

**Peptidmikroarrays zur Charakterisierung von
Bindungs- und Substratspezifitäten**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Antonia Marie Lydia Masch

geboren am 13.04.1984 in Bad Langensalza

Gutachter: Prof. Dr. Mike Schutkowski
Prof. Dr. Wolfgang Sippl
Prof. Dr. Dirk Schwarzer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.09.2016

**“Live as if you were to die tomorrow.
Learn as if you were to live forever.”**

Mahatma Gandhi

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	iii
Definition epigenetischer Begriffe.....	vi
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Posttranslationale Modifikationen und epigenetische Modulation.....	1
1.2 Methoden zur Identifikation von posttranslationalen Modifikationen.....	2
1.2.1 Massenspektrometrie	2
1.2.2 Antikörper-basierte Methoden.....	3
1.3 Peptidmikroarrays.....	5
1.4 Anwendungsgebiete und Detektionsmöglichkeiten von Peptidmikro-arrays.....	6
1.4.1 Detektion von Bindungen auf Peptidmikroarrays	9
1.4.2 Detektion enzymatischer Aktivitäten auf Peptidmikroarrays.....	10
1.5 Histonmikroarrays zur Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen und epigenetischer Modulation.....	12
1.6 Histonmodifikationen, deren Enzyme und <i>Reader</i> domänen	15
1.6.1 Acetylierung von Histonen.....	15
1.6.2 Histonmethylierung	20
1.6.3 Histonphosphorylierung	21
1.6.4 Andere Histonmodifikationen.....	24
1.6.5 <i>Cross-talk</i>	27
2 Zielstellung	30
3 Material und Methoden	31
3.1 Chemikalien.....	31
3.2 Enzyme, Proteine, Peptide.....	31
3.3 Radiochemikalien.....	32
3.4 Puffer.....	32
3.5 Antikörper	32
3.6 Bestimmung der Peptidkonzentration.....	33
3.7 Festphasenpeptidsynthese	33
3.8 Peptidmikroarrayinkubationen.....	33
3.8.1 Verwendete Peptidmikroarrays.....	33
3.8.2 Untersuchung der Bindung rekombinanter Proteine an auf Mikroarrays immobilisierten Peptiden.....	34
3.8.3 Auswertung der Peptidmikroarrays.....	35
3.8.4 Untersuchung der Bindung modifikations- und sequenzspezifischer Antikörper auf Peptidmikroarrays.....	35

3.8.5	Untersuchung der Bindung rekombinanter <i>Reader</i> domänen auf Peptidmikroarrays ...	36
3.8.6	Untersuchung von Acetylierungen auf Peptidmikroarrays.....	37
3.8.7	Untersuchung von Phosphorylierungen auf Peptidmikroarrays (Radioaktiv-Assay).....	38
3.8.8	Untersuchung von Dephosphorylierung auf Peptidmikroarrays.....	39
3.8.9	Untersuchung von Deacylierungen auf Peptidmikroarrays.....	39
3.9	<i>In vitro</i> Experimente Peptidsubstrate und MALDI-ToF.....	40
3.10	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter mittels HPLC.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Bindungsspezifitäten von Antikörpern	41
4.1.1	Voruntersuchung der einzusetzenden Antikörperkonzentration.....	42
4.1.2	Untersuchung der Bindungsspezifitäten von modifikationsspezifischen Antikörpern...	44
4.1.3	Untersuchung der Bindungsspezifitäten von sequenzspezifischen Antikörpern	47
4.2	Untersuchung der Bindungsspezifitäten von <i>Reader</i> domänen.....	52
4.2.1	Untersuchung der Bindungsspezifitäten der Bromodomänen BRD4(1) und BRD4(2) ...	53
4.2.2	Untersuchung der Bindungsspezifitäten der Chromodomäne CHD1.....	54
4.2.3	Untersuchung der Bindungsspezifitäten der Tudor-ähnlichen Domäne Spindlin1	58
4.3	Substratspezifitäten von <i>writern</i>	64
4.3.1	Untersuchung der Substratspezifitäten der Acetyltransferasen p300, GCN5, PCAF und Tip60.....	64
4.3.2	Untersuchung der Substratspezifitäten der ADP-Ribosyltransferasen ARTD1 und ARTD10	67
4.3.3	Untersuchung der Substratspezifitäten der Kinasen Wee1, Myt1, MSK1 und Prk1.....	70
4.4	Identifikation der Substratspezifitäten von <i>erasern</i>	75
4.4.1	Untersuchung der Substratspezifitäten der Phosphatase XopH	75
4.4.2	Untersuchung der Substratspezifitäten der Deacylasen Sirtuin1-Sirtuin7	79
5	Diskussion	91
5.1	Identifizierung von Bindungsspezifitäten	91
5.1.1	Bindung von modifikations- und sequenzspezifischen Antikörpern	91
5.1.2	Bindung von <i>Reader</i> domänen	94
5.2	Identifizierung der Substratspezifitäten von <i>Writern</i>	95
5.2.1	Nachweis der Acetylierung durch Acetyltransferasen.....	95
5.2.2	Nachweis der ADP-Ribosylierung durch ADP-Ribosyltransferasen.....	96
5.2.3	Nachweis der Phosphorylierung durch Kinasen	98
5.3	Identifikation der Substratspezifitäten von <i>erasern</i> am Beispiel der Sirtuine.....	100
5.3.1	Substratspezifität von Sirtuin1 und Sirtuin2	100
5.3.2	Acylspezifität von Sirtuin1 und Sirtuin2	101
5.3.3	Sequenzspezifität von Sirtuin1 und Sirtuin2.....	102
5.3.4	<i>Cross-talk</i> von Acetylierung und Phosphorylierung am Beispiel von H3K9ac und H3K27ac	103
5.3.5	Substratspezifität von Sirtuin6.....	106
5.3.6	Substratspezifität von Sirtuin7.....	108

5.4	Einsatz von Peptidmikroarrays in der epigenetischen Forschung	108
6	Zusammenfassung	111
	Literaturverzeichnis.....	113
	Anhang A1: Chromatographische und massenspektrometrische Analysen der synthetisierten Peptide.....	133
	Anhang A2: Erklärung der graphischen Darstellungen der statistischen Auswertung der Histonmikroarrays	147
	Anhang A3: MALDI-ToF-Spektren der <i>in vitro</i> Experimente	149
	Anhang A4: Übersicht der Histonphosphorylierungen	155
	Danksagung	159

Definition epigenetischer Begriffe

Acetylspezifität	Fähigkeit zur affinen Bindung von acetylierten Lysinseitenketten
Acylspezifität	Fähigkeit zur affinen Bindung von acylierten Lysinseitenketten
Bindungsspezifität	Eigenschaft von Proteinen zur affinen Bindung an (modifizierte) Peptide oder Proteine
Chromatin	geordnete kompakte Struktur aus DNA, Histonen und anderen Proteinen, die das Chromosomen bilden
<i>cross-talk</i>	gegenseitige Beeinflussung benachbarter PTMs
Einzel-PTM	innerhalb eines Peptids ist eine einzelne Aminosäure modifiziert
Epigenetik	Modifikationen des Genoms und des Chromatins, die zu einer Veränderung der Funktion und/oder Regulation dieser Moleküle führt, ohne dabei die Nukleotidsequenz zu verändern
<i>eraser</i>	Enzyme, die eine posttranslationale Modifikation entfernen
Histon	basische Proteine mit einem Molekulargewicht von 22,6 kDa (H1), 14 kDa (H2A), 13,8 kDa (H2B), 15,3 kDa (H3) und 11,2 kDa (H4)
Histonoktamer	bestehend aus vier Paaren von Histonmolekülen (H2A, H2B, H3 und H4)
Histonvariante	Histone, die sich in einer oder wenigen Aminosäuren von dem konservierten Histonprotein unterscheiden
Histonvariantenspezifität	Fähigkeit zur affinen Bindung an eine Histonvariante
Kreuzreaktivität	Fähigkeit zur affinen Bindung eines Antikörpers an unterschiedliche Antigene, die dem ursprünglichen Antigenepitop ähneln
Methylierungsgrad	Maß der Methylierung (mono- di- oder trimethylierte Lysine, mono-, symmetrisch oder unsymmetrisch dimethylierte Arginine)
Methylspezifität	Fähigkeit zur affinen Bindung von methylierten Lysin- bzw. methylierten Argininseitenketten
modifikationsspezifische Antikörper	Antikörper, die posttranslational modifizierte Aminosäuren binden, unabhängig von der umgebenden Aminosäuresequenz

Modifikationsstelle	eine Aminosäureseitenkette innerhalb eines Proteins, die posttranslational modifiziert werden kann; z.B. H3K9ac
multiple PTMs	innerhalb eines Peptids sind mehrere Aminosäuren modifiziert
Nukleosom	funktionelle Untereinheit der Chromatinstruktur; ein Nukleosom setzt sich aus DNA (146 Basenpaare) und den vier Paaren von Histonmolekülen (H2A, H2B, H3 und H4) zusammen
Phosphorspezifität	Fähigkeit zur affinen Bindung von phosphoryliertem Serin, Threonin oder Tyrosin
polyacetyliert	innerhalb eines Peptids sind mehrere Lysine acetyliert
Posttranslationale Modifikation	Veränderungen von Proteinen, die nach der Translation stattfinden
<i>Reader</i> domänen	Proteindomänen, die posttranslationale Modifikationen binden
Sequenzspezifität	Eigenschaft eines Proteins eine bestimmte Aminosäuresequenz zu binden
sequenzspezifische Antikörper	Antikörper, die posttranslational modifizierte Aminosäuren in einer speziellen Aminosäuresequenz binden; z.B. anti-H3K9me1-Antikörper
Substratspezifität	Eigenschaft von Enzymen ihre Substrate zu binden
<i>writer</i>	Enzyme, die eine chemische Gruppe von einem Co-Substrat auf das Substrat übertragen
Zielmodifikationsstelle	eine modifizierte Aminosäureseitenkette innerhalb eines Proteins, die für ein bestimmtes Protein spezifisch ist

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl-
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ARTD	ADP-Ribosyltransferase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BRD	Bromodomäne
BRD4	Bromodomänen-enthaltene Protein 4
BSA	Bovines Serum Albumin
CHD1	Chromodomäne 1
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Cit	Citrullin
CST	Cell Signaling Technologies
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Flag	Sequenz: DYKDDDDK
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
GNAT	GCN5-verwandte N-Acetyltransferasen
GST	Glutathion S-Transferase
H1/H2A/H2B/H3/H4	Histonprotein
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethansulfonsäure
HP1	Heterochromatinbindeprotein 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IgG	Immunglobulin G
Kac	acetyliertes Lysin
KAT	Lysinacetyltransferase

Kbut	butyryliertes Lysin
k_{cat}/K_M	katalytische Effizienz
k_{cat}	Wechselzahl
KCl	Kaliumchlorid
Kcr	crotonyliertes Lysin
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
Kmal	malonyliertes Lysin
Kme1/2/3	methyliertes (mono-, di-, trimethyliertes) Lysin
Kmyr	myristoyliertes Lysin
Kmod	modifiziertes Lysin
Kprop	propionyliertes Lysin
Ksuc	succinyliertes Lysin
LU	<i>Light Units</i> (Einheit der Signalintensitäten der Peptidmikroarrays)
MALDI-ToF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, time of flight</i>)
MBHA	4-Methyl-Benzhydrylamin
MBq	Mega-Becquerel
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MnCl ₂	Manganchlorid
MS	Massenspektrometrie
MSK1	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase 1
MYST	MOZ, YBF2/Sas3, Sas2, und Tip60
Myt1	Membran-assoziierte Tyrosin- und Threonin-spezifische Cyclin-abhängigen Kinase (Cdc2)-inhibierende Kinase
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NaCl	Natriumchlorid
p300	300-kDa Protein
PARP	Poly-ADP-Ribosyltransferasen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepuffertes Salz)
PCAF	p300/CREB (<i>cAMP-Response Element Binding</i>)-Bindeprotein Assoziationsfaktor
pH	pH-Wert
PP1	Protein Phosphatase 1

Prk1	PKC-verwandte Kinase 1
PRMT5-MEP50	Protein Arginin <i>N</i> -methyltransferase5-Methylomprotein 50
PTM	Posttranslationale Modifikation
Rme1/2a/2s	methyliertes (mono-, asymmetrisch di-, symmetrisch dimethyliertes) Arginin
SH2	Proteindomäne <i>Src-homology 2</i>
SH3	Proteindomäne <i>Src-homology 3</i>
Sirt	Sirtuin
Sph	phosphoryliertes Serin
SPIN1	Spindlin1
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>Solid phase peptide synthesis</i>)
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris gepuffertes Salz)
TBST	<i>Tris buffered saline Tween</i> (Tris gepuffertes Salz mit Tween20-Zusatz)
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
Tip60	60-kDa <i>Tat-interacting protein</i>
Tph	phosphoryliertes Threonin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Wee1	Wee1A Proteinkinase
x	beliebiger proteinogener Aminosäurerest
Yph	phosphoryliertes Tyrosin

Die verwendeten Drei- und Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur.¹

Englische Begriffe, für die kein deutsches Äquivalent existiert, sind im Text kursivgeschrieben. Dies gilt ebenfalls in zusammengesetzten Wörtern.

1 Einleitung

1.1 Posttranslationale Modifikationen und epigenetische Modulation

Histone sind konservierte kleine basische Proteine, die ausschließlich im Zellkern eukaryotischer Zellen vorkommen. Diese Histone ermöglichen es, die DNA innerhalb des Zellkerns zu kondensieren, indem die DNA um die Histone gewunden ist. Dabei bildet sich eine geordnete kompakte Struktur aus, das Chromatin (Abbildung 1.1). Chromatin dient dem Schutz der DNA vor Beschädigung und reguliert zusätzlich den Zugang von Faktoren, die für die Transkription, Replikation und Reparatur der DNA wichtig sind.

Es ist bekannt, dass die Histone, und besonders ihre unstrukturierten *N*-terminalen Regionen, von einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen adressiert werden.² Dabei wird die Chromatinstruktur entweder direkt durch posttranslationale Modifikationen gestört oder die Modifikationen beeinflussen die Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen.

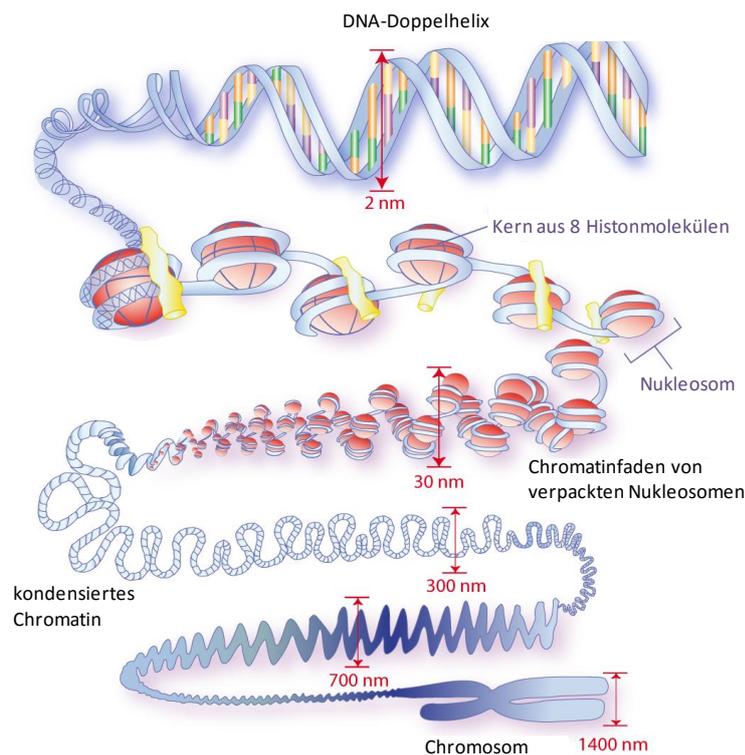


Abbildung 1.1: Aufbau des Chromatins. Die DNA wird über mehrere Stufen (Histone mit umwundener DNA, Nucleosomen, Chromatin) kondensiert und bildet schließlich das Chromosom. Abbildung modifiziert nach³.

