lysin erfordert. Trimethylierte Lysine (nicht protoniert) sind daher als Substrate ausgeschlossen (Trewick et al., 2005). Dies könnte man dahingehend interpretieren, dass im Unterschied zu Mono- und Dimethylierung die Histontrimethylierung eine stabile Modifikation sei. Kürzlich wurde aber entdeckt, dass die Trimethylierung durch andere Enzyme entfernt wird. Dass es solche Enzyme geben muss, konnte man bereits aus folgender Tatsache schließen: Androgenstimulierung führt zunächst zum Switch der LSD1-Aktivität zur H3-K9-Demethylase. Nach einer solchen Stimulation kommt es aber auch noch dann zum Verlust der Histon-H3-K9-Trimethylierung, wenn man die Aktivität von LSD1 hemmt. Dementsprechend muss ein von LSD1 verschiedenes Enzym für die Entfernung der Trimethylierung verantwortlich sein.

Proteine mit einer JmjC-Domäne sind solche Demethylasen (Clissold and Ponting, 2001; Tsukada et al., 2006; Yamane et al., 2006). Die JHDM (*JmjC domain-containing histone demethylase*) Enzyme bilden eine grosse, im Laufe der Evolution konservierte Histon-Demethylase-Familie. Die JmjC-Domäne der JHDM-Subklassen Jmjd2a (Ng et al., 2007; Whetstone et al., 2006) und Jmjd2b (Fodor et al., 2006) kann eine Trimethylierung an H3-K9 entfernen. Dies geschieht durch eine Hydroxylierung (Hydroxylradikalischer Angriff) (Ozer and Bruick, 2007; Trewick *et al.*, 2005). Den Reaktionsmechanismus zeigt Abbildung 1-9.



**Abbildung 1-9: Reaktionsmechanismus einer Demethylierung durch JmjC-Domänen enthaltende Proteine (Trewick *et al.*, 2005). 2-OG: 2-Oxoglutarat.**

Es ist anzunehmen, dass noch viele weitere Histondemethylasen entdeckt werden. Diese könnten zu den bereits erwähnten Aminoxidasen oder JHDM gehören, mögliche Kandidaten wären aber auch Mitglieder der Cupin-Protein-Familie. Diese Proteine sind Dioxygenasen, die keine JmjC-Domäne enthalten, die aber ein Metallozentrum wie Fe(II) benutzen und daher zur Histon-Demethylierung fähig sein könnten (Shi and Whetstine, 2007). Möglich ist auch eine Funktion der *SAM radical enzymes* als Histon-Demethylasen (Chinenov, 2002; Shi *et al.*, 2007), diese enthalten alle eine konservierte SAM-bindende Domäne. Bis dato ist aber noch wenig über diese Enzyme bekannt, da sie in einer oxygenierten Umgebung sehr instabil sind.

### 1.2.2.2 SU(VAR)3-9

Das *Su(var)3-9*-Gen in *Drosophila* wurde ursprünglich in genetischen Screens als Suppressor des Position effect variegation (PEV) entdeckt. Als PEV bezeichnet man die Variabilität der transkriptionellen Aktivität normalerweise aktiver Gene nach ihrer Translokation in die Nähe von Heterochromatin (Henikoff, 1992; Reuter and Spierer, 1992). Dabei wird ein ursprünglich euchromatisches, transkribiertes Gen durch chromosomale Rearrangements in die Nähe von heterochromatischen Regionen gebracht. In einer Subpopulation von Zellen des Organismus wird das transposierte Gen dann wahrscheinlich durch Ausbreitung des Heterochromatins über das Gen reprimiert. Es entsteht ein variegierter Phänotyp. Bei einem Teil der Zellen wird das Gen nach wie vor transkribiert und führt zu einer phänotypischen Ausprägung, in den anderen Zellen ist es reprimiert und es erscheint ein anderer Phänotyp.

Gene, die bei Mutation zu einer Unterdrückung des PEV führen, werden *Su(var)*-Gene (Engl.: Suppressor of variegation) genannt. Wirkt eine Mutation PEV-steigernd, dann handelt es sich um ein *E(var)*-Gen (Engl.: Enhancer of variegation).

In *Drosophila* existieren über 50 Suvar-Loci, von denen 15 molekular definiert wurden. *Su(var)*-Gene kodieren für Strukturkomponenten des Heterochromatins, wie z.B. das Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Eissenberg et al., 1990; Eissenberg and Elgin, 2000), SU(VAR)3-7, HDAC1 (Czermin et al., 2001) und die Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 (Rea et al., 2000; Schotta et al., 2002).

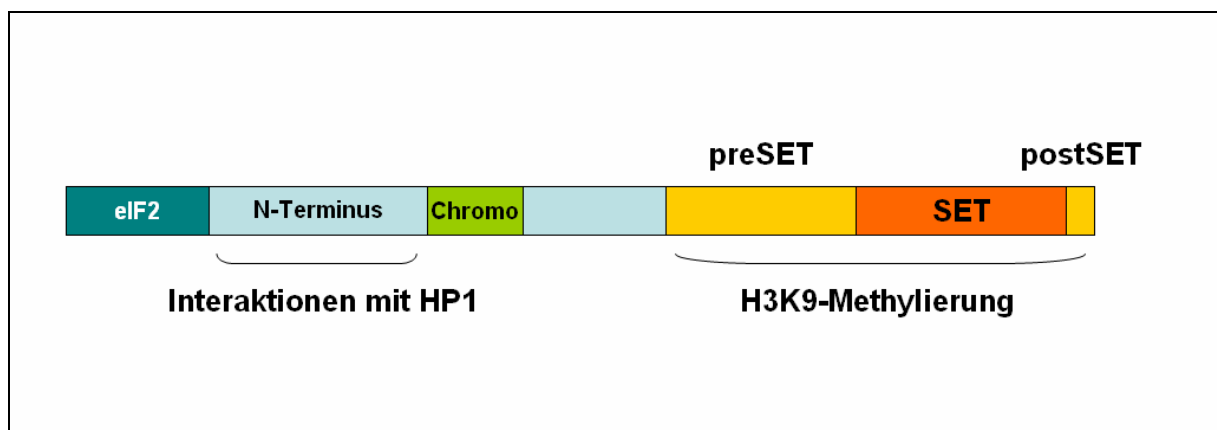


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung von *Drosophila melanogaster* SU(VAR)3-9.

Das Enzym hat in *Drosophila melanogaster* eine Länge von 635 Aminosäuren. Es ist in *Drosophila* aufgrund der Fusion mit den 80 N-terminalen Aminosäuren des Translationsinitiationsfaktors eIF-2 $\gamma$  (Krauss and Reuter, 2000) länger als in Säugern (Aagaard et al., 1999). Wie in Abbildung 1-10 ersichtlich, verfügt SU(VAR)3-9 über eine für

die Methyltransferaseaktivität essentielle SET-Domäne nahe des C-Terminus, die von einer cysteinreichen pre-SET-Domäne (Rea *et al.*, 2000) und der post-SET-Domäne eingerahmt wird. Darüberhinaus enthält es eine Chromodomäne (Firestein *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 1998; Melcher *et al.*, 2000). Chromodomänen sind in verschiedenen Spezies konserviert. Sowohl die Chromodomäne von SUV39H1 (Melcher *et al.*, 2000) als auch die von HP1 (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001) binden an Heterochromatin bzw. methyliertes Lysin 9 von Histon H3. Eine Deletion der Chromodomäne führt aber auch zur Reduktion der Aktivität von SUV39H1 (Chin *et al.*, 2006). Der N-Terminus von SU(VAR)3-9 ist relativ schlecht charakterisiert.

*Su(var)3-9* ist eine in verschiedenen Spezies konservierte Histonmethyltransferase. Homologe sind in *Schizosaccharomyces pombe* *Clr4*, beim Menschen *SUV39H1* (Aagaard *et al.*, 1999) und in Mäusen *Suv39h1* (Aagaard *et al.*, 1999) und das testisspezifische *Suv39h2* (O'Carroll *et al.*, 2000).

Die **Verteilung in der Zelle** wurde sowohl mit polyklonalen Antikörpern als auch mit EGFP-„getagten“ (EGFP = enhanced green fluorescent fusion proteins) Fusionsproteinen untersucht (Schotta *et al.*, 2002). SU(VAR)3-9 ist in Fruchtfliegen am heterochromatischen Chromozentrum und am sog. vierten Chromosom lokalisiert. Außerdem bindet es an Telomere und an verschiedene euchromatische Regionen (Schotta *et al.*, 2003). Die Heterochromatinassoziation dieser Histonmethyltransferase wurde bei Versuchen mit mutierten EGFP-Fusionsproteinen sowohl der Chromodomäne als auch der SET-Domäne zugeordnet (Schotta *et al.*, 2003). Der N-Terminus des Enzyms genügt für die Bindung an das vierte Chromosom und an eine kleine zentrale Region des Chromozentrums (Schotta *et al.*, 2002).

Die **Funktion von SU(VAR)3-9 als Histonmethyltransferase** wurde zunächst für die Orthologe in Säugern SUV39H1 (*Homo sapiens*) und *Suv39h1* (*Mus musculus*) nachgewiesen (Rea *et al.*, 2000). Für *Drosophila melanogaster* SU(VAR)3-9 wurde eine Histonmethyltransferaseaktivität zuerst bei einer Immunaффinitätsaufreinigung aus Embryoextrakten gezeigt (Czermin *et al.*, 2001). Diese Aktivität konnte bei *in vitro* Versuchen mit rekombinantem Protein bestätigt werden (Schotta *et al.*, 2002). In *Drosophila melanogaster* ist SU(VAR)3-9 die wichtigste, wenn auch nicht die einzige Histonmethyltransferase für Histon H3-K9 (Schotta *et al.*, 2002). V.a die Di- und Trimethylierung von perizentrischem Heterochromatin werden durch SU(VAR)3-9 kontrolliert (Ebert *et al.*, 2004). Es addiert nicht-prozessiv 2 Methylgruppen an H3-K9, dabei dimerisiert es über den N-Terminus (Eskeland *et al.*, 2004). Ein Knockout beider *Suv39h*-

Homologen in Stammzellen führt zum Fehlen der perizentrischen H3-K9-Trimethylierung und zu einem alternativen Methylierungsmuster: Lysin 9 wird monomethyliert und Lysin 27 trimethyliert (Peters *et al.*, 2003).

Die **Rolle von SU(VAR)3-9 im heterochromatischen Silencing** und bei der Suppression des PEV durch Enzymmutation hängt mit der H3-K9-Methylierung zusammen. Heterochromatische Regionen werden über die Methylierung von H3-K9 stabilisiert (Peters *et al.*, 2001) und H3-K9 dient als Anker für Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Außerdem interagiert SU(VAR)3-9 über seinen N-Terminus mit der Chromoshadow-Domäne von HP1, d.h. SU(VAR)3-9 und HP1 scheinen gegenseitig voneinander abhängig in ihrer Heterochromatinassoziation zu sein. Tatsächlich führt die Entfernung des einen zu einer Verteilungsstörung des jeweils anderen (Schotta *et al.*, 2002). Es zeigte sich, dass auch die *Su(var)3-9*-Orthologe in *S. pombe* (Nakayama *et al.*, 2001) und beim Menschen (Melcher *et al.*, 2000) Heterochromatin-assoziiert sind. Maus-Suv39h1 und h2 spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Telomerlänge (Garcia-Cao *et al.*, 2004). Bei Verminderung des Suv39 kommt es zur verminderten H3-K9-Methylierung, weniger HP1 bindet an den Telomeren, es kommt zur abnormalen Telomereelongation. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass SU(VAR)3-9 *in vivo* (wahrscheinlich aufgrund seiner Rolle in der Heterochromatinbildung) mit HDAC1 assoziiert ist (Czermin *et al.*, 2001). Wie Methylierung von H3-K9, HP1 und Silencing im Detail zusammenhängen, wurde bereits in Abschnitt 1.2.1 näher erläutert.

Weniger Aufmerksamkeit wird der Rolle von SU(VAR)3-9 in Zellzyklusprozessen entgegengebracht. Das Ortholog SUV39H1 wird zyklusabhängig bei der G1/S-Transition phosphoryliert (Firestein *et al.*, 2000). Das Enzym weist dann Phosphogruppen in und um die Chromodomäne auf. Konzentriert sind diese aber am C-Terminus. Außerdem führt eine Überexpression zur Wachstumshemmung, jedoch zu keinem kompletten Arrest der Zellen im Zyklus.

### 1.2.2.3 Acetylierung

Die Acetylierung von Histonen ist die am besten untersuchte posttranslationale Modifikation. Histone werden durch circa 30 mittlerweile bekannte Histonacetyltransferasen (HAT) acetyliert und durch 18 bekannte Histondeacetylasen (HDAC) deacetyliert (Glozak et al., 2005). Teilt man Histonacetyltransferasen nach Sequenzhomologie und Substraten ein, so erhält man mindestens 6 Familien: GNAT (mit Gcn5 verwandt), MYST (für MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 und Tip60), p300/CBP, Hormon-Rezeptor-Koaktivatoren, TAFII250, TFIIC und Nut1 (Carrozza et al., 2003; Sterner and Berger, 2000). Die HDACs wurden in drei verschiedene Klassen eingeteilt: HDAC I, II und III.

Bei der Acetylierung wird die Acetylgruppe des Coenzym Acetyl-CoA an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes gehängt. Es können bei Hefen wie auch bei Vertebraten die N-terminalen Lysinreste K9, K14, K18 und K23 in Histon H3 und K5, K8, K12 und K16 in Histon H4 acetyliert werden. Bei Vertebraten werden in Histon H2A K5 und K9 acetyliert, in Histon H2B K5, K12, K15 und K20 (Roth et al., 2001; Vaquero *et al.*, 2003).

Acetylierung von Lysinen an den N-Termini der Histone ist eines der Hauptmerkmale aktiv transkribierter Genbereiche (Fischle *et al.*, 2003; Marmorstein, 2001). Durch die Acetylierung wird die positive Ladung der Lysinreste neutralisiert und dadurch die Bindung der DNA an die Histone gelockert (Workman and Kingston, 1998). Dies ermöglicht z.B. Transkriptionsfaktoren und den Proteinen der Transkriptionsmaschinerie einen leichteren Zugang (Lee et al., 1993). Die meisten bekannten menschlichen HATs fungieren als Transkriptionskoaktivatoren. Es zeigte sich außerdem, dass viele Transkriptionskoaktivatoren über eine intrinsische HAT-Aktivität verfügen.

Darüberhinaus bieten acetylierte Lysine eine Bindungsstelle für Proteine, die eine Bromodomäne besitzen. Dabei handelt es sich sowohl um Chromatin-assoziierte Faktoren als auch um HATs.

Weiterhin steht die Acetylierung an manchen Lysinresten (z.B. H3-K9) in direkter Konkurrenz zur Methylierung, die komplett entgegengesetzte funktionelle Konsequenzen hat (die Repression). Daher ist Histonmethylierung auch mit HDAC-Aktivität assoziiert.

Vor einigen Jahren wurde außerdem gezeigt, dass HAT auch andere Proteine als Histone acetylieren können, z.B. Transkriptionsfaktoren, Hormonrezeptoren und den Tumorsuppressor p53 (Glozak *et al.*, 2005; Kouzarides, 2000).

Zu den verschiedenen Funktionsbereichen HAT-enthaltender Komplexe gehören die Transkriptionsaktivierung, Gen-Silencing, DNA-Reparatur und Zellzyklusprogression und -kontrolle (Carrozza *et al.*, 2003).

Die Histondeacetylasen sind in drei Klassen unterteilt, HDAC I, II und III. Die Klassen I und II sind dabei jeweils durch die Homologie ihrer HDACs zu den Hefe-HDACs *Rpd3* und *Hda1* definiert (Robyr et al., 2002; Taunton et al., 1996). HDACs der Klasse III werden durch ihre Homologie zur katalytischen Domäne von *Sir2p* definiert, einem *S. cerevisiae* Transkriptionssilencingfaktor. Die HDACs der ersten beiden Klassen reagieren auf den HDAC-Inhibitor Trichostatin A sensitiv, wohingegen die HDACs der dritten Klassen unempfindlich sind. Dagegen brauchen HDACs der dritten Klasse um aktiv zu sein das Coenzym NAD<sup>+</sup> (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) als Kofaktor (Moazed, 2001).

V.a. die Enzymaktivitäten der Klasse-I-HDACs sind mit einer Reihe von Chromatinkomplexen wie SIN3 und NURD assoziiert (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998). Außerdem zeigen sie ein Zusammenspiel mit anderen epigenetischen Mechanismen, wie DNA-Methylierung oder Histonmethylierung (Czermin *et al.*, 2001; Fuks et al., 2001). Die Funktionen dieser Enzyme reichen von Transkriptionsrepression über Entwicklung (Ahringer, 2000), X-Inaktivierung und epigenetisches Silencing (Sun and Hampsey, 1999) zu Zellzyklusregulation (Kouzarides, 1999) und Silencing im Rahmen des Position effect variegation in *Drosophila* (Mottus et al., 2000).

### 1.2.3 DNA-Methylierung

DNMT (DNA-Methyltransferasen) methylieren Cytosinreste, die von Guanin gefolgt werden, an der C5-Position des Pyrimidinringes (Chen et al., 1991). Für die Methylierung muss auf die Cytosine in der DNA-Sequenz direkt ein Guanin folgen (Bird, 1978; Cedar et al., 1979). Diese CpG-Dinukleotid-Sequenz liegt weit unter dem statistisch zu berechnenden Wert im Genom, aber dafür sind etwa 80% der CpG-Dinukleotide methyliert (Cooper and Krawczak, 1989). Der Rest der normalerweise unmethylierten CpG-Dinukleotide tritt in kleinen Clustern auf, die CpG-Islands genannt werden (Bird, 2002; Bird, 1986).

Abhängig von ihrem bevorzugten DNA-Substrat können DNA-Methyltransferasen in zwei Klassen eingeteilt werden. Die *De-novo*-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b schaffen eine Cytosinmethylierung an vorher unmethylierten CpG-Stellen. Eine die Methylierung aufrechterhaltende Methyltransferase DNMT1 sorgt während der Replikation dafür, dass ein vorbestehendes Methylierungsmuster auch auf dem neu entstehenden DNA-Strang beibehalten wird (Klose and Bird, 2006). DNMT2 hat nur einen geringen Einfluss auf die Etablierung von Methylierungsmustern *in vivo* (Okano et al., 1998), obwohl es *in vitro* über Methyltransferase-Restaktivität verfügt (Hermann et al., 2003).

Wie wird nun aber ein gezieltes Methylierungsmuster erstellt? Es gibt dreierlei Möglichkeiten: DNMT3a und b könnten über spezifische Domänen mit DNA oder Chromatin interagieren. Die Domäne PWWP leitet z.B. die DNMT3-Enzyme zum perizentrischen Heterochromatin. Es gibt *in vitro* Beweise für eine Interaktion der PWWP-Domäne mit DNA (Qiu et al., 2002). Außerdem bestehen strukturelle Ähnlichkeiten zu einer anderen Histonmodifikationen erkennenden Domäne, der Tudor-Domäne. Die zweite Möglichkeit bestünde darin, dass DNMT3a und b durch Protein-Protein-Interaktionen mit Transkriptionsrepressoren oder anderen Faktoren zum Ort ihrer Bestimmung gelangen. (Für DNMT3a: (Di Croce et al., 2002). Für beide DNMTs: (Brenner et al., 2005)) Drittens könnte das RNA-Interferenz-System die *de novo* Methylierung an spezifischen DNA-Sequenzen initiieren (Kawasaki and Taira, 2004).

Die DNA-Methylierung entwickelte sich erst spät in der Evolution und es wird allgemein angenommen, dass ihr Sinn darin besteht, die langfristige Stilllegung von Genen zu erleichtern (Kass et al., 1997) und die Genomstabilität durch Repression von Transposons zu gewährleisten (Yoder et al., 1997).

Dies könnte durch folgende Mechanismen verwirklicht werden:

Erstens durch schlechtere Bindung von Transkriptionsfaktoren an regulatorische Elemente. Der Transkriptionsfaktor Erythroblastosis 1 (ETS1) (Maier et al., 2003) und Boundary



Element CCCTG-binding factor (CTCF) (Bell and Felsenfeld, 2000) binden an nichtmethylierte, nicht aber an methylierte DNA.

Weiterhin existieren aber auch MBPs (methyl-CpG-bindende Proteine), die an symmetrisch methylierte CpG binden: MECP2 (Methyl-CpG-bindendes Protein 2), MBD1 (methyl-CpG-bindende Domäne Protein 1), MBD2 und MBD4 und KAISO (Hendrich and Bird, 1998; Prokhortchouk et al., 2001). Diese Proteine könnten durch Rekrutierung von Chromatin-Remodeling-Enzymen bzw. Korepressoren die Transkription reprimieren. MECP2 assoziiert z.B. mit SIN3A (transcriptional co-repressor SWI-independent 3A) und HDACs (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998).

### 1.2.4 Imprinting

Imprinting von Genen wurde schon vor zwanzig Jahren bei Kerntransplantationsexperimenten in der Maus entdeckt (McGrath and Solter, 1984; Surani et al., 1984). Es bedeutet allelische Expression in Abhängigkeit von der Herkunft von Mutter oder Vater. Viele der vom Imprinting betroffenen Gene spielen eine Rolle in Entwicklung, fetalem Wachstum und Verhalten (Wilkins and Haig, 2003).

Die meisten der mit Imprinting verbundenen Gene liegen in größeren chromosomalen Domänen. Diese enthalten sogenannte „Imprinting control regions“ (ICRs), Sequenzelemente, die für die Expression der Gene wichtig sind. Die ICRs sind durch epigenetische Modifikationen reguliert und enthalten viele CpG-Dinukleotide. Eines der beiden elterlichen Allele ist methyliert, meist handelt es sich dabei um das mütterliche.

Während der Gametogenese müssen vorbestehende Methylierungen in den primordialen Keimzellen zunächst entfernt werden (Hajkova et al., 2002), bevor bei der Spermatogenese in späten fetalen Stadien und bei der Oogenese sogar erst nach der Geburt neue Imprintingmuster erstellt werden. Die bei maternalen Imprints dafür verantwortliche DNA-Methyltransferase ist DNMT3a in Kombination mit DNMT3L (Chedin et al., 2002; Hata et al., 2002). Eine noch unklare Frage ist die nach dem Mechanismus, der zum Imprinting nur eines Allels führt. Eine Möglichkeit ist die der Bindung von Proteinen an ICRs eines Allels, so dass in den damit assoziierten Allelen keine Methylierung mehr stattfinden kann. Repeat-Sequenzen, die in der Nähe der ICRs liegen, könnten über einen noch nicht geklärten Mechanismus, der möglicherweise dem des Silencing im perizentrischen Heterochromatin durch RNAi ähnelt, schlußendlich zur DNA-Methylierung der anderen Allele führen.

Für die somatische Aufrechterhaltung des in den Keimzellen erstellten Methylierungsmusters ist die DNA-Methyltransferase DNMT1 erforderlich (Jaenisch and Bird, 2003).

Aber auch andere Nicht-Histon-Proteine sind wichtig: CTCF z.B. schützt das unmethylierte mütterliche Allel vor der Aquirierung einer DNA-Methylierung (Fedoriw et al., 2004; Pant et al., 2003; Schoenherr et al., 2003). Das methylierte Allel hingegen ist mit MDBs assoziiert.

Während Imprinting lange Zeit allein der DNA-Methylierung zugeordnet war, konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass auch hier, wie in anderen Bereichen, epigenetische Modifikationen miteinander vernetzt sind. So weisen die ICRs methylierter Allele in allen untersuchten Zellen und Geweben H3-K9-Methylierung und Hypoacetylierung von H3 und H4 auf. In den ICRs der nicht methylierten Allele hingegen war das Chromatin hyperacetyliert und H3K4 methyliert (Fournier et al., 2002; Yang et al., 2003). Die Mechanismen dieser Modifikationen könnten orts- und entwicklungsabhängig und verschieden von denen im Gesamtgenom sein. Darauf deutet z.B. hin, dass die Acetylierung von ICRs teilweise unabhängig von einer Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A ist (Gregory et al., 2002).

### **1.2.5 Epigenetisches Zusammenspiel: Ein Histon-Code?**

An den beiden Chromatinzuständen Eu- und Heterochromatin lässt sich auch das Zusammenspiel verschiedener Histonmodifikationen und anderer epigenetischer Markierungen studieren. Schon die oben erwähnten typischen Modifikationsmuster für fakultatives und perizentrisches Heterochromatin (siehe 1.2.1) weisen darauf hin, dass bestimmte Kombinationen von Modifikationen ein spezifisches Ergebnis haben. Zur Jahrtausendwende wurde daher die Theorie aufgestellt, dass ein „Histon-Code“ existiere (Strahl and Allis, 2000). Dieser Code solle aus einer Kombination multipler Histonmodifikationen bestehen, die durch verschiedene Enzymaktivitäten vermittelt würden (Czermin and Imhof, 2003). Abgelesen werde der Code durch Proteine, die spezifische Modifikationen erkennen würden. Die daraufhin entstehende Diskussion um die Existenz des Codes ist zu einem Großteil allein durch die Begriffsdefinition bestimmt. Als Beweis der Theorie werden verschiedene Phänomene angeführt (Jenuwein and Allis, 2001):

- (1) Die Hemmung der repressiven Histon-H3-Lysin-9-Methylierung durch Phosphorylierung von Serin 10 desselben Histons. Andererseits ist die Serinphosphorylierung an Histon H3 Serin 10 synergistisch gekoppelt mit Acetylierung von H3 (an Lysin 14) während der Stimulation durch epidermalen Wachstumsfaktor und bei Genaktivierung (Cheung et al., 2000; Clayton et al., 2000; Lo et al., 2000). Die Phosphorylierung steht also einerseits für transkriptionelle

Aktivierung. Im Kontext anderer Modifikationen kann sie aber auch mitotische Chromosomenkondensation zur Folge haben (Wei et al., 1999).

- (2) Die Deacetylierung von Histon H3 durch CLR3 wird benötigt, um die Methylierung von Histon H3 Lysin 9 zu ermöglichen (Nakayama *et al.*, 2001). Die Acetylierung von H3-K14 wird durch Phosphorylierung von H3 Serin 10 positiv und durch Methylierung von H3 Lysin 9 negativ reguliert.
- (3) Es existieren Multiproteinkomplexe, die verschiedene Enzymaktivitäten in sich vereinen (Czermin *et al.*, 2001).

Auch wenn trotz dieser Phänomene Uneinigkeit über die Existenz eines Codes herrscht, ist doch offensichtlich, dass epigenetische Phänomene einen multidimensionalen Charakter aufweisen. Die jeweiligen Modifikationen verstärken sich zyklisch gegenseitig (Laird, 2005). Ursache und Effekt können aber nur innerhalb linear-kausaler Beziehungen eine klare Bedeutung annehmen, da hier zeitliche Abläufe durchschaubar sind und man durch Addition und Subtraktion einzelner Komponenten ihre Notwendigkeit prüfen kann. In einem sich zyklisch verstärkenden System beeinflusst die Entfernung einer Komponente alle anderen. Hieraus wird verständlich, warum die Untersuchung epigenetischer Mechanismen so komplex ist. Im Bestreben, den Histoncode zu entschlüsseln, wurden nichtsdestotrotz Versuche unternommen, die Interaktion epigenetischer Mechanismen zu untersuchen. Dabei zeigte sich in Abhängigkeit von Studie und Modellorganismus eine Prädominanz verschiedener Elemente (Laird, 2005).

In einigen Modellorganismen gehen beim Silencing Histondeacetylierung und Verlust der Methylierung von Histon H3 Lysin 4 der Methylierung von Histon H3 an Lysin 9 und DNA-Methylierung voraus (Mutskov and Felsenfeld, 2004). Bei der Etablierung von Heterochromatin initiiert die siRNA die Histondeacetylierung, daraufhin erfolgt die Methylierung von Histon H3 an Lysin 9 und die DNA-Methylierung. Vaquero et al. zeigten wiederum, dass die Histondeacetylase SIRT bei Säugern während der Bildung von Heterochromatin SUV39H1 rekrutiert und deacetyliert und so dessen Aktivität steigert (Vaquero et al., 2007). Weitere Experimente wurden mit Mäusen durchgeführt und zeigten, dass die DNA-Methylierung „downstream“ von der H3-K9-Methylierung liegt. Die Inaktivierung der Histonmethyltransferase Suv39h führte zur Reduktion der DNA-Methylierung an perizentrischen Satelliten (Lehnertz et al., 2003) und Zellen ohne die Histonmethyltransferase G9a hatten ein gestörtes DNA-Methylierungsmuster an Genen, die Imprinting unterliegen (Xin et al., 2003). Auch in *Neurospora crassa* und *Arabidopsis* ist die

DNA-Methylierung komplett von der H3-K9-Methylierung abhängig (Elgin *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2002; Tamaru and Selker, 2001).

Auffallend ist auf der anderen Seite, dass in *Arabidopsis* die DNA-Methylierung fürs Gen-Silencing genügt, die H3-K9-Methylierung nicht (Johnson *et al.*, 2002). Eine übergeordnete Rolle der DNA-Methylierung zeigt sich auch darin, dass eine Promotordeletion und Beendigung der Transkription wenig Effekt auf lokale Methylierungsmuster hat (Kang *et al.*, 2003). Ein weiterer Hinweis auf die Dominanz der DNA-Methylierung ist ein Verlust der Histon-H3-Lysin-9-Methylierung im Heterochromatin als Folge der Inaktivierung von MET1, einer CpG-aufrechterhaltenden Methyltransferase (Tariq *et al.*, 2003). Dies ist dadurch zu erklären, dass die DNA-Methylierung über das 5-Methylcytosin-bindende Protein MECP2 sowohl HDACs als auch H3-K9-Methyltransferaseaktivität rekrutiert (Elgin *et al.*, 2003). Auch in *Arabidopsis* kontrolliert die DNA-Methylierung die Histon-H3-Lysin-9-Methylierung und die Heterochromatinbildung (Soppe *et al.*, 2002).

Aus diesen widerstreitenden Argumenten ist ersichtlich, dass es weder konsistente Daten in Bezug auf die Prädominanz bestimmter Modifikationen noch wirkliche Beweise der Histon-Code-Theorie gibt. Es liegen lediglich Puzzleteile vor, die sich zu keinem Gesamtbild zusammenfügen lassen. Zukünftige Studien bleiben abzuwarten.

### 1.3 EPIGENETIK IM KONTEXT MENSCHLICHER ERKRANKUNGEN

Chromatin als dynamische Struktur integriert ständig Signale von der Zelloberfläche und aus dem Zellinneren und koordiniert eine angemessene Reaktion mittels Änderungen der Transkription. Dies ist v.a. während Entwicklung und Differenzierung aber auch im adulten Organismus von großer Bedeutung. Bei Störung dieser Regulation können Krebs, genetische Erkrankungen, kongenitale Fehlbildungen, pädiatrische Syndrome, Autoimmunerkrankungen und sogenannte multifaktorielle Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose etc. die Folge sein.

#### 1.3.1 Pränatale Periode

Schon kurz nach der Befruchtung einer Eizelle wird die Expression des paternalen Genoms durch rasche DNA-Demethylierung und verschiedene Histonmodifikationen verändert (Morgan et al., 2005). Die epigenetischen Modifikationen des maternalen Genoms sind dagegen statischer. Letztendlich wird sowohl im paternalen als auch im maternalen Genom eine epigenetische Vorlage für die Genexpression in den verschiedenen embryonalen Geweben etabliert. Störungen epigenetischer Mechanismen in dieser Phase der Entwicklung führen zu kongenitalen Erkrankungen, multisystemischen pädiatrischen Syndromen oder prädisponieren das Neugeborene, in seinem späteren Leben an neurodegenerativen Erkrankungen oder Krebs zu erkranken (Rodenhiser and Mann, 2006).

Fehler beim genomischen Imprinting, einem Mechanismus, der durch DNA-Methylierung und Histonmodifikationen die Expression paternaler und maternaler Allele eines Gens reguliert, können z.B. zur Ausbildung einiger pädiatrischer Syndrome führen (Beaudet, 2004; Hitchins et al., 2001; Kamnasaran and Cox, 2002; Nicholls and Knepper, 2001; Verona et al., 2003; Weksberg et al., 2003). Bekannte Beispiele für genspezifische Imprintingstörungen sind z.B. das **Prader-Willi-Syndrom**, das **Angelman-Syndrom** und das **Beckwith-Weidemann-Syndrom** (Nicholls *et al.*, 2001; Weksberg *et al.*, 2003). Hierbei spielen die Histonmethylierung an H3 Lysin 9 und beim Prader-Willi-Syndrom insbesondere die Histonmethyltransferase G9a eine Rolle (Xin *et al.*, 2003).

Abgesehen von genspezifischen treten globale Störungen des Imprinting auch bei Embryonen auf, denen ein ganzer elterlicher Chromosomensatz fehlt. **Teratome** z.B. entstehen durch die spontane Aktivierung einer Eizelle in situ. Dabei fehlt das komplette paternale Genom (Kuno et al., 2004). Genau der umgekehrte Fall liegt bei **Blasenmolen**, einer hydropischen Entartung der plazentaren Chorionzotten, vor. Eine komplette Blasenmole entsteht durch eine

defekte Keimanlage mit Verlust des Zellkerns und des genetischen Materials der Mutter. Alle 46 Chromosomen sind väterlichen Ursprungs (Devriendt, 2005). Blasenmolen können zu Chorionepitheliomen entarten. Die rezessive Erkrankung „Familiäre biparentale komplette Blasenmole“ führt zum wiederholten Auftreten von Blasenmolen bei fehlerhafter Ausbildung spezifischer maternaler Imprintingmuster während der Embryogenese (El Maarri et al., 2003). Auch die Schwangere selbst kann durch Imprintingdefekte zu Schaden kommen: Die Ätiologie der **Präeklampsie**, ein Krankheitsbild, das bei der Mutter zu Hypertonie und Proteinurie führt, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Pathomechanismen in der Plazenta werden in Betracht gezogen. Teilweise scheint die Erkrankung epigenetisch vererbt zu werden (van Dijk et al., 2005).

Ein weiterer Zweig der Gynäkologie ist mit der Epigenetik vernetzt. Bei der **assistierten Reproduktion** bestehen ein erhöhtes Risiko einer intrauterinen Wachstumsretardierung, von Frühgeburtlichkeit, geringem Geburtsgewicht und kongenitalen Malformationen und eine erhöhte perinatale Sterblichkeit (McDonald et al., 2005). Außerdem ist die Prävalenz der Imprinting-Erkrankungen wie Angelman- und Beckwith-Weidemann-Syndrom bei IVF und ICSI-Kindern größer als bei auf natürlichem Weg gezeugten Kindern (Gicquel et al., 2003; Niemitz and Feinberg, 2004). Dies ist wohl durch die Exposition der Zygote gegenüber unnatürlichen Umgebungsbedingungen zu erklären. Auch im Tiermodell konnten in der Folge von *in vitro* Kultur Entwicklungsabnormalitäten und ein Imprintingverlust nachgewiesen werden (Mann et al., 2003; Young et al., 2003). Es ist noch nicht abzusehen, welche epigenetischen Schäden im Laufe der Jahre in Verbindung mit der assistierten Reproduktion bekannt werden (Maher et al., 2003).

### 1.3.2 Immunsystem und Autoimmunerkrankungen

Epigenetische Mechanismen beeinflussen auch die Immunantwort. Abnorme DNA-Methylierung wurde in Patienten mit **Systemischem Lupus erythematoses** beobachtet. Die T-Zellen dieser Patienten zeigen geringe DNA-Methyltransferaseaktivität und hypomethylierte DNA (Oelke and Richardson, 2004).

Das **ICF-Syndrom** (immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies) wiederum wird verursacht durch Mutationen in beiden *DNMT3b*-Genen, die Folge ist eine DNA-Hypomethylierung (Ehrlich, 2003).

### 1.3.3 Neurologie und Neuropsychiatrie

Weitere Bereiche, in denen die Epigenetik eine Rolle spielt, sind die Neurologie und die Neuropsychiatrie. Epigenetische Mechanismen vermitteln hier zwischen Umweltstimulus, synaptischem Input und neurologischer Funktion.

Abgesehen von einer nachgewiesenen Rolle epigenetischer Mechanismen in der Regulation des zirkadianen Rhythmus (Crosio et al., 2000; Naruse et al., 2004), ist z.B. die gesteigerte Acetylierung von Histon H3 (nicht H4) im Hippocampus an Konditionierung und Gedächtnisbildung beteiligt (Levenson et al., 2004; Yeh et al., 2004). Die Aktivierung dopaminerger, cholinergischer und glutamaterger Signalwege im Hippocampus führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Histon H3 (Crosio et al., 2003).

Eine Störung dieser epigenetischen Mechanismen kann daher die Basis für kognitive Dysfunktion sein. So gibt es Hinweise darauf, dass ein Teil der Pathogenese der **Alzheimererkrankung** durch eine fehlerhafte Regulation der Histonacetylierung bedingt sein könnte (Cao and Sudhof, 2001; von Rotz et al., 2004).

**Schizophrenie** kann zum Teil durch ein Herunterregulieren des extrazellulären Matrixproteins REELIN erklärt werden. Inhibitoren von HDACs und DNMTs erhöhen die *reelin*-Expression, ein Zeichen für die epigenetische Regulation (Chen et al., 2002; Costa et al., 2002).

Pathologische Hirnprozesse haben außerdem ein epigenetisches Korrelat, das zur Chronifizierung der Erkrankung beitragen kann. Beispielsweise konnten nach **epileptischen Anfällen** in verschiedenen Bereichen des Gehirns Veränderungen der Genexpression nachgewiesen werden. Ein Teil der transkriptionellen Reaktion auf epileptische Anfälle beinhaltet dabei Veränderungen in der Chromatinstruktur (Mugnaini et al., 1989). Eine Übersicht zeigt Tabelle 1-4.

Bei der **Friedreich-Ataxie** ist durch repetitive Triplets das Gen für Frataxin stillgelegt. Die Histone H3 und H4 an diesem Genlokus sind hypoacetyliert, H3-K9 ist vermehrt trimethyliert. Das Silencing wird durch HP1 verstärkt (Saveliev et al., 2003). Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch Ataxie, Muskelschwäche, Skelettdeformitäten, Dysarthrie, progrediente Demenz etc., häufig findet sich auch eine Herzbeteiligung im Sinne einer Kardiomyopathie und ein Diabetes mellitus assoziiert. Bisher ist keine kausale Therapie möglich.

Tabelle 1-4: Epigenetische Prozesse als Reaktion auf epileptische Anfälle.

Gen	Regulation	Epigenetischer Mechanismus
<i>c-fos</i> (immediate early gene)	Erhöhung der Expression in vielen Bereichen des Gehirns (Morgan et al., 1987)	Acetylierung von Histon H4 und Phosphoacetylierung von Histon H3 im Bereich des <i>c-fos</i> -Promotors nach Elektrokrampftherapie erhöht (Tsankova et al., 2004).
<i>GluR2</i> (Glutamat-Rezeptor-2)	mRNA herunterreguliert (Grooms et al., 2000; Huang et al., 2002; Sanchez et al., 2001)	Verminderte Acetylierung von Histon H4 im Bereich des <i>GluR2</i> -Promotors bei durch Pilocarpingabe ausgelösten Krampfanfällen (Huang et al., 2002).
<i>BDNF</i> (Brain derived neurotrophic factor)	Erhöhte Expression (Binder et al., 1999; Ernfors et al., 1991; Isackson et al., 1991; Kokaia et al., 1995; Nibuya et al., 1995; Timmusk et al., 1993)	Acetylierung von H4 im P2-Promotor von <i>BDNF</i> erhöht (Huang et al., 2002; Tsankova et al., 2004). Acetylierung von Histon H3 in den P3- und P4-Promotoren von <i>BDNF</i> nach Elektrokrampftherapie induziert (Tsankova et al., 2004).

In der pädiatrischen Neurologie und im Rahmen pädiatrischer Syndrome zeigen sich weitere Verbindungen zur Epigenetik:

Das autosomal-dominant vererbte **Rubinstein-Taybi-Syndrom**, ein Fehlbildungskomplex mit geistiger Behinderung, Minderwuchs und einer charakteristischen kranio-mandibulo-fazialen Dysplasie, ist durch Mutationen der Histonacetyltransferase *CBP*, einem Transkriptionskoaktivator, bedingt (Blough et al., 2000; Petrij et al., 1995). Der Verlust von *CBP* führt dabei anscheinend zu Störungen der Bildung des Langzeitgedächtnisses (Bourtchouladze et al., 2003; Korzus et al., 2004; Oike et al., 1999) und dies kann durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren gemildert werden (Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004).

Mit intellektuellen Einschränkungen ist auch das X-chromosomal vererbte **Coffin-Lowry-Syndrom** verbunden. Hier ist das Gen für die Serin-Threonin-Kinase *RSK-2* mutiert, die Histonphosphorylierung ist gestört (Ausio et al., 2003).

Auch das X-chromosomal vererbte, bei kleinen Mädchen nach dem Down-Syndrom die häufigste erbliche Form der mentalen Retardierung darstellende **Rett-Syndrom**, ist zumindest



teilweise durch Mutationen des *MECP2*-Gens (Methyl-CpG-bindendes Protein 2) verursacht (Amir et al., 1999; Ellaway and Christodoulou, 2001; Shahbazian and Zoghbi, 2002). *MECP2* als CpG-bindendes und HDAC-rekrutierendes Protein spielt physiologisch eine Rolle in Gedächtnisbildung und bei synaptischer Plastizität.

Das **Syndrom des fragilen X-Chromosoms** oder Martin-Bell-Syndrom ist eine Trinukleotiderkrankung. In einem der beiden fragilen X-Gene *FMR1* und *FMR2* sind hier repetitive Trinukleotidsequenzen vermehrt (Ashley et al., 1993; Gecz et al., 1996; Gu et al., 1996). Dies führt zur Hypermethylierung dieser und angrenzender Regionen und zur Stilllegung der betreffenden Gene. Die Folge ist geistige Retardierung mit einem IQ unter 50. Das durch geistige Retardierung, faziale Dysmorphie, urogenitale Anomalien und  $\alpha$ -Thalassämie gekennzeichnete **ATR-X-Syndrom** hat als molekulare Grundlage eine Mutation im *ATR-X*-Gen, die zur Hypomethylierung einiger Y-spezifischer Satelliten und subtelomerischer Repeats führt (Gibbons et al., 2000). Auffallend ist auch, dass die SET-Domäne von *EZH2* mit dem *XNP-ATR-X*-Gen-Produkt interagiert (Cardoso et al., 1998) und *EZH2* damit in der Pathogenese eine Rolle zu spielen scheint.

Beim **Sotos-Syndrom**, das auch als zerebraler Gigantismus bezeichnet wird, besteht durch Nonsense-, Frameshift- oder submikroskopische Deletionsmutationen von *NSD1* eine Haploinsuffizienz für dieses Gen (Kurotaki et al., 2002). Das Sotos-Syndrom führt bei den betroffenen Kindern zu einem beschleunigten Körper- und Knochenwachstum mit Ausbildung eines Makrozephalus. Eine deutliche Verlangsamung der kognitiven, sprachlichen und motorischen Entwicklung ist ebenfalls charakteristisch, teilweise treten auch epileptische Anfälle auf.

*WHSC1*, ein Gen, das eine SET-Domäne enthält, liegt in der Region, die beim **Wolf-Hirschhorn-Syndrom** deletiert ist (Stec et al., 1998). Dieses Malformationssyndrom ist gekennzeichnet durch verschiedene Organfehlbildungen, faziale Dysmorphien, geistige und psychomotorische Retardierung bei Hirnfehlbildungen, durch Wachstumsverzögerung und orthopädische Probleme.

## 1.4 ROLLE DER EPIGENETIK IN DER KANZEROGENESE

Krebs als Überbegriff für eine Vielzahl maligner Tumoren ist ein Leiden, das die Menschheit seit Jahrhunderten beschäftigt. Der Begriff „Krebs“ geht auf Hippokrates zurück, der ihn deshalb wählte, weil die im Rahmen des Tumorwachstums bei der Angiogenese entstehenden Gefäße an die Scheren eines Krebses erinnern (Feinberg et al., 2006).

Es gibt einige Eigenschaften, die vielen malignen Tumoren gemeinsam sind: Ein maligner Tumor muss in der Lage sein, unabhängig von wachstumsstimulierenden Signalen zu wachsen und wachstumshemmende Signale und Apoptose zu umgehen. Er muss der Wirtsimmunantwort entkommen und schließlich seine eigene Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherstellen, indem er die Angiogenese anregt. Maligne Tumoren verfügen im Normalfall über unlimitedes replikatives Potential. Sie sind fähig zur Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan and Weinberg, 2000).

Klassischerweise ist Kanzerogenese ein Prozess, der mehrere Schritte erfordert (Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung), dabei werden im Laufe der Entartung Defekte in verschiedenen Genen akkumuliert, die über Vorstufen zum monoklonalen malignen Tumor führen (Böcker et al., 2004).

