

Neue Anwendungen von (S)-Adenosyl-L-methionin-Analoga mit Protein-Methyltransferasen und Click-Chemie zur sequenzspezifischen Markierung von Proteinen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen
University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Wibke Peters

aus Mönchengladbach

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Elmar Weinhold

Universitätsprofessor Dr. Bernhard Lüscher

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2005 bis Oktober 2008 am Institut für Organische Chemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen unter Anleitung von Prof. Dr. Elmar Weinhold und am Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Aachen unter Anleitung von Prof. Dr. Bernhard Lüscher angefertigt.

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Elmar Weinhold für die Möglichkeit, diese Arbeit durchführen zu können, und für die sehr persönliche Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe, die die intensive Zusammenarbeit erst ermöglicht hat.

Während der gesamten Zeit stand mir Prof. Dr. Bernhard Lüscher mit Anmerkungen und Ratschlägen hilfreich zur Seite, wofür ich mich herzlich bei ihm bedanken möchte.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
Drei- und Einbuchstaben-Code für Aminosäuren	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Genom und Epigenetik	1
1.2 Histon-Code	1
1.2.1 Organisation des Chromatin	1
1.2.2 Histon-Modifikationen	2
1.2.3 Dynamik des Histon-Codes	4
1.3 Enzymkatalysierte Methylierung von Biomolekülen	5
1.4 Histon-Methyltransferasen	6
1.4.1 Arginin-Methyltransferasen	6
1.4.2 Histon-Lysin-Methyltransferasen	7
1.4.3 Die SET-Domänen Familie der Protein-Lysin-Methyltransferasen	8
1.4.4 DOT1 Histon-Lysin-Methyltransferasen	9
1.5 Histon-Lysin-Methyltransferase Dim-5	9
1.6 Humane Histon-Lysin-Methyltransferase MLL	11
1.6.1 Strukturelle Eigenschaften von MLL4	12
1.6.2 Enzymatische Aktivität und Zusammensetzung humaner MLL-Komplexe	13
1.7 AdoMet und Analoga	14
1.7.1 Synthetische Cofaktor-Analoga	15
1.7.2 Aziridin-Cofaktor Analoga	15
1.7.3 AdoMet-Analoga mit Veränderungen der Methylgruppe	17
1.7.4 Doppelt aktivierte AdoMet-Analoga	18
1.8 Chemische Reaktionen in biologischen Systemen	20
1.8.1 Die Staudinger-Ligation	20
1.8.2 Click-Chemie	21
1.8.3 Die Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen Cycloaddition	22
1.8.4 Die Click-Reaktion und ihre Anwendung in biologischen Systemen	23
2 ZIELSETZUNG	24
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
3.1 Expression und Reinigung der Variante Dim-5 Δ 17	25

3.2	Aktivitätsbestimmung von Dim-5 in radioaktiven Methylierungsassays	27
3.2.1	Aktivität mit Histon Oktamer	27
3.2.2	Aktivität mit dem Fluorescein-Histonpeptid	28
3.2.3	Aktivität von Dim-5 bei verschiedenen pH-Werten	29
3.3	Untersuchung der Dim-5 mit Cofaktor-Analoga	30
3.3.1	Aziridin-Cofaktoren	30
3.3.2	Bindungstests mit potentiellen Protein-MTase Inhibitoren	31
3.4	Transferase-Aktivität der Dim-5 mit doppelt aktivierter Cofaktoren	34
3.4.1	Aktivität von Dim-5 mit AdoPropen	34
3.4.2	Versuche zur Markierung der Doppelbindung	37
3.4.3	Aktivität von Dim-5 mit AdoButin	37
3.4.4	Aktivität mit weiteren doppelt aktivierten Cofaktoren	39
3.5	Synthese eines neuen Cofaktors mit terminaler Dreifachbindung und Aktivitätsuntersuchung mit Dim-5	40
3.5.1	Synthese des AdoMet Analogons AdoEnIn	40
3.5.2	Umsetzung von AdoEnIn mit dem Testpeptid durch Dim-5	40
3.5.3	Andere Protein-MTasen und ihre Aktivität mit doppelt aktivierten- und Aziridin-Cofaktoren	43
3.6	Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen Cycloaddition (Click-Reaktion) zur chemischen Markierung der übertragenen Alkyngruppe	46
3.6.1	Biotinylierung des Monoalkylierten Peptids	47
3.6.2	Biotinylierung von Histon H3 durch zweistufige Modifikation	50
3.7	Konstruktion, Reinigung und Aktivität der Variante M.SssI-H3-Tag	51
3.7.1	Methylierung des H3-Tags mit Dim-5	51
3.7.2	Markierung von M.SssI-H3-Tag mit AdoEnIn und anschließende Biotinylierung durch die Click-Reaktion	53
3.8	Markierung eukaryotischer Zielproteine mit AdoEnIn durch endogene MTase-Aktivität und anschließend Biotinylierung	53
3.8.1	Expressionsversuche in E.coli	64
3.8.2	Expression und Lokalisation von MLL-C in humanen Zellen	64
3.8.3	Nachweis der Aktivität von HA-MLL-C mit AdoEnIn und Histon H3	65
3.8.4	Aktivität von MLL in einem ASH2L-Komplex	67
3.8.5	Expression und Lokalisation von HA-MLL-C	68
3.8.6	Versuche zur Markierung von Proteinen in humanen Kernextrakten mit immuno-präzipitiertem HA-MLL-C	70
4	ZUSAMMENFASSUNG	73
4.1	Entwicklung eines Protein-Modifikations und Markierungssystems	73
4.1.1	Markierung von einem Histon-Peptid und Histon H3 durch die HMTase Dim-5	73

4.1.2	Markierung des modifizierten Peptids durch eine bioorthogonale chemische Reaktion	74
4.1.3	Modifikation von Histon H3 mit AdoEnIn und Dim-5 und anschließende Markierung mit Biotin	74
4.1.4	Modifikation von Histon H3 durch Proteinkomplexe	75
4.2	Anwendung des Modifikations-Markierungssystems in zellulären Systemen	76
4.2.1	Detektion biotinylierter Proteine im Western-Blot	76
4.2.2	Isolierung biotinylierter Proteine aus Kernextrakten	76
5	AUSBLICK	77
6	MATERIALIEN UND METHODEN	79
6.1	Materialien	79
6.1.1	Enzyme	82
6.1.2	Marker und Plasmide	82
6.1.3	Oligodesoxynucleotide und Primer	84
6.1.4	Bakterienstämme und Zelllinien	85
6.1.5	Antikörper	86
6.2	Geräte	87
6.2.1	Reinstwasser-Anlage	87
6.2.2	Zentrifugen	87
6.2.3	Schüttler und Inkubatoren für die Zellkultur	87
6.2.4	Elektroporation	87
6.2.5	Ultraschall	87
6.2.6	Gefriertrocknung	87
6.2.7	Sterilisation	87
6.2.8	Inkubator für zellfreie Reaktionen	88
6.2.9	Visualisierung von Western-Blots	88
6.2.10	Agarose-Gelelektrophorese	88
6.2.11	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	88
6.2.12	Szintillationsmessungen	88
6.3	Instrumentelle Methoden:	88
6.3.1	FPLC	88
6.3.2	HPLC	88
6.3.3	UV-Vis Spektroskopie	89
6.3.4	DNA Sequenzierung	90
6.4	Molekularbiologische Methoden	90
6.4.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen zur Elektroporation	90
6.4.2	Herstellung salz-kompetenter <i>E.coli</i> Zellen zur Hitzeschock-Transformation	90
6.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	90
6.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	91

6.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	91
6.4.6	Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA	92
6.4.7	Konzentrationsbestimmung von DNA	92
6.4.8	Reinigung der Variante Dim-5Δ17	92
6.4.9	Aktivitätsassays von Dim-5Δ17 mit ¹⁴ C-AdoMet	93
6.4.10	Konstruktion der Variante M.SssI-H3-Tag	94
6.4.11	Reinigung der Variante M.SssI-H3-Tag	94
6.4.12	Konstruktion des Plasmids pDest MLL4-Cterminal	95
6.4.13	Transfektion eukaryotischer Zellen	95
6.4.14	Reinigung der Variante HA-MLL4-C	96
6.4.15	Herstellung eines Kernextraktes mit Ultraschall-Aufschluss	96
6.4.16	Herstellen eines Dignam-Kernextraktes	97
6.4.17	Enzymatische Peptid-Modifikation	97
6.4.18	Biotinylierung mono-alkylierter Peptide mittels Click-Chemie	98
6.4.19	Enzymatische Histon-Modifikationen	98
6.4.20	Biotinylierung von Histonen	98
6.4.21	Modifikation von Zielproteinen in Kernextrakten und anschließender Biotin-Markierung durch Click-Chemie	98
6.4.22	Isolieren Biotin-markierter Proteine mit magnetischen Streptavidin-Beads	99
6.5	Chemische Synthesen	100
6.5.1	Synthese des AdoMet Analogons AdoEnIn	100
6.5.2	Synthese von Biotin-PEG-Azid	101
6.6	Anhang	103
7	LITERATUR	105
8	DANKSAGUNG	114
9	LEBENS LAUF	116

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, bzw. 2'-Desoxyadenosin
Abb.	Abbildung
AdoHcy	S-Adenosyl-L-homocystein
AdoMet	S-Adenosyl-L-methionin
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
ca.	circa
[D6]DMSO	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dim-5	Protein-Methyltransferase aus <i>Neurospora crassa</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylendiamintetraacetic acid)
G	Guanin, bzw. 2' -Desoxyguanosin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
H3	Histon H3
H3K9	Lysin 9 von Histon H3
HIS	Histidin
HKMT	Histon-Lysin-Methyltransferasen
HMT	Histon-Methyltransferasen
HMTase	Histon-Methyltransferase
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMT	Histon-Arginin-Methyltransferasen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	kilo Dalton

K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
LC-ESI-MS	Flüssigkeitschromatographische Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry)
λ	Wellenlänge
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
m	Multipllett
M.SssI	Methyltransferase aus <i>Mycoplasma sp. Stamm MQ1</i>
M.TaqI	Methyltransferase aus <i>Thermus aquaticus</i>
me	Methyl
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MTase	Methyltransferase
MTase	Methyltransferase
MW	Molekulargewicht in g/mol (molecular weight)
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NMR	Magnetische Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
ODN	Oligodesoxynukleotid
OD^λ	Optische Dichte bei Wellenlänge
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	DNA-Polymerase DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
ppm	parts per million
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SV	Säulenvolumen
T	Thymin, bzw. 2'-Desoxythymidin

TBE	Trisbase, Borsäure, EDTA
TBTA	tris-(Benzyltriazolylmethyl)amin
TEA	Triethylamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TPTA	tris-(Hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
tR	Retentionszeit
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp

Drei- und Einbuchstaben-Code für Aminosäuren

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

Proteinsequenzen werden vom N-Terminus zum C-Terminus geschrieben. Aminosäuren in Proteinen werden im Ein-Buchstaben-Code, gefolgt von der Position der Aminosäure, angegeben. Mutanten von Proteinen werden mit dem Namen des Wildtyps und der Mutantenbeschreibung bezeichnet. Die Mutantenbeschreibung besteht aus der Wildtyp-Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code), der Position der Mutation und der ausgetauschten Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code).

1 Einleitung

1.1 Genom und Epigenetik

Mit dem Verständnis der DNA-Struktur als Doppelhelix der DNA im Jahr 1953 begann die Aufklärung des genetischen Codes (Watson & Crick, 1953). Die zellulären Mechanismen, mit denen DNA Sequenzen zu Proteinstrukturen übersetzt werden, wurden in den folgenden Jahren untersucht (Crick *et al.*, 1961). Mehrzellige Organismen, besonders Eukaryoten, bestehen aus vielfältig differenzierten Zellen, welche mit der DNA die genetische Information des gesamten Organismus tragen, davon aber nur einen Bruchteil als Genprodukte exprimieren. Über dem genetischen Code als primäre Informationsebene müssen also noch weitere Ebenen der Informationsspeicherung existieren. Dieser Code über dem Code ist die Epigenetik. Die Epigenetik untersucht erbliche Unterschiede in der Genexpression, welche ohne Veränderungen der DNA-Struktur auftreten (Wolffe & Matzke, 1999).

Die nächst höhere Ebene der Genregulation umfasst kovalente Modifikationen der DNA ohne die Abfolge der Basensequenz zu beeinflussen. So wird z.B. die Inaktivierung eines kompletten X-Chromosoms weiblicher Säugetiere maßgeblich durch Methylierung gesteuert (Beard *et al.*, 1995; Panning & Jaenisch, 1996). Somatische Zellen diploider Organismen tragen zwei Kopien jedes Allels. In Säugern sind einige Gene durch „Imprinting“ reguliert, d.h. die Genexpression erfolgt nicht gleichzeitig von beiden Allelen, sondern ausschließlich nur von einem Allel (Wilkinson *et al.*, 2007). So wird z.B. die Expression des *Insulin-like growthfactor-2* nur vom väterlich vererbten Allel exprimiert (DeChiara *et al.*, 1991). Als übergeordnete Ebene der Regulation der Genexpression ist in den folgenden Jahren die posttranslationale Modifikation von Histonen entdeckt und intensiv untersucht worden (Rea *et al.*, 2000; Strahl & Allis, 2000; Jenuwein & Allis, 2001).

1.2 Histone-Code

1.2.1 Organisation des Chromatin

Die Expression von Genen eukaryotischer Organismen hängt besonders von der Zugänglichkeit der DNA für die Transkription ab. In Eukaryoten ist die nukleäre DNA zu Chromatin verpackt. Die Grundeinheit des Chromatin ist das Nukleosom (Abbildung 1). Dabei bilden die Histone H3 und H4 ein Tetramer, das auf jeder Seite von einem H2A/H2B Histone-Dimer gebunden wird. Um dieses Oktamer sind 146 bp der DNA in einer linksgängigen Superhelix gewunden. Dieser hochkonservierte Nucleo-Proteinkomplex tritt

alle 200 $\pm$ 40 Basenpaare in allen eukaryotischen Genomen auf (Luger *et al.*, 1997; Luger, 2003). Die Nukleosomen sind durch DNA-Linkereinheiten von 10 bis 80 bp miteinander verbunden und werden durch das Histon H1 zu einer 10nm Faser kompaktiert..

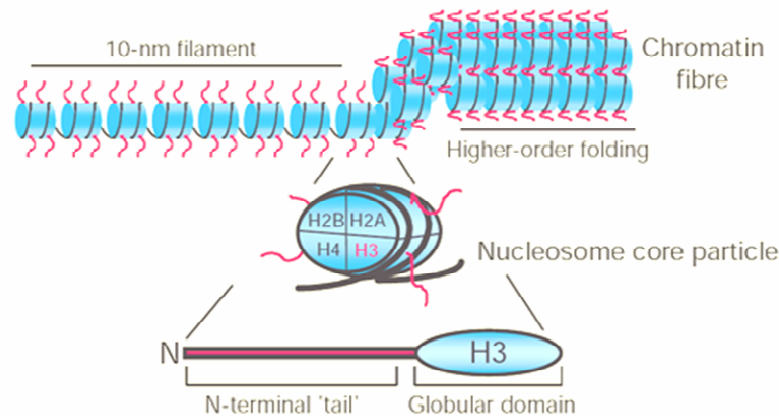


Abbildung 1: Struktur des Chromatin. Die globulären Histon-Domänen sind zum Oktamer assoziiert, die frei beweglichen Termini ragen aus der Struktur heraus. Höhere Organisationsformen ergeben die 10 nm Faser, die sich zu Komplexen höherer Ordnung falten können (aus Strahl & Allis, 2000).

Chromatin kann verschieden stark kondensiert sein, wodurch auch die Zugänglichkeit der DNA reguliert wird. Im sehr dicht gepackten Heterochromatin findet man wenig transkriptionale Aktivität (Zhimulev *et al.*, 1986), im lockerer strukturierten Euchromatin dagegen viel. Die Chromatinstruktur ist meist dynamisch, und kann durch unterschiedliche Modifikationen umgebaut (*remodeled*) werden. Studien der Nukleosomenstruktur haben gezeigt, dass die N- und C-Termini der Histone nicht im Nukleosom mit verpackt sind, sondern als *Random-Coil*-Struktur herausragen (Trievel, 2004).

1.2.2 Histon-Modifikationen

Die N- und C-Termini der Histone werden posttranslational auf vielfältige Weise modifiziert. Die Modifikationen sind kovalent und umfassen u.a. Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, und Ubiquitinylierung (Berger, 2002). Neben ATP-abhängigen Chromatin-*remodeling* Vorgängen, die die Mobilität der Nukleosomen erhöhen (Cairns *et al.*, 1996; Collingwood *et al.*, 1999), können auch die Histon-Modifikationen die Chromatin-Struktur durch Beeinflussung von Histon-DNA oder Histon-Histon Wechselwirkungen verändern (Zheng & Hayes, 2003). Die erstaunliche Diversität und außerordentliche Spezifität dieser posttranslationalen Markierungen gaben Anlass zu der Annahme, dass die Modifikationen einen Code darstellen, der von anderen Proteinen gelesen werden kann. Diesen bezeichnete man als Histon-Code (Strahl & Allis, 2000). Die Vielfalt der Modifikationen eröffnet eine

Fülle an möglichen Kombinationen (Abbildung 2). Der Zustand des Chromatin wird durch unterschiedliche Histon-Modifikationen bestimmt, welche die Transkription ,an‘ oder ,aus‘ schalten können.. So gilt z.B die Methylierung an Histon H3 Lysin 9 (H3K9) als Transkriptions-reprimierendes Signal (Nakayama *et al*, 2001; Heard *et al*, 2001). Phosphorylierung an Histon H3 Serin 10 hingegen ist aktivierend, und diese Modifikationen schließen sich gegenseitig aus (Li *et al*, 2002). Auch die Methylierung von H3K4 hat Transkriptions-aktivierende Effekte (Berger, 2007).

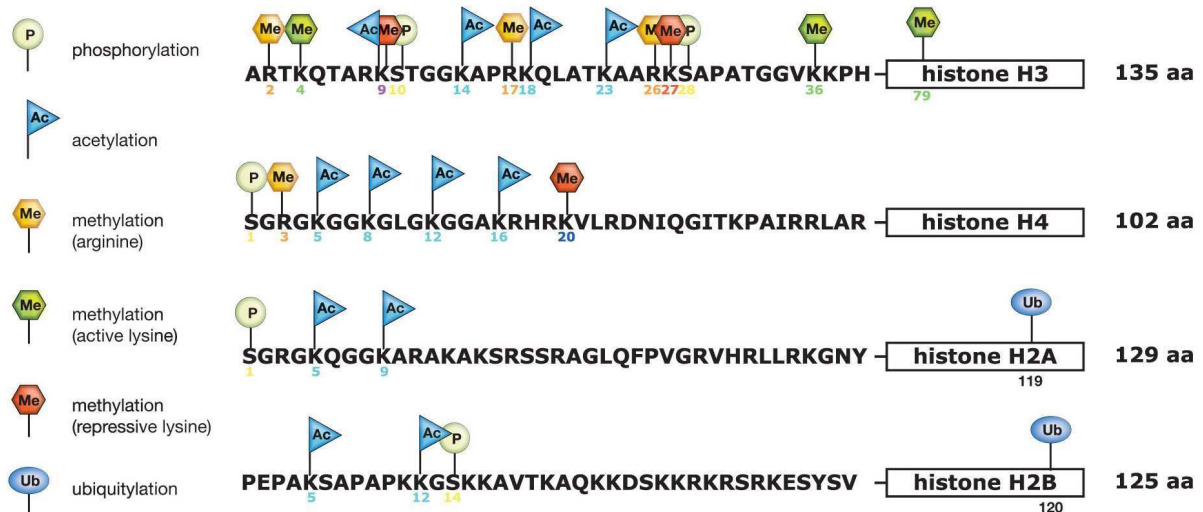


Abbildung 2: Posttranslationale Modifikationen der Histone. Die modifizierten N-Termini der Histone sind im Ein-Buchstaben Aminosäurecode dargestellt, die globuläre Domäne als Box (aus C.D: Allis, Epigenetics, 2006).

Die Histon-Acetylierung ist generell mit aktivem, transkribiertem Chromatin assoziiert (Sternier & Berger, 2000). Durch die Acetylierung wird die positive Ladung der Lysinreste entfernt, und die Bindung mit der am Zucker-Phosphat Rückgrat negativ geladenen DNA lockert sich. Die Methylierung ist die am besten charakterisierte Modifikation und gilt als bedeutendes Steuerungssignal (Trievel, 2004). Die Methylierung unterscheidet sich von den anderen Histon-Modifikationen, da sie an den Seitenketten von Argininen und Lysinen auftreten kann, und das Stickstoffatom, welches modifiziert wird, einfach oder mehrfach methyliert werden kann (Walsh, 2006). Abhängig von der Position der Methylierung kann die Modifikation aktivierend oder reprimierend wirken (Cheung & Lau, 2005). Neben den Kinasen, welche für die Phosphorylierung verantwortlich sind, sind die Histon-Methyltransferasen (MTasen) die Histon-modifizierenden Enzyme mit der höchsten Spezifität. Diese werden später noch im Detail behandelt.

1.2.3 Dynamik des Histon-Codes

Die meisten Histon-Modifikationen sind reversibel. Tatsächlich kann sich das Modifikationsmuster einzelner Histon-Positionen innerhalb von Minuten ändern. Da zuerst besonders die Histon-Acetylierung untersucht wurde, sind hier mit den Histon-Deacetylasen (HDACs) auch die ersten Enzyme gefunden worden, die diese Modifikationen wieder entfernen (Leipe & Landsmann, 1997). Durch Entfernung der Acetyl-Markierung wird die Transkription im Allgemeinen wieder reprimiert (Kouzarides, 2007). In Zusammenhang mit ATP-abhängigem Chromatin-remodeling scheint die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Histonen auch den Austausch der Histone nach der Replikation und ihre Zusammenlagerung zu den bekannten Oktameren zu bewirken (Kimura *et al.*, 2006). Hierbei sind besonders die Aurora-Kinasen zu erwähnen, die z.B. durch Phosphorylierung von Histon H3S10, einem mitotischen Signal, den Zellzyklus kontrollieren. Die Protein-Phosphatase 1 kann diese Phosphatgruppen wieder entfernen (Emanuele *et al.*, 2008).

Die Methylierung wurde lange Zeit als stabiles Signal angesehen, welches nur durch Austausch von Histonen entfernt werden kann. Im Jahr 2004 wurde dann die erste Demethylase gefunden, die spezifisch Methylgruppen an Histon H3K4 entfernen kann (Shi *et al.*, 2004). Diese Entdeckung unterstreicht die Bedeutung der Methylierung als dynamisches regulatorisches Signal für die Genexpression.

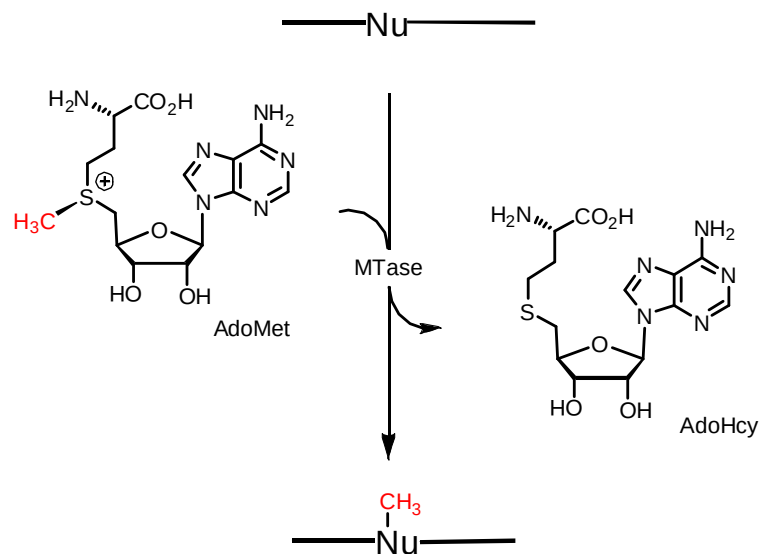
Der postulierte Mechanismus der Lysin-Demethylierung folgt einem oxidativen Reaktionsweg, bei dem Formaldehyd entsteht. Die notwendige Stabilisierung des kationischen Zwischenproduktes durch ein freies Elektronenpaar am Stickstoff macht diesen Mechanismus für trimethyliertes Substrat unmöglich. Methylgruppen von trimethylierten Lysinresten können durch andere Gruppe von Demethylasen entfernt werden. Diese Enzymen der JmjC-Familie katalysieren in Anwesenheit von Fe(II) und α -Ketoglutarat die Bildung von Formaldehyd und Succinat (Tsukada *et al.*, 2006; Marmorstein & Trievel, 2008).

Für die Arginin-Methylierung wurde dagegen erst ein Enzym beschrieben, welches antagonistische Enzymfunktionen ausführt, die Histon-Arginin Demethylase JmJd6 (Chang *et al.*, 2007). Diese enzymatische Funktion muss aber noch genauer untersucht werden, wirkliche Arginin-Demethylaseaktivität bestätigen zu können (Smith & Denu, 2008). Eine Enzymgruppe, die PADs (Peptidyl-Arginin Deiminasen), von denen es im Menschen vier verschiedene Enzyme gibt, können Methylargininreste zu Citrullinresten umwandeln (Cuthbert *et al.*, 2004). Da das Produkt aber nicht unmethyliertes Arginin ist, erfüllen die PADs nicht die Voraussetzungen einer wirklichen Demethylase (Klose & Zhang, 2007).

Somit kann die Arginin-Methylierung noch nicht als vollständig reversible Histon-Modifikation angesehen werden.

1.3 Enzymkatalysierte Methylierung von Biomolekülen

Die biologische Methylierung als regulatorisches Signal hat durch die Entdeckung des Histon-Codes in den letzten Jahren außerordentlich an Bedeutung gewonnen. Die enzymatische Reaktion (Schema 1) ist aber schon sehr lange bekannt.



Schema 1: Die Methylierung nukleophiler Positionen (Nu) in Biomolekülen ist enzymkatalysiert. Spezifische Methyltransferasen (MTasen) nutzen den ubiquitären Cofaktor S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) als Methylgruppendifferenz. Als Produkte entstehen das methylierte Biomolekül und das demethylierte S-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy).

Die Enzyme, welche diese Reaktion katalysieren, nennt man Methyltransferasen (MTasen). Als Methylgruppendifferenz dient der natürliche Cofaktor S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) (Cantoni, 1952). Die Methylgruppe wird enzymkatalysiert von AdoMet auf unterschiedliche Biomoleküle übertragen und es entstehen S-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy) und das methylierte Produkt. Methyliert werden neben kleineren Molekülen in der Biosynthese auch große Biopolymere wie DNA, RNA und Proteine (Jeltsch, 2002; Walsh, 2006; Grewal & Rice, 2004). Diese Substrate werden meist sehr spezifisch modifiziert. Sie enthalten Erkennungssequenzen mit nucleophilen Zielpositionen als Methylgruppenakzeptoren.

Die Methylierung von Proteinen verläuft posttranslational und wird von Protein-MTasen vermittelt. Während die DNA-MTasen nur der methylierte Basen liefern, ist das Substratspektrum der Protein-MTasen deutlich umfassender. Proteine können an den

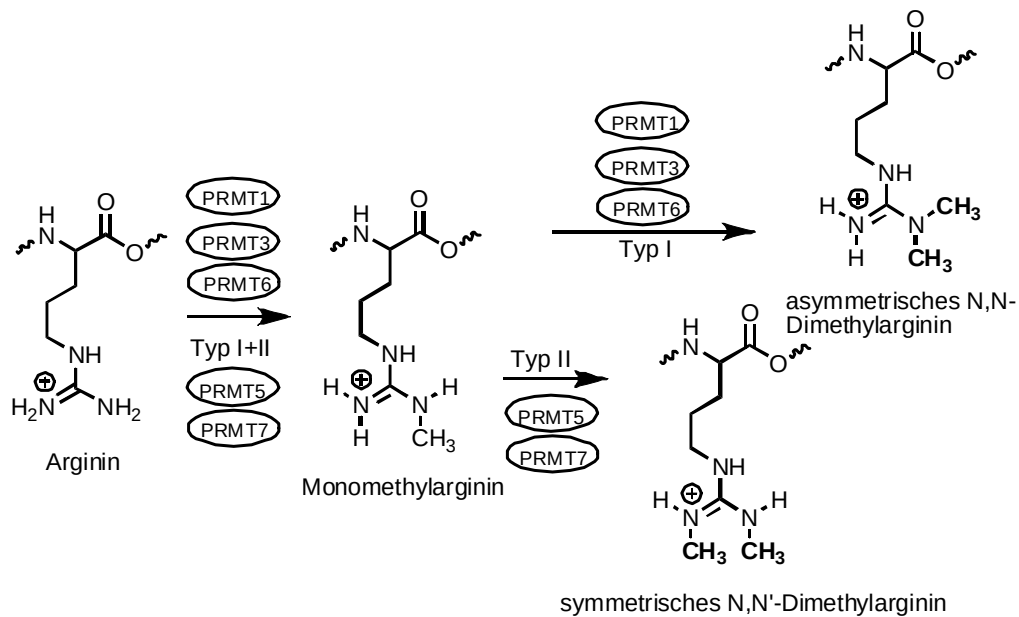
nucleophilen Seitenketten von Lysin, Arginin, Histidin und Glutamin methyliert werden. Diese sind die häufiger vorkommenden N-Methylierungen. Die Seitenketten von Asparagin- und Glutaminsäure können auch O-methyliert werden. Die Methylierungen verändern die chemischen Eigenschaften der Substrate. Die Methylierung von Carboxylgruppen hebt ihre negative Ladung auf und bewirkt eine höhere Hydrophobizität. Die N-Methylierung von Lysinresten ändert die positive Ladung dagegen nicht (Shogren-Knaak, 2007). Durch die möglichen Mono-, Di- und Trimethylierungen erhöht sich aber der sterische Anspruch und die Hydrophobizität der Seitenkette deutlich und bietet Wechselwirkungsmöglichkeiten für Protein-Protein Interaktionen (Walsh, 2006). Dies wird besonders am Beispiel der Histon-Methylierung und der damit verbundenen regulatorischen Funktionen bei der Genexpression deutlich.

1.4 Histon-Methyltransferasen

Unter allen Enzymen, die Markierungen für den Histon-Code anbringen, sind Histon-MTasen neben Kinasen die Enzyme mit der höchsten Spezifität. Die HMTasen modifizieren die N- und C-Termini der Histone, welche frei aus dem Nukleosom herausragen. In den basischen Histon-Proteinen sind die Aminosäuren Lysin- und Arginin weit verbreitet, und werden in hohem Maße posttranslational modifiziert.

1.4.1 Arginin-Methyltransferasen

Arginin-MTasen sind in vielen Organismen, nicht aber in Bakterien, identifiziert worden (Gary & Clark, 1998; Boulanger *et al*, 2004; Hung & Li, 2004). Beim Menschen hat man bis jetzt acht verschiedene Protein-Arginin-MTasen (PRMTs) gefunden. Sie werden als Typ I oder Typ II Enzyme klassifiziert (Bedford & Richard, 2005). In Eukaryoten gibt es drei Hauptformen an methyliertem Argininresten: N-Monomethylarginin, N,N'-asymmetrisches Dimethylarginin und N,N-symmetrisches Dimethylarginin (Schema 2). Die Typ I PRMTs (z.B. PRMT1, PRMT3 oder PRMT6) produzieren asymmetrisches Dimethylarginin, und Typ II PRMTs (PRMT 5 und 7) katalysieren die Bildung von symmetrischem Dimethylarginin (Smith & Denu 2008).



Schema 2: Methylierung von Arginin über Monomethylarginin zu symmetrischem und asymmetrischem Dimethylarginin über die gemeinsame Zwischenstufe Monomethylarginin durch PRMTs (nach Bedford & Richard, 2005 und Klose & Zhang, 2007).

Alle strukturell charakterisierten PRMTs bilden Dimere, was wahrscheinlich notwendig für ihre enzymatische Aktivität ist. Die Dimerisierung beeinflusst die Orientierung von Aminosäureresten, wodurch erst die Bindung des Cofaktors AdoMet ermöglicht wird. (Cheng *et al.*, 2005).

Die Histone H2A, H3 und H4 sind Substrate einiger PRMTs. Ihre Methylierung ist Teil des Histon-Codes und trägt zur Regulation der Genexpression bei. Die Arginin-Methylierung kann sowohl die Aktivierung als auch die Reprimierung der Transkription zur Folge haben. Die Mechanismen dieser Regulation sind aber noch weitgehend unverstanden. Ein regulatorischer Prozess, der im Zusammenhang mit der Methylierung des übernächsten Lysin-Restes untersucht wurde, ist die Inaktivierung von Genen durch die asymmetrische Dimethylierung von Arginin 2 von Histon H3 (H3R2me2a). Diese Modifikation verhindert die Wechselwirkung mit Set1 oder MLL-Ash2-HMT-Komplexen und verhindert so die Methylierung von K4 (Kirmizis *et al.* 2007; Guccione *et al.*, 2007).

1.4.2 Histon-Lysin-Methyltransferasen

Histon Lysin-MTasen (HKMTs) sind hochspezifische Enzyme, die meist nur einen bestimmten Lysinrest eines Histons modifizieren (Kouzarides, 2002). Die Lysin-Reste der Histone können Mono-, Di- oder Trimethyliert werden, und die unterschiedliche Anzahl an Methylgruppen pro Position kann in verschiedenen regulatorischen Funktionen resultieren.

Durch die vielen Kombinationsmöglichkeiten ist die Lysin-Methylierung ein hochkomplexer Kodierungsmechanismus. Histon H3 kann an vielen Positionen methyliert werden, neben den im N-Terminus gelegenen Lysinresten K4, K9, K27 und K36 kann der im globulären Bereich liegende Lysinrest, K79, methyliert werden (Feng *et al.*, 2002; Lacoste *et al.*, 2002; van Leuwen *et al.*, 2002). Die wohl am besten untersuchte Methylierungsposition ist die an H3K9. Generell ist H3K9 in allen drei Methylierungsstufen ein Kennzeichen von transkriptionell stillgelegtem Genen. Diese Markierung ist von Pflanzen bis zu den Tieren verbreitet. Allerdings sind auch alle drei Methylierungsstufen von K9 in transkriptionell aktiven Regionen gefunden worden (Krauss, 2007). Trotzdem wird generell eine Methylierung von H3K9 als heterochromatische Histon-Modifikation angesehen. Als weitere heterochromatische Marker gelten H3K27 und H4K20 (Schotta *et al.*, 2004; Ringrose *et al.*, 2004). Die Hauptpositionen für Methylierung, die mit aktivierter Transkription verknüpft sind, sind H3K4, H3K36 und H3K79 (Martin & Zhang, 2005).

Die HKMTs lassen sich nach Strukturmerkmalen in zwei Hauptklassen unterteilen, die der SET-Domänen Familie und der DOT1 Familie.

1.4.3 Die SET-Domänen Familie der Protein-Lysin-Methyltransferasen

Die meisten HKMTs gehören zur Klasse 5 der AdoMet-abhängigen MTasen mit einer SET-Domäne. Die Domäne wurde als eine konservierte Sequenz in drei *D.melanogaster* Proteinen gefunden und nach ihnen benannt (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste und Trithorax). Die SET-Domäne umfasst ca. 130 Aminosäurereste. Ihr Vorkommen ist aber nicht auf HKMTs beschränkt und auch andere Proteinen können sie enthalten (Dillon *et al.*, 2005). Die SUV39-Familie ist am eingehendsten untersucht worden. Ihre SET-Domäne besteht aus β -Faltblättern, welche eine knotenähnliche Struktur ausbilden. N- und C-terminal liegen flankierende Sequenzen, die Pre- und Post-SET Regionen. Diese sind oft essentiell für enzymatische Aktivität und könnten an der Substraterkennung beteiligt sein (Schubert *et al.*, 2003). Die SET-Domänen enthaltenden Enzyme unterscheiden sich von anderen AdoMet-abhängigen MTasen in einigen Merkmalen. Das wichtigste ist, dass die Bindungsstellen für das Protein-Substrat und AdoMet auf gegenüberliegenden Seiten der SET-Domäne liegen. Das ermöglicht eine Mehrfach-Modifikation des Substrates, ohne dass es freigesetzt und neu gebunden werden muss. Die Kristallstrukturen einiger SET-Enzyme haben gezeigt, dass die Cofaktor-Bindungstasche unter diesen MTasen konserviert ist (Zhang *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002; Trievel 2004). Zur Cofaktorbindung trägt ein positiv geladener Aminosäurerest durch Bildung einer Salzbrücke mit der Carboxylgruppe von AdoMet bei. Ein aromatischer

Rest in der Post-SET Region interagiert mit dem Adenin-Ring des Cofaktors über π -Stapelung. Damit die Methylgruppe übertragen werden kann, muss das Ziel-Lysin deprotoniert sein. SET-MTasen verfügen über ungewöhnlich hohe pH-Optima, da dann das Substrat für die Methylgruppenübertragung deprotoniert werden muss (Cheng *et al.*, 2005). Alternativ können auch basische Aminosäurereste im aktiven Zentrum das Proton abstrahieren.

1.4.4 DOT1 Histon-Lysin-Methyltransferasen

DOT1 HKMTs enthalten keine SET-Domäne und methylieren die Position H3K79 (Feng *et al.*, 2002). Histone werden im freien Zustand nicht modifiziert, sondern müssen zur Methylierung im Nukleosom eingebettet sein. Wie bei den SET-MTasen liegen die Bindungsstellen für AdoMet und dem Substrat auf unterschiedlichen Seiten der Enzyme. Der katalytische Mechanismus DOT1-MTasen ähnelt stark dem der SET-MTasen. Allerdings fehlen hier im aktiven Zentrum Aminosäurereste, welche das Ziellysin deprotonieren können. Auch die unterschiedlichen pH-Profile von SET- und DOT1-MTasen deuten auf einen anderen Mechanismus bei der Lysin-Deprotonierung für die Methylgruppenübertragung hin (Smith & Denu, 2008; Sawada *et al.*, 2004), z.B. eine tiefe Bindungstasche mit hydrophober Umgebung, welche eine Absenkung des pK_A -Wertes des Ziellysinrestes erlaubt (Dao Pin *et al.*, 1991).

1.5 Histon-Lysin-Methyltransferase Dim-5

Dim-5 ist eine HMTase aus *N.crassa* und gehört zum Typ der SUV39-MTasen mit einer SET-Domäne. Die Kristallstruktur der Dim-5 wurde 2002 bestimmt. Sie ist eine der ersten Kristallstrukturen eines Enzyms mit einer SET-Domäne (Zhang *et al.*, 2002). Die Bezeichnung Dim-5 steht für *Defective in Methylation*, die Wirkung einer Mutation in diesem Gen (Tamaru *et al.*, 2003). Das Enzym methyliert Histon H3 und seine Spezifität wurde mit Hilfe von synthetischen Peptiden des N-Terminus von Histon H3 bestimmt. Dabei wird der Lysinrest H3K9 spezifisch trimethyliert. Ersetzt man Lysin 9 durch eine andere Aminosäure, so erkennt das Enzym das variierte Peptid nicht und es wird nicht modifiziert. Die Trimethylierung von H3K9 in *N.crassa* kontrolliert die DNA Methylierung und damit die Transkription. Ein Fehlen der H3K9-Trimethylierung resultiert in einer starken Hypomethylierung der DNA (Tamaru & Selker, 2001). Dim-5 ist somit an der schon vorher beschriebenen Steuerung der Genexpression durch Histon-Modifikationen beteiligt und liefert ein Beispiel für einen regulatorischen Zusammenhang zwischen DNA- und Histon-Methylierung.

Bei der Bestimmung der Spezifität des Enzyms wurde festgestellt, dass Trimethyl-K9 das Hauptprodukt ist und kaum Zwischenstufen wie mono- oder dimethyliertes Substrat entstehen. Das weist darauf hin, dass das Enzym die Methylgruppen prozessiv überträgt. Das Peptidsubstrat bleibt gebunden und der demethylierte Cofactor AdoHcy wird in der Cofaktor-Bindungstasche gegen AdoMet ausgetauscht (Tamaru *et al.*, 2003).

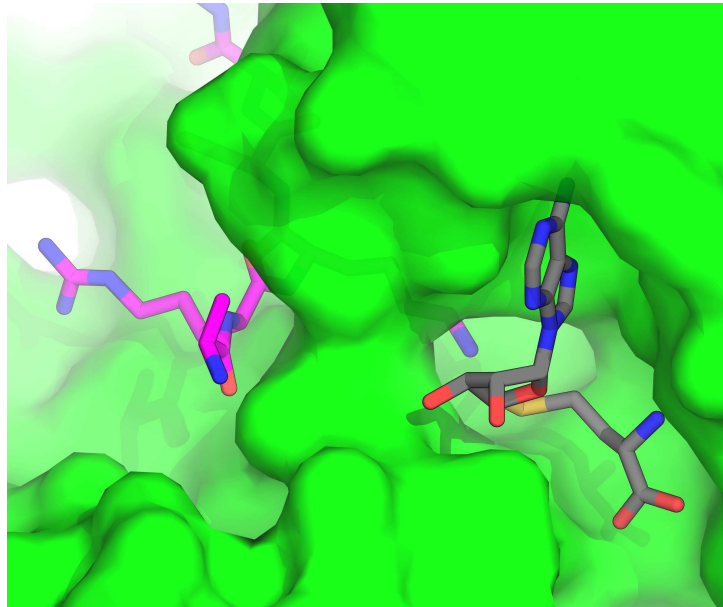
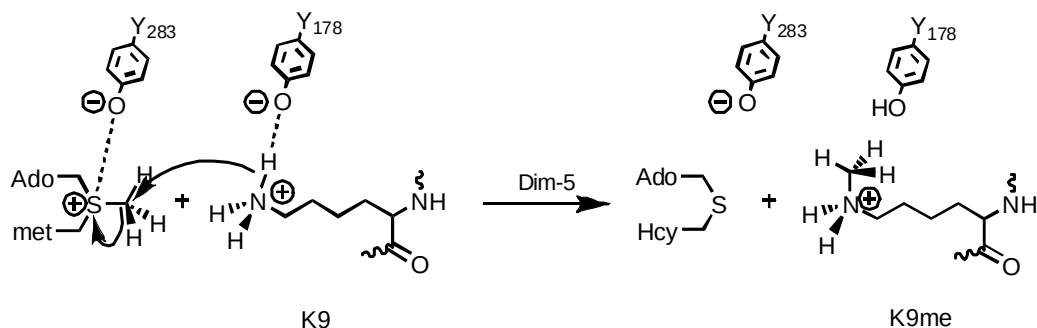


Abbildung 3: Das aktive Zentrum der Dim-5 (grün) mit gebundenem Peptidsubstrat (hinten) und AdoHcy (vorne). Stäbchenmodell grau: AdoHcy, magenta: Substratpeptid (nach Zhang *et al.*, 200).