Epigenetische Modulation findet hauptsächlich am Nucleosom statt. Das Nucleosom setzt sich aus vier Paaren von Histonmolekülen (H2A, H2B, H3 und H4) zusammen, die zusammen ein Oktamer bilden, welches wiederum 1,7mal mit DNA (146 Basenpaare) umwickelt ist. Die Nucleosomen werden über eine sogenannte *Linker*-DNA miteinander verbunden. Ein fünftes Histonprotein, Histon H1,

bindet an diese *Linker*-DNA und ermöglicht somit noch eine weitere Verdichtung zwischen den Nucleosomen. Damit wird die Chromatinstruktur zusätzlich stabilisiert (Abbildung 1.1). Die Modifikation der Histonproteine führt dabei entweder zu einer offeneren Struktur mit einer lockerer gebundenen DNA oder zur Kondensation des Chromosomens.⁴⁻⁹

Das Chromatin wird in zwei Formen unterschieden: zum einen das Heterochromatin, welches die hochkondensierte Form (viele Histonmethylierungen und -phosphorylierungen) mit den meist inaktiven Genen bezeichnet¹⁰ und zum anderen das Euchromatin mit einer relativ offenen Anordnung (viele Histonacetylierungen), die die meist aktiven Gene enthält.^{11,12}

Besonders die zwischen 13-40 Aminosäure langen aus dem Oktamer herausragenden *N*-terminalen Regionen der Histonmoleküle sind interessant. An diesen *N*-terminalen Regionen sind die meisten posttranslationalen Modifikationen (PTMs) lokalisiert. Die Modifikationen treten an den Seitenketten der Aminosäuren auf. Die verwendete Nomenklatur der Modifizierungen beschreibt zuerst die Referenz zum Histon (z.B. H3), gefolgt von der modifizierten Aminosäure im Einbuchstabencode (z.B. K9 für das Lysin 9) und schlussendlich die Modifikation selbst (z.B. ac für Acetylierung). Die Modifizierung des Beispiels lautet daher H3K9ac.

Histonmodifikationen sind zwischen den Spezies konserviert. In Anbetracht der Komplexität der theoretisch möglichen Kombinationen von Histonmodifikationen ist es entscheidend zu bestimmen, welche dieser Modifikationen tatsächlich auch *in vivo* vorkommen und was ihre Funktion sein könnten.

1.2 Methoden zur Identifikation von posttranslationalen Modifikationen

1.2.1 Massenspektrometrie

Massenspektrometrie (MS) wird hauptsächlich für die Bestimmung des Molekulargewichtes von Peptiden oder von Proteinen verwendet. Dies ermöglicht auch die Analyse posttranslational modifizierter Proteine.¹³⁻²⁴

Vor der massenspektrometrischen Analyse steht die Isolation der zu untersuchenden Komplexe durch Immunopräzipitation oder Affinitätschromatographie und deren Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese. Im Falle der Untersuchung von PTMs werden die Peptide über *reversed-phase* Chromatographie mit anschließender Fraktionssammlung aufgetrennt, denen die massenspektrometrische Analyse folgt. Die gewonnenen Peptide, sowie deren durch tryptischen Verdau generierte, kürzere und leichter zu handhabende Peptidfragmente, werden anschließend im Massenspektrometer ionisiert. Das Instrument misst für jedes Peptidion das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) und dessen Intensität. Anhand der bekannten Schnittstelle des untersuchten Enzyms kann ein Computerprogramm die einzigartigen Aminosäuresequenzen für jedes Peptid, basierend auf dessen Masse, bestimmen. Das Molekulargewicht und die Ladung des Restes, wie beispielsweise die Phosphatgrup-

pe, sind ebenfalls (u.U. durch den Abgleich mit einer Datenbank) bekannt. Die Datenbankanalyse übersetzt die gemessenen Unterschiede der m/z -Verhältnisse in Protein-Häufigkeitsunterschiede. Je nach Anwendungsfall können der „einfachen“ massenspektrometrischen Bestimmung noch weitere Schritte folgen. Nach dem ersten MS-Schritt werden bestimmte Peptidionen erst isoliert. Dann wird durch die Kollision mit inertem Gas Energie zugeführt, sodass die Peptidionen weiter fragmentiert werden. Diese Peptidfragmente werden durch einen zweiten MS-Schritt analysiert und erneut das m/z -Verhältnis für jedes „fragmentierte“ Peptidion bestimmt. Diese Prozedur wird MS/MS genannt.²⁵ Am Ende der massenspektrometrischen Analyse ist es möglich die molekulare Dekoration der untersuchten Probe zu ermitteln. So kann auch die Sequenz eines Histonpeptids, einschließlich der posttranslationalen Modifikation, bestimmt werden.²⁶

Massenspektrometrie ermöglicht die simultane Messung tausender Proteine und Peptide. Dabei können sowohl gereinigte Proteine als auch Proteinmischungen, z.B. aus Zelllysaten, analysiert werden.^{27–29} Weitere Vorteile sind, dass keine Markierung der Peptide oder Proteine notwendig ist und auch noch Proteinkonzentrationen im unteren femtomolaren Bereich detektiert werden können.^{30,31}

Wie jede andere Methode auch, besitzt MS jedoch einige Limitierungen: Es ist oft eine extensive Probenvorbereitung durch Reinigung der untersuchten Peptide und Proteine durch chromatographische Methoden erforderlich. Die analytische Sensitivität kann hier durch die Probenvorbereitung zur Entfernung von häufig vorkommenden Proteinen verbessert werden. Außerdem sind viele Proteine instabil und Degradation während der Probenpräparation oder Lagerung beeinträchtigen die Proteinidentifikation. Auch sind einige modifizierte Peptide schlechter ionisierbar (z.B. phosphorylierte Peptide) oder die Modifikation (z.B. Sulfatierung) ist nicht detektierbar. Zudem kann die automatische Proteinidentifikation durch Datenbankabgleich zu uneindeutigen Ergebnissen führen, da viele Peptide zwar die gleiche Masse, aber unterschiedliche Aminosäuresequenzen besitzen. Bioinformatische Algorithmen und statistische Methoden, wie beispielsweise *False Discovery Rate*, können helfen die entsprechenden Anpassungen vorzunehmen, die die Identifikation der „wahren“ Proteinhäufigkeitsunterschiede erlauben.^{22,26}

1.2.2 Antikörper-basierte Methoden

Die Antikörper-basierten Methoden verlassen sich auf die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper, die die spezifischen Modifikationen an Histonen detektieren. Dabei gibt es einerseits die pan-spezifischen Antikörper, die die Detektion spezifischer Aminosäuremodifikationen ermöglichen. Beispielsweise detektieren die anti-Kac-Antikörper alle acetylierten Lysine in den Histonen (und anderen Proteinen) und zwar unabhängig von den umgebenden Aminosäuren. Diese Antikörper werden in dieser Arbeit als modifikationsspezifische Antikörper bezeichnet. Andererseits gibt es die modifikations- und sequenzspezifischen Antikörper, die spezifisch die Aminosäuremodifikation innerhalb einer

spezifischen Aminosäureumgebung detektieren, wie z.B. die Histon H4 Lysin 16 Acetylierung (anti-H4K16ac-Antikörper). Diese Antikörper werden in dieser Arbeit als sequenzspezifische Antikörper bezeichnet³². Antikörper werden in verschiedenen Anwendungen, wie z.B. Western Blot, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Immunfluoreszenz und Immunopräzipitation eingesetzt. Hierbei wurden auch verstärkt Untersuchungen am Chromatin mittels einer Variation der Immunpräzipitation, der sogenannten Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)³³, verwendet. ChIP beinhaltet zuerst die Behandlung des Zelllysats oder der Gewebeprobe mit einem *cross-linking* Reagenz, wie z.B. Formaldehyd, um die Histone mit dem Chromatin zu vernetzen. Das Chromatin wird im Ultraschallbad oder mit Nuklease behandelt, um kurze DNA-Fragmente zu generieren. Das resultierende Fragment wird mittels eines geeigneten gegen die gewünschte Histonmodifikation gerichteten Antikörpers immunpräzipitiert. Wenn die putative Histonmodifikationsstelle innerhalb eines Gens oder Promoters bekannt ist, kann durch quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) die Anwesenheit der untersuchten Modifikation an einer definierten Stelle quantifiziert werden.

Eine sehr leistungsstarke Adaption der ChIP-Technik kann durch die Kopplung an massive parallele DNA-Sequenzierung erfolgen; eine Technik, die als ChIP-Seq bezeichnet wird. In dieser Prozedur wird die immunpräzipitierte DNA (z.B. das selektiv angereicherte Chromatin) direkt sequenziert, um die genomischen Loci, die an das Antikörperziel (z.B. das spezifisch modifizierte Histon) gebunden sind, zu bestimmen.³⁴ Auf diesem Weg kann jede Histonmodifikation, solange ein dafür spezifischer Antikörper existiert, über das gesamte Genom entschlüsselt werden.

Allerdings benötigt ChIP affine und spezifische Antikörper. Denn da Antikörper stabil und löslich sind und reichlich vorkommen, sollte die Qualität und Spezifität der eingesetzten Antikörper vor dem experimentellen Einsatz überprüft werden.³⁵ Die Reproduzierbarkeit der Antikörperbindung kann hierbei durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Ein Faktor ist die Kreuzreaktivität des Antikörpers. Hier bindet der Antikörper nicht nur an das Zielantigen bzw. die angezielte Modifikation, sondern zusätzlich andere Proteine.^{36,37} Die Kreuzreaktivität kann auch zur Epitoperkennung in Abwesenheit der angezielten PTM führen.³⁸ Aber auch eine Sensitivität gegenüber benachbarten PTMs auf die Antikörperbindung (z.B. durch Epitopmaskierung³⁹) und eine Unfähigkeit zur Unterscheidung der Methylierungsgrade eines speziellen Restes (z.B. mono-, di- oder trimethylierte Lysine) wurde festgestellt.^{37,40–44} Weitere Faktoren sind die Variabilität der Antikörper (unterschiedliche Produktionschargen könnten von einer anderen Zusammensetzung der Tiere kommen und dadurch unterschiedliche Bindungsspezifitäten zeigen)^{35,45–47}, Unterschiede in der Affinität⁴³, sowie die falsche Anwendung (unterschiedliche Experimente und experimentelle Bedingungen könnten die Proteinstruktur und damit auch deren Bindungseigenschaften verändern). Damit kann eine „schlechte“ Wahl des eingesetzten Antikörpers zu fehlerhaften Schlussfolgerungen über die Lokalisation und Funktion der untersuchten Histonmodifizierungen führen.³⁵ Dies verlangt nach Methoden, die die

Qualität der Antikörper vor dem Einsatz kontrollieren und damit eine akkurate Dateninterpretation erlauben.

1.3 Peptidmikroarrays

Für die systematische Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen und die Identifizierung enzymatischer Reaktionen haben sich Protein- und Peptidmikroarrays als wertvolle Werkzeuge erwiesen. Gegenüber Verfahren, wie MS oder ELISA, und den Mikrotiterplatten, stellen die Mikroarrays eine konsequente Weiterentwicklung des „wells without walls“-Prinzips dar. Die durch den Fortfall der Wände erreichte Zweidimensionalität der Mikroarrays stellt dabei einen Vorteil gegenüber der Mikrotiterplatte dar, weil keine Volumina wegen der Füllhöhe mehr benötigt werden. Damit stellen Protein- und Peptidmikroarrays ein miniaturisiertes Analysesystem dar, welches bei minimalem Probeneinsatz innerhalb kurzer Zeit tausende von Verbindungen (DNA, Zucker, Proteine, Peptide) parallel untersucht. Potentielle Enzymsubstrate oder Bindungspartner können dadurch schneller und kostengünstiger durch verringertes Probenmaterial (wenige Nanogramm der Verbindung reichen⁴⁸) und höheren Probendurchsatz identifiziert werden.

Gegenüber Proteinmikroarrays besitzen Peptidmikroarrays eine Reihe von Vorteilen: die Peptide sind kostengünstig vollautomatisch synthetisierbar und erlauben den Einbau von definiert (posttranslational) modifizierten und unnatürlichen Aminosäurederivaten. Peptide sind stabiler und robuster als Proteine, zudem sie in den meisten Reaktionsbedingungen ihre biologische Aktivität beibehalten. Peptidmikroarrays sind einfacher zu lagern, da eine Denaturierung, wie bei Proteinen, nicht beachtet werden muss, und bieten eine Langzeitstabilität.^{49,50} Weiterhin sind Peptidmikroarrays bezüglich der Beladung der Spots wesentlich homogener, da davon ausgegangen werden kann, dass bei gleicher Länge der Peptide der Platzbedarf sehr ähnlich ist. Der Hauptvorteil von Peptidmikroarrays ist jedoch der parallele Durchsatz, der es ermöglicht innerhalb kurzer Zeit ein Proteom (in Form überlappender Peptide) durchzumustern.^{51,52}

Der Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten Peptidmikroarrays ist in Abbildung 1.2 dargestellt und zeigt die Unterteilung eines Peptidmikroarrays in drei Unterbereiche (= Subarrays). Jeder dieser Unterbereiche enthält eine definierte Peptidbibliothek, die dreifach in demselben Layout angeordnet ist. Diese Peptidreplika dienen der Qualitätskontrolle. Das nach dem Absetzen der Peptidlösung benetzte Areal auf der Mikroarrayoberfläche wird als Spot bezeichnet. Die Anzahl von Peptidmolekülen, die innerhalb eines Spots auf der Mikroarrayoberfläche immobilisiert sind, wird durch die Spotbeladung angegeben. In dieser Arbeit werden Peptidmikroarrays mit bis zu 6204 3-fach abgesetzten Peptiden (PhosphoTyrosin-Mikroarray) verwendet. Die Abmessung der Peptidmikroarrays entspricht denen des Standardobjektträgers (25,1 mm x 75,5 mm x 1 mm). Es werden häufig Objektträger aus Glas mit chemisch modifizierter Oberfläche zur Herstellung eines Peptidmikroarrays verwendet, um

auf diesem die Peptide zu immobilisieren.^{53–56} Glas weist neben seiner kostengünstigen Herstellung und leichten Verfügbarkeit weitere Vorteile auf: gute optische Eigenschaften, eine sehr geringe Eigenfluoreszenz im Bereich der Anregungswellenlängen ($\lambda = 460\text{-}680\text{ nm}$), ist physikalisch sehr stabil und kann aufgrund der homogenen Oberfläche gleichmäßig modifiziert werden.