Bei der Transformation einer normalen differenzierten Zelle zur Tumorzelle spielt neben der Aktivierung von Onkogenen - z.B. durch Amplifikation oder Mutation in Enhancer- oder Promotorregionen von Genen des Zellzyklus - die funktionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Deletion, Translokation oder Mutation eine grosse Rolle (Hanahan *et al.*, 2000). Die grosse Zahl solcher mittlerweile identifizierter Gene hat zu der Ansicht geführt, dass der Begriff Krebs eine heterogene Gruppe von Malignomen umfasst, die eine unterschiedliche Ätiologie und Pathogenese aufweisen und durch Defekte in unterschiedlichen Genen charakterisiert sind. Während die Chronisch Myeloische Leukämie charakteristischerweise durch das Philadelphiachromosom definiert wird (Rowley, 1990), entsteht das Kolorektale Karzinom durch die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz, z.B. durch Defekte in den Genen *FAP*, *DCC*, *K-RAS*, *p53* etc. (Fearon and Vogelstein, 1990).

Gerade beim so gut untersuchten Entstehungsmechanismus des Kolorektalen Karzinoms zeigt sich dann aber auch eine Schwachstelle des über Jahre etablierten Modells der Karzinogenese: Keine der bekannten Mutationen ist spezifisch oder notwendig für ein bestimmtes Stadium, mit Ausnahme der „Gatekeeper“-Mutation selbst (TP53) (Fearon *et al.*, 1990).

Mit fortschreitendem Verständnis der genetischen Alterationen in malignen Tumoren setzt sich die Erkenntnis durch, dass auch die Epigenetik eine bedeutende Rolle in der

Kanzerogenese spielt. Als Alternative zum klassischen Modell der Kanzerogenese als klonalem genetischen Prozess wurde das epigenetische Vorläufermodell vorgeschlagen (Feinberg *et al.*, 2006). Die Kanzerogenese soll hierbei in drei Schritten ablaufen: Im ersten Schritt sollen Vorläuferzellen epigenetisch geschädigt werden, was zu einer polyklonalen Vorläuferzellpopulation führt, die vulnerabel für Umweltreize und genetische Schäden ist. Im zweiten Schritt kommt eine genetische Mutation hinzu, die den Krebs initiiert, im dritten Schritt akkumulieren dann genetische und epigenetische Schäden und führen zur Progression der Erkrankung. Als Beweise für dieses neue Modell dienen unter anderem Studien, die die Reversibilität des Phänotyps von Tumorzellen sowohl bei Leukämien als auch bei soliden Tumoren belegen (Lotem and Sachs, 2002; Sachs, 1986). Auch konnte gezeigt werden, dass klonierte Kerne von Melanomen bei Mäusen sich zu normalen Mäusen ausdifferenzieren konnten, ein weiterer Hinweis auf die epigenetische Kontrolle der Eigenschaften der Tumorzellen (Hochedlinger *et al.*, 2004). Darüber hinaus zeigte sich, dass die epigenetischen Veränderungen tatsächlich den initialen Mutationen in Karzinomen vorausgehen: weitreichende DNA-Hypomethylierung wurde in den untersuchten Tumoren gefunden (Feinberg and Vogelstein, 1983) und auch Promotorhypermethylierung konnte in vielen Fällen nachgewiesen werden (Crawford *et al.*, 2004; Holst *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 1994). Epigenetische Alterationen wurden bereits in noch benignem Gewebe gefunden, wohingegen genetische Alterationen erst nach fortlaufender Kultivierung auftraten (Crawford *et al.*, 2004). In den letzten Jahren wird versucht, Genetik und Epigenetik im Rahmen der Karzinogenese zu einem Gesamtbild zu integrieren (Hanash, 2004; Zardo *et al.*, 2002). So wurde in verschiedenen Studien der Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifikationen in Tumoren untersucht (Nouzova *et al.*, 2004), die Wirkung der DNA-Methylierung auf die Genexpression wurde getestet. Der Einsatz von epigenetischen Inhibitoren hat solche Experimente entscheidend vereinfacht.

#### **1.4.1 DNA-Methylierung in Tumoren**

Im Rahmen der Kanzerogenese wurde zunächst entdeckt, dass sich einige menschliche Tumoren von gesunden Geweben durch Hypomethylierung ihrer Gene unterscheiden (Feinberg *et al.*, 1983). Erst in der Folgezeit wurde bekannt, dass regionale Hypermethylierung durch Repression von Tumorsuppressorgenen ebenfalls zur Entstehung von malignen Tumoren beiträgt (de Bustros *et al.*, 1988; Herman and Baylin, 2003; Jones and Laird, 1999; Linhart *et al.*, 2007).

### 1.4.2 Histonacetylierung in Tumoren

Generell ist eine Inaktivierung der HAT-Aktivität aufgrund von Mutationen oder der inhibitorischen Wirkung viraler Proteine mit Krebs assoziiert (Jacobson and Pillus, 1999; Johnstone, 2002; Kouzarides, 1999). Dies wird z.B. dadurch verständlich, dass physiologischerweise die HAT-Aktivität von p300, CBP und pCAF mit P53-vermittelter Transkription assoziiert ist (Grossman, 2001; Johnstone, 2002). P53 als „Wächter des Genoms“ ist einer der wichtigsten Tumorsuppressoren.

In vielen primären menschlichen Tumoren wurden daher somatische Mutationen der Histonacetyltransferasen *CBP*, *p300* und *pCAF* beschrieben (Gayther et al., 2000; Ionov et al., 2004; Kishimoto et al., 2005). Missense-Mutationen von *p300* und Verlust der Heterozygotie am *p300*-Lokus sind mit Kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen, Magenkarzinomen und Glioblastomen assoziiert (Gayther et al., 2000; Giles et al., 1998; Muraoka et al., 1996).

Keimbahnmutationen von *CBP* führen zur Ausbildung des Rubinstein-Taybi-Syndromes, bei dem ein bis zu 350-fach erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Malignomen besteht (Gibbons, 2005; Murata et al., 2001; Petrij et al., 1995). Meist bilden die betroffenen Individuen kindliche Tumoren mit Ausgang in Derivaten der Neuralleiste aus. Auch Mäuse mit monoallelischer Inaktivierung von *CBP* entwickeln im Laufe der Zeit mit hoher Penetranz hämatologische Tumoren (Kung et al., 2000).

Darüber hinaus werden in Krebszellen die für Histon H4 Lysin 16 spezifischen Acetyltransferasen MOZ, MOF und MORF aus der MYST-Familie der Histonacetyltransferasen weniger häufig an DNA-repetitive Sequenzen gebunden (Fraga et al., 2005). Dieselben Histonacetyltransferasen sind auch in Leukämien durch die Bildung von Fusionsproteinen wie MOZ-CBP und MORF-CBP verändert, dabei ist ein Abfall der globalen Acetylierung von Histon H4 Lysin 16 zu beobachten (Di Croce, 2005; Fraga et al., 2005).

Histondeacetylasen (HDACs) haben ähnlich wie die DNA-Methylierung zwei entgegengesetzte Funktionen in der Kanzerogenese (Lund et al., 2004). Einerseits spielen HDACs eine wichtige Rolle in der Transkriptionsinaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Andererseits sind wichtige Tumorsuppressor-Mechanismen abhängig von der Funktion der HDACs.

Ein Beispiel ist die Abhängigkeit des Tumorsuppressors Rb von HDAC1 bei der Transkriptionsrepression von E2F-Zielgenen (Luo et al., 1998; Robertson et al., 2000). (E2F ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene des Zellzyklus aktiviert.) HDAC1 ist für die Zellzyklusregulation sehr wichtig: Embryonale Stammzellen mit einer homozygoten *HDAC1*-

Deletion weisen Proliferationsschwäche kombiniert mit erhöhten Leveln der Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 auf (Lagger et al., 2002). Mäuse ohne HDAC1 sind nicht lebensfähig.

HDAC2 ist in Geweben und Tumoren von Mäusen, denen der Tumorsuppressor APC fehlt, in Abhängigkeit vom Wnt-Signalweg und von c-Myc überexprimiert (Zhu et al., 2004). HDAC2 scheint die Krebszellen vor Apoptose zu schützen und Inhibition von HDAC2 durch Valproinsäure verringert die Adenombildung in Mäusen mit gestörtem APC (Zhu *et al.*, 2004).

Nicht zu vergessen ist natürlich auch das Zusammenspiel von HDACs mit anderen epigenetischen Mechanismen wie Histonmethylierung und DNA-Methylierung. HDACs werden z.B. von Histonmethyltransferasen benötigt, weil sie die Acetylgruppen, welche die Methylierung behindern, von den Histonen entfernen.

### 1.4.3 Die Bedeutung von Histonmethyltransferasen

In den letzten Jahren wurden immer mehr Histonmethyltransferasen identifiziert und ein Fortschritt im Verständnis ihrer Funktion erreicht. Mit diesem tiefgehenden Verständnis ging auch die Erkenntnis einher, dass viele Histonmethyltransferasen als SET-Domänen enthaltende Proteine mit der Kanzerogenese eng verbunden sind (Huang, 2002; Schneider et al., 2002).

Fehlerhaft stillgelegte Gene von Tumorsuppressoren in Krebszellen weisen eine heterochromatische Struktur auf, die unter anderem durch eine Steigerung der Histon-H3-Lysin-9-Dimethylierung und eine Verminderung der Histon-H3-Lysin-4-Dimethylierung gekennzeichnet ist (Nguyen et al., 2002).

Tabelle 1-5 zeigt einen Überblick über die derzeit bekannten mit der Kanzerogenese assoziierten Histonmethyltransferasen.

**Tabelle 1-5: Histonmethyltransferasen, die eine Rolle in der Kanzerogenese spielen (Schneider et al., 2002).**

Histonmethyltransferase	Bedeutung für die Kanzerogenese	Referenz
<b>SUV39-Familie</b>		
<i>Suv39h1/2</i>	<i>Suv39h1/2</i> double-knocked-out Mäuse zeigen late-onset B-Zell-Lymphome; möglicherweise Non-Hodgkin-Lymphome bei Menschen	(Peters et al., 2001)
<i>SETB1</i>	Expressionslevel in Tumorgewebe aus Pleomorphen Adenomen der Parotis erhöht	(Aniello et al., 2006)
<i>Eu-HMTase</i>	Expressionslevel in Tumorgewebe aus Pleomorphen Adenomen der Parotis erhöht	(Aniello et al., 2006)
<b>SET1-Familie</b>		
<i>Mll (Hrx, Trx1, All1)</i>	Translokationen im Rahmen von Leukämien	(Ziemin-van der Poel et al., 1991)
	Partielle Duplikation bei Akuter Myeloischer Leukämie	(Schichman et al., 1994a; Schichman et al., 1994b)

	Deletionen in Exon 8 bei Akuten Lymphoblastischen T-Zell-Leukämien	(Lochner et al., 1996)
<i>Mll3 (Halr)</i>	Terminale Deletionen bei hämatologischen Neoplasien und bei Holoprosenzephalie	(Tan and Chow, 2001)
<i>Mll2</i>	In Zelllinien solider Tumoren amplifiziert	(Huntsman et al., 1999)
<i>Ezh2 (Enx1)</i>	In Tumorzelllinien (Mantelzelllymphome, Prostatakarzinom, Brustkrebs u.v.a.m.) hochreguliert und überexprimiert	(Bracken et al., 2003; Kleer et al., 2003; Raaphorst et al., 2003; Varambally et al., 2002; Visser et al., 2001)
	Expressionslevel korreliert mit einer schlechteren Prognose in Prostatakarzinomen und Mammakarzinomen	(Kleer et al., 2003; Varambally et al., 2002)
	Lokalisiert in Regionen, die kritisch für maligne myeloische Erkrankungen sind	(Cardoso et al., 2000)
<b>SET2-Familie</b>		
<i>Nsd1</i>	<i>ARA267a</i> , ein <i>Nsd1</i> -Homolog, kann beim Prostatakarzinom die Androgen-Rezeptor-Transaktivierung erhöhen	(Wang et al., 2001)
	In Akuten Myeloischen Leukämien bei Kindern mit <i>NUP98</i> fusioniert	(Jaju et al., 2001)
<i>Nsd2 (MMSET, WHSC1)</i>	<i>WHSC1/MMSET</i> ist in Multiplen Myelomen transloziert und mit IgH fusioniert	(Malgeri et al., 2000; Stec et al., 1998)
<i>Nsd3 (WHSC1L1)</i>	<i>WHSC1L1</i> in Zelllinien aus Karzinomen, v.a. aus primären Mammakarzinomen, rearrangiert	(Stec et al., 2001)
	In Akuten Myeloischen Leukämien mit <i>NUP98</i> fusioniert	(Schneider et al., 2002)

Histonmethyltransferase	Bedeutung für die Kanzerogenese	Referenz
<b>RIZ-Familie</b>		
<i>Riz (Prdm2)</i>	Keine <i>Riz1</i> -Expression in einem breiten Spektrum menschlicher Karzinome, z.B. der Brust	(Abbondanza et al., 2000)
	<i>Riz1</i> -knockout-Mäuse entwickeln diffuse B-Zell-Lymphome und ein breites Spektrum ungewöhnlicher Tumoren (Magenkarzinome, Fibrosarkome, Lungenadenokarzinome, Lipome, Hypophysentumoren, Hämangiosarkome)	(Steele-Perkins et al., 2001)
	Missense-Mutationen in menschlichen Tumorgeweben und -zelllinien	(Steele-Perkins et al., 2001)
	<i>Riz</i> -Lokus in Tumoren der Brust, der Leber, des Kolons und neuroendokrinen und lymphoiden Tumoren deletiert/transloziert	(Buyse et al., 1996)
	Frameshift-Mutationen in Mikrosatelliten-instabilen Karzinomen des Kolons, des Magens und des Endometriums	(Piao et al., 2000)
<i>Blimp-1</i>	In B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen deletiert	(Mock et al., 1996)
<i>Mell</i>	Aktivierung der Transkription bei Translokationen in Akuten Myeloischen Leukämien und beim Myelodysplastischen Syndrom	(Mochizuki et al., 2000)
<i>Pfm1</i>	Markiert einen Tumorsuppressorlokus auf Chromosom 12	(Yang and Huang, 1999)
<i>MDS1-EVII</i>	<i>EVII</i> ist in Myeloischen Leukämien überexprimiert	(Fears et al., 1996)



Das Polycomb-Gruppen-Protein **EZH2** ist Teil des Histonmethyltransferasen-Komplexes PRC2 (EED-EZH). Dieses Enzym, das sowohl für die Zellproliferation als auch für die Zellzyklus-Kontrolle von Bedeutung ist, ist in vielen Tumoren überexprimiert (Bracken *et al.*, 2003; Kleer *et al.*, 2003; Raaphorst *et al.*, 2003; Varambally *et al.*, 2002). Der Expressionslevel dieser Histonmethyltransferase korreliert außerdem mit einer schlechteren Prognose bei Prostatakarzinomen (Varambally *et al.*, 2002) und Mammakarzinomen (Kleer *et al.*, 2003). In verschiedenen Karzinomarten ist der *Ezh2*-Lokus amplifiziert (Bracken *et al.*, 2003). Eine erzwungene Überexpression führt überdies auch im Experiment zu einer gesteigerten Zellproliferation (Visser *et al.*, 2001). In schon transformierten Prostatakrebszellen ist durch die RNAi-vermittelte „Stilllegung“ von *Ezh2* oder *Eed* ein Stillstand der Proliferation zu beobachten (Bracken *et al.*, 2003; Varambally *et al.*, 2002). Der onkogene Mechanismus, welcher der *Ezh2*-Überexpression *in vivo* zugrunde liegt, ist noch unbekannt (Lund *et al.*, 2004). Eine Endstrecke der *Ezh2*-Überexpression könnte die Repression von Tumorsuppressoren durch EZH2 sein, wie z.B. die Repression des Gens für den Tumorsuppressor PSP94 in der Prostata (Beke *et al.*, 2007). Durch Analyse der Verteilung der H3-K27-Methylierung im Genom von Gewebe aus aggressiven, disseminierten Prostatakarzinomen konnten außerdem 14 Zielgene ausgemacht werden, deren Repression durch EZH2 sowohl in Mammakarzinomen als auch in Prostatakarzinomen mit einer schlechten Prognose einhergeht (Yu *et al.*, 2007).

*SU(Z)12* (auch bekannt als *KIAA0106*, *JJAZ1* oder *ChET9*), eine weitere Komponente des Komplexes PRC2, ist in endometrialen Stromatumoren häufig rearrangiert und mit *JAZF1* fusioniert (Koontz *et al.*, 2001). Daher fällt es unter die Kontrolle des *JAZF1*-Promotors und wird dadurch aktiviert. Außerdem ist *SU(Z)12* auch in Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen und Leberkarzinomen hochreguliert (Kirmizis *et al.*, 2003).

Im Unterschied zu *Ezh2* und *SU(Z)12* führt eine weitere Komponente von PRC2, *Eed*, bei verminderter Expression zu einer erhöhten Inzidenz an karzinogen-induzierten T-Zell-Lymphomen (Richie *et al.*, 2002).

Die Kenntnisse über den Zusammenhang des Expressionslevels der verschiedenen Komplexkomponenten mit Karzinomen haben zu der Theorie geführt, dass die Störung der Stöchiometrie der verschiedenen Komponenten durch die Bildung dysfunktioneller Komplexe ausreichend für die Entstehung von Krebs sein könnte (Cao and Zhang, 2004).

Das Gen einer anderen Histonmethyltransferase, **MIII** (Engl.: Mixed lineage leukemia gene, auch *Hrx* oder *All1*), eine Histon-H3-Lysin-4-spezifische Methyltransferase (Milne *et al.*,

2002; Nakamura et al., 2002) und das menschliche Homolog zu *Drosophila* Trithorax, ist in akuten Leukämien häufig transloziert (Djabali et al., 1992). Allein bis zum Jahr 2001 waren mindestens 30 Translokationen in menschlichen Malignomen bekannt, an denen *MLL* beteiligt war (Ayton and Cleary, 2001). Die bei der Translokation entstehenden Fusionsproteine haben in transgenen Mäusen onkogenes Potential (Corral et al., 1996; Dobson et al., 1999). Interessanterweise verlieren alle Fusionsproteine ihre C-terminale SET-Domäne und behalten trotzdem ihre transkriptionsaktivierende Kapazität (Lund et al., 2004). Wie die teilweise sehr verschiedenartigen Translokationen zur gleichen Endstrecke der onkogenen Transformation führen, ist noch nicht bekannt. Eine mögliche Rolle könnte die Dimerisierung des Fusionsproteins spielen (So et al., 2003). Welche Zielproteine im speziellen dereguliert werden, ist aber noch unklar. *HoxA7* und *HoxA9*, beides bekannte MLL1-Zielgene, sind jedenfalls beide für die Induktion einer Leukämie durch MLL-Fusionsproteine erforderlich (Ayton and Cleary, 2003).

Die für Histon H3 Lysin 9 spezifische Methyltransferase **SU(VAR)3-9** in *Drosophila* und die Orthologe bei Mensch und Maus assoziieren mit zahlreichen Proteinen, die den Zellzyklus regulieren, wie z.B. pRB (Nielsen et al., 2001; Vandel et al., 2001), PcG-Proteinen (Sewalt et al., 2002) und SMADs (Frontelo et al., 2004). Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine Störung der Funktion von SU(VAR)3-9 zur malignen Entartung führen kann.

Beispielsweise sind Mäuse, denen beide *Suv39*-Homologe fehlen, anfällig für chromosomale Instabilitäten und entwickeln in 30% der Fälle im Alter von 9 bis 15 Monaten B-Zell-Lymphome, die den menschlichen Non-Hodgkin-Lymphomen ähneln (Peters et al., 2001). Der Karyotyp der Tumorzellen ist dabei extrem hyperploid.

In Tumoren vorkommende Mutanten von pRB können keine SUV39H1-Proteine mehr binden, was die Relevanz dieser Verbindung unterstreicht (Nielsen et al., 2001). Da pRB SUV39H1 physiologischerweise zu den Promotoren der E2F-responsiven S-Phasen-Gene leitet, wo SUV39H1 diese dann durch Methylierung an H3-K9 reprimiert und die Differenzierung einleitet (Ait-Si-Ali et al., 2004), führt eine ausbleibende Assoziation von pRB und SUV39H1 zwangsläufig zu fortlaufenden Zellteilungen und zur Inaktivierung eines der am besten charakterisierten Tumorsuppressor-Pathways (Huang, 2002).

Wichtig im Zusammenhang der Kanzerogenese erscheint auch die Funktion von *Suv39h1/2* als Regulator der Telomerlänge (Garcia-Cao et al., 2004), da diese für die immortale Zelle von grosser Bedeutung ist. Zellen, bei denen *Suv39h* fehlt, weisen aufgrund der verminderten

H3-Lysin-9-Di- und -Trimethylierung eine verminderte Assoziation von HP1 mit den Telomeren auf, was zur Telomereelongation führt (Garcia-Cao *et al.*, 2004).

**RIZ1** (Retinoblastoma interacting zinc-finger protein) war das erste Protein mit einer SET-Domäne, das aufgrund seiner Interaktion mit pRB als Tumorsuppressor identifiziert wurde (Chadwick *et al.*, 2000; Steele-Perkins *et al.*, 2001). Das entsprechende Gen liegt auf Chromosom 1 in einer der am häufigsten deletierten Regionen in menschlichen Karzinomen (Buyse *et al.*, 1996). *Riz1* ist in einer Vielzahl von Tumoren (Mammakarzinom, Leberkarzinom, Kolonkarzinom, Lungenkarzinom, Lymphome, Melanome, Magenkarzinom, Neuroblastome und Osteosarkome) durch Mutationen oder DNA-Methylierung inaktiviert (Chadwick *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2001; He *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999; Oshimo *et al.*, 2004; Poetsch *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2002). Besonders interessant ist dabei, dass bei den karzinomspezifischen Mutationen die Histonmethyltransferaseaktivität von RIZ1 reduziert ist oder gänzlich fehlt - ein Hinweis auf die wichtige Rolle dieser Enzymaktivität bei der Tumorsuppression (Kim *et al.*, 2003).

Ein noch zu untersuchender Punkt ist die Tatsache, dass verschiedene SET-Domänen-Proteine in einer karzinogenen und in einer karzinopräventiven Form existieren. Bei den Genen für RIZ und MDS-EVI1 wird dies durch die Verwendung zweier Promotoren erreicht, die zur Expression von Enzymisofomen führen, welche entweder eine SET-Domäne enthalten oder nicht. Diese Erkenntnis führte zur Aufstellung einer sogenannten Ying-Yang-Theorie, nach der Krebs durch die Störung des natürlichen Gleichgewichts zwischen den SET-enhaltenden und SET-losen Proteinisofomen entsteht (Huang, 2002), so dass die Expression der onkogenen die der tumorsuppressiven Isoform überwiegt.

## 1.5 MODULATOREN DER EPIGENETIK: EPIGENETISCHE THERAPEUTIKA?

Epigenetische Markierungen können leicht verändert und durch Umweltreize wie Ernährung und Medikamente oder auch Hormone beeinflusst werden. Eine Diät, die arm an Methylgruppendonatoren wie Folat und Methionin ist, kann beispielsweise den Methylierungslevel der DNA beeinflussen (Curtin *et al.*, 2004). Auf diese Weise trägt die Ernährung zur Entstehung von Arteriosklerose, Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskulären Erkrankungen oder sogar Krebs bei (Curtin *et al.*, 2004; Friso and Choi, 2002; Waterland and Jirtle, 2004; Zaina *et al.*, 2005).

Auch kanzerogene Stoffe aus unserer Umwelt wie z.B. Arsen oder Benzpyrene können über epigenetische Mechanismen wirken (Rossman, 2003).

Diese Beispiele verdeutlichen das Zusammenspiel von Genetik, Epigenetik und Umwelt in der Pathogenese vieler Erkrankungen. Gleichzeitig zeigen sie aber auch die Möglichkeit auf, durch Änderung von Ernährung oder Einsatz von Therapeutika regulierend in epigenetische Mechanismen einzugreifen.

Das Wissen um die mögliche Reversibilität epigenetischer Zustände hat zu neuen Therapieoptionen geführt. Mittlerweile sind Substanzen bekannt, die die DNA-Methylierung und Histondeacetylasen beeinflussen. Einige dieser Stoffe befinden sich bereits in Phase 3 der klinischen Erprobung.

2004 war ein spezifischer Inhibitor einer Protein-Arginin-Methyltransferase entdeckt worden, AMI-1, ein symmetrisches sulfoniertes Harnstoffderivat (Cheng *et al.*, 2004a).

Bei allen Erfolgen auf diesem neuen Gebiet gab es aber bis zum Beginn dieser Arbeit keinen Stoff, der mit in Tumoren dysregulierten für Lysin spezifischen Histonmethyltransferasen interagierte.

Im folgenden werden daher nur die bisher gängigen Hemmstoffe von DNA-Methyltransferasen und Histondeacetylasen cursorisch besprochen.

### 1.5.1 DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

Schon 1964 wurden die ersten der heute am umfassendsten von allen epigenetischen Therapeutika eingesetzten DNA-Methyltransferase-Inhibitoren entdeckt (SORM *et al.*, 1964). Dies sind die Azanukleoside 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin (klinisch: Decitabine) (Goffin and Eisenhauer, 2002).

Beide Nukleosidanaloga werden zunächst zu Deoxynukleotidtriphosphaten umgewandelt und anschließend anstelle von Cytosinen in die DNA eingebaut. Daher sind sie auch nur in Zellen

aktiv, die sich in der S-Phase befinden. Einmal in die DNA eingebaut, wirken sie stark hemmend auf die Methylierung der DNA (Jones and Taylor, 1980). Die DNA-Methyltransferasen binden irreversibel an DNA, die diese Nukleosidanaloga und auch die modifizierten Basen der neueren DNA-Methyltransferaseinhibitoren enthält (Juttermann et al., 1994; Santi et al., 1983; Zhou et al., 2002). Es bildet sich ein stabiles Muster demethylierter DNA aus, das über Zellteilungen hinweg bestehen bleibt (Jones *et al.*, 1980).

5-Aza-2'-deoxycytidin wirkt außerdem nicht nur auf die DNA-Methylierung. Es wurde gezeigt, dass es Gene mit nicht methyliertem Promoter aktiviert und zu einer verstärkten H3-Acetylierung und H3-Lysin-4-Methylierung führt. Die in Krebszellen vermehrte Dimethylierung von Histon H3 Lysin 9 wird signifikant verringert (Nguyen *et al.*, 2002).

Die antitumorösen Effekte der Nukleosidanaloga sind also eine Reexpression stillgelegter Gene (Bender et al., 1998), zelluläre Differenzierung und Proliferationsstillstand (Attadia, 1993).

Für 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin konnte in klinischen Tests eine vielversprechende antileukämische Aktivität und eine gute Wirkung bei der Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms nachgewiesen werden (Issa, 2003; Issa and Kantarjian, 2005), wohingegen die antitumoröse Wirkung gegenüber soliden Tumoren nicht überzeugend war (Goffin *et al.*, 2002). Ein weiterer Nachteil von 5-Aza-2'-deoxycytidin sind seine Toxizität (Juttermann *et al.*, 1994) und seine mutagenen Effekte *in vivo* (Jackson-Grusby et al., 1997). Beide Nukleosidanaloga sind außerdem chemisch instabil und nicht peroral verabreichbar.

Zebularin und Procainamid sind neuere DNA-Methyltransferase-Inhibitoren. Zebularin ist in Wasser stabil, kann peroral verabreicht werden und wird in Krebszellen effektiver als in nicht transformierte Zellen aufgenommen (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004b).

Neben diesen neuen potentiellen Medikamenten konnte eine DNA-Methyltransferase inhibierende Aktivität einiger Isolate aus Grünem Tee nachgewiesen werden (Fang et al., 2003). Außerdem hemmen Psammaphline aus dem Schwamm *Pseudoceraina purpurea* sowohl HDACs als auch DNA-Methyltransferasen (Pina et al., 2003). Tests mit Antisense-Oligonukleotiden der DNA-Methyltransferase DNMT1 zeigten schließlich eine inhibierende Wirkung (Yan et al., 2003).

Ziele für die weitere klinische Testung der DNA-Methyltransferase-Inhibitoren könnten z.B. deren Kombination mit HDAC-Inhibitoren sein, mehrere Studien zeigten bisher schon einen synergistischen Effekt beider Substanzgruppen (Belinsky et al., 2003; Bovenzi and Momparler, 2001; Cameron et al., 1999; Shi et al., 2003; Yang et al., 2001).

### 1.5.2 Histondeacetylase-Inhibitoren

Die Zahl der designten und identifizierten HDAC-Inhibitoren wächst stetig. Die wichtigsten, mittlerweile in Phase 1 und 2 der klinischen Erprobung, sind: Phenylbutyrat, Phenylacetat, SAHA (Suberoylanilidhydroxaminsäure), Depsipeptid, Trapoxin A, Apicidin und Valproinsäure (Egger et al., 2004; Johnstone, 2002). Sie werden peroral und intravenös verabreicht und wirken sowohl gegen solide Tumoren als auch gegen Leukämien in von Patienten gut tolerierten Dosen (Marks and Dokmanovic, 2005). Aufgrund seiner Toxizität kann der erste identifizierte HDAC-Inhibitor TSA (Trichostatin A) nicht als Therapeutikum eingesetzt werden, er stellt aber ein weitverbreitetes Hilfsmittel zur Erforschung epigenetischer Zusammenhänge in der Wissenschaft dar (Vanhaecke et al., 2004).

HDAC-Inhibitoren induzieren Differenzierung, Wachstumsstillstand und/oder Apoptose in Tumoren und in transformierten Zellen, die in Kultur gehalten werden (Egger *et al.*, 2004). Eine Hypothese, die dieses Phänomen erklären soll, ist die, dass durch die Akkumulation von acetylierten Proteinen und v.a. Histonen vorher epigenetisch stillgelegte Gene induziert und hochreguliert werden. So wird z.B. das Gen *p21* (ein Tumorsuppressor) in mit HDAC-Inhibitoren behandelten Tumorzellen auch in der Abwesenheit des normalerweise für seine Aktivierung wichtigen *p53* exprimiert (Xiao et al., 1999). Da P53 als „Wächter des Genoms“ ebenfalls ein Tumorsuppressor ist, dessen Funktion in vielen Tumoren verloren gegangen ist, ist diese Tatsache doppelt wichtig.

Ein Ziel für die Zukunft bleibt die Entwicklung von Therapien, die gezielt bestimmte HDACs ansprechen und nicht wie die heutigen Stoffe global auf sehr viele der HDACs wirken.

## 2 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, einen potenten Hemmstoff der Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 zu finden. Dies ist besonders interessant, weil sich in den letzten Jahrzehnten gezeigt hat, dass nicht nur allein die Basenabfolge im Genom einer Zelle für deren Phänotyp verantwortlich ist, sondern dass auch die Genexpression regulierende Netzwerke eine Rolle spielen. Dazu gehört die posttranslationale Modifikation der Histon-N-Termini.

Eine Missregulation bestimmter histonmodifizierender Enzyme kann zur malignen Entartung von Zellen führen oder auch zur Entstehung verschiedener chronischer Krankheiten.

Mit dem wachsenden Verständnis der molekularen Grundlagen von Krankheiten ergeben sich neue Therapiemöglichkeiten. An vielen Stellen, von Rezeptoren über Signalkaskaden bis zu intrazellulären Enzymen, kann mittlerweile erfolgreich in die Regulation von Zellen eingegriffen werden. Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACs), als Beispiel für Substanzen, die an den Enzymen der posttranslationalen Histonmodifikation angreifen, befinden sich in der klinischen Anwendung zur Behandlung von malignen Tumoren.

Als diese Arbeit begonnen wurde, war aber noch kein Hemmstoff einer Histonmethyltransferase bekannt. Gerade ein solcher Stoff könnte aber grosse klinische Relevanz haben, da die Histonmethylierung eine besonders langlebige posttranslationale Modifikation ist und über längere Zeiträume zu einer gleichbleibenden Genexpression führt.

Es lag die Hypothese nahe, dass, wenn es Hemmstoffe anderer posttranslational arbeitender Enzyme gibt, es auch Hemmstoffe von Histonmethyltransferasen gäbe.

Um diese Hypothese zu testen, sollte eine Substanzbibliothek aus kleinen Molekülen mit einer Histonmethyltransferase gescreent werden. Die sich daraus ergebenden Inhibitoren sollten mit weiteren Histonmethyltransferasen auf ihre Spezifität geprüft werden. Ein *in vivo* Versuch im Zellsystem sollte sich anschließen.

Die bei einer solchen Suche gefundenen Inhibitoren stellen ein interessantes Instrument zur Untersuchung epigenetischer Mechanismen (posttranslationaler Modifikationen) dar. Daneben wäre es denkbar, dass sie nach eingehender Charakterisierung, Testung im Tiermodell und bei Erfüllung aller notwendigen Voraussetzungen als Therapeutikum dienen könnten.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

###### Gefäße/Säulen etc.:

1,5-ml-Reaktionsgefäße	Greiner
1,5-ml-, 3,5-ml- und 5-ml-Reagenzröhrchen	Sarstedt
15-ml- und 50-ml-Gefäße	Sarstedt
250-ml-Zentrifugationsgefäße	Corning
Silikonisierte 1,5-ml-Reaktionsgefäße	Biozym
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml/0,5 ml	Biozym und GeneAmp
Photometerküvetten	Sarstedt
Zellkulturschalen und -flaschen	Greiner
Drosophila-Kultur-Flaschen	FLY50-01
SDS-Einmalgelkassetten	Invitrogen
QuickSpin-Säulchen	Boehringer Mannheim
PolyPrep-Chromatographiesäulen	Biorad

###### Pipetten/Spritzen:

Pipettenspitzen	Sorenson, Molecular BioProducts
Pasteurpipetten	Roth
Spritzen und Zubehör	Becton Dickinson

###### Papier/Membranen/Filter/Filme:

Filterpapier Whatman 3 MM	Whatman
Hybond N + (PVDF)-Membran	Amersham Biosciences
Dialyseschläuche	Spectrum
Filter (0,45 µm und 0,22 µm)	Roth
Röntgenfilme	Fuji



**Beads etc.**

Chitin-Agarose- <i>beads</i>	NEB
Glutathion-Sepharose-4B	Pharmacia Biotech
Flag- <i>beads</i>	Sigma
Talon- <i>beads</i>	BD Biosciences

**3.1.2 Chemikalien und Enzyme**

Alle Chemikalien und Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Pierce (Bonn), Promega (Mannheim), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Ausnahmen: Amplify-Lösung (Amersham Biosciences), Entwicklerlösung für Western Blots/ECL (Amersham Biosciences), Kolloidales Coomassie (Novex, Invitrogen).

Radiochemikalien stammten von Amersham Pharmacia (Braunschweig).

Enzyme: Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A, PMSF) wurden von Sigma bezogen, Trypsin von Promega.

**3.1.3 Naturstoff-Bibliothek**

Grundlage für das Screening nach Modulatoren verschiedener Histonmethyltransferasen war eine Komponentensammlung des Hans-Knöll-Instituts für Naturstoffforschung. Diese Sammlung bestand aus 2976 verschiedenen Naturstoffen, welche in DMSO-Lösung in einer Konzentration von jeweils 1 µg/µl vorlagen. Von jeder Substanz war eine Menge von 10 µl vorhanden.

### 3.1.4 Medien

#### **Bakterien:**

Flüssiges und festes LB-Medium (Luria-Bertani) wurde nach Standardprotokollen hergestellt (BERTANI, 1951).

#### **SL2-Zellen:**

Schneiders *Drosophila* Medium, revised (Gibco Invitrogen)

10% FCS (fetales Kälberserum, Sigma, inaktiviert durch Inkubation bei 56°C für 20 min)

Glutamin

Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml)

#### **Sf9-Zellen:**

SF-900II-SFM (Gibco Invitrogen)

10% FCS (inaktiviert durch Inkubation bei 56°C für 20 min)

4 mM Glutamin

Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml)

#### ***Drosophila*:**

SIGMA Instant *Drosophila* Medium bzw. selbst hergestelltes Fliegenfutter (Rezept im Methodenteil unter 3.2.12)

### 3.1.5 Verwendete Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Für Proteinexpressionen wurde *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Stratagene) verwendet. (pLys: Chloramphenicolresistenz bei Konzentrationen unter 40 µg/ml, jedoch sensitiv bei Konzentrationen über 100 µg/ml.)

Genotyp: *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal λ* (DE3)

Für massenspektrometrische Versuche und Zellwachstumsassays wurden *Drosophila* SL2-Zellen verwendet.

Schmetterlingszellen (Sf9) wurden für Expressionen im Baculosystem benutzt.

### 3.1.6 Verwendete Fliegenstämme

Für die Testung des Chaetocineffektes wurden *Drosophila melanogaster*  $ln(1)w^{m4}/Su(var)3-9/+$  verwendet. Bei diesen Fliegen wurde das white-Gen, das im Normalfall für eine rote Augenfarbe kodiert, durch Bestrahlung in die Nähe von Heterochromatin transloziert und invertiert und unterliegt damit dem PEV (position effect variegation). Außerdem verfügen die Fliegen über eine zusätzliche *Su(var)3-9*-Kopie, die allerdings durch einen Heatshock-Promotor reguliert wird. Bei normaler Inkubationstemperatur (18-25 °C) wirkt sich diese Zusatzkopie phänotypisch nicht aus. Durch die Repression des white-Gens ist die normale Augenfarbe dieser Fliegen damit weiß bzw. rot-weiß gesprenkelt.

### 3.1.7 DNA-Konstrukte

Tabelle 3-1: Liste der verwendeten DNA-Konstrukte.

<b>Name: Insert (in Vektor)</b>	<b>Besonderheit / Bemerkung</b>	<b>Bezogen von...</b>
SU(VAR)3-9 wt (pET-15b)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Talon- <i>beads</i>	Birgit Czermin
SU(VAR)3-9 Deletionsmutante $\Delta$ 213 (pET-15b)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Talon- <i>beads</i>	Birgit Czermin
E(z)-flag (pFastBac 1)	Baculovirus-Herstellung, N-terminaler flag- <i>tag</i>	Birgit Czermin
ESC (pFastBac HT B)	Baculovirus-Herstellung, N-terminaler 6*his- <i>tag</i> und HA- <i>tag</i>	Birgit Czermin
SU(Z)12 (pFastBac HT B)	Baculovirus-Herstellung, N-terminaler 6*his- <i>tag</i>	Birgit Czermin
PR-SET7 (pMyb)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Chitin- <i>beads</i>	Volker Seitz
SUV39H1 (pGEX 2T)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Glutathion- Sephrose 4B- <i>beads</i>	Stephen Rea
DIM-5 (pGEX 2T)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Glutathion- Sephrose 4B- <i>beads</i>	Eric Selker
mG9a (pGEX 4T-3)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Glutathion- Sephrose 4B- <i>beads</i>	Yoroshi Shinkai
SET 7/9 full length (pGEX KG), 52-366 (pGEX 6P1)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Glutathion- Sephrose 4B- <i>beads</i>	Jon Wilson
hSET 7/9 (pET-15b)	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung über Talon- <i>beads</i>	Jeong-Ho Chang

### 3.1.8 Antikörper

Tabelle 3-2 zeigt die in Western Blots verwendeten Antikörper. Sekundärantikörper waren jeweils an Meerrettichperoxidase gekoppelt.

**Tabelle 3-2: Antikörper.**

Antikörper	Bezogen von...	Verdünnung im Western Blot	Zweitantikörper
$\alpha$ -H3-K9me3	Thomas Jenuwein	1:750	$\alpha$ -rabbit (1:10000)
$\alpha$ -H3-K4me2	abcam	1:1000	$\alpha$ -rabbit (1:10000)

### 3.1.9 Geräte

**Tabelle 3-3: Geräte mit ihren Bezugsquellen.**

Gerät	Bezugsquelle
-80 °C-Schränke	GFL
Autoklav	H+P
Bakterieninkubator/Schüttler	New Brunswick Scientific
Chromatographiesystem „Äkta“	Amersham Pharmacia Biotech
Drehrad	neoLab
Drosophila-Inkubator	RUMED Rubarth Apparate GmbH
Entwickler für Röntgenfilme	Agfa
Filmkassetten	Appligene
Geldokumentationssystem	Pharmacia Biotech
Gelladespritzen	Hamilton
Geltrockner	BioRad
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 30 ml)	
Laborschüttler	Roth
Labor-Tischzentrifuge	Eppendorf (Modell 5415 C) Heraeus (Biofuge pico)
Labor-Zentrifugen	Sorvall (Modell RC5C) Heraeus/Kendro (Cryofuge 6000i)
Lichtmikroskope Zellkultur und Drosophila	Zeiss
Lyophilisator	Eigenbau Werkstatt Butenandt-Institut
Mikroliterpipetten	Gilson

pH-Meter	Mettler Toledo
Power Supplies	Pharmacia, Consort, BioRad
Reinstwasseranlage	Elga Labwater
Rotoren	SS34, Super-LiteGSA (Sorvall DuPont), Ti50, TLA55 (Beckmann)
Rührer	Heidolph
SDS-Gelkammern und Western Blot-System	Novex
Sterilwerkbänke	PMF
Szintillationszähler mit Drucker	Beckman
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschallgerät	Branson
Ultrazentrifugen	Beckman Coulter (Optima Max-E und Optima LE-80K)
UV-Meter (Photometer)	Pharmacia Biotech
Vortexer	Bachofer
Wärmeschrank 26 °C	LMS
Wärmeschrank 37 °C	Memmert
Wasserbad	Braun

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 Arbeiten mit Proteinen

Proteine wurden im Regelfall bei -80 °C gelagert (PR-SET7 bei -20 °C) und während der Experimente auf Eis gehalten.

Die Proteaseinhibitoren Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A (jeweils 1 µg/µl), PMSF (0,2 mM) und das Reduktionsmittel DTT (1 mM) wurden jeweils frisch zu den Puffern gegeben.

#### 3.2.1.1 Protein-Analyse mittels SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteingemischen wurde das Gelsystem der Firma Novex verwendet, das aus zwei miteinander verbundenen Plastikplatten bestand. Zwischen diese Platten wurde zuerst das Trenn- und nach dessen Polymerisation das Sammelgel eingegossen. Pro Gel wurden circa 6 ml Trenngel und 2,5 ml Sammelgel verwendet.

##### Trenngel (10%):

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

##### Sammelgel (5%):

1,55 ml	Wasser
0,26 ml	Acrylamidmix (30/0,8)
0,65 ml	Tris 1 M pH 6,8
12,5 µl	SDS 20%
12,5 µl	APS 20%
2,5 µl	TEMED

Zur Herstellung von Gelen mit anderen Sammelgel-Prozentigkeiten (z.B. 7,5%, 15% oder 17,5%) wurde die Menge der eingesetzten Acrylamidlösung bei konstantem Endvolumen variiert.

Zu den Proteinproben wurde SDS-PAGE-Probenpuffer gegeben, so dass dessen Endkonzentration „1x“ betrug. Die Proben wurden dann bei 95 °C denaturiert (3 min) und mittels einer Spritze in die Probenauftragstaschen gegeben. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 40 bis 50 mA bzw. 190 V durchgeführt und beendet, wenn die Bromphenolblaubande des SDS-PAGE-Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine dienten Proteinmarker. Nach der Elektrophorese wurden die Plastikplatten getrennt und die Gele entweder mit Coomassie-Blau angefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

**SDS-Laufpuffer:**

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

**4x SDS-Probenladepuffer:**

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

**3.2.1.2 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau**

Nach Beendigung der Elektrophorese (3.2.1.1) wurden die anzufärbenden Gele für 10 min in der Fixierlösung geschüttelt. Anschließend erfolgte die Färbung schwenkend für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele mindestens 60 min in der Entfärbelösung geschüttelt. Zum schnelleren Entfärben wurde der Entfärbelösung etwas Zellstoffpapier zugesetzt (Bindung überschüssigen Coomassies), welches mehrmals erneuert wurde. Nach Erreichen des gewünschten Entfärbegrades wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems fotografiert, ausgewertet, und in einem Geltdrockner auf Whatman-Papier für 2 Stunden bei 80 °C getrocknet.



**Fixierlösung:**

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

**Coomassie-Färbelösung:**

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

**Entfärbelösung:**

10% (v/v)	Essigsäure
-----------	------------

**3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Zur Konzentrationsbestimmung von aufgereinigten Proteinen wurde ein Massenstandard von BSA verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen von BSA und der zu untersuchenden Proteine erstellt, dann wurden die Verdünnungen nebeneinander auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach der Färbung mit Coomassie-Blau wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems fotografiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den computergestützten Vergleich der Proteinbanden mit den Banden des BSA-Massenstandards, dessen Konzentration bekannt war.

**3.2.2 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli***

Zu 200 µl chemisch kompetenten *E. coli* (BL-21) wurde 1 µl Ligationsansatz, der die DNA für das jeweilige Protein in ein Plasmid ligiert enthielt, gegeben und das Gemisch für ungefähr 15 min auf Eis inkubiert. Um die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien zu ermöglichen, wurde der Reaktionsansatz für 1 min auf 42 °C erhitzt und dann durch Zugabe von 200 µl LB und Transfer auf Eis gekühlt. Nun wurde das Gemisch bei 37 °C unter Schütteln für 30 min inkubiert. Im Anschluß wurden die Bakterien auf LB-Platten mit 100 µg Ampicillin (Roth) und einem anderen, für das jeweilige Plasmid spezifischen Antibiotikum, ausplattiert und über nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Klone von der Platte geerntet werden.