Dim-5 besitzt 318 Aminosäurereste und ist damit das kleinste Mitglied der SUV39-Familie. Strukturvergleiche mit anderen SET-Proteinen zeigen stark konservierte Bereiche mit mehreren invarianten Aminosäuren. Die neun Cysteinreste der Pre-SET Domäne sind in der SUV39-Familie hoch konserviert. Sie komplexieren Zink-Ionen und sind für die enzymatische Aktivität essentiell (Zhang *et al.*, 2002). Dim-5 hat ungewöhnliche enzymatische Eigenschaften. Die höchste Aktivität zeigt das Enzym bei einem pH-Wert von 9,8, einer Temperatur von 10°C und einem geringem Salzgehalt.

Auch für dieses Enzym dient AdoMet als Methylgruppendonor. Die Cofaktor-Bindungsstelle ist hier, im Gegensatz zu anderen MTasen, eine offene Tasche, die den oben beschriebenen Cofaktor-Austausch ermöglichen kann (Abbildung 3). Von der Cofaktor-Bindungsstelle führt ein Kanal, der durch mehrere β -Faltblätter gebildet wird durch das Enzym. Auf der anderen Seite befindet sich die Bindungsstelle für das Peptidsubstrat. Die spezifische Substraterkennung resultiert aus Wechselwirkungen von Aminosäureseitenketten des Enzyms mit denen des Substrats (Zhang *et al.*, 2003). Besonders die Wasserstoffbrückenbildung

zwischen H3S10 und Dim-5 D260 scheint essentiell für die Substratbindung. Der katalytische Mechanismus der Methylgruppenübertragung ist von zwei hochkonservierten Tyrosin-Resten anhängig, Y178 und Y283. Die terminale Aminogruppe von K9, welche in einer S_N2 -ähnlichen Substitutionsreaktion methyliert wird, wird durch eine Wasserstoffbrücke mit Dim-5 Y178 für den nukleophilen Angriff auf die aktivierte Methylgruppe AdoMet positioniert. Beim pH-Optimum von pH 9.8 sind die Aminogruppe und die Tyrosin-Reste partiell deprotoniert. Beide Gruppen haben einen pKa-Wert von ca. 10. Schema 3 zeigt den möglichen katalytischen Mechanismus der Methylgruppenübertragung unter Beteiligung der beiden konservierten Tyrosinreste.



Schema 3: Mögliche Funktion der katalytischen Aminosäurereste Y283 und Y178 beim Methylgruppentransfer.

Das deprotonierte Y178 kann, falls das terminale Lysin noch eine positive Ladung trägt, seine Deprotonierung unterstützen. Die negative Ladung an Y283 stabilisiert hingegen die positive Ladung der Methylsulfonium-Gruppe des Cofaktors. Mutationen an diesen beiden Positionen führen zum kompletten Verlust der enzymatischen Aktivität (Zhang *et al.*, 2003).

1.6 Humane Histon-Lysin-Methyltransferase MLL

Die *mixed lineage leukemia* (MLL) Genfamilie kodiert fünf MLL-Proteine, funktionelle Orthologe zum *Drosophila Trithorax*-Protein. Davon ist MLL1 am besten untersucht. Das Gen wurde als ein Proto-Onkogen identifiziert, welches in Verbindung mit akuten Leukämien bei Kindern und Erwachsenen steht. In den Krebszellen wurden chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens gefunden. Es sind mehr als 40 verschiedene Partner identifiziert worden die mit MLL Fusionsproteine bilden, welche die pathogene Dimerisierung oder Oligomerisierung von MLL bewirken (Yokoyama *et al.*, 2004; Hess, 2004 a,b). Posttranslational wird das Protein durch die Taspase I in zwei Fragmente gespalten,

MLL^N und MLL^C. Die Prozessierung findet kurz nach der Translation statt. Es hat sich gezeigt, dass der N- und C-terminale Teil von MLL nach der proteolytischen Spaltung interagieren und einen Komplex bilden (Hsieh *et al.*, 2003). MLL^N enthält eine Domäne mit starken Homologien zu DNA-MTasen, und reprimiert die Genexpression. MLL^C hingegen zeigt starke Transkriptions-aktivierende Eigenschaften und besitzt intrinsische HMTase Aktivität (Yokoyama *et al.*, 2002).

1.6.1 Strukturelle Eigenschaften von MLL4

Das 2715Aminosäuren enthaltende MLL4-Protein mit einem Molekulargewicht von 293.330 Dalton ist eines der im Menschen vorkommenden fünf Isoformen des Enzyms und auf Chromosom 19 lokalisiert. Die postulierte proteolytische Schnittstelle ist konserviert und trägt die Sequenz G/DVDD. Die Spaltung durch Taspase I resultiert in N- und C-Terminalen Fragmenten. Eine nukleäre Lokalisation des Proteins ist für MLL4 nicht experimentell belegt. Da Sequenzvergleiche aber nukleäre Lokalisierungssequenzen aufgezeigt haben, kann die nukleäre Lokalisation auch hierfür angenommen. Der N-Terminus enthält vier zweigeteilte nukleäre Lokalisationssequenzen und drei AT-Hooks, die eine Bindung an DNA nahelegen. Ein Zink-Finger-Motiv und drei PHD-Domänen im N-terminalen Teil können Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Ausserdem enthält das N-terminale Fragment noch eine Bromodomäne zur potentiellen Bindung acetylierter Lysinreste (Abbildung 4).

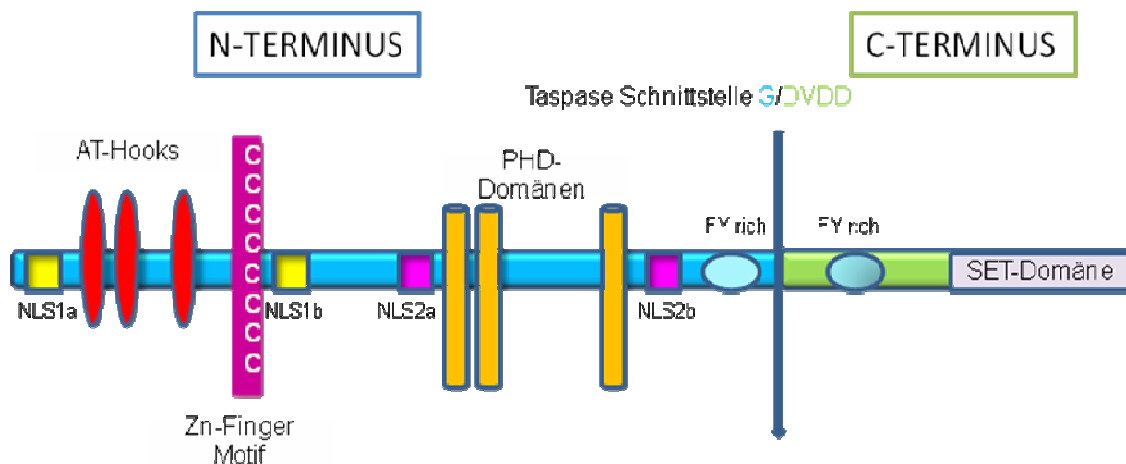


Abbildung 4: Schematische Darstellung des MLL4-Gens mit bekannten Strukturelementen und der postulierten Taspase-Schnittstelle. Alle Strukturelemente sind durch Sequenzvergleiche identifiziert worden. Der N-terminale Teil (blau) enthält die NL-Sequenzen (gelbe und violette Boxen), drei AT-Hooks (rot), ein Zn-Finger Motiv (violett) und drei PHD-Domänen (gelb). An der postulierten Taspase-Schnittstelle wird das Protein gespalten. Der C-terminale Teil enthält mit der SET-Domäne die HMTase-Aktivität. Der N- und C-terminale Teil enthalten jeweils eine FY-reiche Domäne (hellblau).

Der kleinere C-Terminale Teil von MLL4 mit 651 Aminosäuren bildet weniger strukturelle Elemente. Die SET-Domäne ist für die nachgewiesene HMTase-Aktivität von MLL4 verantwortlich. Ansonsten enthalten der N- und C-terminale Teil noch zwei F/Y-reiche Abschnitte die oft in Chromatin-assoziierten Proteinen vorkommen, deren Funktion aber noch unbekannt ist (Strukturvorhersagen durch Sequenzhomologien auf http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/protview?peptide=ENSP00000222270&db=core).

1.6.2 Enzymatische Aktivität und Zusammensetzung humaner MLL-Komplexe

Die enzymatische Aktivität der MLL-Proteine wird durch eine im C-terminalen Teil befindliche SET-Domäne vermittelt. Sie entfaltet sich aber nur in einem Proteinkomplex mit mehreren Untereinheiten. Ein solcher Komplex, Set1 oder auch COMPASS genannt, der für die Methylierung von Histon H3K4 verantwortlich ist, wurde zuerst aus Hefen isoliert (Roguev *et al.*, 2001). Daraufhin wurden viele Set1-ähnliche Komplexe im Menschen gefunden, die ebenfalls HMTase-Aktivität aufweisen. Die Komplexe enthalten stark konservierte Untereinheiten, die sich u.a. in dem Bestandteil unterscheiden, der die enzymtische Aktivität des Komplexes vermittelt. Dies sind Set1- und Trithorax-Homologe wie hSet1 oder MLL1, MLL2, MLL3 und MLL4. Der Kernkomplex mit den konservierten Untereinheiten hDPY-30, RbBP5, WDR5 und ASH2L (Abbildung 5) ist bei allen humanen Set1-ähnlichen HMTase-Komplexen gleich (Cho *et al.*, 2007).

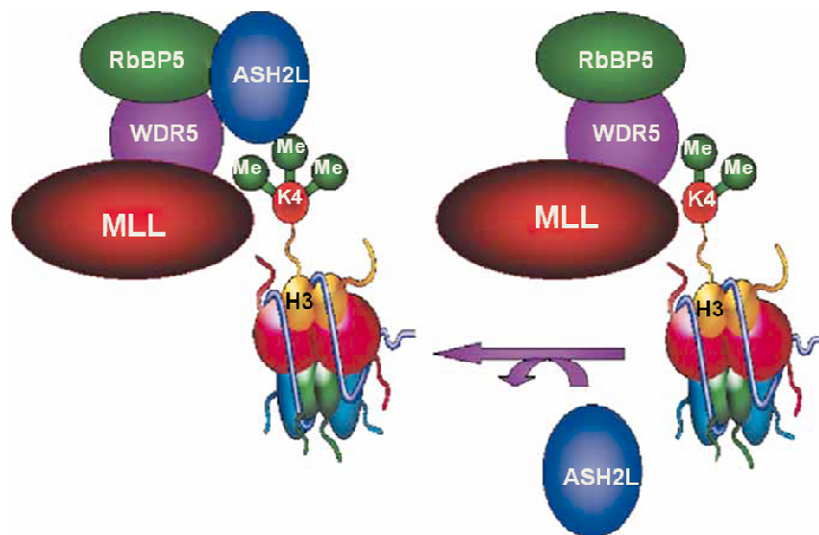


Abbildung 5: Mögliche Interaktionen von MLL mit den konservierten Komponenten RbBP5, WDR5 und ASH2L, und eine mögliche Regulation der H3K4-Trimethylierung durch ASH2L (aus Steward *et al.*, 2006).

WDR5 ist verantwortlich für die Substraterkennung- und Bindung. Eine kürzlich bestimmte Kristallstruktur von MLL1 im Komplex mit WDR5 und Histon H3 zeigt, dass Enzym und Substrat in die gleiche Bindungstasche von WDR5 binden. Das Modell postuliert eine WDR5-vermittelte Interaktion zwischen MLL und Histon H3 zur Regulation des Methylierungsstatus (Song & Kingston, 2008). RbBP5 bildet zusammen mit WDR5 die Bindungsplattform für MLL, bindet ASH2L, und ist essentiell für die Aktivität des Komplexes. ASH2L gehört zur Gruppe der Trithorax-Proteine und übt Funktionen in der Kontrolle der Genexpression aus. ASH2L ist für die enzymatische Aktivität des Komplexes nicht essentiell, und scheint lediglich als Modulator für den Methylierungsstatus des Substrats H3K4 zu fungieren. Vollständige Komplexe lieferten überwiegend Trimethyl-H3K4 während eine Verringerung des ASH2L-Anteils zu einer vermehrten Entstehung von Dimethyl-H3K4 führte (Steward *et al.*, 2006).

Die Substraterkennung durch WDR5 wird durch Modifikationen benachbarter Histon H3-Reste gestört. Die asymmetrische Dimethylierung von Arginin 2 (H3R2me2a), welche durch die humane Arginin-MTase PRMT6 ausgeführt wird, schließt die Bindung eines MLL4-ASH2-Komplexes und damit die Methylierung von H3K4 aus. Umgekehrt zeigten Chromatin-Studien die Abwesenheit von H3R2me2a in H3K4-trimethylierten, transkriptional aktiven Promotorregionen. Dies legt eine regulatorische Funktion des MLL4-ASH-Komplexes in der Transkriptionskontrolle nahe (Guccione *et al.*, 2007). Die Rekrutierung der HMT-Komplexe zu Promotoren zur transkriptionalen Aktivierung kann über die Bindung von ASH2L an Transkriptionsfaktoren erfolgen (Rampalli *et al.*, 2007). Insgesamt ist z.Z. aber nur unvollständig geklärt, wie MLL-Komplexe an spezifische Promotoren rekrutiert werden.

1.7 AdoMet und Analoga

AdoMet ist nach Adenosintriphosphat (ATP) der häufigste Cofaktor in Zellen und essentiell für das Wachstum von sowohl prokaryotischer als auch eukaryotischer Zellen. Er dient als der Methylgruppendonator für Enzyme, welche die Methylierung von DNA, RNA, Proteinen und kleinen Molekülen katalysieren (siehe 1.3). Neben der Methylierung wird AdoMet für weitere Stoffwechselwege, wie z.B. bei der Cystein-Biosynthese und der Polyamin-Synthese genutzt. Seine Rolle in diesen wichtigen biochemischen Stoffwechselwegen begründet sich durch das hoch energetische Sulfoniumzentrum, welches jedes der benachbarten C-Atome für einen nuklephilen Angriff aktiviert (Lu, 1999). In Zellen wird die AdoMet-Synthese durch die AdoMet-Synthetase katalysiert, welche den Adenosyl-Teil von ATP auf Methionin überträgt.

Durch das chirale Sulfoniumzentrum existiert AdoMet in zwei epimeren Formen, dem S- und R-AdoMet. Die Chiralität am Schwefel ist entscheidend für die biologische Aktivität. Das S-Epimer wird von der AdoMet-Synthetase gebildet und ist die biologisch aktive Form (Chiang *et al.*, 1996). Dagegen kann das R-Epimer als Inhibitor für MTasen wirken (Borchard *et al.*, 1976). Das bei der Methylgruppenübertragung entstehende AdoHcy, welches auch ein guter MTase-Inhibitor ist, wird in einer Folgereaktion zu Adenosin und Homocystein hydrolysiert. Letzteres kann zu Methionin methyliert und wieder in AdoMet eingebaut werden (Fontecave *et al.*, 2004).

Bei der Methylierung wird die aktivierte Methylgruppe auf nukleophile Zielpositionen, wie N-, C-, O- oder S-Atome verschiedenster Substrate, übertragen. Die Methylierung erfolgt über einen S_N2-ähnlichen Mechanismus, unter Inversion der Konfiguration eines AdoMet-Analogons mit chiraler Methylgruppe. Das Substrat und der Cofaktor AdoMet werden im Enzym gebunden und dadurch räumlich so positioniert, dass die Zielposition die aktivierte Methylgruppe nucleophil angreifen kann.

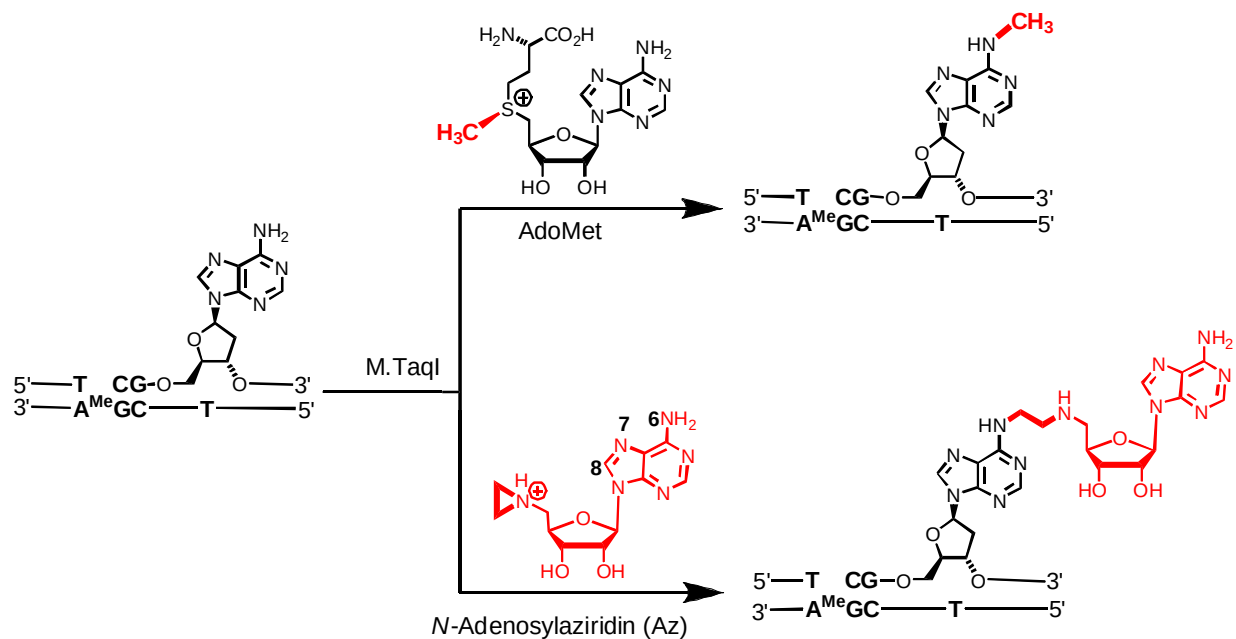
1.7.1 Synthetische Cofaktor-Analoga

Die Methylgruppen, die von den Protein-MTasen auf ihre Substrate übertragen werden, sind schwer zu detektieren. Hauptsächlich werden radioaktiv-markierte AdoMet-Analoga zur Bestimmung von Methylierungspositionen oder der spezifischen Aktivität der Enzyme eingesetzt. Die Methylgruppe kann mit ³H oder ¹⁴C markiert werden. Beide radioaktiven Isotope sind weiche, schwache β-Strahler. Sie lassen sich nicht sensitiv detektieren und müssen zur Verstärkung der Signale der Zerfälle z.B. in Szintillationsflüssigkeiten vermessen werden. Sowohl die Handhabung als auch die Funktionalität dieser Detektionsmethode ist nicht anwendungsfreundlich.

1.7.2 Aziridin-Cofaktor Analoga

Zur alternativen Markierung von Methylierungspositionen mit Reportermolekülen (z.B. Fluoreszenzmarkern) müssen diese, wie die Methylgruppe, sequenzspezifisch und kovalent mit dem Substrat verknüpft werden. Protein-MTasen z.B. erfüllen beide Voraussetzungen: Sie modifizieren ihre Substrate sequenzspezifisch und die Methylgruppe wird kovalent mit der Zielposition verknüpft. Zur Erkennung durch die Enzyme müssen die eingesetzten synthetischen Cofaktoren wichtige Strukturmerkmale des natürlichen Cofaktors beinhalten. Ein Beispiel dafür sind die zur sequenzspezifischen DNA-Markierung genutzten Aziridin-Cofaktoren. Anstelle des Sulfoniumzentrums und der Methylgruppe besitzen diese einen

Aziridin-Ring (Schema 4). So überträgt die DNA-Adenin-N6-MTase M.TaqI den synthetischen Cofaktor *N*-Adenosylaziridin (Az) auf das Zieladenin in ihrer Erkennungssequenz (Pignot *et al.*, 1998). Dabei findet ein nucleophiler Angriff auf eines der beiden aktivierten C-Atome des Aziridins statt. Dieser Angriff führt zur Öffnung des Aziridinringes und damit zur Kupplung des gesamten Cofaktors mit der Zielposition.



Schema 4: Sequenzspezifische Übertragung der Methylgruppe von AdoMet (oben) und Kupplung des Cofaktor-Analogons *N*-Adenosylaziridin (unten) innerhalb der 5'TCGA-3' DNA-Sequenz durch die DNA-MTase M.TaqI.

Da ein zusätzlicher Adeninchromophor innerhalb der DNA keine gute Reportergruppe darstellt, wurden verschiedene Fluorophore und Biotin mit unterschiedlichen Positionen des Adenin-Ringes verknüpft. Damit gelingt die Übertragung gut detektierbarer Reportergruppen auf die DNA. Sowohl ein Dansyl-modifizierter als auch ein mit Biotin-modifizierter Aziridin-Cofaktor kann von M.TaqI sequenzspezifisch mit kurzen DNA-Doppelsträngen und mit Plasmid-DNA gekuppelt werden (Plevaljic *et al.*, 2004). Diese Markierungsmethode ermöglicht es, die Anzahl und die Position der übertragenen Reportergruppen zu kontrollieren und ‚SMILing DNA‘ (*Sequence specific Methyltransferase Induced Labelling of DNA*) genannt. Das dabei entstehende Kupplungsprodukt aus den beiden Substraten bindet stark an die MTase. Deshalb bleiben die MTasen an der markierten Sequenz gebunden, und müssen zur vollständigen Markierung im stöchiometrischen Verhältnis in Bezug auf die

Erkennungssequenzen eingesetzt werden muss. Der ternäre Komplex aus Enzym, Cofaktor und Substrat muss zur Freisetzung der markierten DNA thermisch oder durch enzymatische Fragmentierung der Proteine zerstört werden. Dieser Umstand birgt auf der anderen Seite großes Potential zur Isolierung und Untersuchung der an ihre Substrate gebundenen MTasen.

1.7.3 AdoMet-Analoga mit Veränderungen der Methylgruppe

Die Aziridin-Cofaktoren sind synthetisch hergestellt worden. Schon lange aber sind enzymatische Methoden zur Herstellung von AdoMet-Derivaten bekannt. Die AdoMet-Synthetase kann Methionin-Analoga umsetzen und daraus die in Abbildung 6 gezeigten AdoMet-Analoga S-Adenosyl-L-ethionin (AdoEth) und S-Adenosyl-L-propionin (AdoProp) bilden (Schlenk *et al.* 1959; Schlenk & Dainko 1975).

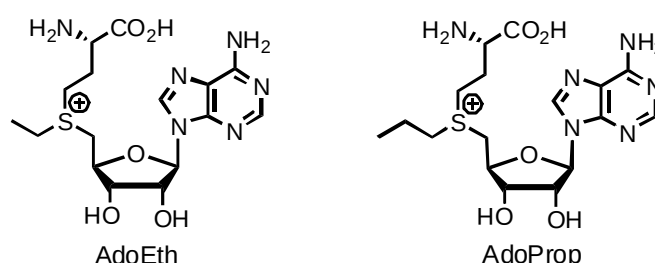
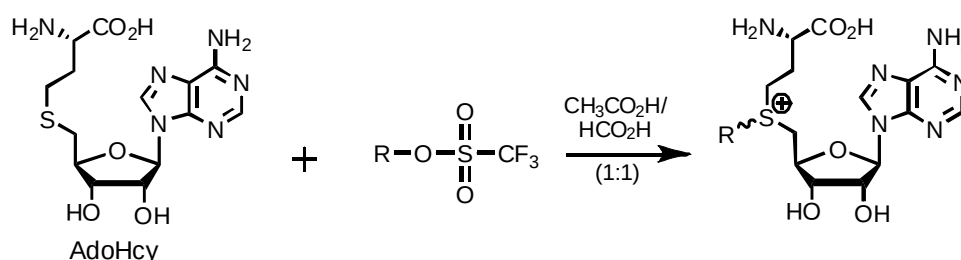


Abbildung 6: Strukturen der AdoMet-Analoga AdoEth und AdoProp. Sie unterscheiden sich vom natürlichen Cofaktor nur in der verlängerten, aktivierten Seitenkette.

Die chemische Synthese von AdoMet-Analoga mit Verlängerungen der aktivierten Seitenkette gelingt ausgehend von AdoHcy und einem Alkylierungsreagenz. Eine erfolgreiche Synthese von AdoEth und AdoProp gelang durch Verwendung entsprechend stark aktivierter Trifluormethylsulfonsäureester (Dalhoff, 2005).. Die Umsetzung erfolgt im sauren Milieu, wodurch alle nucleophilen Positionen in AdoHcy, ausser das Schwefelatom, protoniert und damit geschützt sind (Schema 5). So kann eine regioselektive Alkylierung des Schwefels erfolgen. Da die Alkylierung bezüglich des neu gebildeten Stereozentrums am Schwefelatom unselektiv ist, wird ein Epimerengemisch erhalten, dass anschließend mittels *RP*-HPLC aufgetrennt wurde.

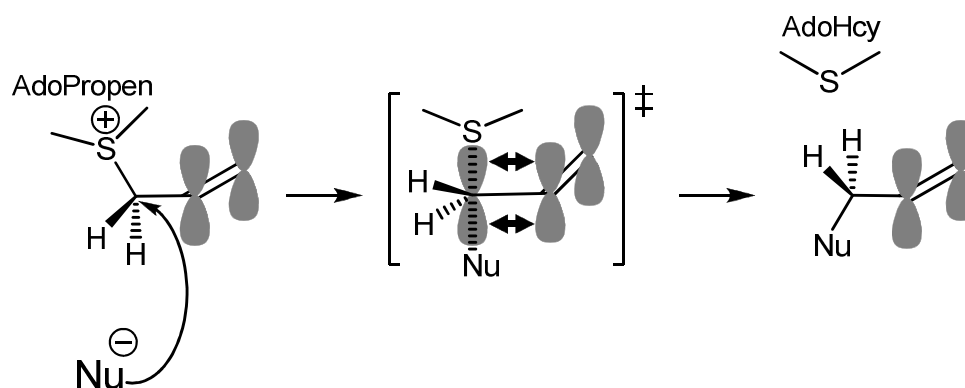


Schema 5: Chemische Synthese der Cofaktor-Analoga AdoEth und AdoProp mit verlängerten Seitenketten.

Die beiden Cofaktor-Analoga können von M.TaqI als Cofaktor genutzt werden und die verlängerte Seitenkette wird sequenzspezifisch auf Zielpositionen in der DNA übertragen. Leider ist die Aktivität der DNA-MTase mit diesen synthetischen Cofaktoren wesentlich geringer als mit AdoMet und sinkt zudem mit zunehmender Länge der Seitenkette (Dalhoff, 2005). Ein Grund hierfür ist der größere sterische Anspruch der längeren Seitenketten, der zu ungünstigeren sterischen Effekten im S_N2 -ähnlichen Übergangszustand der Alkylgruppenübertragung führt. Diesem Umstand soll mit der Einführung elektronisch aktivierter Seitenketten entgegengewirkt werden (Klimašauskas & Weinhold, 2007).

1.7.4 Doppelt aktivierte AdoMet-Analoga

Die aktivierende Wirkung der Seitenkette soll durch das Einführen ungesättigter C-Atome in Nachbarschaft zum Reaktionszentrum erzielt werden. Während der S_N2 -artigen Übertragungsreaktion entsteht am nucleophil-angegriffenen C-Atom ein trigonal bipyramidaler Übergangszustand. Es kommt zu einer Inversion der Konformation am angegriffenen C-Atom, und einer zwischenzeitlichen Umhybridisierung der Orbitale von sp^3 zu sp^2 (Schema 6). Das im Übergangszustand vorliegende p-Orbital kann mit den π -Orbitalen der benachbarten ungesättigten C-Atome in Wechselwirkung treten. Damit wird der Übergangszustand stabilisiert und die Übertragung erleichtert (Dalhoff *et. al.*, 2006 a). Aufgrund der zusätzlichen Aktivierung durch die Seitenkette werden diese Cofaktoren als doppelt aktiviert bezeichnet.



Schema 6: Vorgeschlagener Mechanismus für die konjugative Stabilisierung des Übergangszustandes bei der Übertragungsreaktion mit doppelt aktivierten AdoMet-Analoga.

Es wurde eine ganze Reihe nach diesem Prinzip aufgebauter AdoMet-Analoga hergestellt (Abbildung 7). Die Synthese erfolgte analog zu AdoEth und AdoProp ausgehend von AdoHcy und aktivierten Seitenketten in saurer Umgebung (Dalhoff *et al.*, 2006 b). Es wurden doppelt

oder dreifach ungesättigte Verbindungen und Aromaten eingesetzt, wobei die Lage der Mehrfachbindung im AdoMet-Analogon immer β -ständig zum Sulfoniumzentrum ist.

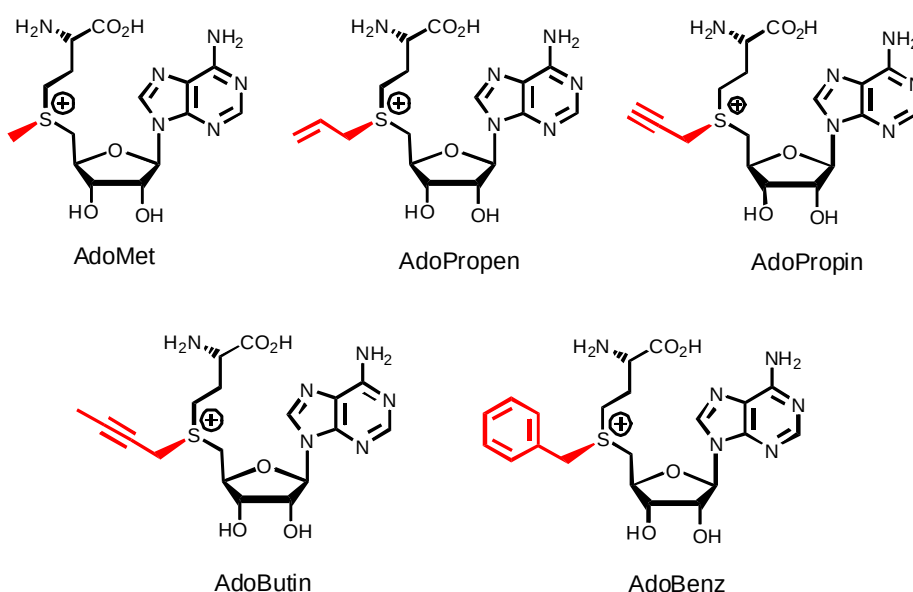
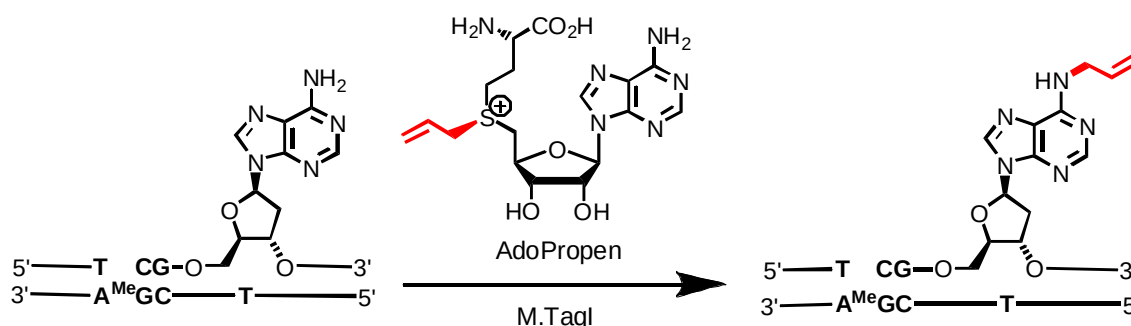


Abbildung 7: Strukturen einiger AdoMet-Analoga mit ungesättigten Seitenketten zur doppelten Aktivierung im Vergleich zu AdoMet. Zur doppelten Aktivierung können Doppelbindungen, Dreifachbindungen oder aromatische Systeme eingesetzt werden.

Die doppelt aktivierten AdoMet-Analoga AdoPropen und AdoButin wurden von der DNA-MTase M.TaqI als Cofaktoren akzeptiert (Schema 7). Das Enzym katalysiert die sequenzspezifische Übertragung der Seitenkette auf die Zielposition. Im Gegensatz zu den Aziridin-Cofaktoren verläuft Reaktion bei den doppelt aktivierten Cofaktoren katalytisch, d.h. das Enzym kann die Reaktionsprodukte freisetzen und steht für einen weiteren Katalysezyklus zur Verfügung.



Schema 7: Übertragung der verlängerten doppelt aktivierten Seitenketten von AdoPropen auf das Zieladenin in der Erkennungssequenz durch M.TaqI.

Ähnlich wie mit dem Cofaktor-Analogen Az stellt die Einführung einer chemischen Gruppe in ein Substrat noch keine gut detektierbare Markierung dar. Zu diesem Zweck ist die Verknüpfung mit einer Reportergruppe notwendig. Wegen der Größe von Reportergruppen sollen diese allerdings nicht direkt an die Seitenkette gebunden werden, da der sterische Anspruch an die Cofaktor-Bindungstaschen der Enzyme wohl sehr groß wäre. Vielmehr soll mit der verlängerten Seitenkette eine chemische Gruppe übertragen werden, die in einem zweiten Schritt mit einem entsprechend derivatisiertem Reportermolekül reagiert. DNA-Moleküle konnten mit diesem Zweistufen-System schon spezifisch mit einem Fluorophor markiert werden. Dabei überträgt eine DNA-MTase eine doppelt-aktivierte Seitenkette mit einer terminalen Aminogruppe auf die DNA, die im zweiten Schritt mit einem Amin-reaktiven Fluoreszenzfarbstoff verknüpft wurde (Lukinavicius *et al.*, 2007). Diese Markierungsmethode unter Anwendung der doppelt aktivierten Cofaktor-Analoga wurde mTAG (*methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups*) genannt. Mit Hilfe der doppelt aktivierten AdoMet Analoga können prinzipiell sehr viele funktionelle Gruppen enzymatisch übertragen werden. Damit stehen für eine nachträgliche chemische Markierung verschiedene Reaktionsmöglichkeiten zur Verfügung.

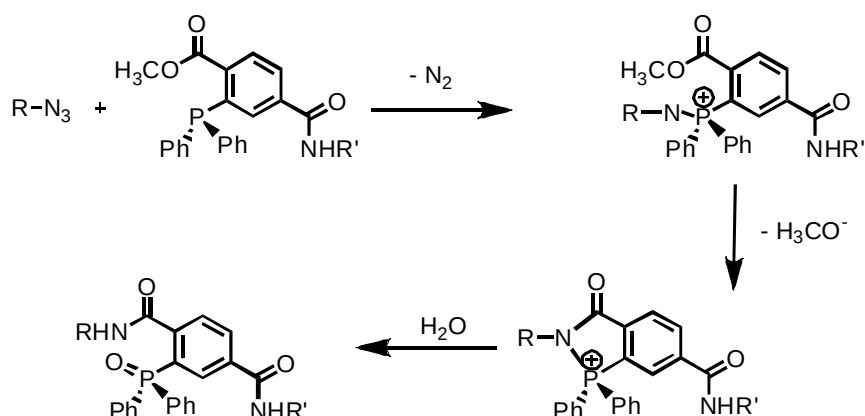
1.8 Chemische Reaktionen in biologischen Systemen

Um zelluläre Prozesse aufklären zu können, müssen Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung sichtbar gemacht, verfolgt, isoliert und identifiziert werden. Mit genetisch kodierten Markern wie dem *Green Fluorescent Protein* (GFP) lassen sich einzelne Protein verfolgen. Die Größe dieser Reportergruppe kann aber die Lokalisation und Funktion der Proteine stark beeinflussen. Diese Methode lässt sich auch nicht von Proteinen auf weitere Klassen von Biomolekülen, wie Lipide oder Nukleinsäuren, übertragen. In den letzten Jahren ist ein alternatives Konzept zur Markierung von Biomolekülen entstanden: Der bioorthogonale chemische Reporter (Prescher & Bertozzi, 2005). Eine bioorthogonale chemische Gruppe wird durch Nutzung zelleigener Stoffwechselwege in ein Biomolekül eingebaut. Anschließend wird der Reporter zugegeben und durch eine bioorthogonale Reaktion an die zuvor eingeführte chemische Gruppe gebunden.

1.8.1 Die Staudinger-Ligation

Die strukturelle Vielfalt und Reaktivität der funktionellen Gruppen in Biomolekülen machen selektive Reaktionen schwierig. Reaktionen, die in an Biomolekülen oder in biologischen Systemen in wässrigen Medien selektiv verlaufen, nennt man bioorthogonal. Dabei reagieren

funktionelle Gruppen, die gar nicht oder nur sehr selten in Biomolekülen vorkommen. Dazu gehört unter anderem die Azid-Gruppe. Aufgrund ihrer Reaktivität wird diese in unterschiedlichen bioorthogonalen Reaktionen eingesetzt (Köhn & Breinbauer, 2003). Eine der Reaktionen ist die von Saxon & Bertozzi (2000) für biologische Umgebungen eingeführte Staudinger-Ligation. Diese chemoselektive Ligation erfolgt durch die Reaktion eines Triarylphosphins mit einem Alkylazid (Schema 8). Nach Abspaltung von Stickstoff entsteht ein Aza-Ylid, welches sich intramolekular umlagert und nach Hydrolyse zur Bildung des Amid-verknüpften Produktes führt.



Schema 8: Mechanismus der Staudinger-Ligation zwischen einem Triarylphosphin und einem Azid zum Amid-verknüpften Produkt (aus Hang & Bertozzi, 2001).

Das bei dieser Reaktion entstehende abiotische Triarylphosphinoxid sollte wegen der Anwendung in biologischen Systemen entfernt werden (spurlose Staudinger Ligation). Durch Einsatz von Phosphinen mit übertragbaren Acyl-Gruppen konnten das über die Amid-Bindung verbundene Ligationsprodukt und freies Triarylphosphinoxid erhalten werden (Hang & Bertozzi, 2001).

Anwendungen dieser Methode fanden sich besonders in der Markierung von Glycoproteinen durch Verknüpfung biotinylierter Triarylphosphine mit biosynthetisch eingebauten Azidozuckern. Auch Proteine, die die nicht-natürlichen Aminosäure Azidohomoalanin mit dem zelleigenen Translationsapparat einbauen konnten, sind mittels der Staudinger-Ligation markiert worden (Saxon & Bertozzi, 2000; Kiick *et al.*, 2002).

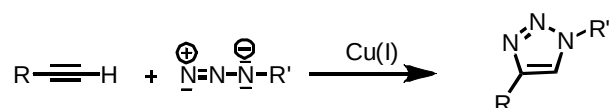
1.8.2 Click-Chemie

Weitere Ansätze zur Verknüpfung zweier Biomoleküle liefert die sogenannte Click-Chemie. Darunter werden Reaktionen zusammengefasst, die einfach und effizient verlaufen und dazu

mehrere weitere Kriterien erfüllen müssen. Sie müssen andere funktionelle Gruppen tolerieren, hohe Ausbeuten erzielen, in wässrigen Umgebungen ablaufen und die stabilen Produkte müssen einfach zu isolieren sein. Die gängigsten Beispiele hierfür sind Cycloadditionen mit ungesättigten Verbindungen, nucleophile Substitutionsreaktionen wie Ringöffnungen und Additionen an ungesättigte C-C Mehrfachbindungen (Kolb *et al.*, 2001). Die beliebteste Reaktion für Anwendungen in biologischen Systemen ist eine Cu(I)-katalysierte Variante der Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition, die weitläufig auch als ‚die‘ Click-Reaktion bezeichnet wird.

1.8.3 Die Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen Cycloaddition

Für die Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion ist im Gegensatz zur z.B. thermischen Reaktion ein terminales Alkin erforderlich. Es reagiert mit einem Azid zu einem disubstituierten Triazol (Schema 9).



Schema 9: Cu(I) katalysierte Reaktion eines terminalen Alkins mit einem Azid zu einem Triazol.

Bei der nicht-katalysierten Cycloaddition nach Huisgen entsteht eine 1:1 Mischung aus 1,4 und 1,5-disubstituierten Regioisomeren (Bock *et al.*, 2006). Die Cu(I)-Katalyse verläuft über einen Übergangszustand, der selektiv das 1,4-Regioisomer liefert (Tornøe *et al.*, 2002). Da Azide und terminale Alkine in biologischen Systemen nur sehr selten anzutreffen sind und die Reaktion in wässriger Umgebung abläuft, erfüllt die Click-Reaktion die Bedingungen einer bioorthogonalen Reaktion.

Das Kupfer wird meist als Cu(II)-Salz der Reaktion zugefügt, und die katalytisch aktive Cu(I)-Spezies *in situ* durch Reduktion, häufig mit Natriumascorbat, erzeugt. Diese ist aber instabil, und wird durch Luftsauerstoff reoxidiert oder disproportioniert zu Cu(II) und Cu(0). Mechanistische Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die entstehenden Triazole als reaktionsbeschleunigende Liganden für Cu(I) dienen könnten, da einige Click-Reaktionen autokatalytischen Charakter zeigen. Tris-(Benzyltriazolmethyl)amin (TBTA) ist besonders effektiv als aktivierender Ligand (Chan *et al.*, 2004). Seine geringe Löslichkeit in Wasser erfordert jedoch einen gewissen Anteil organischer Lösungsmittel im Reaktionsmedium, was im Gegensatz zu den für die Click-Chemie geforderten Kriterien steht. Aber auch andere, in Wasser lösliche Verbindungen wie tris-(Hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (TPTA) und Prolin wurden als Liganden für Cu(I) beschrieben (Chan *et al.*, 2004, Feldman *et al.*, 2004).

Thermische dipolare Cycloadditionen verlaufen nach einem konzertierten Reaktionsmechanismus. Für die Cu(I)-katalysierte Variante wird ein anderer Mechanismus vorgeschlagen. Die stufenweise erfolgende Cycloaddition wird durch eine monomere Cu(I)-Spezies katalysiert. (Rostovtsev *et al.*, 2002).

1.8.4 Die Click-Reaktion und ihre Anwendung in biologischen Systemen

Azide und Alkine sind in biologischen Umgebungen nahezu inert, sind aber als funktionelle Gruppen in organische Verbindungen leicht einführbar. Der Translationsapparat kann synthetische Aminosäuren wie z.B. Azidohomoalanin in Proteine einbauen. Die Azid-funktionalisierten Proteine können anschließend über die Click-Reaktion mit biologischen Reportern markiert werden. Dies kann an Zelloberflächen oder in Proteinlösungen durchgeführt werden (Link & Tirell, 2003). Auch Azid- oder Alkin-modifizierte Oberfläche von Viruspartikeln konnte mit Hilfe der Click-Reaktion Fluoreszenz-markiert werden (Wang *et al.*, 2003). Durch die Toxizität des Kupfers ist die Reaktion nicht *in vivo* anwendbar. Dynamische Prozesse können also *in vivo* nicht verfolgt werden. Zur Behebung dieses Nachteils entwickelte Bertozzi eine Alternative zur Kupferkatalyse. Durch Nutzen der Ringspannung können mit Cycloooktinen, den kleinsten der stabilen Cycloalkinen, bioorthogonale Markierungsreaktionen mit Aziden unter milden Bedingungen durchgeführt werden (Agard *et al.*, 2004). Die Reaktivität bezüglich der Azide ist allerdings geringer als bei der Cu(I)-katalysierten Variante. Zur Beschleunigung der Cu-freien Reaktion wurden zusätzlich elektronenziehende Gruppen an den Cycloooktin-Ring angebracht. Dadurch konnte die Reaktivität gegenüber Aziden deutlich gesteigert werden (Baskin *et al.*, 2007). Die neue Cu-freie Click-Reaktion erlaubt jetzt sogar das Verfolgen von Stoffwechselprodukten in lebenden Organismen über mehrere Entwicklungsstufen (Laughlin *et al.*, 2008).