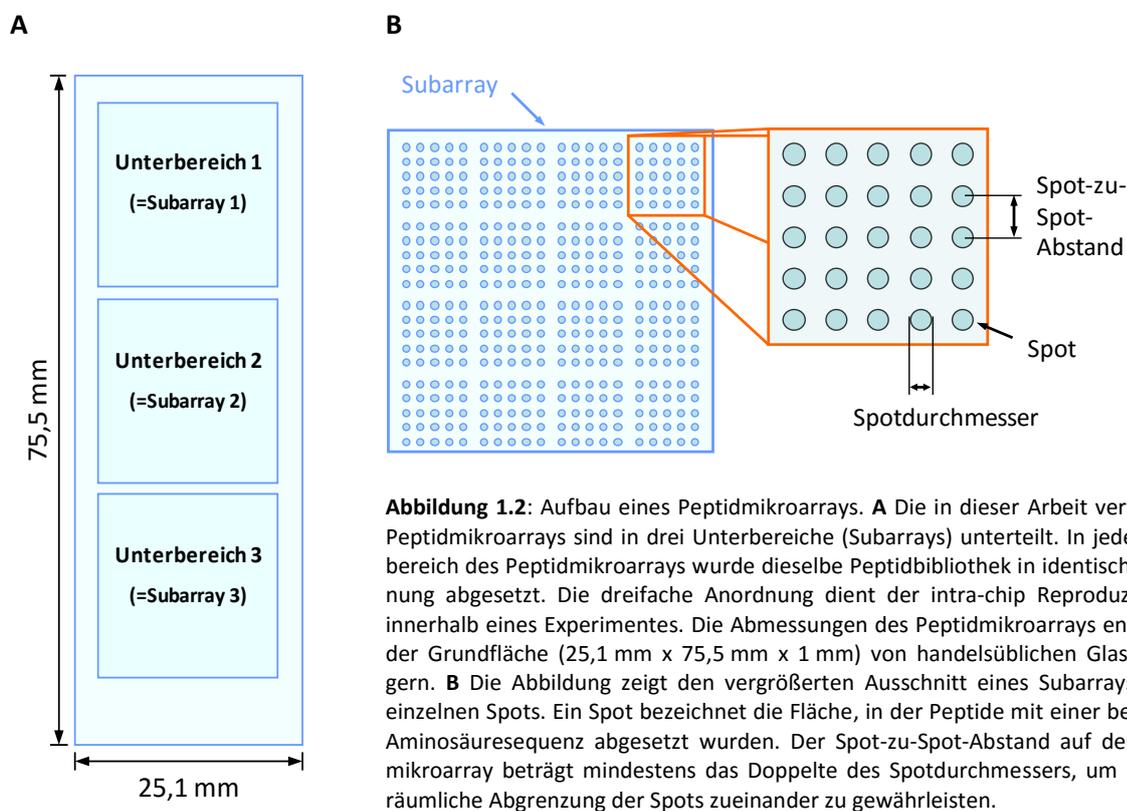


Abbildung 1.2: Aufbau eines Peptidmikroarrays. **A** Die in dieser Arbeit verwendeten Peptidmikroarrays sind in drei Unterbereiche (Subarrays) unterteilt. In jedem Unterbereich des Peptidmikroarrays wurde dieselbe Peptidbibliothek in identischer Anordnung abgesetzt. Die dreifache Anordnung dient der intra-chip Reproduzierbarkeit innerhalb eines Experimentes. Die Abmessungen des Peptidmikroarrays entsprechen der Grundfläche (25,1 mm x 75,5 mm x 1 mm) von handelsüblichen Glasobjektträgern. **B** Die Abbildung zeigt den vergrößerten Ausschnitt eines Subarrays mit den einzelnen Spots. Ein Spot bezeichnet die Fläche, in der Peptide mit einer bestimmten Aminosäuresequenz abgesetzt wurden. Der Spot-zu-Spot-Abstand auf dem Peptidmikroarray beträgt mindestens das Doppelte des Spotdurchmessers, um eine klare räumliche Abgrenzung der Spots zueinander zu gewährleisten.

1.4 Anwendungsgebiete und Detektionsmöglichkeiten von Peptidmikroarrays

Das Multiplex-Format der Peptidmikroarrays prädestiniert sie als vielfältiges Hilfsmittel zum Erforschen der Interaktionen von Peptiden mit Proteinen oder Proteindomänen (Abbildung 1.3 A).^{57–67}

Von Gianni Cesareni's Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass anhand der Peptidmikroarray-Technologie die Charakterisierung von humanen SH2- und SH3-Bindedomänen durch entsprechende Peptidmikroarrays möglich war, die entweder 6202 PhosphoTyrosin-enthaltende Peptide⁶⁶ oder 9192 prolinreiche Peptide⁶⁵ auf den Mikroarrays präsentierten.

Darüber hinaus kann auch die Interaktion von Nukleinsäuren mit Peptiden untersucht werden (Abbildung 1.3 B). Peptidmikroarrays ermöglichten die Identifikation von DNA-bindenden Domänen an die Restriktionsendonuklease *EcoRII*-darstellenden Peptide⁶⁸ oder die Untersuchung der Interakti-

on von Peroxidase-konjugierter viraler RNA mit dem Nukleokapsid-Protein NCp7 des HIV-1 gagpol Vorläufer-Proteins.⁶⁹

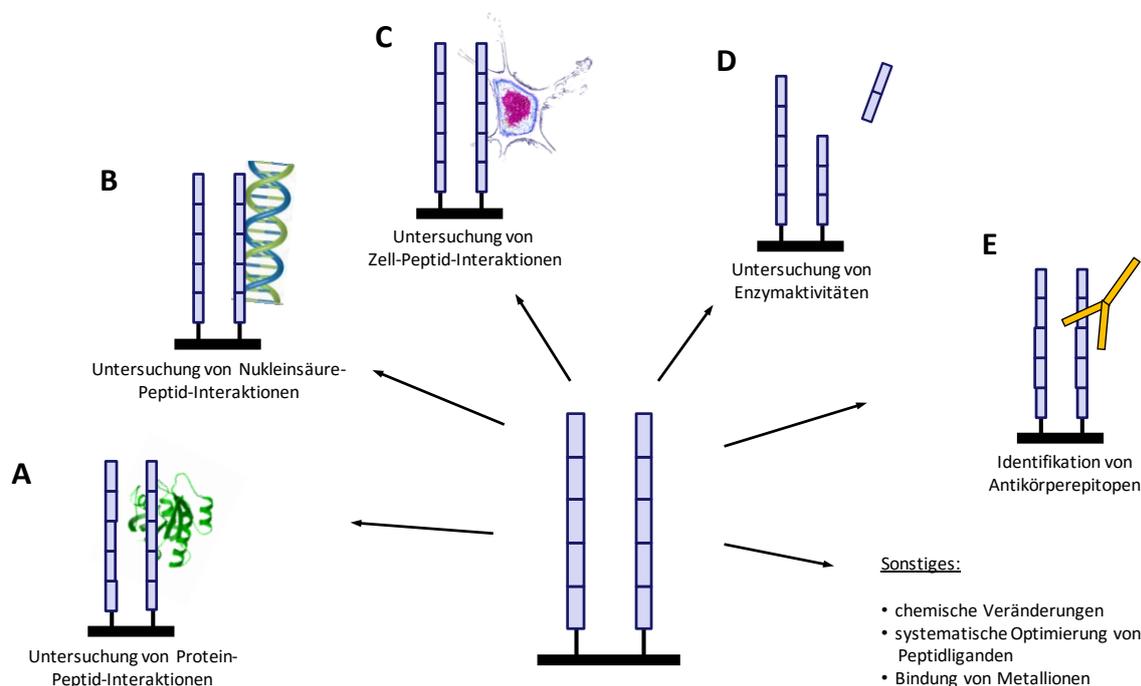


Abbildung 1.3: Übersicht über die Anwendungsgebiete von Peptidmikroarrays. **A** Peptidmikroarrays ermöglichen die Messung von Protein-Peptid-Wechselwirkungen, indem die auf dem Mikroarray immobilisierten Peptide mit einem potentiell interagierenden Protein inkubiert werden. **B** Peptidmikroarrays erlauben die Untersuchung von Interaktionen zwischen Peptiden und Nukleinsäuren. **C** Auch die Detektion von Zell-Peptid-Interaktionen ist möglich. **D** Peptidmikroarrays können auch dazu genutzt werden Enzymaktivitäten zu charakterisieren, indem auf dem Peptidmikroarray potentielle Enzymsubstrate präsentiert werden. **E** Werden auf dem Peptidmikroarray überlappende Peptidsequenzen immobilisiert, erlaubt das die Identifikation der Epitope der untersuchten Antikörper.

Die Interaktion von lebenden Zellen mit Peptiden konnte ebenfalls durch Peptidmikroarrays untersucht werden (Abbildung 1.3 C). Durch die Immobilisierung von Peptid-MHC-Tetramer-Komplexen auf Mikroarrays war es möglich die effektive Aktivierung von T-Zellen nachzuweisen.⁷⁰ Muscat *et al.* verwendeten Peptidmikroarrays zur Untersuchung von Makrophagen und konnten zeigen, dass die auf dem Mikroarray präsentierten Peptidderivate die Wachstumsrate oder das Überleben der Makrophagen beeinflussen.⁷¹

Peptidmikroarrays ermöglichen die Identifizierung von Enzym-Substraten mit Hilfe der immobilisierten Peptide (Abbildung 1.3 D) und helfen bei der Analyse von Enzym-Substratspezifitäten.^{72–78} Dabei ist es generell möglich mittels Peptidmikroarrays chemische Veränderungen, wie die Einführung oder das Entfernen posttranslationaler Modifikationen, systematisch zu untersuchen.^{67,79–85} Solche modifikationsübertragenden Enzyme sind Proteinkinasen^{86–96}, aber auch Acetyl-, Methyl- und ADP-Ribosyltransferasen^{97–100}. Sie übertragen die Reste von einem Co-Substrat auf das immobilisierte Peptid, so dass ein modifiziertes Peptid und ein Co-Produkt entstehen. So wurden Peptidmikroarrays genutzt, um Kinasesubstrate zu identifizieren^{86–88}, Bindungstaschenspezifitäten zu analysieren^{89,90},

Phosphorylierungsstellen innerhalb eines Substrats zu charakterisieren^{86,91,92}, spezifische Substrate zu entwickeln⁹³, Kinaseaktivitäten in Zelllysaten zu untersuchen⁹⁴ und Phosphorylierung an vorphosphorylierten Substraten zu erkennen.⁸⁶ Die Arbeitsgruppe um David Shechter nutzt einen anti-H4R3me2s-Antikörper, der als Sensor für die enzymatische Aktivität von der Arginin-Methyltransferase PRMT5-MEP50 (Protein Arginin *N*-Methyltransferase 5-Methylsom Protein 50) auf Histonprotein-präsentierenden Peptidmikroarrays dient.^{99,100} Modifikationsentfernende Enzyme, wie Phosphatasen, Deacylasen oder Demethylasen, spalten (teilweise unter Zuhilfenahme eines Co-Substrates) einen Rest vom modifizierten Substrat ab. Bei der Reaktion entsteht neben anderen unmodifizierten Bruchstücken das unmodifizierte Peptid. Eine effiziente Charakterisierung der Spezifitäten von allen humanen Sirtuinen, als NAD⁺-abhängigen Deacetylasen, erfolgte mittels Peptidmikroarrays, die mehr als 6800 humane Acetylierungsstellen als Reaktionspartner zur Verfügung stellten und so zur Identifikation neuer Substrate führte.⁷⁷

Eine weit verbreitete Anwendung der Peptidmikroarrays ist die Kartierung von Antikörper-Epitopen (Abbildung 1.3 E), indem die Peptidmikroarrays Proteine in Form von überlappenden Peptidsequenzen präsentieren, an die die Antikörper binden.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ So gelang es verschiedenen Gruppen Antikörper-Signaturen in komplexen biologischen Proben, wie Patientenserum, Gelenksflüssigkeiten oder Hirnwasser zu analysieren.^{102,105-107} Die Abbildung kompletter Proteome auf Peptidmikroarrays wurde zum Nachweis von Proteinfunktionen und zur Detektion von Wechselwirkungen von Proteinen anderer Organismen, wie z.B. Erregern von Infektionskrankheiten, genutzt.¹⁰⁸⁻¹¹¹ Die Antikörper-Peptid-Interaktion könnte somit helfen diagnostische und prognostische Biomarker für Infektions- oder Autoimmunerkrankungen zu identifizieren.^{52,112-115} Aber auch die Kreuzreaktivitäten des Antikörpers mit Peptiden aus anderen Proteinen können mittels Peptidmikroarrays bestimmt werden.^{40,112,116}

Die Analyse von Bindungsspezifitäten von Antikörpern auf Peptidmikroarrays^{37,40-44,116} ist eine zuverlässige und schnelle Methode, die als Standardprozedur zur Qualitätskontrolle der einzusetzenden Antikörper durchgeführt wird, bevor die Antikörper in weiteren teuren analytischen Methoden, wie z.B. der Sequenzierung, eingesetzt werden. Beispielsweise wurde die Bindungsspezifität von verschiedenen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern mittels Peptidmikroarrays untersucht, wobei für die verschiedenen anti-Phosphotyrosin-Antikörper eine unterschiedliche Sequenzspezifität festgestellt wurde.^{117,118} Die Untersuchung mit Mikroarrays bietet dabei eine detaillierte Aussage über Bindungsmuster der Antikörper, der Kreuzreaktivität und Beeinflussung von anderen Modifikationen und gibt so Auskünfte über die benötigten durchzuführenden Kontrollexperimente für die weiteren biologischen Experimente.

1.4.1 Detektion von Bindungen auf Peptidmikroarrays

Die Bindung des Zielproteins an die immobilisierten Peptide oder die posttranslational modifizierten Peptide kann durch drei Hauptdetektionsmöglichkeiten visualisiert werden (Abbildung 1.4).

Die erste Methode nutzt Antikörper, die spezifisch das Zielprotein detektieren (Abbildung 1.4 A). Nach der Inkubation des Peptidmikroarrays mit dem Zielprotein, wird zuerst ein gegen das Zielprotein gerichteter Antikörper (anti-Zielprotein-Antikörper) verwendet, gefolgt von einem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Damit wird an den Positionen auf dem Peptidmikroarray, an denen das Zielprotein an ein immobilisiertes Peptid gebunden hat, ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Das Epitop des Anti-Zielprotein-Antikörpers sollte allerdings bekannt sein, um jegliche Beeinflussung der Erkennung des immobilisierten Peptids zu vermeiden. Alternativ kann der Anti-Zielprotein-Antikörper selbst fluoreszenz-markiert sein, wie z.B. bei der Erkennung der Bindung von anti-Histonpeptid-Antikörpern durch anti-Immunglobulin (anti-IgG)-Antikörper oder bei der Charakterisierung von pan-spezifischen Antikörpern^{77,118} auf Peptidmikroarrays. Der Hauptvorteil dieser Detektionsmethode liegt in der großen Vielfalt und in der zahlreichen Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen Primär- und Sekundärantikörpern. Das Auslesen der Peptidmikroarrays erfolgt meist mittels konfokaler Laserscanner.

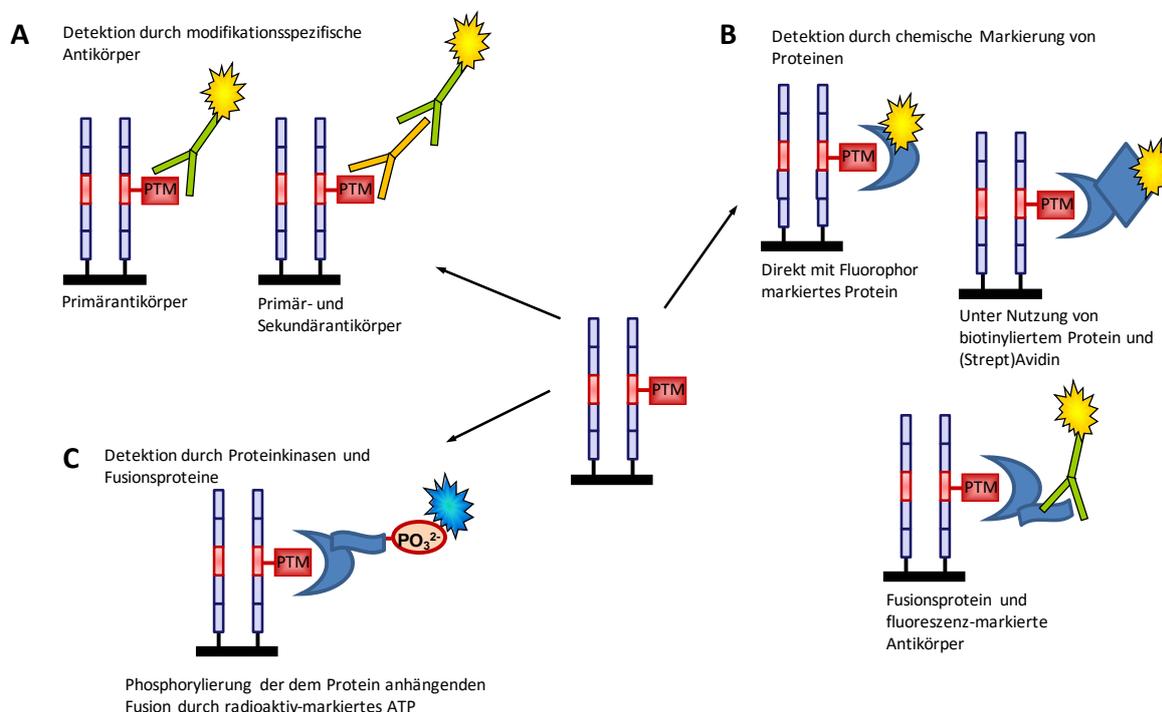


Abbildung 1.4: Prinzipien der Detektion von gebundenen Zielproteinen auf Peptidmikroarrays. **A** Die Bindung des Zielproteins oder der posttranslational modifizierten Peptide kann durch modifikationsspezifische Antikörper detektiert werden. Dies wird entweder durch fluoreszenz-markierte Primärantikörper oder durch Primär-Ak, gefolgt von fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern realisiert. **B** Die Detektion der Bindung ist auch durch die chemische Markierung von Proteinen möglich. Das Protein kann hier direkt mit einem Fluorophor markiert sein oder biotinylierte Proteine und (Strept)Avidin bzw. Fusionsproteine und fluoreszenz-markierte Antikörper nutzen. **C** Gebundene Zielproteine können auch durch Proteinkinasen und Fusionsproteine detektiert werden, indem die Kinase die dem Protein anhängende Fusion durch radioaktiv-markiertes ATP phosphoryliert und damit radioaktiv-markiert.