### 3.2.3 Expression von Histonmethyltransferasen in BL-21

#### 3.2.3.1 His-tag

1. Tag:

1  $\mu$ l pET-15b-Plasmid wurde in 200  $\mu$ l BL-21(DE3)pLys-Zellen transformiert (siehe 3.2.2). Die Bakteriensuspension wurde auf Chloramphenicol-Ampicillin-LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2. Tag:

Mehrere Kolonien wurden von der Platte abgenommen und in 50 ml LB gegeben (mit 50  $\mu$ l Ampicillin, d.h. 5 mg und 15  $\mu$ l Chloramphenicol, d.h. 510  $\mu$ g). Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

3. Tag:

Jeweils 5 bis 10 ml der Vorkultur wurden zu 0,5 l LB plus Chloramphenicol (150  $\mu$ l) plus Ampicillin (500 $\mu$ l) gegeben. (Die Gesamtmenge des verwendeten LB war gewöhnlich 4 Liter.) Die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute geschüttelt bis die OD<sub>600</sub> über 0,8 lag. War dies der Fall, so wurden die Bakterien mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei 18 °C über Nacht weiterschüttelt.

4. Tag:

Die Bakterienkulturen wurden zentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 4 °C, Heraeus-Zentrifuge), das dabei entstehende Pellet in 40 ml Lysis Puffer (1 mM Imidazol enthaltend) resuspendiert, die Suspension in ein 50-ml-Gefäß überführt und bei -179 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Bakterien zur Zelllyse bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut (Dauer etwa 15-20 min), die Lösung wurde viskös. Nach Ultraschallbehandlung unter Eiskühlung (7 Mal je 30 Sekunden, Amplitude 60%), was durch das Aufbrechen der DNA zu einer Verflüssigung der Lösung führen sollte, wurde das Bakterienlysate in SS34-Zentrifugegefäße gegeben und der Zelldebris abzentrifugiert (18000 rpm, 30 min, 4 °C, Sorvall-Zentrifuge).

Nun wurden Talonbeads vorbereitet, indem sie vor Verwendung 2 Mal mit Lysis-Puffer (1 mM Imidazol enthaltend) gewaschen und dann 1:1 in Lysis-Puffer resuspendiert wurden.

Der Überstand der Zentrifugation wurde mit 1-2 ml Talonbeads-Puffergemisch versetzt und für 1-1,5 h im Kühlraum rotiert. Anschließend wurden die Talonbeads abzentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4 °C), nach Verwerfen des Überstandes in 5 ml Lysis-Puffer (1 mM Imidazol enthaltend) aufgewirbelt und in BioRad-Säulchen (15 ml Volumen) überführt. Es wurden

folgende Waschschritte mit steigenden Imidazol-Konzentrationen im Lysis-Puffer durchgeführt (jeweils 10 ml Puffer auf die Säule):

- dreimal Waschen mit 1 mM Imidazol im Lysis-Puffer
- einmal mit 5 mM Imidazol im Lysis-Puffer
- zweimal mit 15 mM Imidazol im Lysis-Puffer

Die Elution des an die *Talonbeads* gebundenen Proteins erfolgte durch Gabe von cirka 6 ml 100 mM Imidazolpuffer auf das BioRad-Säulchen und Auffangen der Tropfen für etwa zehn 0,5 ml-Fraktionen. Von jeder Fraktion wurden 30 µl entnommen und sowohl auf einem SDS-Gel analysiert als auch in einem HIM-Assay auf die jeweilige Aktivität getestet.

Die am höchsten konzentrierten und aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und dreimal 30 min gegen je 1 Liter Dialysepuffer dialysiert. Anschließend wurde Glycerin zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben, die Enzymlösung wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte je nach Protein bei -20 °C (PR-SET7) oder -80 °C (SU(VAR)3-9, E(z)-Komplex, G9a, DIM-5).

**Lysis-Puffer:**

20 mM Tris pH 8.0  
200 mM NaCl  
0.05% NP40  
1/5/15/100 mM Imidazol  
Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Aprotinin, PMSF, Pepstatin)

**Dialysepuffer:**

1 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM NaCl  
20 mM Tris HCl pH 8  
0,5 mM EGTA  
0,1 mM EDTA  
Proteaseinhibitoren (PMSF, DTT)

### 3.2.3.2 Intein-tag

Expressionen von Proteinen mit Intein-*tag* liefen sehr ähnlich zur Proteinexpression bei His-*tag* (3.2.3.1) ab. Unterschiede waren:

1. Tag:

Die BL-21-Zellen wurden mit dem jeweils passenden pMyb-Plasmid transformiert.

2. und 3. Tag:

Wie unter 3.2.3.1 beschrieben.

4. Tag:

Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien wurden diese in 20-40 ml Intein-Säulen-Puffer aufgenommen und wie unter 3.2.3.1 schockgefroren, aufgetaut, mit Ultraschall behandelt und der Zelldebris in der Sorvall-Zentrifuge vom Überstand abgetrennt und verworfen.

Die Chitinbeads (New England Biolabs) wurden vor Verwendung zweimal mit Intein-Säulen-Puffer gewaschen, dann wurde eine 1:1-Mischung aus Puffer und *beads* hergestellt.

3 ml dieses Puffer-*beads*-Gemischs wurden zum Überstand gegeben. Bei 4 °C erfolgte eine einstündige Rotation, anschließend wurden die Chitinbeads abzentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen.

Zum Waschen wurden die *beads* dreimal mit jeweils 10 ml Säulenpuffer aufgewirbelt und anschließend abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4 °C). Für die Elution wurden sie dann erneut mit Säulenpuffer versetzt und in ein BioRad-Plastiksäulchen gegeben. Daraufhin erfolgte die Zugabe von einmal 5 ml Elutionspuffer ohne DTT und einmal 1 ml Elutionspuffer mit DTT. Nun wurden, nachdem das Säulchen unten verschlossen worden war, 650 µl Elutionspuffer mit DTT zugegeben und das Säulchen mit einem Deckel verschlossen. Bei 4 °C wurde das Gemisch über nacht inkubiert.

5. Tag:

Zur Elution wurden 6 ml Elutionspuffer mit DTT auf die Säule pipettiert und Tropfen für etwa zehn 0,5-ml-Fractionen aufgefangen. Jeweils 30 µl wurden von jeder Fraktion weggenommen und auf einem SDS-Gel analysiert, außerdem wurde wiederum die Aktivität im HIM-Assay bestimmt.

Die am höchsten konzentrierten und aktivsten Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und je nach exprimiertem Protein bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt.

Eine Dialyse oder die Zugabe von Glycerin war hier nicht nötig.

**Intein-Säulen-Puffer:**

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

**Elutionspuffer ohne DTT:**

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

**Elutionspuffer mit DTT:**

Siehe obigen Elutionspuffer,  
DTT zu einer Endkonzentration von 35 mM dazugeben.

**3.2.3.3 GST-tag**

Auch die Expression von Proteinen mit *GST-tag* weist viele Ähnlichkeiten zu den unter 3.2.3.1 und 3.2.3.2 beschriebenen Protokollen auf.

Sie unterscheidet sich aber in folgenden Punkten:

1. Tag:

Die BL-21-Zellen wurden mit dem jeweils passenden pGEX-Plasmid transformiert.

2. und 3. Tag:

Wie unter 3.2.3.1 beschrieben.

4. Tag:

Nach dem Abzentrifugieren wurden die Bakterien in etwa 40 ml GST-Säulen-Puffer aufgenommen und wie unter 3.2.3.1 beschrieben schockgefroren, aufgetaut, mit Ultraschall behandelt und der Überstand in der Sorvall-Zentrifuge abgetrennt.

Die Glutathion-Sepharose-*beads* (Amersham Biosciences) wurden vor Verwendung zweimal mit GST-Säulen-Puffer gewaschen, dann wurde eine 1:1-Mischung aus GST-Säulen-Puffer und den *beads* hergestellt. Der Bakterienüberstand wurde in einem 50-ml-Gefäß mit 5 ml des 1:1-Gemischs versetzt und bei 4 °C für 2-4 Stunden rotiert. Die *beads* wurden anschließend abzentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen.

Die nun folgenden Schritte wurden alle unter Kühlung bei 4 °C durchgeführt.

Zum Waschen wurden die *beads* in Waschpuffer 1 aufgewirbelt und in ein 15-ml-Gefäß überführt. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten bei 4 °C auf dem Rotationsrad wurden sie abzentrifugiert (2000 rpm, 3 min, 4 °C). Danach wurden sie noch zweimal mit

jeweils cirka 10 ml Waschpuffer 1 aufgewirbelt, inkubiert und anschließend abzentrifugiert (2000 rpm, 3 min, 4 °C). Auf die gleiche Art erfolgten die anschließenden Waschschrte mit Waschpuffer 2 (dreimal: Aufwirbeln - Inkubieren für 2 min - Abzentrifugieren). Für die Elution wurden die *beads* dann auf dieselbe Weise dreimal mit Elutionspuffer ohne Glutathion versetzt, inkubiert und abzentrifugiert (2000 rpm, 3 min, 4 °C). Dann erfolgte die eigentliche Elution mit Elutionspuffer mit Glutathion. 2 ml Puffer wurden auf die *beads* gegeben und das Gemisch über Nacht bei 4 °C inkubiert.

5. Tag:

Die *beads* wurden abzentrifugiert (2000 rpm, 3 min, 4 °C) und vom Überstand 30 µl abgenommen, um ihn auf einem SDS-Gel zu analysieren, außerdem wurde die Enzymaktivität im HIM-Assay bestimmt. Der Rest des Überstandes wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C aufbewahrt. Die *beads* wurden noch zwei weitere Male je 2 Stunden mit Elutionspuffer mit Glutathion inkubiert, abzentrifugiert und der Überstand dann auf dieselbe Art behandelt.

Alle hier aufgeführten Puffer enthalten Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A, PMSF und 1mM DTT

**GST-Säulenpuffer:**

20 mM	Tris pH 8,0
300 mM	NaCl
0,5 mM	EDTA
0,5%	NP 40

**Waschpuffer 1:**

20 mM	Tris pH 8,0
1 M	NaCl
0,5 mM	EDTA
1%	NP 40

**Waschpuffer 2:**

20 mM	Tris pH 8,0
500 mM	NaCl
0,5 mM	EDTA
1%	NP 40

**Elutionspuffer ohne Glutathion:**

20 mM	Tris pH 8,0
150 mM	NaCl
0,5 mM	EDTA
0,05%	NP 40
12%	Glycerin

**Elutionspuffer mit Glutathion:**

Wie Elutionspuffer ohne Glutathion

20 mM	Glutathion
-------	------------

WICHTIG!! pH einstellen bei 7,5 bis 8,0

**3.2.4 HIM-Assay/HMT-Assay****3.2.4.1 „Spot-and-count“-Methode**

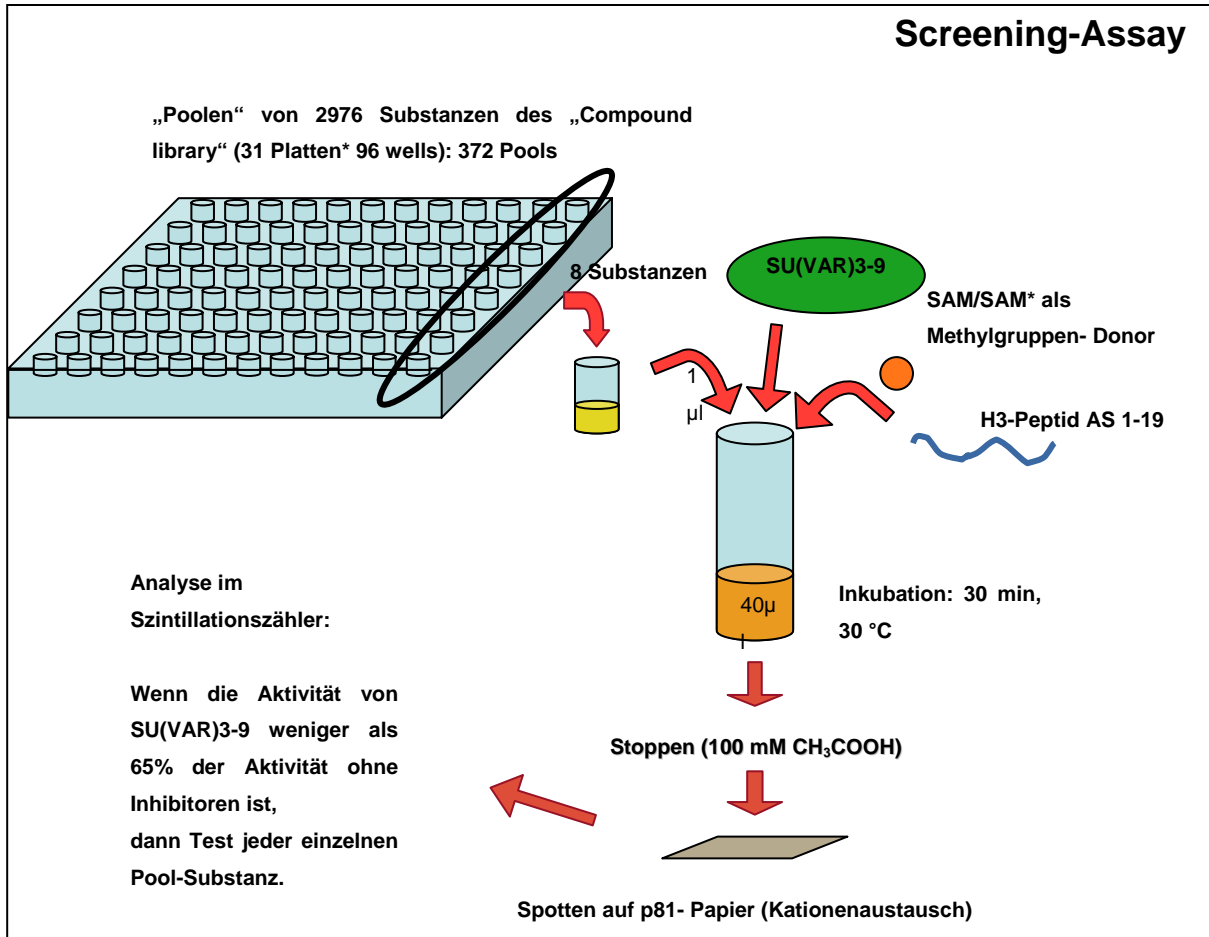
Histonmethyltransferaseassays nach der „*Spot-and-count*“-Methode dienen dazu, in rekombinant hergestellten Proteinen Methyltransferase-Aktivität zu detektieren. Ebenso eignen sie sich, um die (inhibitorische) Wirkung verschiedener Substanzen auf Histonmethyltransferasen zu testen.

**HMT-Assay (40µl):**

1 µg	H3-Peptid (bzw. 2 µg Histon H3, 10 µg Oktamer)
40 µM	S-Adenosyl-Methionin
7,5-12,5 nCi/µl	S-Adenosyl-L-[methyl- <sup>3</sup> H]-Methionin
1-20µl	Histonmethyltransferase (je nach Protein)
add 40 µl	Methyltransferase-Puffer (10 mM HEPES pH 7,6; 25 mM NaCl; 1 mM EDTA, 10% Glycerol)

Nach Mischen aller Assaykomponenten wurde die Reaktion durch Zugabe der Histonmethyltransferase gestartet. Bei den verschiedenen Experimenten wurde für 5 bis 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zupipettieren von Essigsäure auf eine Konzentration von 10 mM im Endvolumen gestoppt. Dann wurden 33 µl des Reaktionsansatzes auf p81-Filterpapier (*spot*) gegeben. Die Filterpapierchen wurden dreimal für jeweils 10 Minuten in HIM-Puffer (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,2) gewaschen und anschließend getrocknet. Der Einbau von <sup>3</sup>H-markierten Methylgruppen wurde nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen (*count*).

Die *Spot-and-Count*-Methode wurde unter anderem zum Screening einer Komponentensammlung auf Inhibitoren oder Aktivatoren von SU(VAR)3-9 verwendet (Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1: Ablauf des Screeningassays für Modulatoren der Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9.** Konzentrationen der Assaykomponenten: circa 8 µg SU(VAR)3-9, 1 µg der gepoolten Substanzen, 1 µg H3-Peptid (Aminosäuren 1-19 mit zusätzlichem Cysteinrest), 40 µM S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosyl[methyl-<sup>3</sup>H]methionin mit einer spezifischen Aktivität von 0,3 Ci/mmol.



### **3.2.4.2 Autoradiographische Methode**

Die autoradiographische Analyse der Histonmethyltransferaseaktivität diene v. a. der Visualisierung des Einbaus einer radioaktiv markierten Methylgruppe in Histon H3.

Das Reaktionsvolumen wurde dafür auf 20 µl beschränkt und der Assay mit 6,6 µl 4\*SDS-Ladepuffer anstatt mit Essigsäure gestoppt. Ansonsten entsprach der Assayaufbau dem unter 3.2.4.1 genannten. Histonmethyltransferasen und H3 im Assay wurden mittels eines 15%igen Geles aufgetrennt. Nach Gellauf, konventioneller Färbung und Dokumentation des Geles wurde dieses 30 min in Amplify-Lösung geschüttelt, getrocknet und bei -80 °C zur Belichtung auf einen Röntgenfilm gebracht. Mehrere Filme wurden unterschiedlich lange belichtet (mehrere Stunden bis Tage) und anschließend entwickelt.

### **3.2.4.3 Massenspektrometrische Methode**

Das Assayvolumen wurde auf 25 µl verkleinert und 2 µg H3 statt des H3-Peptids verwendet. Radioaktiv markiertes S-Adenosyl-Methionin wurde nicht zugegeben. Statt des Methyltransferasen-Puffers wurde Wasser verwendet. Der Assay wurde auf ein 17%iges Gel zur Separation der Histone aufgetragen und weiterhin wurde wie unter 3.2.10 verfahren.

### 3.2.5 Zellkultur

Die Kultur von *Drosophila* SL2-Zellen und Sf9-Zellen aus *Spodoptera frugiperda* erfolgte bei 26 °C im Inkubator. Für die Zellhaltung wurden Zellkulturflaschen verwendet, für Proteinexpressionen Schalen. Abhängig von der Dichte und Zahl der Zellen in Kultur wurden diese etwa alle 3 bis 5 Tage gesplittet und frisches Medium wurde zugegeben. Dabei wurden möglichst alle Zellen durch Beklopfen der Kulturflasche von der Oberfläche abgelöst. Ein Teil der Zell-Medium-Suspension wurde in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt, wobei die Verdünnung zwischen 1:3 und 1:10 betrug. Zwischen dem Splitten wurde täglich kontrolliert, ob die Zellen bereits konfluent gewachsen waren, adhären wuchsen und sich nicht in zu großer Zahl von der Oberfläche lösten oder ob eine Kontamination stattgefunden hatte. Bei Konfluenz und aufgrund zu hoher Dichte nicht mehr adhären Zellen wurde gesplittet. Kontaminierte Zellen wurden verworfen.

#### **Medium für SL2-Zellen:**

Schneiders *Drosophila* Medium, revised von Gibco Invitrogen  
mit 10% FCS (inaktiviert durch Inkubation bei 56 °C für 20 min) und Glutamin, Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) versetzt

#### **Medium für Sf9-Zellen:**

Sf-900 II SFM von Gibco Invitrogen  
mit 10% FCS (inaktiviert durch Inkubation bei 56 °C für 20 min) und 4 mM Glutamin, Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) versetzt

Für die Erstinfektion im Baculosystem wurde kein FCS zugegeben.

### 3.2.6 Proteinexpression von E(z)-Komplex im Baculo-System

1. Tag:

Für die Expression der Proteine des E(z)-Komplexes wurden Sf9-Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst auf 15-cm-Platten mit Sf-900-Medium ausgesät ( $1,2 \cdot 10^7$  Zellen pro Platte), dann wurde eine Stunde gewartet, bis sie sich abgesetzt hatten und das Sf-900-Medium abgesaugt und erneuert werden konnte (15 ml pro Schale). Für die Expression des E(z)-Komplex mussten die Zellen mit Viren für die entsprechenden Komplexkomponenten koinfiziert werden. Dazu wurden jeweils 600  $\mu$ l der verschiedenen Virenlösungen für die Komponenten E(z), p55, SUZ(12) und ESC gemischt und die Mischung dann auf die Zellen geträufelt.

Die Zellen wurden für eine Stunde langsam auf einem Schüttler geschwenkt, dann mit weiteren 10 ml Sf-900-Medium (plus 10% Serum) versetzt, und 2 bis 2,5 Tage bei 26 °C inkubiert.

3. Tag:

Die Zellen wurden mittels eines Gummischabers oder durch Auf- und Abpipettieren von den Zellkulturschalen abgelöst und zusammen mit dem Mediumüberstand in ein 250-ml-Gefäß überführt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 4 °C) und die Zellen nach Verwerfen des Überstandes in BC 300 + 0,1% NP40 resuspendiert. Für jede 15-cm-Platte einer Baculoinfektion wurden 0,5 ml Puffer verwendet, so dass sich z.B. nach einer Expression in 20 Platten die Zellen in 10 ml Puffer befanden. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen wurden die Zellen aufgeschlossen, anschließend wurde der Zelldebris abzentrifugiert (4000 rpm, 20 min, Hereuszentrifuge bei 4 °C). Der so erhaltene Überstand wurde als "Baculoextrakt" oder "Zellextrakt" bezeichnet. Er wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4. Tag:

Um E(z)-Komplex aufzureinigen, wurde eine Affinitätsreinigung über den Flag-tag von E(z) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein 1:1 Gemisch aus Flagbeads und BC 100 hergestellt. (400  $\mu$ l beads wurden vor Verwendung mehrmals mit jeweils frischem BC 100 gewaschen, indem sie mit dem Puffer aufgewirbelt und dann abzentrifugiert wurden (1500 rpm, 2 min, 4 °C). Zuletzt wurden 400  $\mu$ l BC 100 zu 400  $\mu$ l beads pipettiert.) Dann wurden 10 ml „Baculoextrakt“, 800  $\mu$ l 1:1-Gemisch aus beads und BC 100 (Sigma) und 10 ml BC 0 zusammenpipettiert und für 2 Stunden bei 4 °C rotiert. Anschließend erfolgten die Wasch- und Elutionsschritte:

- Abzentrifugieren der *beads* (1500 rpm, 5 min, 4 °C).
- Viermal Inkubation mit 1 ml BC 300 + 0,1% NP40 für jeweils 20 min bei 4 °C mit anschließender Zentrifugation (5 min, 3000 rpm, 4 °C).
- Zweimalige Aufnahme in 1 ml BC 100+NP 40, Mischen und Abzentrifugieren (1 min, 3000 rpm, 4 °C).
- Für die Elution wurden die *beads* mit 200 µl BC 100 ohne NP 40 versetzt, Flag-Peptid wurde hinzugegeben (Endkonzentration 200 ng/µl) und das Gemisch über Nacht bei 4 °C rotiert.

#### 5. Tag:

Die *beads* wurden mit dem Puffer in kleine BioRad-Säulchen übertragen, welche in Eppendorfgläser gestellt in der Tischzentrifuge zur Beschleunigung der Elution rotiert wurden (3000 rpm, 2 min, 4 °C). Das Eluat im Eppendorf-Gefäß wurde dann zur Analyse auf ein Gel aufgetragen und seine Methyltransferaseaktivität in einem HIM-Assay getestet. Nochmaliges Inkubieren in derselben Puffermenge für 30 min eluierte noch mehr Protein, allerdings in geringerer Konzentration. An den *beads* selbst blieben beträchtliche Mengen nicht-eluierten Proteins haften.

#### **BC Puffer:**

25 mM	HEPES pH 7,6
X mM	KCl
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5 mM	EGTA
0,5 mM	EDTA
10 % (v/v)	Glycerin

Für BC 300 wird 300 mM, für BC 100 100mM und für BC 0 kein KCl verwendet.

### 3.2.7 Behandlung von Zellen mit Chaetocin

Die Versuche wurden mit *Drosophila* SL2-Zellen sowohl in 12-Kammer-Platten als auch in 75 cm<sup>2</sup> (250 ml) oder 175 cm<sup>2</sup> (650 ml) messenden Zellkulturflaschen durchgeführt. 12-Kammer-Platten wurden verwendet, um die Toxizität bzw. Wirkung von Chaetocin auf das Zellwachstum in verschiedenen Zell- und Inhibitorkonzentrationen abzuschätzen oder um die Zellen mittels Immunfluoreszenz auszuwerten. Zellkulturflaschen wurden benutzt, wenn Histone isoliert und deren Modifikationen mittels Massenspektrometrie oder Western Blot analysiert werden sollten.

Zu Beginn eines jeden Experiments wurden Zellen in verschiedenen Behältnissen in jeweils gleicher Konzentration ausgesät. Bei 12-Kammer-Platten waren dies Konzentrationen zwischen 250000 Zellen pro ml und  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml, wobei die Kammern jeweils 1 ml enthielten. Für die massenspektrometrischen Experimente wurden mindestens  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml ausgesät, wobei für die 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen 30 ml und für die 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen 40 ml verwendet wurden.

Nachdem sich die Zellen innerhalb von 1-2 Stunden abgesetzt hatten, wurden verschiedene Verdünnungen von Chaetocin ins Medium pipettiert und durch längeres Schwenken gleichmäßig in diesem verteilt. Dann wurden die Zellen über einen Zeitraum von 1 bis 8 Tagen inkubiert, wobei das Medium über die gesamte Dauer belassen wurde.

Mit den 12-Kammer-Platten wurde wie unter 3.2.8 beschrieben verfahren, die Zellkulturflaschen wurden geerntet, die Histone sauer extrahiert und Histonmodifikationen mittels Massenspektrometrie analysiert.

### 3.2.8 Zellwachstumsassay

*Drosophila* SL2-Zellen, die wie unter 3.2.7 beschrieben mit Chaetocin behandelt worden waren, wurden täglich gezählt. Für die Zählung mussten die adhärenen Zellen vorübergehend vom Kulturflaschen- oder Kammerboden gelöst werden. Dazu wurde das Medium mehrmals auf und abpipettiert. Dann wurde eine geringe Menge der Zellsuspension entnommen (50 µl pro Kammer und 0,5 ml pro Kulturflasche) und mit 0,4%igem Trypanblau versetzt (Endkonzentration von Trypanblau 0,04%). 12,5 µl der Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und gezählt. Die aufgewirbelten Zellen in den Kulturflaschen setzten sich nach einiger Zeit wieder ab und wurden bis zur nächsten Zählung weiter inkubiert.

### 3.2.9 Saure Extraktion von Histonen

Für die Analyse der Wirkung von Chaetocin auf die Histonmethylierung *in vivo* wurden *Drosophila* SL2-Zellen wie zuvor beschrieben mit dem Inhibitor behandelt und die Histone dann sauer extrahiert und massenspektrometrisch oder mittels eines Western Blots analysiert. Um genügend Material für die Durchführung einer sauren Extraktion zu erhalten, waren zum Erntezeitpunkt mindestens  $10^8$  Zellen im gesamten Zellkulturgefäß notwendig. Die Extraktion der Histone verlief wie folgt:

Die SL2-Zellen wurden durch Schütteln in Lösung gebracht und in 50-ml-Gefäße überführt. Dann wurden sie abzentrifugiert (10 min, 1000 rpm, 4 °C). Die weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 2 ml kaltem PBS resuspendiert, in ein 15-ml-Gefäß übertragen und anschließend erneut zentrifugiert. 7,5 ml N-Puffer wurden hinzugegeben und die Suspension dann mit 500 µl N-Puffer plus Triton X 6% (30 µl Triton X 100% in 470 µl N-Puffer) versetzt (d.h. insgesamt 8 ml N-Puffer + 0,375% Triton X) und bei 4 °C für mindestens 10 Minuten rotiert.

Das Gemisch wurde vorsichtig auf 4 °C kalte Saccharosecushion in einem 50-ml-Gefäß geschichtet und dann durch die Cushion hindurchzentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde zum Waschen in 2 ml N-Puffer resuspendiert, in ein 15ml-Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Nun wurde 1 ml 0,4 M HCl (0,5 ml 0,8 M HCl in 0,5 ml PBS) zugegeben, das suspendierte Pellet in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und dieses 3 Stunden bis über Nacht bei 4 °C rotiert. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4 °C) und Überführen des Überstandes in ein anderes Gefäß, wurde das Pellet nochmals eine Stunde mit 0,4 M HCl inkubiert und hernach wie beschrieben verfahren. Die vereinigten Überstände wurden in Dialyseschläuche (6000-8000 MW, Durchmesser 1 cm) gegeben und dann dreimal eine Stunde oder über nacht gegen 100 mM Essigsäure dialysiert. Die dialysierten Lösungen wurden zumeist auf drei Eppendorf-Gefäße verteilt und auf Trockeneis schockgefroren. Dann erfolgte die Evaporation im Lyophilisator, die normalerweise einige Stunden benötigte. Der so erhaltene Proteinpuder wurde in 2\*Lämmli-Puffer gelöst und auf ein 17%iges Gel aufgetragen. Weiter wurde mit den Proben wie unter 3.2.10 oder 3.2.11 beschrieben verfahren.

**PBS (Phosphate buffered saline):**

140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,4 (mit HCl) einstellen	

**N-Puffer:**

10%	Saccharose
0,5 mM	EGTA pH 8
60 mM	KCl
15 mM	NaCl
15 mM	HEPES
1 mM	PMSF
5 µg/ml	Aprotinin
5 µg/ml	Leupeptin
5 µg/ml	Pepstatin A
1 mM	DTT

**Saccharose-cushion:**

Wird es dem N-Puffer hergestellt.

Der einzige Unterschied ist der höhere Saccharosegehalt von 20 %.

### 3.2.10 Massenspektrometrie

#### 3.2.10.1 Propionylierung und Trypsinverdau

Histone für die massenspektrometrische Analyse wurden zunächst mittels SDS-PAGE (17%-Gele für SL2-Zellen) separiert, fixiert (siehe 3.2.1.2), dreimal je fünf Minuten in monodestilliertem Wasser geschüttelt und dann mit SimplyBlue™ SafeStain für eine Stunde bei Raumtemperatur gefärbt. Die Entfärbung erfolgte wiederum mit monodestilliertem Wasser.

Die zu analysierenden Banden (hier H3) wurden ausgeschnitten, zerkleinert und in nicht-silikonisierten Eppendorf-Gefäßen weiter unter Schütteln mit dreimal 200 µl H<sub>2</sub>O für jeweils 15 min entfärbt. Die nun beschriebenen Schritte wurden durchgeführt, bis die Gelstücke vollständig entfärbt waren (zumeist 2-3 Mal):

- Einmal Waschen in 200 µl H<sub>2</sub>O für 15 min.
- Einmal Waschen in 200 µl 50% ACN (Acetonitril) 50% H<sub>2</sub>O für 15 min.
- Einmal Waschen in 200 µl 100% ACN für 15 min.

Nach dem letzten Schritt musste das Acetonitril verdunsten. Nun erfolgte die chemische Modifikation (Propionylierung) der Gelstücke. Es wurden nacheinander 5 µl Propionsäureanhydrid, 13 µl 1 M Ammoniumbicarbonat und 2 µl Natriumpropionat (als Katalysator) zu den Proben gegeben und das Gemisch wurde 5 min im Thermomixer bei 37 °C und 800-900 rpm geschüttelt. Anschließend wurden nochmals 40 µl Ammoniumbicarbonat zugegeben, wobei darauf zu achten war, dass die durch die Reaktion entstehenden Luftblasen entweichen konnten. Die so behandelten Proben wurden 1-3 Stunden bei 37 °C im Thermomixer bei 600 rpm inkubiert.

Für den Trypsinverdau wurden die Proben nochmals dreimal 20 min in jeweils 200 µl H<sub>2</sub>O gewaschen, dann einmal in 200 µl 50% ACN 50% H<sub>2</sub>O, dann einmal in 100% ACN. Dann wurden 1,2 µl Trypsin (Promega) in einer Konzentration von 200 ng/µl und 10 µl Ammoniumbicarbonat 100 mM (pH 8) zugegeben und das Gemisch für 10 min bei 37 °C und rpm geschüttelt. Anschließend wurde Ammoniumbicarbonat 100 mM zu einem Endvolumen von 40 µl hinzupipettiert. Die Reaktion wurde mindestens 3 Stunden bis über nacht im Thermomixer inkubiert.



### 3.2.10.2 Peptidextraktion

Für die Peptidextraktion aus den Gelstücken wurden die über nacht inkubierten Proben zunächst zentrifugiert, die Verdaulösung abgenommen, 30 µl Ammoniumbicarbonat 40 mM zupipettiert und dann nochmals 20 min geschüttelt (600 rpm, 37 °C). Die eigentliche Extraktion verlief folgendermaßen:

- Zentrifugation der Proben und Überführen des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß.
- Zweimal Zugabe von 40 µl ACN (Acetonitril) 100% und Inkubation unter Schütteln (600 rpm) für 20 min. Danach kurzes Abzentrifugieren der Gelstücke und Sammeln des Überstandes im neuen Eppendorfgefäß.
- Einmal Zugabe von 40 µl Ameisensäure 5% und Inkubation unter Schütteln (600 rpm) für 20-30 min. Danach Abzentrifugieren der Gelstücke und Sammeln des Überstandes.
- Zweimal Zugabe von 40 µl ACN (Acetonitril) 100% und Inkubation unter Schütteln (600 rpm) für 15 min. Danach Abzentrifugieren der Gelstücke und Poolen aller Überstände.

Die gepoolten Überstände wurden in Trockeneis schockgefroren und anschließend im Lyophilisator evaporiert. Sie wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.2.10.3 Zip-Tip-Präparation

Im Anschluß an chemische Modifikation (Propionylierung) und Trypsinverdau mussten die peptidhaltigen Proben für die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight) vorbereitet werden. Hierfür wurden sie in eine Matrix aufgenommen und auf ein target gebracht, mit dem sie ins Massenspektrometer eingebracht werden konnten.

Für die Vorbereitung einer Probe waren folgende Schritte notwendig:

Zunächst wurde die Probe aufgetaut und mit 10 µl 0,1 bis 1% TFA (Trifluoressigsäure) resuspendiert. Die ZipTip-Spitzen wurden auf 10-µl-Pipetten gesteckt und durch mehrmaliges langsames Auf- und Abpipettieren von 10 µl 50% ACN (Acetonitril)/50% Wasser gewaschen. Im Anschluß wurden die Spitzen mit 0,1% TFA äquilibriert, indem auch diese Lösung mehrmals auf- und abpipettiert wurde. Dann wurde die Probenlösung drei bis vier Male durch die ZipTip-Spitze gezogen und am Ende verworfen. Anschließend wurde wieder mit 0,1% TFA gewaschen, allerdings musste beim Abpipettieren der Lösung diese nun jeweils

verworfen werden, da sie sonst die TFA mit der Probenlösung verunreinigt hätte. Beim letzten Abpipettieren wurden etwa 5 µl Lösung in der ZipTip-Spitze belassen und diese von der Pipette genommen. In eine kleinere Pipettenspitze (2-µl-Pipette) wurde 1 µl Matrix aufgenommen. Die ZipTip-Spitze mit der adhärennten Probenlösung wurde auf diese Spitze gesteckt, dann wurde die Matrix durch die ZipTip-Spitze auf das Target pipettiert. Dabei sollte die Probe in der Matrix eluiert und mit auf das Target gebracht werden.

**Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure):**

1 Spatelspitze	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
50%	Acetonitril
0,6%	Trifluoressigsäure

Vortexen

Zentrifugieren

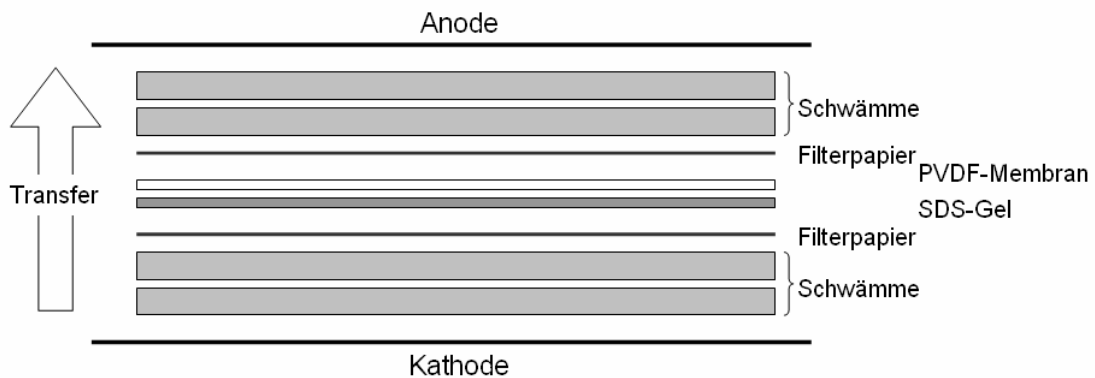
Nur den Überstand verwenden.

Wenn alle Proben auf das Target pipettiert waren, wurde gewartet, bis die Flüssigkeit bei Raumtemperatur verdunstet war, die Proben wurden dazu unter den Abzug gebracht. Im Anschluß daran konnte das Target ins Massenspektrometer eingebracht und die Proben analysiert werden.

### 3.2.11 Western Blot

Beim Western Blot wurden die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, auf der mit spezifischen Antikörpern Proteine mit entsprechenden Epitopen detektiert wurden.

Dazu wurde eine PVDF-Membran (Hybond P, Amersham Biosciences) auf Gelgröße zurechtgeschnitten, mit Methanol benetzt und zusammen mit dem SDS-Gel, Filterpapieren und vier bis sechs Schwämmen in Westernblotpuffer getränkt. Der Western Blot wurde folgendermaßen zusammengebaut:



**Abbildung 3-2: Aufbau des Western Blots.** Gel und Membran wurden aufeinander gelegt, wobei die PVDF-Membran auf Seiten der Anode lag. Auf beide Seiten wurden Filterpapiere und jeweils 2 bis 3 Schwämme geschichtet. Dann wurde die Box verschlossen.

Bei einer Stromstärke von 400 mA bzw. bei circa 100 V wurde der Blot für etwa eine Stunde unter Kühlung in Westernblotpuffer durchgeführt.

#### Westernblotpuffer

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

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

**Primärantikörperlösung:**

Antikörper in 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver, in PBS-Tween gelöst;

Verdünnung je nach Antikörper von 1:500 bis 1:2000

**Sekundärantikörperlösung:**

Antikörper, mit Meerrettichperoxidase gekoppelt (in 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver, in PBS-Tween gelöst);

Verdünnung: 1:10 000

Nach dem Waschen wurden die Protein-Antikörper-Komplexe des Western Blot mit dem ECL-Kit<sup>TM</sup> (*enhanced chemoluminescence*, Western Blotting Detection Reagent; Amersham Biosciences) autoradiographisch nachgewiesen. Die Membran wurde hierzu auf ein Stück Haushaltsfolie gelegt und für eine Minute mit 1 ml eines 1:1-Gemisches aus Lösung A und Lösung B benetzt. Dann wurde sie in Folie verpackt und in einer Filmkassette gegen einen Röntgenfilm (Super RX, Fuji) exponiert. Je nach gewünschter Signalstärke wurde zwischen einigen Sekunden und 30 Minuten exponiert.

### 3.2.12 Fliegenhaltung

*Drosophila melanogaster* *ln(1)w<sup>m4</sup>/Su(var)3-9/+* Fliegen wurden bei einer Temperatur von 18-25 °C in Stopfen-Gläsern (Zwei verschiedene Größen: Durchmesser 27 mm bzw. 52 mm, Höhe 95 mm bzw. 99 mm), die zu etwa ¼ mit Nährmedium gefüllt waren, gehalten. Nach 10-14 Tagen konnten die neu geschlüpften, adulten Fliegen in neue Gläser umgesetzt werden. Dies geschah unter Narkose der Fliegen mit CO<sub>2</sub>.

#### Fliegennährmedium:

1,5 l	Wasser
12 g	Agar
27 g	Trockenhefe
15 g	Sojamehl
33 g	Rübensirup
120 g	Malzextrakt
120 g	Maismehl
9,3 ml	Propionsäure
3,6 g	Nipagin

### 3.2.13 Behandlung von Fliegen mit Chaetocin

Für die Testung der Wirkung von Chaetocin wurden die Fliegen in Gläsern mit speziellem Instant *Drosophila* Medium (SIGMA) gehalten, das ohne Kochen angerührt werden konnte und dem Chaetocin in DMSO gelöst und DMSO bzw. Butanol in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben wurden. Nachdem die Fliegen Eier abgelegt hatten und Larven im Medium sichtbar wurden, wurden die adulten Fliegen aus den Gläsern entfernt. Die neu geschlüpften Fliegen wurden dann unter dem Mikroskop in CO<sub>2</sub>-Narkose auf Veränderungen des Augenpigmentes untersucht, Gruppen zugeteilt und entsprechend ausgezählt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 MODULATOREN DER HISTONMETHYLTRANSFERASE SU(VAR)3-9

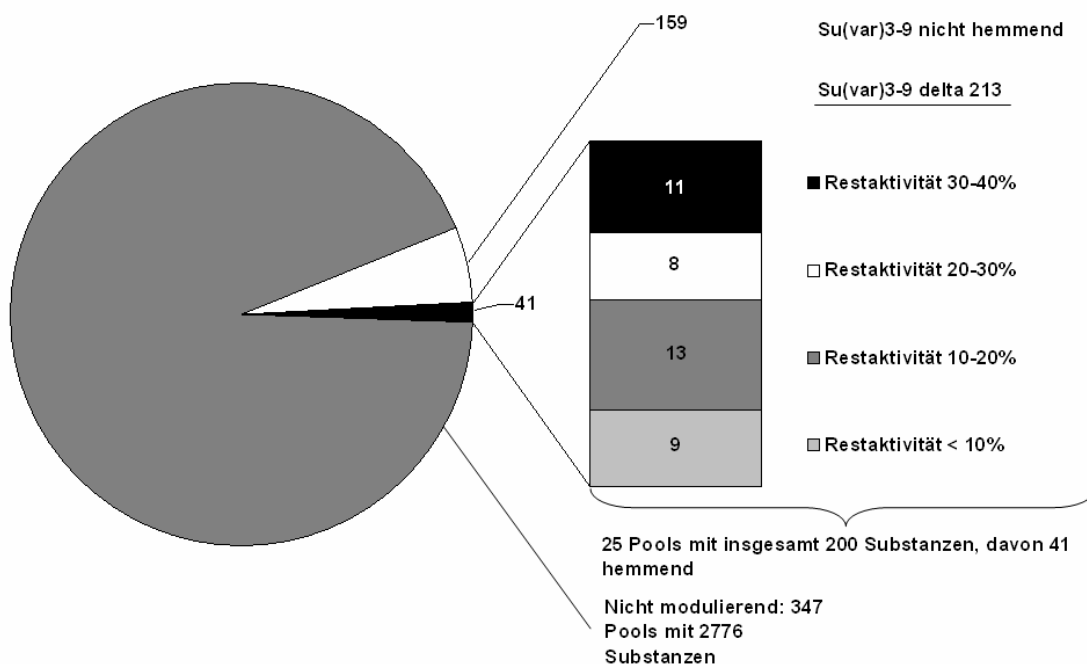
Ausgangspunkt der Suche nach Modulatoren von Histonmethyltransferasen war eine Komponentensammlung des Hans-Knöll-Instituts für Naturstoffforschung.

Als Enzym für die Testung aller Komponenten der Sammlung auf etwaige aktivierende oder inhibierende Wirkung wurde *Drosophila melanogaster* SU(VAR)3-9 delta 213 gewählt, eine Histonmethyltransferase, die in großen Mengen und hochaktiv in Bakterien rekombinant herstellbar ist und Histon H3 an Lysin 9 methyliert.

Für das Screening wurden jeweils 8 Substanzen der Komponentensammlung gepoolt und das inhibitorische Potential des Pools in einem Spot-and-Count-Assay geprüft (siehe 3.2.4.1). Sank die Aktivität von SU(VAR)3-9 nach Zugabe der gepoolten Substanzen auf unter 65% seiner Aktivität bei alleiniger Zugabe von DMSO, so wurde der Pool als „positiv“ angesehen. In diesem Fall wurde jede Komponente des Pools dann noch einmal einzeln auf ihr inhibitorisches Potential getestet (Abbildung 3-1).

In dem so durchgeführten Screening waren 25 der getesteten 372 Pools positiv. Bei Einzeltestung der in den 25 Pools enthaltenen 200 Komponenten erniedrigten 41 Substanzen die Histonmethyltransferaseaktivität von SU(VAR)3-9 auf unter 40% des Ausgangswertes, 9 Substanzen auf unter 10% (Abbildung 4-1).

Ein Inhibitor wurde definiert als eine Substanz, die bei einer Konzentration von 25 mg/l im Assayvolumen die Aktivität von SU(VAR)3-9 auf unter 25% des normalen Wertes vermindert. (Die Konzentration konnte nur in mg/l angegeben werden, da die molare Masse der meisten Stoffe nicht bekannt war.) Dieser Definition entsprachen 28 Substanzen. Eine Zusammenstellung zeigt Tabelle 4-1.



**Abbildung 4-1: Ergebnisse des Inhibitorenscreenings.** Das Kuchendiagramm zeigt den Anteil positiver Pools und den Anteil der Substanzen, die die SU(VAR)3-9-Aktivität auf unter 40% verringerten an der Gesamtheit der getesteten Substanzen. 25 der 372 Pools waren positiv, von den darin enthaltenen 200 Substanzen verringerten insgesamt 41 die Aktivität von Suvar auf unter 40%, 159 Substanzen hemmten nicht.