2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit ist in drei Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der Auswahl und der Überprüfung von Protein-MTasen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Übertragung von funktionellen Gruppen unter Ausnutzung der Aziridin- und doppelt aktivierten synthetischen Cofaktoren. Die Proteinsubstrate der Enzyme sollen durch die Übertragungsreaktion sequenzspezifisch modifiziert werden. Dazu soll insbesondere die Histon-Lysin-MTase Dim-5 Beachtung finden. Bevor die Reaktion mit vollständigen Proteinen durchgeführt werden kann, soll ein Testsystem mit einem Substratpeptid entwickelt werden, wodurch der Umsatz der synthetischen Cofaktoren mit dem Enzym einfach analysierbar wird. Das kurze Peptid mit einer Erkennungssequenz für die entsprechende Protein-MTase beinhalten, diese Sequenz könnte später mit beliebigen Proteinen fusioniert werden, so dass Fusionsproteine durch MTasen und synthetische Cofaktoren chemisch funktionalisiert werden könnten.

Im zweiten Abschnitt soll eine geeignete biokompatible chemische Reaktion an der enzymatisch ins Substrat eingeführten funktionellen Gruppe gefunden werden. Zur Markierung von Proteinen soll dadurch ein Reporter eingebracht werden können. Das Reporter-Molekül kann z.B. ein beliebiger Fluorophor oder eine biologische Affinitätsgruppe sein. Die Markierungsreaktion soll zunächst mit dem modifizierten Peptid optimiert werden, bevor Histone als ganze Proteine markiert und detektiert werden können. Geeignete funktionalisierte Reporter für das Testsystem und die Proteinmarkierung müssen entworfen und synthetisiert werden. Die Analytik für beide Reaktionen muss definiert und optimiert werden.

Im dritten Abschnitt soll das Zwei-Stufen-Markierungssystem auf andere Protein-MTasen und neue Substrate angewandt werden. Ein beliebiges Protein soll mit einem Peptid-Tag versehen, mit der Protein-MTase Dim-5 und einem synthetischen Cofaktor modifiziert, und im zweiten Schritt markiert werden. Für die humane Protein-MTase MLL4 sollen durch spezifische Markierung unbekannter Substrate diese isoliert und identifiziert werden. Dazu soll die Methode von der Markierung gereinigter Proteine auf komplexe Proteingemische bis zu ganzen Zelllysaten erweitert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression und Reinigung der Variante Dim-5 Δ 17

Der *E.coli* Stamm BL21 DE3 Codon Plus RIL wird mit dem Expressionsvektor pGEX-2T Dim-5 Δ 17 transformiert. Das Enzym wird dann wie beschrieben exprimiert und gereinigt (Zhang *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wird keine weitere Variante verwendet, so dass die Variante Dim-5 Δ 17 im Weiteren kurz als Dim-5 bezeichnet wird. Nach der Affinitätsreinigung an einer Glutathion-Matrix wird das Fusionsprotein einer weiteren Reinigung durch Gelfiltration unterzogen. In Abbildung 8 ist ein typisches Coomassiegefärbtes SDS-Gel der Affinitätsreinigungsstufe dargestellt.

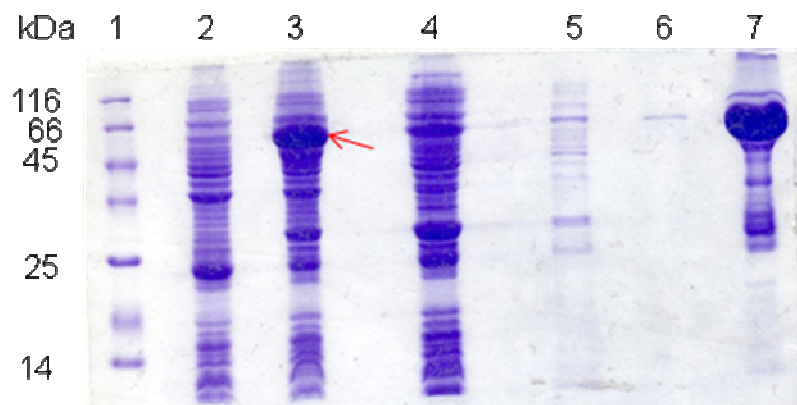


Abbildung 8: SDS-Gel der säulenchromatographischen Reinigung von Dim-5 aus *E.coli* Lysat an einer Glutathion-Matrix. Der rote Pfeil zeigt die Proteinbande der Dim-5. Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spur 2: nicht induzierte Probe; Spur 3: induzierte Probe; Spur 4: Durchlauf; Spur 5: Waschschrift I; Spur 6: Waschschrift II; Spur 7: Elution mit Glutathion.

Wie sich an der intensiven Bande der induzierten Probe in Spur 3 erkennen lässt, wird das Protein gut exprimiert. Die Bande ist in der nicht induzierten Probe (Spur 2) kaum ersichtlich. Die erhaltene Bande läuft kurz unterhalb der 66.2 kDa Markerbande (Spur 1), was dem berechneten Molekulargewicht von 60 kDa etwa entspricht. Das Gesamtmolekulargewicht ergibt sich aus der Dim-5, mit einem Molekulargewicht von 34 kDa, und dem GST-Tag mit 26 kDa. Anders als von Zhang *et al.* (2002) beschrieben wird der GST-Tag am Protein belassen, da der Verdau mit der Protease Faktor Xa nicht vollständig erschien und auch das Fusionsprotein gute Aktivität zeigt. Da das Eluat von der Glutathion-Säule noch erhebliche Mengen an Protein-Verunreinigungen enthält, wird es einer zweiten Reinigungsstufe mit einer Superdex 75 Gelfiltrationssäule unterzogen (Abbildung 9).

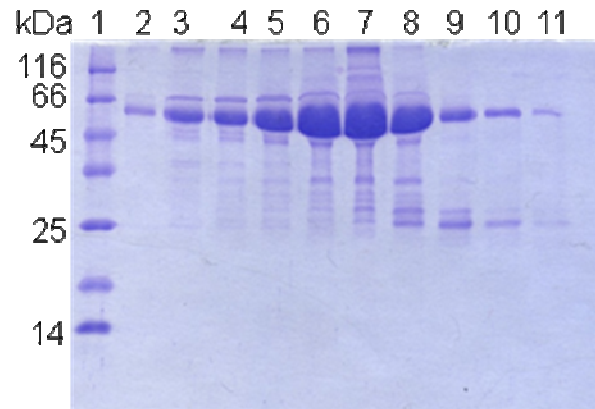


Abbildung 9: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Dim-5 enthaltenden Fraktionen nach Superdex 75 Gelfiltration des Eluats der Glutathion-Säule. Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spuren 2-11: Dim-5 enthaltende Fraktionen nach Gelfiltration.

Die Dim-5 enthaltenden Fraktionen weisen nach der Gelfiltration deutlich weniger Protein-Verunreinigungen auf als das Eluat der Glutathion-Säule. Die ersten Fraktionen enthalten überwiegend Verunreinigungen im hochmolekularen Bereich, und in den späteren Fraktionen nehmen niedermolekulare Verunreinigungen zu. Die Fraktionen werden diesem Umstand entsprechend getrennt aufgeteilt und eingefroren. Aus fünf Litern *E.coli*-Zellkultur werden 10–13 mg Enzym gewonnen (nach Bradford bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ und UV-Messung mit $\epsilon^{280} = 96.322,5 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ϵ berechnet auf www.expasy.org/tools/protparam.html).

3.2 Aktivitätsbestimmung von Dim-5 in radioaktiven Methylierungsassays

3.2.1 Aktivität mit Histon Oktamer

Die gereinigte Protein-MTase Dim-5 soll zunächst mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet in radioaktiven Methylierungsassays auf ihre Aktivität hin untersucht werden. Hierzu wird in Anlehnung an ähnliche Untersuchungen Histon-Oktamer aus Kalbsthymus als Substrat eingesetzt (Zhang *et al.*, 2003). Die Reaktionen werden mit radioaktiv-markiertem AdoMet (S-(5'-Adenosyl)-L-[methyl- ^3H]-methionin, ^3H -AdoMet) als Cofaktor durchgeführt. Direkt nach Mischen des Reaktionsansatzes wird ein Startwert genommen und durch Auftropfen auf einen P81 Whatman-Filter wird die Reaktion gequencht. Auf die gleiche Weise werden Proben nach unterschiedlichen Zeitintervallen erhalten. Überschüssiges ^3H -AdoMet wird durch Waschen mit einem 200 mM Na_2CO_3 -Puffer entfernt, so dass die in Proteine eingebaute Radioaktivität durch Szintillations-Zählung bestimmt werden kann. Kontrollen ohne Enzym (KI) bzw. ohne Substrat (KII) dienen zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrundes. Schon der Startwert R 0 zeigt eine erhöhte Aktivität gegenüber den Kontrollen KI 0 und KII 0 (Abbildung 10). Nach 30 Minuten kann eine sehr gute Aktivität des Enzyms mit dem Gesamt-Histon gemessen werden, während für die Kontrollen nur Hintergrundaktivität messbar ist.

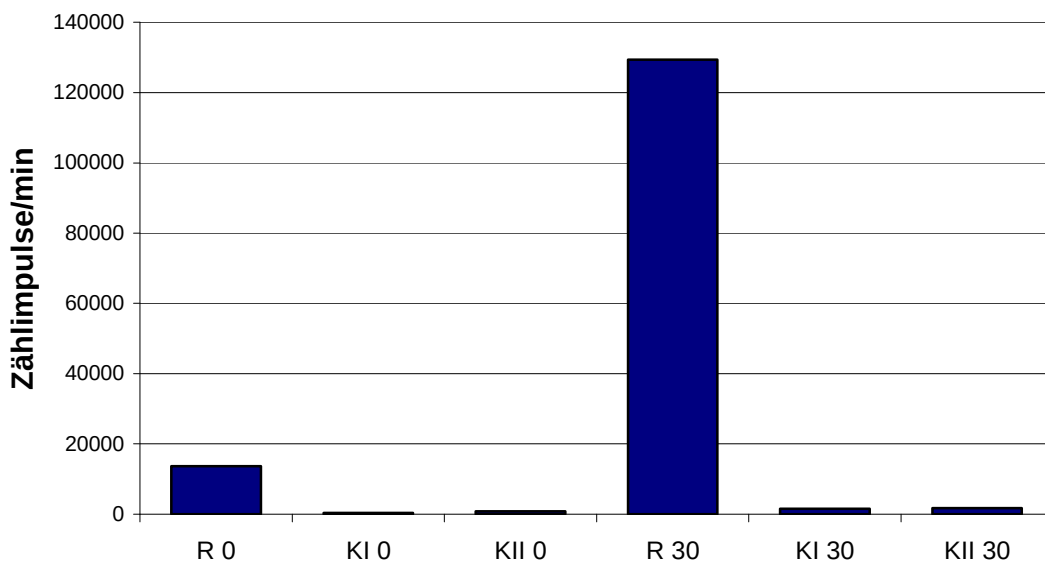


Abbildung 10: Aktivität von Dim-5 mit AdoMet und tritiiertem AdoMet mit Kalbsthymus-Histon. Die 0-Werte entsprechen den Startwerten, die Reaktionszeit beträgt 30 min

KI: Kontrolle ohne Enzym; KII: Kontrolle ohne Substrat; R: Reaktion mit Substrat und Enzym.

Reaktionsbedingungen: 0.8 μM Dim-5, 11 μM Histon H 2454, 50 μM AdoMet, 0.45 μM tritiiertes AdoMet in Dim-Reaktionspuffer (50 mM Glycin, 2 mM DTT, pH 9.8).

3.2.2 Aktivität mit dem Fluorescein-Histonpeptid

Zur vereinfachten Durchführung von Testreaktionen des Modifikations- und Markierungssystems wird statt des natürlichen Substrats Histon H3 zunächst ein Peptid eingesetzt. Dieses Peptid mit der Sequenz ARTKQTARKSTGGKA, enthält die ersten fünfzehn Aminosäuren von Histon H3 mit der Zielposition Lysin9 (K9), die von Dim-5 spezifisch modifiziert wird. In der Kristallstruktur der Dim-5 mit AdoHcy sind vom Substrat nur wenige Aminosäuren aufgelöst (Positionen 7-12). Aktivitätsuntersuchungen haben aber gezeigt, dass das Enzym mit dem 15mer-Peptid aktiver ist als mit Peptiden, die die Aminosäurereste 1-13 oder 5-15 enthalten. Offensichtlich sind die außen liegenden Aminosäurereste wichtig für Wechselwirkungen mit dem Enzym und zur Substraterkennung (Zhang *et al.*, 2003). Deswegen wird das 15mer als Substratpeptid gewählt. Mit diesem Peptid könnten auch K4-spezifische KMTs untersucht werden. Da die Peptidsequenz nicht UV-aktiv ist, wird Fluorescein als Reporter an den N-Terminus gebunden (Abbildung 11). Die Fluoreszenz kann mit einem Fluoreszenz-Detektor während HPLC-Läufen verfolgt werden. Im Folgenden soll überprüft werden, ob das synthetische Peptid als Substrat von Dim-5 genutzt werden kann.

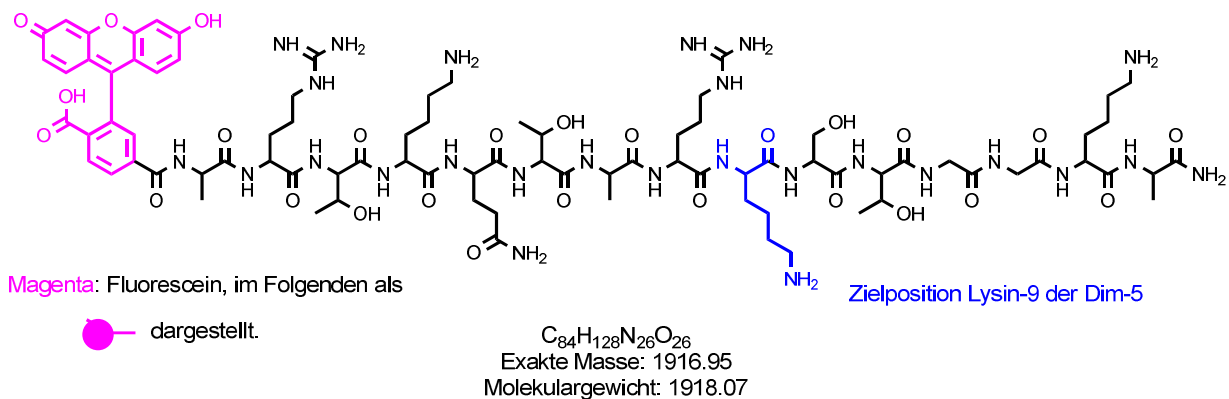


Abbildung 11: Strukturformel des 15mer Histonpeptids. In magenta ist der N-terminal gebundene Fluoresceinrest dargestellt, in blau die Aminosäure K9, welche sequenzspezifisch von Dim-5 modifiziert wird.

Um das Peptid analog zum Histon-Oktamer nutzen zu können, muss die Ausführung des radioaktiven Aktivitätstests mit den P81 Filtern optimiert werden. Der Waschpuffer hat mit 200 mM einen für diese Anwendung zu hohen Salzgehalt, und führt dazu, dass das Peptid von den Filtern gewaschen wird. Ein Waschschriff mit einem weniger konzentrierten Waschpuffer von 50 mM Salzkonzentration belässt das Peptid auf dem Filter und wäscht überschüssigen (radioaktiven) Cofaktor weg.

3.2.3 Aktivität von Dim-5 bei verschiedenen pH-Werten

Weitere Funktionsstudien beschreiben Dim-5 als salzempfindliches Enzym, das auch nur in einem eingeschränkten pH-Bereich aktiv ist (Zhang *et al.*, 2002). Um diese Eigenschaften für das neue Substrat zu überprüfen, wird die Aktivität der Dim-5 mit AdoMet bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Bei pH-Werten von 7.5 – 8.5 ist Dim-5 aktiv und es treten im Rahmen der Messgenauigkeit kaum Unterschiede auf. Im Vergleich zur Reaktion beim optimalen pH-Wert von 9.8 beträgt die Aktivität bei allen übrigen pH-Werten allerdings nur ca. 50% (Abbildung 12).

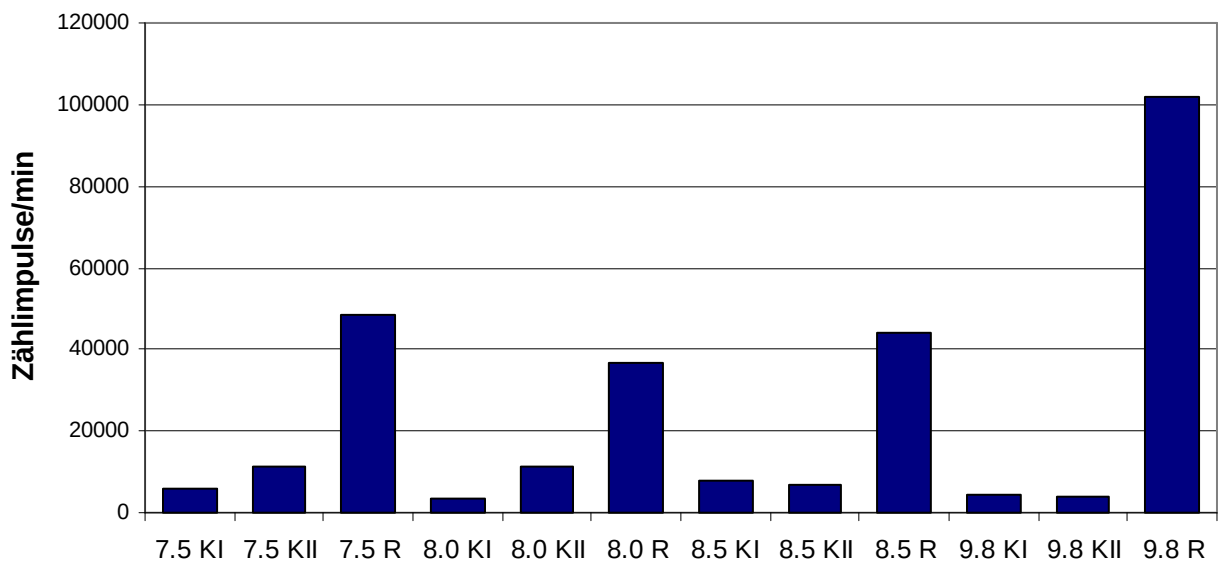


Abbildung 12: Aktivität von Dim-5 mit AdoMet und tritiiertem AdoMet bei verschiedenen pH-Werten auf dem synthetischen Peptid. Dargestellt sind die Reaktionswerte nach 20 min.

KI: Kontrolle ohne Enzym; KII: Kontrolle ohne Substrat; R: Reaktion mit Enzym und Substrat.

Reaktionsbedingungen: 0.8 μM Dim-5; 5 μM Peptid; 50 μM AdoMet; 0.45 μM tritiiertes AdoMet. Reaktionspuffer für pH 7.5 – 8.5: 50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT; Reaktionspuffer für pH 9.8: 50 mM Glycin, 2 mM DTT.

Für Dim-5 wurde mit einem 20mer-Histonpeptid ein k_{cat} -Wert von 2.3 min^{-1} bestimmt (Gowher *et al.*, 2005). Im Verhältnis zu anderen Lysin-spezifischen MTasen, deren k_{cat} -Werte unter 1 min^{-1} liegen, oder Enzymen die nur einige Umsätze pro Stunde aufweisen (Trievel 2004, Chin *et al.*, 2006), ist die Aktivität der Dim-5 sehr hoch. Dadurch eignet sie sich gut zur Aufstellung eines Testsystems mit den synthetischen Cofaktoren.

3.3 Untersuchung der Dim-5 mit Cofaktor-Analoga

3.3.1 Aziridin-Cofaktoren

Zunächst soll eine mögliche Kupplung von Aziridin-Cofaktoren an die ϵ -Aminogruppe von K9 des Testpeptids durch Dim-5 untersucht werden. Die Analyse der Testansätze durch HPLC auf einer C-18 *reversed-phase* (RP) Säule durchgeführt. Das Peptid wird durch das N-terminal gebundene Fluorescein detektiert. Da der HPLC-Laufpuffer einen sauren pH-Wert aufweist (pH 2.0) muss die Wellenlänge für die Excitation angepasst werden. Im Basischen liegt das Absorptionsmaximum von Fluorescein bei $\lambda = 485$ nm und verschiebt sich im Sauren zu $\lambda = 440$ nm (UV-Messungen). Dagegen verschiebt sich das Emissionsmaximum im Sauren nicht und liegt weiterhin bei $\lambda = 510$ nm.

Dim-5 wird mit den Cofaktor-Analoga *N*-Adenosylaziridin (Az) und biotinyliertem Az-Cofaktor (6BAz, Abbildung 13) bei pH 9.8 getestet.

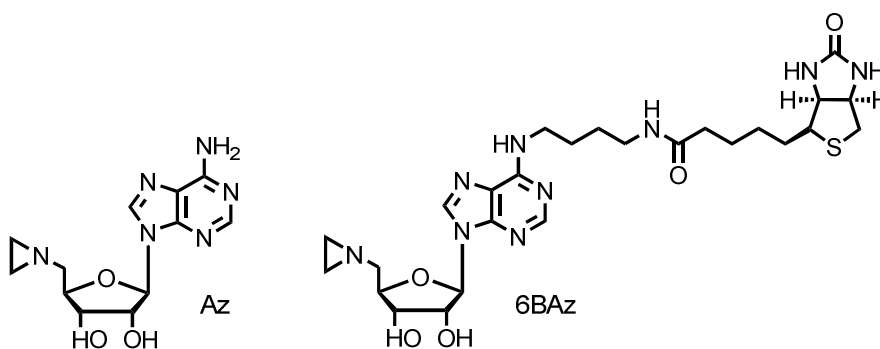


Abbildung 13: Strukturen der Cofaktor-Analoga Aziridin (Az) und N6-Biotin-Aziridin (6BAz).

Da die Cofaktoren die Polarität des Peptids deutlich senken sollten, wird eine Elution von modifizierten Peptiden bei größeren Retentionszeiten erwartet. Es können jedoch keine Kupplungsprodukte der Cofaktor-Analoga mit dem Peptid festgestellt werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich im basischen pH-Wert von 9.8. Dieser bietet für das Enzym optimale Bedingungen, aber der Aziridin-Stickstoff ist deprotoniert (erwarteter $pK_a \sim 8$). Dadurch sind die beiden C-Atome des Aziridin-Ringes für einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe von K9 nicht aktiviert. Daraufhin wird der pH-Wert der Reaktionen schrittweise gesenkt. Obwohl in den Radioaktivassays gezeigt wurde, dass Dim-5 auch bei pH 7.5 aktiv ist, fand hier ebenfalls keine Übertragung der Cofaktoren statt. Dieser Umstand ist nicht nur den divergenten pH-Optima zuzuschreiben, sondern könnte auch im Fall von 6BAz auf eine zusätzliche sterische Hinderung im aktiven Zentrum des Enzyms hindeuten.

3.3.2 Bindungstests mit potentiellen Protein-MTase Inhibitoren

Zum besseren Verständnis der Cofaktorbinding von Dim-5 sollen Funktionsstudien mit AdoMet-ähnlichen Verbindungen, die Modifikationen am Adenin-Ring oder am Aminosäureteil beinhalten, durchgeführt werden. In der Arbeitsgruppe Weinhold sind verschiedene Verbindungen synthetisiert worden, die als Inhibitoren für DNA-MTasen eingesetzt werden sollten (Abbildung 14). Um festzustellen, ob diese Verbindungen einen Inhibitor für die Protein-Methylierungsreaktion durch Dim-5 darstellen können, wird die Bindungsfähigkeit an Dim-5 durch kompetitive Hemmung der Methyltransfer-Reaktion in radioaktiven Methylierungsassays getestet. Die Verbindungen werden im Vergleich zu AdoMet im Überschuss eingesetzt. Wird die Methylierungsreaktion gehemmt, so ist es wahrscheinlich, dass die Verbindungen im aktiven Zentrum des Enzyms mit dem natürlichen Cofaktor um die Bindungsstelle konkurrieren.

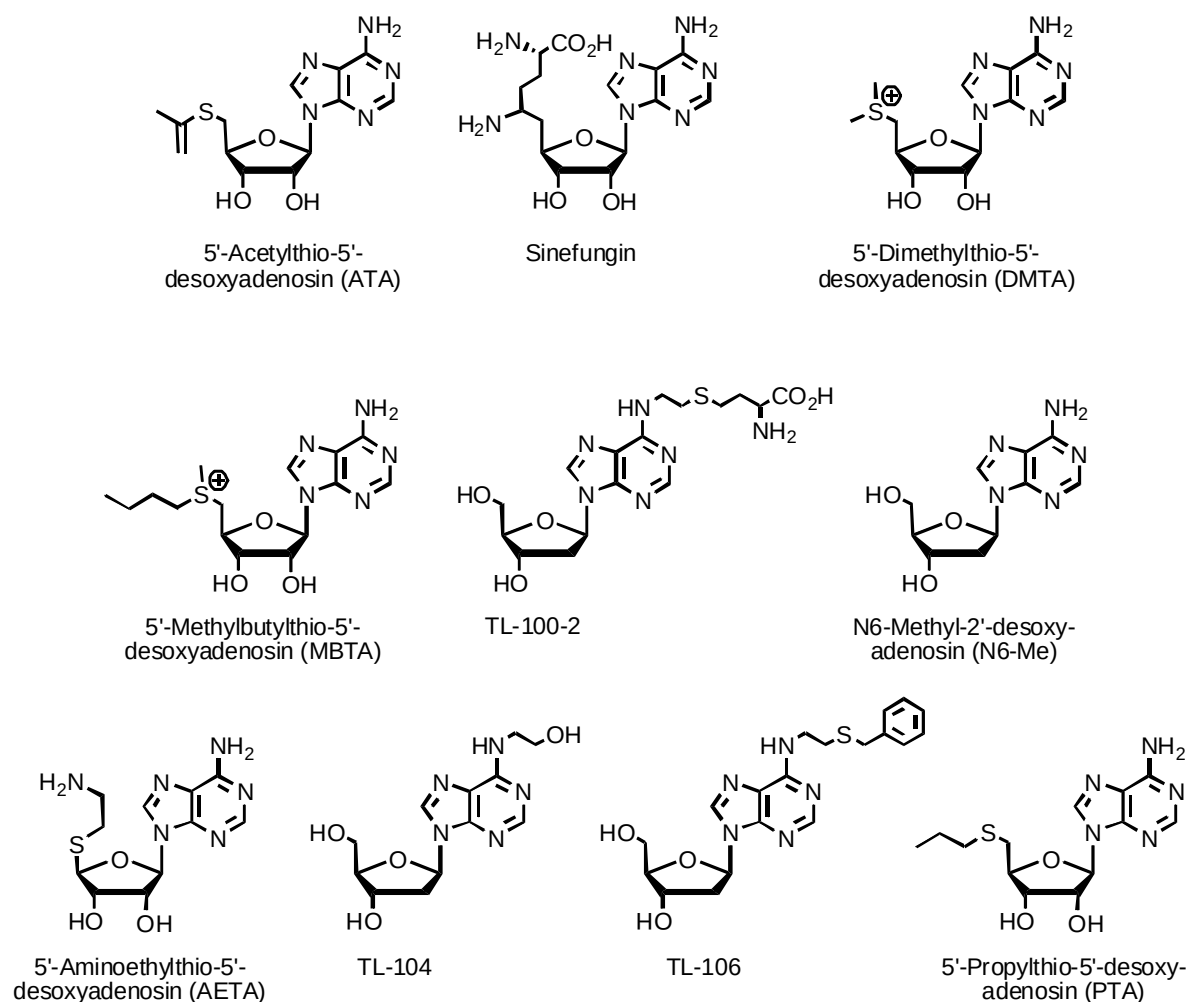


Abbildung 14: Strukturen der im Inhibitionstest eingesetzten Verbindungen

Die Verbindungen sind von dem natürlichen Cofaktor AdoMet abgeleitet. Sinefungin ist außerdem als DNA-MTase-Inhibitor beschrieben (Schluckebier *et al.*, 1997). Durch das weitgehende Beibehalten des Cofaktor-Grundgerüsts mit der Ribose- und Adeninstruktur sollen ähnlich gute Bindungseigenschaften wie mit AdoMet oder AdoHcy erzielt werden. Wenn ein Inhibitor mit Modifikationen an der N6-Position oder einer veränderten Aminosäure-Seitenkette im Enzym bindet, so können zusätzlich zur vorliegenden Röntgenkristallstruktur Rückschlüsse über Platzverhältnisse und Ausrichtung der Bindungstasche der Dim-5 geschlossen werden. Diese Informationen können dann auch beim Design neuer Cofaktor-Analoga Anwendung finden.

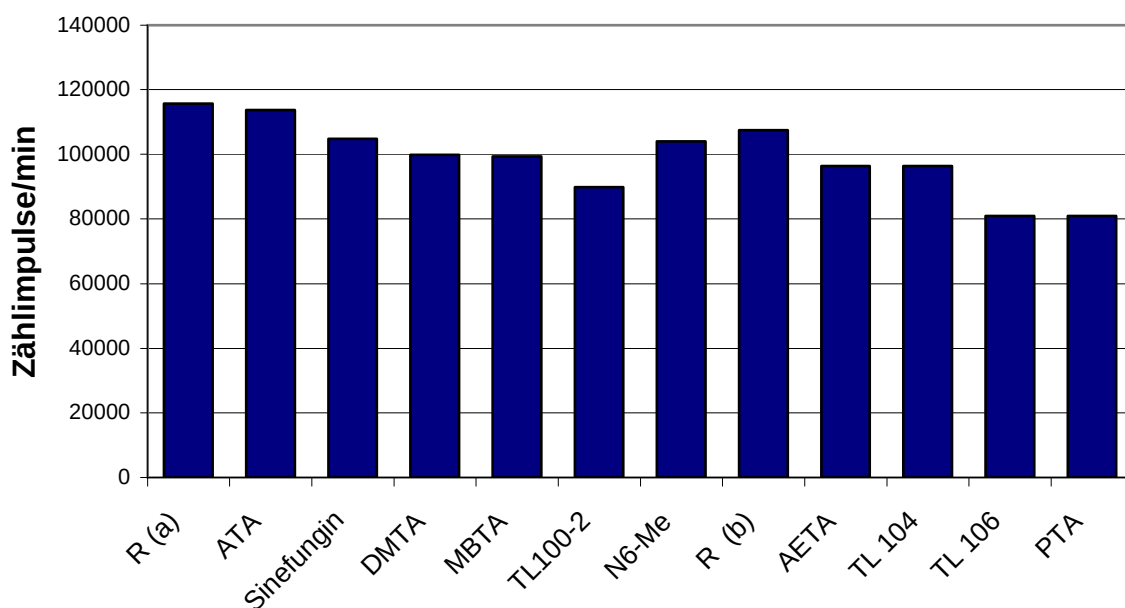


Abbildung 15: Inhibition der Methylierung mit Dim-5 und AdoMet durch Einsatz von Adenosin-Derivaten. R(a) = Vergleichsreaktion für die Inhibitoren ATA–N6-Me; R(b): Vergleichsreaktion für Inhibitoren AETA – PTA. Reaktionsbedingungen: 0.8 μ M Dim-5, 5 μ M Peptid, 10 μ M AdoMet, 0.45 μ M tritiiertes AdoMet, Inhibitoren jeweils 160 μ M in Dim-5 Reaktionspuffer pH 9.8, 20 min bei RT.

Wie in Abbildung 15 gezeigt, hat keine der Verbindungen eine deutliche Auswirkung auf die Methylierungsgeschwindigkeit. Auch Sinefungin zeigt trotz beschriebener Wirkung auf DNA-MTasen keinen Effekt auf Dim-5. Im Vergleich zur Kontrollreaktion (R(a)) ohne Inhibitor ist mit Zusatz von TL100-2 eine Verringerung des Umsatzes um ca. 20% erkennbar. TL106 und PTA (hier Kontrollreaktion R(b)) können wie TL100-2 die Methylierung um ca. 20% senken. Da keine Verbindung eine deutliche Unterdrückung der Methylierungsreaktion hervorruft, werden keine weiteren Tests mit ähnlich strukturierten Verbindungen durchgeführt.

Das Testen der Aziridin-Cofaktoren im kompetitiven Methylierungsassay werden nicht angestrebt, da die Übertragungsreaktion unter den pH-Vorgaben der MTase chemisch nicht möglich sein sollte. Stattdessen werden in einem weiteren Kompetitionsassay die Bindungsfähigkeit von doppelt aktivierten Cofaktoren getestet, da diese pH-Wert unabhängig eingesetzt werden können (Abbildung 16). Diese Verbindungen werden im Vergleich zu AdoHcy getestet, welches ein guter Inhibitor ist. AdoHcy geht als Reaktionsprodukt bei der Methylierung hervor und ist sowohl für DNA- als auch für Protein-MTasen der natürliche Inhibitor der Methyltransferasereaktion (Produktinhibition).

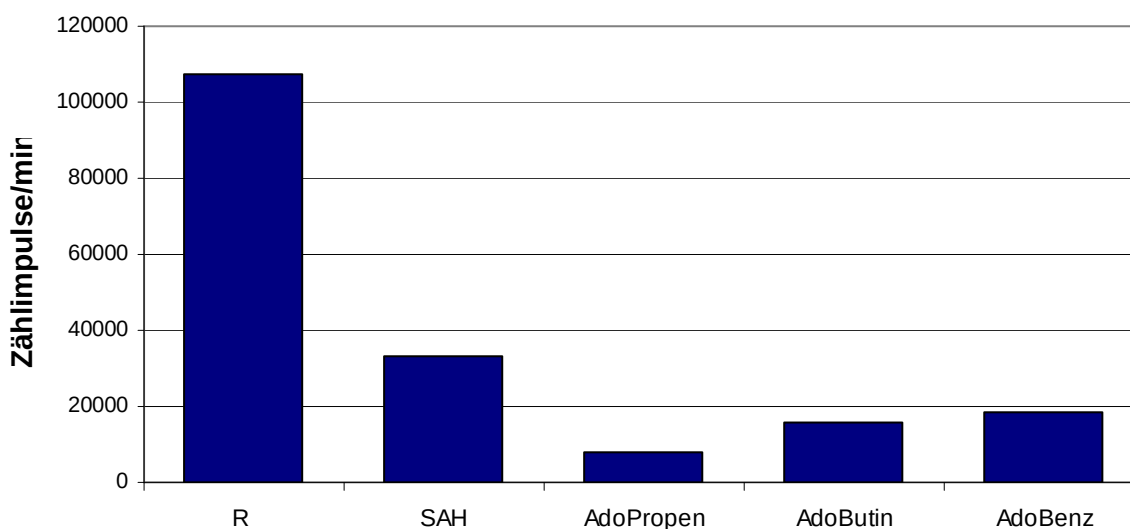


Abbildung 16: Inhibition der Methylierung mit Dim-5 und AdoMet durch Einsatz der doppelt aktivierten Cofaktoren AdoPropen und AdoButin und AdoBenz im Vergleich zu AdoHcy.

Reaktionsbedingungen: 0.8 μM Dim-5, 5 μM Peptid, 10 μM AdoMet, 0.45 μM tritiiertes AdoMet, Inhibitoren jeweils 160 μM in Dim-5 Reaktionspuffer pH 9.8, 20 min bei RT

Der Einsatz der doppelt aktivierten Cofaktoren bewirkt eine deutliche Verringerung der Methylgruppenübertragung. Alle Verbindungen inhibieren stärker als AdoHcy, d.h. sie zeigen auch eine bessere Bindung. AdoPropen hemmt die Reaktion mit ca. 80% am stärksten. Diese sehr guten Bindungseigenschaften zeigen, dass die Verbindungen potentiell auch als Cofaktoren für Dim-5 fundieren könnten. Für die Übertragungsreaktion mit AdoPropen und AdoButin muss nur die Positionierung der Seitenketten im Enzym die für die doppelte Aktivierung nötige Konformation zeigen.

3.4 Transferase-Aktivität der Dim-5 mit doppelt aktivierter Cofaktoren

3.4.1 Aktivität von Dim-5 mit AdoPropen

AdoPropen zeigt im Inhibitionsversuch die beste Bindung und wird als erstes Cofaktor-Analogon mit Dim-5 untersucht (Abbildung 17). Das Enzym wird stöchiometrisch zum Substrat (50 μM) eingesetzt. Nach verschiedenen Zeitintervallen wird der Reaktion Aliquot entnommen und mittels *RP*-HPLC analysiert. Für ein gut detektierbares Signal werden pro Lauf 5 pmol Peptid auf die Säule aufgebracht. Die kleine Allylgruppe bewirkt nur eine geringe Abnahme der Polarität des Testpeptids. Zur Trennung von Produkt und Edukt war deswegen die Erstellung eines optimalen Stufengradienten notwendig.

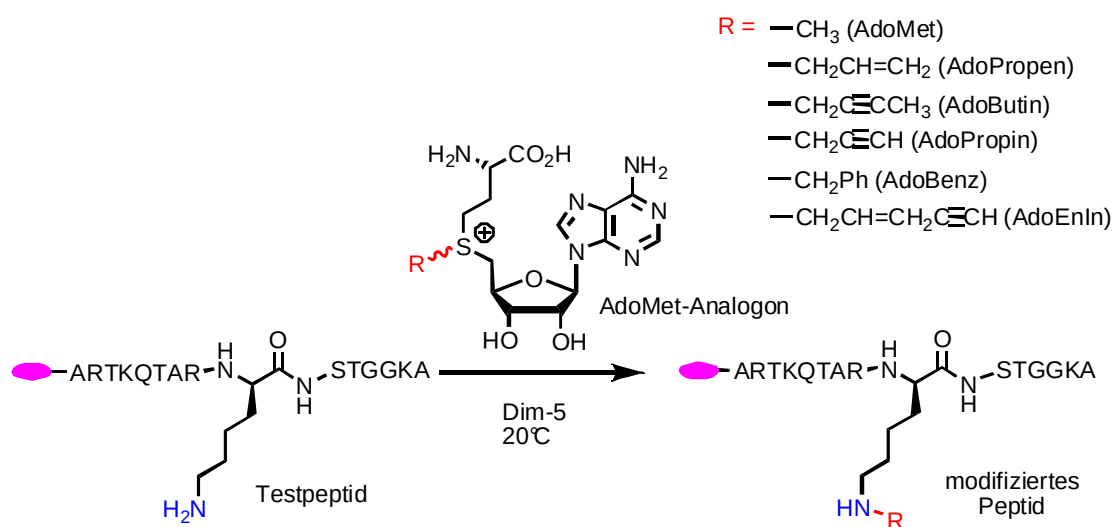


Abbildung 17: Modifikation des Lysin 9 (K9) mit Dim-5 doppelt aktivierten AdoMet Analoga. magenta: Fluorescein, blau: K9, rot: zu übertragende Seitenkette.

Das alkylierte Peptid eluiert mit einer größeren Retentionszeit (Abbildung 18). Dim-5 konnte also AdoPropen als Cofaktor nutzen und die Allylgruppe auf das Peptid übertragen. Die Reaktion mit AdoPropen verläuft mit stöchiometrischen Mengen Enzym sehr schnell. Beim ersten Stundenwert ist bereits kompletter Umsatz zu beobachten. Nähere Untersuchungen zeigen, dass die Reaktion schon nach wenigen Minuten zu einem Großteil abgelaufen ist. Nach höchstens 30 min ist der Umsatz quantitativ. Daraufhin wird die Konzentration des Enzyms gesenkt. Abbildung x zeigt die Übertragung der Seitenkette von AdoPropen auf das Testpeptid unter stöchiometrischen und katalytischen Bedingungen.

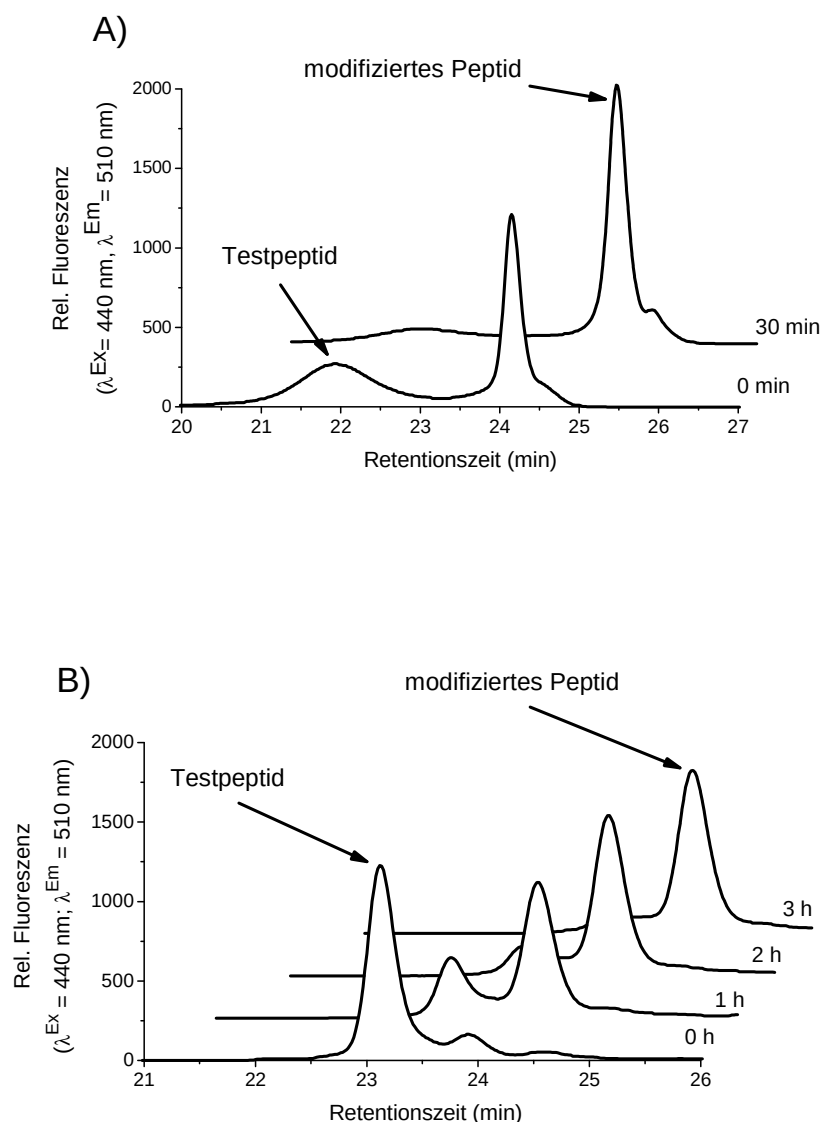


Abbildung 18: HPLC-Analyse der Umsetzung von AdoPropen mit dem Testpeptid durch Dim-5 nach verschiedenen Reaktionszeiten A) Stöchiometrischer Transfer der Propenyl-Seitenkette durch Dim-5 (je 50 μM). B) Katalytischer Transfer der Propenyl-Seitenkette durch Dim-5 auf das Peptid im Verhältnis 1:10. In den Chromatogrammen treten keine weiteren Signale auf. 300 μM (S)- AdoPropen in Dim-Reaktionspuffer pH 9.8.