Die zweite Methode bedient sich der chemischen Markierung von Zielproteinen entweder mittels Fluorophore, die ein direktes Auslesen der Signale durch Fluoreszenzscanner ermöglichen¹¹⁹, oder mittels Biotin, welches nach der Bindung von fluoreszenz-markierten Streptavidin oder Avidin detektiert werden kann (Abbildung 1.4 B). Andere chemische Markierungen unter der Nutzung von Lysin- oder Cysteinseitenketten sind nicht regio-selektiv, was meist in einer komplexen Mischung aus inhomogen markierten Proteinmolekülen resultiert. Dieses Problem kann allerdings umgangen werden, indem die Zielproteine regio-selektiv unter Zuhilfenahme von kurzkettigen Peptiden, sogenannten *Tags*, oder durch Fusionsproteine genetisch markiert werden. Diese Fusionen können entweder am C- oder N-Terminus des Zielproteins angehängt werden, was die Detektion stark vereinfacht. Weitverbreitete Fusionsproteine oder *Tags* sind Glutathion-S-Transferase (GST), *His-Tag*, *Flag-Tag*, *HA-Tag* oder *c-myc-Tag*.^{120,121} Auch hier erfolgt das Auslesen des Fusionsproteins wieder über fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper, die gegen das Fusionsprotein oder den *Tag* gerichtet sind. So wird der Arbeitsaufwand und das benötigte Assaymaterial für die Untersuchung von verschiedenen Zielproteinen oder Proteindomänen reduziert.

Die dritte Methode fokussiert auf die Nutzung von Proteinkinasen, die die GST-Fusion des Zielproteins unter Anwendung von radioisotop-markiertem Adenosintriphosphat (ATP) phosphorylieren (Abbildung 1.4 C). Die dadurch entstandenen radioaktiv-markierten Spots auf dem Peptidmikroarray, an den Positionen an denen das Zielprotein gebunden hat, können über Phosphorimager oder Röntgenfilme detektiert werden.

1.4.2 Detektion enzymatischer Aktivitäten auf Peptidmikroarrays

Für die Detektion von enzymatischen Aktivitäten, die Reste von einem Co-Substrat auf das Substrat übertragen, werden zwei verschiedene Ansätze genutzt.^{95,122} Diese unterscheiden sich hauptsächlich durch die Art des Co-Substrates.

Die erste Methode bedient sich der Anwendung von markierten Co-Substraten, dessen Rest von einem modifikationstransferierenden Enzym auf das Substrat bzw. die immobilisierten Peptide übertragen wird, so dass letztendlich dieser veränderte und markierte Rest als Sensor dient (Abbildung 1.5 A). Dieser direkte Nachweis erfolgt z.B. durch radioisotopen-markiertes [γ -³²P]-ATP oder [γ -³³P]-ATP^{95,122-126}, ¹⁴C-acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA, Ac-CoA)^{127,128}, ³H-S-Adenosylmethionin (SAM, AdoMet)^{98,129} oder Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) zur entsprechenden Charakterisierung von Kinasen, Acetyltransferasen, Methyltransferasen oder (Poly-)ADP-Ribosyltransferasen. Radioaktiv-markierte Substrate werden meist über Phosphorimager, Emulsionen oder Röntgenfilme detektiert. Diese Methode ist sensitiv und bietet den Vorteil, dass es die native Substratstruktur beibehält.¹³⁰

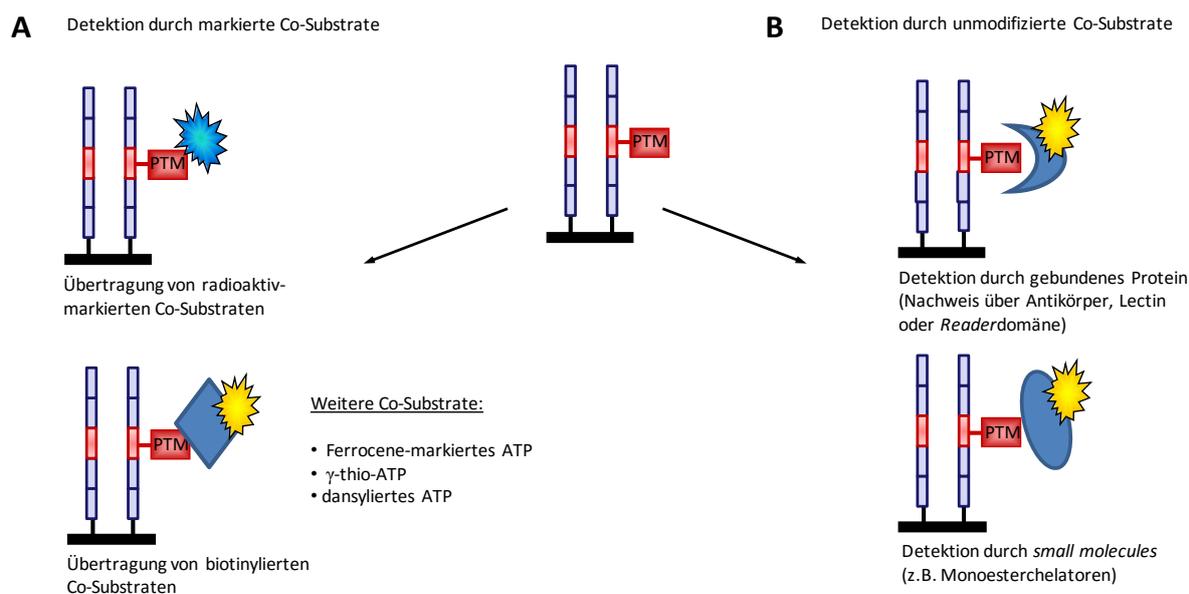


Abbildung 1.5: Prinzipien zur Detektion von enzymatischen Aktivitäten auf Peptidmikroarrays. **A** Durch die Nutzung von markierten (z.B. radioaktiv-markierten oder biotinylierten) Co-Substraten kann das modifikationsübertragende Enzym den markierten Rest auf das Substrat bzw. die immobilisierten Peptide transferieren und damit direkt markieren. **B** Die Modifikation der auf dem Peptidmikroarray immobilisierten Peptidsubstrate durch Enzymaktivitäten kann auch durch unmodifizierte Co-Substrate detektiert werden. Dies wird u.a. durch gebundenes Protein oder *small molecules* ermöglicht.

Indirekte Nachweismethoden^{131–134} nutzen biotinylierte Co-Substrate wie ATP¹³⁵ oder NAD⁺ zur Charakterisierung von Kinasen oder ADP-Ribosyltransferasen, die über fluoreszenz-markiertes Streptavidin oder über Streulichtmessung (nach Inkubation mit Nanogold-markiertem Avidin und darauffolgender Silberfärbung) ausgelesen werden können. Darüber hinaus kann auch Ferrocene-konjugiertes ATP¹³¹ oder γ -thio-ATP¹³⁴ in Kombination mit elektrochemischer Detektion oder von dansyliertem ATP¹³⁶ in Kombination mit Fluoreszenz-basierten Auslesemethoden verwendet werden, um die Phosphorylierung durch Proteinkinasen zu identifizieren.

Die zweite Methode nutzt unmodifizierte Co-Substrate (Abbildung 1.5 B). Um die durch das Enzym eingebaute Modifikation des Substrates zu detektieren, wird ein spezifisches Reagenz benötigt, das an den übertragenen Rest bindet. Hier dient die posttranslationale Modifikation als Sensor, indem die Bindung des Proteins an eine PTM die enzymatisch übertragene Modifikation nachweist (zeigt sich in der Zunahme des Signals). Dieses Reagenz kann entweder ein Protein sein, wie z.B. ein sequenz- oder modifikationsspezifischer Antikörper inkl. der phosphospezifischen Antikörper, ein Lectin oder eine PTM-spezifische *Readerdomäne* (z.B. die SH2-Domänen zur Erkennung von PhosphoTyrosin-Bausteinen⁶⁶). Die Detektion von meist generischen phosphospezifischen Antikörpern erfolgt indirekt über fluoreszenz-markierte, an den PTM-Sensor bindende sekundäre Antikörper oder durch direkte Fluoreszenz- oder Chemolumineszenzmarkierung des Phosphatrest-erkennenden Antikörpers.^{56,137–142} Aber auch kleine chemische Verbindungen (*small molecules*) können als Reagenz genutzt werden, welche das immobilisierte nun spezifisch modifizierte Peptid erkennen. Die Detektion erfolgt hier mittels fluoreszenz-markierter (ProQ-Diamond)^{118,122,133,143} oder biotinylierter, Phosphat-

monoester bindender Chelatoren (Phos-Tag).^{139,144–147} Im Falle des Phos-Tags wird die erfolgreiche Phosphatgruppenübertragung über Oberflächen Plasmon Resonanz (nach Inkubation von Phos-Tag und Streptavidin oder Streptavidin und anti-Streptavidin-Antikörper) oder über Fluoreszenz (nach Inkubation von Phos-Tag und fluoreszenz-markiertem Streptavidin) nachgewiesen.^{126,148,149}

Beide Methoden ermöglichen es die eingefügte posttranslationale Modifikation chemisch umzuwandeln. So ist es möglich die durch markierte Co-Substrate modifizierten Peptidderivate chemisch zu verändern, so dass diese chemoselektiv mit Fluorophoren reagieren. Das erlaubt ein fluoreszenzbasiertes Auslesen. Ein Beispiel ist hier die Kinase-vermittelte Übertragung von Thio-Phosphat auf die immobilisierten Peptide, die durch anschließende Michael-Addition in biotinylierte Substrate umgewandelt werden. Das Biotin kann im nächsten Schritt durch fluoreszenz-markiertes Streptavidin oder Avidin visualisiert werden. Alternativ kann auch die posttranslationale Modifikation selbst in einzigartige strukturell-veränderte Peptide überführt werden. Als Beispiel dient hier die Transformation von Phosphoserin/Phosphothreonin-enthaltenden Peptiden in jeweils Dehydroalanin- oder 2-amino-dehydrobutyrylierte Aminosäuren durch basenkatalysierte β -Elimination.¹⁵⁰ Die sich daraus ergebende, in den immobilisierten Peptideneinzigartige Doppelbindung kann zum chemoselektiven Markieren mit Fluorophoren oder mit Biotinmolekülen genutzt werden.

Die Detektion von modifikationsentfernenden Enzymen greift auf dieselben Prinzipien zurück, allerdings in der entgegengesetzten Richtung. Hierbei muss beachtet werden, dass der Inhalt der Peptidmikroarrays verändert werden muss, so dass jetzt die chemisch modifizierten Peptide als Substrate präsentiert werden. Hier sollte zusätzlich eine Kontrollinkubation durchgeführt werden, um den „Startwert“ zu ermitteln und dadurch die enzymatische Aktivität (Abnahme des Signals) direkt vergleichen zu können.

1.5 Histonmikroarrays zur Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen und epigenetischer Modulation

Die Analyse von Histonmodifikationen hat eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen identifiziert, die die Modulation vom Chromatinstatus durch Histon-DNA-Interaktionen und Genexpression regulieren. Dabei spielt insbesondere auch der *cross-talk* der verschiedenen Modifikationen in vielen Chromatin-assoziierten Prozessen und krebserregenden Krankheiten eine wichtige Rolle. Jedoch fokussiert sich der Großteil der Forschung nur auf die N-terminalen Regionen der Histonproteine. Dies hat hauptsächlich zwei Ursachen: Erstens wurde lange vermutet, dass die Aminosäuren innerhalb des Histonkerns keine wichtige Rolle bei der Interaktion mit anderen Molekülen spielen. Zudem wurde vermutet, dass die Histonstruktur, aufgrund von sterischer Hinderung, keine dieser Interaktionen oder verändernden Modifikationen im Inneren des Histonoktamers erlaubt. Aber es wurde

zweitens auch dadurch verursacht, dass es einfach an einem geeigneten Verfahren mangelte, welches die Untersuchung des Histonkerns ermöglichte.

Eine systematische Untersuchung der Histonmodifikationen ist jedoch wegen der hohen Anzahl an theoretisch möglichen Kombinationen der verschiedenen PTMs schwierig. Ein Schwerpunkt der Forschung lag in den letzten Jahren auf den *N*-terminalen Regionen der Histone H3 und H4.¹⁵¹ Die Histonmodifizierungen wurde mittels harzgebundener Bibliotheken von den *N*-terminalen Regionen des Histons H4 entschlüsselt.¹⁵² Garskeet *al.* verwendeten eine kombinatorische Bibliothek aus 5000 10-meren Peptiden, die alle Kombinationsmöglichkeiten der *N*-terminalen Modifikationen am Histon H3 darstellen, um den *cross-talk* von PTMs für sechs *Reader*domänen zu charakterisieren und um damit den Methylierungsstatus von H3K4 zu untersuchen.¹⁵³

Zudem wurde angenommen, dass die Nukleosomstruktur eine effiziente Beschreibung und Ablesung von PTMs verhindert. Jedoch konnten Sawicka *et al.* zeigen, dass die Phosphorylierungsstellen im Histonkern zellzyklusabhängig sind und zwischen Interphase und Mitose variieren.¹⁵⁴ Darüber hinaus sind die Wee1-vermittelte Phosphorylierung am Histon H2B mit dem an der Grenze zum Histonkern liegendem Tyr37¹⁵⁵, die Methylierung am Histon H3K79 durch die Lysinmethyltransferase Dot1¹⁵⁶ oder die Acetylierung von H3K122 durch p300/CBP¹⁵⁷ Beispiele, dass die Histonkernregionen sehr wohl für enzymatische Modifikationen zugänglich sind. Andere Untersuchungen konnten demonstrieren, dass die Modifikation der Histonkerne die Transkription regulieren.^{7,158,159}

Die Entwicklung von Histonmikroarrays, die mehrere kombinierte Modifikationen präsentieren, erlaubt es dabei Histonmodifikationen und den *cross-talk*, ergänzend zu den modifikations- und sequenzspezifischen Antikörpern oder den massenspektrometrischen Ansätzen, zu untersuchen. Eine Vielfalt an verschiedenen Histonmikroarrays wurde entwickelt, die in ihrer Anzahl an präsentierten Histonpeptiden und Histonvarianten, der Peptidlänge, aber auch den posttranslationalen Modifikationen stark variieren (Tabelle 1.1).