**Tabelle 4-1: Substanzen, die im Screening die SU(VAR)3-9-Aktivität unter 25% des Ausgangswertes verringerten.** Die 28 Inhibitoren sind geordnet nach ihrem inhibitorischen Potential. Substanzen, deren Namen nicht bekannt waren, sind mit Plattennummer und Position angegeben.

Position	Substanzname	Restaktivität SU(VAR) delta 213 in Prozent
Platte 59, Position C05	Substanzname nicht bekannt	0%
Platte 57, Position A12	(R,R)-Bis{2-[1-(methylamino)ethyl]phenyl}diselenid	0,80%

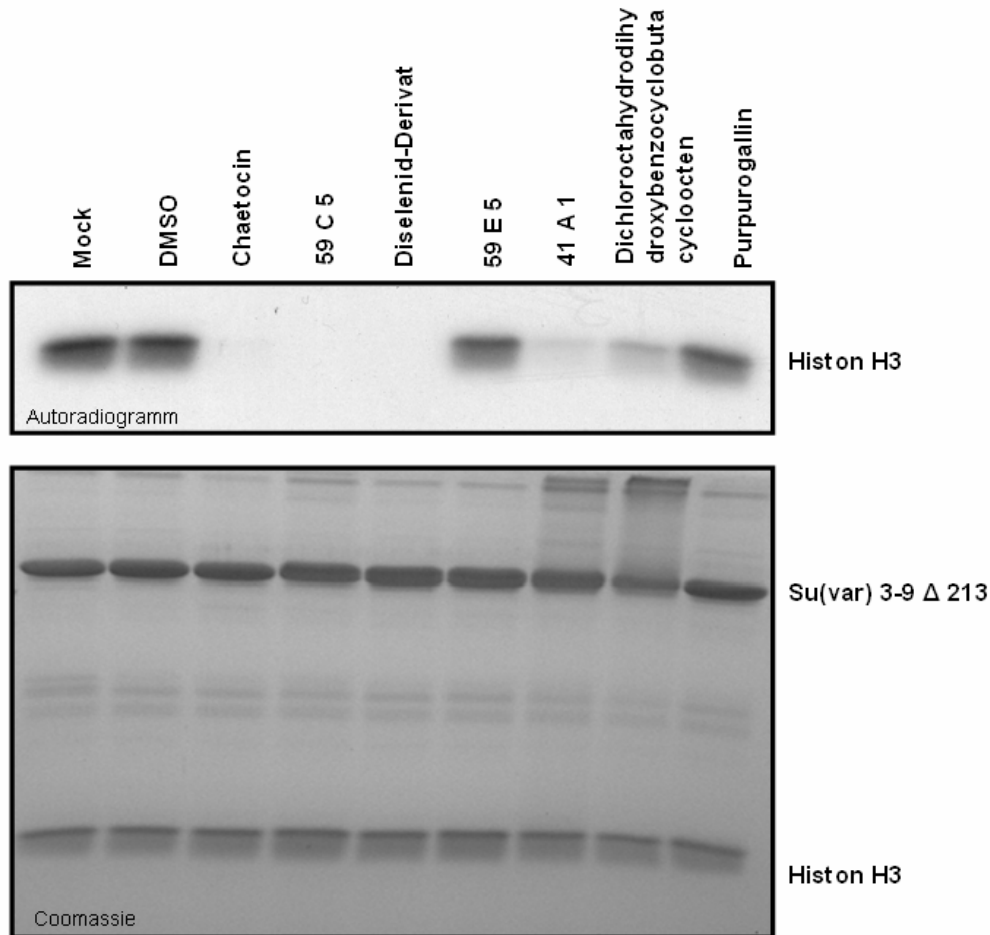
<b>Position</b>	<b>Substanzname</b>	<b>Restaktivität SU(VAR) delta 213 in Prozent</b>
Platte 32, Position F 09	Chaetocin	2,60%
Platte 60, Position G12	N-o-Carboxyphenyl-D-xylosylamin	2,90%
Platte 41, Position G12	3-Dimethylamino-5-(2-thienylcarbonyloximino)-2-thioxothiazolidin-4-on	3,30%
Platte 56, Position C07	Substanzname nicht bekannt	4,50%
Platte 57, Position C 09	5-Isobutyl-3-(3'-thienyl)-pyraz-4-on-1,2-dioxid	6,20%
Platte 32, Position E 03	Substanzname nicht bekannt	9,10%
Platte 57, Position A 09	(S,S)-Bis-[1-(8-hydroxy-2-methoxy-5,6,7,8-tetrahydronaphthyl)]diselenid	9,50%
Platte 59, Position E 05	Substanzname nicht bekannt	10,60%
Platte 56, Position F 09	Norstictic acid	10,60%
Platte 41, Position A 01	Substanzname nicht bekannt	11,10%
Platte 50, Position A 05	9-Aminoacridiziniumbromid	11,70%
Platte 41, Position A 03	Substanzname nicht bekannt	12,50%
Platte 47, Position H12	Substanzname nicht bekannt	12,80%
Platte 60, Position D 12	8-Oxo-12-nordriman-11-säuremethylester	14,30%
Platte 37, Position F 06	Substanzname nicht bekannt	15,60%



<b>Position</b>	<b>Substanzname</b>	<b>Restaktivität SU(VAR) delta 213 in Prozent</b>
Platte 55, Position D 11	8-Aminoacridiziniumbromid	16,60%
Platte 54, Position H 08	Substanzname nicht bekannt	17,20%
Platte 57, Position G 01	6-Amino-2-nitro-8-thioxo-8,9-dihydro-5-oxa-9-aza-benzocyclohepten-7-carbonsäureethylester	18,00%
Platte 34, Position C 08	Substanzname nicht bekannt	18,20%
Platte 57, Position C 01	(4R,6R)-4-Brom-7,7-dichlorspiro[bicyclo[3,2,0]-hept-2-en-6,2'-oxiran]	18,90%
Platte 32, Position C 11	Purpurogallin	20,60%
Platte 40, Position D 08	2,3-Dichlor-4b,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro1,4-dihydroxybenzo[3,4]cyclobuta[1,2-b]cycloocten	21,30%
Platte 55, Position E 11	3-Benzoylnaphtho[1,2-b]furan-4,5-dion	21,60%
Platte 35, Position G 04	Substanzname nicht bekannt	22,10%
Platte 40, Position H 12	Substanzname nicht bekannt	22,90%
Platte 47, Position E 06	21-Hydroxypregnenolon-3,12-dibenzoat	24,70%

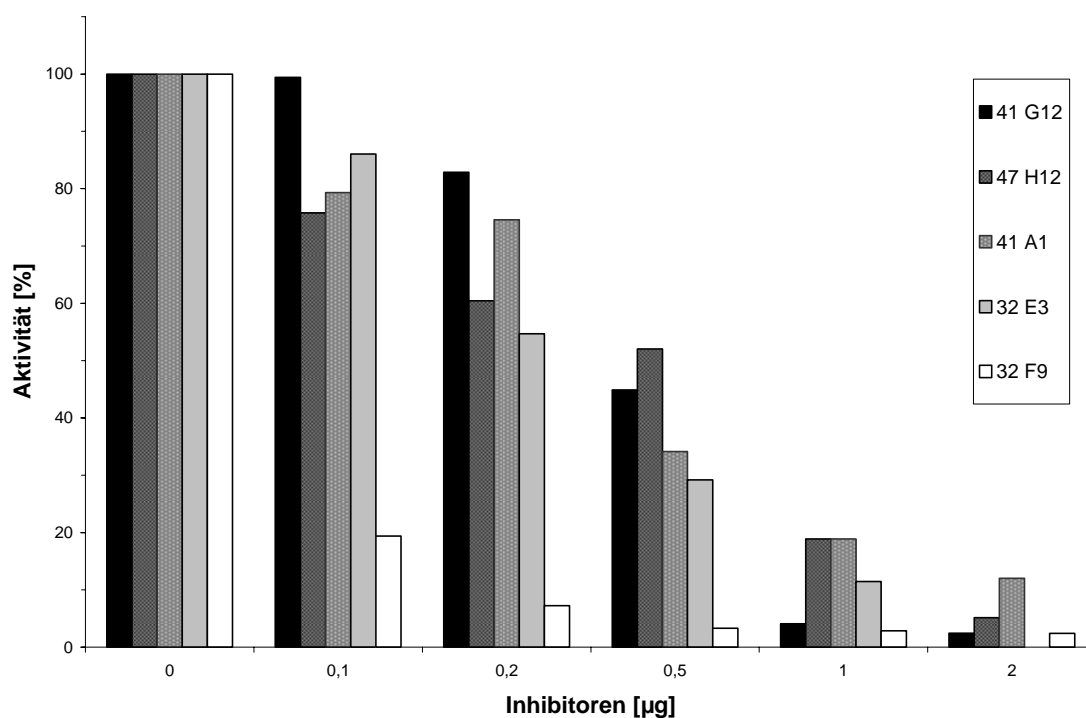
Da das Screening nicht mit Histon H3 sondern mit H3-Peptid durchgeführt worden war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass einige der gefundenen Inhibitoren nicht an SU(VAR)3-9 selbst angriffen, sondern ihre hemmende Wirkung durch Angriff am bzw. Interaktion mit dem Substrat H3-Peptid entfalteten. H3-Peptid enthält die ersten 19 Aminosäuren von H3 plus einen zusätzlichen Cysteinrest. Dieser Unterschied zum eigentlichen Histon H3 könnte dann bedeuten, dass bei einigen der als Inhibitoren identifizierten Substanzen mit Histon H3 als Substrat und auch *in vivo* keine Hemmung mehr

stattfände. Um solche potentielle peptidspezifische Effekte auszuschließen, wurden einige Inhibitoren nochmals in einem Standardmethyltransferaseassay mit rekombinantem Histon H3 als Substrat getestet. Der Versuch wurde mittels der autoradiographischen Methode ausgewertet (siehe 3.2.4.2). Wie in Abbildung 4-2 zu sehen, waren tatsächlich einige der Substanzen bei Testung mit rekombinantem Histon weniger wirksam als im vorherigen Screening. Chaetocin aber war auch hierbei ein potenter Inhibitor. DMSO, das Lösungsmittel der Substanzen, zeigte keinen inhibitorischen Effekt.



**Abbildung 4-2:** SDS-PAGE-Analyse von *in vitro* methyliertem H3 unter Zugabe von jeweils 10 µg eines **Inhibitors**. Fehlendes Signal im Autoradiogramm bedeutet Inhibition. Im Reaktionsvolumen: ca. 8 µg SU(VAR)3-9, 2 µg H3, 1 µg Inhibitor, 40 µM SAM mit spezifischer Aktivität von 0,6 Ci/mmol.

Daneben wurden von einigen der Inhibitoren auch Verdünnungsreihen angefertigt und die Verdünnungen mit SU(VAR)3-9 delta 213 im Standardmethylierungsassay getestet. Dies diente v.a. der groben Abschätzung der halbmaximalen Hemmkonstante  $IC_{50}$ . Die Ergebnisse zeigt Abbildung 4-3.



**Abbildung 4-3: Aktivität von SU(VAR)3-9 nach Zugabe von Verdünnungen verschiedener Inhibitoren des Screenings.** Standardmethylierungsassay. Die Stock-Lösungen der Inhibitoren wurden jeweils 1:1, 1:5 und 1:10 mit DMSO verdünnt und jeweils 1 µl ins Reaktionsvolumen gegeben. Für die Konzentration 2 µg/40 µl (Assayvolumen) wurden jeweils 2 µl Stocklösung zugegeben. Da die Molekulare Masse der Substanzen zumeist nicht bekannt war, wurde die Konzentration in µg/40 µl Assayvolumen angegeben. 41 G12: 3-Dimethylamino-5-(2-thienylcarbonyloximino)-2-thioxothiazolidin-4-on. 47 H12; 41 A01; 32 E03: Namen unbekannt. 32 F09: Chaetocin. Aufgrund der geringen verfügbaren Menge der jeweiligen Inhibitoren (10 µl) konnten bei diesem Versuch keine Standardabweichungen berechnet werden.

Wie aus der Abbildung ablesbar, war die halbmaximale Hemmkonzentration  $IC_{50}$  für Chaetocin kleiner als 2,5 mg/l, für 32E3 ungefähr 5 mg/l, für 41A1 lag sie zwischen 5 und 12,5 mg/l. 3-Dimethylamino-5-(2-thienylcarbonyloximino)-2-thioxothiazolidin-4-on und die Substanz 41G12 hemmten beide bei einer Konzentration von etwa 12,5 mg/l im Assayvolumen halbmaximal.

## 4.2 WIRKUNG VON CHAETOCIN AUF VERSCHIEDENE HISTONMETHYLTRANSFERASEN *IN VITRO*

Einer der stärksten Hemmstoffe im Screening mit SU(VAR)3-9 war Chaetocin, ein Mykotoxin, das bei der Fermentation von *Chaetomium minutum* erzeugt wird. Chaetocin gehört zu den 3-6-Epidithiodiketopiperazinen (ETPs).

Abgesehen vom Screening inhibierte Chaetocin auch in der nachfolgenden Testung mit Histon H3 SU(VAR)3-9. Ebenso hemmte es auch schon bei geringen Konzentrationen (Abbildung 4-3).

Für eine weiterführende Testung der Wirkung von Chaetocin *in vitro* auf SU(VAR)3-9 und andere Histonmethyltransferasen sprach neben seinem inhibitorischen Potential v.a. seine relativ einfache Verfügbarkeit in größeren Mengen.

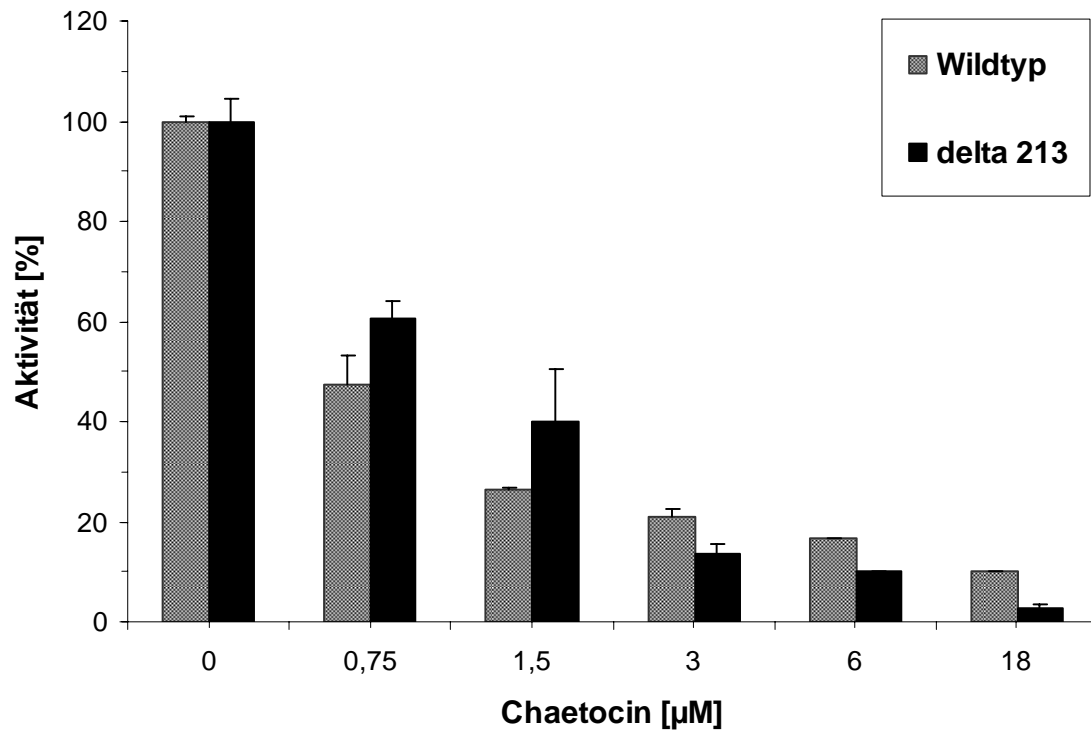
### 4.2.1 Chaetocin hemmt *Drosophila melanogaster* SU(VAR)3-9 delta 213 und Wildtyp

Im Screening mit SU(VAR)3-9 stand Chaetocin an dritter Stelle der besten Inhibitoren. Dort hemmte Chaetocin bei einer Konzentration von 25 mg/l SU(VAR)3-9 auf 2,6% Restaktivität (Tabelle 4-1). Selbst bei einer Verdünnung auf 2,5 mg/l zum Vergleich der IC<sub>50</sub> mit anderen Inhibitoren wurde SU(VAR)3-9 noch auf unter 20% Restaktivität inhibiert (Abbildung 4-3).

Zur exakteren Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration IC<sub>50</sub> von Chaetocin wurde SU(VAR)3-9  $\Delta$ 213 daher in einem Spot-and-Count-Assay mit steigenden Konzentrationen von Chaetocin versetzt.

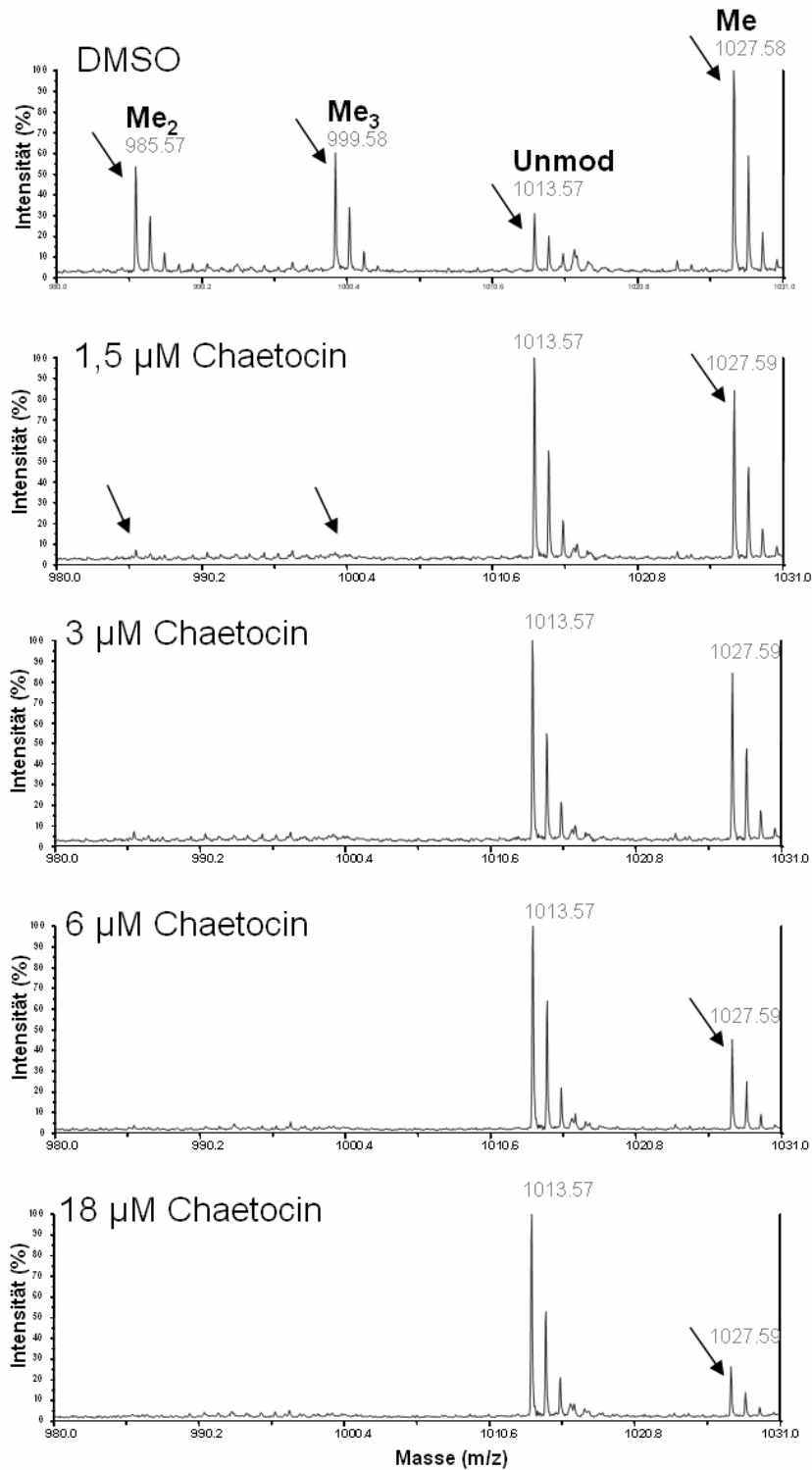
Da sich SU(VAR)3-9  $\Delta$ 213 vom Wildtyp des Enzyms durch 213 deletierte N-terminale Aminosäuren unterscheidet, sollte auch eruiert werden, ob die Hemmung auf die Deletionsmutante beschränkt oder dort stärker sei. Deshalb wurde auch die Aktivität SU(VAR)3-9 wt mit steigenden Chaetocin-Konzentrationen getestet.

Wie in Abbildung 4-4 zu sehen, werden sowohl SU(VAR)3-9  $\Delta$ 213 als auch SU(VAR)3-9 wt von Chaetocin mit einer IC<sub>50</sub> von circa 1  $\mu$ M gehemmt. Der N-Terminus des Enzyms scheint für die Hemmung also nicht wesentlich zu sein.



**Abbildung 4-4: Aktivität von SU(VAR)3-9 nach Zugabe steigender Chaetocin-Konzentrationen.** Standardmethylierungsassays wurden unter Zugabe steigender Chaetocin-Konzentrationen durchgeführt und nach 30 min gestoppt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus je zwei Reaktionsansätzen.

Neben der Spot-and-Count-Methode wurde ein entsprechend aufgebauter Versuch (mit SU(VAR)3-9 delta 213, Histon H3 aber ohne radioaktiv markiertes SAM) auch massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 4-5). Wie in der Abbildung ersichtlich, korrelieren niedrige Konzentrationen an Chaetocin mit verminderter Di- und Trimethylierung von Histon H3 Lysin 9, höhere Konzentrationen auch mit einer verminderten Monomethylierung.



**Abbildung 4-5: Methylierung von Histon H3 Lysin 9 durch SU(VAR)3-9 delta 213 bei Zugabe steigender Chaetocinkonzentrationen zum Assay.** Ein Standardmethylierungsassay wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Unmod: Unmodifizierter Lysin-9-Rest. Me: Monomethylierung von Lysin 9. Me<sub>2</sub>: Dimethylierung. Me<sub>3</sub>: Trimethylierung. Die geringere Masse von Di- und Trimethylierung ist bedingt durch Propionylierung und anschließenden Trypsinverdau (siehe 3.2.10.1). Die Peakhöhe steht für die Menge der betreffenden Modifikation.

#### 4.2.2 Chaetocin hemmt SU(VAR)3-9 kompetitiv

Nachdem das inhibitorische Potential von Chaetocin näher charakterisiert worden war, stellte sich die Frage, auf welche Art die Hemmung von SU(VAR)3-9 vonstatten ginge. Kompetitive Hemmung von SU(VAR)3-9 läge vor, wenn Chaetocin einem der Substrate SAM oder Histon H3 ähnlich wäre und mit diesen um das aktive Zentrum von SU(VAR)3-9 konkurrierte. Bei der nicht kompetitiven Hemmung würde Chaetocin nicht mit den Substraten um die Bindung am aktiven Zentrum konkurrieren. Zur Klärung des Hemmtyps eignet sich die Erstellung eines Lineweaver-Burk-Diagrammes, hierfür wurde der Standardmethyltransferaseassay (siehe 3.2.4.1) leicht variiert. Die Standardmethyltransferasereaktionen wurden in Triplets für jeweils 5 Minuten durchgeführt, wobei die Konzentration von Histon H3 konstant bei 3,2  $\mu\text{M}$  gehalten und die Konzentration von SAM (inklusive radioaktiv markiertem SAM) zwischen 5 und 60  $\mu\text{M}$  variiert wurde. Chaetocin wurde in steigenden Konzentrationen von 0 bis 6  $\mu\text{M}$  zugegeben. Abbildung 4-6 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten  $v$  von den SAM-Konzentrationen in doppeltreziproker Auftragung.

Alle Kurven der Abbildung schneiden die Ordinate im selben Schnittpunkt, für den gilt:

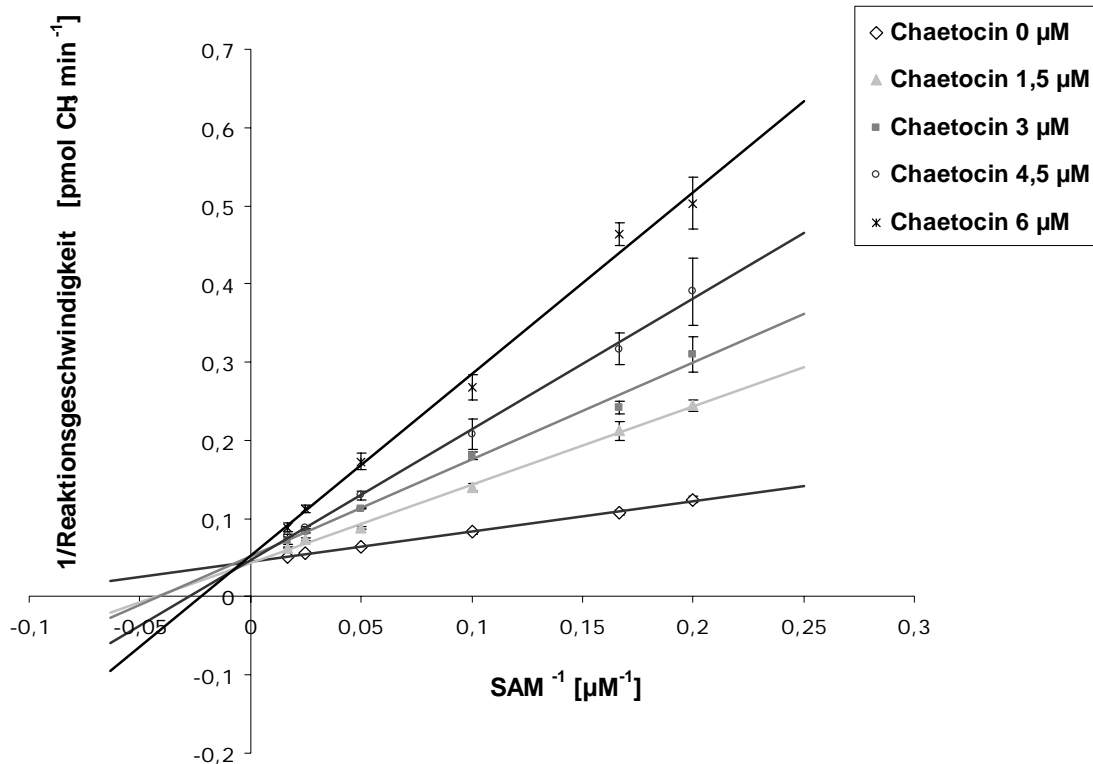
$$Y = 1 / v_{\max}$$

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  aller Reaktionen liegt daher etwa bei 21,05 pmol  $\text{CH}_3/\text{min}$ , per definitionem würde Chaetocin SU(VAR)3-9 also kompetitiv hemmen. Das würde bedeuten, dass Chaetocin anstelle des natürlichen Substrates S-Adenosylmethionin an das aktive Zentrum von SU(VAR)3-9 binden und mit SAM konkurrieren könnte. Erst bei höheren SAM-Konzentrationen würde es verdrängt und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  erreicht.

Aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse wurde für die ungehemmte Reaktion die Michaeliskonstante  $K_m$  nach folgender Formel errechnet:

$$X = -1 / K_m$$

Die Michaeliskonstante  $K_m$  ist diejenige Substratkonzentration, bei der das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeitet, für SU(VAR)3-9 ist dies 8,57  $\mu\text{M}$  SAM.



**Abbildung 4-6: Kompetitive Hemmung von SU(VAR)3-9 delta 213 durch Chaetocin in der Auftragung nach Lineweaver und Burk.** Standardmethylierungsassays wurden leicht variiert in Triplets durchgeführt. Die Konzentration von Histon H3 wurde konstant bei 3,2  $\mu\text{M}$  gehalten. SAM (plus radioaktiv markiertes SAM) wurde in Konzentrationen von 5 bis 60  $\mu\text{M}$  zugegeben. Es wurden Kurven für 0  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 4,5  $\mu\text{M}$  und 6  $\mu\text{M}$  Chaetocin erstellt, indem die Reaktionsgeschwindigkeiten und Substratkonzentrationen jeweils reziprok aufgetragen wurden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Reaktionsansätzen.

Nach der gleichen Formel ergaben sich für die verschiedenen Chaetocinkonzentrationen die scheinbaren (apparenten) Michaeliskonstanten  $K_{m \text{ app}}$  der gehemmten Reaktionen, die mit der Inhibitorkonstanten  $K_i$  über folgende Formel verknüpft sind:

$$K_{m \text{ app}} = \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) K_m$$

Dabei ist  $[I]$  die Konzentration des Inhibitors. Aufgelöst nach  $K_i$  ergibt sich:

$$K_i = \frac{[I]}{\left( \frac{K_{m \text{ app}}}{K_m} - 1 \right)}$$

Die Inhibitorkonstante  $K_i$  ist ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor. Sie gibt diejenige Konzentration des Inhibitors an, bei der die apparente Michaeliskonstante  $K_{m \text{ app}}$  der



gehemmten Reaktion gerade doppelt so groß ist wie die Michaeliskonstante  $K_m$  der ungehemmten Reaktion.

Tabelle 4-2 führt die Ergebnisse der Berechnungen für die verschiedenen im Lineweaver-Burk-Diagramm verwendeten Chaetocinkonzentrationen auf. Der Durchschnittswert aller errechneten Inhibitorkonstanten ist  $K_i = 1,37$ .

**Tabelle 4-2: Errechnete scheinbare Michaeliskonstanten  $K_{m \text{ app}}$  und Inhibitorkonstanten  $K_i$  bei den verschiedenen Chaetocinkonzentrationen im Lineweaver-Burk-Diagramm.**

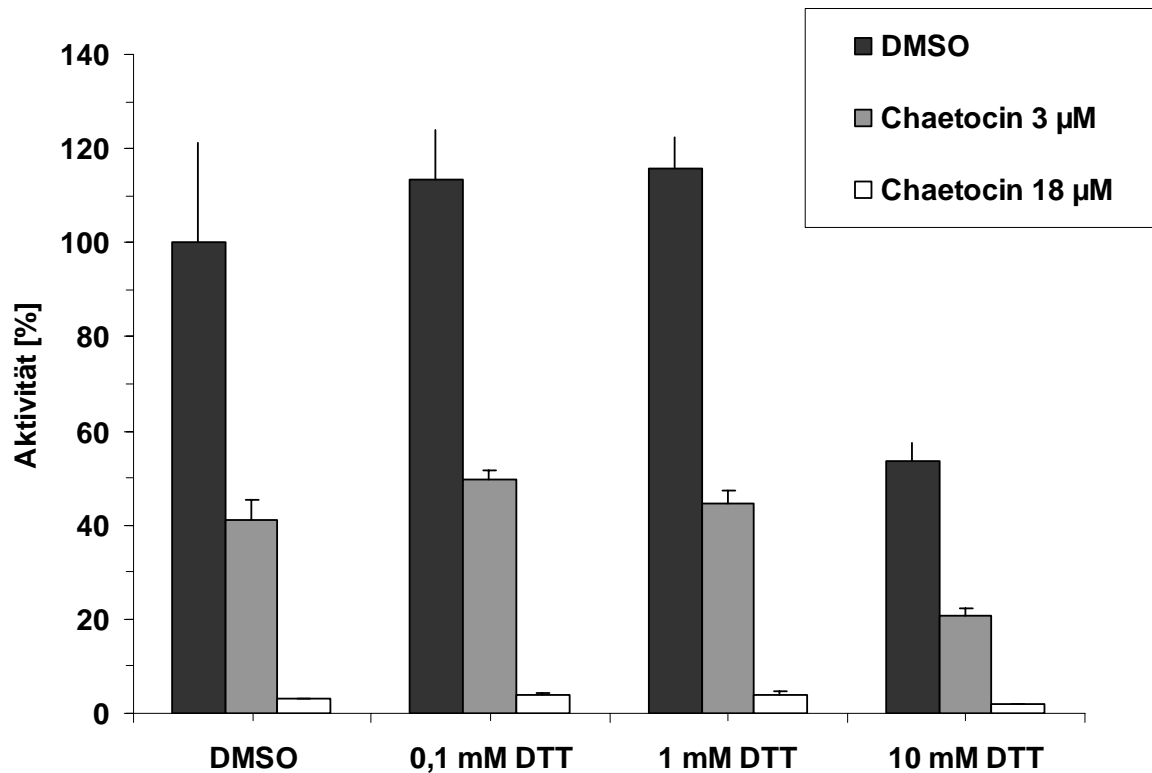
<b>Chaetocin (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Scheinbare Michaeliskonstante <math>K_{m \text{ app}}</math> (<math>\mu\text{M SAM}</math>)</b>	<b>Inhibitorkonstante <math>K_i</math> (<math>\mu\text{M Chaetocin}</math>)</b>
1,5	22,94	0,89
3	23,77	1,69
4,5	36,22	1,39
6	44,78	1,42

### **4.2.3 Chaetocin hemmt auch nach Spaltung seiner Disulfidbrücken SU(VAR)3-9**

SU(VAR)3-9 und verwandte Enzyme enthalten nahe ihren aktiven Zentren in Prä- und Post-SET-Domäne eine ganze Reihe von Cysteinresten, die einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Ebenso ist bekannt, dass das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) und andere thiolreaktive Substanzen die Aktivität von SU(VAR)3-9 in hohen Dosen vermindern. Für DTT ist das ab einer Konzentration von 10 mM der Fall. Dies könnte durch Bildung von Schwefelbrücken zwischen SU(VAR)3-9 und DTT bzw. durch Aufbrechen der SU(VAR)3-9-Schwefelbrücken bedingt sein. Beides würde zur Änderung der Enzymtertiärstruktur führen.

Da beide Monomere von Chaetocin eine Disulfidbrücke enthalten, stellte sich die Frage, ob diese Disulfidbrücken für die inhibitorische Wirkung von Chaetocin wichtig seien, indem auch sie die SU(VAR)-Tertiärstruktur störten. Um dies zu prüfen, wurden die Standard-Methyltransferase-Assays (siehe 3.2.4.1) mit Konzentrationen von 0  $\mu$ M, 3  $\mu$ M und 18  $\mu$ M Chaetocin und jeweils steigenden DTT-Konzentrationen durchgeführt. DTT sollte hierbei die Disulfidbrücken von Chaetocin spalten und dessen vermeintliche Interaktion mit SU(VAR)3-9 beeinträchtigen.

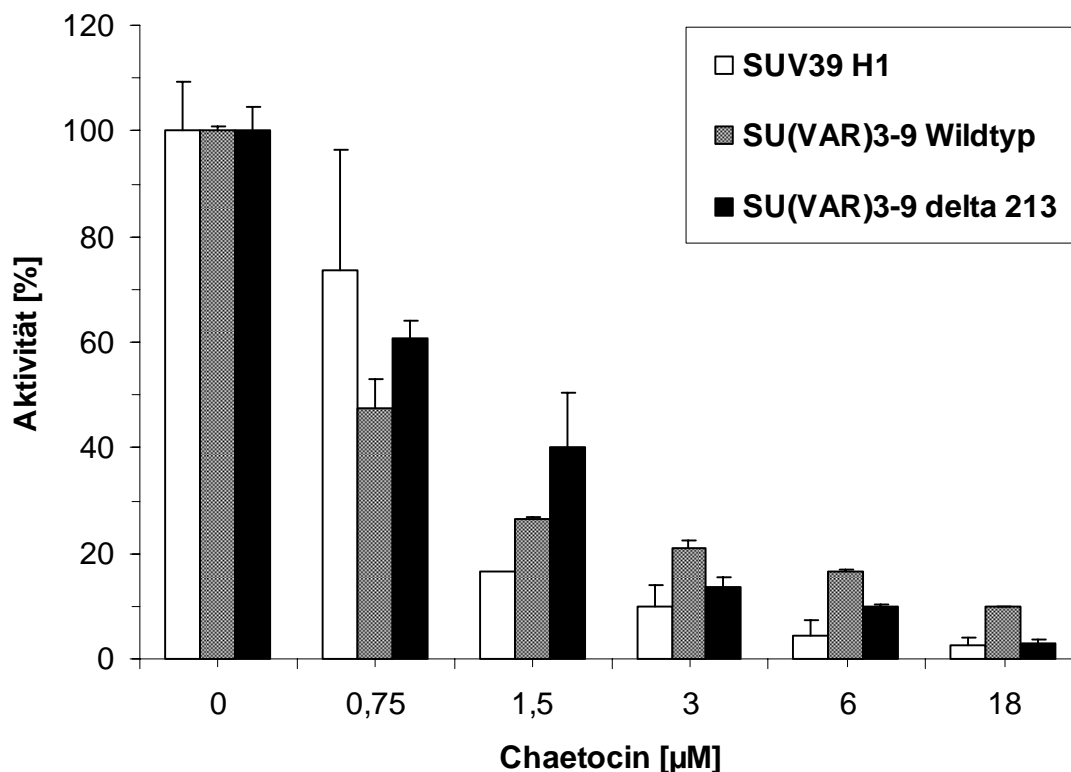
Wie in Abbildung 4-7 zu sehen, mindert DTT das inhibitorische Potential von Chaetocin nicht, sondern führt bei einer Konzentration von 10 mM sogar zu einer gegenüber der alleinigen Wirkung von Chaetocin verstärkten Hemmung von SU(VAR)3-9.



**Abbildung 4-7: Die inhibitorische Wirkung von Chaetocin auf SU(VAR)3-9 wird auch nach Spaltung seiner Disulfidbrücken durch DTT nicht gemindert.** Standardmethylierungsassays wurden durchgeführt unter Zugabe von 0  $\mu$ M, 3  $\mu$ M und 18  $\mu$ M Chaetocin und jeweils steigenden DTT-Konzentrationen. Die Su(var)-Aktivität wurde jeweils prozentual zur Aktivität ohne Chaetocin und DTT angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus jeweils zwei Reaktionsansätzen.

#### 4.2.4 Das menschliche SU(VAR)3-9-Ortholog SUV39H1 wird durch Chaetocin gehemmt

Nachdem die inhibitorische Wirkung von Chaetocin auf das *Drosophila melanogaster* Enzym SU(VAR)3-9 untersucht worden war, war seine Wirkung auf dessen humanes Ortholog SUV39H1 von besonderem Interesse. Dieses ist kürzer als SU(VAR)3-9 aufgrund der fehlenden Fusion mit den 80 N-terminalen Aminosäuren des Translationsinitiationsfaktor eIF-2 $\gamma$ . Für dieses Experiment wurde GST-SUV39H1 in *Escherichia coli* exprimiert und über Glutathion-Sepharose-4B-beads aufgereinigt, dabei war seine Aktivität um den Faktor 10 geringer als die des SU(VAR)3-9.



**Abbildung 4-8: Hemmung der Aktivität von humanem SUV39H1 durch Chaetocin.** Standardmethylierungsassays mit *Drosophila melanogaster* SU(VAR)3-9 delta 213 und wildtyp sowie dem humanen SUV39H1 wurden unter Zugabe steigender Chaetocinkonzentrationen durchgeführt. Die Aktivität der Enzyme wurde prozentual zur Aktivität ohne Zugabe von Chaetocin berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus jeweils zwei Reaktionsansätzen.

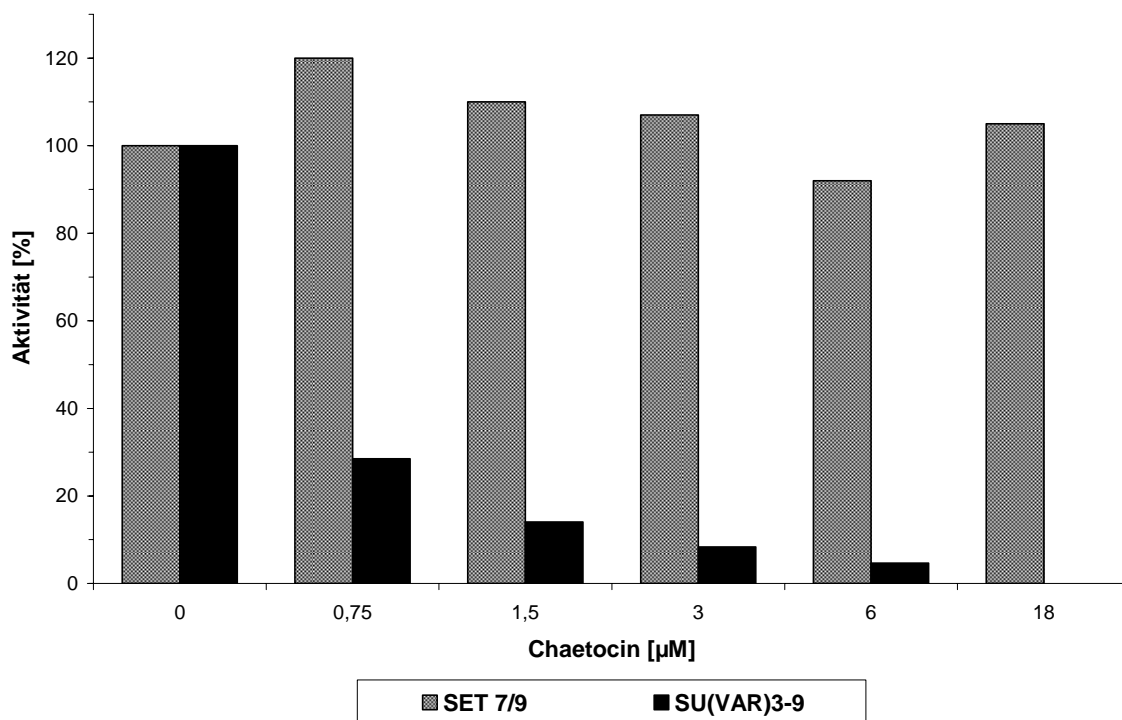
Zur Testung der Chaetocinwirkung wurde wiederum der Standardmethyltransferaseassay nach der Spot-and-Count-Methode verwendet (siehe 3.2.4.1). Es zeigte sich, dass auch humanes SUV39H1 mit einer der SU(VAR)3-9 ähnlichen halbmaximalen

Hemmkonzentration  $IC_{50}$  im Bereich zwischen 0,75 und 1,5  $\mu$ M durch Chaetocin gehemmt wurde (Abbildung 4-8).

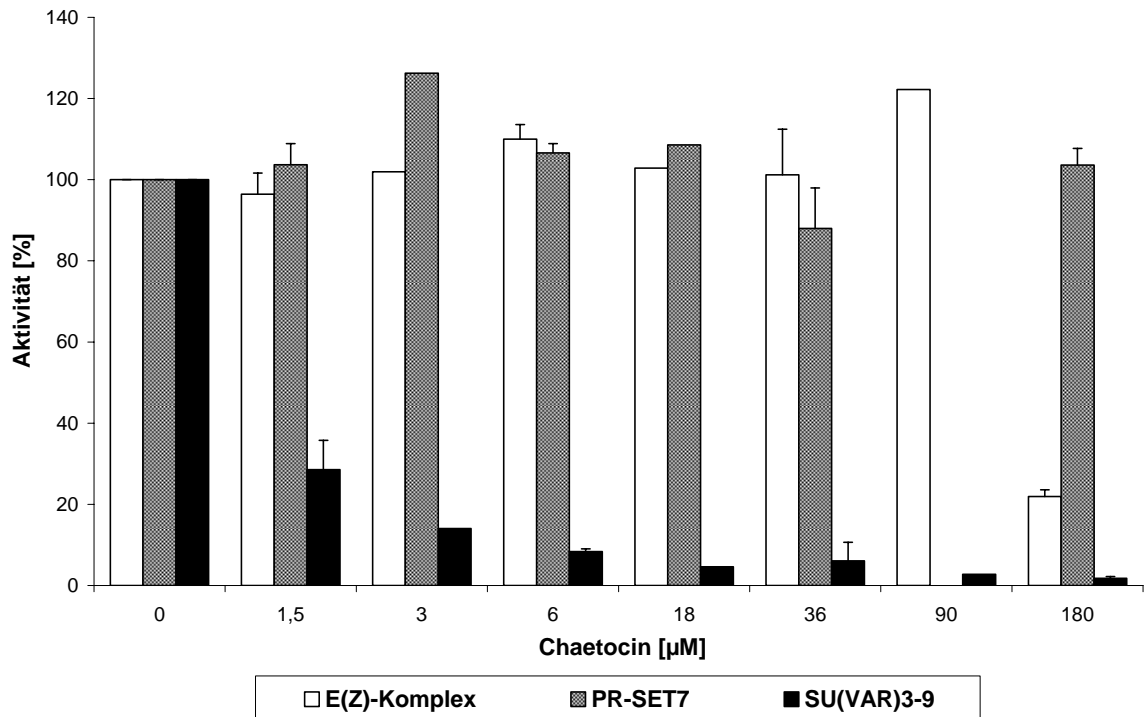
#### 4.2.5 Wirkung von Chaetocin auf die nicht für Histon H3 Lysin 9 spezifischen Methyltransferasen E(z)-Komplex, PR-SET7 und SET7/9

Beim Einsatz eines Inhibitors ist nicht nur ein hohes Hemmpotential gefordert, ebenso wichtig ist, dass er spezifisch ist, d.h. seine Wirkung möglichst nur auf ein Enzym oder eine Enzymgruppe entfaltet. Um neben der Effektivität auch eine Aussage über die Spezifität von Chaetocin machen zu können, wurde die Substanz mit einer Reihe von bekannten Histonmethyltransferasen getestet. Darunter waren auch E(z)-Komplex, PR-SET7 und SET7/9. Diesen drei Enzymen ist gemeinsam, dass sie zwar alle eine SET-Domäne (aktives Zentrum gleicht dem der Enzyme SU(VAR), Enhancer of zeste und Trithorax) haben, jedoch nicht wie SU(VAR)3-9 spezifisch Histon H3 an Lysin 9 methylieren. Sie gehören nicht zur Klasse der SU(VAR)-Enzyme.