Bei einer Enzymkonzentration von 5 μM und einer Peptidkonzentration von 50 μM (Abbildung B) wird nach 3 h vollständiger Umsatz erreicht. Das Propen-modifizierte Peptid wird massenspektrometrisch durch *Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry* (LC-ESI MS) analysiert. Als Kontrollen werden zusätzlich nicht-modifiziertes

und trimethyliertes Peptid vermessen. Abbildung 19 zeigt das Massenspektrum des Propen-modifizierten Peptids.

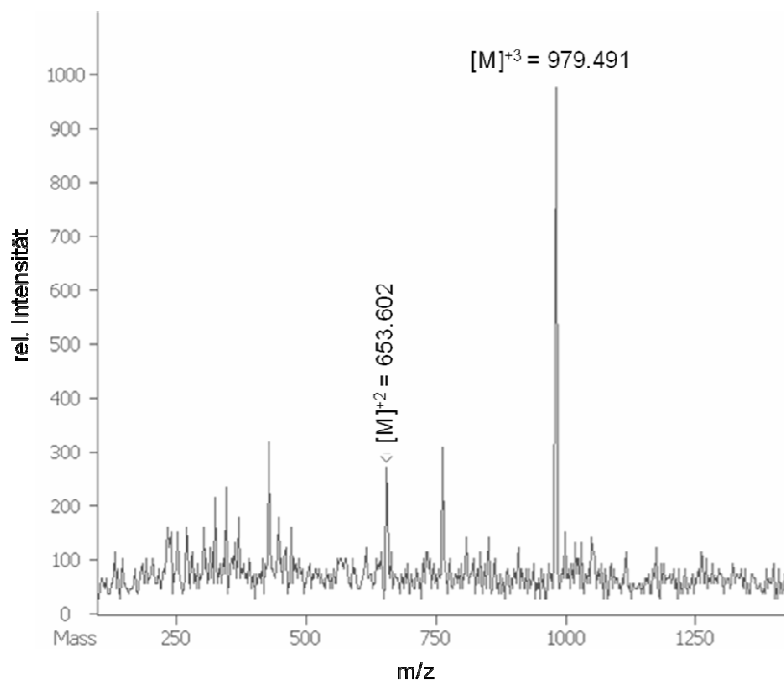


Abbildung 19: *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) des Allyl-markierten Peptids. Angegeben sind die Massen für $[M]^{+2H}$ und $[M]^{+3H}$.

Die Proben werden in einem sauren Laufpuffer gemessen (pH 2.75). Das Peptid kann an fünf basischen Resten protoniert werden, weswegen im Positiv-Modus gemessen wird. Detektiert werden die Massenpeaks für $[M]^{+2H}$ und $[M]^{+3H}$. Die beobachteten Werte von 979.491 ($[M]^{+2H}$) und 653.602 ($[M]^{+3H}$) stimmen gut mit den berechneten Werten von 979.490 und 653.713 für das Peptid mit einer zusätzlichen Propenylgruppe überein. Das Ergebnis steht im Gegensatz zur natürlichen Reaktion, bei der überwiegend Trimethyllysin produziert wird. Im Falle von AdoPropen wird die Seitenkette nur einmal übertragen. Substrate werden von Dim-5 prozessiv methyliert, d.h. das Substrat bleibt gebunden während der Cofaktor ausgetauscht wird (Tamaru *et al.*, 2003). Der Substratkanal könnte zu schmal für eine Übertragung mehrerer Allylreste sein oder das allylierte Produkt könnte nur unzureichend an Dim-5 binden und rasch dissoziieren. Ein prozessiver Mechanismus wäre damit unmöglich. Dieser Umstand wirkt sich auf eine folgende chemische Markierung allerdings positiv aus, da genau eine neue chemische Gruppe in das Substrat eingefügt wird, die dadurch gezielt für Markierungsreaktionen angesteuert werden kann.

3.4.2 Versuche zur Markierung der Doppelbindung

Dim-5 und AdoPropen bilden ein gutes Testsystem zur Entwicklung einer neuen Modifikations-Markierungs-Methode für Proteine. Nach der Optimierung der Analytik von HPLC und ESI-MS kann die katalytische Funktionalisierung durch einen doppelt aktivierten Cofaktor und einer Protein-MTase gezeigt werden. Allerdings bietet die Doppelbindung wenig gut etablierte Möglichkeiten für chemische Reaktionen zur Einführung eines Reporters unter Bedingungen, die das Peptid (und später auch Proteine) im nativen Zustand belassen. Eine beschriebene Methode zur Markierung von Proteinen durch Reaktion an einer Doppelbindung ist die Mizoroki-Heck-Reaktion (Kodama *et al.*, 2007). Ein Aryliodid reagiert unter Palladium-Katalyse mit einem Alken. Die Ausbeute an markiertem Protein beträgt allerdings nur 2%. Daher stellt diese Methode aufgrund der geringen Ausbeute kein attraktives System dar, dessen Optimierung sich lohnt.

3.4.3 Aktivität von Dim-5 mit AdoButin

Der Cofaktor AdoButin trägt als funktionelle und gleichzeitig aktivierende Gruppe eine interne Dreifachbindung. Dim-5 kann den Cofaktor umsetzen, allerdings nur im stöchiometrischen Verhältnis zum Peptidsubstrat. Ein katalytischer Transfer wird nicht erreicht. Der Umsatz beträgt ca. 30% nach 4 h (Abbildung 20). Am Zeitverlauf ist abzulesen, dass eine längere Inkubationszeit die Ausbeute nicht mehr deutlich steigert, von 3 h auf 4 h ist kaum eine weitere Produktbildung zu beobachten. Da der Cofaktor im Basischen mit einer Halbwertszeit von $\tau_{1/2} = 24$ min bei 60°C und pH 7.9 zerfällt (Dalhoff, 2005), könnte der Cofaktor nach einigen Stunden schon vollständig hydrolysiert sein. Wahrscheinlich ist durch die starre Dreifachbindung die α -CH₂ Gruppe der Cofaktor-Seitenkette im aktiven Zentrum der Dim-5 sterisch schlecht für einen nukleophilen Angriff durch die ϵ -Aminogruppe des Ziel-Lysins positioniert.

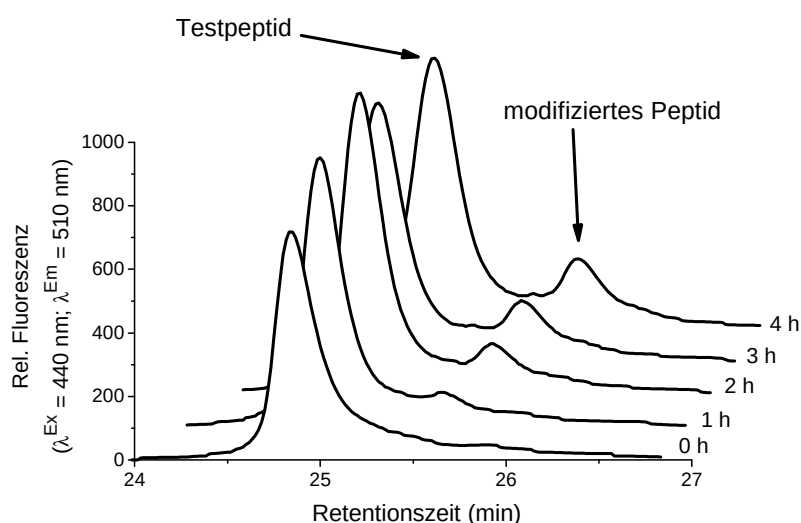


Abbildung 20: HPLC-Analyse der Umsetzung von AdoButin mit dem Testpeptid durch stöchiometrische Mengen an Dim-5 (50 μM) nach verschiedenen Reaktionszeiten. In den Chromatogrammen treten keine weiteren Signale auf. 300 μM (S)-AdoButin in Dim-Reaktionspuffer pH 9.8.

Die massenspektrometrische Analyse des mit der Butin-Seitenkette modifizierten Peptids zeigt, dass auch hier genau eine Seitenkette übertragen wird. Gefunden wird ein Signal für $[\text{M}]^{+3\text{H}} = 657.751$ (ber.: 657.716) und ein Signal für $[\text{M}]^{+3\text{H}} = 640.045$ (ber.: 639.983) des nicht modifizierten Peptids. Auch wenn durch enzymatischen Umsatz keine vollständige Modifikation des Peptids mit einer Butin-Seitenkette erreicht wird, kann das alkylierte Peptid durch *RP*-HPLC einfach gereinigt werden. Damit liegt eine komplett modifizierte Fraktion vor, die in weiteren Schritten mittels einer Click-Reaktion markiert werden könnte. Eine Dreifachbindung kann über eine Huisgen-Cycloaddition mit einem Azid reagieren. Leider ist an internen Dreifachbindungen die Kupfer-katalysierte Variante dieser Reaktion nicht möglich. Andere Bedingungen wie Erhitzen können auch nicht genutzt werden. Das Peptid ist gegenüber höheren Temperaturen (40 - 50°C) zwar tolerant, Reaktionen an Proteinen sind unter diesen Bedingungen aber nicht mehr möglich und führen im Allgemeinen zur Denaturierung der Proteine. Um eine der Modifikation folgende chemische Markierungsreaktion an der funktionellen Gruppe durchführen zu können, müssen weitere doppelt aktivierte Cofaktoren mit anderen funktionellen Gruppen getestet werden.

3.4.4 Aktivität mit weiteren doppelt aktivierten Cofaktoren

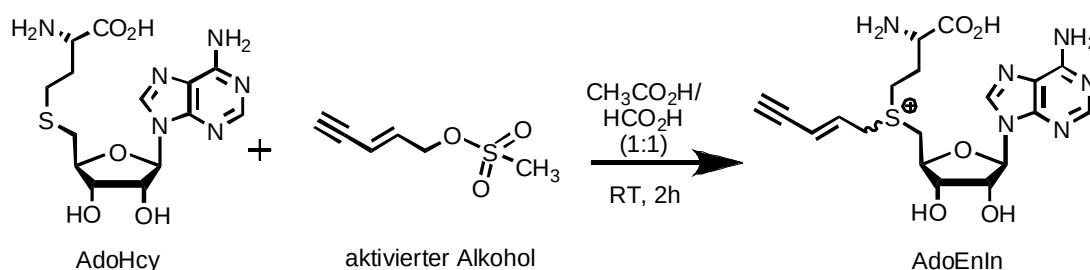
Der Cofaktor AdoPropin trägt, ähnlich wie AdoButin, ein Alkin zur Doppelaktivierung, aber in diesem Fall an einer terminalen Position Übertragene Seitenketten könnten also mit der Kupfer-katalysierten Click-Reaktion prinzipiell markiert werden. Mit Dim-5 kann keine Modifikation des Peptids festgestellt werden. Ursache ist wahrscheinlich eine Hydrolyse des Cofaktors im basischen Reaktionspuffer (pH 9.8), die sehr schnell verläuft. Schon nach 15 - 20 min Inkubation im Puffer bei RT kann durch Kationentauscher-HPLC kein intakter Cofaktor mehr nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit entspricht mit $\tau_{1/2} = 30$ min bei 60°C und pH 7.9 (Dalhoff, 2005) ungefähr der Stabilität von AdoButin.

Der Cofaktor AdoBenz zeigt zwar gute Bindung im radioaktiven Verdrängungsassay, aber keinen Umsatz auf dem Peptid. Der sterisch anspruchsvolle Aromat kann in der engen Bindungstasche wohl nicht übertragen werden.

3.5 Synthese eines neuen Cofaktors mit terminaler Dreifachbindung und Aktivitätsuntersuchung mit Dim-5

3.5.1 Synthese des AdoMet Analogons AdoEnIn

Um eine funktionelle Gruppe und wirksame doppelte Aktivierung in einem AdoMet-Analogon kombinieren zu können, wird ein weiterer Cofaktor entwickelt: Ein Alkin soll als funktionelle Gruppe terminal vorliegen und eine Doppelbindung soll zur Aktivierung dienen, da diese als Gruppe im AdoPropen gute Effekte für eine doppelte Aktivierung gezeigt hat. Ein passender Alkohol mit beiden Funktionen ist in (*E*)-Konfiguration kommerziell erhältlich. Der Alkohol wird als Mesylat aktiviert und danach mit AdoHcy umgesetzt (**Schema 10**).



Schema 10: Synthese des doppelt aktivierten Cofaktor-Analogons AdoEnIn aus AdoHcy und aktivierten Alkin-Alkohol.

Die Epimere konnten mit präparativer *RP*-HPLC nicht getrennt werden und werden als Gemisch erhalten. Das Verhältnis beider Epimere ist ungefähr 1:1. Damit besteht in den Reaktionsansätzen die Hälfte der Cofaktor-Konzentration aus dem nicht-aktiven (*R*)-Epimer.

3.5.2 Umsetzung von AdoEnIn mit dem Testpeptid durch Dim-5

Trotz der im Vergleich zu AdoButin noch um ein weiteres C-Atom verlängerten Seitenkette ist Dim-5 mit AdoEnIn aktiv. Wird Dim-5 stöchiometrisch zum Peptid eingesetzt, können ca. 55% Umsatz erreicht werden. Die Reaktionen werden typischerweise einige Stunden lang inkubiert und jede Stunde wird ein Aliquot analysiert. Dabei fällt auf, dass mehr als 80% der Produktbildung innerhalb der ersten Stunde stattfinden und der Produktzuwachs während der weiteren Inkubation nur wenige Prozent beträgt (Abbildung 21).

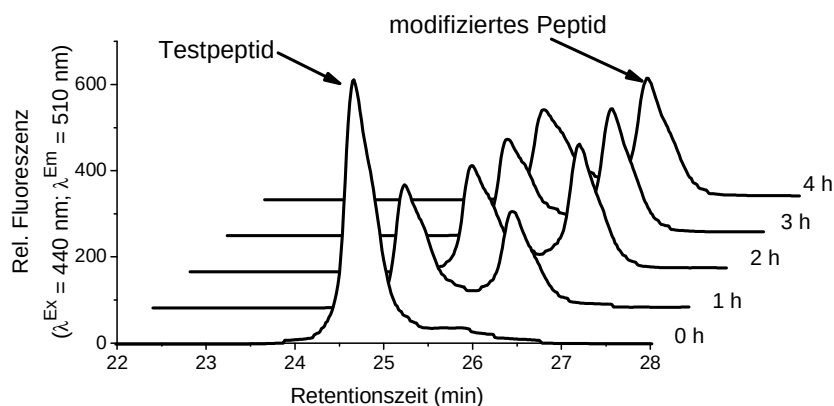


Abbildung 21: HPLC-Analyse der Umsetzung von AdoEnIn mit dem Testpeptid durch stöchiometrische Mengen an Dim-5 (50 μM) nach verschiedenen Reaktionszeiten. In den Chromatogrammen treten keine weiteren Signale auf. 300 μM (S)-AdoEnIn in Dim-Reaktionspuffer pH 9.8.

Das Cofaktor-Analogon wird im basischen Reaktionspuffer ebenfalls hydrolysiert, und auch durch Nachlegen von Cofaktor kann nicht mehr modifiziertes Peptid erhalten werden. Das Enzym wird stöchiometrisch zum Testpeptid eingesetzt aber trotzdem wird nur etwas mehr als die Hälfte des Peptids modifiziert. Das (*R*)-Epimer wirkt vielleicht als kompetitiver Inhibitor, da es zwar im aktiven Zentrum binden könnte, aber nicht umgesetzt werden kann. Die Zerfallsprodukte des Cofaktors könnten auch als Inhibitoren wirken. Aus diesen Gründen kann durch späteres Nachlegen des Cofaktors keine Umsatzsteigerung erreicht werden. Nach Reaktion mit dem Cofaktor AdoEnIn wird die Masse des modifizierten Peptids durch LC-ESI TOF MS bestimmt. Abbildung 22 zeigt die Masse für $[\text{M}]^{+2\text{H}}$ mit 991.977 (ber. = 991.999) und $[\text{M}]^{+3\text{H}}$ mit 661.671 (ber. = 661.668). Auch hier wird nur eine Seitenkette auf das Substrat übertragen. Damit steht ein terminales Alkin als orthogonale funktionelle Gruppe für gezielte Markierungsreaktionen am Peptid zur Verfügung.

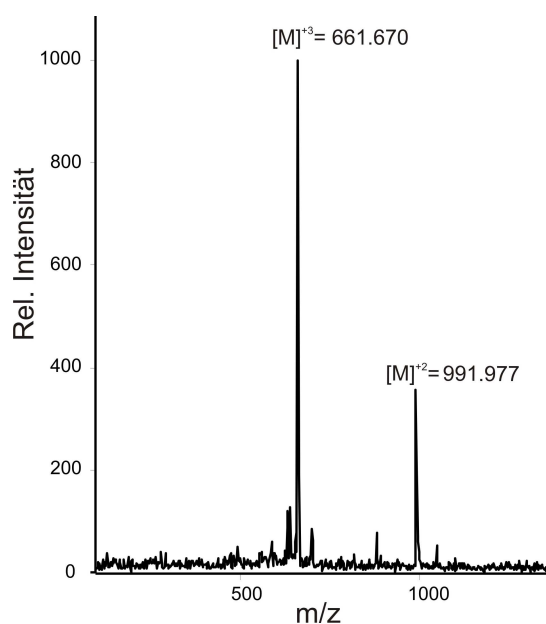


Abbildung 22: LC-ESI TOF Massenspektrum (EIC) des mit der AdoEnIn-Seitenkette modifizierten Peptids. Gefunden wurden Massen für $[M]^{+2H}$ und $[M]^{+3H}$.

Mit dem Massenspektrum kann nur bestätigt werden, dass die Seitenketten der Cofaktoren vollständig übertragen werden, und dass sich jeweils nur eine neue funktionelle Gruppe auf dem Peptid befindet. Offen bleibt, ob das Enzym mit den synthetischen Cofaktoren seine Substratspezifität (H3K9) behält. Durch Sequenzierung des mit AdoEnIn modifizierten Testpeptids wird erstmals festgestellt, dass die Modifikation in der Tat an K9 stattgefunden hat (Abbildung 23).

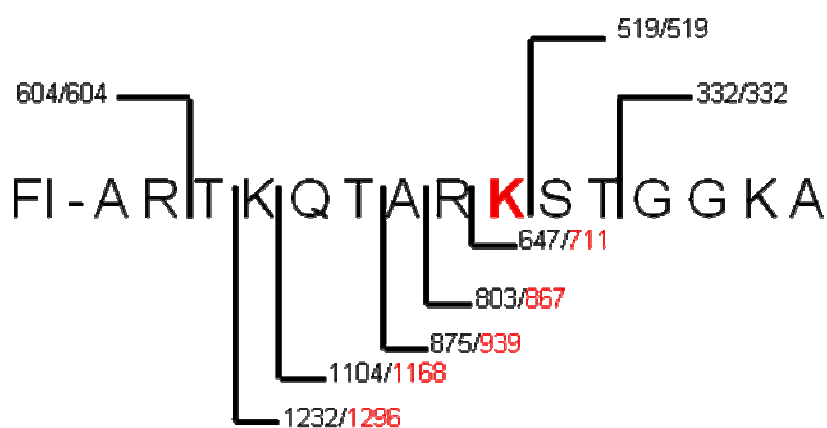


Abbildung 23: MS-Sequenzierung des mit einer EnIn-Seitenkette modifizierten Peptids. Der Strichcode zeigt die Fragmente, die bei der Sequenzierung identifiziert wurden. Die vordere Zahl beschreibt die Masse, die für das angegebene Fragment des nicht-modifizierten Peptids gefunden wurde. Die hintere Zahl zeigt die entsprechende Masse des EnIn-modifizierten Fragments. FI = Fluorescein.

Für die Sequenzierungs-Analyse wird unmodifiziertes und EnIn-modifiziertes Peptid fragmentiert und mit MALDI TOF analysiert. Vom N-Terminus des Peptids wird nur ein Fragment gefunden. Dieses entspricht der Masse von Fluorescein und den ersten beiden Aminosäuren und weist für das modifizierte und unmodifizierte Peptid die gleiche Masse auf. Alle weiteren gefundenen Fragmente gehen vom C-Terminus aus. Die ersten beiden C-terminalen Fragmente zeigen auch hier für das Kontrollpeptid und das modifizierte Peptid die gleichen Massen. Alle weiteren Fragmente, in denen jetzt die Ziel-Aminosäure K9 enthalten ist, zeigen für das modifizierte Peptid einen Massenzuwachs von 64 Da. Diese Masse entspricht genau der EnIn-Seitenkette. Damit wird gezeigt, dass sich die Modifikation an K9 befindet. Dim-5 behält mit AdoEnIn ihre Substratspezifität, und damit wahrscheinlich auch mit allen anderen doppelt aktivierten Cofaktoren.

3.5.3 Andere Protein-MTasen und ihre Aktivität mit doppelt aktivierten- und Aziridin-Cofaktoren

Dim-5 besitzt laut Literatur unter den KMTs eine der größten Umsatzgeschwindigkeiten und wird deswegen bevorzugt untersucht. Sie weist auch Aktivität mit den meisten doppelt aktivierten Cofaktoren auf. Neben Dim-5 werden weitere KMTs auf ihre Aktivität mit doppelt aktivierten Cofaktoren untersucht. Clr4 aus *Schizosaccharomyces pombe*, und Su(VAR)3-9 aus *Drosophila melanogaster* sind wie Dim-5 H3K9-spezifisch.

Clr4 mit einem Molekulargewicht von 35 kDa wird wie beschrieben exprimiert und gereinigt (Min *et al.*, 2003). Im Methylierungsassay mit radioaktivem [³H-methyl]-AdoMet zeigt das Enzym Aktivität mit dem Testpeptid (Abbildung 24). Hier ist deutlich zu sehen, dass die Aktivität viel geringer ist als die von Dim-5. Die Übertragungsgeschwindigkeit von Clr4 beträgt nur 0.54 min⁻¹ (Collazo *et al.*, 2005). Die Methylierungsreaktion wird für 60 min bei 30°C durchgeführt und das Enzym halb-stöchiometrisch zum Testpeptid eingesetzt. Das pH-Optimum für Clr4 liegt zwischen 7.5 - 8.5 und ist damit im Vergleich zu Dim-5 deutlich niedriger. Das Senken des pH-Wertes von 8.5 über 8.0 auf 7.5 bewirkt allerdings eine kontinuierliche Abnahme der Aktivität. Die gesteigerte Halbwertszeit der Cofaktoren könnte aber die langsamere Übertragungsgeschwindigkeit etwas ausgleichen.

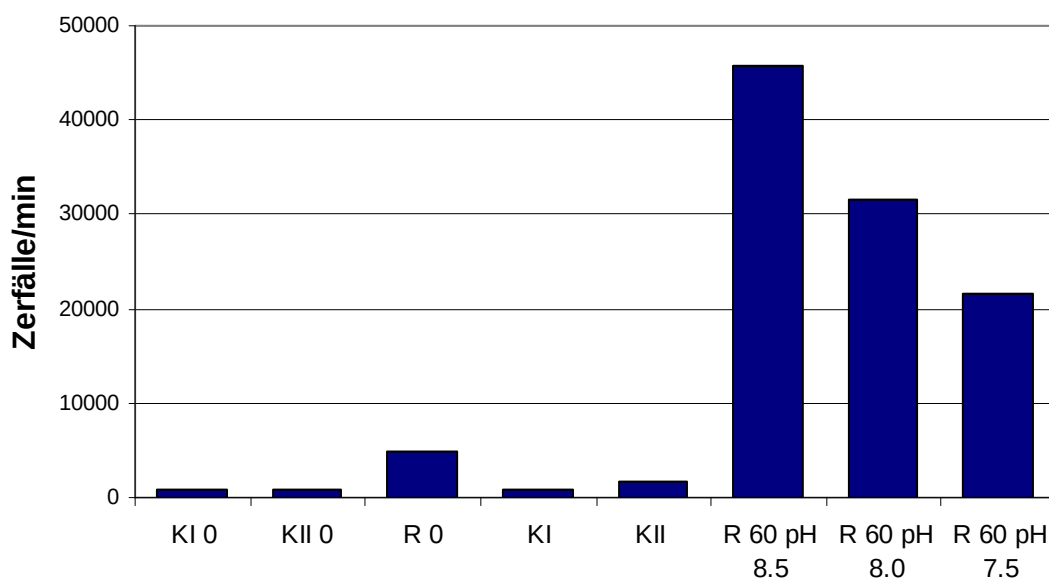


Abbildung 24: Aktivität von Clr4 mit tritiiertem AdoMet und dem Testpeptid bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt sind die 0 h-Startwerte, und Reaktionswerte nach 60 min bei 30°C. KI: Kontrolle ohne Substrat; KII: Kontrolle ohne Enzym; R: Reaktion mit Enzym und Substrat. Reaktionsbedingungen: 0.8 μM Clr4; 5 μM Peptid; 50 μM AdoMet; 0.45 μM tritiiertes AdoMet. Reaktionspuffer für pH 7.5 – 8.5: 50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT.

Nachdem bestätigt werden konnte, dass das synthetische Peptid auch als Substrat für die KMT Clr4 dient, wird die Aktivität mit den Aziridin- und doppelt aktivierten Cofaktoren durch den HPLC-Assay untersucht. Die Aziridin-Cofaktoren Az und 6BAz (Abbildung 13) können trotz des neutralen pH-Wertes der Reaktion von 7.5, bei dem der Aziridin-Ring zumindest teilweise protoniert sein sollte, nicht zur Reaktion gebracht werden. Nachfolgend werden die doppelt aktivierten Cofaktoren mit Clr4 getestet. Mit AdoPropen kann im stöchiometrischen Verhältnis der Protein-MTase zum Testpeptid (je 50 μM) ein quantitativer Umsatz nach 3 h Reaktionszeit erzielt werden (Abbildung 25).

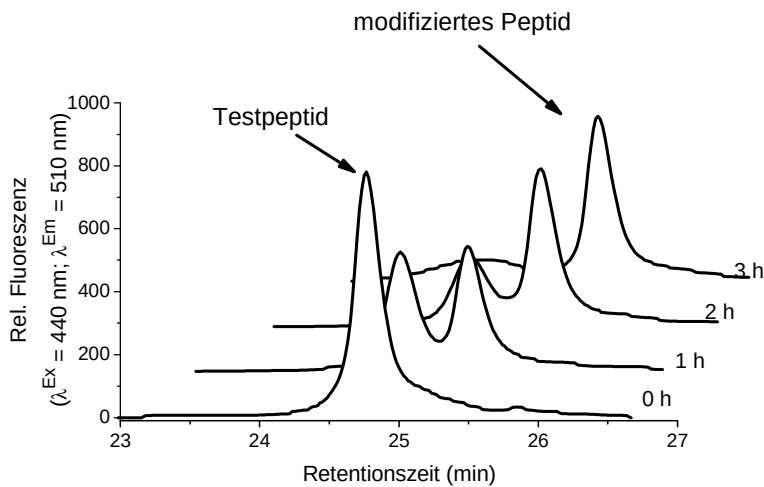


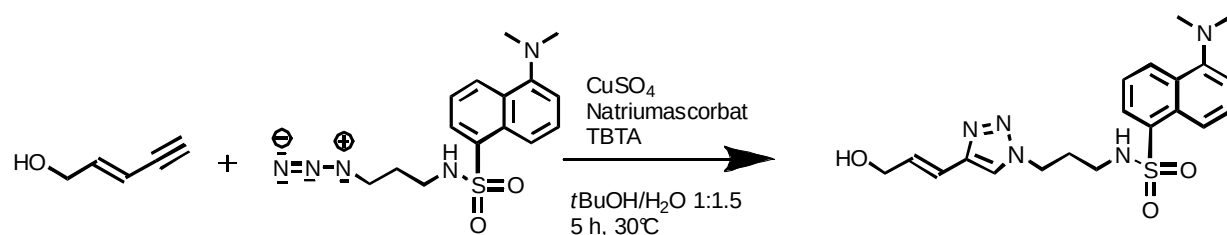
Abbildung 25: HPLC-Analyse der Umsetzung von AdoPropen mit dem Testpeptid durch stöchiometrische Mengen an Clr4 (50 μM) nach verschiedenen Reaktionszeiten.

In den Chromatogrammen treten keine weiteren Signale auf 300 μM (S)-AdoPropen in Clr4-Reaktionspuffer pH 8.5.

Inkubationen mit AdoButin und AdoEnIn zeigen dagegen keinen Umsatz, obwohl der neutralere pH-Wert die Stabilität der Cofaktoren deutlich steigern, und damit eine längere Reaktionsdauer ermöglichen sollte. Für Clr4 werden mit 25 μM für AdoMet und 100 μM für ein 15mer Peptid hohe K_M -Werte beschrieben (Collazo *et al.*, 2005). Mit 50 μM Peptid befindet man sich also deutlich unter dem K_M -Wert, was die Reaktionsgeschwindigkeit natürlich herabsetzt. Mit dem natürlichen Cofaktor und dem sterisch eher anspruchslosen AdoPropen kann eine Übertragung der Seitenketten stattfinden, wohingegen die größeren Cofaktoren AdoButin und AdoEnIn wahrscheinlich nicht gut in die Cofaktorbindungstasche binden bzw. durch ungünstige Positionierung der Seitenkette im aktiven Zentrum keine Übertragung ablaufen kann.

3.6 Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen Cycloaddition (Click-Reaktion) zur chemischen Markierung der übertragenen Alkingruppe

Nachdem keine der zusätzlich getesteten Protein-MTasen einen besseren Umsatz als Dim-5 mit AdoEnIn zeigte, wird dieses Enzym weiterhin benutzt, um die EnIn-Seitenkette auf das Testpeptid zu übertragen. An die übertragene Seitenkette soll dann durch die Click-Reaktion ein Affinitätsmarker kovalent mit dem modifizierten Peptid gekuppelt werden. Bevor diese Reaktion jedoch am modifizierten Peptid durchgeführt wird, sollen die Reaktionsbedingungen mit dem Alkohol 2-Penten-4-in-1-ol und Dansylazid optimiert werden (Schema 11). Als Ligand für das katalytische Cu(I), welches *in situ* durch Reduktion aus Cu(II) mit Natriumascorbat hergestellt wird, dient *tris*-(Benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA). Die Verbindung ist allerdings nicht wasserlöslich, so dass die Reaktion in einem Gemisch aus *tert*-Butanol und Wasser durchgeführt werden muss.



Schema 11: Testsystem zur Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion zwischen dem Alkin und Dansylazid. TBTA wird als Ligand zur Stabilisierung der redoxempfindlichen Cu(I)-Spezies eingesetzt. Die Reaktion wird in einem Gemisch aus *tert*-Butanol und Wasser (1:1.5, v/v) bei 30°C für 5 h durchgeführt.

Für erste Tests werden millimolare Konzentrationen der Reaktionspartner gewählt. In den späteren Markierungsreaktionen wird das alkylierte Peptid aber im deutlichen Unterschuss vorliegen. Das Azid hingegen kann weiterhin in höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Der Reaktionsverlauf wird zunächst anhand der Bildung des fluoreszierenden Produktes durch Dünnschichtchromatografie überprüft. Zur genaueren Analyse wird die Reaktion durch RP-HPLC analysiert (Abbildung 26) und die neu entstandene Verbindung mit einer Retentionszeit von 20 min isoliert und massenspektrometrisch charakterisiert. Die Masse bestätigt das Triazol-Addukt aus dem Alkin-Alkohol und Dansylazid.

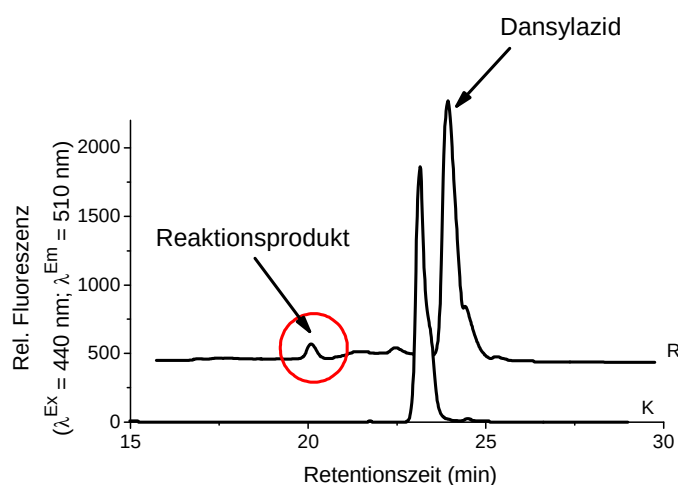


Abbildung 26: HPLC-Analyse der Testreaktion zwischen Dansylazid und Alkin-Alkohol. Bei der Reaktion R bildet sich ein Signal bei 20 min (rot markiert), welches als das entsprechende Triazoladdukt identifiziert werden konnte. Die Kontrolle K (ohne Alkin-Alkohol) zeigt dieses Signal nicht.

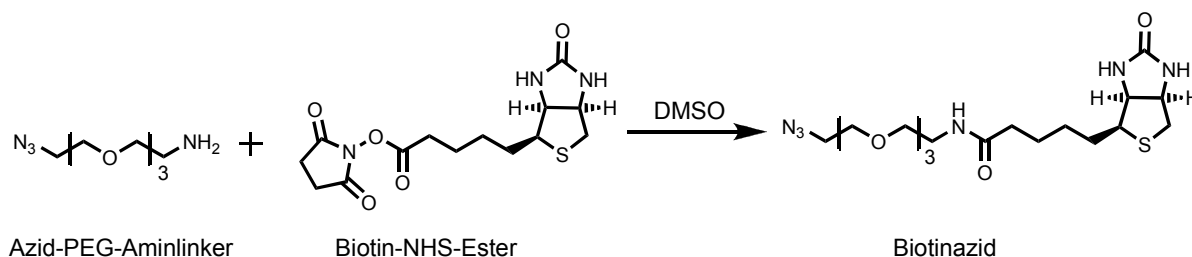
20 μM Alkin-Alkohol, 500 μM Dansylazid, 500 μM CuSO_4 /TBTA, 15 mM Natriumascorbat, 5 h bei 30°C.

In den nächsten Schritten wird die Konzentration des Alkin-Alkohols so weit gesenkt, bis ungefähr die Konzentration vorliegt, in denen das modifizierte Peptid später eingesetzt werden kann. Die Konzentration des Alkin-Alkohols wird dementsprechend auf 20 μM gesenkt, das Azid wird mit 500 μM eingesetzt. Die Reaktionen werden bei 30°C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist die Reaktion mit Hinblick auf den Alkin-Alkohol nach 5 h quantitativ abgelaufen.

3.6.1 Biotinylierung des Monoalkylierten Peptids

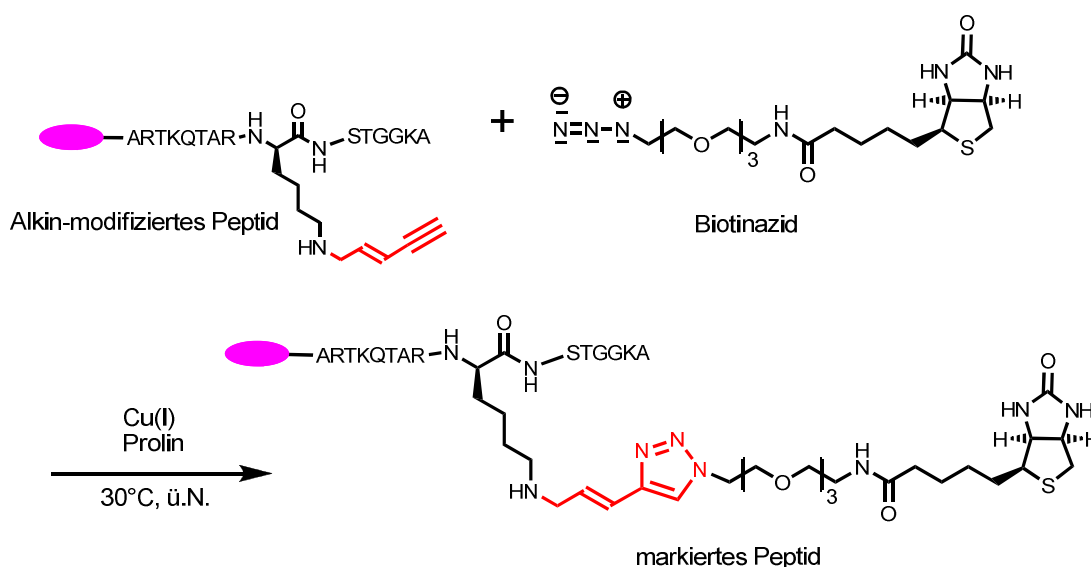
Für die Markierung des modifizierten Peptids wird dieses durch präparative *RP*-HPLC gereinigt und bis zur Trockene eingengt. Das Peptid wird mit Ligand und CuSO_4 (beide 500 μM), Natriumascorbat (30 Äquivalente) und Dansylazid (500 μM) in einem leicht basischen Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8.0) und *tert*-Butanol/Wasser (1:1.5) in einem Volumen von 20 μL aufgenommen. Der komplette Reaktionsansatz wird durch *RP*-HPLC analysiert. Das Dansyl-markierte Produkt sollte im Vergleich zum alkylierten Edukt bei größeren Retentionszeiten eluieren. Die Ansätze zeigen auch nach mehreren Wiederholungen und Variationen der Kupfer- und Ascorbatkonzentrationen sowie des *tert*-Butanol-Anteils kein

neues Signal. Außerdem fällt das Peptid oft fast quantitativ aus, so dass kaum Signale detektiert werden können. Mit L-Prolin wurde eine Verbindung gefunden, die sehr gut wasserlöslich ist und als Ligand für die Click-Reaktion fungieren kann (Chan *et al.*, 2004). Die Reaktion kann jetzt ohne Zusatz organischer Lösungsmittel durchgeführt werden. Zusätzlich wird die Konzentration an Alkin durch das Vereinigen mehrerer modifizierter Peptidfraktionen auf ca. 125 μM gesteigert. Für die Reaktion in Wasser muss ein wasserlösliches Reporterazid das schlecht lösliche Dansylazid ersetzen.



Schema 12: Synthese von Biotinazid aus einem Azid-Amin-Linker und einem Biotin-NHS-Ester.

Deshalb wird, auch in Hinblick auf die spätere Anwendung an Proteinen, Biotinazid synthetisiert (Schema 12), welches durch einen PEG-Anteil wasserlöslich sein soll. Dieses soll jetzt für die Markierung des Alkin-modifizierten Peptids mit Hilfe der Click-Reaktion eingesetzt werden (**Schema 13**).



Schema 13: Markierung des Alkin-modifizierten Peptids mit Biotin durch die Click-Reaktion

Nach Durchführung der Click-Reaktion mit diesen optimierten Parametern zeigt sich im analytischen HPLC-Lauf ein neues Signal bei 29 min (Abbildung 27).

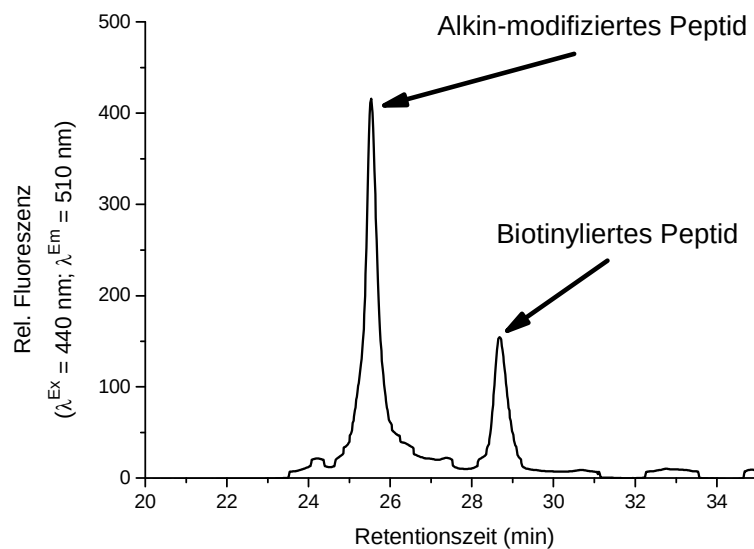


Abbildung 27: HPLC-Analyse der Click-Reaktion mit Biotinazid am Alkin-modifizierten Peptid. Das Produkt eluiert bei 29 min. Der Reaktionsumsatz beträgt ca. 30%.

Das Signal bei 29 min wird durch LC-ESI TOF MS analysiert. Gefunden werden die Signale für $[M]^{+2H} = 1214.109$ (ber. = 1214.107) und $[M]^{+3H} = 809.749$ (ber. = 809.740), was bestätigt das Biotinazid mit dem Alkin-markierten Peptid reagiert hat (Abbildung 28).

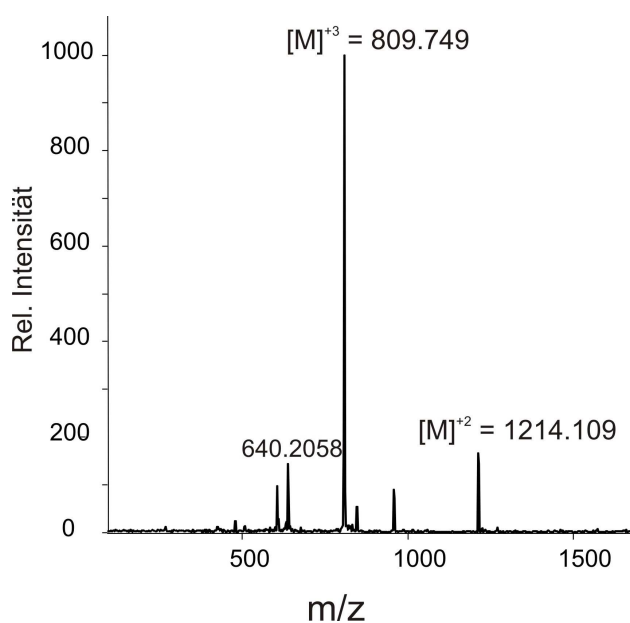


Abbildung 28: LC-ESI TOF Massenspektrum (EIC) des über Click-Chemie biotinylierten Peptids.