Einige dieser Histonmakroarrays präsentieren Peptide, die auf Zellulosemembranen gebunden sind.^{160–162} Die Histonmikroarrays von EpiCypher immobilisieren biotinylierte Histonpeptide auf Streptavidin-beschichteten Glasobjektträger.^{42,163–168} Andere beschriebenen Histonmikroarrays präsentieren Peptid-Zellulose-Konjugate, die auf Glasobjektträgern^{40,161,169–171} oder Nitrozellulose-beschichteten Glasoberflächen¹⁷² immobilisiert wurden. Allerdings enthalten all diese Histonmikroarrays entweder nur eine begrenzte Anzahl von PTMs (Tabelle 1.1) oder sie umfassen nur die *N*-terminalen Regionen der Histone. Dadurch ist es nicht möglich alle Modifikationen innerhalb des Histonkerns zu untersuchen und herauszufinden, wie diese Modifikationen und deren *cross-talk* die Genexpression und Stoffwechselregulation beeinflussen. So präsentiert z.B. auch der Histonmikroarray aus dem Labor von John Denu die Histonsequenz vom Histon H3 nur bis zur Position 125, und auch das nicht vollständig (keine komplette Histonsequenz H3 1-125), sondern mit Unterbrechungen.

Für das Histon H4, auch hier mit Unterbrechungen, werden die Sequenzen nur bis zur Aminosäure 65 dargestellt, wohingegen die Histonproteine H2A und H2B wieder nur durch den N-Terminus (H2A 1-23 und H2B 1-30) präsentiert werden.¹⁷²

Tabelle 1.1: Vergleichende Übersicht über die vier verschiedenen zurzeit publizierten Histonmikroarrays (adaptiert aus¹⁷²)

Plattform		Kombinatorischer PTM-Histonpeptidmikroarray (Denu-Labor)	MODifizierter Histonpeptidarray (Active Motif)	EpiGOLD Histonpeptidarray (EpiCypher)	Histonmikroarray (JPT, diese Arbeit)
Beschichtung der Mikroarrayoberfläche		Nitrozellulose	Zellulose	Streptavidin	Epoxy-Gruppen
Peptidumfang	Einzel-PTM	169 Peptide (H3, H4, H2A und H2B)	70 Peptide (H3, H4, H2A und H2B)	70 Peptide (H3, H4, H2A und H2B)	2444 Peptide (H2A, H2B, H3, H4 und H1)
	PTM-Kombinationen	371 Peptide mit bis zu 5 PTMs	309 Peptide mit bis zu 4 PTMs	121 Peptide mit bis zu 5 PTMs	1430 Peptide mit bis zu 6 PTMs
	Peptidlänge	13mer	19mer	10-20mere	20mer
	Gesamtpeptidanzahl	674	379	191	3874
Enthaltende PTMs		Kac, Kme1, Kme2, Kme3, Rme1, Rme2a, Rme2s, Citrullin, Sph, Tph, Yph	Kac, Kme1, Kme2, Kme3, Rme2a, Rme2s, Citrullin, Sph, Tph	Kac, Kme1, Kme2, Kme3, Rme1, Rme2a, Rme2s, Citrullin, Sph, Tph	Kac, Kprop, Kbut, Kmal, Ksuc, Kme1, Kme2, Kme3, Rme1, Rme2a, Rme2s, Citrullin, Sph, Tph, Yph
Spotreplika		3 Spots x 2 Subarrays	1 Spot x 2 Subarrays	6 Spots x 4 Subarrays	1 Spot x 3 Subarrays

Der in dieser Arbeit verwendete Histonmikroarray präsentiert alle fünf Histonproteine in Form von 3874 überlappenden Peptiden, die jeweils als Triplikat auf der Mikroarrayoberfläche immobilisiert sind. Dies erlaubt eine hohe intra-chip Reproduzierbarkeit und statistische Auswertung, wie bereits mit anderen Peptidmikroarrays gezeigt werden konnte.^{51,112,173,174} Die wissenschaftliche Peptidbibliothek (1400 Peptide) enthält alle Peptide der vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4, indem es die volle Proteinsequenz abdeckt und zusätzlich noch deren natürliche Histonvarianten (wie z.B. H3.1, H3.2, H3.3) in Form überlappender Peptide abbildet. Hier werden die posttranslationalen Modifikationen an allen bereits bekannten und publizierten Histonmodifikationsstellen und mit allen PTM-Kombinationen (bis zu 6 PTMs pro Peptid) dargestellt. Dabei wurde hier auf die am besten untersuchten Modifikationen von Lysin, Arginin und den phosphorylierbaren Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin fokussiert. Die auf dem Histonmikroarray präsentierten Modifikationen sind acetylierte (Kac), propionylierte (Kprop), butyrylierte (Kbut), methylierte (mono-, di- and tri-methyliert, entsprechend mit Kme1, Kme2 and Kme3 abgekürzt) Lysinbausteine, mono- (Rme1) und di-methylierte Argininreste (Rme2a, Rme2s fürsymmetrisch und asymmetrisch dimethyliertes Arginin), Arginin-Citrullin-Austausch (Cit) sowie phosphoryliertes Serin, Threonin und Tyrosin (Sph, Tph, Yph). Darüber hinaus enthält die wissenschaftliche Bibliothek auch die vom Histon H1 abstammenden Peptide als Wildtyp-Peptidscan und alle von Wisniewski *et al.*¹⁷⁵ beschriebenen Modifikationen. Die systematische Histonbibliothek (2444 Peptide) enthält einen *Scan* durch die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 als einzelne Modifikationen der oben erwähnten PTMs an allen potentiellen Modifikationsstellen und den zusätzlichen Modifikationen von malonylierten (Kmal) und succinylierten (Ksuc) Lysinresten.

1.6 Histonmodifikationen, deren Enzyme und Readerdomänen

Posttranslationale Modifikationen spielen eine wesentliche Rolle in der Epigenetik, Signaltransduktion und in den Stoffwechselwegen. Histonmodifikationen sind reversibel und werden durch komplementäre Enzymklassen kontrolliert (Abbildung 1.6). Enzyme, die die posttranslationalen Modifikationen bzw. Histonmodifikationen übertragen oder entfernen, werden als *writer* und *eraser* dieser epigenetischen Modifikationen bezeichnet. Die Dekoration der Histone mit posttranslationalen Modifikationen resultiert im sogenannten Histon Code, der durch Proteinbindedomänen (*Readerdomänen*) ausgelesen werden kann. Die *Readerdomänen* binden an die unterschiedlichen PTMs oder die Kombination verschiedener Modifikationen. Die meisten posttranslationalen Modifikationen sind auch für Nicht-Histon-Substrate zutreffend. Allerdings liegt der Fokus der in dieser Arbeit beschriebenen Enzymsubstrate auf Histonen, weshalb diese im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

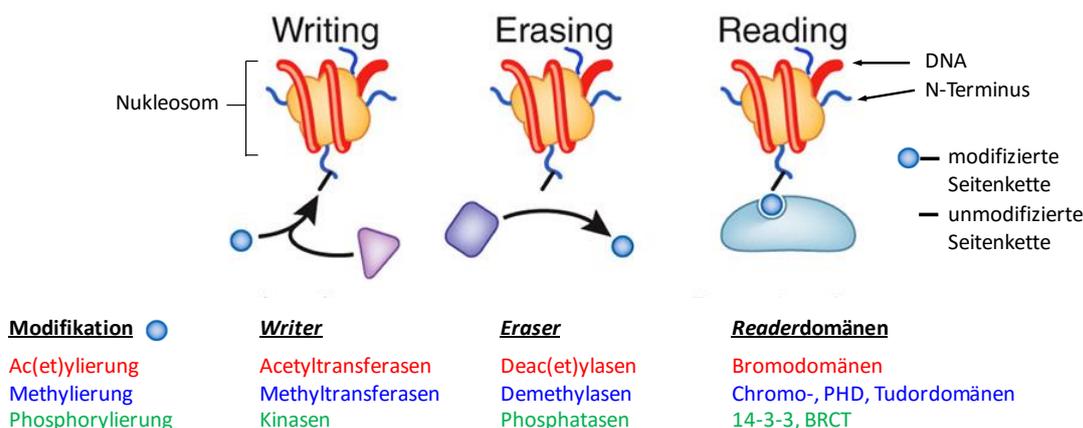


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der kovalenten Histonmodifikationen (Ac(et)ylierung, Methylierung und Phosphorylierung) und ihrer entsprechenden Enzyme und Readerdomänen. Gezeigt sind die drei verschiedenen Vorgänge der epigenetischen Modulation: die Übertragung der posttranslationalen Modifikation („Writing“) durch die Enzymklassen der *writer*, die Entfernung der PTM („Erasing“) durch die komplementären Enzymklassen (*eraser*), sowie das Erkennen und Binden („Reading“) an die Histonmodifikation durch die entsprechenden Proteinbindedomänen (*Readerdomänen*). Abbildung adaptiert von¹⁷⁶.

1.6.1 Acetylierung von Histonen

Die Acetylierung von Histonen wurde das erste Mal 1964 von Allfrey entdeckt.¹⁷⁷ Die von ihm beschriebene *N*-Acetylierung ersetzt ein Wasserstoffatom in einer reaktiven Aminogruppe durch einen Acetyl-Rest (CO-CH₃). *N*-Acetylierung kann entweder am *N*-terminalen α -Amin eines Proteins (*N* ^{α} -Acetylierung) oder an der ϵ -Aminogruppe in der Seitenkette von Lysinen (*N* ^{ϵ} -Acetylierung) auftreten. In dieser Arbeit wird der Fokus auf letztere gelegt werden, da die *N* ^{ϵ} -Acetylierung eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikation innerhalb von Histonen darstellt. Sie ist an der Transkription, Chromatinstruktur und DNA-Reparatur beteiligt.¹⁷⁸

Histone sind basische Proteine, die aufgrund ihrer Anreicherung von positiv-geladenen Seitenketten (d.h. Lysin und Arginin) die Affinität der Histone zur negativ-geladenen DNA erhöht. Die Acetylierung

neutralisiert die positive Ladung des Lysins, wodurch die Interaktion der Histone mit der DNA geschwächt werden kann. Die Acetylierung von Lysinen ist reversibel. Lysinacetylierung wird durch die Enzyme der Histon-Acetyltransferasen (KATs) eingeführt, und durch die Histon-Deacetylasen (HDACs) effizient umgekehrt, wodurch sie das Gleichgewicht des Acetylierungsstatus von nukleosomalen Histonen und innerhalb der Zelle regulieren.

Histone werden an vielen Lysinresten acetyliert, die meisten der gut untersuchten Acetylierungen finden an den *N*-terminalen Regionen der Histone, insbesondere am H3K9, H3K14, H4K5, H4K8, H4K12 und H4K16, statt.¹⁵⁸ Allerdings konnte eine Acetylierung auch am H3K56ac gezeigt werden, welches sich innerhalb der globulären Domäne des Histons H3 an der Eintritt- bzw. Austrittsstelle der DNA-Superhelix befindet.¹⁷⁹

Die Acetylierung stört die elektrostatische Interaktion zwischen Histonen und DNA. Dadurch entsteht ein „offenes Chromatin“ mit einer frei zugänglicheren DNA, so dass diese besser für die Transkriptionsfaktoren zugänglich ist.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Histonacetylierungen noch mindestens in zwei anderen Wegen funktionieren: erstens, Sie können Proteine mit bestimmten *Reader*domänen, wie die spezifisch Acetyllysin-bindenden Bromodomänen, rekrutieren. Bromodomänen werden überwiegend in KATs und am Chromatinumbau beteiligten Komplexen gefunden.¹⁸⁰ Zweitens inhibiert die Histonacetylierung die Bindung von Chromatin-assoziierten Proteinen am Chromatin. So konnte gezeigt werden, dass H3K4ac die Affinität von *spChp1* (Chromodomänenprotein 1 aus *schizosaccharomyces pombe*) an der *N*-terminalen Region von H3 mit methyliertem K9 reduziert. Das ist übereinstimmend mit Strukturdaten, die zeigen, dass H3K4 mit einer speziellen Glutaminsäure innerhalb der Chromodomäne von *spChp1* interagiert.^{181,182}

1.6.1.1 Histon-Acetyltransferasen (KATs)

Bislang wurden zwei Typen der 26 humanen Histon-Acetyltransferasen identifiziert, wovon beide acetyl-CoenzymA (ac-CoA) als Cofaktor verwenden, um die Acetylgruppe auf die ϵ -Aminogruppe der Lysine zu übertragen. Typ A ist überwiegend im Zellkern lokalisiert, wohingegen Typ B meistens im Zytoplasma vorkommt. Kennzeichnend für Typ B-KATs ist, dass sie nur freie Histone acetylieren und keine bereits in das Nukleosom eingebettete Histone. Somit sind Typ B-KATs für die Acetylierung neusynthetisierter Histone verantwortlich, bevor diese in den Zellkern importiert werden. Bislang konnte nur ein Vertreter für diesen Typ identifiziert werden: die Histon-Acetyltransferase 1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (*scHat1*) und seine Homologe.¹⁸³

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Typ A-KATs in ihrer Substratspezifität und dem katalytischen Mechanismus.^{184–186} Sie können in 5 Familien unterschieden werden¹⁸⁷, basierend auf ihrer Proteinsequenz und dreidimensionaler Struktur:

1. GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferasen (GNATs)¹⁸⁸, die auch die beiden Vertreter GCN5 (KAT2A) und PCAF (KAT2B) enthalten, die u.a. H3K9 acetylieren.
2. MYST (für MOZ, YBF2/Sas3, Sas2, und Tip60) verwandte KATs¹⁸⁹, einschließlich des Enzyms Tip60 (60-kDa *Tat-interacting protein*), welches H4 und H2A an Modifikationsstellen von DNA-Doppelstrangbrüchen acetyliert^{190,191} und darüber hinaus auch an der Rekrutierung von DNA-Reparaturmechanismen an diesen Stellen verantwortlich ist^{190,192}
3. P300/CREB (*cAMP response element binding*) Bindeprotein (p300/CBP) KATs, die eine Vielzahl physiologischer Funktionen regulieren¹⁹³ und als Co-Aktivatoren für diverse Transkriptionsfaktoren dienen¹⁹⁴. Sie acetylieren alle vier Histone und auch nukleosomale Histone, sowie viele weitere Nicht-Histon-Substrate.
4. Allgemeine Transkriptionsfaktoren KATs, wie z.B. TAF1, die eine Histon-Acetyltransferase-Aktivität aufweisen.
5. Nukleare Hormon-verwandte KATs, SRC1 und ACTR (z.B. SRC3) besitzen ebenfalls eine Histon-Acetyltransferase-Aktivität und wirken als Coaktivatoren von nukleären Rezeptoren.

Sowohl *in vitro* Untersuchungen als auch durch Enzym-/Inhibitorstrukturen wurden zwei potentielle Mechanismen für die enzymatische Aktivität von Acetyltransferasen postuliert. KATs können einen ternären Komplex zwischen dem acetyl-CoA und dem unacetylierten Lysin erzeugen (GNATs), oder sie bilden ein Intermediat mit acetyl-CoA und einem Cystein, bevor das angezielte Lysin acetyliert wird (MYST).¹⁰

Die Acetyltransferasen des Typs A sind überwiegend in großen makromolekularen Komplexen zu finden, die nicht nur die katalytische Untereinheit, sondern noch mehrere andere zusätzliche Komponenten enthalten, die für die Spezifität und genomische Lokalisation verantwortlich sind.

1.6.1.2 Histon-Deacetylasen (HDACs)

Histon-Deacetylasen sind Enzyme, die die Acetylierung von Lysinen rückgängig machen und dabei die positive Ladung der Seitenketten wiederherstellen. Die 18 humanen Enzyme der HDACs sind, abhängig von ihrer Sequenzhomologie, in 4 Klassen unterteilt. Klasse I und Klasse II enthalten alle 10 Zink-abhängigen HDACs (HDAC1-HDAC10), die jeweils mit den Enzymen *scRpd3* und *scHda1* aus Hefe am nächsten verwandt sind. Klasse IV wird lediglich durch einen Vertreter, HDAC11, repräsentiert. Die HDACs der Klassen I, II und IV teilen sich einen ähnlichen katalytischen Mechanismus bei dem ein Zinkion, nicht aber ein anderer Co-Faktor, benötigt wird.¹⁹⁵

Die 7 HDACs der Klasse III sind vom Co-Substrat Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) abhängig. Die Vertreter dieser Klasse werden auch als Sirtuine bezeichnet und sind zum Gen *Silent Information Regulator 2* aus Hefe (*scSir2*) homolog.^{196,197} Die Abhängigkeit der Sirtuine vom Co-Substrat NAD⁺ deutet auf ihre entscheidende Rolle im Metabolismus und Energiestoffwechsel zur Aufrechterhal-

tung der zellulären Vorgänge und der Genomintegrität hin.^{196,198–201} Sie werden damit auch entweder durch metabolischen und energetischen Stress (Ernährungs- und Wärmerestriktion) als auch durch genotoxischen Stress aktiviert.