Es wurden jeweils Standardmethylierungsassays nach der Spot-and-Count-Methode durchgeführt, wobei das zu methylierende Substrat für PR-SET7 Nucleosomen und für E(z) Histon H3 war. Dabei zeigte sich, dass weder *Drosophila melanogaster* E(z)-Komplex noch PR-SET7 durch Chaetocin in Konzentrationen unter 90  $\mu\text{M}$  gehemmt wurden und ebenso SET7/9 in Konzentrationen unter 18  $\mu\text{M}$  Chaetocin nicht gehemmt wurde (Abbildung 4-10 und Abbildung 4-9).



**Abbildung 4-9: Chaetocin hemmt die Histonmethyltransferase SET7/9 in Konzentrationen bis 18  $\mu\text{M}$  nicht.** Aktivität von Set7/9 in einem Standardmethylierungsassay nach Zugabe steigender Chaetocinkonzentrationen.



**Abbildung 4-10: Chaetocin hemmt die Histonmethyltransferasen E(z) und PR-SET7 in Konzentrationen unter 90 µM nicht.** Aktivitäten der Histonmethyltransferasen E(z)-Komplex, PR-SET7 und SU(VAR)3-9 in Standardmethylierungsassays mit ansteigenden Chaetocinkonzentrationen. Enzymmenge: 15 µl E(z)-Komplex-Eluat, 10 µl PR-SET7-Eluat und 8 µg SU(VAR)3-9 im Assayvolumen (40 µl). Substrate für die Methylierung: Bei E(z)-Komplex und SU(VAR)3-9 Histon H3, für PR-SET7 Nucleosomen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 2 Reaktionsansätzen. Keine Fehlerbalken bei 3 µM, 18 µM und 90 µM Chaetocin, da aufgrund limitierter Enzymmenge hierbei nur ein Reaktionsansatz getestet wurde. PR-SET7 wurde nicht mit 90 µM Chaetocin getestet.

E(z)-Komplex wurde in einem baculoviralen Expressionssystem hergestellt und aufgereinigt (siehe 3.2.6). Er methyliert Histon H3 an Lysin 9 und Lysin 27. In Abbildung 4-10 ist erkennbar, dass die halbmaximale Hemmkonzentration  $IC_{50}$  zwischen 90 µM und 180 µM Chaetocin liegen muss. Da die Herstellung im Baculosystem nur zu geringen Proteinmengen und einer niedrigen Aktivität von E(z) führte, erfolgte keine genauere Charakterisierung der  $IC_{50}$ .

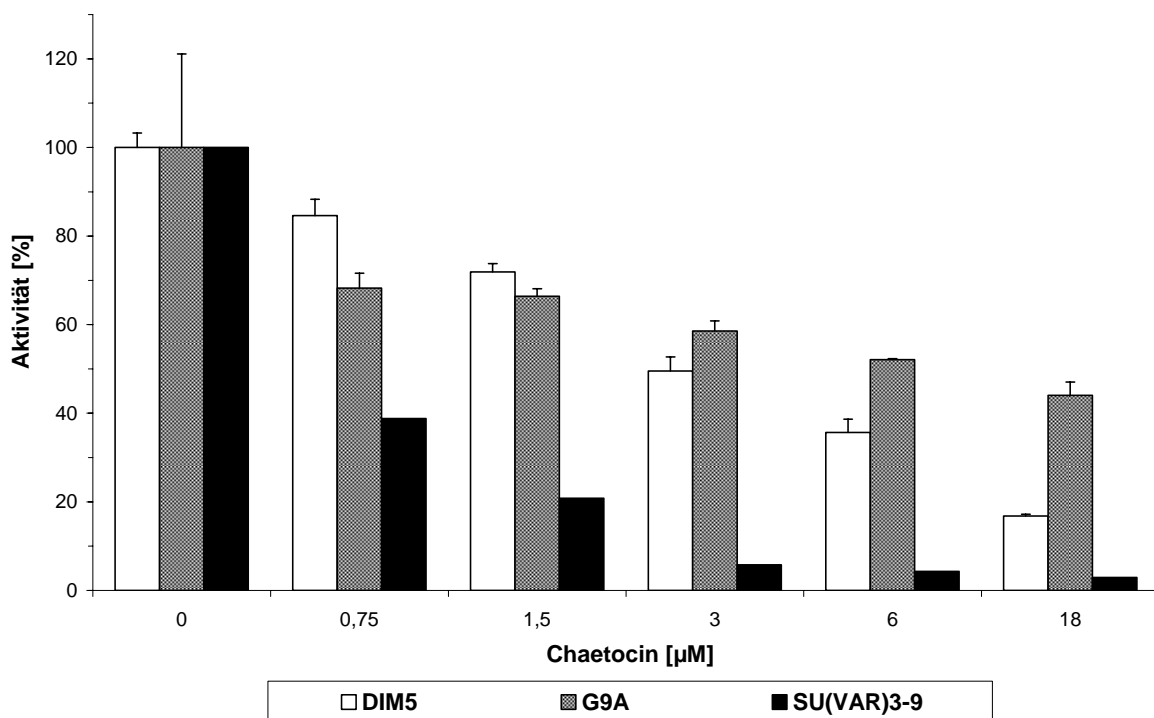
Die Histon H4 Lysin 20 spezifische Methyltransferase PR-SET7 wurde in *Escherichia coli* in großen Mengen exprimiert. Selbst die Zugabe eines Mikroliters der Chaetocin-Stammlösung (d.h. die Konzentration von Chaetocin im Reaktionsvolumen war 180 µM) führte zu keiner sichtbaren Hemmung dieses Enzyms.

SET7/9 (zur Verfügung gestellt durch A. Imhof) methyliert Histon H3 Lysin 4. Diese Methyltransferase wurde ebenfalls in Konzentrationen bis 18 µM Chaetocin nicht gehemmt (Abbildung 4-9).

#### 4.2.6 Chaetocin hemmt G9a und DIM-5 erst in höheren Konzentrationen

Die obigen zur Untersuchung der Spezifität von Chaetocin verwandten Histonmethyltransferasen E(z)-Komplex, PR-SET7 und SET7/9 enthalten zwar eine SET-Domäne, sie sind aber nicht für Histon H3 Lysin 9 spezifisch und nicht mit SU(VAR)3-9 verwandt.

Zur genaueren Eingrenzung der Chaetocin-Spezifität boten sich deshalb G9a und DIM-5 an, die beide eine (entfernte) Verwandtschaft zur SUV39-Familie aufweisen. G9a ist eine für Histon H3 Lysin 9 spezifische Methyltransferase der Maus, DIM-5 das dem *Drosophila melanogaster* SU(VAR)3-9 entsprechende Enzym in *Neurospora crassa*. Nach Expression beider Enzyme in *Escherichia coli* und Aufreinigung, wurden wiederum Standardmethylierungsassays mit steigenden Chaetocin-Konzentrationen durchgeführt.



**Abbildung 4-11: Chaetocin hemmt DIM-5 und G9a weniger stark als SU(VAR)3-9.** Standardmethylierungsassays der drei Enzyme wurden mit steigenden Chaetocinkonzentrationen durchgeführt. Enzymmenge: 1  $\mu\text{l}$  DIM-5-Eluat, 10  $\mu\text{l}$  G9a-Eluat, 8  $\mu\text{g}$  SU(VAR)3-9. Das Methylierungssubstrat war für alle drei Enzyme 1  $\mu\text{g}$  H3-Peptid. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus jeweils 2 Reaktionsansätzen. Keine Fehlerbalken für SU(VAR)3-9, dieses wurde nur als Kontrolle mitgetestet.



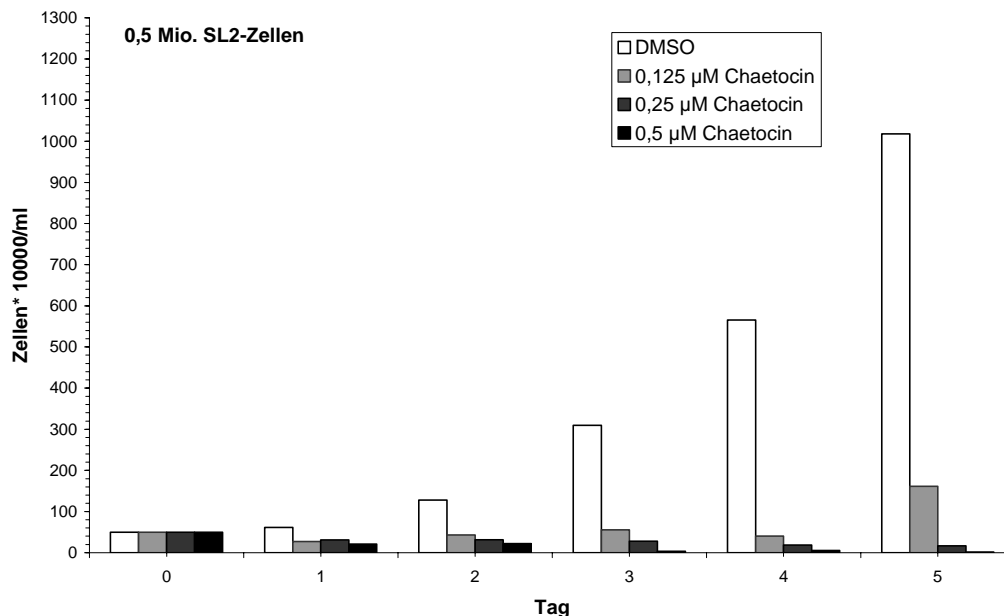
Abbildung 4-11 zeigt, dass beide Enzyme zwar durch Chaetocin inhibiert werden, jedoch ist dessen Wirkung weniger stark als auf SU(VAR)3-9. Die halbmaximale Hemmkonzentration  $IC_{50}$  liegt für das *Neurospora crassa* SU(VAR)-Ortholog DIM-5 bei circa 3  $\mu$ M Chaetocin und für G9a bei circa 18  $\mu$ M Chaetocin.

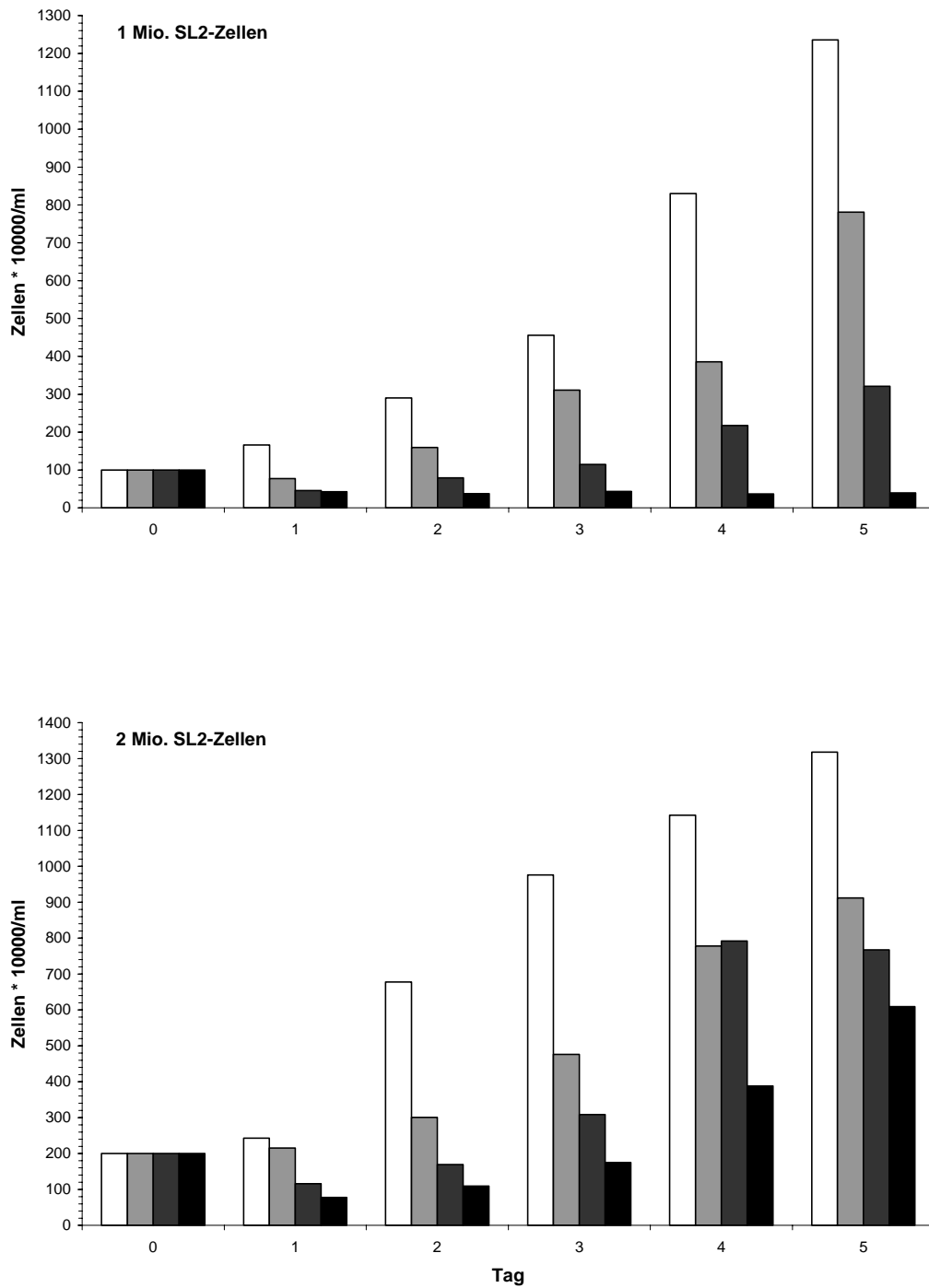
### 4.3 WIRKUNG VON CHAETOCIN *IN VIVO*

#### 4.3.1 Zelldichteabhängige Toxizität von Chaetocin

Nach der Untersuchung von Effektivität und Spezifität des Inhibitors Chaetocin *in vitro* interessierte besonders, ob es auch *in vivo*, d.h. z.B. in einem Zellsystem, wirksam sei. Bevor aber Chaetocin-spezifische Effekte auf Enzyme oder Histone *in vivo* untersucht werden konnten, musste zunächst die Toxizität von Chaetocin auf Zellen geprüft werden.

Hierfür wurden *Drosophila* SL2-Zellen mehrere Tage lang mit jeweils verschiedenen Chaetocinkonzentrationen behandelt, wobei die Zellen jeden Tag gezählt wurden. Auffallend war hierbei, dass Chaetocin einen toxischen Effekt anscheinend abhängig von der Zelldichte bei Aussaat entwickelte. (Das Volumen der Zell-Medium-Lösung war dabei jeweils konstant.) Bei niedrigerer Zelldichte (0,5 Millionen Zellen/ml) zu Beginn des Experiments wies Chaetocin einen größeren toxischen Effekt auf. Selbst bei der niedrigsten Chaetocin-Konzentration wuchsen die SL2-Zellen nicht. Bei einer Aussaat von 2 Millionen Zellen/ml führten bis zu 0,5  $\mu\text{M}$  Chaetocin im Kulturmedium nur zu einer Wachstumsverzögerung der Zellen von 24 bis 48 Stunden (Abbildung 4-12).



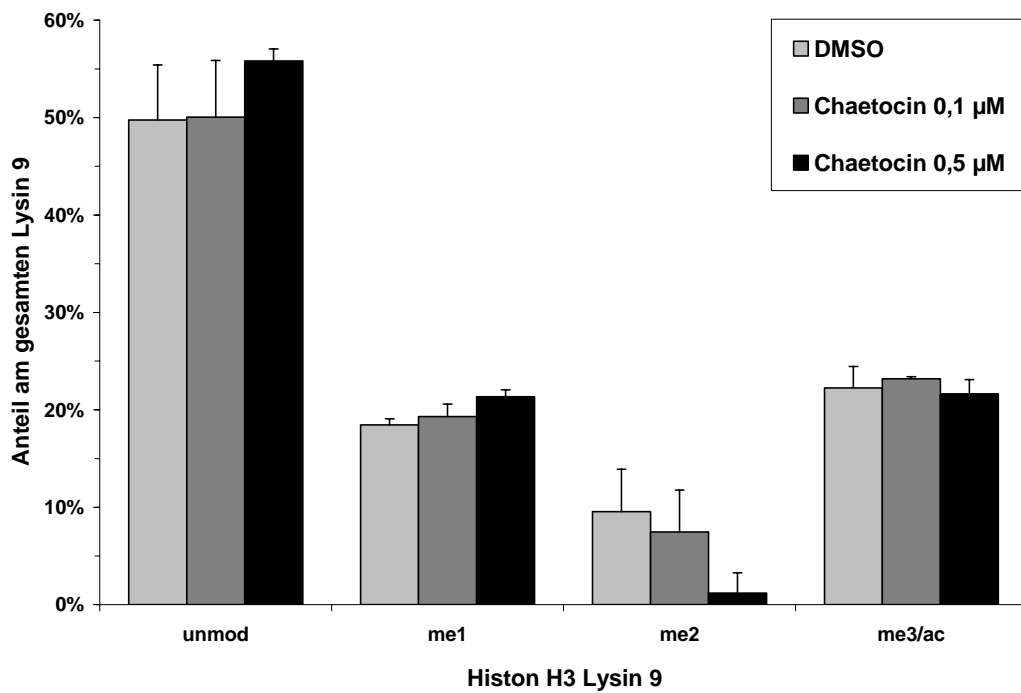


**Abbildung 4-12: Wirkung von Chaetocin auf kultivierte Zellen.** *Drosophila* SL2-Zellen, ausgesät mit verschiedenen Dichten (0,5 Mio. Zellen/ml, 1 Mio. Zellen/ml, 2 Mio. Zellen/ml), wurden für mehrere Tag mit verschiedenen Chaetocinkonzentrationen (0 μM, 0,125 μM, 0,25 μM und 0,5 μM Chaetocin) behandelt. Jeden Tag wurde eine Zellprobe entnommen und gezählt. Die Abbildung zeigt die Zellzahl/ml an den Tagen 0 bis 5. Die Werte entsprechen den Durchschnittswerten aus jeweils 4 verschiedenen Kammern.

### 4.3.2 Effekte von Chaetocin auf Histonmodifikationen

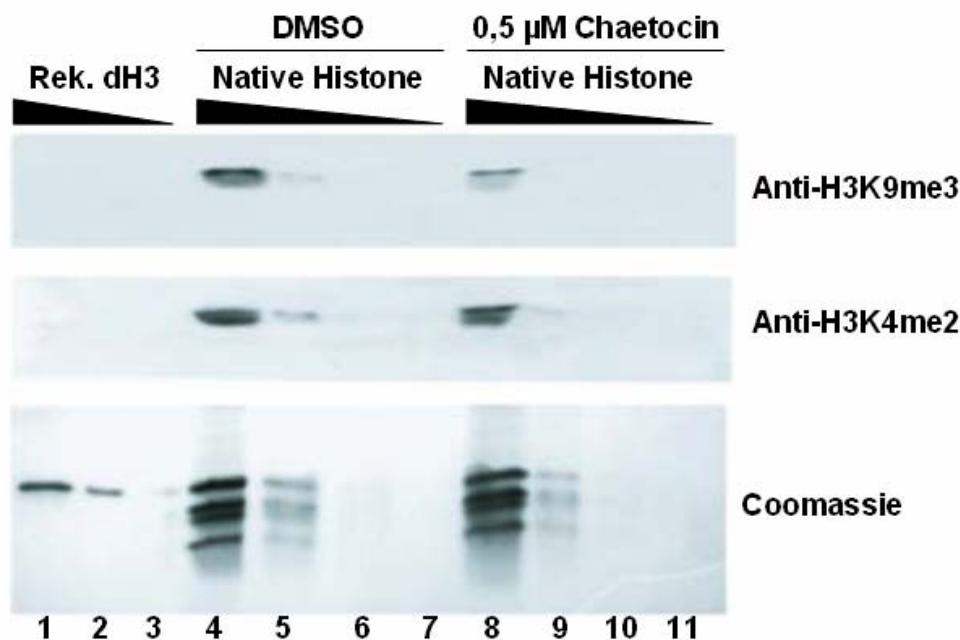
Nach Abschluss der Vorexperimente wurden *Drosophila* SL2-Zellen in einer Dichte von 2,5 Mio. Zellen/ml ausgesät und das Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Chaetocin versetzt (0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M). Aliquots zur Untersuchung der Histon-Modifikationen wurden an Tag 2 und 7 geerntet, die Histone sauer extrahiert (siehe 3.2.9) und anschließend massenspektrometrisch analysiert (siehe 3.2.10).

Wie auch schon bei den *in vitro* Experimenten, wurde die Methylierung des Lysin 9 von Histon H3 durch die Chaetocinbehandlung der Zellen beeinflusst. Massenspektrometrisch konnte gezeigt werden, dass die Histon H3 Lysin 9 Dimethylierung durch Behandlung mit Chaetocin verringert wurde. Dies war v.a. bei einer Chaetocin-Konzentration von 0,5  $\mu$ M und nach 7 Tagen Inkubation sichtbar, in geringerem Ausmaß aber auch bei 0,1  $\mu$ M Chaetocin im Medium (Abbildung 4-13).



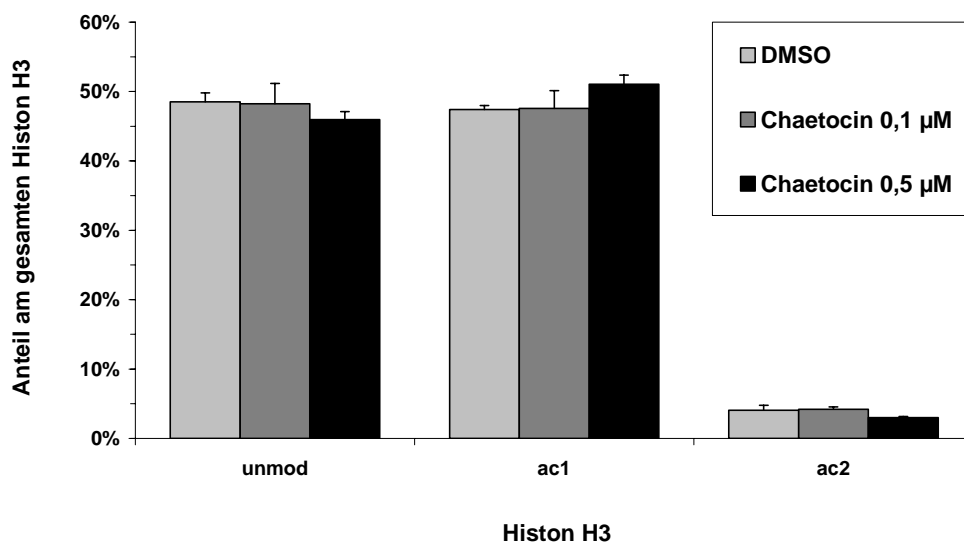
**Abbildung 4-13: Hemmung der Histon H3 Lysin 9 Dimethylierung durch Chaetocin *in vivo*.** *Drosophila* SL2-Zellen wurden 7 Tage mit 0,1 und 0,5  $\mu$ M Chaetocin und dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert, die Histone sauer extrahiert und massenspektrometrisch analysiert. Unmod: nichtmodifiziertes Histon H3 Lysin 9. Me1, me2, me3: Mono-, Di- und Trimethylierung von Histon H3 Lysin 9. Me3/Ac: Acetylgruppen weisen die gleiche Massenverschiebung wie eine Trimethylierung auf. Die Prozentwerte für alle möglichen Modifikationen einer Serie ergeben zusammen 100%.

Da eine Trimethylierung von H3 Lysin 9 im Massenspektrum von einer Monoacetylierung von Lysin 9 nicht zu unterscheiden ist, konnte diese Modifikation massenspektrometrisch nicht untersucht werden. Zur Untersuchung einer möglichen Reduktion der Trimethylierung von Lysin 9 wurde deshalb ein Western Blot mit einem für diese Modifikation spezifischen Antikörper durchgeführt. Abbildung 4-14 zeigt, dass nach Behandlung mit Chaetocin auch ein Abfall der H3 Lysin 9 Trimethylierung vorhanden ist. Das Signal in Spur 8 ist deutlich schwächer als in Spur 4. Im Vergleich dazu kommt es nach Chaetocinbehandlung zu keiner verminderten Dimethylierung von H3 Lysin 4. Diese Kontrolle zeigt gleiche Signalstärke im Western Blot nach Zellinkubation mit DMSO und Chaetocin.

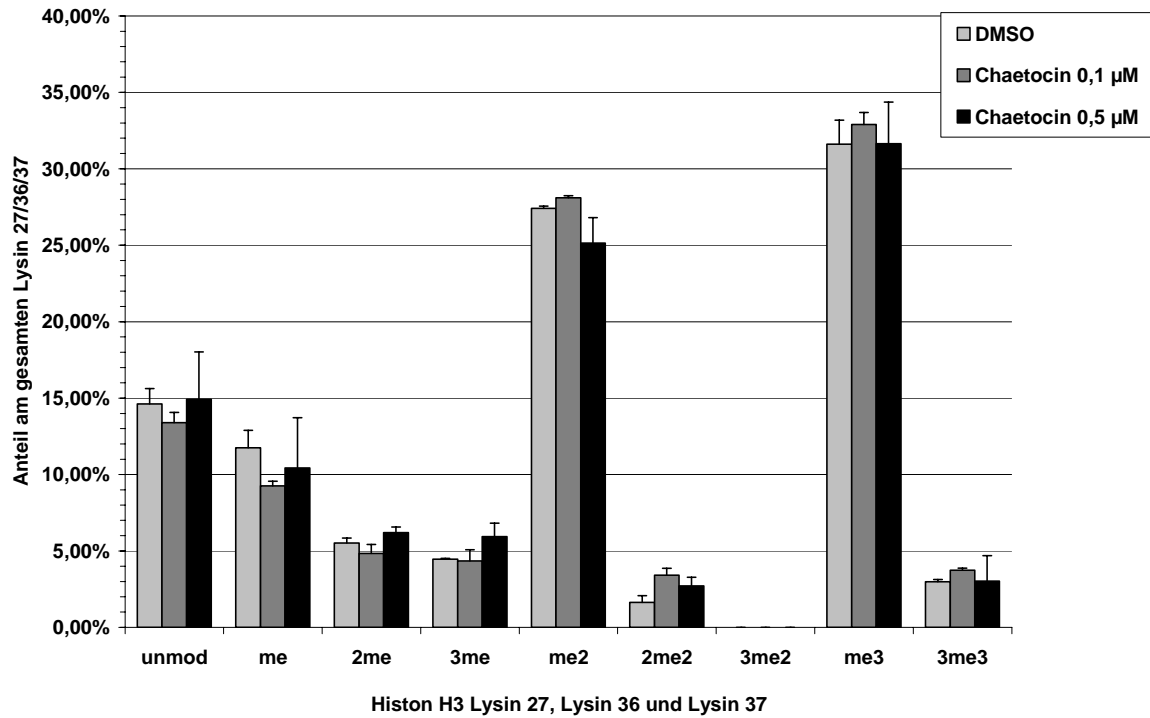


**Abbildung 4-14: Chaetocin vermindert die Histon H3 Lysin 9 Trimethylierung *in vivo*.** Spuren 1-3: Fortlaufende Verdünnungen von rekombinantem Histon H3. Spuren 4-11: Aus *Drosophila* SL2-Zellen isolierte Histone, ebenfalls fortlaufend verdünnt von Spur 4 bis 7 und 8 bis 11. Spuren 4-7: Behandlung mit DMSO. Spuren 8-11: Behandlung mit 0,5 µM Chaetocin. Auftrennung der Histone in 17% SDS-PAGE, Analyse durch Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen Histon H3 Lysin 9 Trimethylierung (Anti-H3-K9me3) und Histon H3 Lysin 4 Dimethylierung (H3K4me2).

Neben der Methylierung von Histon H3 Lysin 9 wurden auch die Acetylierung von Lysin 18 und 23 und die Methylierung von Lysin 27, Lysin 36 und 37 von Histon H3 untersucht. Es zeigte sich, dass diese Modifikationen auch nach 7 Tagen Zellinkubation und bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  Chaetocin im Medium durch Chaetocin nicht beeinflusst wurden (Abbildung 4-15, Abbildung 4-16).

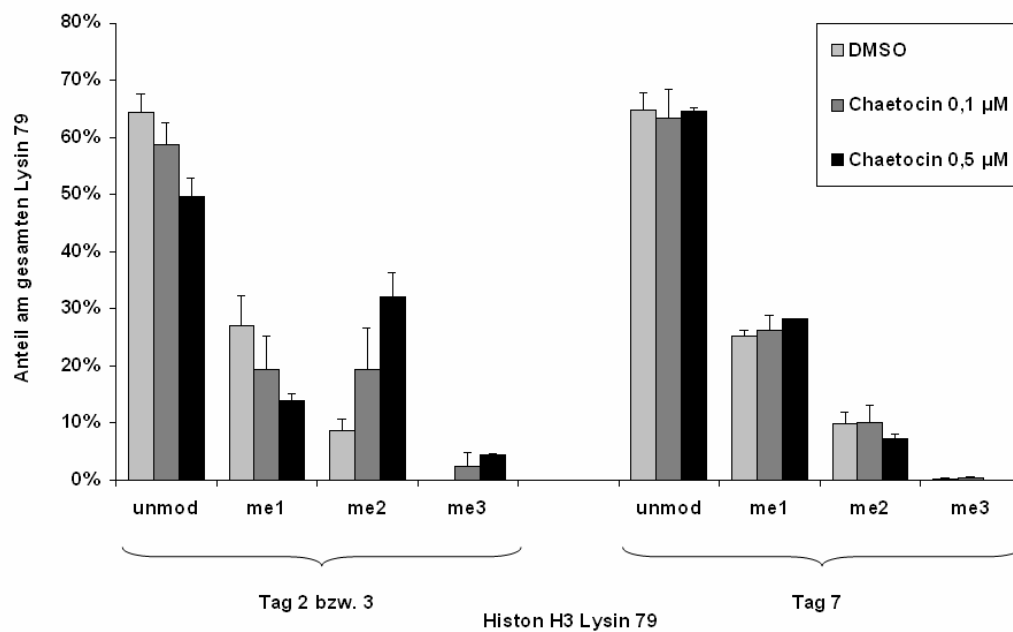


**Abbildung 4-15: Chaetocin hat keinen Effekt auf die Acetylierung von Histon H3 Lysin 18 und 23.** *Drosophila* SL2-Zellen wurden 7 Tage mit 0,1 und 0,5  $\mu\text{M}$  Chaetocin und dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert, die Histone sauer extrahiert und massenspektrometrisch analysiert. Unmod: nichtmodifiziertes Histon H3 an Lysin 18 und 23. Ac1: Singuläre Acetylierung von Histon H3 an Lysin 18 oder 23. Ac2: Sowohl Acetylierung von H3 Lysin 18 als auch Lysin 23. Die Prozentwerte für alle möglichen Modifikationen einer Serie ergeben zusammen 100%. Eine getrennte Analyse von Lysin 18 und Lysin 23 ist aufgrund der technischen Gegebenheiten nicht möglich.



**Abbildung 4-16: Chaetocin hat keinen Effekt auf die Methylierung von Histon H3 Lysin 27, Lysin 36 und 37.** *Drosophila* SL2-Zellen wurden 7 Tage mit 0,1 und 0,5 μM Chaetocin und dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert, die Histone sauer extrahiert und massenspektrometrisch analysiert. Die Prozentwerte für alle möglichen Modifikationen einer Serie ergeben zusammen 100%. Unmod: Histon H3 unmodifiziert an Lysin 27, 36 und 37. Me, 2me, 3me: Eine, zwei oder drei Monomethylierungen an Histon H3 Lysin 27, Lysin 36 oder Lysin 37. Me2, 2me2, 3me2: Eine, zwei oder drei Dimethylierungen an Histon H3 Lysin 27, Lysin 36 oder Lysin 37. Me3, 3Me3: Eine oder drei Trimethylierungen an Histon H3 Lysin 27, Lysin 36 oder Lysin 37. 2me3 entspricht aufgrund von Propionylierung und Trypsinverdau me2 und wird daher nicht getrennt aufgeführt (siehe 3.2.10.1). Eine getrennte Analyse der drei Lysine ist aufgrund der methodischen Gegebenheiten nicht möglich.

Lediglich aus SL2-Zellen extrahiertes Histon H3 Lysin 79 wies während der Zellbehandlung mit Chaetocin vorübergehend (nach Inkubation für zwei oder drei Tage) eine Abnahme der Monomethylierung und des unmodifizierten Lysin 79 auf und eine Zunahme der Dimethylierung. Diese Effekte kehrten sich bei längerer Inkubationsdauer (7 Tage) aber leicht ins Gegenteil um (Abbildung 4-17).



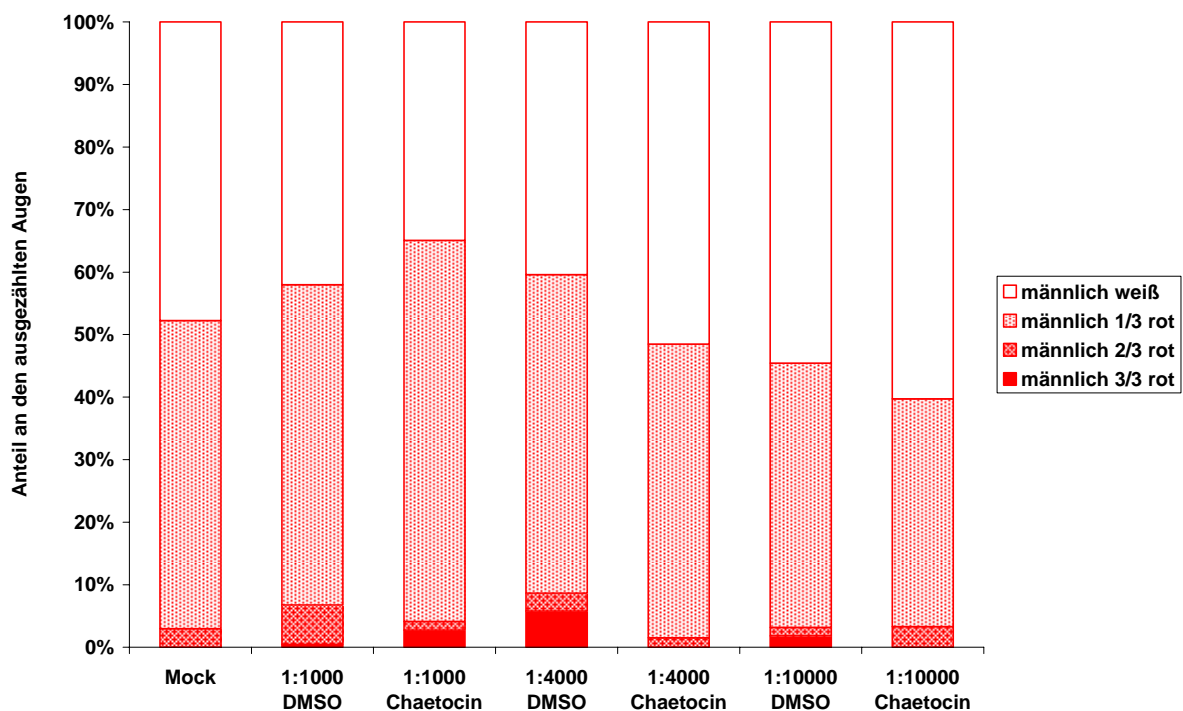
**Abbildung 4-17: Effekte von Chaetocin auf die Methylierung von Histon H3 Lysin 79.** *Drosophila* SL2-Zellen wurden mit DMSO, 0,1 µM und 0,5 µM Chaetocin über mehrere Tage inkubiert. Die Histone wurden an Tag 2 bzw. 3 und Tag 7 sauer extrahiert und ihre Modifikationen massenspektrometrisch analysiert. Unmod: Unmodifiziertes Lysin. Me1, me2, me3: Mono-, Di- und Trimethylierung von Lysin 79. Die möglichen Modifikationen einer Serie ergeben an Tag 2 bzw. 3 und an Tag 7 aufsummiert 100%.



### 4.3.3 Effekte von Chaetocin auf *Drosophila melanogaster* Fliegen

Nach erfolgter Charakterisierung des Effektes von Chaetocin auf die Histonmodifikationen von *Drosophila* SL2-Zellen wurde die Wirkung der Substanz auf einen vollständigen Fliegenorganismus näher beleuchtet.

Hierzu wurden *Drosophila melanogaster*  $ln(1)w^{m4}/Su(var)3-9/+$  Fliegen in Gläser mit speziellem Instant-Medium gebracht. Dieses wurde für die Vorversuche zunächst mit verschiedenen Lösungsmitteln versetzt, um deren Effekte auf die Augenfarbe der Fliegen zu testen. Es stellte sich heraus, dass DMSO (Chaetocin lag in DMSO-Lösung vor) allein schon ab Konzentrationen von 1:4000 im Medium einen Effekt hatte und zur Vermehrung der Phänotypen mit rotem Pigment führte. Butanol hingegen zeigte keinen Effekt auf die Augenfarbe der Fliegen.



**Abbildung 4-18: Effekt von Chaetocin auf die Augenfarbe männlicher *Drosophila melanogaster*  $ln(1)w^{m4}/Su(var)3-9/+$  Fliegen.** Die Fliegen wurden in Gläsern mit Medium mit verschiedenen Chaetocinanteilen (1:1000, 1:4000 und 1:10000) gehalten. Als Kontrollen dienten DMSO-Verdünnungen bzw. reines Medium (Mock). Neu geschlüpfte Fliegen wurden unterteilt in Fliegen mit weissen und bis zu 1/3 bzw. 2/3 und 3/3 rot pigmentierten Augen und ausgezählt. In der Abbildung sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Untergruppen aufgeführt.

Die Chaetocin-DMSO-Lösung wurde im Hauptversuch mit Butanol auf verschiedene Konzentrationen verdünnt und ins Instant-Medium gebracht. Als Kontrollen dienten DMSO-Butanol-Verdünnungen. Die in derartigem Medium geschlüpften Fliegen wurden dann verschiedenen Augenfarbengruppen zugeordnet und ausgezählt.

Wie in Abbildung 4-18 zu sehen, führt eine Konzentration von 1:1000 Chaetocin im Medium zu einer um etwa 7% vermehrten Expression männlicher Phänotypen mit rotem Augenfarbpigment im Gegensatz zu DMSO. Beim Vergleich mit unbehandelten Fliegen ergibt sich eine Steigerung von 13%. Allerdings zeigt auch DMSO 1:1000 eine Wirkung auf die Augenfarbe, wenn auch nicht in derselben Ausprägung wie Chaetocin. In höheren Verdünnungen hingegen ist kein Effekt von Chaetocin im Vergleich zu DMSO sichtbar. Auch bei weiblichen Fliegen zeigt Chaetocin in den obigen Konzentrationen keine Wirkung auf die Augenfarbe. (Daten nicht aufgeführt)

## 5 DISKUSSION

Mittels des Screenings einer Naturstoffbibliothek von etwa 3000 Substanzen wurden erstmals Inhibitoren einer Lysin-Histonmethyltransferase identifiziert. Inhibitoren anderer histonmodifizierender Enzyme hatten sich in der Vergangenheit als äußerst nützliche Tools in der Erforschung epigenetischer Zusammenhänge erwiesen und konnten teilweise innerhalb klinischer Studien auch therapeutisch eingesetzt werden. Chaetocin, eine der identifizierten SU(VAR)3-9 inhibierenden Substanzen, wurde näher charakterisiert. Es erwies sich als spezifisch für die Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 und hemmte diese kompetitiv. Auch *in vivo* war eine Hemmung der Methylierung von Histon H3 Lysin 9 nachweisbar.

### 5.1 DISKUSSION DER METHODEN

#### 5.1.1 Screening der Naturstoffbibliothek

Um Modulatoren der Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 zu identifizieren, wurden etwa 3000 *small molecules* einer Naturstoffbibliothek gescreent. Dabei wurden jeweils 8 Komponenten gepoolt und im Standardmethyltransferaseassay mit SU(VAR)3-9 und H3-Peptid auf ihr inhibitorisches Potential getestet (siehe 4.1).

*Small molecules* sind organische Substanzen, charakteristischerweise mit einem Molekulargewicht unter 1500 Dalton. Sie sind entweder synthetisch hergestellt oder Derivate von in der Natur vorkommenden Substanzen. Der Vorteil, den man sich im Screening von der Testung von Naturstoffen versprach, ist eine größere Ausbeute an nutzbaren Modulatoren als dies bei Testung von synthetischen Komponenten der Fall wäre. Ein beträchtlicher Teil der heute bekannten Inhibitoren von histonmodifizierenden Enzymen besteht nämlich aus Derivaten von Naturstoffen. Das prominenteste Beispiel ist der HDAC-Inhibitor Trichostatin A. Trichostatine wurden 1976 aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert (Tsuji et al., 1976). Aber auch die HDAC-Inhibitoren Trapoxin A und B wurden aus dem Pilz *Helicoma ambiens* als zyklische Tetrapeptide isoliert (Itazaki et al., 1990). Denkt man an ein mögliches therapeutisches Potential, so kann man anführen, dass etwa 30% der weltweit verkauften Medikamente in ihrer Grundstruktur auf Naturprodukten basieren (Grabley and Thiericke, 1999). Die vielleicht eindrucksvollsten Beispiele sind die Acetylsalicylsäure, deren Grundstruktur Salicylsäure ein Produkt der Weide ist, und Penicillin G.

Die grosse Ausbeute von 41 Substanzen, welche die SU(VAR)3-9-Aktivität um mehr als 60% verringerten, scheint obige Spekulationen zu bestätigen. In einem Screen für Inhibitoren von

Arginin-Histonmethyltransferasen, bei dem synthetische Komponenten untersucht wurden, konnten Cheng et al. nur 9 Inhibitoren in einer Substanzbibliothek von 9000 Substanzen identifizieren (Cheng *et al.*, 2004a). Der Grund für die größere Ausbeute in einer Naturstoffbibliothek ist jedoch unklar. Es ließe sich vermuten, dass die Hersteller bestimmter *small molecules* diese bilden, um sich an Umwelteinflüsse anzupassen. Konkret könnte dies z.B. für *Chaetomium minutum*, den Pilz aus dem Chaetocin isoliert wurde, bedeuten, dass er von einer verminderten SU(VAR)3-9-Aktivität in seiner Umgebung profitiert. Angenommen, *Chaetomium minutum* lebt in parasitärer Gemeinschaft mit einem Wirtsorganismus. Möglicherweise führt eine verminderte Genrepression durch die erhöhte Plastizität im Wirtsgenom zu Wirtspheänotypen, die ein besseres Wachstum von *Chaetomium minutum* garantieren. Da SUV39H1-Überexpression zur Wachstumsverzögerung betroffener Organismen führt (Melcher *et al.*, 2000), könnte die Aktivitätsverminderung im Umkehrschluss zur Proliferationssteigerung des Wirts führen. Das wäre die ideale Lebensgrundlage für einen Parasiten.

Substanzbibliotheken können auf verschiedene Arten für das Studium zellulärer Mechanismen eingesetzt werden. Es gibt den phänotyporientierten Ansatz, bei dem die *small molecules* auf ihre Wirkung auf einen bestimmten biologischen Prozess gescreent werden. D.h. es werden zumeist Zellen mit den Substanzen inkubiert. Alternativ kann eine Substanzbibliothek auch auf die Wirkung der Komponenten auf die Aktivität eines einzelnen aufgereinigten oder rekombinanten Proteins getestet werden. Wir entschieden uns für die zweite Version, weil wir speziell an der Wirkung der Substanzen auf das Enzym SU(VAR)3-9 interessiert waren. Noch interessanter wäre es gewesen, Inhibitoren von E(z) zu identifizieren, da die Rolle dieser Histonmethyltransferase in menschlichen Karzinomen besser untersucht ist als die von SU(VAR)3-9. Dies war aber deshalb unmöglich, weil E(z) in unserem Labor nur in kleinen Mengen und mit niedriger Aktivität hergestellt werden konnte.