3.6.2 Biotinylierung von Histon H3 durch zweistufige Modifikation

Nach erfolgreichem Abschluss der Testreaktionen am Peptid soll das Modifikations-Markierungs-System jetzt auf ganze Proteine angewendet werden. Zunächst wird Histon H3, das natürliche Substrat von Dim-5, gewählt. Ganze Proteine können nicht mehr über HPLC analysiert werden, so dass ein neues Detektionsverfahren entwickelt werden muss. Als Reporter soll auch hier statt des Dansyl-Fluorophors Biotin eingesetzt werden, da dieses mit Peroxidase-gekuppeltem Avidin in Western-Blots sehr sensitiv detektiert werden kann. Da Substratproteine in Zellen in viel geringeren Konzentrationen als im artifiziellen System mit 50 μ M Peptid vorliegen, wurde die Substratkonzentration auf 6.5 μ M, also fast ein Zehntel, gesenkt. Das Enzym Dim-5 wird zunächst wieder stöchiometrisch zum Protein-Substrat eingesetzt. Im Western-Blot zeigt sich ein starkes Signal in der Spur der Modifikations-Markierungs-Reaktion (Abbildung 29). Das Signal befindet sich ungefähr auf Höhe der 15 kDa-Markerbande, was dem Molekulargewicht des Histon H3 mit 15.2 kDa gut entspricht. Die Biotinmarkierung könnte die Migration im Gel etwas beeinflussen. Die schwächere Bande bei ca. 30 kDa entspricht dimerisiertem Histon, welches auch biotinyliert wurde. Histon H3 besitzt zwei interne Cystein-Reste, die zu einer Dimerisierung durch Disulfidbildung neigen (Produktinformation von New England Biolabs). Die schwache Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa kann der Dim-5 zugeordnet werden. Diese Bande ist auch in der Kontrolle ohne Substrat zu sehen. Offensichtlich modifiziert das Enzym sich selbst. Wahrscheinlich bindet das Cofaktor-Analogon im aktiven Zentrum auch in einer Konformation, die eine Übertragung der Seitenkette auf das Substrat nicht zulässt, wohl aber den Angriff eines Nukleophils im oder in Nachbarschaft des aktiven Zentrums ermöglicht. Dieser Effekt könnte auch nur durch das (*R*)-Epimer bedingt sein. Dies könnte auch die Ursache sein, warum durch Nachlegen von AdoEnIn in den Reaktionen mit dem Testpeptid keine deutliche Umsatzsteigerung erzielt werden konnte. Die Selbstmodifikation könnte zu einer Inaktivierung der Dim-5 führen. Die anderen Kontrollreaktionen ohne AdoEnIn und ohne Dim-5 zeigen kein Signal, was die Spezifität der Click-Reaktion bestätigt.

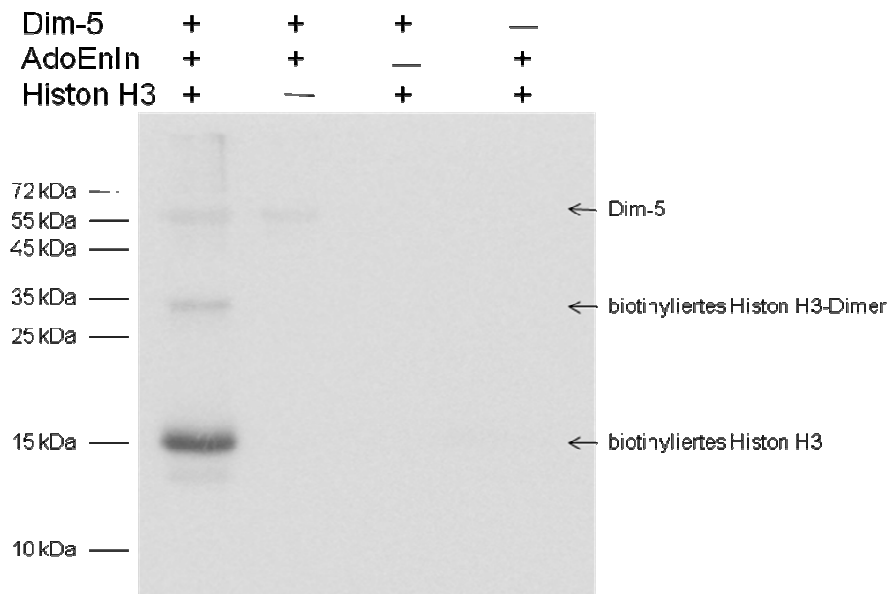


Abbildung 29: Western-Blot des biotinylierten Histon H3 nach Modifikation mit Dim-5 und AdoEnIn Cofaktor sowie Click-Reaktion. Die Detektion erfolgt mit Peroxidase-gekuppeltem Avidin. Sichtbar sind die Banden von biotinyliertem Histon H3 (bei 15 kDa), biotinyliertem Histon-Dimer (bei 30 kDa) und ein geringes Hintergrundsignal von Dim-5 (bei 60 kDa) durch Selbstmodifikation.

Mit dem Volllängen-Protein scheint das Enzym aktiver zu sein als mit dem Peptid. Auch bei katalytischen Verhältnissen von Enzym zu Histon H3 von 1:10 kann im Biotin-Blot noch ein Signal detektiert werden. Der K_M -Wert für das natürliche Substrat ist wahrscheinlich wesentlich geringer als für das Testpeptid, was zu besseren Umsätzen führen sollte. Allerdings ist die Detektion durch den Western-Blot auch sensitiver als der Nachweis mittels *RP*-HPLC, da durch die Peroxidase-Reaktion eine Signalamplifikation stattfindet.

3.7 Konstruktion, Reinigung und Aktivität der Variante M.SssI-H3-Tag

3.7.1 Methylierung des H3-Tags mit Dim-5

Die Dim-5 katalysierte Übertragung der Alkin-Seitenkette und die anschließende Markierung durch Click-Chemie sollte als Modifikations-Markierungs-System für beliebige Proteine, die mit einem kurzem Histon-Tag versehen sind, getestet werden. Dazu wird die DNA-MTase M.SssI als Fusionsprotein exprimiert, welches N-Terminal die Aminosäuren 1-16 der Histon H3-Sequenz trägt. Gereinigt wird das Protein über einen C-Terminal lokalisierten His-Tag. Wie in der Dissertation von A. Monami 2007 beschrieben, soll auch diese M.SssI-Variante in einem weiteren Reinigungsschritt durch Kationentauscher-Chromatographie von Fremdproteinen befreit werden. Durch den basischen Histon-Anteil ist die Bindung an das Kationenaustauschermaterial aber so stark, dass das Protein nicht mehr eluiert werden konnte.

Deshalb wurden die Waschbedingungen für die His-Tag-Affinitätschromatographie optimiert. Mit diesem verbesserten Protokoll konnte das Eluat der Nickelsäule als Substrat genutzt werden. Zur Überprüfung ob der Histon-Tag an M.SssI von Dim-5 als Substrat genutzt werden kann, oder vielleicht konformationsbedingt nicht zugänglich ist, wird zunächst mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet methyliert. Die pH-Wert Optima für Dim-5 und MSssI liegen mit 9.8 und 7.9 weit auseinander. Die Reaktion wird zunächst bei optimalen Bedingungen für M.SssI (pH 7.9) durchgeführt. Dieses Enzym neigt unter nicht optimalen Bedingungen zum Denaturieren, und Dim-5 hat, wie im radioaktiven Assay gezeigt, bei pH 8 noch ausreichend Aktivität. Da Dim-5 überwiegend Trimethyl-K9 produziert, soll methylierte M.SssI-H3-Tag im Western-Blot mit dem Anti-Trimethyl-H3K9 Antikörper detektiert werden (Abbildung 30).

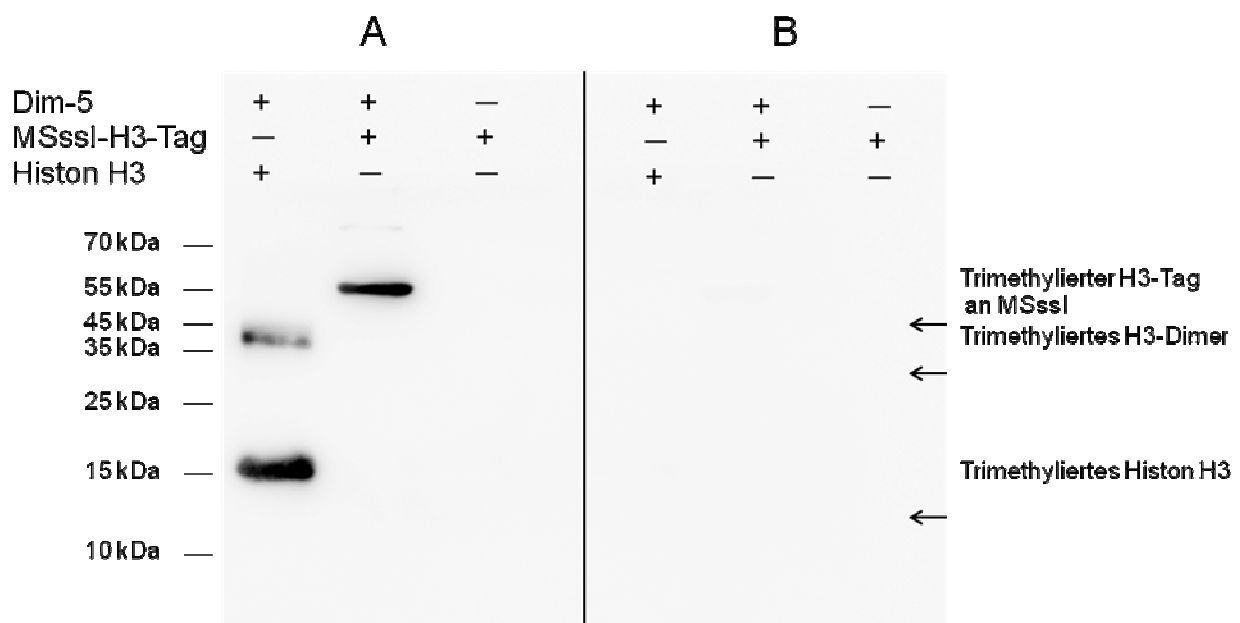


Abbildung 30: Methylierung von Histon H3 und dem Histon-Tag an M.SssI durch Dim-5. Die Detektion der methylierten Substrate erfolgt mit dem Anti-H3K9-Trimethyl Antikörper im Western-Blot. A: Reaktion mit AdoMet; B: Kontrolle ohne AdoMet.

Als Positivkontrolle wird die Reaktion mit Histon H3 als Substrat durchgeführt. Das methylierte Histonprotein (Bande bei 15 kDa) und sein methyliertes Dimer (Bande bei 35 kDa) geben ein deutliches Signal mit dem Antikörper. In der Reaktion mit MSssI-H3-Tag ist auf Höhe der 55 kDa-Markerbande, welche der berechneten Größe von MSssI-H3-Tag mit 51 kDa gut entspricht, ebenfalls ein starkes Signal sichtbar. Dim-5 kann also den Histon-Teil im Fusionsprotein erkennen, ihn als Substrat nutzen und wie in der natürlichen Reaktion Trimethyl-K9 produzieren. Teil B des Western-Blots zeigt, dass in Kontrollen ohne AdoMet,

keine Signale entstehen. Die Enzympräparationen sind also frei von AdoMet und die Signale beruhen nur auf der enzymatischen Aktivität von Dim-5 mit ihren Substraten.

3.7.2 Markierung von M.SssI-H3-Tag mit AdoEnIn und anschließende Biotinylierung durch die Click-Reaktion

Nun soll das M.SssI-H3-Tag Konstrukt durch Dim-5 und AdoEnIn modifiziert und anschließend durch Click-Reaktion biotinyliert werden. Der Reaktionsansatz wird wie oben bei pH 7.9 durchgeführt und das biotinylierte Produkt soll im Western-Blot durch Avidin-Peroxidase detektiert werden. Allerdings konnten nur Hintergrundsignale detektiert werden, die alle von der Selbstmodifikation mit AdoEnIn stammen. In den Kontrollen mit Dim-5 und AdoEnIn sowie M.SssI-H3-Tag und AdoEnIn sind die Signale der Proteine genauso stark wie in dem eigentlichen Markierungsansatz. Da M.SssI auch eine MTase ist, kann sie wahrscheinlich das AdoMet-Analogon binden, so dass es im aktiven Zentrum zu dieser Nebenreaktion kommen könnte. Daher eignet sich die Dim-5 in Kombination mit dem Cofaktor-Analogon AdoEnIn eher schlecht als modifizierendes Enzym. M.SssI-H3-Tag eignet sich für die Markierung durch AdoEnIn ebensowenig. Die Methode sollte dazu dienen, M.SssI über die Click-Reaktion mit Azid-modifizierten ODNs zu verknüpfen. Bei diesem Ausmaß an Selbstmodifikation kann aber keine spezifische Markierung erfolgen. Man könnte das aktive Zentrum durch Binden von AdoHcy vor unspezifischen Reaktionen mit AdoEnIn schützen, um dann den Histon-Teil mit Dim-5 zu markieren.

Allerdings sollte AdoHcy auch Dim-5 inhibieren, so dass mit geringfügigen Umsatzgeschwindigkeiten zu rechnen ist. Die Effizienz der Markierung sollte an anderen Fusionsproteinen, die den Cofaktor AdoEnIn nicht binden können, überprüft werden.

3.8 Markierung eukaryotischer Zielproteine mit AdoEnIn durch endogene MTase-Aktivität und anschließender Biotinylierung

Das jetzt in dieser Arbeit entwickelte Modifikations-Markierungssystem für Proteine soll auch zum Isolieren und Identifizieren neuer Nicht-Histon Substrate eukaryotischer (vorzugsweise humaner) Protein-MTasen in Zelllysaten genutzt werden. Durch das Zwei-Stufen Markierungssystem können Proteine, die Substrate von MTasen sind, mit einem Affinitätsmarker versehen werden. Sie können mit Hilfe von magnetischen Affinitätspartikeln

isoliert werden, durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und mit Massenspektrometrie identifiziert werden. Viele Protein-MTasen sind im Zellkern lokalisiert, wo sie zur Regulation der Genexpression Chromatin-Modifikationen ausführen. Bekannte Substrate sind Histone und Bestandteile des Transkriptionsapparates. Die Suche nach neuen MTase-Zielproteinen neben den Histonen soll sich daher zunächst auch auf dieses Zellkompartimente beschränken. Dazu sollen Lysate aus Zellkulturen hergestellt werden, die mit der entsprechenden Protein-MTase transfiziert worden sind. In ersten Experimenten werden oben beschriebene Markierungen aber zuerst in Kernextrakten aus eukaryotischen Zellen durchgeführt, in denen keine MTase überexprimiert wurde, sondern nur die intrinsische Aktivität aller endogen vorhandenen Protein-MTasen genutzt wird.

Nachweis von Biotin-markierten Proteinen aus Zellextrakten mittels Western-Blot

Der Kernextrakt wird aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-T) hergestellt. Ein notwendiger Schritt bei der Präparation des Extraktes ist die Durchführung einer Dialyse oder Ultrafiltration, wodurch kleine Moleküle abgetrennt werden. So kann die Konzentration an endogenem AdoMet, welches als natürlicher Cofaktor die Reaktion mit dem synthetischen Cofaktor AdoEnIn unterdrücken würde, deutlich reduziert werden. Man kann nicht sicher davon ausgehen, dass der Extrakt ausreichend Histone zur Markierung enthält, da diese beim Ultrafiltrationsschritt während der Präparation verloren gegangen sein könnten. Eine Probe Kernextrakt wird deshalb außer mit AdoEnIn zusätzlich mit Histon H3 als Substrat versetzt. Wenn der synthetische Cofaktor von Enzymen genutzt werden kann, sollte zumindest das zugesetzte Histon H3 markiert werden. Ein weiterer Ansatz wird ohne zusätzliches Histon durchgeführt. Die Reaktionszeit für die Modifikation beträgt 5 h. Die Übertragungsreaktion läuft wegen der im Gegensatz zu den Versuchen mit gereinigten Enzymen vergleichsweise geringen Konzentrationen an Enzymen und Substraten wahrscheinlich sehr langsam ab. Die Click-Reaktion zur Biotinylierung der Alkin-modifizierten Proteine wird über Nacht durchgeführt. Die markierten Proteine sollen im Western-Blot nach Reaktion mit Avidin-Peroxidase sichtbar werden. Die Abbildung 31 zeigt die entstandenen Signale im Western Blot.

Die Signale entstehen nur in den Proben, in denen sowohl zelleigene MTasen (Extrakt) und AdoEnIn vorhanden sind. Am deutlichsten treten zwei Banden auf Höhe von 15 kDa hervor. Dem Molekulargewicht nach kann es sich hierbei um Histone handeln. Kurz darunter befindet sich ein weiteres deutliches Signal. In dem Bereich von 25 kDa – 100 kDa sind Verfärbungen erkennbar, aber es treten keine klaren Banden hervor.

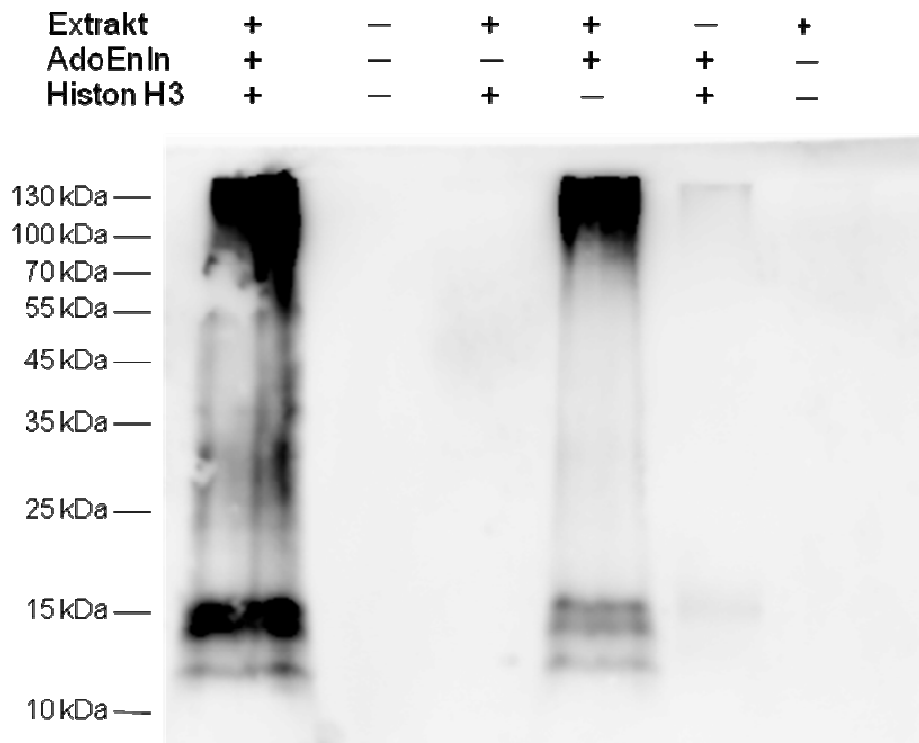


Abbildung 31: Western-Blot der Reaktionen von Kernextrakt aus HEK 293-T Zellen mit AdoEnIn mit bzw. ohne Histon H3 sowie Kontrollen nach der Click-Reaktion mit Biotinazid. Die biotinylierten Proteine werden mit Peroxidase-gekuppelten Avidin detektiert.

Durch die lange Reaktionszeit der Click-Reaktion ist wahrscheinlich ein Großteil des Cu(I) zu Cu (II) reoxidiert worden. Dieses komplexiert Aminogruppen und Peptidbindungen, was zu diffusen Banden im SDS-Gel führen kann. Auch das starke Signal im hochmolekularen Bereich bei über 130 kDa, welches in den Ansätzen mit und ohne zusätzlichem Histon H3 auftritt, kann von stark denaturierten Proteinkomplexen stammen, die trotz des starken Erhitzens der Proben mit SDS vor der Elektrophorese nicht mehr getrennt werden und deshalb kaum in das Gel einlaufen. Im Vergleich zeigt sich, dass in Ansätzen mit zugesetztem Histon H3 intensivere Signale auftreten als in Ansätzen, in denen ausschließlich endogenes Histon H3 zur Verfügung steht. In Versuchen mit Dim-5 wurde beobachtet, dass bei stöchiometrischen Konzentrationen von Enzym und Substrat bei einer Gesamtproteinmenge von einigen Mikrogramm in 20 µl ein starker Niederschlag auftritt. Die Gesamtmenge an Protein in den Kernextrakt-Proben beträgt im gleichen Volumen mit 50 µg ungefähr das zehnfache. Die Bindung des zusätzlich eingesetzten Substrates verteilt sich zwar auf mehrere Protein-MTasen, trotzdem könnten hier ähnlich starke Bindungseffekte auftreten welche die Bildung von Proteinaggregaten begünstigen.

Auffallend ist, dass die beiden oberen Banden bei 15 kDa die gleiche Stärke aufweisen, und nicht nur die oberste dieser Banden, die Histon H3 entspricht, ein starkes Signal zeigt. Die korrespondierenden Banden in dem Ansatz ohne zusätzliches Histon sind ähnlich stark, nur insgesamt weniger intensiv. In dem Molekulargewichtsbereich der Histone sind drei Banden auszumachen. Alle vier Histone (H2A, H2B, H3 und H4) weisen potentielle Methylierungspositionen auf (Freitas *et al.*, 2004; Peterson & Laniel, 2004), wobei H3 und H4 das höchste Methylierungspotential besitzen (Bannister & Kouzarides, 2005). Die beiden Histone H2A und H2B weisen mit 13.99 kDa und 13.79 kDa sehr ähnliche Molekulargewichte auf, und werden daher in der SDS-PAGE wahrscheinlich nicht getrennt. Zur genaueren Charakterisierung der unteren Banden wird ein Western-Blot mit einem Histon H4-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Durchführung eines weiteren anti-H4 Immunoblots würde eine Identifikation nicht zwingend gewährleisten, da es von Blot zu Blot Abweichungen in Bezug auf die Auftrennung und Lage eines bestimmten Proteins kommen kann. Um solche Abweichungen auszuschließen, wird die Reaktion mit derselben Membran durchgeführt, auf der schon die in Abbildung 31 gezeigten Signale detektiert wurden. Zuvor muss allerdings die Peroxidaseaktivität des zur Detektion verwendeten Peroxidasegekuppelten Avidin inaktiviert werden. Die Peroxidaseaktivität wird durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid inaktiviert, was jedoch nicht vollständig gelingt.

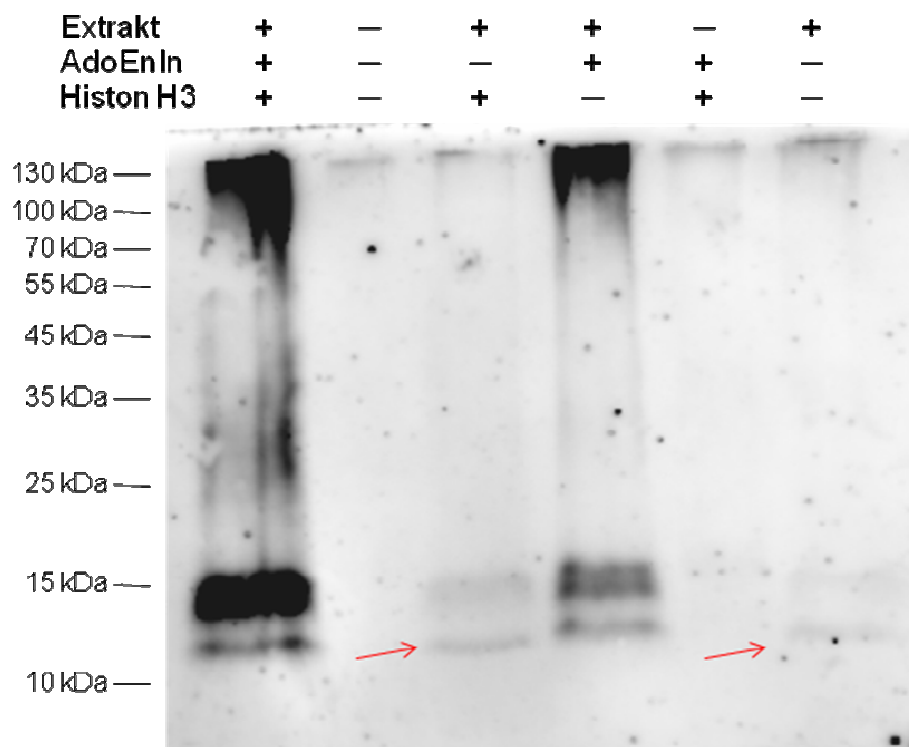


Abbildung 32: Detektion des Western-Blots mit einem Histon H4-spezifischen Antikörper nach Wasserstoffperoxid-Behandlung der Membran. In den Spuren mit Kernextrakt und Histon H3 bzw. Kernextrakt ohne zugesetztem H3 entsteht jeweils ein neues Signal (roter Pfeil), welches die Lage von Histon H4 anzeigt.

Die gleichen Signale, die auch nach der ersten Reaktion sichtbar waren, erscheinen auch hier wieder, da die Peroxidaseaktivität nicht vollständig inaktiviert wurde (Abbildung 32). Es entstehen aber in den Spuren, in denen bei der ersten Detektion keine Reaktion stattgefunden hat, neue Signale. Dieses sind die Spuren, in denen die Reaktion von Kernextrakt mit Histon H3 sowie nur der Kernextrakt aber ohne AdoEnIn aufgetragen sind. Die Signale, die die Lage von Histon H4 anzeigen, sind auf Laufhöhe der im ersten Detektionsschritt entwickelten untersten Bande. Außerdem fehlt diese Bande in der Kontrolle ohne Kernextrakt in der sich nur Histon H3 befindet. Somit kann man davon ausgehen, dass die unterste Bande Histon H4 ist.

Wie oben erwähnt, sind die Reaktionszeiten für Modifikation und Markierung sehr lang gewählt, um festzustellen zu können, ob überhaupt eine Reaktion stattfindet. Da aber sehr starke Signale entstehen, und die Detektionszeit für die Peroxidasereaktion unter einer Sekunde liegen, kann die Reaktionsdauer verkürzt werden. Hierdurch soll vermieden werden, dass die Proteine denaturieren und sich unlösliche Komplexe bilden, indem das katalytische

Cu(I) reduziert gehalten wird. Es lässt darauf hoffen, dass sich der diffus gefärbte Bereich ab 25 kDa auflöst, und einzelne Banden sichtbar werden. Der Versuch, diesen Bereich in niederprozentiger SDS-PAGE aufzulösen, war nicht erfolgreich. Die oben gezeigte Reaktion wird wiederholt, mit dem Unterschied, dass Modifikations- und Click-Reaktion jeweils nur eine Stunde lang durchgeführt werden. Auch diese Ansätze werden durch denaturierende PAGE und anschließenden Western-Blot mit Avidin-Peroxidase-Färbung analysiert (Abbildung 33).

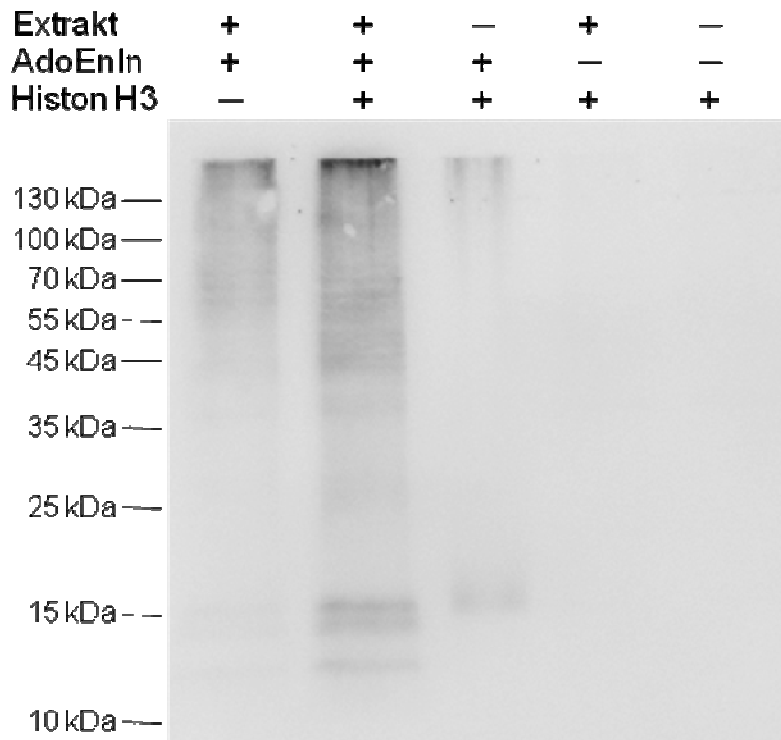


Abbildung 33: Western-Blot der Reaktion von Kernextrakt mit AdoEnIn ohne und mit Histon H3 und Kontrollen. In allen Proben wurde die Click-Reaktion durchgeführt. Färbung mit Avidin-Peroxidase.

Zwar sind die Signale der Histone hier schwächer, aber im höher molekularen Bereich sind jetzt in den Proben mit als auch ohne zugesetztem Histon H3 diskrete Banden zu erkennen. Genauso wie vorher sind die Signale in der Reaktion mit zusätzlichem Histon stärker. In den Kontrollen sind diese Banden nicht vorhanden. Die Versuche mit Dim-5 haben eine starke unspezifische Selbstmodifikation des Enzyms gezeigt. Die Signale könnten also auch von unspezifisch selbstmarkierten MTasen stammen. Da viele humane MTasen ein sehr hohes Molekulargewicht aufweisen, handelt es sich bei den hier erhaltenen Signalen, die sich im Bereich zwischen 25 kDa und 130 kDa befinden, wahrscheinlich eher um Substrate der

MTasen. Die Kontrollreaktion mit Histon H3 und AdoEnIn zeigt allerdings ein schwaches Hintergrundsignal, was auf eine längere Detektionszeit im Vergleich mit den Experimenten mit den gereinigten Protein-MTase Dim-5 zurückzuführen ist .

Isolierung von Biotin-markierten Proteinen aus Kernextrakten mittels magnetischer, Streptavidin-beschichteter Partikel

Die Untersuchung der Kernextraktproben im Western-Blot hat gezeigt, dass intrinsische MTase(n) eine hohe Aktivität mit AdoEnIn aufweisen, und die Click-Reaktion auch in diesem komplexen Proteingemisch selektive Markierung gewährleistet. Signale in den Bereichen von 10 – 15 kDa konnten markierten Histonen zugeordnet werden. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte das Denaturieren von Proteinen und die Bildung von Aggregaten weitgehend verhindert werden. Dabei stellte sich heraus, dass auch in den Bereichen höherer Molekulargewichte Proteine markiert werden und als getrennte Signale detektiert werden könnten. Um genau bestimmen zu können, um welche Proteine es sich handelt, sollen sie massenspektrometrisch analysiert werden. Dazu müssen biotinylierte von nicht-markierten Proteinen getrennt werden. Dies soll mit magnetischen Partikeln erfolgen, die mit Streptavidin beschichtet sind. Biotinylierte Substrate binden über Streptavidin an die Partikel und können mit einem Magneten vom restlichen Extrakt getrennt werden. Durch Erhitzen mit SDS wird die Biotin-Streptavidin Bindung gelöst, und die gebundenen Proteine können im SDS-Gel analysiert werden. In Abbildung 34 ist ein Beispiel abgebildet. Die Kernextrakt-Proben vor der Abtrennung der markierten Proteine (0.5% der Ansätze) zeigen, dass in allen Reaktionen die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde.

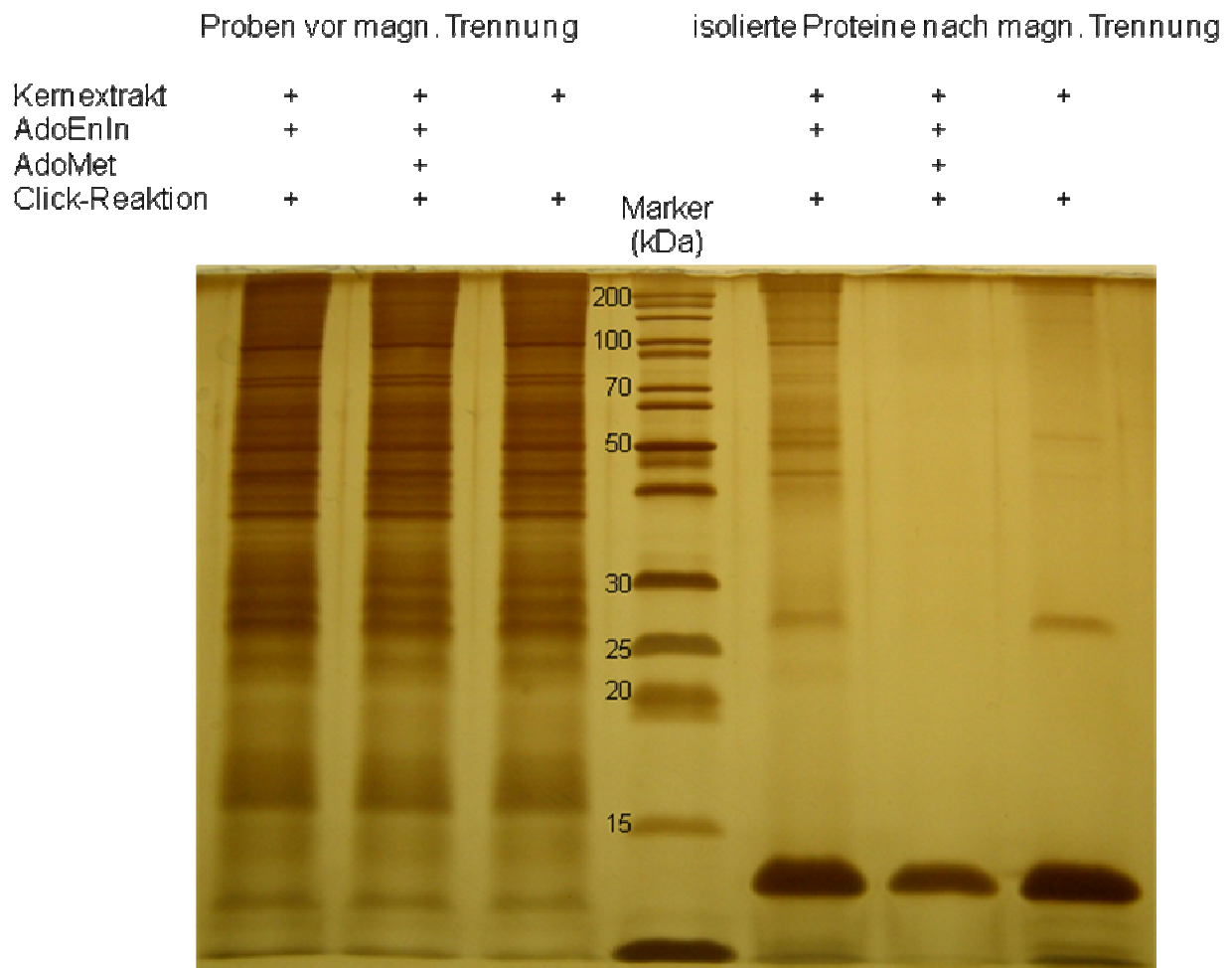


Abbildung 34: SDS-PAGE der Kernextraktproben vor und nach der Trennung mit magnetischen Streptavidin - beschichteten Partikeln. Die Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

In den Proben der mit den magnetischen Partikeln isolierten Proteine sieht man im Molekulargewichtsbereich um 13 kDa starke Banden. Diese stammen von Streptavidin-Monomeren, die sich beim Erhitzen der Proben von den Partikeln gelöst haben. Darunter könnten mögliche Banden isolierter Histone verdeckt sein, da sie ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen. Dieser Kernextrakt ist nach einem anderen Reinigungsprotokoll hergestellt worden als derjenige, mit dem die Proben für die Western-Blots hergestellt worden sind (siehe 6.4.15). In dieser Präparation können viel geringere Mengen an Histonen vorhanden sein als in der vorhergehenden Präparation. Damit könnte die Konzentration an markierten und isolierten Histonen könnte so gering sein, dass die Detektionsgrenze unterschritten wird. Die isolierten Proteine aus der Reaktion von Kernextrakt mit AdoEnIn ähneln im Bandenmuster der entsprechenden Reaktion mit Detektion durch Western-Blot und einzelne Banden sind deutlich voneinander getrennt erkennbar. In der Kontrolle mit AdoMet ist vor der Modifikationsreaktion mit AdoEnIn eine Methylierung durchgeführt worden, so

dass Zielpositionen von MTasen mit Methylgruppen abgesättigt sind und die Seitenkette des synthetischen Cofaktors nicht mehr übertragen werden kann. In dieser Probe werden keine Proteine isoliert. Die Kontrolle mit Kernextrakt aber ohne AdoEnIn zeigt die Banden von Proteinen, die in der Zelle auf natürlichem Weg biotinyliert werden. Dass diese Banden in der AdoMet-Kontrolle nicht sichtbar werden liegt daran, dass in dieser Spur weniger Gesamtprotein aufgetragen ist. Das ist daran zu erkennen, dass die Streptavidin-Bande etwas weniger intensiv ist als in den anderen beiden Spuren.

Alle Proteinbanden in der Spur der Kernextrakt-Kontrolle ohne AdoEnIn finden sich auch in der eigentlichen Reaktion wieder. Alle übrigen Proteinbanden treten aber in keiner der beiden Kontrollen auf. Diese sind somit spezifisch markierte Proteine. Die isolierten Proteine wären somit entweder Substrate von Protein-MTasen in der Zelle, oder MTasen selbst (Selbstmodifikation).

Ein weiterer Markierungs-Ansatz wird analog mit Kernextrakt und AdoEnIn hergestellt. Eine Hälfte der markierten Proteine wird an die magnetischen Streptavidin-Partikel gebunden zur massenspektrometrischen Analyse geschickt. Die andere Hälfte der markierten Proteine wird durch Erhitzen von den Partikeln gelöst, durch SDS-PAGE aufgetrennt und einzelne Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Diese sollen ebenso mittels Massespektrometrie untersucht werden. Beide Proben werden vor der Analyse tryptisch fragmentiert. Die ausgeschnittenen Gelbanden enthalten zu wenig Protein so dass hier keine Proteinfragmente identifiziert werden können. In der Probe, die direkt von den Partikeln eluiert und gemessen wurde, werden Peptide von 300 verschiedenen Proteinen als mögliche Treffer identifiziert. Diese Menge an Substraten erscheint durchaus möglich, bedenkt man die große Anzahl an MTasen in eukaryotischen Zellen. Allerdings ist es erstaunlich, dass alle diese Substrate so stark markiert werden, dass sie über der Nachweisgrenze liegen. Sortiert man die Proteine aus, die nur anhand eines Peptid-fragmentes identifiziert wurden, sowie alle Keratine, die von Verunreinigungen bei der Präparation der Proben stammen, bleiben noch 108 Proteine übrig (Abbildung 35).

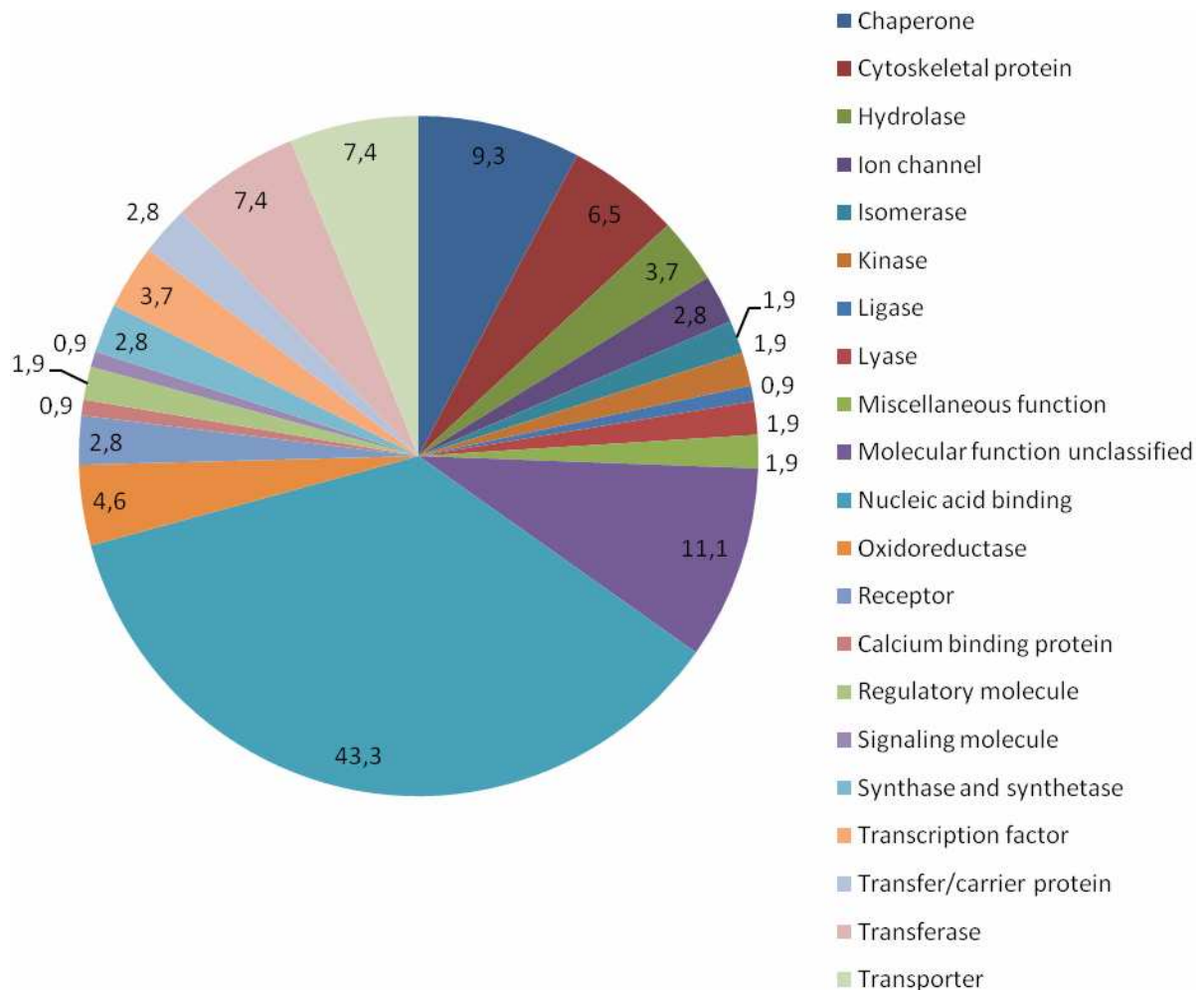


Abbildung 35: Klassifizierung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine nach ihrer molekularen Funktion. Das Kuchendiagramm zeigt den jeweiligen Anteil der Proteine an der ihnen zugeordneten Funktion. Die große Gruppe der Nukleinsäure-bindenden Proteine und die Transkriptionsfaktoren sind anhand ihrer zellulären Funktion besonders wahrscheinliche Substrate von Protein-MTasen.

Unter den isolierten Proteinen befinden sich Histon H2A, H2B und H4. Histon H3 wird nicht gefunden, was daran liegen kann, dass gerade diese Histon-Fragmente schlecht ionisierbar sind und nicht detektiert werden können (Dr. Nordhoff, persönliche Mitteilung). Ein hoher Anteil der identifizierten Proteine sind Transkriptionsfaktoren, Ribonukleoproteine, sowie weitere RNA und mRNA bindende Proteine (unter den Cytoskelett-Proteinen), welche an der Transkription und Translation beteiligt sind. Bestandteile der *High-Mobility Group* wurden identifiziert, die an dynamischen Chromatin-Umlagerungen beteiligt sind. Es scheint wahrscheinlich, dass diese Proteine wirkliche Substrate sein können, da sie direkt an der

Regulation der Genexpression durch vielfältige Funktionen beteiligt sind. Besonders interessant ist, dass nur eine MTase gefunden wird (Serin-Hydroxymethyltransferase). Die Selbstmodifikation, wie sie bei Dim-5 beobachtet wird, scheint hier nicht stark ausgeprägt zu sein. Da allerdings auch nicht-markierte Proteine an den Partikeln haften können, muss dieser unspezifische Hintergrund durch Vermessen zusätzlicher Kontrollen näher bestimmt werden. Prinzipiell ist der Ansatz, markierte Substrate von Protein-MTasen aus Zellextrakten zu isolieren, und sie sogar zu identifizieren, erfolgreich. Die massenspektrometrische Analyse markierter Proteine aus humanem Zellextrakt ergibt einige sehr wahrscheinliche Treffer. Die gefundenen Substrate lassen sich noch nicht bestimmten MTasen zuordnen, da in den verwendeten Extrakten keine MTase überexprimiert wurde. Das Auffinden spezifischer Substrate von einzelnen Enzymen soll in weiteren Versuchen verstärkt untersucht werden.