Die subzelluläre Lokalisation der humanen Sirtuine (Sirt) spielt eine wesentliche Rolle für ihre Substratspezifität.^{202,203} So besitzen alle 7 humanen Sirtuine eine Deacetylaseaktivität. Allerdings favorisieren einige der Sirtuine andere (Acyl-)Substrate. So wirkt z.B. Sirtuin5 als Desuccinylase und Demalonylase^{204–208} und Sirtuin6 als Demyristoylase.^{209,210} Zusätzlich werden auch andere saure Acylmodifikationen, wie Glutaryllysin^{211,212}, oder kurzkettige fetthaltige Acylierungen (propionyliertes, butyryliertes, crotonyliertes Lysin) durch die verschiedenen Sirtuine entfernt.^{210,213–215} Sirt4 und Sirt6 haben darüber hinaus eine Mono-ADP-Ribosyltransferaseaktivität.^{198,216–223} Sirt1 ist überwiegend im Zellkern lokalisiert, kann sich jedoch zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und her bewegen.^{224,225} Sirt2 kommt überwiegend im Zytoplasma vor²²⁶, ist in der G2/M-Phase der Zellteilung jedoch auch im Zellkern anwesend.²²⁷ Sirt3, Sirt4 und Sirt5 finden sich im Mitochondrium, obwohl auch hier ein kleiner Anteil an Sirt3 unter Nicht-Stressbedingungen im Zellkern vorkommt.²²⁸ Sirt6 ist wiederum nur im Zellkern lokalisiert. Sirt7 kommt nur im Nukleolus vor.^{199,218}

Sirtuine werden lebensverlängernde Eigenschaften zugesprochen^{229–231}, was in einigen Modellsystemen, einschließlich der Maus, gezeigt werden konnte²³² und zur Entwicklung von *anti-aging*-Produkten durch die Pharmaindustrie führte.²³³ Resveratrol, eine natürlich vorkommende Komponente des Rotweins, soll die Sirtuine angeblich aktivieren und damit den Ursprung für das sogenannte „französische Paradox“ darstellen, nach dem der Konsum von Rotwein den Effekten einer andererseits fettreichen Ernährung entgegenwirkt.²³⁴

Wie auch die KATs kommen die HDACs in großen makromolekularen Komplexen vor, die auch nur in diesen Komplexen aktiv sind. Die Sirtuinproteine bestehen aus zwei globulären Domänen mit 14 α -Helices und 9 β -Strängen, deren Struktur in einer großen Rossmann-Spalte, zur Bindung des Co-Substrates NAD⁺, und einer kleineren Zink-Bindedomäne organisiert ist. Beide Domänen sind durch einige *Loops* verbunden, so dass sich ein Proteintunnel mit konservierten Aminosäuren innerhalb der *Sir2*-Familie formt und für die Substratbindung und -katalyse verantwortlich ist.²³⁵ Die Bindungstasche besitzt für jede Sirtuinisoform unterschiedliche Ladungsverhältnisse und Hydrophobizitäten, wodurch sich die unterschiedliche Substratspezifität für jedes Sirtuin ergibt.^{204,236}

Obwohl die Sirtuine als Deacetylasen klassifiziert werden, wurde die Sirtuinkatalyse ursprünglich in einer Ribosyltransferasereaktion beobachtet.²³⁷ Hierbei wird NAD⁺ in Nikotinamid und acetylierte ADP-Ribose gespalten. Dies führte zur Entdeckung der HDAC-Aktivität des mammalen Homologs von *Sir2*¹⁹⁸, und einer weiterführenden Aufklärung des chemischen Mechanismus, in welchem ein Intermediat zwischen der verbleibenden ADP-Ribose und der Acetylgruppe des Peptidsubstrats gebildet wird. Schlussendlich wird die Reaktion mit der Bildung von 2-O-acetyl-ADP-Ribose (*O*-AADPR) und

einem deacetylierten Substrat abgeschlossen, welches auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Sirtuinkatalyse ist.^{201,238} Die Katalyse der Reaktion von Sirtuinen ist auf die koordinierte Bindung von dem acetylierten Peptid, gefolgt von der Bindung des NAD^+ , zurückzuführen. Obwohl die Bildung von acetylierter ADP-Ribose energetisch nicht begünstigt ist, wird die Reaktion durch die Hydrolyse von NAD^+ angetrieben. Diese Abhängigkeit vom NAD^+ -Vorhandensein unterstreicht den Zusammenhang zwischen dem Energiestatus der Zelle und der Sirtuinaktivität.

1.6.1.3 Readerdomänen von Histonacetylierung

Bromodomänen (BRDs) sind evolutionär konservierte, etwa 110 Aminosäure lange Proteine oder Proteindomänen, die acetylierte Lysine binden und innerhalb von Proteinkomplexen maßgeblich an der Regulation der Gentranskription beteiligt sind. Trotz großer Sequenzvariationen weisen alle Bromodomänen eine schmale, aber tiefe Bindetasche auf, um acetylierte Lysine und ihre Seitenketten aufnehmen zu können (Abbildung 1.7 A).^{162,239–241} Alle Acetyllysin-Bindetaschen sind darüber hinaus hydrophob und mit einer Wasserstoffbrückenbindungsstelle am unteren Boden der Bindetasche versehen. Für die meisten BRDs wird das acetylierte Lysin in der Bindetasche über Wasserstoffbrückenbindung am Boden an einen Asparaginrest verankert²⁴² (Abbildung 1.7 B), wobei die Interaktion durch ein Netzwerk weiterer Wasser-vermittelter intermolekularer Wasserstoffbrücken stabilisiert wird.²⁴³

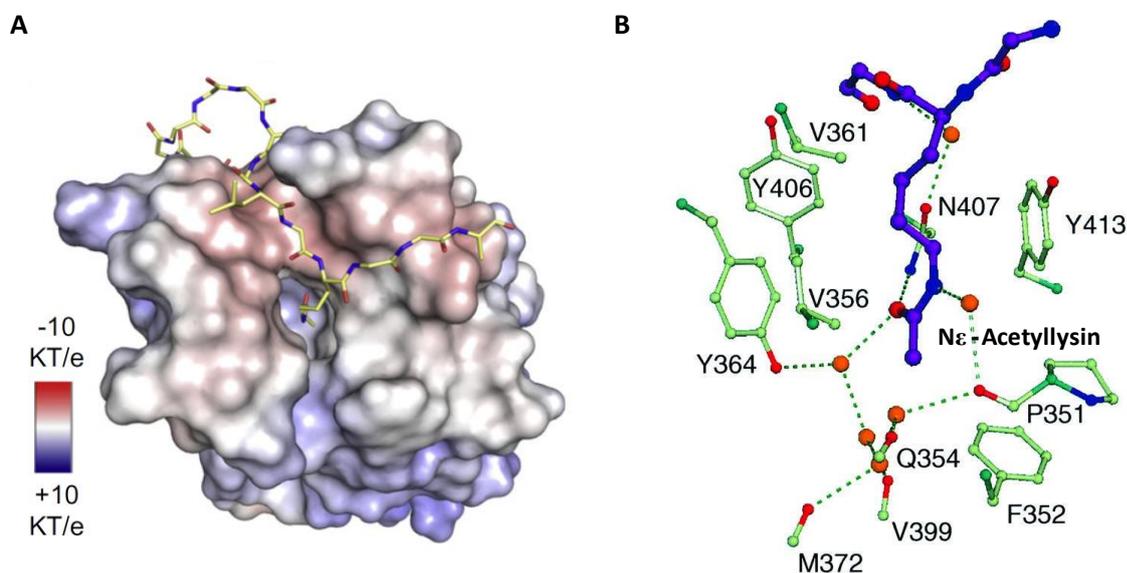


Abbildung 1.7: Bromodomänen und ihre Acetyllysin-Bindetaschen. **A** Die Abbildung zeigt die elektrostatische Oberfläche der Bromodomänen BRD2(1) mit gebundenen Peptid H4K12ac (AS 1-15 von Histon H4) (PDB: 2DVQ, Abbildung aus ²⁴⁴). Die Farbgebung der elektrostatischen Oberflächenpotentiale reichen von -10 kT/e (rot) bis $+10\text{ kT/e}$ (blau). Die schmale und tiefe Acetyllysin-Bindetasche der Bromodomänen ist zum Leser orientiert. **B** Details zur Peptidbindetasche des acetylierten Peptids H4K16ac (AS 19-29 von Histon H4) innerhalb der Bromodomäne Gcn5p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die $N\epsilon$ -Acetyllysin-Bindetasche zeigt den Ring von Wassermolekülen um die Acetylgruppe am Boden der Bindetasche und die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche. Abbildung entnommen aus ²⁴²

Bisher sind 61 humane Bromodomänen in 46 unterschiedlichen Proteinen identifiziert worden¹⁶², von denen viele interessante Zielproteine für die pharmazeutische Behandlung von Entzündungen, Virusinfektionen oder Krebs darstellen.^{245,246} Bromodomänen-enhaltendes Protein 4 (BRD4) agiert als transkriptioneller Regulator²⁴⁷ und enthält zwei *N*-terminale Acetyllysin-bindende Bromodomänen in den Aminosäurebereichen 44-168 (BRD4(1)) und 333-460 (BRD4(2)). BRD4 assoziiert mit Chromatin, indem die Bromodomänen an die acetylierten Lysine in den Histonen binden. Darüber hinaus wurde BRD4 kürzlich als therapeutisches Zielprotein von vielen Krebsarten, einschließlich akuter myelitischer Leukämie, Darm- und Brustkrebs, identifiziert.^{248,249}

1.6.2 Histonmethylierung

Die Methylierung von Histonamino­säuren konnte an den Seitenketten von Arginin, Lysin und Histidin detektiert werden. Im Gegensatz zur Acetylierung oder Phosphorylierung verändert die Methylierung die allgemeine Ladung des Moleküls nicht (wohl aber die Hydrophobizität und Basizität). Die am besten charakterisierten Histonmethylierungen treten an den Lysin- oder Argininresten auf.^{250–252}

Histon-Lysinmethylierungen sind überwiegend am H3K4, H3K9, H3K29, H3K36, H3K79 und am H4K20 zu finden. Diese spezifischen Modifikationsstellen können generell in zwei Kategorien unterschieden werden, euchromatisch und heterochromatisch. Die Methylierung von H3K4, H3K36 und H3K79 wird oft mit aktiven Genen im Euchromatin assoziiert, während die Methylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 mit den heterochromatischen Regionen des Genoms assoziiert wird. Die methylierten Lysinreste werden oft als transkriptionell „aktive“ (z.B. H3K4me3) oder „inaktive“ (z.B. H3K27me3) Kennzeichen bezeichnet, obwohl hier keine klare Abgrenzung in der funktionellen Verteilung zwischen diesen Modifikationen existiert.²⁵³

Zu den hauptsächlich charakterisierten Arginin-Methylierungsstellen gehören H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 und H4R3. Die Methylierung von H3R17 und H3R26 wird mit bestimmten aktiven Genen in Verbindung gebracht. Im Gegensatz dazu tritt die Methylierung am H3K8 und H4R3 gleichzeitig in der Genrepression auf.²⁵¹

1.6.2.1 Lysin-Methyltransferasen

Die erste identifizierte Lysin-Methyltransferase war SUV39H1, welche das H3K9 methyliert.²⁵⁴ Seitdem sind viele weitere Lysin-Methyltransferasen charakterisiert worden, von denen viele nun in Zusammenhang mit Erkrankungen im Menschen, wie z.B. Krebs, gebracht werden.²⁵⁵ Die meisten der Histon-Lysin-Methyltransferasen enthalten eine konservierte SET-Domäne, welche die enzymatische Aktivität des Methyltransfers aufweist. Alle bekannten Histon-Lysin-Methyltransferasen katalysieren den Transfer einer Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin (SAM) auf die ϵ -Aminogruppe des Lysins. Lysine können mono-, di- oder trimethyliert sein, was entsprechend als

Kme1, Kme2 oder Kme3 bezeichnet wird. Beispielsweise katalysiert die Methyltransferase *scSet1* alle drei Methylierungsgrade am H3K4, wohingegen *Set7/9* nur die Monomethylierung am H3K4 generiert.²⁵⁶

1.6.2.2 Readerdomänen von Histonmethylierungen

Es gibt eine ganze Reihe von *Readerdomänen*, die spezifisch methylierte Lysine binden. Dagegen werden methylierte Arginine bis jetzt nur von einer bekannten *Readerdomäne*, der ATRX-DNMT3A-DNMT3L (ADD)-Domäne (enthält ein PHD-Motif) gebunden.²⁵⁷

Die Kme-bindenden *Readerdomänen* setzen sich u.a. aus Chromo-, Tudor-, PWWP- und MBT (*malignant Brain Tumor*)-Domänen²⁵⁸ zusammen, die allesamt methylierte Lysine innerhalb der Histone binden.²⁵⁹

Tudordomänen bestehen aus ca. 50 Aminosäuren, deren Sequenz konserviert ist. Die humane Tudor-ähnliche Domäne Spindlin1 ist ein Histon-Methylierungseffektorprotein, welches di- und trimethyliertes H3K4 bindet^{260,261} und dabei entscheidend zur epigenetischen Kontrolle der Genexpression und der DNA-Reparaturmechanismen beiträgt.²⁶² Aber auch eine zusätzliche Modifizierung am asymmetrisch dimethylierten H3R8 ist in Zusammenhang mit der Funktion von Spindlin1 als Aktivator im Wnt-Signalweg beschrieben worden.^{263,264}

Tudordomänen sind aus vier Strängen β -Faltblattfässern aufgebaut. Diesen Aufbau weisen auch die PWWP-Domänen, benannt nach dem innerhalb des Proteins konservierten Pro-Trp-Trp-Pro-Motiv, und die MBT-Domänen auf. Die meisten Methyllysin-*Readerdomänen* bilden einen aromatischen Käfig aus, um das methylierte Lysin mit seinen langen hydrophoben Seitenketten zu binden.^{258,265} Dabei weisen die Bindetaschen für mono- und dimethylierte Lysine eher eine schmale Schlüsselloch-ähnliche Kavität aus, während die Bindetaschen für die größeren trimethylierten Gruppen breiter sind und eher eine leichter zugängliche Furche an der Oberfläche ausbilden.

Die Chromodomänen sind konservierte Proteine, die aus einem dreisträngigen β -Faltblatt und einer C-terminalen α -Helix aufgebaut sind.²⁶⁶ Die humane Chromodomäne 1 (CHD1) enthält zwei Chromodomänen, die als Tandem aufgebaut sind. Beide Domänen werden für die Bindung an H3K4me2/3 benötigt.²⁶⁷ Und da methyliertes H3K4 ein Kennzeichen für die aktive Transkription ist. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass durch die spezifische Bindung der *Readerdomäne* und die damit einhergehende Rekrutierung von chromatinumbauenden Enzymen, die Transkription potenziert wird.

1.6.3 Histonphosphorylierung

Bereits vor über 30 Jahren wurde die Phosphorylierung von Histonen am Histone H3 erwähnt.²⁶⁸ Seitdem sind viele weitere Phosphorylierungen am Serin-, Threonin- und Tyrosinresten an allen Kernhistonen, und auch deren Varianten, untersucht worden. Die Phosphorylierung verändert signi-

fikant die globale Ladung des Proteins. Infolgedessen werden die ionischen Eigenschaften und dadurch auch die gesamte Struktur und Funktion der lokalen Chromatinumgebung beeinflusst. Darüber hinaus präsentiert die Phosphorylierung auch eine Bindeplattform für andere zelluläre Proteine, inklusive der Proteine die eine Schlüsselrolle im Chromatinumbau spielen. Die Phosphorylierung von Histonen ist wesentlich an essentiellen zellulären Prozessen, wie Mitose, Apoptose, DNA-Reparatur, -Replikation und -Transkription beteiligt. Paradoxe Weise wird Histonphosphorylierung mit zwei genau entgegengesetzten Chromatinzuständen assoziiert. Zum einen der generellen Chromatinkondensation während der Mitose und Apoptose und zum anderen der lokalen Chromatinöffnung während der aktiven Transkription. Diese beiden offensichtlichen gegensätzlichen Effekte sind stark vom Kontext abhängig und werden zum Teil durch die Anwesenheit von benachbarten Histonmodifikationen beeinflusst. Diese Art des Zusammenspiels wird als *cross-talk* bezeichnet und wird im Abschnitt 1.6.5 genauer diskutiert.