Für ein High-throughput-Screening gelten normalerweise verschiedene Forderungen: Der Screen sollte soweit wie möglich automatisiert sein und zur Minimierung der Kosten möglichst klein gehalten werden (Ward et al., 2002). So werden häufig Roboter und spezielle Pipetten verwendet. Cheng et al. benutzten bei der Suche nach Argininmethyltransferaseinhibitoren einen ELISA-basierten High-throughput-Assay, bei dem ein Roboter zum Einsatz kam. Die Methylierung wurde autoradiographisch mit Antikörpern sichtbar gemacht. Für unser Screening wären generell drei Methoden in Frage gekommen: Ein Standardmethyltransferaseassay mit nachgeschalteter massenspektrometrischer Analyse, ein Assay in Kombination mit der autoradiographischen Methode und ein *Spot and Count Assay*.

Der Nachteil der Massenspektrometrie ist der große technische Aufwand, der nötig ist, um die Assaysamples für die Analyse vorzubereiten und auch der Zeitaufwand, um die Spektren auszuwerten. Die Autoradiographische Methode ist schlecht zu quantifizieren, da jede Probe auf ein Gel aufgetragen werden muß, ist auch hier ein größerer Aufwand vonnöten. Wir entschieden uns daher für einen *Spot and Count Standardmethyltransferaseassay* als Screeningmethode. Dieser wurde ohne die Verwendung von Robotern und anderen technischen Hilfsmitteln pipettiert. Um die Praktikabilität zu verbessern, wurden jeweils 8 Substanzen gepoolt. Wir gingen davon aus, dadurch zwar einige der Modulatoren von SU(VAR)3-9 nicht zu identifizieren. Die starken Inhibitoren sollten sich aber trotzdem durchsetzen. Wir etablierten einen empirisch festgelegten Grenzwert von 65% SU(VAR)3-9-Restaktivität, bei dessen Unterschreitung der betroffene Pool in seine Einzelsubstanzen aufgesplittet wurde. Diese wurden dann nochmals mit SU(VAR)3-9 im Standard-Histonmethyltransferase-Assay getestet. Um die Praktikabilität dieses Grenzwertes zu testen, wurden auch die 8 Pools aufgesplittet und einzeln getestet, die zwischen 65 und 70% Restaktivität aufwiesen: Ein Inhibitor war enthalten, der die SU(VAR)3-9-Aktivität um 95,5% verringerte, drei mit einer Su(var)3-9-Restaktivität zwischen 20 und 25%. Die Testung einiger Pools mit SU(VAR)-Aktivitäten zwischen 70 und 80% ergab einen Inhibitor. (Ein Inhibitor war dabei als Substanz definiert, die die SU(VAR)3-9-Aktivität auf unter 25% des Ausgangswertes verminderte.) Von den 33 getesteten Pools mit unter 65% SU(VAR)3-9-Restaktivität enthielten 20 Pools ein bis zwei Inhibitoren. 7 Pools enthielten keine Substanzen, die die SU(VAR)-Aktivität beeinflussten. 6 Pools enthielten zwei bis drei Substanzen, die zwar nicht als Inhibitoren gezählt wurden, die aber die SU(VAR)-Aktivität jeweils auf unter 50% inhibierten und deren Wirkung sich im Pool wohl aufaddierte. Der etablierte Grenzwert erwies sich daher als praktikabel, hätte aber ebensogut durch den Grenzwert von 70% Restaktivität ersetzt werden können.

### 5.1.2 *Spot and Count Assay* verschiedener Histonmethyltransferasen mit Chaetocin

Zum Nachweis der Spezifität der Chaetocinhemmung für SU(VAR)3-9 wurde die Substanz im Standardmethyltransferaseassay (siehe 3.2.4.1) mit verschiedenen Histonmethyltransferasen getestet. Um eine Vergleichbarkeit der jeweiligen Assays zu erreichen, wurde versucht, jeweils gleiche Mengen und Aktivitäten der Histonmethyltransferasen im Assay einzusetzen. Ebenso wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit alle Reaktionen bei 30 °C für 30 Minuten inkubiert.

Für SU(VAR)3-9 lag diese Inkubationsdauer aufgrund von Ergebnissen aus Vorexperimenten in unserem Labor nahe. Für andere Histonmethyltransferasen war sie möglicherweise ungünstig gewählt. Die Methylierungsreaktionen könnten hierbei schon jenseits des linearen Bereichs der betreffenden HMTs und gesättigt sein, daher könnte S-Adenosyl-Homocystein als kompetitiver Inhibitor von S-Adenosyl-Methionin wirken und zusätzliche inhibitorische Effekte von Chaetocin oder anderen Inhibitoren wären schwer sichtbar.

Entsprechend den Untersuchungen von Eskeland et al. ist die Methylierungsreaktion des Enzyms SU(VAR)3-9 delta 213 während eines Zeitraums von 60 Minuten linear (Eskeland *et al.*, 2004). Chin et al. zeigten, dass auch das menschliche Homolog SUV39H1 über 40 Minuten eine lineare Reaktionsgeschwindigkeit aufweist (Chin *et al.*, 2006). Dagegen werden DIM-5 und PR-SET7 in Studien nur 5-15 Minuten inkubiert (Xiao et al., 2005; Zhang et al., 2002).

Laut einer anderen Studie ist die HMT G9a nur für cirka 10 Minuten linear und es besteht gemischte Produkthemmung (Patnaik et al., 2004). Eine in unserem Labor erstellte Aktivitäts-Zeit-Kurve von G9a mit und ohne Chaetocin hingegen zeigte zwar auch einen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit nach 10 Minuten, allerdings zeigte sich der inhibitorische Effekt von Chaetocin ebenfalls erst nach diesen 10 Minuten und verstärkte sich in den folgenden Minuten. Dies spräche dann doch für eine längere Inkubationsdauer.

Ein weiterer postulierter Nachteil der Inkubation über 30 Minuten war, dass selbst bei linearem Verhalten der Histonmethyltransferasen im ungehemmten Zustand durchaus die Möglichkeit bestand, dass nach Zugabe von Chaetocin die Reaktionen über dieselben Zeiträume nicht linear bleiben würden. Dies konnte unsere eigene Untersuchung von G9a mit und ohne Inhibitor nicht bestätigen. Auch eine Wiederholung der Linearitätsprüfung von SU(VAR)3-9 delta 213 zeigte in gehemmtem und ungehemmtem Zustand linearen Verlauf und eine deutlicher werdende Hemmung mit fortschreitender Zeit.

### 5.1.3 In vivo Testung von Chaetocin an SL2-Zellen

Für die Untersuchung einer möglichen *in vivo* Hemmung von SU(VAR)3-9 durch Chaetocin wurden *Drosophila* SL2-Zellen ausgewählt. Da das Screening an *Drosophila* SU(VAR)3-9 delta 213 erfolgt war, erschien dies als der logische Schritt. SL2-Zellen bieten gegenüber Säugerzellen außerdem den Vorteil, dass der praktische Aufwand ihrer Kultur sehr gering ist und Kontaminationen selten sind. Nachteilig ist aber, dass die für SL2-Zellen gefundene Inhibition der Histon H3 Lysin 9 Dimethylierung nicht ohne weiteres auch für Säugerzellen angenommen werden kann. Wir versuchten deshalb, HeLa-Zellen einer humanen Cervixkarzinomlinie und 3T3-Zellen der Maus (Fibroblasten) mit Chaetocin zu inkubieren. Dies war deshalb unmöglich, weil sich der toxische Effekt von Chaetocin, der sich auch schon bei den SL2-Zellen manifestiert hatte, bei Säugerzellen um ein Vielfaches potenzierte. Selbst kleinste Chaetocinkonzentrationen führten zum Zelltod. Möglicherweise könnte ein in der Zukunft anzufertigendes, chemisch modifiziertes, weniger toxisches Derivat des Chaetocin in weiteren Untersuchungen eingesetzt werden.

## 5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

### 5.2.1 Modulatoren von SU(VAR)3-9

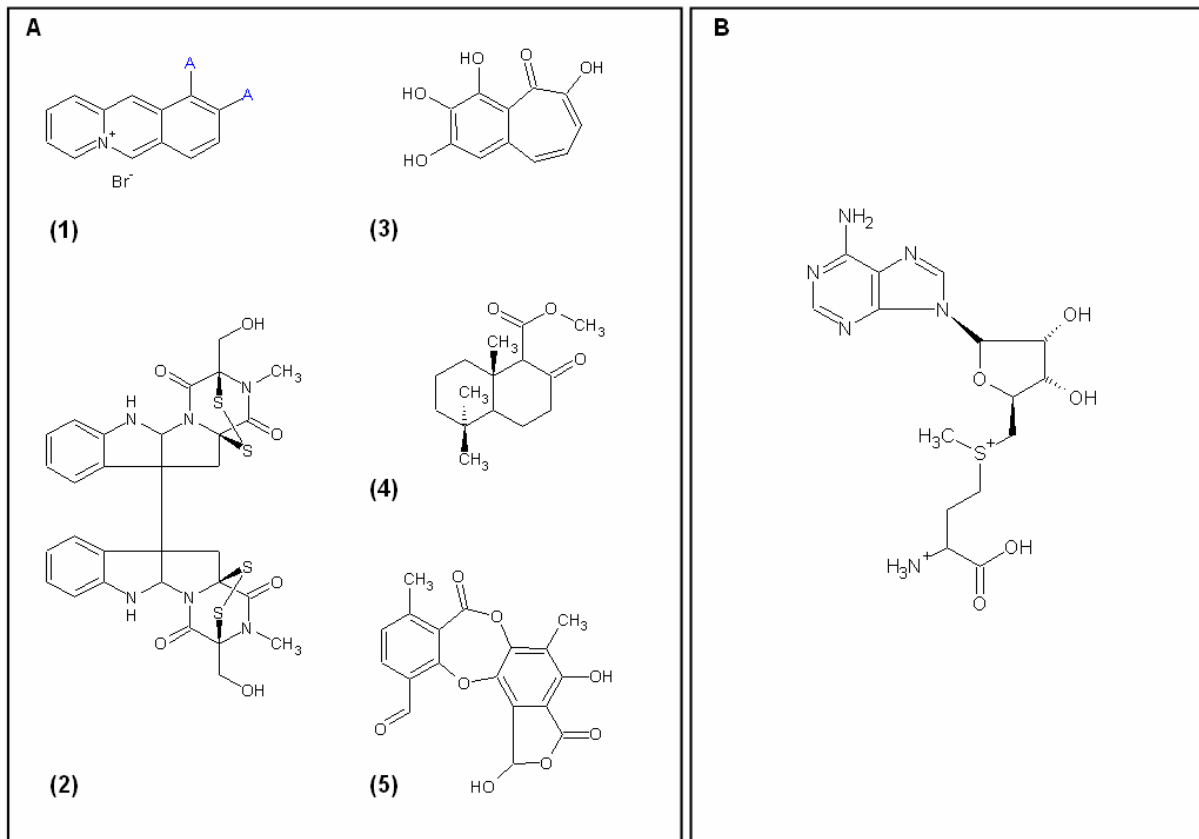
Im Screening der Naturstoffbibliothek fanden sich 28 Substanzen, die die Aktivität von SU(VAR)3-9 delta 213 auf unter 25% hemmten. Sie wurden als Inhibitoren definiert.

Vergleicht man die Strukturen verschiedener Inhibitoren aus dem Screening miteinander auf der Suche nach Gemeinsamkeiten, so fallen mehrere Dinge auf. So enthalten fast alle der in Abbildung 5-1 gezeigten Strukturen planare Teilkomponenten. In dieser Hinsicht besteht Ähnlichkeit zum SU(VAR)-Substrat S-Adenosyl-Methionin mit seiner Purinstruktur. Als zweites enthalten mit Ausnahme der Acridiziniumbromide alle aufgeführten Substanzen eine Kombination aus Carbonyl-, Hydroxyl-, Carboxyl- oder Carboesterstrukturen um ein zyklisches Grundsystem. Auch hierin besteht eine Übereinstimmung mit S-Adenosylmethionin. Nur Chaetocin enthält aber Schwefelatome, und wie in Abbildung 5-1 ersichtlich verfügt auch SAM über ein positiv geladenes Schwefelatom.

Letztendlich muss aber bemerkt werden, dass all diese Ähnlichkeiten eher allgemeiner Natur sind. Es gibt keine wirklich eindeutig gemeinsame Strukturkomponente, die in allen Inhibitoren vorhanden wäre und die somit nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip mit dem aktiven Zentrum von SU(VAR) interagieren könnte. Hierbei muss auch in Betracht gezogen werden, dass nur von Chaetocin gezeigt wurde, dass es SAM-kompetitiv hemmt. Über den Wirkungsmechanismus der anderen Substanzen ist nichts bekannt. Möglich wäre für sie auch ein allosterischer Hemmmechanismus außerhalb des aktiven Zentrums (der SET-Domäne) und die nicht kompetitive Hemmung von SU(VAR)3-9. Da auch die Chromodomäne für die Aktivität von SU(VAR)3-9 eine Rolle spielt (Chin *et al.*, 2006) wäre auch eine Interaktion dort vorstellbar.

Um bessere Aussagen machen zu können, wäre es daher notwendig gewesen, den Einfluß aller Inhibitoren auf die Enzymkinetik zu untersuchen um dann einen zweiten Blick auf Inhibitor- und Enzymstruktur zu werfen und mögliche Interaktionen zu identifizieren. Neben einem enormen zeitlichen Aufwand gab es einige andere Gründe, die dafür sprachen, dies zu unterlassen.





**Abbildung 5-1: Vergleich der Strukturen verschiedener Inhibitoren aus dem Screening.**

**A: (1) Aminoacridiziniumbromid (2) Chaetocin (3) Purpurogallin (4) 8-Oxo-12-nordrیمان-11-säuremethylester (5) Norstictinsäure.**

**B: Strukturformel von S-Adenosylmethionin zum Vergleich.**

Mit einigen der Inhibitoren aus dem Screening konnte aufgrund ihrer mangelnden Spezifität nicht weitergearbeitet werden: So erwiesen sich die Substanz 3174 mit der Position 35 G 04, 2,3-Dichlor-4b,5,6,7,8,9,10,10a-octahydro-1,4-dihydroxybenzo[3,4]cyclobuta[1,2-b]cycloocten und 3-Dimethylamino-5-(2-thienylcarbonyloximino)-2-thioxothiazolidin-4-on als HDAC-Inhibitoren, Purpurogallin hemmt außer SU(VAR)3-9 auch noch eine Xanthinoxidase (Sheu et al., 1998). Da im Screening wegen größerer verfügbarer Mengen ausschließlich mit H3-Peptid gearbeitet worden war, musste das inhibitorische Potential jedes Inhibitors noch einmal mit Histon H3 im Assay überprüft werden, um peptidspezifische Effekte auszuschließen. Einige der Stoffe, unter anderem auch Purpurogallin, zeigten dabei eine verminderte Enzymhemmung. Limitierend für die weitere Arbeit mit den Inhibitoren war aber letztendlich die Tatsache, dass die Substanzen der Naturstoffbibliothek nur in sehr geringen Mengen von unter 1 Milliliter nachbestellbar waren. Chaetocin, einer der besten Inhibitoren im Screening wie auch im Assay mit Histon H3, war zum Zeitpunkt unserer Experimente käuflich erwerblich. Es war der einzige Inhibitor, der in Mengen verfügbar war,

mit denen man sinnvolle Experimente auch in der Zellkultur planen konnte. Aus diesem Grund wurde Chaetocin und seine Wirkung auf SU(VAR)3-9 und andere HMTs *in vitro* und *in vivo* näher charakterisiert.

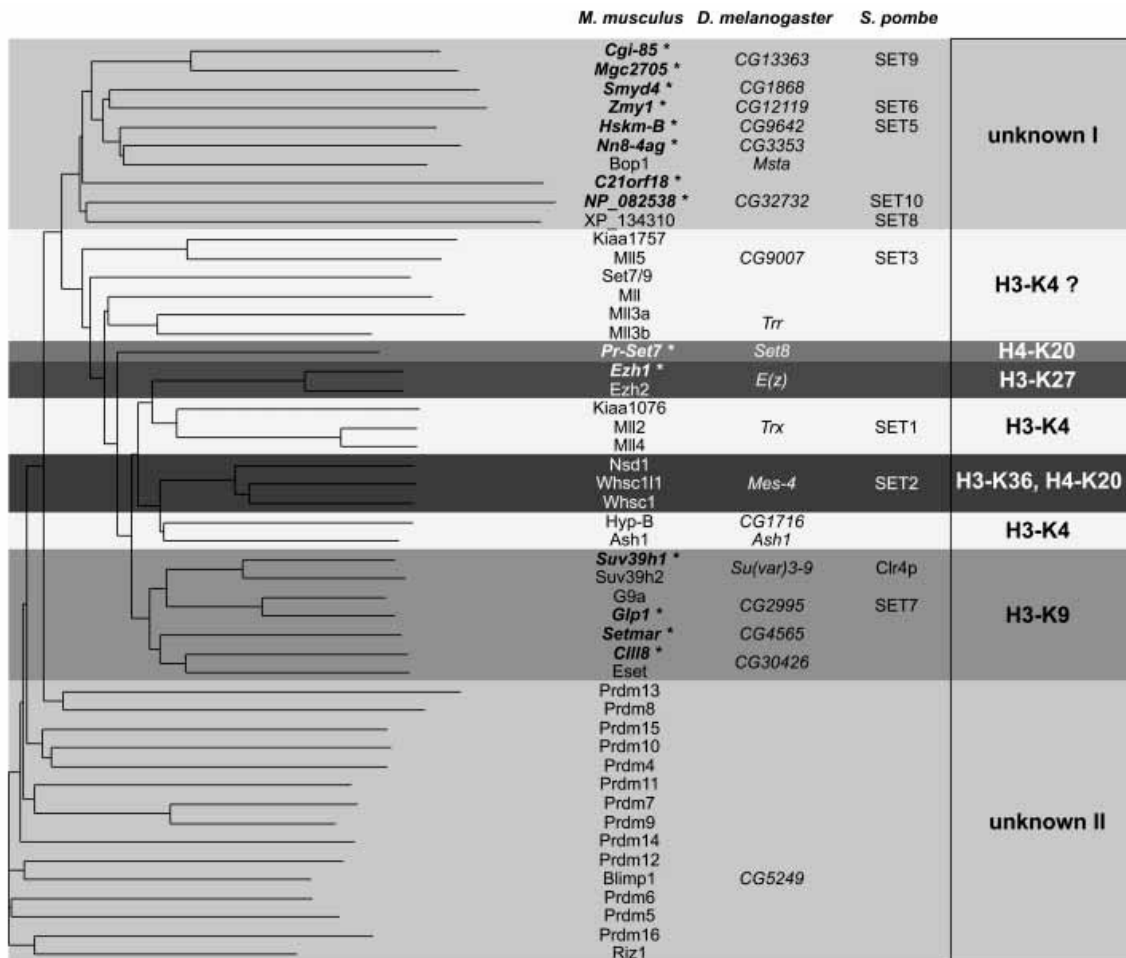
### 5.2.2 Spezifität von Chaetocin: Hemmung von SU(VAR)3-9 oder Hemmung der Methylierung von Histon H3-K9?

Um einen Eindruck von der Spezifität der Chaetocinhemmung für SU(VAR)3-9 zu bekommen, wurden verschiedenen HMTs mit Chaetocin getestet. Dabei stellte sich heraus, dass E(z)-Komplex, PR-SET7 und SET7/9 auch in hohen Konzentrationen nicht gehemmt wurden, die halbmaximalen Hemmkonzentrationen  $IC_{50}$  lagen jeweils über 180  $\mu$ M und konnten daher nicht bestimmt werden, weil die Chaetocin-Stammlösung keine höhere Konzentration im Assay zuließ. DIM-5 und G9a hingegen wurden bei höheren Chaetocinkonzentrationen gehemmt, DIM-5 mit einer  $IC_{50}$  von etwa 3  $\mu$ M und G9a mit einer  $IC_{50}$  von cirka 18  $\mu$ M Chaetocin.

Der Grund für diese eingeschränkte Spezifität könnte darin liegen, dass diese beiden HMTs mit SU(VAR)3-9 näher verwandt sind als E(z)-Komplex, PR-SET7 und SET7/9. Es ist verständlich, dass DIM-5 als Ortholog von SU(VAR)3-9 in *Neurospora crassa* gehemmt wird, da auch humanes SUV39H1 gehemmt wird. Ein Blick auf den Verwandtschaftsbaum in Abbildung 5-2 zeigt, dass auch G9a viel mehr Strukturähnlichkeiten mit dem Maus-SU(VAR)-Ortholog aufweist, als E(z), PR-SET7 und SET7/9. Es ist mit SU(VAR)3-9 unmittelbar verwandt. G9a, DIM-5, SUV39H1 und SU(VAR)3-9 methylieren alle Histon H3 Lysin 9. Interessant ist aber auch, dass sowohl G9a als auch DIM-5 im Unterschied zu SU(VAR)3-9 keine Chromodomäne enthalten (Tamaru *et al.*, 2001), die ja neben der SET-Domäne für die HMT-Aktivität eine Rolle spielt. Falls Chaetocin seine Hemmwirkung auch über die Interaktion mit der SU(VAR)-Chromodomäne entfalten würde, so wäre umso mehr verständlich, warum eine Wirkung auf DIM-5 und G9a zwar vorhanden ist, aber nicht in dem Ausmaß der Wirkung auf SU(VAR)3-9 und SUV39H1. Von Interesse wäre in diesem Zusammenhang auch der Test von *S. pombe* CLR4 mit Chaetocin, dieses SU(VAR)3-9-Ortholog enthält ebenfalls eine Chromodomäne.

Fraglich ist aufgrund der gegenüber SU(VAR)3-9 achtzehnfach höheren  $IC_{50}$  von G9a letztendlich, ob Chaetocin als SU(VAR)3-9-Inhibitor oder als ein Inhibitor der Histon-H3-K9-Methylierung bezeichnet werden sollte. Denn G9a und SU(VAR)3-9 sind zwar verwandt, aber im Unterschied zu DIM-5 und SU(VAR)3-9 keine Orthologe.

*In vivo* konnte eine Reduktion der Di- und Trimethylierung von Histon H3 Lysin 9 nachgewiesen werden. In der Maus werden diese beiden Methylierungen von verschiedenen Enzymen übernommen. G9a macht eine Mono- und Dimethylierung (Rice *et al.*, 2003), Suv39h1 die Trimethylierung (Rice *et al.*, 2003; Schotta *et al.*, 2004). Man könnte also schlußfolgern, dass die Veränderungen *in vivo* nicht alleine durch eine Hemmung von SU(VAR)3-9 sondern auch von G9a bedingt sind.



**Abbildung 5-2: Verwandtschaftsbaum von SET-Domänen-Proteinen der Maus (aus (Schotta *et al.*, 2004)).** Basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen.

Allerdings wurden unsere *in vivo* Versuche an *Drosophila* SL2-Zellen vorgenommen. In *Drosophila* wurde erst nach Abschluss dieser Arbeit ein dem Maus-G9a entsprechendes Enzym identifiziert, dG9a, das Euchromatin mono-, di- und trimethyliert (Stabell *et al.*, 2006). Ein Test mit Chaetocin war deshalb nicht möglich. *Drosophila* SU(VAR)3-9 ist für heterochromatische Di- und Trimethylierung zuständig und Nullmutanten zeigen einen Verlust der Di- und Trimethylierung von Histon H3 Lysin 9 am Chromozenter (Ebert *et al.*,

2004). Außerdem konnte innerhalb von Versuchen in unserem Labor nachgewiesen werden, dass rekombinantes SU(VAR)3-9 zu Di- und Trimethylierung von Histon H3 fähig ist. Abbildung 4-5 z.B. zeigt die SU(VAR)3-9 Histon H3 Lysin 9 Methylierung in einem *in vitro* Assay, hierbei ist eine Mono-, Di- und Trimethylierung möglich. Auch in diesem Versuch wird entsprechend den *in vivo* Versuchen bei niedrigen Chaetocinkonzentrationen zunächst die Di- und Trimethylierung gehemmt, bei höheren Chaetocinkonzentrationen auch die Monomethylierung (dies war *in vivo* nicht nachweisbar). Eine Hemmung von Di- und Trimethylierung in *Drosophila* wäre demnach also nicht einer gleichzeitigen Hemmung von SU(VAR)3-9 und dG9a *in vivo* gleichzusetzen.

Für die Klärung der Fragestellung, ob alleine SU(VAR)3-9 bzw. seine Orthologe durch Chaetocin *in vivo* gehemmt werden, könnten weitere Versuche an Säugerzellen z.B. der Maus oder mit *Drosophila* SL2-Zellen helfen. Hierbei müsste immunhistochemisch durch spezifische Antikörper für Di- und Trimethylierung geklärt werden, ob z.B. bei der Maus nur die Suv39h1-abhängige Trimethylierung oder auch die G9a-abhängige Dimethylierung gehemmt werden. Wichtig wäre dies auch deshalb, weil beide Enzyme mit sehr unterschiedlichen Chromatinzuständen assoziiert sind: G9a und Mono- und Dimethylierung von H3-K9 mit Euchromatin, Suv39h1 und Trimethylierung mit perizentrischem Heterochromatin. Erste Versuche an Mauszellen (3T3) scheiterten an der stark toxischen Wirkung von Chaetocin. Die kürzliche Identifikation von *Drosophila* dG9a würde mit Antikörpern gegen H3-K9-Di- und -Trimethylierung auch eine Untersuchung an den gegenüber Chaetocin unempfindlicheren SL2-Zellen ermöglichen: Hier könnte man zwischen einer euchromatischen dG9a-abhängigen Hemmung der Methylierung und einer heterochromatischen SU(VAR)3-9-abhängigen Hemmung unterscheiden.

### 5.2.3 Kompetitive Hemmung von SU(VAR)3-9 durch Chaetocin

Zur näheren Charakterisierung der Hemmung von SU(VAR)3-9 durch Chaetocin wurden Assays zur Untersuchung der Enzymkinetik durchgeführt. SU(VAR)3-9 wurde mit steigenden Chaetocinkonzentrationen versetzt und die Aktivität doppeltreziprok gegen die S-Adenosylmethioninkonzentration in Form eines Lineweaver-Burk-Diagramms aufgetragen (Abbildung 4-6). Da alle Kurven die Y-Achse im selben Punkt schnitten, wurde angenommen, dass Chaetocin SU(VAR)3-9 kompetitiv zu SAM hemme.

Für die Enzymkinetik wurde die delta-213-Mutation des Enzyms verwendet, da diese aufgrund des fehlenden N-Terminus nicht dimerisieren kann und daher ein linearer Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Aktivität besteht. Beim Wildtyp wäre

dies durch kooperative Effekte eventuell nicht der Fall. Durch Verwendung von SU(VAR)3-9  $\Delta 213$  sind daher genauere Werte für die Michaeliskonstante  $K_m$  und die Katalysekonstante  $k_{cat}$  zu erwarten. Die Reaktionen wurden mit und ohne Chaetocin jeweils nur 5 Minuten inkubiert, um sicher im linearen Bereich der Enzymkinetik zu liegen. Dies wird in Abschnitt 5.1.2 näher erläutert. Die Inhibitorkonstante  $K_i$  war in unseren Versuchen etwa 1,4. Per Definitionem muß für eine rein kompetitive Hemmung die halbmaximale Hemmkonzentration  $IC_{50}$  größer als die Inhibitorkonstante  $K_i$  sein. Die  $IC_{50}$  beträgt aber etwa 1  $\mu M$ . Handelt es sich also trotz eindeutigen Lineweaver-Burk-Diagramms um keine kompetitive Hemmung?

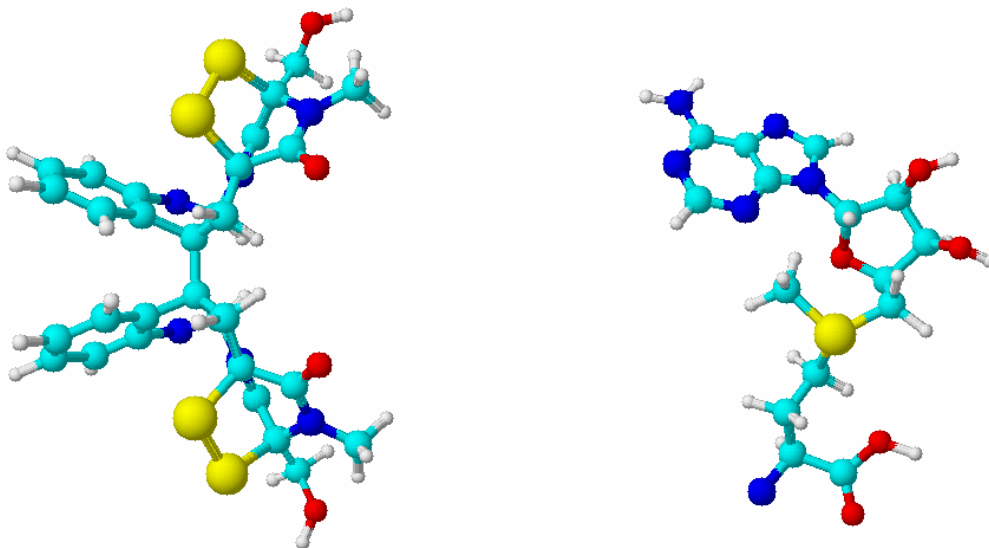
Hierzu ist zu bemerken, dass  $IC_{50}$  und  $K_i$  an verschiedenen Serien von SU(VAR)3-9 bestimmt wurden. Die  $K_m$ , welche in die Berechnung von  $K_i$  einfließt, differierte in unserem Labor bei verschiedenen Bestimmungen sehr stark: Wurde sie von Eskeland et al. mit circa 25,9  $\mu M$  beschrieben (Eskeland *et al.*, 2004), so lag sie während der Chaetocin-SU(VAR)-Kinetikversuche bei 8,6  $\mu M$ . Im ersten Fall wurde für die Bestimmung H3-Peptid verwendet, im zweiten rekombinantes Histon H3. Solche Streubreiten sind nicht ungewöhnlich, denn auch die  $K_m$  für SUV39H1 variierte bei Chin et al. in verschiedenen Versuchen zwischen 6 bis 12  $\mu M$  (Chin *et al.*, 2006). Dies unter Verwendung von rekombinantem H3 und Wildtyp-H3. Die  $K_m$  für G9a wurde von Patnaik et al. auf einen Bereich zwischen 1,8 (Wildtyp-H3) und 2,65 (rekombinantes H3) festgelegt (Patnaik *et al.*, 2004). Die Abweichung von  $IC_{50}$  und  $K_i$  von der Definition könnten also auch durch Streuung erklärt werden.

Vergleicht man die Strukturen von Chaetocin und S-Adenosylmethionin in Abbildung 5-1 und Abbildung 5-3, so stellt man allerdings auch nicht unbedingt eine Ähnlichkeit fest, an der man einen kompetitiven Hemmmechanismus ablesen könnte. Seeger et al. untersuchten das Bindungsepitop von SAM an SU(VAR)3-9. Dabei stellte sich heraus, dass das Adenin des SAM in engem Kontakt zum Enzym steht. Der aromatische Ring wird von SU(VAR)3-9 umschlossen. Eine von dieser Arbeitsgruppe veröffentlichte Bindungstasche von SU(VAR)3-9 mit assoziiertem SAM war zum Zeitpunkt dieser Arbeit leider nicht mehr verfügbar. In einer Arbeit mit dem SU(VAR)3-9-Ortholog DIM-5 konnte gezeigt werden, dass die post-SET-Domäne des Enzyms Teile des SAM-Adeninringes bindet (Zhang *et al.*, 2003). Die entsprechende Struktur in Chaetocin könnte möglicherweise die Indolinstruktur sein.

Zwei neuere Studien zeigen eine Möglichkeit der Hemmung auf: Vaquero et al. beschreiben, dass die Histondeacetylase SIRT SUV39H1 in der SET-Domäne an Lysin 266 deacetyliert und so dessen Aktivität steigert. Sie stellen die Hypothese auf, dass eine Acetylierung die Interaktion zwischen SET und post-SET verändert und dadurch die Enzymaktivität

vermindert (Vaquero *et al.*, 2007). Isham et al. gehen davon aus, dass Chaetocin in seiner Struktur einem acetylierten Histonlysinrest gleiche (Isham et al., 2007). Möglich wäre also, dass Chaetocin durch eine Ähnlichkeit zum acetylierten Lysinrest 266 die Interaktion zwischen SET und post-SET schwächt und so zum Beispiel zu einer Änderung der Konfiguration der Bindungstasche für SAM führt. Dies könnte die nicht mit kompetitiver Hemmung übereinstimmende  $IC_{50}$  von Chaetocin erklären. Da andererseits, wie bereits erwähnt, auch SAM mit der post-SET-Domäne interagiert, ist eine gleichzeitige Konkurrenz von Chaetocin und SAM um eine Bindungsstelle nicht ausgeschlossen.

Eine Möglichkeit zur besseren Charakterisierung des Bindungstyps, wenn auch nicht des -orts von Chaetocin an SU(VAR)3-9 wäre die Kalorimetrie, durch die die Bindungsenergie bestimmt wird.



**Abbildung 5-3: Vergleich der Strukturformeln von Chaetocin (links) und SAM (rechts).**

**Hellblau: C-Atome. Weiß: H-Atome. Gelb: S-Atome. Rot: O-Atome. Dunkelblau: N-Atome.**

Interessant wäre auch die Untersuchung des Hemmmechanismus' von Chaetocin gegenüber dem Substrat Histon H3 gewesen. Versuche in unserem Labor führten leider zu keinem eindeutigen Ergebnis, da Histone sehr stark an Reaktionsgefäßwände adhären und dies keine genaue H3-Titration ermöglicht.

#### 5.2.4 Zelldichteabhängige Toxizität von Chaetocin

Für die Untersuchung der Wirkung von Chaetocin *in vivo* wurden Versuche an *Drosophila* SL2-Zellen durchgeführt.

Dabei zeigte sich ein toxischer Effekt von Chaetocin. Da Chaetocin wie auch Chetomin, Sporidesmin, Gliotoxin, Aranotine und Oryzachlorin zu den 3,6-Epidithio-2,5-Piperazinen gehört, ist dies nicht verwunderlich (Hauser et al., 1970). Mittlerweile sind rund 50 ETPs identifiziert. Neben einer antibiotischen Komponente, die ihren Produzenten wohl als Selektionsvorteil dient, antiviralen und immunmodulatorischen Eigenschaften verfügen diese Substanzen auch über zytotoxische Effekte (Waring and Beaver, 1996). Der charakteristische Diketopiperazinring mit seiner internen Disulfidbrücke ist verantwortlich für die meisten biologischen Eigenschaften dieser Moleküle (Waring et al., 1996). Sporidesmin beispielsweise wirkt stark lebertoxisch und hämolytisch. Dies scheint einerseits durch bei der zyklischen Reduktion der Disulphide/Autoxidation der Thiole freiwerdende freie Radikale wie Superoxid oder Hydrogenperoxid bedingt zu sein (Munday, 1989). In einigen Studien wirkten Zn-Ionen (Smith et al., 1977) und freie Radikalfänger wie Vitamin E protektiv (Munday, 1989). Ein weiterer Grund für die Toxizität könnte eine Inaktivierung von Proteinen durch Bildung gemischter Disulphide mit den ETPs sein, wie es *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Gardiner et al., 2005).

Für Chaetocin wurde durch die Erstbeschreiber ein antibakterieller und zytostatischer Effekt beschrieben (Hauser et al., 1970). Die akute Toxizität wurde durch Hauser et al. durch perorale Verabreichung (DL<sub>50</sub> 1,7 mg/kg) und intraperitoneale Applikation (DL<sub>50</sub> größer 1g/kg) an der Maus ermittelt. Da Chaetocin in seiner Strukturformel allen ETPs stark ähnelt, ist davon auszugehen, dass auch seine Toxizität durch das Thiol-Disulphid-Redoxsystem oder Konjugation mit Proteinen zu erklären ist. Mit einigen Cysteinresten nahe der SET-Domäne verfügt SU(VAR)3-9 über Angriffsstellen, an denen eine Quervernetzung mit Chaetocin denkbar wäre. *In vitro* Versuche unter Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol zur Spaltung molekulinterner Disulphidbrücken und subsequenten Erleichterung der Bildung gemischter Disulphide zeigten einen geringen Einfluss auf die Enzymhemmung durch Chaetocin, bei hohen DTT-Konzentrationen verstärkten sie diese.

Interessanterweise war die Zelltoxizität von Chaetocin in unseren Experimenten abhängig von der Dichte der adhärennten Zellen vor Gabe des Inhibitors in das Nährmedium. Bei sehr niedrigen Zelldichten starben die Zellen nach Inkubation mit Chaetocin, bei höheren Zelldichten zeigte sich lediglich eine Verzögerung des Wachstums. Ein solcher Effekt konnte auch bereits in Versuchen von Bernardo et al. 2003 für Gliotoxin beobachtet werden

(Bernardo et al., 2003). Ob dies in unseren Experimenten auf ein vermindertes Chaetocin/SL2-Zellen-Verhältnis bei höheren Zelldichten zurückzuführen war oder aber durch einen Schutzmechanismus, der nur im Kollektiv greifen konnte, bedingt war, wurde nicht klar. Man könnte an einen Mechanismus ähnlich dem der Virusantwort eines Zellkollektivs denken. Dort führen von befallenen Zellen abgegebene Interferone dazu, dass nichtinfizierte Zellen sich gegen eine Virusinfektion schützen. Möglich wäre, dass durch Zellkommunikation bestimmte Transporter geblockt werden, so dass Chaetocin nicht mehr in „gesunde“ Zellen eindringen kann.

Für das ETP Gliotoxin wurde jedoch 2003 durch Bernardo et al. ein Redoxaufnahmemechanismus beschrieben, der in Zellen zu bis zu 1500-fach höheren Gliotoxinkonzentrationen führen kann als im Medium vorliegend (Bernardo *et al.*, 2003). Dabei ist die reduzierte Form des Toxins in der Zelle gefangen und kann die Zellmembran nicht mehr durchdringen. Bei abnehmender Zelldichte wäre dann mehr Toxin in der Zelle im Gleichgewicht zwischen reduzierter und oxidiertes Form. Ein ähnlicher Mechanismus wie dieser wäre auch für Chaetocin vorstellbar.

### 5.2.5 Effekte von Chaetocin auf die Methylierung von Histon H3

Bei Inkubation von *Drosophila* SL2-Zellen zeigt sich ein Effekt von 0,5  $\mu\text{M}$  Chaetocin im Medium auf die Di- und Trimethylierung von Histon H3 Lysin 9 nach etwa 7 Tagen. Ein geringer ausgeprägter Effekt ist aber auch schon nach 3 Tagen bzw. bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  sichtbar. Die Analyse der Methylierung von Histon H3 Lysin 79 zeigt eine Zunahme von Di- und Trimethylierung nach 2-3 Tagen, die aber nach 7 Tagen nicht mehr besteht.

Diese Effekte sind nicht durch eine Chaetocin-bedingte Induktion der Apoptose bedingt, da im Versuch die Dichten der SL2-Zellen so gewählt wurden, dass sie auch bei höheren Chaetocinkonzentrationen noch wuchsen. Die Veränderungen der Methylierungen sind daher auf Enzyminhibition bzw. -aktivierung zurückzuführen.

Das späte Auftreten des Effektes von Chaetocin auf die Methylierung von Histon H3 Lysin 9 könnte dadurch bedingt sein, dass die Histonmethylierung an sich eine sehr stabile Modifikation ist (Bannister *et al.*, 2002; Imhof and Becker, 2001). Eine Studie von Byvoet et al. 1972 zeigte, dass Histonproteine die gleiche Halbwertszeit wie di- und trimethylierte Lysin- und Argininreste haben (Byvoet, 1972).

Vorübergehende Effekte von Chaetocin auf die Methylierung von H3-K79 zeigen sich allerdings schon nach 3 Tagen. DOT1L, das verantwortliche Enzym, wurde ursprünglich in S.



*cerevisae* als *disruptor of telomeric silencing* entdeckt (Singer et al., 1998). Die Methylierung von Histon H3 Lysin 79 ist wichtig für Gen-Silencing und die adäquate Lokalisation von SIR-Proteinen in *S. cerevisiae* (Ng et al., 2002). Die Funktionen von DOT1L und SU(VAR)3-9 könnten sich aufgrund der bisher publizierten Daten im Bereich des Telomers berühren: Suv39h1 spielt bei der Maus für die Telomerlänge (Garcia-Cao et al., 2004) und DOT1 in *Saccharomyces cerevisiae* für das telomerische Silencing (Ng et al., 2002) eine Rolle. Hierzu ist allerdings anzumerken, dass eine Methylierung von H3-K9 in *S. cerevisiae* nicht existiert und erst vor kurzem ein Enzym entdeckt wurde, das als ein Überbleibsel eines H3-K9-Methylierungssystems betrachtet werden könnte (Klose et al., 2007). Studien über die Rolle von DOT1L im telomerischen Silencing bei Säugern oder in *Drosophila* existieren bis dato nicht. Die folgenden Ausführungen haben demnach spekulativen Charakter.

Möglicherweise nehmen die Di- und Trimethylierung von H3-K79 als Reaktion auf und Ausgleich für die verminderte H3-K9-Methylierung vorübergehend zu, da beide Modifikationen synergistisch zum Silencing führen. Auf der anderen Seite wurde in früheren Studien (Singer et al., 1998) berichtet, dass sowohl Deletion als auch Hochregulation von *Dot1* in *S. cerevisiae* zu einem Verlust des Silencing führen. Entspräche dies der Realität, so wären die DOT1-Effekte früher messbar als die Effekte von Chaetocin auf SU(VAR)3-9, würden aber zum gleichen Endergebnis führen.

## 5.3 AUSBLICK

### 5.3.1 Effekte von Chaetocin auf *Drosophila melanogaster* *ln(1)<sup>w<sup>m4</sup></sup>/Su(var)3-9/+*

Zur weiteren Charakterisierung der Effekte von Chaetocin wären Tests im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* aufschlußreich gewesen. Hierfür wären besonders die Fliegen des Typs *ln(1)<sup>w<sup>m4</sup></sup>/Su(var)3-9/+* geeignet gewesen (siehe 3.1.6: Bei diesen Fliegen ist eine zusätzliche Kopie von *Su(var)3-9* vorhanden, außerdem ist das für rote Augenfarbe kodierende *white*-Gen durch Mutagenese invertiert und an einen Lokus transloziert, der dem PEV unterliegt. Dadurch ist es stillgelegt und die Fliegen zeigen eine weiße bzw. rot-weißgesprenkelte Augenfarbe. Hemmung von SU(VAR)3-9 durch Chaetocin sollte daher bei diesen Fliegen zur Augenfarbe rot führen.)

Innerhalb erster Versuchsreihen stellte sich aber heraus, dass das Lösungsmittel DMSO, in dem sich Chaetocin befand, selbst schon einen Effekt auf die Augenfarbe der Fruchtfliegen hatte. Butanol hingegen wäre als Lösungsmittel geeignet. Da aber mittlerweile Chaetocin

kommerziell als Pulver nicht mehr erwerbbar ist, wurden weitere Versuche mit Verdünnungen von DMSO plus Chaetocin in Butanol durchgeführt. Es zeigte sich zwar ein geringfügiger Effekt v.a. auf die männlichen Fliegen, jedoch konnte dieser aufgrund des Vorgehens nicht eindeutig auf die Wirkung von Chaetocin zurückgeführt werden. Daher wurden keine weiteren Versuche mit höheren Chaetocinkonzentrationen durchgeführt, da hier noch größere DMSO-Effekte zu erwarten gewesen wären.

Ein Ausweg würde die Umkristallisierung von Chaetocin und Lösung in Butanol für weitere Experimente darstellen.

### **5.3.2 Die Bedeutung von Chaetocin als wissenschaftliches Hilfsmittel oder zukünftiges Medikament**

Die ursprüngliche Fragestellung dieser Arbeit war die Suche nach einem Inhibitor der Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9, dessen Wirkung *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden sollte. Dabei wurde neben der Verwendung als Werkzeug für die Molekularbiologie auch die Möglichkeit eines späteren Einsatzes in der Humanmedizin als Krebstherapeutikum in Betracht gezogen.

Bei genauerer Analyse der Funktion von SU(VAR)3-9 *in vivo* stellt sich aber heraus, dass eine solche Option zweifelhaft ist. Ein double-knockout von *Suv39h1* in Mäusen führt z.B. zu einer hohen Inzidenz an B-Zell-Lymphomen (Peters *et al.*, 2001). Dieser Effekt wäre dann wohl auch von Chaetocin zu erwarten. Andererseits ist die Methylierung von Histon H3 Lysin 9 aber mit aberrantem Gen-Silencing in Krebszellen assoziiert (Nguyen *et al.*, 2002). Hier würde die Behandlung mit Chaetocin einen Vorteil bedeuten.

Theoretisch möglich wäre auch ein Einsatz von Chaetocin zur Therapie der Friedreich-Ataxie, bei der durch repetitive Triplets das Gen für Frataxin stillgelegt ist. Die Histone H3 und H4 an diesem Genlokus sind hypoacetyliert, H3-K9 ist vermehrt trimethyliert. Es gibt keine befriedigende Therapie, der Radikalfänger Idebenone wird noch erprobt. Kürzlich veröffentlichten Herman *et al.* eine Studie, in der Lymphozyten erkrankter Individuen mit HDAC-Inhibitoren erfolgreich behandelt werden konnten (Herman *et al.*, 2006). Eine epigenetische Therapie mit Chaetocin scheint daher denkbar. Dabei müsste aber ein Derivat des Inhibitors eingesetzt werden, das die Blut-Hirn-Schranke durchdringen kann und vorzugsweise neuronenspezifisch wirkt bzw. nach Passage der Blut-Hirn-Schranke erst von Enzymen aktiviert wird. (Ein Mechanismus, den man sich bei der Therapie des M. Parkinson mit L-Dopa in Kombination mit Hemmstoffen der nicht hirschrängigen peripheren

Dopa-Decarboxylase-Hemmstoffe Carbidopa und Benserazid zunutze macht.) Noch idealer wäre ein auf das betroffene Gen beschränkter Wirkmechanismus.