Konstruktion, Reinigung und Aktivität der C-Terminalen Variante von MLL-4

Mit dem Modifikations-Markierungssystem sollen nicht nur beliebige Fusionsproteine mit einem Histon-Tag markiert, sondern auch neue Substrate von Protein-MTasen isoliert und identifiziert werden. Protein-MTasen kommen in eukaryotischen Zellen oft in Komplexen mit anderen Proteinen vor. In einem solchen Komplex, einem ASH2L1-Komplex (im Weiteren: ASH), wurde MTase-Aktivität gefunden (Schuchlautz, 2005; Guccione *et al.*, 2007). Die verantwortliche humane Protein-MTase ist MLL4 (jetzt KMTD2). Mittels radioaktiv markiertem AdoMet wurde K4 von Histon H3 als Substrat identifiziert. MLL4 besitzt, wie Dim-5, eine C-Terminale SET Domäne, welche das aktive Zentrum für die MTase-Aktivität enthält. Da MLL als Proto-Onkogen an der Entstehung von Leukämien beteiligt ist, ist die Erforschung potentieller neuer Substrate und Interaktionen mit anderen Proteinen von großem Interesse. Das Enzym soll rekombinant exprimiert und hinsichtlich seiner Aktivität mit AdoEnIn untersucht werden. Wenn die Alkin-Seitenkette des Cofaktors auf das natürliche Histon-Substrat übertragen werden kann, sollen im Anschluss komplexere Proteingemische mit MLL und AdoEnIn versetzt, und so modifizierte Proteine mit der Click-Reaktion biotinyliert und anschließend isoliert werden. Diese könnten neue Substrate für MLL4 darstellen.

MLL4 ist mit einem Molekulargewicht von 293.3 kDa zu groß, um rekombinant in *E.coli* exprimiert zu werden. Daher wird nur der C-terminale Teil, der die SET-Domäne beinhaltet, ab der Taspase-Schnittstelle bei Aminosäure 2061 kloniert (MLL-C). Expressionsvektoren für *E.coli* und eukaryotische Zellen werden parallel hergestellt. Aus einem gemeinsamen Entry-Klon werden dazu mit Hilfe des Gateway-Klonierungssystems zwei Expressionsvektoren

generiert, einer mit N-terminalem GST-Tag für die Expression in *E.coli* und einer mit N-terminalem HA-Tag für die Expression in humanen Zellen.

3.8.1 Expressionsversuche in *E.coli*

Zuerst soll die Expression in *E.coli* untersucht werden. Hier können die Zellen unter geringerem Aufwand kultiviert werden und es könnten höhere Expressionsausbeuten erzielt werden. Zwar ist MLL nur im Komplex mit wenigstens zwei anderen Proteinen (WDR5, RbBP5) aktiv, aber aus Bakterien gewonnenes Enzym kann nach der Reinigung einem humanen Zelllysatz zugesetzt werden, um eine höhere Konzentration an MLL zur Substratmarkierung zu erhalten. Im Lysat könnten dann aktive Proteinkomplexe mit den intrinsischen Untereinheiten gebildet werden. Das GST-MLL-C Konstrukt hat ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Nach der Transformation und Induktion in *E.coli* Rosetta-Zellen ist im SDS-Gel des Zelllysats keine deutliche Expressionsbande sichtbar. Die Expression des Enzyms könnte durch sein Molekulargewicht, welches bei *E.coli* limitierend sein kann, gering ausfallen. Auch nach einer Glutathion-Affinitätschromatographie ist die gewünschte Proteinbande nicht deutlicher zu erkennen und im Western-Blot mit einem GST-spezifischen Antikörper kann das gewünschte Protein nicht eindeutig identifiziert werden. Das erhaltene Proteingemisch wird mit AdoMet und Histon H3 auf MTase-Aktivität getestet. Der Methylierungsstatus soll im Western-Blot mit Antikörpern gegen mono-, di- und trimethyliertem H3K4 detektiert werden, doch mit keinem der Antikörper kann eine Methylierung nachgewiesen werden. Auch ein Markierungstest mit AdoEnIn und Biotinazid verläuft negativ. In einem weiteren Versuch wird das Proteingemisch mit humanem Zelllysatz versetzt. Auch hier kann keine Aktivität festgestellt werden.

3.8.2 Expression und Lokalisation von MLL-C in humanen Zellen

MLL-C soll daraufhin in humanen Zellkulturen exprimiert werden. Dazu werden HEK 293-T Zellen mit dem HA-MLL-C Konstrukt transfiziert. Im Zelllysatz kann das Protein mit einem HA-Antikörper nachgewiesen werden. Das MLL-Protein wird mittels Immunopräzipitation mit einem HA-Antikörper aus Lysaten der ganzen Zelle isoliert. Dann soll festgestellt werden, ob das Enzym aktiv ist und H3K4 methylieren kann. Die Ansätze werden durch Western-Blot mit den oben genannten Antikörpern analysiert. Eine deutliche Bande entsteht in der Reaktion mit dem Trimethyl-H3K4-Antikörper auf Laufhöhe von Histon H3. Mit dem Mono- und dem Dimethyl-H3K4-Antikörper entstehen nur Hintergrundsignale (Abbildung 36).

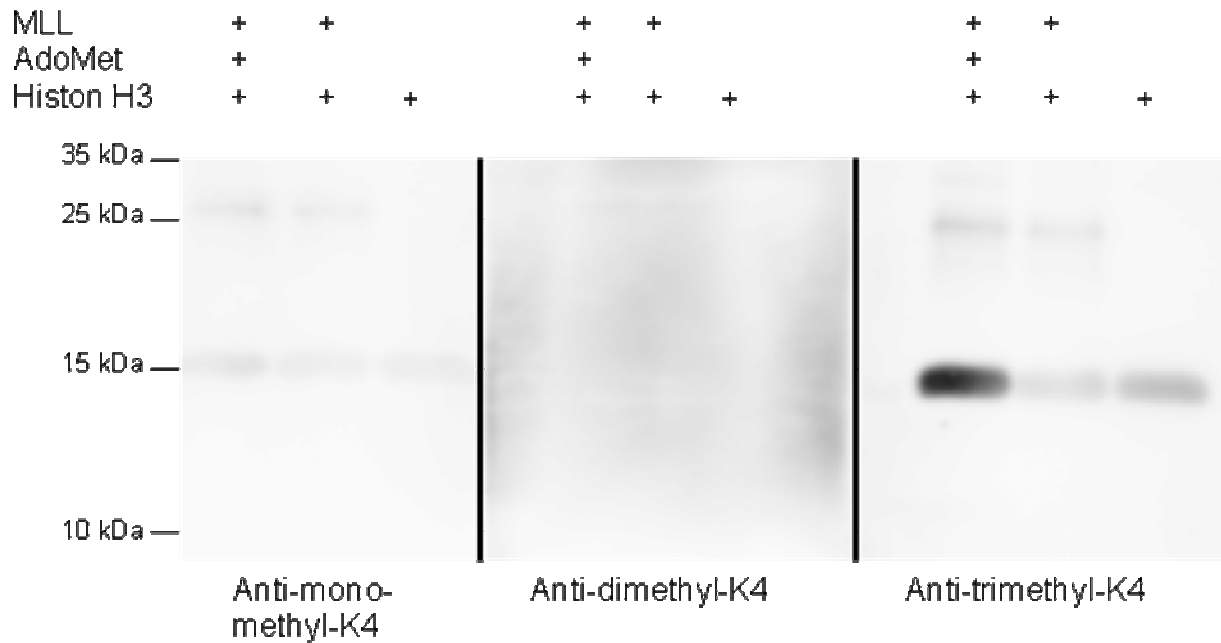


Abbildung 36: Western-Blot der Methylierung von Histon H3 mit immunpräzipitiertem MLL und AdoMet. Das stärkste Signal entsteht in der Reaktion mit dem Trimethyl-H43K4-Antikörper. Die Reaktionen wurden als Triplikate angefertigt und mit Mono-,Di- und Trimethyl-H3K4-Antikörpern mittels einer Peroxidase-Reaktion detektiert.

MLL-C zeigt deutliche Aktivität mit dem natürlichen Substrat Histon H3 und liefert methyliertes K4. Der Umstand, dass der Trimethyl-H3K4-Antikörper das stärkste Signal liefert, deutet darauf hin, dass nicht nur die Komponenten für Substratbindung und Stabilität des Komplexes (WDR5, RbBP5), sondern auch ASH in großem Maß in den Zellen vorhanden sein müssen. ASH ist als ein Modulator beschrieben, in dessen Anwesenheit überwiegend Trimethyl-K4 gebildet wird. Ohne ASH überwiegt das dimethylierte Produkt (Steward *et al.*, 2006). Trotz Überexpression von HA-MLL-C scheinen genügend Komponenten zur Bildung aktiver MLL-Komplexe in den Zellen vorhanden zu sein.

3.8.3 Nachweis der Aktivität von HA-MLL-C mit AdoEnIn und Histon H3

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das rekombinant exprimierte Enzym über MTase-Aktivität verfügt soll es jetzt mit dem Cofaktor-Analogon AdoEnIn getestet werden. Die Reaktion wird mit dem immunpräzipitierten HA-MLL-C und Histon H3 durchgeführt. Anschließend wird in allen Proben die Click-Reaktion mit Biotinazid durchgeführt. Analog zur Reaktion mit Dim-5 und Histon H3 soll biotinyliertes Protein im Western-Blot mit Peroxidase-gekuppeltem Avidin detektiert werden.

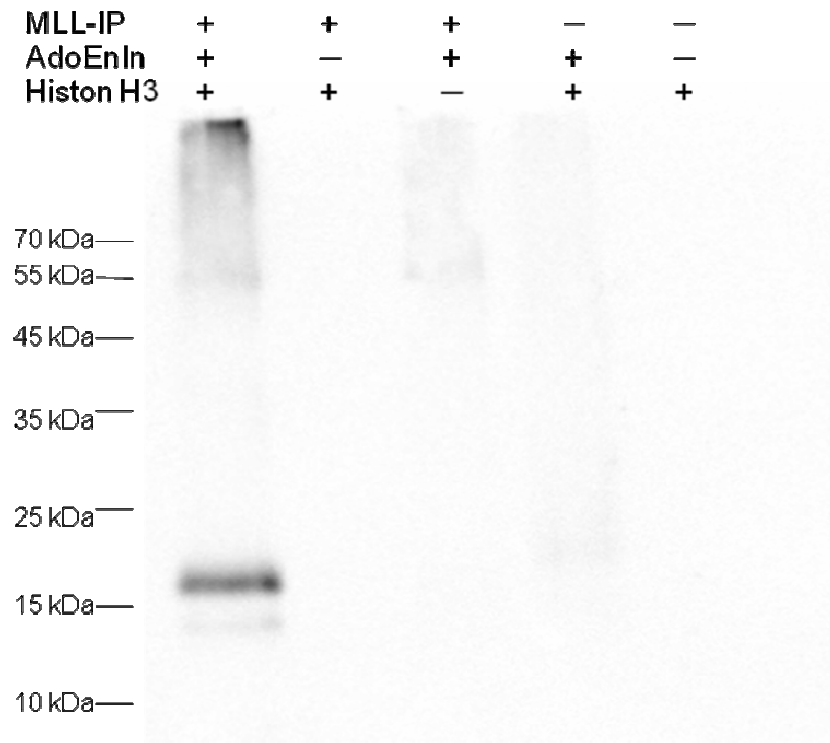


Abbildung 37: Aktivität von HA-MLL-C mit AdoEnIn und Histon H3. Die Detektion im Western-Blot erfolgte nach Click-Reaktion mit Biotinazid durch Avidin-Peroxidase-Färbung.

Abbildung 37 zeigt in den Proben mit HA-MLL-C, AdoEnIn und Histon H3 eine deutliche Bande bei ca. 15 kDa. In allen Kontrollen fehlt diese. Sie entspricht dem biotinyliertem Histon H3. Das entstandene Signal kann auf enzymatische Aktivität des MLL-Fragmentes mit AdoEnIn und eine Übertragung der AdoEnIn-Seitenkette auf Histon H3 zurückgeführt werden. In dem höhermolekularen Bereich über 55 kDa finden sich weitere Signale, die allerdings nicht als einzelne scharfe Banden auftreten. Hier könnte es sich um weitere Reaktionen von HA-MLL-C mit möglichen anderen Substraten handeln. Die Reinigung des MLL-Fragmentes durch Immunpräzipitation wird in einem Puffer durchgeführt, der das Isolieren von Proteinkomplexen erlaubt. So müssen z.B. die für die enzymatische Aktivität von HA-MLL-C benötigten Partner in dem Gemisch vorhanden sein. Auf diese könnten auch mögliche MLL-gebundene Substrate aus den Zellen isoliert worden sein. In der Reaktion mit AdoEnIn könnten diese dann auch modifiziert und markiert worden sein.

3.8.4 Aktivität von MLL in einem ASH2L-Komplex

Die MTase-Aktivität von MLL wurde in einem affinitätsgereinigten ASH-Komplex entdeckt und untersucht (Schuchlautz, 2005). Es soll untersucht werden, ob die Aktivität des natürlichen, nicht getaggen MLL-Enzyms im ASH-Komplex ausreicht, um Histon H3 mit AdoEnIn zu modifizieren. Die Proben werden im Western-Blot untersucht (Abbildung 38).

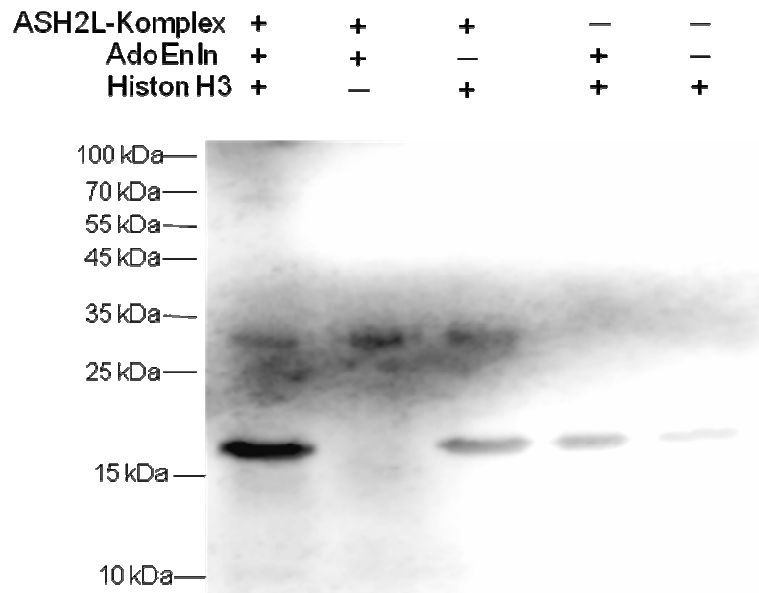


Abbildung 38: Aktivität des ASH-Komplexes mit AdoEnIn und Histon H3. Die Detektion im Western-Blot erfolgte nach Click-Reaktion mit Biotinazid durch Avidin-Peroxidase-Färbung. Das deutliche Signal in der ersten Spur bei ca. 15 kDa stammt vom biotinylierten Histon H3, welches in den Kontrollreaktionen leichten Hintergrund zeigt. Die Bande bei ca. 30 kDa stammt aus dem ASH-Komplex.

Zwar ist in allen Ansätzen, in denen Histon H3 vorhanden ist, ein Hintergrundsignal zu sehen, das Signal in der Markierungsreaktion zeigt aber die größte Intensität. Wahrscheinlich ist der Hintergrund in den Kontrollen mit Histon in diesem Western-Blot höher als in denen mit gereinigten Enzymen, da die Detektionsdauer hier deutlich länger war. Die Bande bei ca. 30 kDa stammt aus dem ASH-Komplex, hierbei könnte es sich um ein natürlich biotinyliertes Protein handeln. Die geringe Konzentration an MLL4 in dem Komplex reicht aber, um das Histon mit der EnIn-Seitenkette modifizieren zu können. Wahrscheinlich kann ein Enzym sogar mehrere Übertragungsreaktionen katalysieren. Somit eignet sich dieser ASH-Komplex auch zur Markierung von MLL4-Substraten mit AdoEnIn.

3.8.5 Expression und Lokalisation von HA-MLL-C

Im nächsten Schritt sollen in einem Lysat aus HEK 293-T Zellen, die vorher mit HA-MLL-C transient transfiziert wurden, neben Histon H3 auch andere mögliche Substrate markiert werden. Aufgrund der Annahme, dass sich potentielle weitere Substrate von MLL4 im Kern befinden, sollen die cytoplasmatischen, und daher eher uninteressanten Proteine abgetrennt, und Kernextrakte hergestellt werden. Der Kernextrakt mit dem exprimierten HA-MLL-C soll mit AdoEnIn versetzt werden, mögliche Substrate mit der EnIn-Seitenkette modifiziert und durch die Click-Reaktion biotinyliert werden. Vorher soll eine immunohistologische Färbung zeigen, ob das rekombinante Enzym wirklich überwiegend im Zellkern lokalisiert ist (Abbildung 39). Dazu wird HA-MLL-C in HeLa Zellen exprimiert, und die Zellen auf Glasträgern fixiert. HA-MLL-C wird mit einem HA-spezifischen Antikörper und einem Cy3-markierten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Für diesen Versuch werden statt der sonst verwendeten HEK 293-T Zellen HeLa-Zellen benutzt, da sie adheränter sind und während des Färbeprozesses nicht von den Glasträgern gewaschen werden. Zur Visualisierung der Zellkerne wird die Probe zusätzlich mit Hoechst 33258 gefärbt, einem Fluoreszenzmarker, welcher in die DNA interkaliert. Die gefärbten Zellen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

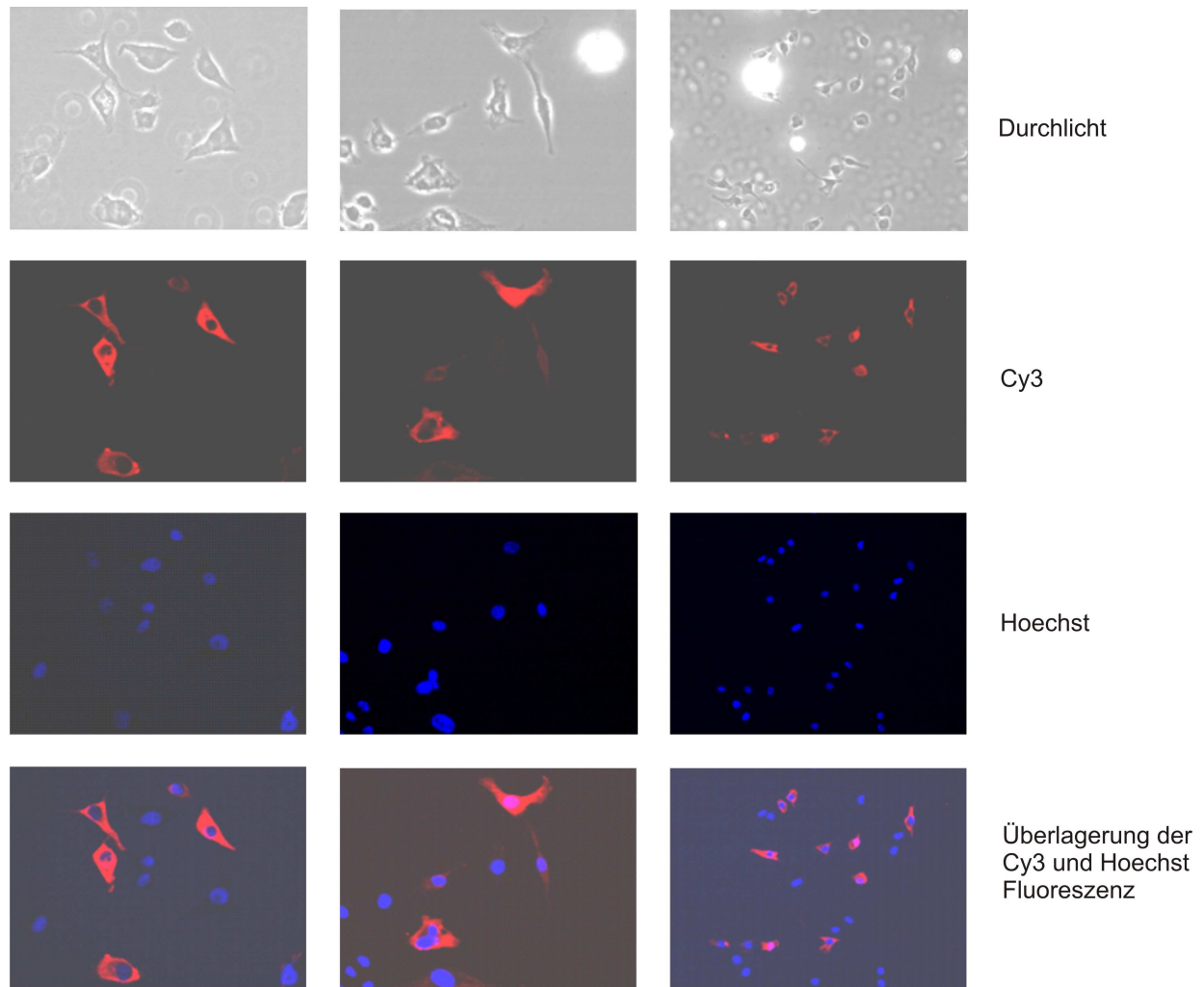


Abbildung 39: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der mit Cy3-gefärbten HA-MLL-C Proteine (rot) und der Hoechst 33258-gefärbten DNA (blau). Die Fluoreszenzmarker wurden jeweils getrennt bei verschiedenen Wellenlängen (545 nm und 346 nm) angeregt und die Emission aufgenommen. Ganze Zellen wurden bei Durchlicht aufgenommen (oben). Die unterste Zeile zeigt die übereinandergelegten Ausschnitte der Cy3- und Hoechst-Fluoreszenz.

Da Cy3 und Hoechst bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden, sind die Ausschnitte nacheinander aufgenommen worden. Die Hoechst-Färbung zeigt die Zellkerne in blau, die Stellen, an denen HA-MLL in den Zellen lokalisiert ist, sind rot gefärbt. Durch das Übereinanderlagern der beiden Fluoreszenzbilder wird deutlich, in welchem Zellkompartiment HA-MLL-C lokalisiert ist. Überwiegend befindet sich das Enzym im Cytoplasma. In einigen Zellen ist das Protein aber vollständig im Kern lokalisiert. Wie durch Sequenzvergleiche festgestellt wurde, sind die vier Lokalisations-Sequenzen für den Transport in den Kern (NLS) jeweils zweigeteilt und befinden sich im N-terminalen Teil (MLL-N), vor der Taspase-Schnittstelle. Zur nukleären Lokalisation müssen der N- und C-

Terminus, wie bei MLL1 (Hsieh *et al.*, 2003), wahrscheinlich dimerisieren. Der rekombinant exprimierte C-terminale Teil müsste um in den Kern zu gelangen mit dem endogenen N-terminalen Teil Hetero-Dimere bilden. Man erwartet also eine Verteilung von rekombinantem HA-MLL-C im Cytoplasma und im Kern. Der Versuch zeigt aber, dass das Protein entweder im Kern oder im Cytoplasma zu finden ist. In wenigen Zellen befindet sich HA-MLL-C in beiden Kompartimenten. Anscheinend kann das Fragment auch ohne Dimerisierung mit dem N-terminalen Teil in den Kern gelangen. Diese Lokalisation könnte wegen der beobachteten Entweder-Oder-Verteilung zellzyklisch bedingt sein.

Mit diesem Versuch wird deutlich, dass es durch Überexpression von HA-MLL-C zu keiner Anreicherung des Enzyms im Zellkern kommt. Bei der Herstellung von Kernextrakten ginge ein Großteil des rekombinanten Proteins verloren und die angestrebte Konzentrationserhöhung von MLL zur Markierung weiterer Substrate wird nicht erreicht.

3.8.6 Versuche zur Markierung von Proteinen in humanen Kernextrakten mit immuno-präzipitiertem HA-MLL-C

Um die Konzentration an MLL im Zelllysate erhöhen zu können, wird die immunopräzipitierte HA-MLL-C Kernextrakten aus nicht-transfizierten Zellen zugesetzt. Die damit erfolgende Erhöhung der enzymatischen Aktivität soll eine stärkere Markierung der MLL-spezifischen Substrate bewirken, die sich von den durch intrinsische MTase-Aktivität markierten Proteinen unterscheiden lassen sollen. In dem Bandenmuster der isolierten Proteine lässt sich zwischen der Probe mit bzw. ohne immunopräzipitiertem MLL jedoch kein Unterschied erkennen (Abbildung 40).

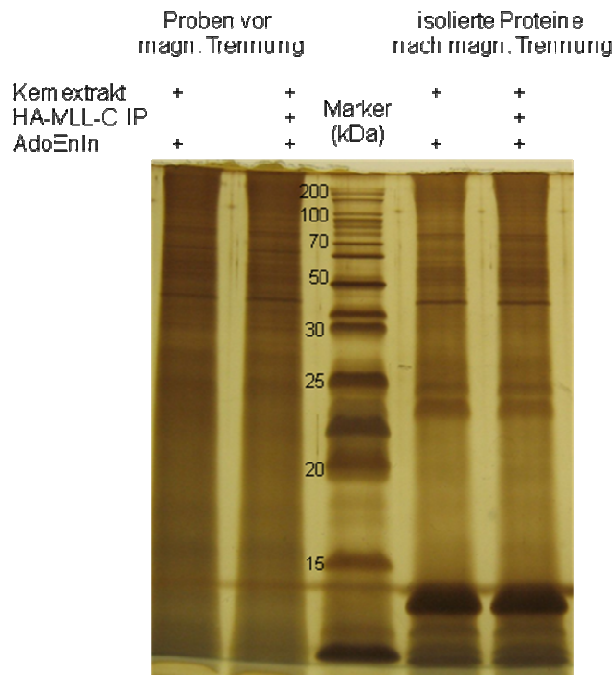


Abbildung 40: SDS-PAGE der Kernextraktproben ohne und mit Zusatz von Ha-MLL-C IP vor und nach der Trennung mit magnetischen Streptavidin - beschichteten Partikeln. Die Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht

Durch die empfindlichere Massenspektrometrie könnten vielleicht einzelne Proteine identifiziert werden, die nur in der Probe mit zugesetztem HA-MLL-C zu finden sind. Das HA-MLL-C Immunopräzipitat enthält neben dem exprimierten Enzym viele Proteine, von denen die meisten wahrscheinlich unspezifisch gebunden sind. Durch alternative Reinigungsmethoden könnte das Enzym sauberer präpariert, und genauer dosiert eingesetzt werden. Man könnte die Markierungsversuche in weniger komplexen Systemen als ganzen Kernextrakten durchführen, und z.B. eine Unterteilung des Extraktes in einzelne Fraktionen mit gestaffelten Molekulargewichten vornehmen. Die wenigen zusätzlichen Proteinbanden, die durch das Markieren MLL-spezifischer Substrate auftreten, ließen sich wahrscheinlich erst so detektieren.

Mit dem Einsatz des AdoMet-Analogons AdoEnIn für Substratmodifikation durch Protein-MTasen und die bioorthogonale Biotinylierung (oder alternative Markierung) können die Substrate direkt isoliert und analysiert werden. Eine andere Methode, wodurch Nicht-Histon-Substrate der Protein-MTase G9a gefunden worden, erfordert die Aufstellung eines Spezifitätsprofils, Sequenzvergleiche der Substratsequenz mit Protein-Datenbanken, die darauffolgende Herstellung von Peptidbibliotheken, Klonierung rekombinanter Proteine, bis

die Substrate erstmals in zellulären Umgebungen untersucht werden können (Rathert *et al.*, 2008). Die Entdeckung von p53 und TAF10 als Substrat der Protein-MTase SET-9 benötigte auch die Klonierung und rekombinante Expression einiger Proteine und radioaktive *in vitro* Assays (Chuikov *et al.*, 2004; Kouskouti *et al.*, 2004). Bis jetzt konnten mit p53, TAF7 , TAF10 und VEGFR1 vier Nicht-Histon-Substrate von Säugern gefunden werden, die an Lysin-Resten methyliert werden (Huang & Berger, 2008). Mit dem neuen Modifikations-Markierungssystem könnten mit nur einem Klonierungsexperiment (für die entsprechende MTase) die Substrate aus Zelllysaten isolieren werden. Nach weiterer Optimierung des Systems könnte es auch *in vivo* eingesetzt werden. Erstellte man eine kleine Bibliothek an Cofaktor-Analoga hätte man genug Variationsbreite, falls der AdoEnIn-Cofaktor von einem Enzym nicht genutzt werden kann. Außerdem erlaubt das System nicht nur die Markierung von Proteinen, um sie isolieren zu können, man könnte die Proteinsubstrate auch mit Fluoreszenzmarkern koppeln und mikroskopisch untersuchen.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Histone und davon abgeleitete Peptide durch Protein-MTasen und AdoMet-Analoga mit chemischen Gruppen modifiziert. In einer bioorthogonalen Reaktion wurden diese anschließend mit einem Fluorophor bzw. Biotin markiert. Die Anwendung dieses zweistufigen Markierungssystems konnte von aufgereinigten Substratproteinen und Enzymen auf Proteinkomplexe und Zellextrakte erweitert werden, so dass Histone als auch Nicht-Histonproteine durch die zelleigene Protein-MTase-Aktivität markiert werden konnten.

4.1 Entwicklung eines Protein-Modifikations und Markierungssystems

4.1.1 Markierung von einem Histon-Peptid und Histon H3 durch die HMTase Dim-5

Synthetische AdoMet-Analoga wurden bis jetzt nur mit DNA-MTasen für eine sequenzspezifische Übertragung funktioneller Gruppen und Reporter auf Zielbasen in der DNA verwendet und sollten in dieser Arbeit für eine Modifikation von Proteinen durch Protein-MTasen eingesetzt werden. In einer nachfolgenden chemischen Reaktion sollten Reporter an die funktionelle Gruppe geknüpft werden, und so ein sequenzspezifisches Markierungssystem für Proteine entstehen.

Die aus dem Pilz *N.crassa* stammende Histon H3K9-spezifische Protein-MTase Dim-5 wurde für erste Untersuchungen mit synthetischen Cofaktoren ausgewählt. Nachdem in Reaktionen mit radioaktiv (Tritium-) markierten AdoMet und Histon-Oktamer aus Kalbsthymus als Substrat festgestellt wurde, dass Dim-5 aktiv ist, wurden verschiedene synthetische Cofaktoren in Aktivitätstests eingesetzt. Als Substrat diente hier ein Fluorescein-markiertes Histon-Peptid das mittels RP-HPLC und Fluoreszenzdetektor einfach detektiert werden kann. Die Aziridin-Cofaktoren Az und 6BAz konnten nicht mit dem Peptid gekuppelt werden, was wahrscheinlich am hohen pH-Optimum der Dim-5 liegt. Dagegen konnten die Seitenketten der doppelt aktivierten Cofaktoren AdoPropen und AdoButin von Dim-5 auf das Peptid übertragen werden. Massenspektrometrisch wurde gezeigt, dass im Gegensatz zur natürlichen Methyltransferase-Reaktion, in der das Substrat trimethyliert wird, nur eine Seitenkette übertragen wird. Da die Seitenketten dieser beiden Cofaktoren keine funktionelle Gruppe tragen, die in einer bioorthogonalen Reaktion leicht eingesetzt werden kann, wurde ein neuer Cofaktor speziell für den Einsatz in nachfolgenden Click-Reaktionen synthetisiert. Das AdoMet-Analogon AdoEnIn wird von Dim-5 umgesetzt. Im Gegensatz zu AdoPropen, welches von dem Enzym katalytisch umgesetzt werden kann, wird eine gute Ausbeute mit

AdoEnIn nur bei stöchiometrischen Verhältnissen von Enzym zu Peptidsubstrat erzielt. Dim-5 überträgt ebenfalls nur eine Seitenkette von AdoEnIn auf das Peptid. Eine Peptid-Sequenzierung zeigte, dass die Sequenzspezifität mit dem synthetischen Cofaktor bestehen bleibt und nur K9 modifiziert wird.

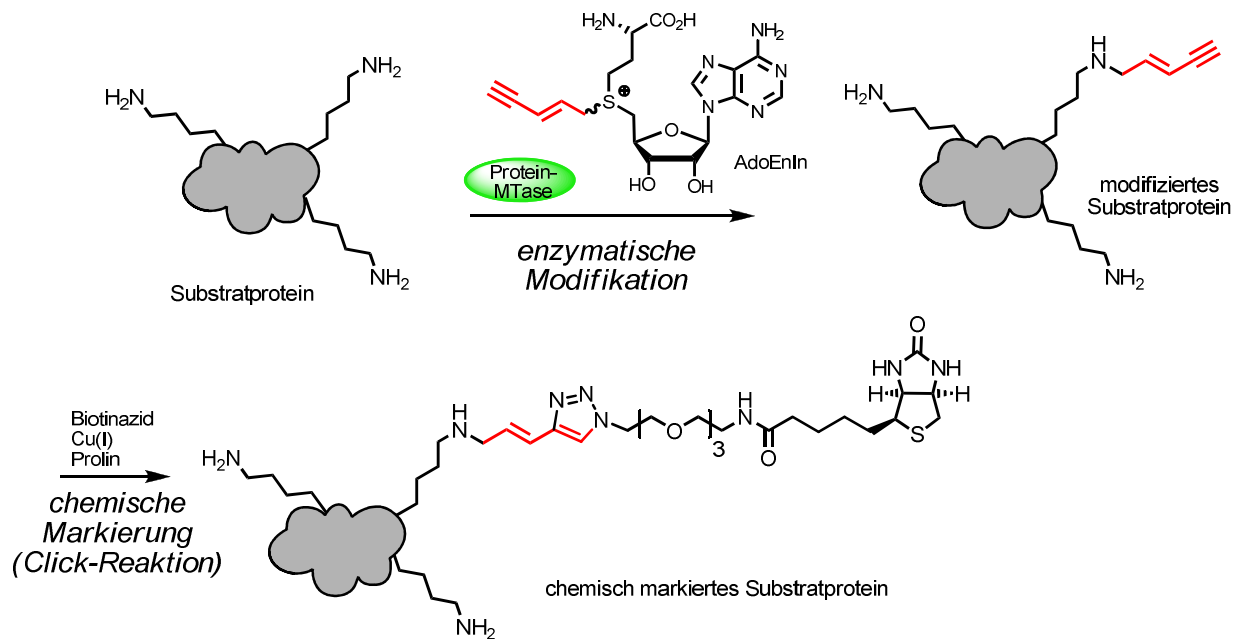
4.1.2 Markierung des modifizierten Peptids durch eine bioorthogonale chemische Reaktion

Mit der Übertragung der Seitenkette von AdoEnIn wurde ein terminales Alkin enzymkatalysiert in das Substrat eingeführt. In einer Cu(I)-katalysierten Reaktion, der sogenannten Click-Reaktion, die bioorthogonalen Charakter hat und *in vitro* in biologischen Systemen eingesetzt werden kann, kann eine Azid-derivatisierte mit Reportergruppe mit dem Alkin-modifizierten Peptid gekuppelt werden. Die Reaktion ist für die Markierung von Proteinen detailliert beschrieben. Trotzdem konnte das alkinylierte Peptid mit einem Biotin-PEG-Azid zunächst nicht zur Reaktion gebracht werden. Der Grund dafür war der Einsatz des für diese Reaktionen zur Komplexbildung von Cu(I) beschriebenen Liganden TBTA. Dieser ist schlecht wasserlöslich und erfordert den Einsatz von organischen Cosolventien, was für die Löslichkeit des Peptids ungünstig ist. Erst der Einsatz von Prolin als vollständig in wässriger Umgebung löslicher Ligand erlaubte die Durchführung der Cycloaddition von alkinyliertem Peptid und Biotin-PEG-Azid. Diese Kupplung konnte massenspektrometrisch bestätigt werden.

4.1.3 Modifikation von Histon H3 mit AdoEnIn und Dim-5 und anschließende Markierung mit Biotin

Nachdem die Reaktionsbedingungen für die enzymatische Übertragung der Seitenkette und der chemischen Biotinylierung durch Click-Reaktion mit dem Histon-Peptid optimiert wurden, sollten sie zur Markierung vollständiger Proteine angewendet werden. Histon H3 wurde von Dim-5 mit der AdoEnIn-Seitenkette modifiziert und durch Click-Reaktion mit Biotin-PEG-Azid biotinyliert. Ein allgemeines Reaktionsschema für die zweistufige Markierungsreaktion ist in Schema 14 gezeigt.

Zur Detektion des markierten Proteins wurde das Reaktionsgemisch durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Peroxidase-gekoppeltem Avidin detektiert. Neben dem biotinylierten Histon, welches das stärkste Signal ergab, wurde auch Dim-5 detektiert. Das Enzym markiert sich also selbst, vor allem in Reaktionen ohne Substrat. Dies erfolgt wahrscheinlich durch ungünstige Bindung des Cofaktor-Analogons im aktiven Zentrum.



Schema 14: Zweistufige sequenzspezifische Markierung eines Substratproteins mit Biotin. Im ersten Schritt erfolgt die enzymatische Modifikation durch eine Protein-MTase und das AdoMet-Analogon AdoEnIn, und anschließend die chemische Biotinylierung mit Hilfe der Click-Reaktion.

Zur Markierung eines Proteins mit diesem Modifikations-Markierungssystem wurde M.SssI, eine DNA-MTase, mit einem Histon-Tag versehen. Dim-5 kann dieses Fusionsprotein als Substrat mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet nutzen. Leider zeigte M.SssI mit dem synthetischen Cofaktor AdoEnIn ebenfalls eine starke Tendenz zur Selbstmodifikation. Außerdem sind die Reaktionsbedingungen beider Enzyme schlecht vereinbar sind. Somit eignen sich Fusionsproteine von M.SssI schlecht für eine Anwendung mit Dim-5 und AdoEnIn.

4.1.4 Modifikation von Histon H3 durch Proteinkomplexe

Das Cofaktor-Analogon AdoEnIn wurde mit eukaryotischen Protein-MTasen getestet. Diese lassen sich aufgrund ihrer Größe schlecht in *E.coli* exprimieren. Außerdem benötigen sie andere Proteine, mit denen sie in einem Komplex ihre MTase-Aktivität entfalten können. Der ASH2-Proteinkomplex enthält MLL4, eine humane H3K4 Protein-MTase. Mit dem ASH2-Komplex und AdoEnIn konnte Histon H3 alkyliert und durch die Click-Reaktion biotinyliert werden, was im Western-Blot mit dem oben beschriebenen Avidin-Konjugat nachgewiesen werden konnte. Die MTase MLL4 liegt in diesem Komplex nur in geringen Konzentrationen vor. Trotzdem konnte das Substrat Histon H3 markiert werden und stöchiometrische Verhältnisse von Enzym und Proteinsubstrat scheinen nicht erforderlich. In

dieser Reaktion war der Hintergrund in den Kontrollen ohne Enzym im Vergleich zu den Kontrollen bei der Markierung mit Dim-5 aber deutlich höher. Um das Enzym konzentrierter einsetzen zu können wurde ein C-terminales Fragment von MLL4, das das katalytische Zentrum trägt, in einen Expressionsvektor kloniert und in *E.coli* bzw. humanen Zellen exprimiert. Während sich in *E.coli* kein aktives Protein nachweisen ließ, war, zeigte das durch Immunopräzipitation (IP) aus humaner Zellkultur gereinigte Enzym deutliche MTase-Aktivität mit AdoMet. Die Methylierung von Histon H3K4 konnte mit Methylierungs-sensitiven Antikörpern nachgewiesen werden, wobei als überwiegendes Produkt H3K4me3 entstand. Die Markierung von Histon H3 mit AdoEnIn durch die MLL4-Präparation zeigte nach chemischer Biotinylierung im Western-Blot ein mit der Dim-5 Reaktion vergleichbar starkes Signal.

4.2 Anwendung des Modifikations-Markierungssystems in zellulären Systemen

4.2.1 Detektion biotinylierter Proteine im Western-Blot

Die Enzymaktivitäten endogener Protein-MTasen in Zellextrakten wurden zur Übertragung der Seitenkette von AdoEnIn auf ihre spezifischen Substrate genutzt. Für diesen Versuch wurden Kernextrakte von HEK 293-Zellen hergestellt. Die Markierung mit Biotin erlaubt prinzipiell die Detektion aller modifizierten Proteine im Western-Blot. Bei der Detektion wurde festgestellt, dass viele Proteine während der Reaktion ausgefallen waren und Aggregate gebildet hatten. Durch eine Verkürzung der Reaktionszeiten von Modifikations- und Markierungsreaktion konnte das Ausfallen verringert werden und einzelne markierte Proteinbanden nachgewiesen werden. Zwei Banden im unteren Molekulargewichtsbereich konnten als Histon H3 und H4 identifiziert werden.

4.2.2 Isolierung biotinylierter Proteine aus Kernextrakten

Die biotinylierten Proteine konnten aus dem Kernextrakt mittels magnetischer, Streptavidin-beschichteter Partikel isoliert und durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung sichtbar gemacht werden. In einer Kontrollreaktion konnte durch vorhergehende Methylierung der Substrate mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet eine Modifikation mit AdoEnIn unterdrückt werden. In der Kontrolle wurden fast keine Proteine isoliert. Die massenpektrometrische Analyse der spezifisch markierten Proteine zeigte, dass 43% der markierten Proteine Nukleinsäuren binden.

5 Ausblick

Mit dem Cofaktor-Analogen AdoEnIn ist eine Verbindung gefunden worden, die eine bioorthogonale funktionelle Gruppe trägt und von Protein-MTasen als Cofaktor genutzt werden kann. Mit Dim-5 wurde in den Modifikationsreaktionen eine deutliche Selbstmodifikation beobachtet. Diese könnte durch das (*R*)-Epimer hervorgerufen werden, welches im aktiven Zentrum bindet, aber nicht umgesetzt wird. Der Cofaktor liegt als Epimerengemisch vor, so dass ein weiterer Reinigungsschritt zur Trennung des (*R*)- und (*S*)-Epimers günstig sein könnte. Dadurch könnte vielleicht auch eine Umsatzsteigerung erzielt werden, da das (*R*)-Epimer inhibitorisch wirken könnte. Prinzipiell sollte für die Funktionalisierung von Proteinen mit Protein-MTasen aber die Synthese neuer Cofaktor-Analoga geplant werden. Da sich die Click-Reaktion gut für Anwendungen in biologischen Systemen bis hin zu komplexen Gemischen wie Zellextrakten eignet, könnte man statt des Alkins ein Azid in eine verlängerte Seitenkette einbauen. Dies wäre auch essentiell für *in vivo* Markierungen mittels der Cu-freien Click-Reaktion, da hierfür die Substrate die Azidgruppe tragen müssen (vgl. auch Abschnitt 1.8.4). Desweiteren könnte eine Aldehydgruppe in der Seitenkette verwendet werden. Diese lässt sich auch in biologischen Umgebungen mit Aminoxy- oder Hydrazin-funktionalisierten Reportern selektiv ansteuern (Adamczyk *et al.*, 2001, Carrico *et al.*, 2005). Dabei müsste die Funktionalität von O-Heteroatomen zur doppelten Aktivierung besonders überprüft werden.