Die am besten charakterisierten Histonphosphorylierungsstellen sind H2AS1, H2AT119, H2AS121, H2AS129, H2BS14, H3T3, H3T6, H3S10, H3T11, H3S28, H3T45, H3Y41 und H4S1.

1.6.3.1 Histon-Kinasen

Kinasen katalysieren die Addition der γ -Phosphatgruppe vom ATP auf die freie Hydroxylgruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin. Funktionell beeinflusst die Histonphosphorylierung damit diverse Prozesse von der transkriptionellen Regulation bis hin zur DNA-Schadensreparatur und Kontrolle des Zellzyklus.²⁶⁵ So ist beispielsweise die Kinase Aurora B in der Mitose für die Initiation der Chromatinkondensation unentbehrlich. Die Kinasen der Aurora-Familie phosphorylieren H3S10 und H3S28 in allen eukaryotischen Organismen, sowohl in der Mitose als auch in der Meiose.^{269–274} Obwohl diese beiden Phosphorylierungsstellen in ihrer relativen Häufigkeit und ihrer funktionellen Regulation in den verschiedenen Organismen variieren, stimmen sie doch weitgehend überein. Sie scheinen jedoch nicht gleichzeitig auf derselben *N*-terminalen Region des Histons H3 vorzukommen.^{275–277}

Die Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase 1 (MSK1) ist ein 802 Aminosäuren langes Protein, welches aus zwei Kinasedomänen aufgebaut ist, die auch beide für die Phosphorylierungskatalyse benötigt werden. Die Kinase wird aktiviert durch Wachstumsfaktoren und Stress-vermittelte Aktivierung im p38-MAPK-Signalweg.²⁷⁸ MSK1 phosphoryliert Transkriptionsfaktoren und Chromatinproteine (ATF1, CREB, STK11, NF- κ B, Nur77 und Histon 3 am Serin 10 und 28), wobei die Substrate ein Konsensusmotiv von Arg-Arg/Lys-x-Ser oder Arg-Lys-Ser aufweisen.²⁷⁹ Die beiden Modifikationen H3S10ph und H3S28ph sind in der Regulation der Transkription der Gene *Jun* und *Fos* beteiligt, die in verschiedenen Krebserkrankungen hochreguliert sind. Eine deregulierte Aktivität der MSK1 Kinase macht diese damit zu einem Ziel für die Medikamentenentwicklung.²⁸⁰

Die PKC-verwandte Kinase 1 (Prk1) identifiziert aktive Androgenrezeptor-abhängige Zielgene (AREs)^{281,282} und ist für die Phosphorylierung von H3T11 nach der Androgenstimulation (besonders in Prostatakrebszellen) verantwortlich.^{6,282}

Wee1 ist eine nukleäre Tyrosinkinase, die die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 durch Tyrosinphosphorylierung negativ reguliert, um den Eintritt in die Mitose vor der Fertigstellung der DNA-Synthese zu verhindern.¹⁵⁵ Obwohl Wee1 vorher als Zellzyklusregulator beschrieben wurde, konnte die Gruppe um Mahajan 2012 zeigen, dass Wee1 auch als epigenetischer Modulator agiert. Durch die Phosphorylierung des Tyrosins 37 von Histon H2B wird die Expression der replikationsabhängigen Histogene unterdrückt.¹⁵⁵ Damit ist Wee1 die erste Kinase, die beschrieben wurde, Tyrosine innerhalb des Histons H2B zu phosphorylieren.

Die humane Myt1 Kinase (PKMYT1, Myt1) gehört wie Wee1 ebenfalls zur Familie der Wee-Kinasen, ist jedoch im Gegensatz zu Wee1 wesentlich restriktiver hinsichtlich der Substratazeptanz.²⁸³ Myt1 ist eine Membran-assoziierte Kinase. Darüber hinaus ist Myt1 dual-spezifisch, d.h. sie phosphoryliert Tyrosin- und Threoninreste gleichermaßen. Sowohl Tyr15 als auch Thr14 der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk1 werden von Myt1 phosphoryliert, wodurch der G2/M-Übergang reguliert wird.^{283–285}

1.6.3.2 Histon-Phosphatasen

Durch die in Konkurrenz miteinander stehenden Aktivitäten von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen wird der Phosphorylierungsgrad in der Zelle kontrolliert. Phosphatasen katalysieren die Entfernung der Phosphatgruppe vom Substrat, indem der Phosphorsäuremonoester in ein Phosphat und einen Alkohol hydrolysiert wird. Phosphatasen besitzen, wie auch die Kinasen, eine Spezifität entweder für Serin-/Threoninreste, Tyrosinreste oder sie zeigen sogar eine duale Spezifität. Sie werden noch weiter unterteilt, basierend auf dem für die Katalyse benötigten Metallionen.²⁸⁶ Die Regulation von Phosphorylierungen ist verbunden mit einigen wichtigen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differentiation, Metabolismus- und Zellsignalen und -kommunikation²⁸⁷, aber auch für DNA-Reparatur, Mitose- und Apoptoseprozesse.^{288–290} Als ein Beispiel einer Histonphosphatase sei die Protein Phosphatase 1 (PP1) genannt, welche als Antagonist zu den Aurora Kinasen agiert.^{271,291} Außerdem konnte gezeigt werden, dass PP1 einen Komplex mit Aurora B bildet²⁹² und die sequenzielle Dephosphorylierung von H3S28ph, gefolgt von H3S10ph, nach der Mitose koordiniert.²⁹³ In dieser Arbeit wurde die Phosphatase XopH ausgewählt, da für diese bisher keine Peptidphosphorylaseaktivität nachweisbar war. XopH ist ein Typ III Effektorprotein des gram-negativen pflanzenpathogenen Bakteriums *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), das in Tomaten und Paprika die bakterielle Fleckenkrankheit verursacht. XopH ist eine im Zytoplasma wirkende Tyrosinphosphatase, deren Aktivität die zum Zelltod führende Reaktionen unterdrücken kann.^{294–297}

1.6.3.3 Readerdomänen von Histonphosphorylierungen

Zusätzlich zu den elektrostatischen Änderungen durch die Addition einer Phosphatgruppe, können auch spezifische Chromatin-assoziierte Proteine phosphorylierte Aminosäuren binden.^{277,298} Die Proteine der 14-3-3 Familie sind konservierte Phosphoserin-bindende Moleküle, die in Säugern sieben Isoformen vorkommen. Dabei bindet 14-3-3 ζ H3S10ph und H3S28ph und korreliert die Induktion der Transkription an bestimmten Genen.²⁹⁹

Weitere Readerdomänen, sind SH2-, BRCT-, WW-, FHA-, WD40- und LRR-Domänen, die spezifisch phosphorylierte Serine binden.

1.6.4 Andere Histonmodifikationen

Es gibt eine Vielzahl an Modifikationen, die für Histone beschrieben worden sind. Allerdings können nicht nur kleine chemische Gruppen auf einen Lysinrest übertragen werden, sondern auch relativ große Polypeptide, wie z.B. ein Ubiquitinprotein, bestehend aus 76 Aminosäuren (Histonubiquitylierung) oder sogenannte kleine Ubiquitin-ähnliche Modifizierer-Proteine (*Small Ubiquitin-like MODifier*, Histonsumoylierung). Auch Lysyloxidasen³⁰⁰, Glykosyltransferasen^{301–303} und noch nicht identifizierte Lysin-2-Hydroxyisobutyrylierende Enzyme³⁰⁴ modifizieren Histone.

1.6.4.1 Histon-ADP-Ribosylierung

ADP-Ribosylierung ist eine über viele Spezies konservierte Modifikation, die in vier Gruppen vorkommen kann: Mono-ADP-Ribosylierung, Poly-ADP-Ribosylierung, ADP-Ribose-Zyklisierung und die Bildung von *O*-acetyl-ADP-Ribose. Allerdings wurden an Histonen nur die Mono-ADP-Ribosylierung von Glutamat- und Argininresten (an allen 5 Histonproteinen)³⁰⁵ und die Poly-ADP-Ribosylierung an Lysinen beschrieben.^{305,306} Die durch die Enzyme der PARP-Familie übermittelte Poly-ADP-Ribosylierung der Histone führt zu einer offeneren Chromatinkonformation, da die hohe negative Ladung der Modifikation eine enge Interaktion der Histone mit der anionischen DNA verhindert.^{305,306} Im Menschen werden die 17 Mitglieder der PARP-Familie auch als Diphtherietoxin-ähnliche ADP-Ribosyltransferasen (ARTDs) bezeichnet^{307,308}, die alle eine katalytische PARP-Domäne aufweisen.³⁰⁹ Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP1 bzw. ARTD1) ist der Prototyp dieser Familie und ist für die meisten Poly-ADP-Ribosylierungen von Proteinen *in vivo* verantwortlich.³¹⁰ Dabei ist die Poly-ADP-Ribosylierung von Histonen und anderen zellkerngängigen Proteinen durch PARP1 eine der wichtigsten Regulationsschritte in der Kontrolle der Chromatinstruktur und der Antwort auf DNA-Schäden.³¹⁰ Auch im Zusammenhang mit der epigenetischen Regulation in der Dynamik des Chromatins wird Poly-ADP-Ribosylierung von einigen Gruppen als entscheidender Faktor beschrieben.^{216,311–316} Ein Beispiel für eine Mono-ADP-Ribosyltransferase ist PARP10 (ARTD10), die beim Zellkern-

Zytoplasma-Transport eine Rolle spielt, zusätzlich aber auch am Chromatinumbau und bei der Gentranskription beteiligt ist.^{308,317–319}

Da auch die Poly-ADP-Ribosylierung eine dynamische Modifikation ist, kann diese durch die Enzyme der PARG (Poly-ADP-Ribose-Glykohydrolasen)-Familie umgekehrt werden.

Bislang ist immer noch wenig bekannt über die molekularen Auswirkungen der ADP-Ribosylierung auf Histone oder über die entsprechenden *Readerdomänen*, obwohl spezifische Makrodomänen in einigen Proteinen gefunden wurden, die freie ADP-Ribose erkennen und als ADP-Ribose-bindende Moleküle fungieren^{320,321} und diese auch hydrolysieren.^{322,323}

1.6.4.2 Histonacylierungen

Neben den gut untersuchten Phosphorylierungen, den Methylierungen von Arginin- und Lysinresten und der Acetylierung von Lysin, sind in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer Lysinacylierungen an Histonen identifiziert worden (Abbildung 1.8). Hier sind insbesondere die Propionylierung, die Butyrylierung, die Malonylierung, die Succinylierung, die Glutarylierung, die Crotonylierung, die Formylierung und die Hydroxybutyrylierung von Lysinresten^{32,207,211,304,324–329}, zu nennen.

Alle Histon-Acetyltransferasen nutzen Acetyl-CoA als energiereiches Substrat für die Acetylierungsreaktion. Im Organismus kommen allerdings auch andere kurzkettigige CoenzymA-Substrate vor, wie z.B. propionyl-, butyryl- oder malonyl-CoA, die entsprechend oft als acyl-CoA zusammengefasst werden. Die Menge an acyl-CoA verändert sich in Abhängigkeit von der Ernährung oder anderen physiologischen Bedingungen.³³⁰ Die Acetyltransferasen CBP und p300 nutzen die Acyl-CoAs um Histonlysine *in vitro* zu propionylisieren oder butyrylieren.³²⁴

Acylierungen sind ebenfalls eine umkehrbare Modifikation. So konnte für die humane Deacetylase Sirtuin2 sowohl *in vitro*²¹³ als auch *in vivo*³³¹ nachgewiesen werden, dass diese Propionyl- und Butyrylreste von Lysinen entfernt, wenn auch mit unterschiedlicher katalytischer Effizienz.^{213,214,332,333}

Kürzlich wurden von Flynn *et al.* Bromodomänen als *Readerdomänen* für Butyryl- und Crotonyllysine identifiziert.³³³

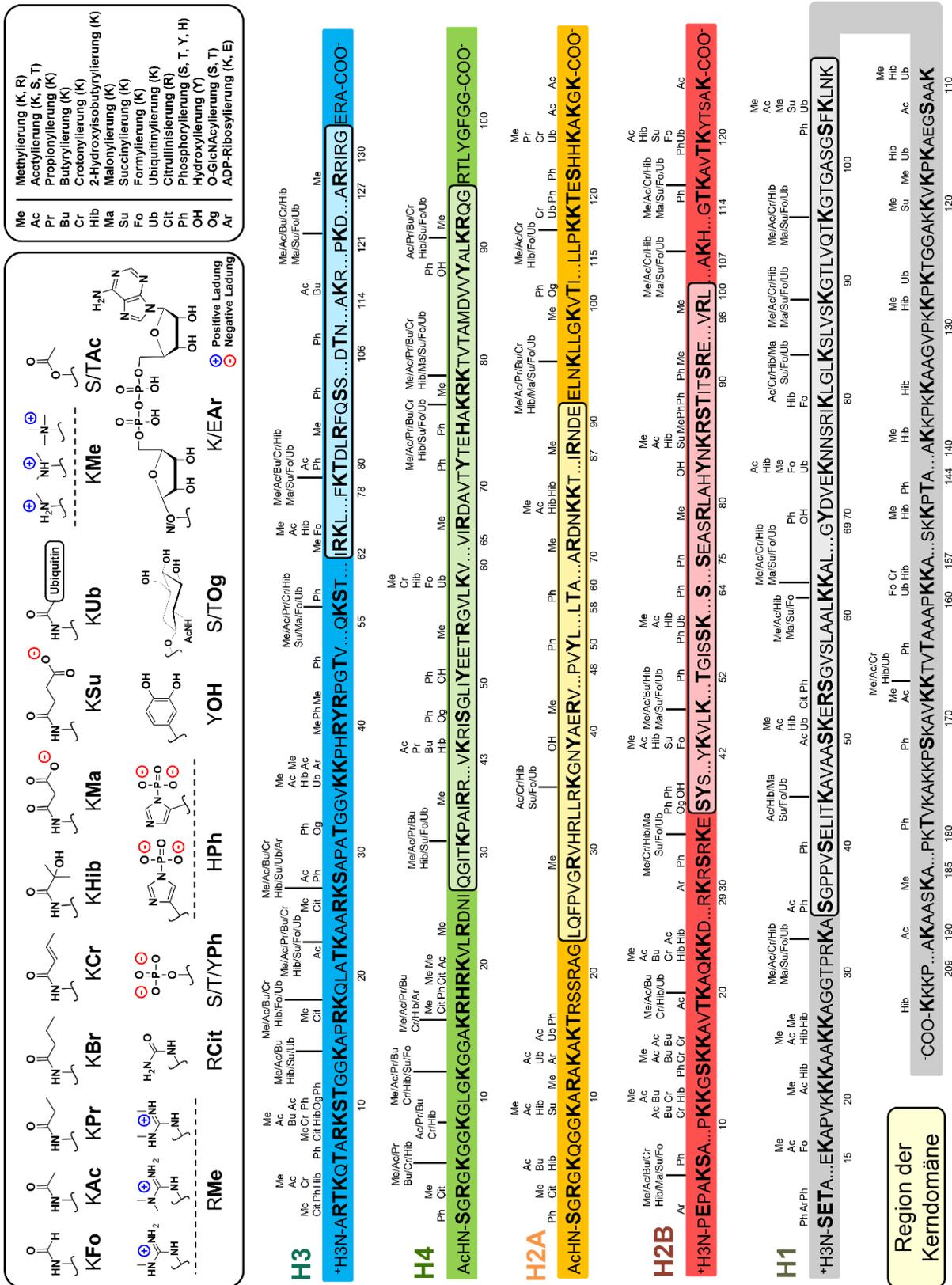


Abbildung 1.8: Übersicht der Histonmodifizierungen, die bislang im Menschen, Maus und Ratte identifiziert wurden. Abbildung wurde modifiziert nach ³³⁴und ergänzt^{155,248,335,336}.