Auch der Einsatz von Chaetocin in der Therapie einer HIV-Infektion erscheint denkbar. Latent mit HIV infizierte Zellen stellen ein Hemmnis in der therapeutischen Viruselimination bei infizierten Patienten dar. Eine Inhibition der Histondeacetylase-Aktivität mit Trichostatin A begünstigt die Bindung von RNA Polymerase II an das HIV LTR (long terminal repeat) (Williams et al., 2006). Das HIV Tat Protein, welches für die Transkriptionselongation notwendig ist, wird jedoch durch die HDAC SIRT1 reguliert und eine Behandlung mit small molecule Inhibitoren von SIRT1 führt zu einer verminderten Expression der HIV-Gene (Pagans et al., 2005). Da SIRT1 SUV39H1 reguliert und dessen Aktivität steigert (Vaquero *et al.*, 2007) wäre der Umkehrschluss möglich, dass eine Inhibition von SUV39H1 durch Chaetocin am ehesten zu einer Verminderung der HIV-Genexpression und damit zu einer erschwerten Therapie führen würde. Würde Chaetocin jedoch synergistisch zu Trichostatin A wirken, könnte es Vorteile für die Therapie einer HIV-Infektion bergen.

Da Chaetocin aber eine toxische Wirkung aufweist, müsste vor einer wie auch immer gearteten therapeutischen Verwendung erst ein wirksames Analogon mit besserer Verträglichkeit identifiziert werden. Verschiedene Gruppen haben im Verlauf der letzten Jahre Konzepte zur Identifikation solcher Stoffe mit therapeutischem Potential entwickelt. Muegge et al. stellten 2001 ein Verfahren vor, nach dem man durch die Analyse funktioneller Gruppen wie z.B. Amininen, Amidinen, Alkoholen, Ketonen, Carboxylsäuren, Guanidinen, Estern etc. das Potential einer Substanz als Medikament beurteilen könnte (Muegge et al., 2001). Eine Analyse von Chaetocin nach den von Muegge et al. aufgestellten Regeln fällt positiv aus. Die therapeutische Verwendung von Chaetocin oder eines Analogons ist trotzdem fragwürdig, da bisher alle Epidithiopiperazine toxische Wirkung zeigen und der Austausch einiger Substituenten an der toxischen Grundkomponente, dem Disulphid-Ringsystem, nichts ändert. Andererseits sind ETPs als Krebstherapeutika trotz allem interessant, Gliotoxin beispielsweise wies *in vivo* Aktivität gegenüber Mammatumoren der Ratte ohne erkennbare Toxizität auf (Vigushin et al., 2004). Isham et al. zeigten 2007, dass Chaetocin ein vielversprechendes Therapeutikum des Multiplen Myeloms darstellen könnte (Isham *et al.*, 2007). Chaetocin verfügt über ein hohes Ausmaß an selektiver Toxizität gegenüber Myelomzellen. Der toxische Effekt wird dabei durch intrazellulären oxidativen Stress und daraus resultierende Apoptose vermittelt. Myelomzellen scheinen empfindlicher gegenüber oxidativem Stress zu sein als nichtmaligne Zellen. Die Gruppe untersuchte auch die Wirkung

von Chaetocin auf die Histon-H3-Acetylierung, die nach Behandlung unverändert war. Die Histonmethylierung wurde nicht untersucht.

Als molekularbiologisches Werkzeug findet Chaetocin schon heute in unserem Labor Anwendung. Auch wenn es vielleicht nicht die Bedeutung des HDAC-Inhibitors Trichostatin A erlangen wird, so bietet seine Verwendung doch den Vorteil, unabhängig von genetischen knockouts die SU(VAR)3-9-Aktivität zeitlich begrenzt und kontrolliert zu inhibieren.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Posttranslationale Histonmodifikationen leisten einen wichtigen Beitrag zur Regulation der Genexpression. Beim Aufbau und bei der Aufrechterhaltung stabiler Genexpressionsmuster spielen v.a. die Histonmethyltransferasen eine Schlüsselrolle. Eine Missregulation kann daher zur malignen Entartung von Zellen oder auch zur Entstehung verschiedener chronischer Erkrankungen führen. Die Entdeckung, dass Inhibitoren von Histondeacetylasen antiproliferative Wirkungen aufweisen, hat zu zahlreichen Studien in diesem Bereich geführt. Einige dieser Inhibitoren befinden sich mittlerweile in Phase I und II der klinischen Evaluation als Tumorthapeutika. Bei Aufnahme dieser Arbeit war aber noch kein Inhibitor einer Histonmethyltransferase bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen potenten Hemmstoff der Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 zu identifizieren.

Dazu wurde eine Substanzbibliothek aus ca. 3000 kleinen Molekülen mittels eines Screens getestet. Es wurden 28 Substanzen gefunden, die die Aktivität von SU(VAR)3-9 erheblich verminderten. Die meisten dieser Substanzen waren nur in sehr kleinen Mengen von bis zu 1 ml verfügbar. Daher wurden weitere Experimente nur mit Chaetocin, einem der potentesten Inhibitoren im Screening, durchgeführt, da dieses relativ einfach in grösseren Mengen verfügbar war. Chaetocin wurde auf seine Spezifität im Standardmethyltransferaseassay mit verschiedenen Histonmethyltransferasen getestet. Es erwies sich als spezifisch für *Drosophila* SU(VAR)3-9 und seine Orthologe beim Menschen und in *Neurospora crassa* mit einer  $IC_{50}$  von circa 1  $\mu$ M für SU(VAR)3-9. Allerdings hemmte es auch G9a, eine mit SU(VAR)3-9 verwandte Histonmethyltransferase, wenn auch erheblich schwächer. Zur Untersuchung des Hemmmechanismus wurde ein Lineweaver-Burk-Diagramm angefertigt. Es zeigte sich, dass Chaetocin SU(VAR)3-9 kompetitiv zum Substrat S-Adenosyl-Methionin hemmt. Ein *in vivo* Versuch im *Drosophila* SL2-Zellsystem mit Analyse der Histonmethylierung durch Massenspektrometrie nach Inkubation von Zellen mit unterschiedlichen Chaetocinkonzentrationen schloss sich an. Auch hier konnte eine Inhibition der SU(VAR)3-9 vermittelten Di- und Trimethylierung von Histon H3 Lysin 9 nachgewiesen werden. Allerdings trat auch eine starke Toxizität von Chaetocin zu Tage. Inkubation von *Drosophila* *ln(1)<sup>w<sup>m4</sup></sup>*/Su(var)3-9/+ zur Untersuchung einer Änderung der Augenfarbe nach Chaetocin-Behandlung führte zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Chaetocin stellt ein interessantes Instrument zur Untersuchung epigenetischer Mechanismen dar. Seine Toxizität könnte einen therapeutischen Einsatz allerdings einschränken. Erste

Untersuchungen zur Myelomtherapie mit Chaetocin zeigen jedoch vielversprechende Ergebnisse sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell mit selektiver Toxizität gegenüber malignen Zellen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aagaard,L., Laible,G., Selenko,P., Schmid,M., Dorn,R., Schotta,G., Kuhfittig,S., Wolf,A., Lebersorger,A., Singh,P.B., Reuter,G., and Jenuwein,T. (1999). Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.*, **18**, 1923-1938.
- Abbondanza,C., Medici,N., Nigro,V., Rossi,V., Gallo,L., Piluso,G., Belsito,A., Roscigno,A., Bontempo,P., Puca,A.A., Molinari,A.M., Moncharmont,B., and Puca,G.A. (2000). The retinoblastoma-interacting zinc-finger protein RIZ is a downstream effector of estrogen action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 3130-3135.
- Ahmad,K. and Henikoff,S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell*, **9**, 1191-1200.
- Ahringer,J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet.*, **16**, 351-356.
- Ait-Si-Ali,S., Guasconi,V., Fritsch,L., Yahy,H., Sekhri,R., Naguibneva,I., Robin,P., Cabon,F., Polesskaya,A., and Harel-Bellan,A. (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *EMBO J.*, **23**, 605-615.
- Alarcon,J.M., Malleret,G., Touzani,K., Vronskaya,S., Ishii,S., Kandel,E.R., and Barco,A. (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP<sup>+/-</sup> mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, **42**, 947-959.
- Allis,C.D., Bowen,J.K., Abraham,G.N., Glover,C.V., and Gorovsky,M.A. (1980). Proteolytic processing of histone H3 in chromatin: a physiologically regulated event in *Tetrahymena* micronuclei. *Cell*, **20**, 55-64.
- Amir,R.E., Van,d.V., I, Wan,M., Tran,C.Q., Francke,U., and Zoghbi,H.Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.*, **23**, 185-188.
- Aniello,F., Colella,G., Muscariello,G., Lanza,A., Ferrara,D., Branno,M., and Minucci,S. (2006). Expression of four histone lysine-methyltransferases in parotid gland tumors. *Anticancer Res.*, **26**, 2063-2067.
- Ashley,C.T., Sutcliffe,J.S., Kunst,C.B., Leiner,H.A., Eichler,E.E., Nelson,D.L., and Warren,S.T. (1993). Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat. Genet.*, **4**, 244-251.
- Attadia,V. (1993). Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on differentiation and oncogene expression in the human monoblastic leukemia cell line U-937. *Leukemia*, **7** Suppl 1, 9-16.
- Ausio,J., Levin,D.B., De Amorim,G.V., Bakker,S., and Macleod,P.M. (2003). Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin. Genet.*, **64**, 83-95.

- Ayton,P.M. and Cleary,M.L. (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*, **20**, 5695-5707.
- Ayton,P.M. and Cleary,M.L. (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev.*, **17**, 2298-2307.
- Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature*, **436**, 1103-1106.
- Bannister,A.J., Schneider,R., and Kouzarides,T. (2002). Histone methylation: dynamic or static?. *Cell*, **109**, 801-806.
- Bannister,A.J., Zegerman,P., Partridge,J.F., Miska,E.A., Thomas,J.O., Allshire,R.C., and Kouzarides,T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Barski,A., Cuddapah,S., Cui,K., Roh,T.Y., Schones,D.E., Wang,Z., Wei,G., Chepelev,I., and Zhao,K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**, 823-837.
- Beaudet,A.L. (2004). Complex imprinting. *Nat. Genet.*, **36**, 793-795.
- Bednar,J., Horowitz,R.A., Grigoryev,S.A., Carruthers,L.M., Hansen,J.C., Koster,A.J., and Woodcock,C.L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 14173-14178.
- Beke,L., Nuytten,M., Van Eynde,A., Beullens,M., and Bollen,M. (2007). The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. *Oncogene*, **26**, 4590-4595.
- Belinsky,S.A., Klinge,D.M., Stidley,C.A., Issa,J.P., Herman,J.G., March,T.H., and Baylin,S.B. (2003). Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res.*, **63**, 7089-7093.
- Bell,A.C. and Felsenfeld,G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, **405**, 482-485.
- Bender,C.M., Pao,M.M., and Jones,P.A. (1998). Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res.*, **58**, 95-101.
- Bernardo,P.H., Brasch,N., Chai,C.L., and Waring,P. (2003). A novel redox mechanism for the glutathione-dependent reversible uptake of a fungal toxin in cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 46549-46555.
- Bernstein,B.E., Kamal,M., Lindblad-Toh,K., Bekiranov,S., Bailey,D.K., Huebert,D.J., McMahon,S., Karlsson,E.K., Kulbokas,E.J., III, Gingeras,T.R., Schreiber,S.L., and Lander,E.S. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, **120**, 169-181.



- BERTANI,G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **62**, 293-300.
- Binder,D.K., Routbort,M.J., and McNamara,J.O. (1999). Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trk receptors in the mossy fiber pathway of adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **19**, 4616-4626.
- Bird,A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, **16**, 6-21.
- Bird,A.P. (1978). Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: II. The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern. *J. Mol. Biol.*, **118**, 49-60.
- Bird,A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, **321**, 209-213.
- Blough,R.I., Petrij,F., Dauwerse,J.G., Milatovich-Cherry,A., Weiss,L., Saal,H.M., and Rubinstein,J.H. (2000). Variation in microdeletions of the cyclic AMP-responsive element-binding protein gene at chromosome band 16p13.3 in the Rubinstein-Taybi syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, **90**, 29-34.
- Böcker,W., Kleihues,P., Höfler,H.K., Lax,S., Poremba,C., and Moll,R. (2004). Allgemeine Tumorpathologie. In Böcker,W., Denk,H., and Heitz,Ph.U. (Eds.), *Pathologie*, . Urban & Fischer Verlag, pp. 169-217.
- Bourtchouladze,R., Lidge,R., Catapano,R., Stanley,J., Gossweiler,S., Romashko,D., Scott,R., and Tully,T. (2003). A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 10518-10522.
- Bovenzi,V. and Momparler,R.L. (2001). Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta and estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **48**, 71-76.
- Bracken,A.P., Pasini,D., Capra,M., Prosperini,E., Colli,E., and Helin,K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.*, **22**, 5323-5335.
- Brenner,C., Deplus,R., Didelot,C., Lorient,A., Vire,E., De Smet,C., Gutierrez,A., Danovi,D., Bernard,D., Boon,T., Pelicci,P.G., Amati,B., Kouzarides,T., de Launoit,Y., Di Croce,L., and Fuks,F. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.*, **24**, 336-346.
- Buyse,I.M., Takahashi,E.I., and Huang,S. (1996). Physical mapping of the retinoblastoma interacting zinc finger gene RIZ to D1S228 on chromosome 1p36. *Genomics*, **34**, 119-121.
- Byvoet,P. (1972). In vivo turnover and distribution of radio-N-methyl in arginine-rich histones from rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 887-888.

- Cameron,E.E., Bachman,K.E., Myohanen,S., Herman,J.G., and Baylin,S.B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.*, **21**, 103-107.
- Cao,R. and Zhang,Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **14**, 155-164.
- Cao,X. and Sudhof,T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**, 115-120.
- Cardoso,C., Mignon,C., Hetet,G., Grandchamps,B., Fontes,M., and Colleaux,L. (2000). The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur. J. Hum. Genet.*, **8**, 174-180.
- Cardoso,C., Timsit,S., Villard,L., Khrestchatisky,M., Fontes,M., and Colleaux,L. (1998). Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 679-684.
- Carrozza,M.J., Utley,R.T., Workman,J.L., and Cote,J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.*, **19**, 321-329.
- Cedar,H., Solage,A., Glaser,G., and Razin,A. (1979). Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2125-2132.
- Chadwick,R.B., Jiang,G.L., Bennington,G.A., Yuan,B., Johnson,C.K., Stevens,M.W., Niemann,T.H., Peltomaki,P., Huang,S., and de la,C.A. (2000). Candidate tumor suppressor RIZ is frequently involved in colorectal carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 2662-2667.
- Chedin,F., Lieber,M.R., and Hsieh,C.L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 16916-16921.
- Chen,L., MacMillan,A.M., Chang,W., Ezaz-Nikpay,K., Lane,W.S., and Verdine,G.L. (1991). Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry*, **30**, 11018-11025.
- Chen,Y., Sharma,R.P., Costa,R.H., Costa,E., and Grayson,D.R. (2002). On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2930-2939.
- Cheng,D., Yadav,N., King,R.W., Swanson,M.S., Weinstein,E.J., and Bedford,M.T. (2004a). Small molecule regulators of protein arginine methyltransferases. *J. Biol. Chem.*, **279**, 23892-23899.
- Cheng,J.C., Matsen,C.B., Gonzales,F.A., Ye,W., Greer,S., Marquez,V.E., Jones,P.A., and Selker,E.U. (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 399-409.
- Cheng,J.C., Yoo,C.B., Weisenberger,D.J., Chuang,J., Wozniak,C., Liang,G., Marquez,V.E., Greer,S., Orntoft,T.F., Thykjaer,T., and Jones,P.A. (2004b). Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell*, **6**, 151-158.

- Cheung,P., Tanner,K.G., Cheung,W.L., Sassone-Corsi,P., Denu,J.M., and Allis,C.D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell*, **5**, 905-915.
- Chin,H.G., Patnaik,D., Esteve,P.O., Jacobsen,S.E., and Pradhan,S. (2006). Catalytic properties and kinetic mechanism of human recombinant Lys-9 histone H3 methyltransferase SUV39H1: participation of the chromodomain in enzymatic catalysis. *Biochemistry*, **45**, 3272-3284.
- Chinenov,Y. (2002). A second catalytic domain in the Elp3 histone acetyltransferases: a candidate for histone demethylase activity?. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 115-117.
- Clayton,A.L., Rose,S., Barratt,M.J., and Mahadevan,L.C. (2000). Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J.*, **19**, 3714-3726.
- Clissold,P.M. and Ponting,C.P. (2001). JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 7-9.
- Cooper,D.N. and Krawczak,M. (1989). Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum. Genet.*, **83**, 181-188.
- Corral,J., Lavenir,I., Impey,H., Warren,A.J., Forster,A., Larson,T.A., Bell,S., McKenzie,A.N., King,G., and Rabbitts,T.H. (1996). An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell*, **85**, 853-861.
- Costa,E., Chen,Y., Davis,J., Dong,E., Noh,J.S., Tremolizzo,L., Veldic,M., Grayson,D.R., and Guidotti,A. (2002). REELIN and Schizophrenia:: A Disease at the Interface of the Genome and the Epigenome. *Mol. Interv.*, **2**, 47-57.
- Crawford,Y.G., Gauthier,M.L., Joubel,A., Mantei,K., Kozakiewicz,K., Afshari,C.A., and Tlsty,T.D. (2004). Histologically normal human mammary epithelia with silenced p16(INK4a) overexpress COX-2, promoting a premalignant program. *Cancer Cell*, **5**, 263-273.
- Crosio,C., Cermakian,N., Allis,C.D., and Sassone-Corsi,P. (2000). Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1241-1247.
- Crosio,C., Heitz,E., Allis,C.D., Borrelli,E., and Sassone-Corsi,P. (2003). Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J. Cell Sci.*, **116**, 4905-4914.
- Curtin,K., Bigler,J., Slattery,M.L., Caan,B., Potter,J.D., and Ulrich,C.M. (2004). MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: diet, estrogen, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 285-292.
- Cuthbert,G.L., Daujat,S., Snowden,A.W., Erdjument-Bromage,H., Hagiwara,T., Yamada,M., Schneider,R., Gregory,P.D., Tempst,P., Bannister,A.J., and Kouzarides,T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, **118**, 545-553.

- Czermin,B. and Imhof,A. (2003). The sounds of silence--histone deacetylation meets histone methylation. *Genetica*, **117**, 159-164.
- Czermin,B., Schotta,G., Hulsmann,B.B., Brehm,A., Becker,P.B., Reuter,G., and Imhof,A. (2001). Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.*, **2**, 915-919.
- de Bustros,A., Nelkin,B.D., Silverman,A., Ehrlich,G., Poiesz,B., and Baylin,S.B. (1988). The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 5693-5697.
- Devriendt,K. (2005). Hydatidiform mole and triploidy: the role of genomic imprinting in placental development. *Hum. Reprod. Update.*, **11**, 137-142.
- Di Croce,L. (2005). Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins. *Hum. Mol. Genet.*, **14 Spec No 1**, R77-R84.
- Di Croce,L., Raker,V.A., Corsaro,M., Fazi,F., Fanelli,M., Faretta,M., Fuks,F., Lo,C.F., Kouzarides,T., Nervi,C., Minucci,S., and Pelicci,P.G. (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*, **295**, 1079-1082.
- Djabali,M., Selleri,L., Parry,P., Bower,M., Young,B.D., and Evans,G.A. (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat. Genet.*, **2**, 113-118.
- Dobson,C.L., Warren,A.J., Pannell,R., Forster,A., Lavenir,I., Corral,J., Smith,A.J., and Rabbitts,T.H. (1999). The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *EMBO J.*, **18**, 3564-3574.
- Du,Y., Carling,T., Fang,W., Piao,Z., Sheu,J.C., and Huang,S. (2001). Hypermethylation in human cancers of the RIZ1 tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase superfamily. *Cancer Res.*, **61**, 8094-8099.
- Earnshaw,W.C. and Cooke,C.A. (1989). Proteins of the inner and outer centromere of mitotic chromosomes. *Genome*, **31**, 541-552.
- Ebert,A., Schotta,G., Lein,S., Kubicek,S., Krauss,V., Jenuwein,T., and Reuter,G. (2004). Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **18**, 2973-2983.
- Egger,G., Liang,G., Aparicio,A., and Jones,P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, **429**, 457-463.
- Ehrlich,M. (2003). The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin. Immunol.*, **109**, 17-28.
- Eissenberg,J.C. and Elgin,S.C. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 204-210.

- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V., and Elgin, S.C. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 9923-9927.
- El Maarri, O., Seoud, M., Coullin, P., Herbiniaux, U., Oldenburg, J., Rouleau, G., and Slim, R. (2003). Maternal alleles acquiring paternal methylation patterns in biparental complete hydatidiform moles. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1405-1413.
- Elgin, S.C. and Grewal, S.I. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.*, **13**, R895-R898.
- Ellaway, C. and Christodoulou, J. (2001). Rett syndrome: clinical characteristics and recent genetic advances. *Disabil. Rehabil.*, **23**, 98-106.
- Ernfors, P., Bengzon, J., Kokaia, Z., Persson, H., and Lindvall, O. (1991). Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron*, **7**, 165-176.
- Eskeland, R., Czermin, B., Boeke, J., Bonaldi, T., Regula, J.T., and Imhof, A. (2004). The N-terminus of *Drosophila* SU(VAR)3-9 mediates dimerization and regulates its methyltransferase activity. *Biochemistry*, **43**, 3740-3749.
- Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., and Yang, C.S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.*, **63**, 7563-7570.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
- Fears, S., Mathieu, C., Zeleznik-Le, N., Huang, S., Rowley, J.D., and Nucifora, G. (1996). Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 1642-1647.
- Fedoriw, A.M., Stein, P., Svoboda, P., Schultz, R.M., and Bartolomei, M.S. (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science*, **303**, 238-240.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 21-33.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, **301**, 89-92.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, **421**, 448-453.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.*, **12**, 1052-1058.

- Firestein,R., Cui,X., Huie,P., and Cleary,M.L. (2000). Set domain-dependent regulation of transcriptional silencing and growth control by SUV39H1, a mammalian ortholog of *Drosophila* Su(var)3-9. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 4900-4909.
- Fischle,W., Wang,Y., and Allis,C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 172-183.
- Fodor,B.D., Kubicek,S., Yonezawa,M., O'Sullivan,R.J., Sengupta,R., Perez-Burgos,L., Opravil,S., Mechtler,K., Schotta,G., and Jenuwein,T. (2006). Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev.*, **20**, 1557-1562.
- Fournier,C., Goto,Y., Ballestar,E., Delaval,K., Hever,A.M., Esteller,M., and Feil,R. (2002). Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO J.*, **21**, 6560-6570.
- Fraga,M.F., Ballestar,E., Villar-Garea,A., Boix-Chornet,M., Espada,J., Schotta,G., Bonaldi,T., Haydon,C., Ropero,S., Petrie,K., Iyer,N.G., Perez-Rosado,A., Calvo,E., Lopez,J.A., Cano,A., Calasanz,M.J., Colomer,D., Piris,M.A., Ahn,N., Imhof,A., Caldas,C., Jenuwein,T., and Esteller,M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.*, **37**, 391-400.
- Friso,S. and Choi,S.W. (2002). Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J. Nutr.*, **132**, 2382S-2387S.
- Frontelo,P., Leader,J.E., Yoo,N., Potocki,A.C., Crawford,M., Kulik,M., and Lechleider,R.J. (2004). Suv39h histone methyltransferases interact with Smads and cooperate in BMP-induced repression. *Oncogene*, **23**, 5242-5251.
- Fuks,F., Burgers,W.A., Godin,N., Kasai,M., and Kouzarides,T. (2001). Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.*, **20**, 2536-2544.
- Garcia-Cao,M., O'Sullivan,R., Peters,A.H., Jenuwein,T., and Blasco,M.A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat. Genet.*, **36**, 94-99.
- Gardiner,D.M., Waring,P., and Howlett,B.J. (2005). The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*, **151**, 1021-1032.
- Gayther,S.A., Batley,S.J., Linger,L., Bannister,A., Thorpe,K., Chin,S.F., Daigo,Y., Russell,P., Wilson,A., Sowter,H.M., Delhanty,J.D., Ponder,B.A., Kouzarides,T., and Caldas,C. (2000). Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat. Genet.*, **24**, 300-303.
- Gecz,J., Gedeon,A.K., Sutherland,G.R., and Mulley,J.C. (1996). Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat. Genet.*, **13**, 105-108.

- Gibbons,R.J. (2005). Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum. Mol. Genet.*, **14 Spec No 1**, R85-R92.
- Gibbons,R.J., McDowell,T.L., Raman,S., O'Rourke,D.M., Garrick,D., Ayyub,H., and Higgs,D.R. (2000). Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat. Genet.*, **24**, 368-371.
- Gicquel,C., Gaston,V., Mandelbaum,J., Siffroi,J.P., Flahault,A., and Le Bouc,Y. (2003). In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 1338-1341.
- Giles,R.H., Peters,D.J., and Breuning,M.H. (1998). Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet.*, **14**, 178-183.
- Glozak,M.A., Sengupta,N., Zhang,X., and Seto,E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, **363**, 15-23.
- Goffin,J. and Eisenhauer,E. (2002). DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann. Oncol.*, **13**, 1699-1716.
- Gottschling,D.E. (2004). Summary: epigenetics--from phenomenon to field. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **69**, 507-519.
- Grabley,S. and Thiericke,R. (1999). Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.*, **64**, 101-154.
- Gregory,R.I., O'Neill,L.P., Randall,T.E., Fournier,C., Khosla,S., Turner,B.M., and Feil,R. (2002). Inhibition of histone deacetylases alters allelic chromatin conformation at the imprinted U2af1-rs1 locus in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11728-11734.
- Grooms,S.Y., Opitz,T., Bennett,M.V., and Zukin,R.S. (2000). Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 3631-3636.
- Grossman,S.R. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2773-2778.
- Grunstein,M. (1998). Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell*, **93**, 325-328.
- Gu,Y., Shen,Y., Gibbs,R.A., and Nelson,D.L. (1996). Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nat. Genet.*, **13**, 109-113.
- Hajkova,P., Erhardt,S., Lane,N., Haaf,T., El Maarri,O., Reik,W., Walter,J., and Surani,M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.*, **117**, 15-23.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hanash,S. (2004). Integrated global profiling of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 638-644.

- Hansen, J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 361-392.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., and Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, **129**, 1983-1993.
- Hauser, D., Weber, H.P., and Sigg, H.P. (1970). [Isolation and configuration of Chaetocin]. *Helv. Chim. Acta*, **53**, 1061-1073.
- He, L., Yu, J.X., Liu, L., Buyse, I.M., Wang, M.S., Yang, Q.C., Nakagawara, A., Brodeur, G.M., Shi, Y.E., and Huang, S. (1998). RIZ1, but not the alternative RIZ2 product of the same gene, is underexpressed in breast cancer, and forced RIZ1 expression causes G2-M cell cycle arrest and/or apoptosis. *Cancer Res.*, **58**, 4238-4244.
- Hendrich, B. and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6538-6547.
- Henikoff, S. (1992). Position effect and related phenomena. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2**, 907-912.
- Herman, D., Jensen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L., and Gottesfeld, J.M. (2006). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 551-558.
- Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 2042-2054.
- Hermann, A., Schmitt, S., and Jeltsch, A. (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 31717-31721.
- Hitchins, M.P., Stanier, P., Preece, M.A., and Moore, G.E. (2001). Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J. Med. Genet.*, **38**, 810-819.
- Hochedlinger, K., Blelloch, R., Brennan, C., Yamada, Y., Kim, M., Chin, L., and Jaenisch, R. (2004). Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev.*, **18**, 1875-1885.
- Holst, C.R., Nuovo, G.J., Esteller, M., Chew, K., Baylin, S.B., Herman, J.G., and Tlsty, T.D. (2003). Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res.*, **63**, 1596-1601.
- Horn, P.J. and Peterson, C.L. (2006). Heterochromatin assembly: a new twist on an old model. *Chromosome. Res.*, **14**, 83-94.
- Huang, S. (2002). Histone methyltransferases, diet nutrients and tumour suppressors. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 469-476.



- Huang,Y., Doherty,J.J., and Dingledine,R. (2002). Altered histone acetylation at glutamate receptor 2 and brain-derived neurotrophic factor genes is an early event triggered by status epilepticus. *J. Neurosci.*, **22**, 8422-8428.
- Huntsman,D.G., Chin,S.F., Muleris,M., Batley,S.J., Collins,V.P., Wiedemann,L.M., Aparicio,S., and Caldas,C. (1999). MLL2, the second human homolog of the *Drosophila* trithorax gene, maps to 19q13.1 and is amplified in solid tumor cell lines. *Oncogene*, **18**, 7975-7984.
- Imhof,A. and Becker,P.B. (2001). Modifications of the histone N-terminal domains. Evidence for an "epigenetic code"? *Mol. Biotechnol.*, **17**, 1-13.
- Ionov,Y., Matsui,S., and Cowell,J.K. (2004). A role for p300/CREB binding protein genes in promoting cancer progression in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **101**, 1273-1278.
- Isackson,P.J., Huntsman,M.M., Murray,K.D., and Gall,C.M. (1991). BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron*, **6**, 937-948.
- Isham,C.R., Tibodeau,J.D., Jin,W., Xu,R., Timm,M.M., and Bible,K.C. (2007). Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood*, **109**, 2579-2588.
- Issa,J.P. (2003). Decitabine. *Curr. Opin. Oncol.*, **15**, 446-451.
- Issa,J.P. and Kantarjian,H. (2005). Azacitidine. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **Suppl**, S6-S7.
- Issa,J.P., Ottaviano,Y.L., Celano,P., Hamilton,S.R., Davidson,N.E., and Baylin,S.B. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet.*, **7**, 536-540.
- Itazaki,H., Nagashima,K., Sugita,K., Yoshida,H., Kawamura,Y., Yasuda,Y., Matsumoto,K., Ishii,K., Uotani,N., Nakai,H., and . (1990). Isolation and structural elucidation of new cyclotetrapeptides, trapoxins A and B, having detransformation activities as antitumor agents. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **43**, 1524-1532.
- Ivanova,A.V., Bonaduce,M.J., Ivanov,S.V., and Klar,A.J. (1998). The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nat. Genet.*, **19**, 192-195.
- Jackson-Grusby,L., Laird,P.W., Magge,S.N., Moeller,B.J., and Jaenisch,R. (1997). Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **94**, 4681-4685.
- Jacobson,S. and Pillus,L. (1999). Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 175-184.
- Jaenisch,R. and Bird,A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.*, **33 Suppl**, 245-254.

- Jaju,R.J., Fidler,C., Haas,O.A., Strickson,A.J., Watkins,F., Clark,K., Cross,N.C., Cheng,J.F., Aplan,P.D., Kearney,L., Boulwood,J., and Wainscoat,J.S. (2001). A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, **98**, 1264-1267.
- Janicki,S.M., Tsukamoto,T., Salghetti,S.E., Tansey,W.P., Sachidanandam,R., Prasanth,K.V., Ried,T., Shav-Tal,Y., Bertrand,E., Singer,R.H., and Spector,D.L. (2004). From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*, **116**, 683-698.
- Jenuwein,T. and Allis,C.D. (2001). Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jenuwein,T., Laible,G., Dorn,R., and Reuter,G. (1998). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 80-93.
- Jia,S., Yamada,T., and Grewal,S.I. (2004). Heterochromatin regulates cell type-specific long-range chromatin interactions essential for directed recombination. *Cell*, **119**, 469-480.
- Jiang,G., Liu,L., Buyse,I.M., Simon,D., and Huang,S. (1999). Decreased RIZ1 expression but not RIZ2 in hepatoma and suppression of hepatoma tumorigenicity by RIZ1. *Int. J. Cancer*, **83**, 541-546.
- Johnson,L., Cao,X., and Jacobsen,S. (2002). Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr. Biol.*, **12**, 1360-1367.
- Johnstone,R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 287-299.
- Jones,P.A. and Laird,P.W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, **21**, 163-167.
- Jones,P.A. and Taylor,S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, **20**, 85-93.
- Jones,P.L., Veenstra,G.J., Wade,P.A., Vermaak,D., Kass,S.U., Landsberger,N., Strouboulis,J., and Wolffe,A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.*, **19**, 187-191.
- Juttermann,R., Li,E., and Jaenisch,R. (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 11797-11801.
- Kamnasaran,D. and Cox,D.W. (2002). Current status of human chromosome 14. *J. Med. Genet.*, **39**, 81-90.
- Kang,S.H., Kiefer,C.M., and Yang,T.P. (2003). Role of the promoter in maintaining transcriptionally active chromatin structure and DNA methylation patterns in vivo. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 4150-4161.
- Kass,S.U., Landsberger,N., and Wolffe,A.P. (1997). DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.*, **7**, 157-165.

- Kawasaki,H. and Taira,K. (2004). Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, **431**, 211-217.
- Khorasanizadeh,S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259-272.
- Kim,K.C., Geng,L., and Huang,S. (2003). Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers. *Cancer Res.*, **63**, 7619-7623.
- Kirmizis,A., Bartley,S.M., and Farnham,P.J. (2003). Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 113-121.
- Kishimoto,M., Kohno,T., Okudela,K., Otsuka,A., Sasaki,H., Tanabe,C., Sakiyama,T., Hiramata,C., Kitabayashi,I., Minna,J.D., Takenoshita,S., and Yokota,J. (2005). Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 512-519.
- Kleer,C.G., Cao,Q., Varambally,S., Shen,R., Ota,I., Tomlins,S.A., Ghosh,D., Sewalt,R.G., Otte,A.P., Hayes,D.F., Sabel,M.S., Livant,D., Weiss,S.J., Rubin,M.A., and Chinnaiyan,A.M. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 11606-11611.
- Klose,R.J. and Bird,A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 89-97.
- Klose,R.J., Gardner,K.E., Liang,G., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Zhang,Y. (2007). Demethylation of histone H3K36 and H3K9 by Rph1: a vestige of an H3K9 methylation system in *Saccharomyces cerevisiae*? *Mol. Cell Biol.*, **27**, 3951-3961.
- Kokaia,M., Ernfors,P., Kokaia,Z., Elmer,E., Jaenisch,R., and Lindvall,O. (1995). Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Exp. Neurol.*, **133**, 215-224.
- Koontz,J.I., Soreng,A.L., Nucci,M., Kuo,F.C., Pauwels,P., van Den,B.H., Cin,P.D., Fletcher,J.A., and Sklar,J. (2001). Frequent fusion of the JAZF1 and JJAZ1 genes in endometrial stromal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 6348-6353.
- Korzus,E., Rosenfeld,M.G., and Mayford,M. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*, **42**, 961-972.
- Kouzarides,T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 40-48.
- Kouzarides,T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.*, **19**, 1176-1179.
- Krauss,V. and Reuter,G. (2000). Two genes become one: the genes encoding heterochromatin protein Su(var)3-9 and translation initiation factor subunit eIF-2gamma are joined to a dicistronic unit in holometabolic insects. *Genetics*, **156**, 1157-1167.

- Kung,A.L., Rebel,V.I., Bronson,R.T., Ch'ng,L.E., Sieff,C.A., Livingston,D.M., and Yao,T.P. (2000). Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev.*, **14**, 272-277.
- Kuno,N., Kadomatsu,K., Nakamura,M., Miwa-Fukuchi,T., Hirabayashi,N., and Ishizuka,T. (2004). Mature ovarian cystic teratoma with a highly differentiated homunculus: a case report. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, **70**, 40-46.
- Kurotaki,N., Imaizumi,K., Harada,N., Masuno,M., Kondoh,T., Nagai,T., Ohashi,H., Naritomi,K., Tsukahara,M., Makita,Y., Sugimoto,T., Sonoda,T., Hasegawa,T., Chinen,Y., Tomita Ha,H.A., Kinoshita,A., Mizuguchi,T., Yoshiura,K.K., Ohta,T., Kishino,T., Fukushima,Y., Niikawa,N., and Matsumoto,N. (2002). Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat. Genet.*, **30**, 365-366.
- Lachner,M., O'Carroll,D., Rea,S., Mechtler,K., and Jenuwein,T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Lachner,M., O'Sullivan,R.J., and Jenuwein,T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.*, **116**, 2117-2124.
- Ladoux,B., Quivy,J.P., Doyle,P., du,R.O., Almouzni,G., and Viovy,J.L. (2000). Fast kinetics of chromatin assembly revealed by single-molecule videomicroscopy and scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 14251-14256.
- Lagger,G., O'Carroll,D., Rembold,M., Khier,H., Tischler,J., Weitzer,G., Schuettengruber,B., Hauser,C., Brunmeir,R., Jenuwein,T., and Seiser,C. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.*, **21**, 2672-2681.
- Laird,P.W. (2005). Cancer epigenetics. *Hum. Mol. Genet.*, **14 Spec No 1**, R65-R76.
- Lee,D.Y., Hayes,J.J., Pruss,D., and Wolffe,A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, **72**, 73-84.
- Lee,M.G., Wynder,C., Cooch,N., and Shiekhattar,R. (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, **437**, 432-435.
- Lehnertz,B., Ueda,Y., Derijck,A.A., Braunschweig,U., Perez-Burgos,L., Kubicek,S., Chen,T., Li,E., Jenuwein,T., and Peters,A.H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.*, **13**, 1192-1200.
- Levenson,J.M., O'Riordan,K.J., Brown,K.D., Trinh,M.A., Molfese,D.L., and Sweatt,J.D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.*, **279**, 40545-40559.
- Levenson,J.M. and Sweatt,J.D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 108-118.
- Linhart,H.G., Lin,H., Yamada,Y., Moran,E., Steine,E.J., Gokhale,S., Lo,G., Cantu,E., Ehrlich,M., He,T., Meissner,A., and Jaenisch,R. (2007). Dnmt3b promotes tumorigenesis

- in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev.*, **21**, 3110-3122.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., and Berger, S.L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell*, **5**, 917-926.
- Lochner, K., Siegler, G., Fuhrer, M., Greil, J., Beck, J.D., Fey, G.H., and Marschalek, R. (1996). A specific deletion in the breakpoint cluster region of the ALL-1 gene is associated with acute lymphoblastic T-cell leukemias. *Cancer Res.*, **56**, 2171-2177.
- Lotem, J. and Sachs, L. (2002). Epigenetics wins over genetics: induction of differentiation in tumor cells. *Semin. Cancer Biol.*, **12**, 339-346.
- Lund, A.H. and van Lohuizen, M. (2004). Epigenetics and cancer. *Genes Dev.*, **18**, 2315-2335.
- Luo, R.X., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, **92**, 463-473.
- Maeshima, K., Eltsov, M., and Laemmli, U.K. (2005). Chromosome structure: improved immunolabeling for electron microscopy. *Chromosoma*, **114**, 365-375.
- Maher, E.R., Afnan, M., and Barratt, C.L. (2003). Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs?. *Hum. Reprod.*, **18**, 2508-2511.
- Maier, H., Colbert, J., Fitzsimmons, D., Clark, D.R., and Hagman, J. (2003). Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 1946-1960.
- Malgeri, U., Baldini, L., Perfetti, V., Fabris, S., Vignarelli, M.C., Colombo, G., Lotti, V., Compasso, S., Bogni, S., Lombardi, L., Maiolo, A.T., and Neri, A. (2000). Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of IGH-MMSET fusion transcripts. *Cancer Res.*, **60**, 4058-4061.
- Mann, M.R., Chung, Y.G., Nolen, L.D., Verona, R.I., Latham, K.E., and Bartolomei, M.S. (2003). Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol. Reprod.*, **69**, 902-914.
- Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 163-176.
- Marks, P.A. and Dokmanovic, M. (2005). Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **14**, 1497-1511.
- Marmorstein, R. (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 422-432.
- Martin, C. and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 838-849.

- Martini,E., Roche,D.M., Marheineke,K., Verreault,A., and Almouzni,G. (1998). Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J. Cell Biol.*, **143**, 563-575.
- McDonald,S.D., Murphy,K., Beyene,J., and Ohlsson,A. (2005). Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, **27**, 449-459.
- McGrath,J. and Solter,D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, **37**, 179-183.
- Melcher,M., Schmid,M., Aagaard,L., Selenko,P., Laible,G., and Jenuwein,T. (2000). Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 3728-3741.
- Metzger,E., Wissmann,M., Yin,N., Muller,J.M., Schneider,R., Peters,A.H., Gunther,T., Buettner,R., and Schule,R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, **437**, 436-439.
- Milne,T.A., Briggs,S.D., Brock,H.W., Martin,M.E., Gibbs,D., Allis,C.D., and Hess,J.L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell*, **10**, 1107-1117.
- Moazed,D. (2001). Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 232-238.
- Mochizuki,N., Shimizu,S., Nagasawa,T., Tanaka,H., Taniwaki,M., Yokota,J., and Morishita,K. (2000). A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*, **96**, 3209-3214.
- Mock,B.A., Liu,L., LePaslier,D., and Huang,S. (1996). The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 and the syntenic region of mouse chromosome 10. *Genomics*, **37**, 24-28.
- Morgan,H.D., Santos,F., Green,K., Dean,W., and Reik,W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.*, **14 Spec No 1**, R47-R58.
- Morgan,J.I., Cohen,D.R., Hempstead,J.L., and Curran,T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, **237**, 192-197.
- Mottus,R., Sobel,R.E., and Grigliatti,T.A. (2000). Mutational analysis of a histone deacetylase in *Drosophila melanogaster*: missense mutations suppress gene silencing associated with position effect variegation. *Genetics*, **154**, 657-668.
- Muegge,I., Heald,S.L., and Brittelli,D. (2001). Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J. Med. Chem.*, **44**, 1841-1846.

- Mugnaini,E., Berrebi,A.S., Morgan,J.I., and Curran,T. (1989). Fos-Like Immunoreactivity Induced by Seizure in Mice Is Specifically Associated With Euchromatin in Neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **1**, 46-52.
- Munday,R. (1989). Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 659-673.
- Muraoka,M., Konishi,M., Kikuchi-Yanoshita,R., Tanaka,K., Shitara,N., Chong,J.M., Iwama,T., and Miyaki,M. (1996). p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene*, **12**, 1565-1569.
- Murata,T., Kurokawa,R., Krones,A., Tatsumi,K., Ishii,M., Taki,T., Masuno,M., Ohashi,H., Yanagisawa,M., Rosenfeld,M.G., Glass,C.K., and Hayashi,Y. (2001). Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1071-1076.
- MURRAY,K. (1964). THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES. *Biochemistry*, **3**, 10-15.
- Mutskov,V. and Felsenfeld,G. (2004). Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J.*, **23**, 138-149.
- Nakagawa,T., Bulger,M., Muramatsu,M., and Ito,T. (2001). Multistep chromatin assembly on supercoiled plasmid DNA by nucleosome assembly protein-1 and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27384-27391.
- Nakamura,T., Mori,T., Tada,S., Krajewski,W., Rozovskaia,T., Wassell,R., Dubois,G., Mazo,A., Croce,C.M., and Canaani,E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell*, **10**, 1119-1128.
- Nakayama,J., Rice,J.C., Strahl,B.D., Allis,C.D., and Grewal,S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.
- Nan,X., Ng,H.H., Johnson,C.A., Laherty,C.D., Turner,B.M., Eisenman,R.N., and Bird,A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Naruse,Y., Oh-hashii,K., Iijima,N., Naruse,M., Yoshioka,H., and Tanaka,M. (2004). Circadian and light-induced transcription of clock gene *Per1* depends on histone acetylation and deacetylation. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 6278-6287.
- Ng,H.H., Feng,Q., Wang,H., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Zhang,Y., and Struhl,K. (2002). Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev.*, **16**, 1518-1527.
- Ng,S.S., Kavanagh,K.L., McDonough,M.A., Butler,D., Pilka,E.S., Lienard,B.M., Bray,J.E., Savitsky,P., Gileadi,O., von Delft,F., Rose,N.R., Offer,J., Scheinost,J.C., Borowski,T., Sundstrom,M., Schofield,C.J., and Oppermann,U. (2007). Crystal structures of histone demethylase JMJD2A reveal basis for substrate specificity. *Nature*, **448**, 87-91.