Das AdoMet-Analogen AdoPropen hat mit Dim-5 die beste Aktivität gezeigt. Zur Detektion könnte man einen spezifischen Antikörper herstellen. Durch Immunpräzipitationen könnten dann Propen-markierte Substrate aus Zellextrakten isoliert werden. Die im Vergleich zu AdoEnIn deutlich kleinere Seitenkette könnte zu weniger Nebenreaktionen, wie z.B. Selbstmodifikation führen. Auch können Reaktionen für die Derivatisierung der Doppelbindung näher untersucht werden. So sind in letzter Zeit Cross-Metathese, Oxidation mit Osmiumtetroxid oder Photo-induzierbare Cycloaddition (Lin *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008) für Protein-Markierungen eingesetzt worden.

In dieser Arbeit sind nur Lysin-spezifische MTasen untersucht worden. Als „Markierungswerkzeug“ für die Modifikation beliebiger Proteine über ein Fusionspeptid mit der Erkennungssequenz der entsprechenden MTase könnten Protein-Arginin-MTasen getestet werden. Kürzlich wurde von einer Protein-Arginin-MTase berichtet, die ein Stickstoff-Lost Analogon von AdoMet umsetzen kann (Osborne *et al.*, 2008). Auch die Synthese eines doppelt aktivierten Cofaktor-Analogons, welche die Reportergruppe in der verlängerten

Seitenkette trägt und damit das Substrat direkt markieren kann, wäre sehr interessant. Zwar liegen bei den Protein-Arginin-MTasen die Bindungstaschen für Proteinsubstrat und Cofaktor, wie bei den Protein-Lysin-MTasen auf unterschiedlichen Seiten, sie sind aber offener als die SET-Domänen Strukturen und könnten dem sterischen Anspruch der Reportergruppen eher entsprechen.

In ersten Versuchen konnten markierte Protein-Substrate für MTasen aus humanen Zellextrakten isoliert und identifiziert werden. Protein-MTasen wurden so gut wie nicht gefunden, was darauf hindeutet, dass die Markierungen durch spezifische Übertragungsreaktionen und nicht durch Selbstmodifikation stattgefunden haben. Als weitere Kontrolle muss jedoch untersucht werden, ob Proteine unspezifisch an die magnetischen Partikel binden, und sich die Markierung durch Zugabe von AdoMet oder AdoHcy unterdrücken lässt.

Die Immunopräzipitation von HA-MLL-C ist als Methode zur Enzympräparation für die Markierung von Substraten in Zellen nicht gut geeignet, da sie noch zu viele andere Proteine als Verunreinigung enthält. Die Reinigung von MLL4 über zwei Affinitätstags würde die Präparation eines funktionellen MTase-Komplexes erlauben, da ähnlich wie für den ASH2-Komplex, gebundene Untereinheiten mit isoliert werden könnten. Dieser MLL4-Komplex könnte auch Zellextrakten zugesetzt werden, um die Konzentration des Enzyms zu steigern. Während des Zellwachstums könnte z.B. durch den Einsatz von MTase-Inhibitoren die Methylierung unterdrückt werden, damit mehr nicht-methylierte Substrate zur Verfügung stehen und die Markierung ausgeprägter erfolgen kann. Dies könnte auch durch Verminderung der Expression von MLL4 durch RNAi erreicht werden, so dass die MLL4-spezifischen Substrate weniger methyliert sind und damit zugänglich für eine Modifikation mit gereinigtem Enzym und AdoEnIn werden.

6 Materialien und Methoden

6.1 Materialien

Soweit nicht anders angegeben, waren alle verwendeten Chemikalien vom Reinheitsgrad puriss. p.a. bzw. p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acetonitril (HPLC grade)	Fisher Scientific (Schwerte)
Acrylamid-Bis-Lösung (37.5:1)	Serva (Heidelberg)
S-(5'-Adenosyl)-L-[methyl- ³ H]-methionin	GE Healthcare (München)
S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-1,4-butan-disulfonat	Knoll Bioreserch (Baar, CH)
S-(5'-Adenosyl)-L-homocystein	Sigma (Steinheim)
Agar	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Allylbromid	Fluka (Taufkirchen)
Ameisensäure	J. T. Baker (Griesheim)
Ammoniumperoxosulfat	Serva (Heidelberg)
Ampicillin Natriumsalz	Gerbü (Gaiberg)
L-(+)-Arabinose	Fluka (Taufkirchen)
Ascorbinsäure Natriumsalz	Fluka (Taufkirchen)
11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin	Fluka (Taufkirchen)
D-Biotinyl-N-hydroxysuccinimid	Bachem (Bubendorf)
Borsäure	Gerbü (Gaiberg)
Bromphenolblau Natriumsalz	Serva (Heidelberg)
Rinderserum Albumin	Sigma (Steinheim)
Chloramphenicol	Gerbü (Gaiberg)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva (Heidelberg)
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce (Bonn)
Deuteriumoxid	Merck (Darmstadt)
Dichlormethan	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT)	Fluka (Taufkirchen)

Dynabeads MyOne Streptavidin C1	Invitrogen	Dynal	AS	(Oslo, Norwegen)
Essigsäure	Riedel-de-Häen (Taufkirchen)			
Ethanol	Merck (Darmstadt)			
Ethidiumbromid	Sigma (Steinheim)			
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gerbu (Gaiberg)			
D-Glucose	Gerbu (Gaiberg)			
L-Glutathion (reduziert)	Sigma (Steinheim)			
Glycerin, 99%	Sigma (Steinheim)			
Glycerin, wasserfrei, 99,5%	Gerbu (Gaiberg)			
Glycin	Gerbu (Gaiberg)			
Hefeextrakt	BD Biosciences (Heidelberg)			
His-Select HC-Nickel-Affinity Gel	Sigma (Steinheim)			
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N</i> '-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	Gerbu (Gaiberg)			
Imidazol	Fluka (Taufkirchen)			
Isopropanol	Merck (Darmstadt)			
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)			
Kupfer(II)sulfat	Riedel-de-Haën (Hannover)			
Magnesiumchlorid Hexahydrat	J.T. Baker (Griesheim)			
β -Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)			
Methansulfonsäurechlorid	Chemikalienausgabe des IOC			
2-Morpholino-ethansulfonsäure (MES)	Gerbu (Gaiberg)			
Natriumacetat, wasserfrei	J.T. Baker (Griesheim)			
Natriumazid	J.T.Baker (Griesheim)			
Natriumchlorid	Gerbu (Gaiberg)			
Natriumdihydrogenphosphat	J.T. Baker (Griesheim)			
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu (Gaiberg)			
Natriumhydroxid	J.T. Baker (Griesheim)			
Octyl- β -D-glucopyranosid	Fluka (Taufkirchen)			
2-Penten-4-in-1-ol (tech. 90%)	Alfa Aesar (Karlsruhe)			
Pico ECL Western Blotting Substrate	Pierce (Bonn)			
L-Prolin	intern			

Protease Inhibitor cocktail tablets	Roche (Mannheim)
complete Mini, EDTA-free	
Protein-G Sepharose Fast Flow	Amersham
Salzsäure (37%)	Merck (Darmstadt)
Peroxydase-Avidin-Konjugat	Vector Labs
<i>trans</i> -Crotylbromid ((E)-1-Brom-2-buten), 85%	Acros (Geel)
<i>N,N,N',N'</i> -Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Acros (Geel)
Tris-Hydrochlorid	Gerbu (Gaiberg)
Tris Base	Gerbu (Gaib erg)
(tris-(Benzyltriazolylmethyl)amin) TBTA	freundlicherweise von V.F. Fokin, Scripps (USA), zur Verfügung gestellt
Triethylamin	Fluka (Taufkirchen)
Trifluoressigsäure	Riedel-de-Haën (Taufkirchen)
Triton X-100	Fluka (Taufkirchen)
Trypton	BD Biosciences (Heidelberg)
Tween-20	Gerbu (Gaiberg)
Zinksulfat Heptahydrat	Chemikalienausgabe des IOC

Materialien für die Zellkultur (eukaryotischer Zellen):

DMEM mit Glucose (4.5 g/L)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin / Streptomycin	Seromed (Wien)
10.000 Units/mL / 10.000 µg/mL	
Trypsin / EDTA	Seromed (Wien)
0.5 / 0.02% (w/v) in PBS	
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Zellkulturschalen	Sarstedt (Nümbrecht)
(Ø 6 cm, 10 cm, 15 cm)	

6.1.1 Enzyme

Kommerziell erhältliche Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
R.Bsp1407I	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
R.BstUI	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
R.NcoI	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
R.SalI	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

6.1.2 Marker und Plasmide

MassRuler DNA Ladder, Mix	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
PageRuler Unstained Protein Ladder	MBI Fermentas (St. Leon Rot)

Plasmide:

Tabelle 1: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pGEX2T-Dim-5Δ17	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit N-terminalem GST-Tag unter Kontrolle des <i>tac</i> -Promotors; enthält als Insert die Sequenz für Aminosäuren 17-318 der Dim-5 aus <i>N. crassa</i> ; kloniert über die BamHI/EcoRI Schnittstellen (Zhang, 2002). Der GST-Tag kann über eine nachgelagerte Thrombin-Erkennungssequenz abgetrennt werden. Der Vektor enthält außerdem kodierende Sequenzen für Ampicillin-Resistenz, den pBR322 Replikationsursprung, das <i>lacI</i> -Gen, und den <i>tac</i> Promotor. Das Expressionsplasmid wurde freundlicherweise von Prof. X. Cheng (Emory University, Atlanta, GA, USA) zur Verfügung gestellt.
pQE30-Clr4Δ191	Expressionsplasmid für Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag unter Kontrolle des T5-Promotors; enthält als Insert die Sequenz der Clr4 aus <i>S. pombe</i> , der N-terminus ist bis Aminosäure 191 deletiert; der C-terminus vollständig enthalten (Min <i>et al.</i> , 2002). Der His-Tag kann über eine vorgelagerte Faktor Xa Erkennungssequenz abgetrennt werden. Das Plasmid enthält ausserdem kodierende Sequenzen für Ampicillin-Resistenz, den Col EI Replikationsursprung und Lac-Operator Elemente. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. R.-M. Xu () zur Verfügung gestellt.
pET15b-SU(VAR)3-9Δ213	Expressionsplasmid für Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag unter Kontrolle des T7-Promotors, enthält als Insert die Sequenz der SU(VAR)3-9 aus <i>D. melanogaster</i> , der N-terminus ist bis Aminosäure 213 deletiert (Eskeland <i>et al.</i> , 2004). Der His-Tag kann über eine vorgelagerte Thrombin-Erkennungssequenz abgetrennt werden. Das Plasmid enthält ausserdem kodierende Sequenzen für Ampicillin-Resistenz, den pBR322 Replikationsursprung, und die <i>lacI</i> -Sequenz. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. A. Imhof (LMU München) zur Verfügung gestellt.
pDestHA	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit N-terminalem HA-Tag unter Kontrolle des humanem CMV Promotors/Enhancers in eukaryotischen Zellen. Kompatibilität für das Gateway-System wurde durch Insertion der Gateway-Rekombinationskassette in die SmaI Schnittstelle erreicht. Das Plasmid enthält Sequenzen für den SV40 Replikationsursprung, die Translations-Initiationsregion der HSV Thymidinkinase und die Splicing- und Polyadenylierungssignale von Kaninchen-β-Globin. Das Plasmid wurde in der AG Lüscher (Universitätsklinikum Aachen) hergestellt.

pBFH-MSssl	Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein mit N-terminalem Flag- <i>Tag</i> und C-terminalem His- <i>Tag</i> . Das Plasmid enthält eine kodierende Sequenz für M.Sssl und wurde freundlicherweise von Dr. A. Kiss (Biological Research Center of the Hungarian Academy of Science, Szeged, Ungarn) zur Verfügung gestellt.
GW-pDONR p221	Der Vektor zur Erstellung Gateway-kompatibler Entry-Konstrukte wurde bei Invitrogen kommerziell erworben.

6.1.3 Oligodesoxynucleotide und Primer

Alle Oligodesoxynucleotide (ODN) und Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Oligodesoxynukleotide und Primer

Bezeichnung	Sequenz
MLL4-fw-653	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGG CGTGGACGACGGCACTGACAGTGAGGCT-3'
MLL4-C-term-rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGTTA AGGAACCGACGGCAGCGCTTGGCGCC-3'
MSssl-Tag-Fw	5'-CATGGTAGCTCGCACTAAGCAAAGCTGCTCGCAAGTCTACTGGTGG CAAGGCGCCACGCAAACAGCTGG-3'
MSssl-Tag-Rev	5'-TCGACCAGCTGTTTGCGTGGCGCCTTGCCACCAGTAGACTTGCG AGCAGTTTGCTTAGTGCGAGCTAC-3'

Die Sequenzierprimer für das Konstrukt MSssl-H3-*Tag* stammten von Frau Dr. Amélie Monamie aus dem Arbeitskreis. Für Sequenzierungen von Gateway-Entry-Konstrukten (M13-Promotor) wurden kommerzielle Primer (M13uni (-21), M13rev (-29)) der Firma MWG-Biotech verwendet.

6.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien

Prokaryotische Stämme:

Tabelle 3: *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung
Dh5 α (AK Weinhold)	F' Phi80dlacZ DeltaM15 Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)phoA supE44 lambda-thi-1
XL10 (Stratagene)	TetrD (mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proABlacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]a
BL21 DE3 CodonPlus RIL (Stratagene)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> + <i>etr</i> <i>al</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Camr]

Eukaryotische Zelllinien:

Tabelle 4: Humane Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HEK 293 (ATCC CRL-1573)	Adherente ephitelische Zelllinie abgeleitet von menschlichen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK), welche mit DNA aus Adenovirus 5 stabil transfiziert worden sind. Die Ad5 DNA ist in Chromosom 19q13.2 integriert.
HEK 293T (ATCC CRL-11268)	Die von HEK 293 abgeleitete Zelllinie HEK 293T ist sehr gut transfizierbar, zusätzlich wurde das Temperatur-sensitive Gen für das SV40 T-Antigen eingefügt.
HeLa (ATCC CCL-2)	Adherente epithelische Zelllinie abgeleitet von Zervixkarzinom-Zellen (Adenokarzinom), befallen mit humanem Papillomvirus 18. P53-Expression ist gering, pRB Level normal.

6.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Epitop	Firma
Anti-HA	HA-Peptid (YPYDVPDYA)	Ratte	Der Antikörper erkennt die HA-Peptid-Sequenz (YPYDVPDYA), abgeleitet vom Influenza Hemagglutinin-Protein.	Roche
H3K4me1	Histon H3 Lysin 4 Monomethyl	Kaninchen	Synthetisches Peptid gekuppelt an KLH, abgeleitet von AS 1-100 von humanem Histon H3 monomethyliert an K4.	Abcam
H3K4me2	Histon H3 Lysin 4 Dimethyl	Kaninchen	Synthetisches Peptid gekuppelt an KLH, abgeleitet von AS 1-100 von humanem Histon H3 dimethyliert an K4.	Abcam
H3K4me3	Histon H3 Lysin 4 Trimethyl	Kaninchen	Synthetisches Peptid gekuppelt an KLH, abgeleitet von AS 1-100 von humanem Histon H3 trimethyliert an K4.	Abcam
H3K9me3	Histon H3 Lysin 9 Trimethyl	Kaninchen, polyklonal	Synthetisches Peptid gekuppelt an KLH, abgeleitet von AS 1-100 von humanem Histon H3 trimethyliert an K9.	Abcam

6.2 Geräte

6.2.1 Reinstwasser-Anlage

Das in allen Versuchen verwendete Reinstwasser wurde mit einer Milli-Q Academic Anlage mit vorgeschalteter Elix-3 Einheit (beides Millipore, Eschborn) gewonnen.

6.2.2 Zentrifugen

Volumen bis 2 mL wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D zentrifugiert. Größere Probenmengen wurden in einer Avanti J-20 Zentrifuge (Beckmann, München) mit den Rotoren JS-4.3 oder JA-17 zentrifugiert.

6.2.3 Schüttler und Inkubatoren für die Zellkultur

Bakterielle Zellkulturen wurden in einem Innova 4330 Schüttler (New Brunswick Scientific) oder in einem GFL 3031 inkubiert. Bakterielle Zellkulturen auf Agar-Platten wurden in einem Heraeus Function Line Inkubator (Kendro Laboratory Products, Hanau) angezogen.

Humane Zellkulturen wurden in einem Sanyo InCuSafe CO₂ Inkubator gehalten. Die Zelllinien HEK 293, 293T und HeLa wurden in angefeuchteter Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

6.2.4 Elektroporation

Für die Elektroporation wurde ein Micro Pulser der Firma BioRad (München) verwendet.

6.2.5 Ultraschall

Zellaufschlüsse mittels Ultraschall wurden mit einem Ultraschall-Desintegrator Sonifier II W-250 (Branson, Dietzenbach) und den Einstellungen „Output Level 8“ sowie 20% Intensity durchgeführt.

6.2.6 Gefriertrocknung

Zum Trocknen von Proben im Vakuum wurde eine Speed Vac Plus SC 110A mit der Kühleinheit Refrigerated Vapor Trap RVT 100 der Firma Savant verwendet.

6.2.7 Sterilisation

Geräte und Flüssigmedien wurden in einem Varioklav Dampfsterilisator der Firma H+P Labortechnik (Dülmen) verwendet.

6.2.8 Inkubator für zellfreie Reaktionen

Enzymatische Modifikationen, Ligationen und Click-Chemie-Reaktionen wurden in einem Mastercycler personal PCR-Gerät (Eppendorf, Köln) inkubiert. In diesem Gerät wurden auch die PCR-Reaktionen durchgeführt.

6.2.9 Visualisierung von Western-Blots

Die Detektion spezifischer Bandensignale nach Western-Blot Experimenten erfolgte mit einem Fujifilm LAS 3000 Dokumentationssystem.

6.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele wurden in ein Mini-Sub-Cell GT System gegossen. Für die Stromversorgung wurde ein Power Pac 300 (beides BioRad, München) verwendet.

6.2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Denaturierende Protein-Gelelektrophorese erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen (15%) in einem Mini PROTEAN 3 Cell System für 15 min bei 120 V und weiteren 50 min bei 150 V. Als Spannungsquelle wurde ein Power Pac 300 verwendet. Zum Trocknen der SDS-Gele wurde ein Model 583 Gel Dryer verwendet (alles BioRad, München).

6.2.12 Szintillationsmessungen

Radioaktive Filter wurden mit einem 1409 DSA Liquid Scintillation Counter von Perkin Elmer in Szintillationsflüssigkeit von Aquasafe Zinsser vermessen.

6.3 Instrumentelle Methoden:

6.3.1 FPLC

Für die Proteinreinigung wurde eine FPLC-Anlage der Firma GE Healthcare (Pharmacia) benutzt. Sie besteht aus einem LCC 500 Plus Chromatographie-Controller, zwei High Precision Pump P-500 Pumpen und einem FRAC-100 Fraktionssammler. Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 75-Säule der Firma GE Healthcare verwendet.

Für die Proteinreinigung mit Ionentauscher wurde das BioLogic DuoFlow System der Firma Biorad eingesetzt. Als Kationentauscher wurde eine HS Poros 50 Matrix (Applied Biosystems) in einem XK Säulenmantel (GE Healthcare) benutzt.

6.3.2 HPLC

Die HPLC-Chromatographie wurde mit einem Waters Breeze System durchgeführt. Dieses enthält das binäre Pumpensystem Waters 1525, den Waters 2487 Dual Absorbance Detektor

und einen Waters In-Line Degasser. Zur Fluoreszenz-Messung wurde nach dem UV-Detektor ein Merck Hitachi Fluoreszenz-Detektor FL L-7480 (Lachrom) angeschlossen. Für die *reversed phase* HPLC wurde eine NC Prontosil-Säule (5 µm, 120 Å, 250 x 4.6 mm) der Firma Bischoff, geschützt mit einer Vorsäule (5 µm, 100 Å, 8 x 4.6 mm), ebenfalls Bischoff, eingesetzt. Für präparative Läufe wurde eine NC Prontosil-Säule (5 µm, 120 Å, 250 x 20 mm, Bischoff) mit einer Bischoff-Vorsäule (5 µm, 120 Å, 30 x 20 mm) verwendet. Vor dem Aufbringen der ersten Probe und zwischen den Läufen wurde die jeweilige Säule unter Startbedingungen für mindestens 20 min equilibriert.

Tabelle 6: HPLC-Puffer und Gradienten

System	Puffer A	Puffer B
1	H ₂ O, 0.04% TFA	70% CH ₃ CN, 0.04% TFA
2	H ₂ O, 0.01% TFA	70% CH ₃ CN, 0.01% TFA

Gradient	Verlauf	Flußrate
Gradient 1	0-18 min (22% Puffer B), 18-19 min (22-30% Puffer B), 19-26 min (30% Puffer B), 26-29 min (30-100% Puffer B), 29-32 min (100% Puffer B), 32-33 min (100-22% Puffer B)	1 mL/min
Gradient 2	0-18 min (22% Puffer B), 18-19 min (22-30% Puffer B), 19-26 min (30% Puffer B), 26-30 min (30-50% Puffer B), 30-32 min (100% Puffer B), 32-45 min (100% Puffer B), 45-46 min (100-22% Puffer B)	1 mL/min
Gradient 3	0-15 min (0-50% Puffer B), 15-20 min (50-100% Puffer B), 20-28 min (100% Puffer B), 28-30 min (100-0% Puffer B)	1 mL/min
Gradient 4	0-22 min (5-10% Puffer B), 22-23.5 min (10-100 % Puffer B), 23.5-28 min (100% Puffer B), 28-30 min (100-5% Puffer B)	1mL/min analytisch, 10 mL/min präparativ

6.3.3 UV-Vis Spektroskopie

UV-Vis-spektroskopische Messungen wurden mit einem UV-Visible-Spektrophotometer Cary 3E der Firma Varian (Darmstadt) durchgeführt.

6.3.4 DNA Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie der RWTH Aachen sequenziert. Sequenzierungen zur Erstellung des MLL4-Gateway Konstrukts wurden bei MWG-Biotech (Martinsried) durchgeführt.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen zur Elektroporation

LB-Medium (400 mL) wurden mit einer Übernachtskultur (2 mL) angeimpft und bis zu einer OD^{600} von 0.4 – 0.5 bei 225 rpm und 37°C unter Schütteln inkubiert. Für den Stamm BL 21 DE3 Codon Plus RIL oder Rosetta wurde das LB Medium mit Chloramphenicol (50 µl/mL) versetzt. Die Zellkultur wurde 20 min auf Eis gekühlt und bei 4°C und 3500 rpm während 15 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit eiskaltem H₂O (100 mL) suspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet zweimal in 50 mL und einmal in 10 mL 10%igem Glycerin aufgenommen und wieder zentrifugiert. Abschließend wurde der Niederschlag in 400 µL 10%igem Glycerin resuspendiert, in Portionen von 40 µL aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.4.2 Herstellung salz-kompetenter *E.coli* Zellen zur Hitzeschock-Transformation

LB-Medium (250 mL) wurde mit einer gut gewachsenen Übernachtskultur (5 mL) des gewünschten Zellstammes versetzt und bei 220 rpm und 37° C unter Schütteln bis zu einer OD^{600} von 0.94 inkubiert. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis gestellt, und bei 4° C und 5000 rpm während 10 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in TB-Puffer (20 mL, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 10 mM HEPES und 55 mM MnCl₂, pH 6.7, steril filtriert) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss wie zuvor zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in TB (20 mL) mit 7% DMSO resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Aliquots (200 µL) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gelen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Lämmli. Nach Komprimierung der aufgetragenen Proben im 5%igen Sammelgel folgte die Auftrennung der Banden im 15%igen Trenngel. Zur parallelen Herstellung zweier Trenngele wurden H₂O (2.5 mL) mit 4 x Trenngelpuffer (2.5 mL, 1.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 8.8), Acrylamid/Bisacrylamid (5 mL, 37.5:1, 30%),

APS (50 μ L, 100 mg/mL) gemischt und mit TEMED (5 μ L) versetzt. Die Lösung wurde in die Mini-Protean Gel-Kassette gegossen und unter Isopropanol zum Polymerisieren für 20 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde das Isopropanol entfernt. Für das Sammelgel wurden H₂O (1.75 mL), Sammelgelpuffer (750 μ L, 0.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 6.8), Acrylamid/Bisacrylamid (500 μ L, 37.5:1, 30%), APS (25 μ L, 100 mg/mL) gemischt und mit TEMED (3 μ L) versetzt. Das Sammelgel wurde direkt auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach 15 min war die Polymerisation abgeschlossen, die Gele wurden in die BioRad Laufkammer gestellt und diese mit 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 0.01% SDS) befüllt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel zum Anfärben der Proteine in Coomassie-Färbelösung (10% Essigsäure, 40% Ethanol, 50% H₂O, 0.05% Coomassie-Brilliant-Blue R250) über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Gele wurden dann solange in Entfärbelösung (10% Essigsäure, 40% Ethanol, 50% H₂O) geschüttelt bis nur noch die gefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Anschließend wurden die Gele getrocknet. Bei geringen Proteinmengen wurden die Banden unter Verwendung des Proteo Silver Plus Silver Staining Kit (Sigma) angefärbt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele dazu über Nacht in Fixierlösung (10% Essigsäure, 50% Ethanol, 40% H₂O) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die weitere Färbung und Entwicklung nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Archivierung wurden die gefärbten Gele mit einer Digitalkamera fotografiert.

6.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte in 0.8%igen oder 1.5%igen Agarosegelen, welche in 0.5 x TBE-Puffer (44.5 mM Tris-Base, 44.5 mM Borsäure, 1 mM EDTA, 0.5 μ g/mL Ethidiumbromid, pH 8.0) durch Erhitzen hergestellt und in die Laufkammern gegossen wurden. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen des 6 x Probenpuffers (0.25% Bromphenolblau, 30% Glycerin) versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde in 0.5 x TBE-Puffer bei 100 Volt während ca. 45 min durchgeführt. Anschließend wurde die DNA auf einem UV-Tisch bei $\lambda = 312$ nm sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

6.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Proben der Proteinlösungen wurden auf 100 μ L mit Wasser verdünnt, mit Bradford Reagenz (900 μ L, Coomassie Protein Assay Reagent) versetzt und 10 min bei RT

inkubiert. Die Absorption der Proben bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ wurde gemessen und die Konzentration mit Hilfe einer BSA-Kalibriergerade ermittelt. Als alternative Methode wurde die Absorption der Probe in denaturierendem Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , 6 M Guanidinium-HCl, pH 6.5) bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ bestimmt und die Konzentration mit Hilfe eines molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt. Dieser wurden mit dem ProtParam Programm (Gasteiger *et. al.*, 2005) auf dem ExPASy Server (www.expasy.ch) ermittelt.

6.4.6 Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA

LB-Medium (10 mL) wurde mit einem der Resistenzspezifität des Plasmids entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer plasmidtragenden Kolonie beimpft und bei 37°C und 220 rpm unter Schütteln für 14 h inkubiert. 2 mL der Zellkultur wurden bei 4°C und 6600 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde dann mit dem QiaPrep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben präpariert.

6.4.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Bei allen DNA-Proben handelte es sich um Plasmid-Präparationen oder PCR-Produkte. Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde im UV-Spektrometer bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Plasmidpräparationen wurde zusätzlich die Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte über die empirische Formel $1 \text{ OD}^{260} = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ doppelsträngiger DNA. Alternativ erfolgte die Konzentrationsabschätzung kleiner DNA-Mengen durch Agarose-Gelelektrophorese und visuellen Vergleich mit den Bandenstärken definierter Mengen des Größenmarkers MassRuler DNA-Mix.

6.4.8 Reinigung der Variante Dim-5Δ17

LB-Medium (10 mL) mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Chloramphenicol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wurde mit einer Plasmid-tragenden Kolonie von BL21 DE3 CodonPlus RIL angeimpft und über Nacht bei 250 rpm und 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde LB Medium (150 mL) mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Chloramphenicol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit der Übernachtskultur (3 mL) angeimpft und bei 250 rpm und 37°C unter Schütteln für 6 h inkubiert. Dann wurde LB-Medium (5 x 1 L) mit Ampicillin (je 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Chloramphenicol (je 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit der Tagkultur (jeweils 25 mL) angeimpft. Jede Kultur wurde mit einer ZnSO_4 -Lösung (je 10 μL , 1M) versetzt und bei 220 rpm und 37°C unter Schütteln bis zu einer OD^{600} von 0.5-0.6 inkubiert. Die Kulturen wurden mit IPTG-Lösung (je

400 µl, 1M) induziert und über Nacht unter Schütteln bei 220 rpm und 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 3500 rpm abzentrifugiert und bei -20°C gelagert, oder sofort weiter behandelt.

Alle weiteren Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in Lysis-Puffer (4 mL Puffer pro 1 g Zellmasse, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% Glycerin, pH 7.5) resuspendiert und mit Ultraschall (6 x 2 min mit jeweils einer Minute Pause) aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 17.000 rpm für 1 h zentrifugiert und der Überstand auf eine mit Lysis-Puffer equilibrierte GST-Sepharose Affinitäts-Säule (ca. 2mL Säulenmaterial) mit einem Fluß von ca. 1 mL/min aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 Säulenvolumen (SV) Lysispuffer und anschließend mit 30 SV Waschpuffer I (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% Glycerin, pH 7.5) gewaschen. Die Proteine wurden mit 10 SV Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 M reduziertes Glutathion, pH 8.0) eluiert.

Das Eluat der GST-Sepharose Affinitäts-Säule wurde für die Gelfiltration auf eine mit Elutionspuffer (20 mM Glycin, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 5% Glycerin, pH 9.8) equilibrierte Superdex 75 Säule (ca. 330 mL) mit einem Fluß von 1 mL/min aufgetragen und mit Elutionspuffer eluiert. Der Proteingehalt einzelner Fraktionen (3.5 ml) wurden mittels UV und durch SDS-PAGE bestimmt. Die Dim-5 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrazentrifugation in einem Amicon Centriprep-10 auf ca. 500 µL aufkonzentriert. Das Proteinkonzentrat wurde in Aliquots (10 µL) aufgeteilt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.4.9 Aktivitätsassays von Dim-5Δ17 mit ¹⁴C-AdoMet

Die Aktivität der Dim-5 wurde mit einer Gesamthiston-Präparation aus Kalbsthymus und dem Fluorescein-markierten Peptid als Substrat in radioaktiven Aktivitätstests mit [³H-methyl] AdoMet überprüft. Dazu wurde ein Reaktionansatz aus Dim-5 (8 µM) mit Peptid (5 µM) und nicht-tritiiertem AdoMet (50 µM) in Reaktionspuffer (50 mM Glycin, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 9.8) in einem Gesamtvolumen von 19 µl hergestellt. Direkt danach wurde 1 µl (0.55 µCi) [³H-methyl] AdoMet (1 µl, 0.55 µCi) zugefügt. Kontrollen wurden ohne Enzym bzw. ohne Substrat durchgeführt. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten angesetzt. Ein 0 h-Wert wurde direkt nach dem Mischen durch Auftragen auf ein Whatman P81 Filterpapier (1.25 cm x 1.25 cm) gequencht. Nach einer Reaktionszeit von 20 min bei RT wurden die anderen Ansätze ebenfalls auf das Filterpapier aufgetragen. Die Filterstücke wurden dreimal mit 200 mM Na₂CO₃ (pH 9.2), bzw. einmal mit 50 mM für Reaktionen mit Peptid,

gewaschen, in Ethanol (70%) getaucht und getrocknet. Danach wurde jeder Filter in Szintillationsflüssigkeit (3 mL) vermessen.

6.4.10 Konstruktion der Variante M.SssI-H3-Tag

Als Ausgangsmaterial wurde das Plasmid pBFH-M.SssI herangezogen. Zur Insertion des den Histon-Tag kodierenden Duplex wurden die im Flag-Tag enthaltenen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen R.NcoI und R.SalI genutzt. Der Vektor wurde sequentiell mit beiden Enzymen nach Herstellerangaben fragmentiert, aus Agarosegelen ausgeschnitten, gereinigt und die Konzentration im nächsten Agarosegel abgeschätzt. Das Insert wurde aus zwei ODN hergestellt, die passende Basenüberhänge komplementär zu den erzeugten Vektorschnittstellen tragen. Die ODN wurden in 1 x Ligationspuffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, pH 7.8) bei RT hybridisiert. Vektor und Insert wurden mit T4-Ligase bei 16°C über Nacht inkubiert und der komplette Ligationsansatz für die Transformation von salz-kompetenten XL-10 Zellen eingesetzt. Gewachsene Kolonien wurden über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung überprüft. Ein Konstrukt mit korrekter Sequenz (siehe Anhang) wurde zur Transformation des Expressionsstamm ER2148 durch Elektroporation verwendet.

6.4.11 Reinigung der Variante M.SssI-H3-Tag

LB-Medium (10 mL) mit Ampicillin (100 µg/mL) und Glucose (0.2 %) wurde mit einer M.SssI-H3-Tag tragenden Kolonie inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden fünf 1L Erlenmeyerkolben mit LB-Medium (200 mL) und Ampicillin (100 µg/mL) mit der Übernachtskultur (jeweils 2 mL) beimpft und bis zu einer OD⁶⁰⁰ von 0.6 bei 220 rpm und 37° C geschüttelt. Jede Kultur wurde dann mit einer 25%igen Arabinoselösung (8 mL) induziert und weitere 4 h bei 30°C und 220 rpm unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4°C, 350 rpm, 30 min) geerntet und bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Zum Aufschluss mit Ultraschall wurden die Zellen aus 1 L Kultur in Lysis-Puffer (40 mL, 50 mM Na₂H₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM Imidazol, pH 8.0) resuspendiert und aufgeschlossen (Beschallung 6 x 2 min). Das Lysat wurde bei 17.000 rpm für 1 h zentrifugiert und der Überstand auf eine mit Lysis-Puffer equilibrierte *His-Select* Nickel-Affinitäts-Säule (ca. 1 ml Säulenmaterial) aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 SV Lysis-Puffer und 10 SV Waschpuffer (50 mM Na₂H₂PO₄, 300 mM

NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8.0) gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit Elutionspuffer (10 mL, 50 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0) eluiert. Das Eluat wurde in einem Amicon Centriprep-10 konzentriert, mit Glycerin (50%) versetzt und bei -20°C gelagert.

6.4.12 Konstruktion des Plasmids pDest MLL4-Cterminal

Die Konstruktion der Primer, Ausführung der PCR sowie die Rekombinations-Reaktionen zur Erstellung der Entry- und Expressionsklone wurden nach Angaben des Invitrogen Gateway-Technology Handbuchs (Version E, 2003) ausgeführt. Transformiert wurden *E.coli* XL10-Gold Zellen. Nach Präparation der Plasmid-DNA ausgewählter Entry-Klone wurden diese durch Restriktionsverdau mit dem Enzym R.Bsp1407I auf Anwesenheit des Inserts getestet. Positive Plasmide wurden durch Sequenzierung bei MWG Biotech mit den MWG-Primern (M13uni (-21), M13rev (-29)) überprüft. Ein Plasmid (Entry-Klon) mit richtiger DNA-Sequenz wurde zur Generation des pDest-Vektors in die Rekombinations-Reaktion eingesetzt. Der MLL4-pDest-Expressionsvektor wurde durch Restriktionsverdau mit R.Bsp1407I kontrolliert. Das fertige Konstrukt wurde zur Transfektion humaner Zellkulturen verwendet.

6.4.13 Transfektion eukaryotischer Zellen

Alle Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 Vol% FCS und 1 Vol% Penicillin/Streptomycin angezogen. Die transiente Transfektion adherenter Zellen wurde mit der Calcium-Phosphat Methode nach Busset *et.al* (1994) durchgeführt. Für die Transfektion wurden ca. 10^6 Zellen/10 cm Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde die DNA (20 μg /Platte) vorbereitet. Sie setzt sich aus 5 μg des Expressionsplasmids mit rekombinantem Gen, 14 μg Leervektor (mit gleichem Promotor und Affinitäts-Tag wie der Expressionsvektor) und 0.5-1 μg Transfektionsmarker (z.B. Histon H2-EGFP) zusammen. Die gesamte DNA wurde in CaCl_2 (500 μL , 2.5 mM) verdünnt. Tropfenweise wurden 500 μL 2 x Hebs-Puffer (274 mM NaCl, 42 mM HEPES, 9.6 mM KCl, 1.5 mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7.1) unter ständigem Mischen zugefügt und der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zu den Zellen pipettiert und diese über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten mit 1 x PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM Na_2HPO_4 , 1.45 mM KH_2PO_4 , pH 7.3) gewaschen und mit frischem Medium für weitere 2 Tage inkubiert. Die Transfektionseffizienz konnte durch die Fluoreszenz des Transfektionsmarkers im Mikroskop überprüft werden.

6.4.14 Reinigung der Variante HA-MLL4-C

Die Isolation und Reinigung des Enzyms mit HA-Tag erfolgte durch Immunopräzipitation (IP). Für eine IP wurden auf jeweils 6 – 8 Platten (10 cm) 10^6 HEK293T-Zellen ausgesät und transfiziert (s.o.). Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4° C. Die Zellen wurden mit 1 x PBS-Puffer gewaschen und in Frackelton-Puffer (10 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF, 5 μM ZnCl_2 , 0.2% Triton X-100, 10% Glycerin, pH) mit Proteinase-Inhibitoren (1 Tablette Complete Mini/10 mL Lysat) lysiert. Das Lysat wurde bei 13.200 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Anti-HA Antikörper (2 μg) versetzt und im Überkopf-Schüttler 2 h inkubiert. Protein-G Sepharose (80 μL) wurden in Frackelton-Puffer equilibriert. Die Sepharose-Partikel wurden zum Antikörper-markierten Lysat gegeben und 1.5 h unter Schütteln inkubiert. Die Beads wurden bei 1500 rpm für 2 min abzentrifugiert, zweimal mit MLL-Puffer (2 ml, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 4 mM DTT, pH 7.5) gewaschen und in Aliquots (15 μL) mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

6.4.15 Herstellung eines Kernextraktes mit Ultraschall-Aufschluss

Für ein Endvolumen von ca. 500 μL mit einer Konzentration von ~ 9 mg/mL werden zehn dicht bewachsene Platten (10 cm) benötigt. Zum Ernten der Zellen wurden diese mit 1x PBS-Puffer (je 5 mL) gewaschen, und mit Trypsin (je 0.5 mL) für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Alle Zellen wurden mit Medium (6 mL) suspendiert vereinigt (ca. 11 ml) und bei 1000 rpm für drei min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde einmal mit 10 mL 1 x PBS-Puffer suspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Das entstandene Zellpellet wurde in Puffer A (2 mL, 10 mM HEPES pH 7.6, 5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF) aufgenommen und nach 10 min wieder bei 1000 rpm für drei min zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in Puffer A (5 mL) aufgenommen und in einem Glas Homogenisator Typ B Pestle durch 10 - 12 malige Auf- und Abbewegung homogenisiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit der cytoplasmatischen Fraktion wurde verworfen. Der Niederschlag wurde in Puffer A mit 350 mM Saccharose (5 mL) aufgenommen und erneut bei 10 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellkerne wurden in RIPA-Puffer (5-7 mL, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 1% Desoxycholate, 0.1% SDS, 0.5% Aprotinin) aufgenommen und im Ultraschall bei ca. 10% Intensität mit ca. 20 Pulsen aufgeschlossen. Anschließend wurde bei 13 200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Amicon Centriprep-10 durch wiederholtes Verdünnen und Konzentrieren weitgehend von endogenem AdoMet befreit, auf 500 μL aufkonzentriert, in 20 μL Portionen

aufgeteilt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Konzentration wurde anschliessend mit der Methode nach Bradford bestimmt.

6.4.16 Herstellen eines Dignam-Kernextraktes

Für ein Endvolumen von ca. 2.5 mL mit einer Konzentration von ~ 3.5 mg/mL werden 12 dicht bewachsene Platten (10 cm) benötigt. Ernten und Aufschluss der Zellen im Homogenisator erfolgte wie oben beschrieben. Nach dem Aufschluss wurde das Lysat in Puffer A (5 mL) aufgenommen und bei 25 000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Kernaufschluss erfolgte durch Aufnehmen des Niederschlages in Puffer C (3 mL, 20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 25% Glycerin, pH 7.9) und 10 - 15 Auf- und Abbewegungen im Glas Homogenisator. Die erhaltene Suspension wurde für 30 min mit einem Magnetrührer gerührt, und danach bei 25 000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde gegen Puffer D (1 L, 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 20% Glycerin, pH 7.9) über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde bei 25 000 rpm für 20 min zentrifugiert, und in 20–50 µL Portionen mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Konzentration wurde anschließend mit der Methode nach Bradford bestimmt.

6.4.17 Enzymatische Peptid-Modifikation

Das fluoreszenzmarkierte Testpeptid wurde für die enzymatische Modifikation mit Protein-MTasen immer 50 µM im jeweiligen Reaktionspuffer der Protein-MTase eingesetzt. Die Enzyme wurden stöchiometrisch zum Substrat eingesetzt. Für den Cofaktor AdoPropen wurde die Protein-MTase Dim-5 auch substöchiometrisch (2.5 µM und 5 µM) eingesetzt. Alle Reaktionsansätze (20 µl) enthielten jeweils Protein-Inhibitor Mix (5 µL, 1 Tablette CompletePlus Mini in 1 mL H₂O gelöst), 300 µM Cofaktor (Konzentration des S-Epipimers) und den jeweiligen Reaktionspuffer (Dim-5: 50 mM Glycin, 2 mM DTT, pH 9.8; Clr4: 50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, pH 8.5; MLL4: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM DTT, pH 7.5). Kontrollreaktionen wurden ohne Substrat und ohne Enzym durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit Dim-5 bei 20°C, mit allen anderen Enzymen bei 30°C inkubiert. Für analytische HPLC-Läufe wurden zu den gewünschten Zeitpunkten jeweils (Aliquots) 2 µL entnommen, mit Puffer A (300 µL, System 1) verdünnt und auf die HPLC-Säule aufgetragen. Zur Reinigung des modifizierten Peptids wurde der gesamte Reaktionsansatz appliziert und die Fraktion mit modifiziertem Peptid gesammelt. Dazu wurde jeweils Gradient 1 verwendet. Die produkthaltigen Fraktionen wurden bis zur Trockene durch Gefriertrocknung eingeengt.

6.4.18 Biotinylierung mono-alkylierter Peptide mittels Click-Chemie

Das gereinigte Produkt (125 μM) nach Umsetzung des Testpeptids mit AdoEnIn durch Dim-5 wurde mit Biotinazid (1.2 mM), Prolin (1.2 mM), CuSO_4 (0.8 mM), Natriumascorbat (4 mM) in NaH_2PO_4 -Puffer (50 mM, pH 8.0) in einem Gesamtvolumen von 20 μL aufgenommen. Der Ansatz wurde mit Argon überschichtet und über Nacht bei 30°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf die HPLC aufgebracht und mit System 1 und Gradient 2 analysiert.

6.4.19 Enzymatische Histon-Modifikationen

Enzymatische Modifikationen wurden an rekombinantem Histon H3.1 (NEB) durchgeführt. Reaktionsansätze (20 μl) enthielten Histon H3.1 (6.5 μM), Dim-5 (stöchiometrisch zum Proteinsubstrat), AdoEnIn (300 μM S-Epimer), Proteinase-Inhibitor (3 μL) in Dim-5 Reaktionspuffer (50 mM Glycin, 2 mM DTT, pH 9.8) und wurde bei 20°C für 1 h inkubiert.

6.4.20 Biotinylierung von Histonen

Direkt nach erfolgter enzymatischer Alkylierung mit der AdoEnIn-Seitenkette wurde der Reaktionsansatz mit Biotinazid (1.2 mM), Prolin (1.2 mM), CuSO_4 (0.8 mM) und Natriumascorbat (4 mM) versetzt und eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 5 x-Probenpuffer (4.5% SDS, 25% Glycerin, 125 ppm Bromphenolblau, 1.6 M β -Mercaptoethanol) versetzt, bei 95°C für 5 min erhitzt und durch SDS-PAGE (15%) analysiert. Zur Detektion wurden die Proteine Semi-Dry Blotting Puffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8.3-8.8) bei 75 mA für 30 min auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT mit einer Lösung aus 5% BSA in PBS-T Puffer (140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM Na_2HPO_4 , 1.45 mM KH_2PO_4 , 0.05% Tween-20) geblockt und danach 3 x mit 1 x PBS-T Puffer gewaschen. Das Avidin-Peroxydase-Konjugat (Vector Labs) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T-Puffer mit 5% BSA zugegeben und die Membran 45 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurde 3 x mit 1 x PBS-T gewaschen. Chemilumineszenz-Signale wurden mit dem Pico SuperSignal ECL Western Blotting Substrat von Pierce in einem LAS 3000 (Fujifilm) visualisiert.

6.4.21 Modifikation von Zielproteinen in Kernextrakten und anschließender Biotin-Markierung durch Click-Chemie

Für eine Markierungsreaktion wurden je 150-200 μg Gesamtprotein aus den Kernextrakten eingesetzt. Der Cofaktor AdoEnIn wurde jeweils 300 μM (Konzentration des S-Epimers) eingesetzt. Außerdem enthielten die Reaktionen Proteinase-Inhibitor Mix (10 Vol%, 1 Tablette CompletePlus Mini in 500 μL H_2O gelöst), 15% Glycerin, 0.02% Triton X-100 in

1 x Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM DTT, pH 7.5). Kontrollen wurden ohne Cofaktor durchgeführt, bzw. die Extrakte wurden mit 6.5 mM AdoMet bei 30°C für 1 h vor Zugabe von AdoEnIn inkubiert. Die Modifikationsreaktionen wurden für bei 30° für 1 h durchgeführt. Für die Biotin-Markierung wurde den Reaktionen Biotinazid (1.2 mM), Prolin (1 mM), CuSO₄ (0.5 mM) und Natriumascorbat (10 mM) zugesetzt und diese eine bei 30°C für 30 min inkubiert. Eine Kontrolle (nur Kernextrakt) erfolgte durch Weglassen der Click-Reaktion. Die Reaktionen wurden für die Analyse im Western-Blot mit 5 x-Probenpuffer (250 mM Tris-HCl, 12.5% SDS, 50% Glycerin, 1.6 M β -Mercaptoethanol, 0.25% Bromphenolblau, pH 6.8) versetzt, bei 95°C für 5 min erhitzt und auf ein SDS-Gel (15%) aufgetragen. Für das Isolieren der markierten Proteine mit magnetischen, Streptavidin-beschichteten Partikeln wurde der Kernextrakt nach der Markierung mit Biotin direkt weiter verwendet.

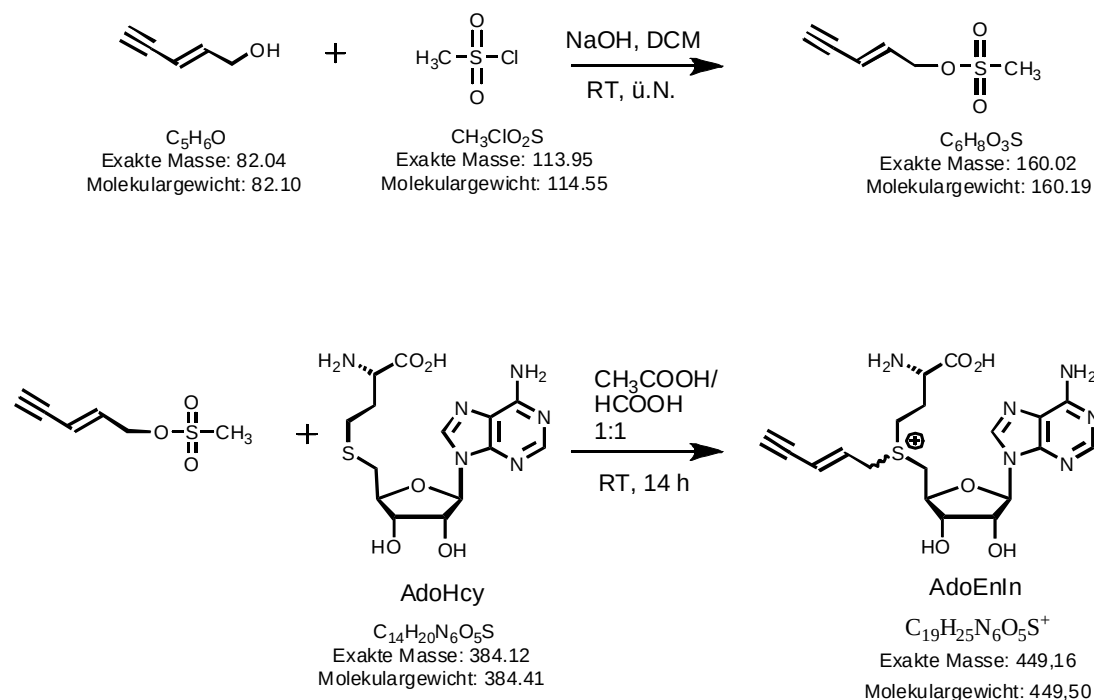
6.4.22 Isolieren Biotin-markierter Proteine mit magnetischen Streptavidin-Beads

Für jeden Ansatz (markierten Kernextrakt sowie alle Kontrollen) wurden jeweils 75 μ L magnetische, Streptavidin-beschichtete Partikel benötigt. Diese wurden drei mal mit B&W-Puffer (200 μ L, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 500 ppm Octyl- β -D-glucopyranosid, pH 7.5) gewaschen. Außerdem wurde für jeden Ansatz eine Zeba-Säule vorbereitet, indem jede Säule viermal mit B&W-Puffer (300 μ L) versetzt und bei 1500 g für 1 min zentrifugiert wurde.

Die Markierungsreaktionen wurden bei 13 200 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Zeba-Säulen aufgetragen und bei 1500 g für 1.5 min zentrifugiert. Danach wurden diese zweimal mit B&W-Puffer, zweimal mit H₂O und wieder zweimal mit B&W-Puffer gespült (s.o.). Danach wurde der Durchlauf des ersten Säulenspülgangs erneut auf die Säule gegeben, direkt auf die Partikel und für 45 min bei 4°C geschüttelt. Mit einem starken Magnet wurden die Partikel an der Gefäßwand konzentriert, der Überstand abgenommen und die Proben zweimal mit B&W Puffer (jeweils 190 μ L), Basic Waschpuffer (jeweils 190 μ L, 50 mM NH₄OAc, 500 ppm Octyl- β -D-glucopyranosid, pH 9.0), wieder mit B&W Puffer (jeweils 190 μ L) und zum Schluss mit H₂O (jeweils 190 μ L) gewaschen. Bei jedem Pufferwechsel wurde die Probe außerdem in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Partikel wurden in 1 x Probenpuffer (15 μ L, s.o.) aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und auf einem 15%igen SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung analysiert. Alternativ wurden die mit Proteinen beladenen Partikel zur Firma Caprotec GmbH, Berlin, geschickt und die Proteine durch HPLC-ESI-MS nach Trypsin-Fragmentierung analysiert.

6.5 Chemische Synthesen

6.5.1 Synthese des AdoMet Analogons AdoEnIn



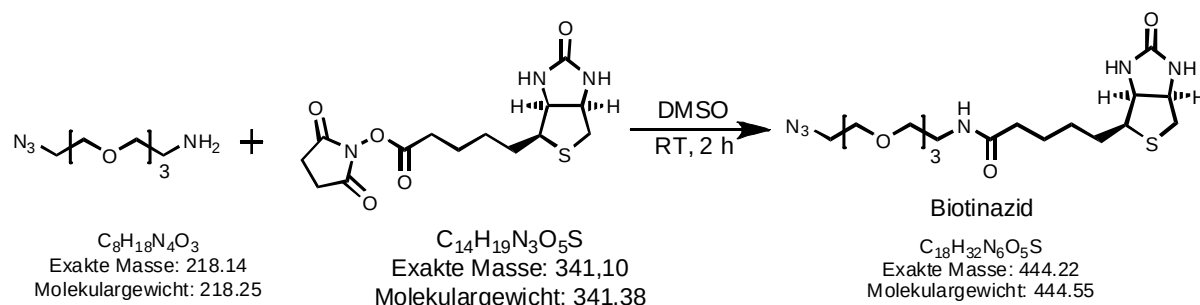
Vor der Synthese wurde der technische Alkohol 2-Penten-4-in-1-ol destilliert. NaOH (12 mmol, 480 mg) und Mesylchlorid (11 mmol, 1.26 g) wurden in Dichlormethan (12 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Alkin-Alkohol (10 mmol, 821 mg) wurde zugegeben und der Ansatz bei RT über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung versetzt, dann gewaschen bis die wässrige Phase basisch blieb und die organische Phase bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde als gelbes, zähflüssiges Öl erhalten und ohne weitere Aufarbeitung sofort eingesetzt. In einen Kolben (10 mL) wurde AdoHcy (26 μmol , 10 mg) eingewogen. Der aktivierte Alkohol wurde in einem Gemisch aus Ameisensäure/Essigsäure (2.5 mL, 1:1, v/v) gelöst, zum AdoHcy getropft und der Reaktionsansatz 14 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit H_2O (30 mL) gequench und dreimal mit Diethylether (je 60 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde durch HPLC (Gradient 4 präparativ, System 2) gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen (Retentionszeit $t = 15$ min) wurden vereinigt und bis zur Trockene lyophilisiert. AdoEnIn wurde als weißer, flockiger Feststoff erhalten, in 450 μL (deutertem) H_2O aufgenommen und die Konzentration durch UV-Spektroskopie ($\epsilon_{260} = 15\,400 \text{ L/mol} \times \text{cm}$) bestimmt. Das Produkt lag als Epimerengemisch am Schwefel mit einem Verhältnis von ca. 1:1 vor.

Ausbeute: 58 % (26.0 μmol , 11.7 mg)

ESI TOF MS: Masse beobachtet: 449.157, berechnet: 449.160

^1H NMR (500 MHz, D_2O , pD 3.5): δ 2.38 (q, $^3J = 5.9$ Hz, 2H, $\text{H}\beta$), 3.50 (s, 0.5H, $\text{H5}''$), 3.54 (s, 0.5H, $\text{H5}''$), 3.56 – 3.68 (m, 2H, $\text{H}\gamma$), 3.81 – 3.91 (m, 2H, $\text{H5}'$), 3.95 – 3.99 (m, 1H, $\text{H}\alpha$), 4.21 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{H1}''$), 4.25 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{H1}''$), 4.53 – 4.61 (m, 1H, $\text{H4}'$), 4.71 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 0.5H, $\text{H3}'$), 4.77 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 0.5H, $\text{H3}'$), 4.85 – 4.90 (m, 1H, $\text{H2}''$), 5.73 (d, $^3J = 16.2$ Hz, 0.5H, $\text{H3}''$), 5.92 (d, $^3J = 15.9$ Hz, 0.5H, $\text{H3}''$), 6.07 (dt, $^3J = 7.6, 15.9$ Hz, 0.5H, $\text{H2}''$), 6.13 – 6.22 (m, 0.5H, $\text{H2}''$), 6.18 (d, $^3J = 3.4$ Hz, 1H, $\text{H1}'$), 8.45 (s, 1H, arom. H), 8.47 (s, 1H, arom. H).

6.5.2 Synthese von Biotin-PEG-Azid



11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (1 mmol, 218.25 mg) wurde in DMSO (5 mL) gelöst und mit Triethylamin (5 mmol, 35.6 μL) versetzt. Danach wurde Biotin-NHS-Ester (0.29 mmol, 100 mg) zugesetzt und die Mischung 2 h bei RT gerührt. Flüchtige Bestandteile wurden am Hochvakuum entfernt, wobei ein weiß-gelber Feststoff zurückblieb. Der Feststoff wurde in Methanol resuspendiert und über eine Kieselgelsäule mit 20% Methanol in Dichlormethan gereinigt. Biotin-PEG-Azid wurde als weißlicher Feststoff erhalten.

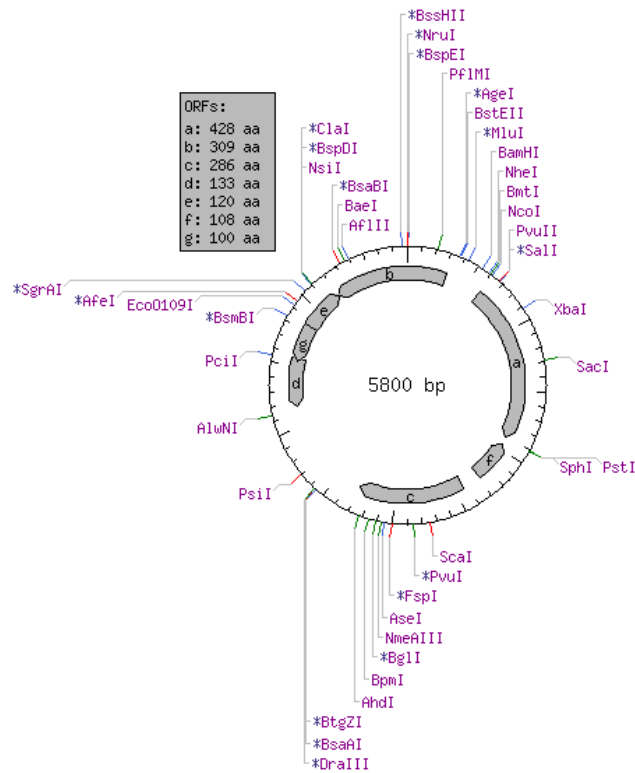
Ausbeute: 11% (25 μmol , 11 mg)

ESI TOF MS (m/z): Masse beobachtet: 445.223, berechnet: 445.223

^1H -NMR (300MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.24 – 1.68 (m, 6H, Biotin-Linker-H), 2.06 (t, 3J = 7.2 Hz, 2H, Biotin-Linker CH_2CO), 2.58 (d, 2J = 12.3 Hz, 1H, SCH_2a), 2.82 (d, 2J = 12.5 Hz, 3J = 5.3 Hz, 1H, SCH_2b), 3.01 – 3.12 (m, 1H, SCH), 3.18 (q, 3J = 5.8 Hz, 2H, CH_2NH), 3.36 – 3.62 (m, 14H, PEG-H), 4.09 – 4.16 (m, 1H, SCHCH), 4.31 (dd, 3J = 5.4 Hz, 3J = 7.5 Hz, 1H, SCH_2CH), 6.35 (s, 1H, Biotin-NH), 6.41 (s, 1H, Biotin-NH), 7.83 (t, 3J = 5.6 Hz, 1H, PEG-NH)

6.6 Anhang

pBFH-M.SssI-H3-Tag



MSssI-H3-Tag Aminosäure-Sequenz:

```

M V A R T K Q T A R K S T G G K A P R K Q L V D M D Y K D D D D K C M S K V E
N K T K K L R V F E A F A G I G A Q R K A L E K V R K D E Y E I V G L A E W Y V P
A I V M e t Y Q A I H N N F H T K L E Y K S V S R E E M I D Y L E N K T L S W N S K
N P V S N G Y W K R K K D D E L K I I Y N A I K L S E K E G N I F D I R D L Y K R T
L K N I D L L T Y S F P C Q D L S Q Q G I Q K G M K R G S G T R S G L L W E I E R A
L D S T E K N D L P K Y L L M E N V G A L L H K K N E E E L N Q W K Q K L E S L G
Y Q N S I E V L N A A D F G S S Q A R R R V F M I S T L N E F V E L P K G D K K P K
S I K K V L N K I V S E K D I L N N L L K Y N L T E F K K T K S N I N K A S L I G Y S
K F N S E G Y V Y D P E F T G P T L T A S G A N S R I K I K D G S N I R K M N S D E
T F L Y M G F D S Q D G K R V N E I E F L T E N Q K I F V A G N S I S V E V L E A I I
D K I G G S H H H H H H C

```

Ha-MLL-C Aminosäuresequenz:

MGVDDGTDSEAEAVQQPRGQGTPPSGPGVVVRAGVLGAAGD
RARPPEDLPSEIVDFVLKNLGGPGDGGAGPREESLPPAPPLA
NGSQPSQGLTASPADPTRTFAWLPGAPGVRVLSLGPAPPEPK
PATSKIILVNKL GQVFVKMAGEGEPVPPPVKQPPLPPTISPTA
PTSWTLPPGPLLGVLPVVG VVRPAPPPPPPLTLVLSSGPASP
PRQAIRVKRVSTFSGRSPPAPPPYKAPRLDEEDGEASEDTPQV
PGLGSGGFSRVRMKTPTVRGVLDLDRPGEPAGEESPGPLQER
SPLLPLPEDGPPQVPDGPDLLESQWHHYSGEASSSEEEPPS
PDDKENQAPKRTGPHLRFEISSEDGFSVEAESLEGAWRTLIE
KVQEARGHARLRHLSFSGMSGARLLGIHHD AVIFLAEQLPG
AQRCQHYKFRYHQQGEGQEEPPLNPHGAARAEVYLRKCTFD
MFNFLASQHRVLPEGATCDEEEDEVQLRSTRRATSLELPMA
MRFRHLKKTSKEAVGVYRSAIHGRGLFCKRNIDAGEMVIEY
SGIVIRSVLTDKREKFYDGKGIGCYMFRMDDFDVVDATMHG
NAARFINHSCEPNCFSRVIHVEGQKHIVIFALRRILRGEELTY
DYKFPIEDASNKLPCNCGAKRCRRFLN

7 Literatur

- Adamczyk, M; Gebler, J.C.; Reddy, E.R. & Yu, Z. (2001). A chemoselective method for site-specific immobilization of peptides via Aminooxy group. *Bioconjugate Chem.* **12**, 139-142.
- Agard, N.J.; Baskin, J.M.; Prescher, J.A.; Lo, A. & Bertozzi, C.R. (2004). A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chem. Biol.* **1**, 644- 648
- Bannister, A.J.; Schneider R.; Myers, F.A.; Thorne, A.W.; Crane-Robinson, C. & Kouzarides, T. (2005). Spatial Distribution of Di- and Tri-methyl Lysine 36 of Histone H3 at Active Genes. *J. Biol. Chem.* **18**, 17732–17736.
- Baskin, J.M.; Prescher, J.A.; Laughlin, S.T.; Agard, N.J.; Chang, P.V.; Miller, I.A.; Lo, A.; Codelli, J.A. & Bertozzi, C.R. (2007). Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **23**, 16790-16797.
- Bedford, T. & Richard, S. (2007). Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function. *Mol. Cell* **18**, 262-272.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Gen. & Dev.* **12**, 142-148.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412.
- Bock, V.D.; Hiemstra, H. & van Maarseveen, J.H. (2006). Cu^I-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.* 51-68.
- Borchardt, R. T.; Huber, J. A. & Wu, Y. S. (1976). A convenient preparation of Sadenosylhomocysteine and related compounds. *J. Org. Chem.* **41**, 565–567.
- Boulanger, M.C.; Miranda, T.B.; Clarke, S.; Di Fruscio, M.; Suter, B.; Lasko, P. & Richard, S. (2004). Characterization of the Drosophila protein arginine methyltransferases DART1 and DART4. *Biochem. J.* **379**, 283–289.
- Bousset, K.; Oelgeschlager, M. H.; Henriksson, M.; Schreek, S.; Burkhardt, H.; Litchfield, D. W.; Luscher-Firzlaff, J. M. & Luscher, B. (1994). Regulation of transcription factors c-Myc, Max, and c-Myb by casein kinase II. *Cell. Mol. Biol. Res.*, 40:, 501–511.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Breinbauer, R. & Köhn, M. (2003). Azide-Alkyne Coupling: A Powerful Reaction for Bioconjugate Chemistry. *ChemBioChem.* **4**, 1147-1149.
- Cairns, B.R.; Lorch, Y; Li, Y.; Zhang, M.; Lacomis, L.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Du, J.; Laurent, B. & Kornberg R.D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87**, 1249–1260.

- Cantoni, G. L. (1953a). The nature of the active methyl donor formed enzymatically from Lmethionine and adenosyltriphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2942–2943.
- Carrico, I.S.; Carlson, B.L. & Berozzi, C.R. (2007). Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 321–322.
- Chan T.; Hilgraf, R.; Sharpless, K.B. & Fokin. V.V. (2004). Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **6**, 2853–2855.
- Chang, B.; Chen, Y.; Zhao, Y. & Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase, *Science* **318**, 444–447.
- Cheng, X.; Collins, R.E.; Zhang, X. (2005). Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 267–294.
- Cheung, P. & Lau, P. (2005). Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *J. Mol. Endocrinol.* **19**, 563–573.
- Chiang, P.K.; Gordon, R.K.; Tal, J.; Zeng, G.C.; Doctor, B.P.; Pardhasaradhi, K. & McCann, P.P. (1996). S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* **10**, 471–480.
- Chin, H.G.; Patnaik, V.; Estéve, P.-O.; Jacobsen, S. E. & 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.
- Cho, Y.-W.; Hong, T.; Hong, S.; Guo, H.; Yu, H.; Kim, D.; Guscynski, T.; Dressler, G.R.; Copelend, T.D.; Kalkum, M. & Ge, K. (2007). PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 20395–20406.
- Chuikov, S.; Kurash, J.K.; Wilson, J.R.; Xiao, B.; Justin, N.; Ivanov, G.S.; McKinney, K.; Tempst, P.; Prives, C. & Gamblin, S.J. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* **432**, 353–360.
- Collazo, E.; Couture, J.-F.; Bulfer, S.; Trievel, R.C. (2005). A coupled fluorescent assay for histone methyltransferases. *Anal. Biochem.* **342**, 86–92.
- Collingwood, T.N.; Urnov, F.D. & Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol.* **23** 255–275.
- Crick, F. ; Barnett, L; Brenner, S. & Watts-Tobin, R.J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature* **192**, 1227–1232.
- Cuthbert, G.L.; Daujat, S.; Snowden, A.W.; Erdjument-Bromage, H.; Hagiwara, T.; Yamada, M.; Schneider, R.; Gregory, P.D.; Tempst, P.; Bannister & Kouzarides, T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545–553.
- Dalhoff, C. (2005). Neue S-Adenosyl-L-methionin-Analoga mit Modifikationen im Methionin-Teil für Transalkylierungen mit DNA-Methyltransferasen. Dissertation, RWTH Aachen.

- Dalhoff, C.; Lukinavičius, G.; Klimašauskas, S. & Weinhold, E. (2006). Direct transfer of extended groups from synthetic cofactors by DNA methyltransferases. *Nat. Chem. Biol.* **1**.
- Dalhoff, C.; Lukinavičius, G.; Klimašauskas, S. & Weinhold, E. (2006). Synthesis of S-adenosyl-L-methionine analogs and their use for sequence-specific transalkylation of DNA by methyltransferases. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 1879-1886.
- Dao-Pin, S.; Anderson, D.E.; Baase, W.A.; Dahlquist, F.W. & Matthews, B.W. (1991). Structural and thermodynamic consequences of burying a charged residue within the hydrophobic core of T4 lysozyme. *Biochemistry* **30**, 11521–11529.
- DeChiara, T.M.; Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**, 849-859.
- Dillon, S.C.; Zhang, X.; Trievel, R.C. & Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* **6**, 227.
- Emanuele, M.J.; Lan, W.; Jwa, M.; Miller, S.A.; Chan, C.S.M. & Stukenberg, P.T. (2008). Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly. *J. Cell Biol.* **181**, 241-254.
- Eskeland, R.; Czermin, B.; Boeke, J.; Bonaldi, T.; Regula, J.T. & Imhof, A. (2004). The N-Terminus of drosophila SU(VAR)3-9 mediates dimerization and regulates its methyltransferase activity. *Biochemistry* **43**, 3740-3749.
- Feldman, A.K.; Colasson, B. & Fokin, V.V. (2004). One-pot synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles from in situ generated azides. *Org. Lett.* **6**, 3897-3899.
- Feng, Q.; Wang, H.; Ng, H.H.; Erdjument-Bromage, H. & Tempst, P. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* **12**, 1052–1058.
- Fernández-Suárez, M.; Baruah, H.; Martínez-Hernández, L.; Xie, K.T.; Baskin, J. M.; Bertozzi, C.R. & Ting, A.Y. (2007). Redirecting lipoic acid ligase for cell surface protein labeling with small-molecule probes. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1483-1487.
- Fontecave, M.; Atta, M. & Mulliez, E. (2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 243-249.
- Freitas, M.A.; Sklenar, A.R. & Parthun, M.R. (2004). Application of Mass Spectrometry to the Identification and Quantification of Histone Post-Translational Modifications. *J. Cell. Biochem.* **92**, 691-700.
- Gary, J.D., & Clarke, S. (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **61**, 65–131.
- Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D. & Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The proteomics protocols handbook, Humana Press* 571-607.

- Gowher, H.; Zhang, X.; Cheng, X.; Jeltsch, A. (2005). Avidin plate assay system for enzymatic characterization of a histone lysine methyltransferase. *Anal. Biochem.* **342**, 287-291.
- Gražvydas, L.; Lapienė, V.; Staševskij, Z.; Dalhoff, C.; Weinhold, E. & Klimašauskas, S. (2007). Targeted labeling of DNA by methyltransferase-directed transfer of activated groups (mTAG). *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2758-2759.
- Grewal, S.I. & Rice, J.C. (2004). Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16** 230–238.
- Guccione, E.; Bassi, C.; Casadio, F.; Martinato, F.; Cesaroni, M.; Schuchlautz, H.; Lüscher, B. & Amati, B. (2007). Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**, 933-938.
- Hang, H.C. & Bertozzi, C.R. (2001). Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc. Chem. Res.* **34**, 727-736.
- Heard, E.; Rougeulle, C.; Arnaud, D.; Avner, P.; Allis, C.D. & Spector, D.L. (2001). Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X-inactivation. *Cell* **107**, 727-738.
- Hess, J.L. (2004). Mechanisms of transformation by MLL. *Critical Reviews* **14**, 235-254.
- Hess, J.L. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol. Med.* **10**, 500-507.
- Hsieh, J.J.-D.; Ernst, P.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P. & Korsmeyer, S.J. (2003). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-Terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 186-194
- Huang, J. & Berger, S.L. (2008). The emerging field of dynamic methylation of non-histone proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 152-158.
- Hung, C.M. & Li, C. (2004). Identification and phylogenetic analyses of the protein arginine methyltransferase gene family in fish and ascidians. *Gene* **340**, 179–187.
- Jeltsch, A. (2002). The chemistry and biology of DNA methylation. *ChemBioChem* **3**, 274–293.
- Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1079.
- Kiick, K.L.; Saxon E.; Tirrell, D.A. & Bertozzi, C.R. (2002). Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 19-24.
- Kimura, H.; Takizawa, N.; Allemand, E.; Hori, T.; Iborra, F.J.; Nozaki, N.; Muraki, M.; Hagiwara, M.; Krainer, A.R.; Fukagawa, T. & Okawa, K. (2006). A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2Cγ, mediates the exchange and dephosphorylation of H2A–H2B. *J. Cell Biol.* **175**, 389-400.

- Kirmizis, A.; Santos-Rosa, H.; Pankett, J.; Singer, M.A.; Vermeulen, M.; Mann, M.; Bähler, J.; Green, R.D. & Kouzarides, T. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* **449**, 928-934.
- Klimašauskas, S. & Weinhold, E. (2007). A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases. *Trends Biotechnol.* **25**, 99-104.
- Klose, R.J. & Zhang, Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 307-318.
- Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Sakamoto, K.; Kigawa, T.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Yokoyama, S. & Tachibana, K. (2007). Site-specific functionalization of proteins by organopalladium reactions. *ChemBioChem* **8**, 232-238.
- Kolb, H.C.; Finn, M.G. & Sharpless K.B. (2001). Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angew. Chem.* **113**, 2056-2075.
- Kouskouti, A.; Scheer, E; Straub, A.; Tora, L. & Talianidis, I. (2004). Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-nadiated methylation. *Mol Cell* **14**, 175-182.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 198-209.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Kraus, V. (2007). Glimpses of evolution: heterochromatic histone H3K9 methyltransferases left its marks behind. *Genetica* **133**, 93-106.
- Lacoste, N.; Utley, R. T.; Hunter J.M.; Poirier G. G. & Cote J. (2002). Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 30421–30424.
- Laughlin, S.T.; Baskin, J.M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C.R. (2008). In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science* **320**, 664-667.
- Leipe, D.D. & Landsman D. (1997). Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolysamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily. *Nucleic Acids Res.* **25** 3693-3697.
- Li, J.; Lin, Q.; Yoon, H.-G.; Huang, Z.-Q.; Strahl, B.D.; Allis, C.D. & Wong, J. (2002). Involvement of Histone Methylation and Phosphorylation in Regulation of Transcription by Thyroid Hormone Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5688-5697.
- Lin, Y.A.; Chalker, J.M.; Floyd, N.; Bernardes, GJ & Davis, B.G. (2008). Allyl sulfides are privileged substrates in aqueous cross-metathesis: application to site-selective protein modification. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9642-9643.
- Link, A.J. & Tirrell, D.A. (2003). Cell Surface Labeling of *Escherichia coli* via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11164-11165.
- Lu, S.C. (1999). S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 391-395.

- Luger, K. (2003). Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 127-135.
- Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F. & Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Marmorstein R. & Trievel, R.C. (2008). Histone modifying enzymes: Structures, mechanisms, and specificities. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 58–68.
- Martin, C. & Zhang, Y. (2005). The diverse function of histone lysine methylation. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 838-849.
- Min, J.; Zhang, X.; Cheng, X.; Grewal, S.I.S. & Xu, R.-M. (2002). Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 828-832.
- Monami, A. (2007). Kupplung der DNA-methyltransferase M.SssI mit Triplehelix-bildenden Oligodesoxynucleotiden. Dissertation, RWTH Aachen.
- Nakayama, J.; Rice, J.C.; Strahl, B.D.; Allis, C.D. & Grewal, S.I.S. (2001). In vivo role of histone H3 lysine 9 methylation in a conserved pathway leading to heterochromatin assembly and epigenetic gene silencing. *Science* **292**, 110-113.
- Osborne, T.; Weller Roska, R.L.; Rajski, S.R. & Thompson, P.R. (2008). In Situ generation of a bisubstrate analog for protein arginine methyltransferase 1. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4574-4575.
- Peterson, C.L. & Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, 548-551.
- Pignot, M.; Siethoff, C.; Linscheid, M. & Weinhold, E. (1998). Coupling of a nucleoside with DNA by a methyltransferase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2888–2891.
- Pljevaljčić, G.; Schmidt, F. & Weinhold E. (2004). Sequence-specific methyltransferase-induced labeling of DNA (SMILing DNA). *ChemBioChem* **5**, 265-269.
- Prescher, A. & Bertozzi, C.R. (2005). Chemestriy in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 13-21.
- Ramapalli, S.; Li, L.; Mak, E.; Ge, K.; Brand, M.; Tapscott, S.J.; & Dilworth, F.J. (2007). p38 MAPK signaling regulates recruitment of Ash2L-containing methyltransferase complexes to specific genes during differentiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1150-1156.
- Rathert, P.; Dhayalan A.; Murakami M.; Zhang, X.; Tamas, R.; Jurkowska, R.; Komatsu, Y.; Shinkai, Y.; Cheng, X. & Albert Jeltsch (2008). Protein lysine methyltransferase G9a acts on non-histone targets. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 344-346.
- Rea, S., Eisenhaber, F.; O'Carroll, F.; Strahl, D.; Opravil, B.; Schmid, S.; Mechtler, M.; Pontig, K.; Allis, C.D. & Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone methyltransferases. *Nature* **406**, 593-599.

- Ringrose, L.; Ehret, H. & Paro, R. (2004). Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol. Cell* **16**, 641–653.
- Rogudev, A.; Schaft, D.; Shevchenko, A.; Pijnappel, W.W.M.; Wilm, M.; Aasland, R. & Stewart, A.F. (2001). The *S. cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2-like protein and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J.* **20**, 7137-7148
- Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V. & Shapeless, K.B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Ang. Chem. Int. Ed.* **41**, 2596-2599.
- Sawada, K.; Yang, Z.; Horton, J.R.; Collins, R.E.; Zhang, X. & Cheng, X. (2004). Structure of the conserved core of the yeast Dot1p, a nucleosomal histone H3 lysine 79 methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **279**, 43296-43306.
- Saxon, E. & Bertizzi, C.R. (2000). Cell surface engineering by a modified staudinger reaction. *Science* **287**, 2007-2010.
- Schlenk, F. & Dainko, J. L. (1975). The S-n-propyl analogue of S-adenosylmethionine. *Biochim. Biophys. Acta* **385**, 312–323.
- Schlenk, F.; Dainko, J. L. & Stanford, S. M. (1959). Improved procedure for the isolation of Sadenosylmethionine and S-adenosylethionine. *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 28–34.
- Schluckebier, G.; Kozak, M.; Bleimling, N.; Weinhold, E. & Saenger, W. (1997). Differential binding of S-adenosylmethionine S-adenosylhomocysteine and sinefungin to the adenine-specific DNA methyltransferase M.TaqI. *J. Mol. Biol.* **265**, 56-67.
- Schotta, G.; Lachner, M.; Sarma, K.; Ebert, A. & Sengupta, R. (2004). A silencing pathway to induce H3–K9 and H4–K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* **18**: 1251–1262.
- Schubert, H.L.; Blumenthal, R.M. & Cheng X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronical of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 329-335.
- Schuchlantz, H. (2005). Aufreinigung und Charakterisierung von Myc-Kofaktor-Komplexen. Diplomarbeit, RWTH Aachen.
- Shi, Y; Lan, F.; Matson; C. Mulligan, P.; Whetstine, J.R.; Cole, A.P.; Casero, R.A. & Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953.
- Shogren-Knaak, M.A. (2007). Mimicking methylated histones. *ACS Chem. Biol.* **2**, 225-227.
- Smith, B.C. & Denu, J.M. (2008). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 45-57.
- Song, J.-J. & Kingston, R.E. (2008). WDR5 interacts with Mixed-lineage Leukemia (MLL) protein via the histone H3 binding pocket. *J. Biol. Chem.* **283**, 35258-35264

- Song, W.; Wang, Y.; Qu, J. & Lin, Q. (2008). Selective functionalization of a genetically encoded alkene-containing protein via "photoclick chemistry" in bacterial cells. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9654-9655.
- Sterner, D.E. & Berger, S.L. (2000). Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435-459.
- Steward, M.M.; Lee, J.-S.; O'Donovan, A.; Wyatt, M; Bernstein, B.E. & Shilatifard (2006). Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 852-854.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000). The language of histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Tamaru, H. & Selker E.U. (2001). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**, 277-283.
- Tamaru, H.; Zhang, X.; McMillen, D.; Singh, P.B.; Nakayama, J.-i.; Grewal, S.I.; Allis, C.D.; Cheng, X. & Selker, E.U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* **34**, 75-79.
- Torne, C.W.; Christensen, C. & Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057-3064.
- transcription factors c-Myc, Max, and c-Myb by casein kinase II. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 501-511.
- Trievel, R.C. (2004). Structure and function of histone Methyltransferases. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **14**, 147-169.
- Tsukada, Y.-i.; Fang, J.; Erdjument-Bormage, H.; Warren, M.E.; Borchers, C.H.; Tempst, P. & Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-816.
- Van Leeuwen, F; Gafken, P. & Gottschling, D. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**, 745-756.
- Walsh, C.T. (2006). Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory. In Roberts, B., 121 – 149.
- Wang, Q.; Chan, T.R.; Hilgraf, R.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. & Finn, M.G. (2003). Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3192-3193.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**, 737-738.
- Wilkinson, L.S.; Davis, W. & Isles, A.R. (2007). Genomic imprinting effects on brain development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 832-843.

- Wilson, J.R.; Jing, C.; Walker, P.A.; Martin, S.R.; Howell, S.A.; Blackburn, G.M.; Gamblin, S.J. & Xiao, B. (2002). Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9. *Cell* **111**, 105-115.
- Wolffe, A.P. & Matzke, M.A. (1999). Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* **286**, 481-486.
- Yokoyama, A.; Wang, Z.; Wysocka, J.; Sanyal, M.; Aufiero, D.J.; Kitabayashi, I.; Herr, W. & Cleary, M.L. (2004). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate hox gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5639-5649.
- Zhang, X.; Tamaru, H.; Khan, S.I.; Horton, J.R.; Keefe, L.J.; Selker, E.U. & 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. & Cheng, X. (2003). Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Cell* **12**, 177-185.
- Zheng, C. & Hayes, J. (2003). Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers* **68**, 539-546.
- Zhimulev, F.; Belyaeva, E.S.; Fomina, O.V.; Protopopov, M.O. & Bolshakov, V.N. (1986). Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **94**, 492-504.

8 Danksagung

Bei allen die mich bei dieser Arbeit begleitet haben möchte ich mich bedanken.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Elmar Weinhold danke ich für sein Engagement, mir mit dieser Arbeit genau die Verbindung von Biologie und Chemie ermöglicht zu haben, die ich mir gewünscht hatte. Ständig teilte er mit mir die Begeisterung für mein Projekt, hatte immer Zeit für mich, inspirierte mich immer von neuem, und hat mir, nicht nur was die Chemie betrifft, sehr viel beigebracht.

Ebenso danke ich meinem zweiten Betreuer Prof. Dr. Bernhard Lüscher, für seine immerwährende Motivation, seinen Enthusiasmus, seinen Rat und seine Ideen. Ich bedanke mich für die großzügige Bereitstellung seiner Labore und die Übernahme des Coreferates.

Der Graduiertenförderung der RWTH Aachen danke ich für mein Promotionsstipendium.

Ich danke Mike Duiken für die Unterstützung bei HPLC-Fragen, für die Aufnahme der ESI-MS-Spektren und viele schöne Abende mit Projektbesprechungen.

Der LECO GmbH danke ich für die Bereitstellung der Geräte für die ESI-MS-Messungen.

Bei David Lichfield bedanke ich mich für die MALDI-Messungen der Peptide.

Der Caprotec GmbH und ihren Mitarbeitern danke ich für das Aufnehmen der Massenspektren der markierten Proteine.

Peter Krüger danke ich für Erstellung der Dim-5 Modelle.

Bei Christian Dalhoff und Thomas Macherey möchte für die Bereitstellung der Cofaktor-Analoga und gute Zusammenarbeit bedanken. Besonders bei Christian für viele Nächte an der HPLC, Verpflegung und Unterhaltung.

Ein besonderer Dank geht an Kerstin Glensk, nicht nur für bei Unterstützung bei der Cofaktor-Reinigung, auch für ihre ständige Hilfsbereitschaft, Witz und gute Laune und eine schöne Zeit im Biologen-Labor.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Diplomandin und Nachfolgerin Sophie Willnow. Durch sie habe ich viele Dinge nochmal in einem anderen Licht gesehen und Neues gelernt. Ihre positive und engagierte Art hat mich in Zeiten, in denen es mal nicht gut lief, wieder motiviert, und das Zusammenarbeiten hat sehr viel Spaß gemacht. Vor allem auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bedanken.

Meine Kollegen Michael Hüben, Matthias Bahr und Peter Poot danke ich für ihren Rat zu jeder Zeit und ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, vor allem aber für ihre Freundschaft und wilde Zeiten. In dieser Gruppe gehört noch besonders mein ehemaliger Kollege Thomas Lenz erwähnt, der beste Mitbewohner aller Zeiten.

Meinen Kollegen Basar Gider, Anna Gotthard, Maria Malyszinska, Sammy Charrak, und den ehemaligen Simone Peters und Amélie Monamie danke ich für eine gute Zeit, Zusammenarbeit und Kameradschaft.

In der Arbeitsgruppe Lüscher möchte ich mich besonders bei Henning Kleine bedanken, außerdem bei Elena Buerova, Juliane Lüscher-Firzlaff, Ruwin Pandithage, Uli Linzen (auch fürs Laptop und Zellen waschen), Jürgen Strahl, Jens Schirmacher Nadine Heinen und Jörg Vervoorts, die immer mit Rat zur Seite standen.

Besonders aber danke ich Steffi Speckgens, die ich hier wiedergefunden habe, die mich in die Geheimnisse der Zellkultur eingeführt hat und immer für mich da war.

Karsten Kapelle danke ich für seine Programmkenntnis bei der Datenauswertung.

Meinen Forschungspraktikanten Kristina Khouri, Jan Timper und Duygu Citak danke ich für ihre Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit.

Bei Stefan Witt möchte ich für die herzliche Aufnahme in wohnungslosen Zeiten bedanken, für seine Zeit, seine Word-Kenntnisse, und großartige Unterstützung in der 'heißen Phase'.

Ich danke allen Pferdebesitzern, deren Pferde ich reiten durfte. Besonders Renate Henning und Georg Breuer, durch die Sachen erfahren habe, die man während einer Promotion nicht lernen kann.

Regina ,Jule und Steffi, ihr seid die Besten.

Rüdiger danke ich fürs Dasein, langes Durchhalten und Geduld, das Kümmern um weltliche Angelegenheiten, die man im Forscherrausch schon mal vergisst und alles, was sich hier nicht aufzählen lässt.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, ohne die ich nicht hier und niemals so weit gekommen wäre. Ihr werdet immer bei mir sein.

9 Lebenslauf

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name: Peters
Vorname: Wibke
Geburtstag: 29.06.1977
Geburtsort: Mönchengladbach
Staatsangehörigkeit: deutsch

Qualifikationen:

1996: Abitur, Bischöfliche Marienschule Mönchengladbach
1998 bis 2004: Studium der Biologie an der RWTH Aachen, Abschluss Diplom
ab 2005 bis 2009: Promotion an der RWTH Aachen