- Nguyen,C.T., Weisenberger,D.J., Velicescu,M., Gonzales,F.A., Lin,J.C., Liang,G., and Jones,P.A. (2002). Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.*, **62**, 6456-6461.
- Nibuya,M., Morinobu,S., and Duman,R.S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.*, **15**, 7539-7547.
- Nicholls,R.D. and Knepper,J.L. (2001). Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2**, 153-175.
- Nielsen,S.J., Schneider,R., Bauer,U.M., Bannister,A.J., Morrison,A., O'Carroll,D., Firestein,R., Cleary,M., Jenuwein,T., Herrera,R.E., and Kouzarides,T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **412**, 561-565.
- Niemitz,E.L. and Feinberg,A.P. (2004). Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 599-609.
- Nouzova,M., Holtan,N., Oshiro,M.M., Isett,R.B., Munoz-Rodriguez,J.L., List,A.F., Narro,M.L., Miller,S.J., Merchant,N.C., and Futscher,B.W. (2004). Epigenomic changes during leukemia cell differentiation: analysis of histone acetylation and cytosine methylation using CpG island microarrays. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 968-981.
- O'Carroll,D., Scherthan,H., Peters,A.H., Opravil,S., Haynes,A.R., Laible,G., Rea,S., Schmid,M., Lebersorger,A., Jerratsch,M., Sattler,L., Mattei,M.G., Denny,P., Brown,S.D., Schweizer,D., and Jenuwein,T. (2000). Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 9423-9433.
- Oelke,K. and Richardson,B. (2004). Decreased T cell ERK pathway signaling may contribute to the development of lupus through effects on DNA methylation and gene expression. *Int. Rev. Immunol.*, **23**, 315-331.
- Oike,Y., Hata,A., Mamiya,T., Kaname,T., Noda,Y., Suzuki,M., Yasue,H., Nabeshima,T., Araki,K., and Yamamura,K. (1999). Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 387-396.
- Okano,M., Xie,S., and Li,E. (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2536-2540.
- Oshimo,Y., Oue,N., Mitani,Y., Nakayama,H., Kitadai,Y., Yoshida,K., Chayama,K., and Yasui,W. (2004). Frequent epigenetic inactivation of RIZ1 by promoter hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, **110**, 212-218.
- Ozer,A. and Bruick,R.K. (2007). Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 144-153.



- Pagans,S., Pedal,A., North,B.J., Kaehlcke,K., Marshall,B.L., Dorr,A., Hetzer-Egger,C., Henklein,P., Frye,R., McBurney,M.W., Hruby,H., Jung,M., Verdin,E., and Ott,M. (2005). SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS. Biol.*, **3**, e41.
- Paik,W.K. and Kim,S. (1973). Enzymatic demethylation of calf thymus histones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 781-788.
- Pant,V., Mariano,P., Kanduri,C., Mattsson,A., Lobanenkov,V., Heuchel,R., and Ohlsson,R. (2003). The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes Dev.*, **17**, 586-590.
- Patnaik,D., Chin,H.G., Esteve,P.O., Benner,J., Jacobsen,S.E., and Pradhan,S. (2004). Substrate specificity and kinetic mechanism of mammalian G9a histone H3 methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 53248-53258.
- Peters,A.H., Kubicek,S., Mechtler,K., O'Sullivan,R.J., Derijck,A.A., Perez-Burgos,L., Kohlmaier,A., Opravil,S., Tachibana,M., Shinkai,Y., Martens,J.H., and Jenuwein,T. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*, **12**, 1577-1589.
- Peters,A.H., O'Carroll,D., Scherthan,H., Mechtler,K., Sauer,S., Schofer,C., Weipoltshammer,K., Pagani,M., Lachner,M., Kohlmaier,A., Opravil,S., Doyle,M., Sibilia,M., and Jenuwein,T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, **107**, 323-337.
- Petrij,F., Giles,R.H., Dauwerse,H.G., Saris,J.J., Hennekam,R.C., Masuno,M., Tommerup,N., van Ommen,G.J., Goodman,R.H., Peters,D.J., and . (1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, **376**, 348-351.
- Piao,Z., Fang,W., Malkhosyan,S., Kim,H., Horii,A., Perucho,M., and Huang,S. (2000). Frequent frameshift mutations of RIZ in sporadic gastrointestinal and endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res.*, **60**, 4701-4704.
- Pidoux,A.L. and Allshire,R.C. (2005). The role of heterochromatin in centromere function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **360**, 569-579.
- Pina,I.C., Gautschi,J.T., Wang,G.Y., Sanders,M.L., Schmitz,F.J., France,D., Cornell-Kennon,S., Sambucetti,L.C., Remiszewski,S.W., Perez,L.B., Bair,K.W., and Crews,P. (2003). Psammaplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase. *J. Org. Chem.*, **68**, 3866-3873.
- Plath,K., Fang,J., Mlynarczyk-Evans,S.K., Cao,R., Worringer,K.A., Wang,H., de la Cruz,C.C., Otte,A.P., Panning,B., and Zhang,Y. (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, **300**, 131-135.
- Poetsch,M., Dittberner,T., and Woenckhaus,C. (2002). Frameshift mutations of RIZ, but no point mutations in RIZ1 exons in malignant melanomas with deletions in 1p36. *Oncogene*, **21**, 3038-3042.

- Prokhortchouk,A., Hendrich,B., Jorgensen,H., Ruzov,A., Wilm,M., Georgiev,G., Bird,A., and Prokhortchouk,E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.*, **15**, 1613-1618.
- Qiu,C., Sawada,K., Zhang,X., and Cheng,X. (2002). The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 217-224.
- Raaphorst,F.M., Meijer,C.J., Fieret,E., Blokzijl,T., Mommers,E., Buerger,H., Packeisen,J., Sewalt,R.A., Otte,A.P., and van Diest,P.J. (2003). Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human polycomb group EZH2 gene. *Neoplasia.*, **5**, 481-488.
- Rea,S., Eisenhaber,F., O'Carroll,D., Strahl,B.D., Sun,Z.W., Schmid,M., Opravil,S., Mechtler,K., Ponting,C.P., Allis,C.D., and Jenuwein,T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Reuter,G. and Spierer,P. (1992). Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays*, **14**, 605-612.
- Rice,J.C., Briggs,S.D., Ueberheide,B., Barber,C.M., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., Shinkai,Y., and Allis,C.D. (2003). Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol. Cell*, **12**, 1591-1598.
- Richie,E.R., Schumacher,A., Angel,J.M., Holloway,M., Rinchik,E.M., and Magnuson,T. (2002). The Polycomb-group gene *eed* regulates thymocyte differentiation and suppresses the development of carcinogen-induced T-cell lymphomas. *Oncogene*, **21**, 299-306.
- Robertson,K.D., Ait-Si-Ali,S., Yokochi,T., Wade,P.A., Jones,P.L., and Wolffe,A.P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.*, **25**, 338-342.
- Robyr,D., Suka,Y., Xenarios,I., Kurdistani,S.K., Wang,A., Suka,N., and Grunstein,M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell*, **109**, 437-446.
- Rodenhiser,D. and Mann,M. (2006). Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ.*, **174**, 341-348.
- Rossmann,T.G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat. Res.*, **533**, 37-65.
- Roth,S.Y., Denu,J.M., and Allis,C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 81-120.
- Rowley,J.D. (1990). The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer*, **65**, 2178-2184.
- Saccani,S. and Natoli,G. (2002). Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev.*, **16**, 2219-2224.

- Sachs,L. (1986). Hematopoietic growth and differentiation factors and the reversibility of malignancy: cell differentiation and by-passing of genetic defects in leukemia. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.*, **3**, 165-176.
- Sanchez,R.M., Koh,S., Rio,C., Wang,C., Lamperti,E.D., Sharma,D., Corfas,G., and Jensen,F.E. (2001). Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J. Neurosci.*, **21**, 8154-8163.
- Sanders,S.L., Portoso,M., Mata,J., Bahler,J., Allshire,R.C., and Kouzarides,T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell*, **119**, 603-614.
- Santi,D.V., Garrett,C.E., and Barr,P.J. (1983). On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell*, **33**, 9-10.
- Sasaki,O., Meguro,K., Tohmiya,Y., Funato,T., Shibahara,S., and Sasaki,T. (2002). Altered expression of retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene, RIZ, in human leukaemia. *Br. J. Haematol.*, **119**, 940-948.
- Saveliev,A., Everett,C., Sharpe,T., Webster,Z., and Festenstein,R. (2003). DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature*, **422**, 909-913.
- Schalch,T., Duda,S., Sargent,D.F., and Richmond,T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, **436**, 138-141.
- Schichman,S.A., Caligiuri,M.A., Gu,Y., Strout,M.P., Canaani,E., Bloomfield,C.D., and Croce,C.M. (1994a). ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 6236-6239.
- Schichman,S.A., Caligiuri,M.A., Strout,M.P., Carter,S.L., Gu,Y., Canaani,E., Bloomfield,C.D., and Croce,C.M. (1994b). ALL-1 tandem duplication in acute myeloid leukemia with a normal karyotype involves homologous recombination between Alu elements. *Cancer Res.*, **54**, 4277-4280.
- Schneider,R., Bannister,A.J., and Kouzarides,T. (2002). Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 396-402.
- Schoenherr,C.J., Levorse,J.M., and Tilghman,S.M. (2003). CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat. Genet.*, **33**, 66-69.
- Schotta,G., Ebert,A., Krauss,V., Fischer,A., Hoffmann,J., Rea,S., Jenuwein,T., Dorn,R., and Reuter,G. (2002). Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.*, **21**, 1121-1131.
- Schotta,G., Ebert,A., and Reuter,G. (2003). SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica*, **117**, 149-158.

- Schotta,G., Lachner,M., Sarma,K., Ebert,A., Sengupta,R., Reuter,G., Reinberg,D., and Jenuwein,T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.*, **18**, 1251-1262.
- Sewalt,R.G., Lachner,M., Vargas,M., Hamer,K.M., den Blaauwen,J.L., Hendrix,T., Melcher,M., Schweizer,D., Jenuwein,T., and Otte,A.P. (2002). Selective interactions between vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 histone lysine methyltransferase suggest that histone H3-K9 methylation contributes to chromosomal targeting of Polycomb group proteins. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 5539-5553.
- Shahbazian,M.D. and Zoghbi,H.Y. (2002). Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 1259-1272.
- Sheu,S.Y., Lai,C.H., and Chiang,H.C. (1998). Inhibition of xanthine oxidase by purpurogallin and silymarin group. *Anticancer Res.*, **18**, 263-267.
- Shi,H., Wei,S.H., Leu,Y.W., Rahmatpanah,F., Liu,J.C., Yan,P.S., Nephew,K.P., and Huang,T.H. (2003). Triple analysis of the cancer epigenome: an integrated microarray system for assessing gene expression, DNA methylation, and histone acetylation. *Cancer Res.*, **63**, 2164-2171.
- Shi,Y., Lan,F., Matson,C., Mulligan,P., Whetstine,J.R., Cole,P.A., Casero,R.A., and Shi,Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
- Shi,Y. and Whetstine,J.R. (2007). Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol. Cell*, **25**, 1-14.
- Sims,R.J., III, Nishioka,K., and Reinberg,D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.*, **19**, 629-639.
- Singer,M.S., Kahana,A., Wolf,A.J., Meisinger,L.L., Peterson,S.E., Goggin,C., Mahowald,M., and Gottschling,D.E. (1998). Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **150**, 613-632.
- Smith,B.L., Embling,P.P., Towers,N.R., Wright,D.E., and Payne,E. (1977). The protective effect of zinc sulphate in experimental sporidesmin poisoning of sheep. *N. Z. Vet. J.*, **25**, 124-127.
- So,C.W., Lin,M., Ayton,P.M., Chen,E.H., and Cleary,M.L. (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell*, **4**, 99-110.
- Soppe,W.J., Jasencakova,Z., Houben,A., Kakutani,T., Meister,A., Huang,M.S., Jacobsen,S.E., Schubert,I., and Fransz,P.F. (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, **21**, 6549-6559.
- SORM,F., Piskala,A., CIHAK,A., and Vesely,J. (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*, **20**, 202-203.

- Stabell,M., Eskeland,R., Bjorkmo,M., Larsson,J., Aalen,R.B., Imhof,A., and Lambertsson,A. (2006). The Drosophila G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4609-4621.
- Stec,I., van Ommen,G.J., and den Dunnen,J.T. (2001). WHSC1L1, on human chromosome 8p11.2, closely resembles WHSC1 and maps to a duplicated region shared with 4p16.3. *Genomics*, **76**, 5-8.
- Stec,I., Wright,T.J., van Ommen,G.J., de Boer,P.A., van Haeringen,A., Moorman,A.F., Altherr,M.R., and den Dunnen,J.T. (1998). WHSC1, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a Drosophila dysmorphia gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1071-1082.
- Steele-Perkins,G., Fang,W., Yang,X.H., Van Gele,M., Carling,T., Gu,J., Buyse,I.M., Fletcher,J.A., Liu,J., Bronson,R., Chadwick,R.B., de la,C.A., Zhang,X., Speleman,F., and Huang,S. (2001). Tumor formation and inactivation of RIZ1, an Rb-binding member of a nuclear protein-methyltransferase superfamily. *Genes Dev.*, **15**, 2250-2262.
- Sterner,D.E. and Berger,S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 435-459.
- Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Sugata,N., Li,S., Earnshaw,W.C., Yen,T.J., Yoda,K., Masumoto,H., Munekata,E., Warburton,P.E., and Todokoro,K. (2000). Human CENP-H multimers colocalize with CENP-A and CENP-C at active centromere--kinetochore complexes. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2919-2926.
- Sugiyama,T., Cam,H., Verdel,A., Moazed,D., and Grewal,S.I. (2005). RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 152-157.
- Sun,Z.W. and Hampsey,M. (1999). A general requirement for the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex in regulating silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **152**, 921-932.
- Surani,M.A., Barton,S.C., and Norris,M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, **308**, 548-550.
- Swedlow,J.R. and Hirano,T. (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol. Cell*, **11**, 557-569.
- 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.
- Tamaru,H. and Selker,E.U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, **414**, 277-283.

- Tan, Y.C. and Chow, V.T. (2001). Novel human HALR (MLL3) gene encodes a protein homologous to ALR and to ALL-1 involved in leukemia, and maps to chromosome 7q36 associated with leukemia and developmental defects. *Cancer Detect. Prev.*, **25**, 454-469.
- Tariq, M., Saze, H., Probst, A.V., Lichota, J., Habu, Y., and Paszkowski, J. (2003). Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 8823-8827.
- Taunton, J., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272**, 408-411.
- Thoma, F., Koller, T., and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.*, **83**, 403-427.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, **10**, 475-489.
- Trewick, S.C., McLaughlin, P.J., and Allshire, R.C. (2005). Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep.*, **6**, 315-320.
- Tsankova, N.M., Kumar, A., and Nestler, E.J. (2004). Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J. Neurosci.*, **24**, 5603-5610.
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y., and Koizumi, K. (1976). A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **29**, 1-6.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **439**, 811-816.
- van Dijk, M., Mulders, J., Poutsma, A., Konst, A.A., Lachmeijer, A.M., Dekker, G.A., Blankenstein, M.A., and Oudejans, C.B. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat. Genet.*, **37**, 514-519.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S., and Trouche, D. (2001). Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 6484-6494.
- Vanhaecke, T., Henkens, T., Kass, G.E., and Rogiers, V. (2004). Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on spontaneous apoptosis in various types of adult rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 753-760.
- Vaquero, A., Loyola, A., and Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowledge Environ.*, **2003**, RE4.

- Vaquero,A., Scher,M., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Serrano,L., and Reinberg,D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*, **450**, 440-444.
- Varambally,S., Dhanasekaran,S.M., Zhou,M., Barrette,T.R., Kumar-Sinha,C., Sanda,M.G., Ghosh,D., Pienta,K.J., Sewalt,R.G., Otte,A.P., Rubin,M.A., and Chinnaiyan,A.M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, **419**, 624-629.
- Verona,R.I., Mann,M.R., and Bartolomei,M.S. (2003). Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 237-259.
- Verreault,A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.*, **14**, 1430-1438.
- Vigushin,D.M., Mirsaidi,N., Brooke,G., Sun,C., Pace,P., Inman,L., Moody,C.J., and Coombes,R.C. (2004). Gliotoxin is a dual inhibitor of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I with antitumor activity against breast cancer in vivo. *Med. Oncol.*, **21**, 21-30.
- Visser,H.P., Gunster,M.J., Kluin-Nelemans,H.C., Manders,E.M., Raaphorst,F.M., Meijer,C.J., Willemze,R., and Otte,A.P. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.*, **112**, 950-958.
- von Rotz,R.C., Kohli,B.M., Bosset,J., Meier,M., Suzuki,T., Nitsch,R.M., and Konietzko,U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J. Cell Sci.*, **117**, 4435-4448.
- Wang,X., Yeh,S., Wu,G., Hsu,C.L., Wang,L., Chiang,T., Yang,Y., Guo,Y., and Chang,C. (2001). Identification and characterization of a novel androgen receptor coregulator ARA267-alpha in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40417-40423.
- Ward,G.E., Carey,K.L., and Westwood,N.J. (2002). Using small molecules to study big questions in cellular microbiology. *Cell Microbiol.*, **4**, 471-482.
- Waring,P. and Beaver,J. (1996). Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *Gen. Pharmacol.*, **27**, 1311-1316.
- Waterland,R.A. and Jirtle,R.L. (2004). Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*, **20**, 63-68.
- Wei,Y., Yu,L., Bowen,J., Gorovsky,M.A., and Allis,C.D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97**, 99-109.
- Weksberg,R., Smith,A.C., Squire,J., and Sadowski,P. (2003). Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum. Mol. Genet.*, **12 Spec No 1**, R61-R68.

- Whetstone, J.R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolnikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M., and Shi, Y. (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, **125**, 467-481.
- Widom, J. and Klug, A. (1985). Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, **43**, 207-213.
- Wilkins, J.F. and Haig, D. (2003). What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 359-368.
- Williams, S.A., Chen, L.F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C.M., Verdin, E., and Greene, W.C. (2006). NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J.*, **25**, 139-149.
- Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. (1999a). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 711-720.
- Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 130-135.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 545-579.
- Xiao, B., Jing, C., Kelly, G., Walker, P.A., Muskett, F.W., Frenkiel, T.A., Martin, S.R., Sarma, K., Reinberg, D., Gamblin, S.J., and Wilson, J.R. (2005). Specificity and mechanism of the histone methyltransferase Pr-Set7. *Genes Dev.*, **19**, 1444-1454.
- Xiao, B., Jing, C., Wilson, J.R., Walker, P.A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I.A., Blackburn, G.M., and Gamblin, S.J. (2003a). Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature*, **421**, 652-656.
- Xiao, B., Wilson, J.R., and Gamblin, S.J. (2003b). SET domains and histone methylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 699-705.
- Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K. (1999). Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21waf1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. *J. Cell Biochem.*, **73**, 291-302.
- Xin, Z., Tachibana, M., Guggiari, M., Heard, E., Shinkai, Y., and Wagstaff, J. (2003). Role of histone methyltransferase G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *J. Biol. Chem.*, **278**, 14996-15000.
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. (2006). JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, **125**, 483-495.
- Yan, L., Nass, S.J., Smith, D., Nelson, W.G., Herman, J.G., and Davidson, N.E. (2003). Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol. Ther.*, **2**, 552-556.



- Yang,X., Phillips,D.L., Ferguson,A.T., Nelson,W.G., Herman,J.G., and Davidson,N.E. (2001). Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res.*, **61**, 7025-7029.
- Yang,X.H. and Huang,S. (1999). PFM1 (PRDM4), a new member of the PR-domain family, maps to a tumor suppressor locus on human chromosome 12q23-q24.1. *Genomics*, **61**, 319-325.
- Yang,Y., Li,T., Vu,T.H., Ulaner,G.A., Hu,J.F., and Hoffman,A.R. (2003). The histone code regulating expression of the imprinted mouse Igf2r gene. *Endocrinology*, **144**, 5658-5670.
- Yeh,S.H., Lin,C.H., and Gean,P.W. (2004). Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Mol. Pharmacol.*, **65**, 1286-1292.
- Yoder,J.A., Walsh,C.P., and Bestor,T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, **13**, 335-340.
- Young,L.E., Schnieke,A.E., McCreath,K.J., Wieckowski,S., Konfortova,G., Fernandes,K., Ptak,G., Kind,A.J., Wilmut,I., Loi,P., and Feil,R. (2003). Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech. Dev.*, **120**, 1433-1442.
- Yu,J., Yu,J., Rhodes,D.R., Tomlins,S.A., Cao,X., Chen,G., Mehra,R., Wang,X., Ghosh,D., Shah,R.B., Varambally,S., Pienta,K.J., and Chinnaiyan,A.M. (2007). A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res.*, **67**, 10657-10663.
- Zaina,S., Lindholm,M.W., and Lund,G. (2005). Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia?. *J. Nutr.*, **135**, 5-8.
- Zardo,G., Tiirikainen,M.I., Hong,C., Misra,A., Feuerstein,B.G., Volik,S., Collins,C.C., Lamborn,K.R., Bollen,A., Pinkel,D., Albertson,D.G., and Costello,J.F. (2002). Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat. Genet.*, **32**, 453-458.
- Zhang,X., Tamaru,H., Khan,S.I., Horton,J.R., Keefe,L.J., Selker,E.U., and Cheng,X. (2002). Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell*, **111**, 117-127.
- Zhang,X., Yang,Z., Khan,S.I., Horton,J.R., Tamaru,H., Selker,E.U., and Cheng,X. (2003). Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol. Cell*, **12**, 177-185.
- Zhang,Y., Iratni,R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Reinberg,D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell*, **89**, 357-364.

- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S., and Reinberg, D. (1998). The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, **95**, 279-289.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, **15**, 2343-2360.
- Zhou, L., Cheng, X., Connolly, B.A., Dickman, M.J., Hurd, P.J., and Hornby, D.P. (2002). Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J. Mol. Biol.*, **321**, 591-599.
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.P., and Gottlicher, M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, **5**, 455-463.
- Ziemin-van der Poel, S., McCabe, N.R., Gill, H.J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S.D., LeBeau, M.M., Rowley, J.D., and . (1991). Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 10735-10739.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BSA	Engl.: Bovine Serum Albumine
cpm	Engl.: Counts per minute
CTCF	Engl.: CCCTG-binding factor (Schützt imprinting control regions vor DNA-Methylierung)
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins/Peptids
DL <sub>50</sub>	Dosis, bei der bei 50% der untersuchten Population der Tod eintritt
dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETPs	Epidithiopiperazine
FCS	Engl.: Fetal calf serum
H3	Histon H3
H3-K9	Histon H3 Lysin 9
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
hs	<i>Homo sapiens</i>
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Hemmkonstante
ICR	Engl.: Imprinting control region
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, Induktor des Lactoseoperons bei <i>E. coli</i> .
IVF	<i>In vitro</i> Fertilisation
JHDM	Engl.: JmjC-domain containing histone demethylase
kb	Kilobase
K <sub>i</sub>	Inhibitor konstante
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante

$K_{m\ app}$	Scheinbare Michaeliskonstante
LB	Engl.: lysogeny broth; Nährlösung zur Anzucht von Bakterien
MECP2	Methyl-CpG-bindendes Protein 2
mm	<i>Mus musculus</i>
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins/Peptids
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEV	Engl.: Position effect variegation; Änderung des Phänotyps durch Aktivierung/Inaktivierung eines Gens in Heterochromatinnähe
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, ein Proteaseinhibitor
PRC	Engl.: Polycomb repressive complex
PRMT	Proteinargininmethyltransferase
RNAi	RNA-Interferenz
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SET-Domäne	Su(var)-, E(z)-, Trithorax-Domäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
Su(var)3-9	Suppressor of variegation 3-9
TSA	Trichostatin A
$v_{max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
wt	Wildtyp (eines Proteins)

## 9 DANKSAGUNG

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter B. Becker für die Betreuung meiner Arbeit, seine stete Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Freundlichkeit.

Ich möchte mich ebenfalls sehr herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Axel Imhof für die Bereitstellung des Themas und seine fortwährende Begeisterung dafür bedanken. Danke, dass Du Dich schon auch mal an die Bench gestellt hast, als es zeitlich eng wurde! Danke für die gute Betreuung und eine stets offene Tür für Fragen etc.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Kollegen der Imhof-Gruppe, allen voran Birgit Czermin, die mich eingearbeitet hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, auch als sie schon nicht mehr Teil unseres Teams war. Pierre Schilcher für seine freundliche Anteilnahme an allen Problemchen und das Puffer-Sharing, Ana Villar-Garea für gute Ideen und Hilfsbereitschaft, Tiziana Bonaldi für die gute Zusammenarbeit und diverse Lästerattacken, Ragnhild Eskeland für die Mitarbeit am Paper, Jörn Böke für die schnelle Lösung meiner Excel-Probleme und Annette Scharf für ihre liebe Art.

Bedanken möchte ich mich auch bei Matthias Prestel für die Einarbeitung und Hilfe bei Problemen mit den „Mucken“, Daisy Schwarzlose für ihre Unterstützung in der Zellkultur, Irene Vetter für Handyerreichbarkeit am Wochenende und allen ehemaligen Kollegen der Brehm-Gruppe für gute Zusammenarbeit und den Spass, den wir hatten.

Ich danke dem gesamten 6. Stock für eine schöne, kreative Zeit mit intensiver Arbeit aber auch intensiven Feiern und für die gute Stimmung, die sehr motivierend wirkte. Ein besonderer Dank gilt der Klinikantinengruppe, Felix Hartlepp, Matthias Prestel, Attila Nemeth und Ralf Strohner.

Danken möchte ich auch der Medizinischen Fakultät der LMU München für die Aufnahme in das Programm zur Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe).

Vielen Dank an meine Freunde für ihre moralische Unterstützung und aufrichtende Worte, wenn mal was nicht so lief, wie ich mir das vorgestellt hatte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die immer hinter mir standen und stehen.

## **10 ANHANG**

### **PUBLIKATION:**

Dieser Anhang enthält die folgende Publikation:

Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E. and Imhof, A.(2005) Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. Nat Chem Biol, 1, 143-145

### **CURRICULUM VITAE**





## Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9

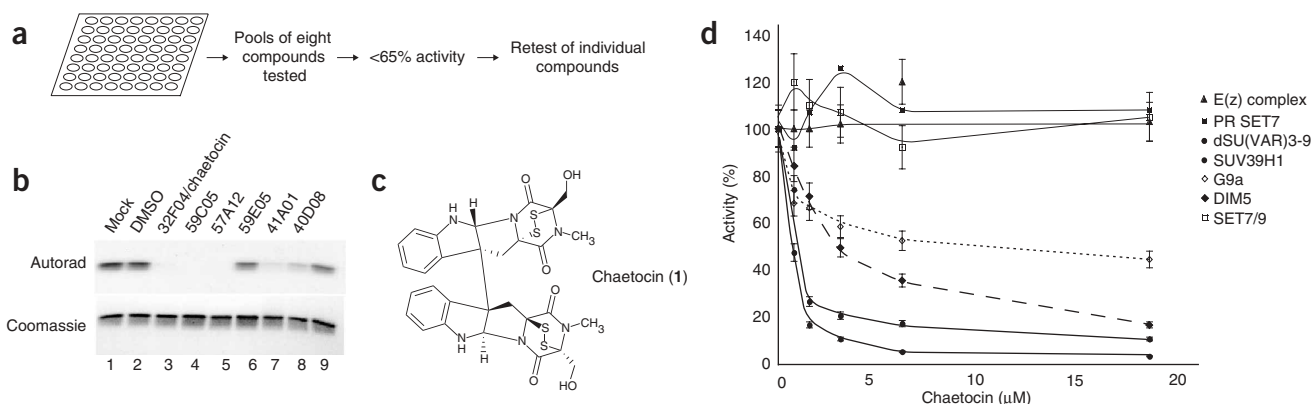
Dorothea Greiner<sup>1</sup>, Tiziana Bonaldi<sup>1</sup>, Ragnhild Eskeland<sup>1</sup>, Ernst Roemer<sup>2,3</sup> & Axel Imhof<sup>1</sup>

**Histone methylation plays a key role in establishing and maintaining stable gene expression patterns during cellular differentiation and embryonic development. Here, we report the characterization of the fungal metabolite chaetocin as the first inhibitor of a lysine-specific histone methyltransferase. Chaetocin is specific for the methyltransferase SU(VAR)3-9 both *in vitro* and *in vivo* and may therefore be used to study heterochromatin-mediated gene repression.**

During the life of every multicellular organism, totipotent cells have to acquire specific functions and maintain their differentiated state. The differentiated state of a cell is determined by its specific pattern of gene expression, which in turn is established and maintained through the differential packaging of DNA into chromatin. The basic unit of chromatin is the nucleosome, a nucleoprotein particle that consists of 147 base pairs of DNA that are wrapped around a proteinaceous core of the four core histones H2A, H2B, H3 and H4 (ref. 1). It is widely accepted that the post-translational modifications of the histone N-terminal tails, as well as modifications within the globular domain,

regulate the level of chromatin condensation and are therefore important in regulating gene expression<sup>2</sup>. Inhibitors of histone acetyltransferases can affect the heritable changes in gene expression of specific genes and are used as drugs for cancer therapy<sup>3</sup>. In addition to histone acetylation, histone methylation has also been shown to be important in establishing stable gene-expression patterns. Some of the known histone methyltransferases (HMTs) are misregulated in tumors<sup>4</sup>, and methyltransferase-induced heterochromatin formation could be involved in neurodegenerative diseases<sup>5</sup>.

To find small molecules that affect HMT function, we screened a small library of compounds for their ability to inhibit the activity of recombinant *Drosophila melanogaster* SU(VAR)3-9 protein. SU(VAR)3-9 is a key player in establishing condensed heterochromatin by specifically methylating Lys9 of histone H3 (ref. 6) and is conserved in most higher eukaryotes. The screening was done by pooling eight individual compounds and testing the pooled mixtures in a standard radioactive filter-binding assay (**Supplementary Methods** online). Every pool that reduced HMT activity by more than 60% was considered inhibitory, and the individual compounds were retested for activity (**Fig. 1a**). Of the 2,976 compounds screened, 22 reduced HMT activity by more than 80% under standard conditions. To verify the activity, and to exclude a possible peptide-specific effect, we further tested the most active inhibitors using intact recombinant H3 molecules as substrates (**Fig. 1b**). One of the strongest inhibitors was the fungal mycotoxin chaetocin (**Fig. 1c, 1**), which was initially isolated from the fermentation broth of *Chaetomium minutum*<sup>7</sup> and belongs to the class of 3-6 epidithio-diketopiperazines (ETPs). It has a half-maximal inhibitory



**Figure 1** *In vitro* inhibition of dSU(VAR)3-9. **(a)** Schematic outline of the inhibitor screen. **(b)** SDS-PAGE analysis of *in vitro* methylated H3 in the presence or absence of 10  $\mu$ g of inhibitor. **(c)** Structure of chaetocin. The chaetocin used in all reactions was >95% pure (**Supplementary Fig. 2** online). **(d)** Inhibition curves for various recombinant HMTs. Methyltransferase assays were performed as described previously<sup>13</sup>. Reactions were done in duplicate and error bars reflect the standard deviation from at least two different experiments.

<sup>1</sup>Adolf Butenandt Institute, Department of Molecular Biology, Histone Modifications Group, Ludwig-Maximilians University of Munich, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany. <sup>2</sup>Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie–Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung, Abteilung Molekulare Naturstoff-Forschung, Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena, Germany. <sup>3</sup>Present address: Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Halle, Weinberg 3, Halle (Saale) 06120, Germany. Correspondence should be addressed to A.I. (imhof@lmu.de).

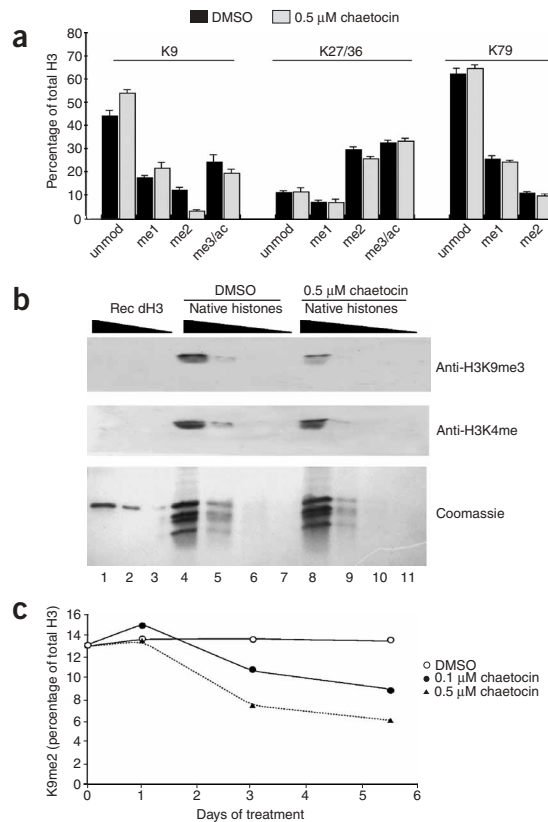
Published online 17 July 2005; doi:10.1038/nchembio721

**Figure 2** *In vivo* inhibition of SU(VAR)3-9. (a) SL-2 cells were grown in the absence (dark bars) or presence (light bars) of chaetocin. Methylation levels were measured by quantitative MALDI-TOF MS as described previously<sup>11,14</sup>. Shown are the relative values for the differentially modified peptides as a fraction of the total H3 (=100%). (b) To study Lys4 dimethylation and Lys9 trimethylation, increasing amounts of recombinant histones (lanes 1–3) or histones isolated from SL-2 cells treated (lanes 8–11) or not treated (lanes 4–7) with chaetocin were loaded on an 18% SDS PAA gel and analyzed by western blotting with specific antibodies against H3K9me3 and H3 dimethylated at Lys4 (H3K4me2). (c) Effect of chaetocin on H3 Lys9 methylation as a function of time. H3 Lys9 methylation levels of histones extracted from nuclei of SL-2 cells at 1, 3 and 5 d after induction were measured by quantitative MALDI-TOF MS. Shown are the relative values for H3K9me2 peptide from histones that were untreated (open circles) and treated with 0.1  $\mu$ M chaetocin (filled circles) or 0.5  $\mu$ M chaetocin (filled triangles).

concentration ( $IC_{50}$ ) for SU(VAR)3-9 of 0.6  $\mu$ M and acts as a competitive inhibitor for *S*-adenosylmethionine (SAM, **Supplementary Fig. 1** online). As SU(VAR)3-9 has a cluster of cysteine residues in its active site<sup>6</sup>, and as we have observed a drop in activity with thiol-reactive substances such as DTT at high doses (>10 mM), we wondered whether the disulfide bond of chaetocin is important for its inhibitory activity. To examine this, we performed the inhibition assays in the presence of increasing amounts of DTT to reduce the disulfide bonds within chaetocin but did not see a substantial decrease in inhibition by SU(VAR)3-9 (**Supplementary Fig. 1**).

To test the enzyme specificity of chaetocin, we also tested other known HMT enzymes that contain a SU(VAR)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax-homology (SET) domain for their sensitivity to chaetocin (**Fig. 1d**). We found that although chaetocin inhibited the human ortholog of dSU(VAR)3-9 with a similar  $IC_{50}$  value (0.8  $\mu$ M), it inhibited other known Lys9-specific HMTs such as mouse G9a and *Neurospora crassa* DIM5 with a higher  $IC_{50}$  value (2.5 and 3  $\mu$ M, respectively). We also tested the recombinant *Drosophila* E(z)-complex (expressed and purified in a baculoviral expression system), which preferentially methylates H3 at Lys27, the bacterially expressed H4 Lys20-specific HMT PRSET7 and the Lys4-specific lysine methyltransferase SET7/9. In all three cases we found  $IC_{50}$  values that were much higher than for the other enzymes (>90  $\mu$ M for the dE(Z) complex and >180  $\mu$ M for PRSET7 and SET7/9). This suggests that chaetocin is an inhibitor of enzymes belonging to the class of the SUV39 family with the strongest inhibitory potential for SU(VAR)3-9 and is a weaker inhibitor of more distantly related enzymes of this family, such as G9a or DIM5 (ref. 8), with a higher  $IC_{50}$  value. HMTs that do not belong to the SU(VAR)3-9 class of enzymes, such as E(z), PRSET7 or SET7/9, are not inhibited, despite having a recognizable SET domain. Taking this together with the finding that chaetocin acts as a competitive inhibitor for SAM, we suggest that the SAM-binding cleft of E(z) and PRSET7 is too divergent from the SU(VAR)3-9 class of enzymes to be bound by chaetocin.

To study the effectiveness of chaetocin at inhibiting SU(VAR)3-9 *in vivo*, we cultivated SL-2 *Drosophila* tissue culture cells in the presence or absence of the inhibitor. The chaetocin used was >95% pure and stable during the course of the experiment (**Supplementary Fig. 2** online). Like other ETPs, chaetocin has a toxic effect on cells grown in culture<sup>9</sup>. When cultivating SL-2 cells, we observed that the toxicity is highly dependent on the initial cell density when chaetocin is added to the culture. Cells seeded at low density (<5  $\times$  10<sup>5</sup> cells per ml) are very sensitive to chaetocin treatment, whereas cells seeded at higher density (>2  $\times$  10<sup>6</sup> cells per ml) can be treated with up to 0.5  $\mu$ M chaetocin, which causes only a growth retardation of 24–48 h



(**Supplementary Fig. 3** online). The toxicity of other known ETPs, such as gliotoxin, has been attributed to their ability to form mixed thiols with various cellular proteins<sup>9</sup>. From these results, and based on the observation that a fly strain deficient for SU(VAR)3-9 is viable<sup>10</sup>, we suggest that the toxic effects are not caused by the inhibition of SU(VAR)3-9, as the disulfide bonds are not required for HMT inhibition. Therefore, we seeded cells at a density of  $2.5 \times 10^6$  cells per ml, treated the culture with different concentrations of the inhibitor (0.1  $\mu$ M and 0.5  $\mu$ M) for several days and took aliquots after 1, 3 and 5 d of culture to study the level of histone modification. Histone modification patterns were analyzed by MS, as previously shown<sup>11</sup>. Consistent with the inhibition of SU(VAR)3-9 *in vitro*, the number of H3 molecules dimethylated at Lys9 (H3K9me2) was markedly reduced when cells were grown in medium containing 0.5  $\mu$ M chaetocin (**Fig. 2a**) after 5 d. Histones isolated from cells treated with 0.1  $\mu$ M and for a shorter time also showed a drop in Lys9 methylation, but not as strongly as with the higher concentration (**Fig. 2b**). Because of the similar mass shift of a trimethyl and an acetyl group, the quantification of the H3 isoform trimethylated at Lys9 (H3K9me3) is obscured by the acetylated form. Therefore, we used an antibody that is specific for trimethylated Lys9 (ref. 12) to selectively investigate the effect of chaetocin on Lys9 trimethylation (**Fig. 2c**). Using this antibody, we also observed a substantial drop in Lys9 trimethylation in the chaetocin-treated cells. These findings are consistent with observations in flies that lack a functional dSU(VAR)3-9 enzyme. The histones isolated from these flies show a marked loss of di- and trimethylation at Lys9 but not of any other lysine<sup>10</sup>. Accordingly, chaetocin does not influence the degree of methylation of other lysines such as Lys27, Lys36, Lys79 or Lys4 when analyzed by MS or western blotting (**Fig. 2**).

As chaetocin also inhibits G9a *in vitro*, we cannot exclude the possibility that the reduction of H3K9me2 is due to the inhibition of the *Drosophila* ortholog of mammalian G9a. However, we consider this to be unlikely because of the similar reduction of H3K9me2 in flies deficient in dSU(VAR)3-9. The specificity of chaetocin for HMTs that target Lys9 within the H3 tail not only will allow a detailed analysis of methyltransferase-mediated gene repression but also provides an excellent tool to mechanistically dissect the processes that lead to the formation of mono-, di- and trimethylated H3 by dSU(VAR)3-9. Despite showing toxic effects in a tissue-culture system, the analysis of derivatives of chaetocin that lack the disulfide bond and therefore have lower toxicity should allow the use of these molecules for various therapeutic or experimental applications.

**Accession codes.** BIND identifiers (<http://bind.ca/>): 300892–300895.

*Note:* Supplementary information is available on the Nature Chemical Biology website.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Work in A.I.'s laboratory is funded by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (IM23/4-1). D.G. is supported by a predoctoral grant from the University of Munich (FöFoLe #12). T.B. is funded by a long-term postdoctoral fellowship from the European Molecular Biology Organisation

(ALTF 642-2003). We thank T. Jenuwein, E. Selker, Y. Shinkai, Y. Cho and P. Singh for valuable reagents, B. Czermin and L. Israel for help with the protein expression and MS analysis, and J. Sutcliffe for critical reading of the manuscript.

#### COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 10 March; accepted 22 June 2005

Published online at <http://www.nature.com/naturechemicalbiology/>

1. Wolffe, A.P. *Chromatin Structure and Function* (Academic Press, San Diego, USA, 1998).
2. Jenuwein, T. & Allis, C.D. *Science* **293**, 1074–1080 (2001).
3. Mei, S., Ho, A.D. & Mahlknecht, U. *Int. J. Oncol.* **25**, 1509–1519 (2004).
4. Hake, S.B., Xiao, A. & Allis, C.D. *Br. J. Cancer* **90**, 761–769 (2004).
5. Savelliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z. & Festenstein, R. *Nature* **422**, 909–913 (2003).
6. Rea, S. *et al.* *Nature* **406**, 593–599 (2000).
7. Hauser, D., Weber, H.P. & Sigg, H.P. *Helv. Chim. Acta* **53**, 1061–1073 (1970).
8. Baumbusch, L.O. *et al.* *Nucleic Acids Res.* **29**, 4319–4333 (2001).
9. Gardiner, D.M., Waring, P. & Howlett, B.J. *Microbiology* **151**, 1021–1032 (2005).
10. Schotta, G. *et al.* *EMBO J.* **21**, 1121–1131 (2002).
11. Bonaldi, T., Imhof, A. & Regula, J.T. *Proteomics* **4**, 1382–1396 (2004).
12. Tamaru, H. *et al.* *Nat. Genet.* **34**, 75–79 (2003).
13. Eskeland, R. *et al.* *Biochemistry* **43**, 3740–3749 (2004).
14. Fraga, M.F. *et al.* *Nat. Genet.* **37**, 391–400 (2005).



## **PERSÖNLICHE DATEN**

---

### **Dorothea Greiner**

Geboren am 10. September 1979 in Heilbronn  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## **PROMOTION**

---

- Seit 09/2004 **Adolf-Butenandt-Institut der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. B. Becker/Prof. Dr. A. Imhof
- 12/2004 – 05/2006 **Promotionsstudium „Molekulare Medizin“**  
Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 08/2005 **Publikation in Nature Chemical Biology**  
Greiner, D. et al. (2005) Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. Nat Chem Biol, 1, 143-145

## **STUDIUM UND SCHULBILDUNG**

---

- 03/2001 – 12/2007 **Studium der Humanmedizin**  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
12/2007 Zweite Ärztliche Prüfung (Note 1,5)  
03/2004 Erstes Staatsexamen (Note 2,0)  
03/2003 Ärztliche Vorprüfung (Note 1,0)
- 10/2000 – 11/2000 **Studium der Architektur**  
Technische Universität München
- 08/1990 – 06/1999 **Justinus-Kerner-Gymnasium Weinsberg**  
06/1999 Abitur (Note 1,0)

## **PROJEKT**

---

- 04/2007 – 10/2007 **Mitglied der Munich-Chicago-Projektgruppe**  
Erarbeitung eines Konzepts für Studenten-Mentoring an der

## **PRAKTISCHES JAHR**

---

06/2007 – 07/2007	<b>PJ in der Inneren Medizin</b> Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie Krankenhaus München-Neuperlach
04/2007 – 05/2007	<b>PJ in der Inneren Medizin</b> The University of Chicago, Pritzker School of Medicine (Offizielles PJ-Programm der LMU München)
12/2006 – 04/2007	<b>PJ-Tertial in Frauenheilkunde und Geburtshilfe</b> Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum der Universität München-Großhadern
08/2006 – 12/2006	<b>PJ-Tertial in der Chirurgie</b> Chirurgische Klinik und Poliklinik Klinikum der Universität München-Großhadern

## **FAMULATUREN UND PFLEGEPRAKTIKA**

---

02/2006 und 06/2006	<b>Famulatur in der Neurologie</b> Krankenhaus München-Bogenhausen
02/2005 – 04/2005	<b>Famulatur in der Allgemeinchirurgie</b> Amala Cancer Hospital and Research Center, Kerala, India
08/2004	<b>Famulatur in der HNO</b> Praxis Dr. Hölscher/Dr. Inoka, München
08/2003	<b>Famulatur in Gynäkologie und Geburtshilfe</b> Klinikum am Gesundbrunnen, Heilbronn
02/2001	<b>Pflegepraktikum in der Kinderchirurgie</b> Dr. von Haunersches Kinderspital, München
12/2000 – 01/2001	<b>Pflegepraktikum in der Neonatologie</b> Klinikum der Universität München-Großhadern

## **AUSLANDSAUFENTHALTE**

---

04/2007 – 05/2007	<b>PJ an der University of Chicago</b>
02/2005 – 04/2005	<b>Famulatur in Indien</b>
08/2001	<b>Praktikum in der Neuropädiatrie</b> Children´s Hospital Zagreb, Croatia (University of Zagreb, Medical School)
08/1999 – 08/2000	<b>Freiwilliger Sozialer Dienst</b> Kinderzentrum Brezovica, Kroatien

## **AUSZEICHNUNGEN**

---

1997	<b>Dritter Preis in der Endrunde des „Bundeswettbewerb Mathematik“</b>
1994	<b>Erster Preis in der Endrunde des „Landeswettbewerb Mathematik“ Baden-Württemberg</b>
1992	<b>Erster Preis im „Landeswettbewerb Jugend musiziert“ Baden-Württemberg</b>