1.6.5 *Cross-talk*

Oft beeinflussen sich benachbarte PTMs gegenseitig, und damit auch die Substraterkennung der *writer* und *eraser*, was als *cross-talk* zwischen den Histonmodifikationen bezeichnet wird.^{281,337–339}

In dieser Arbeit wird unter *cross-talk* nicht verstanden, wenn eine Modifikation von einer oder mehreren anderen Modifikationen abhängig ist³⁴⁰; die Bindung eines Proteins an einer bestimmten Modifikation durch eine benachbarte Modifikation gestört wird^{181,341}; verschiedene Stoffwechselwege auf dieselbe Modifikationsstelle abzielen und unterschiedliche Modifikationen übertragen, so dass die einzelnen Modifikationen miteinander konkurrieren (z.B. Kac, Kme, Kub desselben Lysinrestes)⁴; sich die Aktivität eines Enzyms durch die Modifizierung seines Substrates ändert³⁴²; die benachbarten Modifizierungen miteinander kooperieren, um effizienter spezifische Faktoren zu rekrutieren³⁴³ oder wenn sich Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen gegenseitig beeinflussen.³⁴⁴

Es werden immer mehr histonmodifizierende Proteinkomplexe charakterisiert, die mehr als eine individuelle enzymatische Aktivität oder *Readerdomäne* enthalten. Das Erkennen von Histonmodifikationen ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben der Zielmodifikationsstelle liefern auch die flankierenden Sequenzen einen Beitrag zur Erkennung der PTM, so dass die Modifikation von benachbarten Aminosäuren sehr leicht die Bindung der *Readerdomänen* und der modifizierenden Enzyme beeinflussen kann. Dabei kann die Bindung der PTM auch durch Histonmodifikationen an entfernten Aminosäuren reguliert werden.²³⁹

Ein Beispiel für die Regulation der Histonmodifikationen ist der *cross-talk* zwischen H3S10ph und di- oder trimethyliertes H3K9 (H3K9me2/3), der in der Literatur als „*phospho-methyl switch*“ bezeichnet wird.^{341,345,346} In nicht-pflanzlichen Organismen bindet das Heterochromatinbindeprotein 1 (HP1) an H3K9me2 oder H3K9me3, was zur Bildung des Heterochromatins führt.¹⁵⁸ In der Mitose wird H3S10 u.a. durch Aurora B phosphoryliert (Abbildung 1.9). Die multiple Modifikation H3K9me3S10ph führt nun zur Dissoziation von HP1 vom Chromatin während oder nach der Mitose.³⁴⁷ Damit führt die H3S10-Phosphorylierung zur Chromosomenkondensation.^{6,348–350} Nach der Dephosphorylierung von H3S10ph am Ende der Mitose kann HP1 wieder an H3K9me2/3 binden.³⁴¹

Darüber hinaus haben NMR-Studien gezeigt, dass die H3S10-Phosphorylierung auch Einfluss auf die benachbarten Phosphorylierungen hat. So blockiert H3S10ph den Zugang für die Kinasen *Checkpoint kinase 1* (Chk1) bzw. Protein Kinase C (PKC), die entsprechend H3T11 bzw. H3T6 phosphorylieren.²⁸¹ Zwischen diesen Phosphorylierungen scheint es auch eine Hierarchie zu geben: H3S10ph ist wichtiger als H3T11ph. Wenn H3S10 phosphoryliert ist, kann H3T11 nicht phosphoryliert werden. Ist aber H3T11 oder H3T6 phosphoryliert, kann H3S10 dennoch phosphoryliert werden.²⁸¹ Trotz dieser Hierarchie des *cross-talks* ist auch H3T11 während der Mitose stärker phosphoryliert.³⁴⁷

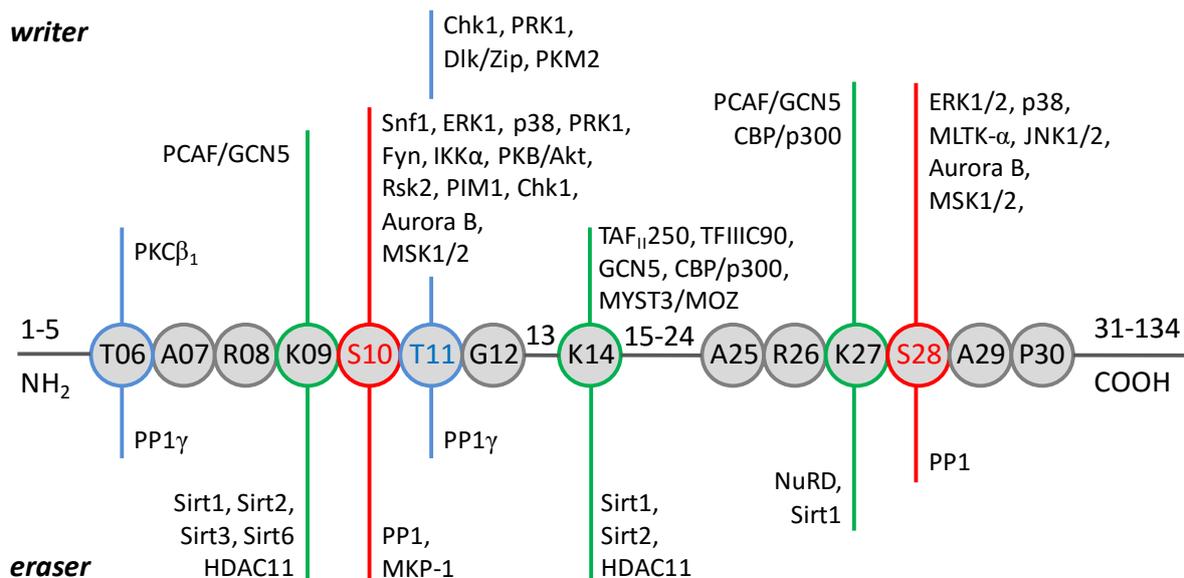


Abbildung 1.9: Übersicht über die N-terminale Region von Histon H3 mit den bislang publizierten *writer* und *eraser* von Acetylierung und Phosphorylierung.^{6,216,281,347,351–360} Gezeigt sind ausgewählte, modifizierbare Aminosäuren der N-terminalen Region des Histons H3, die sich in vielfältiger Weise gegenseitig beeinflussen und durch ihren *cross-talk* die epigenetische Modulation der Zelle regulieren (siehe Text für Details). Aus Gründen der Übersicht wurde auf die Darstellung anderer Modifikationen und deren Enzyme verzichtet. Für eine Übersicht über die *Reader*domänen der N-terminalen Region des Histons H3 sei auf^{239,337} verwiesen.

Die Phosphorylierung von H3S10 kann mit der Acetylierung der umgebenden Lysine H3K9 und H3K14 gekoppelt werden, wobei die Kombination dieser Modifikationen zusammen für die Aktivierung der Transkription verantwortlich sind.^{361–363} Zusätzlich zu H3S10ph werden auch die Phosphorylierungen an H3T11 und H3S28 mit der Acetylierung von H3 (an Lys9 und Lys14) durch GCN5 (Abbildung 1.9) assoziiert und regulieren damit die transkriptionelle Aktivierung.⁶ Allerdings kann auch die Acetylierung die Phosphorylierung beeinflussen. So wird beispielsweise die H3S10-Phosphorylierung durch die Acetylierung von H3K9 gesteigert, aber durch die H3K14-Acetylierung und H3T11-Phosphorylierung verringert.³⁵⁰ Dabei wurde auch gezeigt, dass die Acetylierung die Phosphorylierung während der Mitose reguliert. So zeigt die Acetylierung von H3K9 durch PCAF/GCN5 während der Mitose eine verringerte Häufigkeit und verhindert damit eine H3S10-Phosphorylierung durch AuroraB bis zur Mitose.^{347,364,365} Eine erhöhte H3-Phosphoacetylierung (also multiple Aminosäuren sind acetyliert und phosphoryliert, in diesem Fall H3S10ph und H3K14ac), wird auch durch eine Aktivierung der Kinasen ERK und p38 MAPK verursacht.³⁶⁶

Eine Deacetylierung von H3K14ac ist notwendig für eine nachgeschaltete Methylierung am H3K9 durch die Methyltransferase Clr4.¹² Die synergistische Kopplung von Phosphorylierung und Acetylierung wird zusätzlich belegt, da eine Phosphorylierung des H3S10 die Methylierung am H3K9 inhibiert.²⁵⁴

Dass die sich gegenseitig beeinflussenden Modifikationen nicht zwangsläufig direkt nebeneinander liegen müssen, zeigt beispielsweise die Bindung der Phosphoserin-bindenden *Reader*domäne 14-3-3

an H3S10ph. Die Bindung wird stabilisiert, wenn H3K9 oder H3K14 zusätzlich acetyliert ist.^{154,367–369}Die Isoform 14-3-3 ζ bindet sowohl H3S10ph als auch H3S28ph.²⁶⁵

Die H3S28-Phosphorylierung wird, wie auch die H3S10-Phosphorylierung, für die Chromosomenkondensation während der Mitose benötigt.^{347–350} Dennoch ist die H3S28-Modifikationsstelle bislang weniger untersucht worden.³⁶⁹ Auch sind die funktionellen Unterschiede zwischen der S10- und der S28-Phosphorylierung des Histons H3 noch nicht vollständig geklärt. Allerdings scheint H3S28ph gegenüber H3S10ph entscheidender für die transkriptionelle Aktivierung zu sein.³⁶⁹ Da beide Phosphorylierungsstellen dieselbe Konsensussequenz ARKS haben, werden sie teilweise durch dieselben Kinasen phosphoryliert und durch die Protein Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert (Abbildung 1.9). Mehrere Studien zeigen jedoch, dass die beiden Phosphorylierungen nicht an denselben Histon H3-Molekülen stattfinden, sondern an verschiedenen Nucleosomen lokalisiert sind.^{275–277}

Diese Studien verdeutlichen nicht nur eine Hierarchie des *cross-talks* von Phosphorylierungen, Methylierungen und Acetylierungen innerhalb der N-terminalen Region des Histons H3, sondern auch die biologische Relevanz der spezifischen Kombination von Histonmodifikationen.^{367,368} Die beiden Phosphorylierungen am H3S10 oder H3S28 sind damit sowohl an der Chromatinkondensation während der Mitose als auch an der Chromatinlockerung bei der transkriptionellen Aktivierung beteiligt.⁶

2 Zielstellung

Posttranslationale Modifikationen stellen essentielle Mechanismen in der Zelle dar, um deren epigenetische Prozesse zu regulieren. Eine systematische Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen und der Modulation enzymatischer Aktivitäten ist schwierig. Allerdings würde die Kenntnis über den Ablauf der intrazellulären Wechselwirkungen und über die Zusammenhänge, wie sich die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen gegenseitig beeinflussen, die gezielte Entwicklung therapeutischer und diagnostischer Anwendungen fördern.

Die Etablierung einer effizienten Methode zur Charakterisierung von epigenetischer Modulation ist notwendig. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit verschiedene Peptidmikroarrays als effizientes Hilfsmittel für die parallele Untersuchung einer großen Anzahl von putativen Substraten bzw. Bindern für Enzyme bzw. Proteine genutzt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist das umfangreiche Anwendungsgebiet der Peptidmikroarrays zu demonstrieren. Es sollte untersucht werden, ob es möglich ist, sowohl Bindungsspezifitäten von *Reader*domänen als auch die Substratspezifitäten von *writer* und *eraser* durch die Nutzung derselben Assay-Technologie zu bestimmen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der *cross-talk* zwischen verschiedenen PTMs für enzymatische Aktivitäten mittels dieser Assay-Technologie ermittelt werden kann.

Für die Charakterisierung der Bindungsspezifitäten sollten verschiedene kommerzielle sequenzspezifische Antikörper untersucht und verglichen werden. Ziel war es hier die Anwendbarkeit der Peptidmikroarrays zur Beurteilung der Qualität dieser Antikörper zu überprüfen. Des Weiteren sollten für verschiedene PTM-erkennende *Reader*domänen die Bindungsspezifität und der Einfluss von benachbarten PTMs auf die Erkennung der Binder identifiziert werden.

Für die Identifizierung der Substratspezifität von enzymatischen Aktivitäten sollten verschiedene modifikationsübertragende und -entfernende Proteine untersucht werden. Der Fokus sollte dabei insbesondere auf Acetylierungen und Phosphorylierungen gesetzt werden. Die jeweiligen enzymatischen Aktivitäten sollten hinsichtlich ihrer Sequenzspezifität, Acylspezifität und des *cross-talks* verglichen werden. Anhand ausgewählter Beispiele sollten die auf den Peptidmikroarrays gefundenen Resultate auch in homogenen Assays validiert und kinetisch charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Alle Fmoc-geschützten Aminosäure-Derivate und für die Festphasenpeptidsynthese verwendeten Kupplungsreagenzien, Waschreagenzien oder Lösungsmittel, sowie sonstige Chemikalien u.a. zum Herstellen von Puffern wurden entweder von Iris Biotech (Marktrechwitz), Novabiochem (Darmstadt), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Merck (Darmstadt), Advanced ChemTech (Louisville, USA), AnaSpec (Fremont, USA) oder Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

3.2 Enzyme, Proteine, Peptide

Readerdomänen: Bromodomänen BRD4(1) (44-168) und BRD4(2) (333-460) von Active Motif (Carlsbad, USA); Tudor-ähnliche Domäne Spindlin1 und GST-Spindlin1, Chromodomäne CHD1 von AG Prof. Roland Schüle, Albert-Ludwig-Universität Freiburg

Acetyltransferasen: p300, GCN5, PCAF, Tip60 von AG Prof. Michael O. Hottiger, Universität Zürich

ADP-Ribosyltransferasen: hARTD1 und hARTD10 von AG Prof. Michael O. Hottiger, Universität Zürich

Kinasen: Myt1 von AG Prof. Wolfgang Sippl, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Wee1 von Invitrogen (Carlsbad, USA); RPS6KA5 (MSK1) von Life technologies (Carlsbad, USA); Protein-kinase C-related kinase 1 (Prk1) von ProQinase (Freiburg)

Sirtuine: Sirtuin 1 von AG Prof. Manfred Jung, Albert-Ludwig-Universität Freiburg; Sirtuin2, Sirtuin6 und Sirtuin7 von AG Prof. Clemens Steegborn, Universität Bayreuth; Sirtuin5 von AG Prof. Mike Schutkowski, MLU Halle-Wittenberg

Phosphatase: XopH und XopH-C267A-Mutante von AG Prof. Ulla Bonas, MLU Halle-Wittenberg

Peptide: Tabelle 3.1 zeigt die synthetisierten Peptide

Tabelle 3.1: Übersicht der synthetisierten Peptide. Alle Peptide wurden entweder eigenständig, von Dr. Marat Meleshin (markiert mit °) oder von JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, markiert mit *) synthetisiert.

Peptidname	Peptidsequenz	
Sirtuin-Kinetik-Peptide	H3K9ac	Ac-QTARK(ac)STGGWW-NH ₂
	H3K9acS10ph	Ac-QTARK(ac)S(ph)TGGWW-NH ₂
	H3K9acT11ph	Ac-QTARK(ac)ST(ph)GGWW-NH ₂
	H3K27ac°	Ac-KAARK(ac)SAPSWW-NH ₂
	H3K27acS28ph°	Ac-KAARK(ac)S(ph)APSWW-NH ₂
MALDI-Test-Peptide*	H3_K9ac*	H-ARTKQTARK(ac)STGGKAPR-NH ₂
	H3_K9ac_S10ph*	H-ARTKQTARK(ac)S(ph)TGGKAPR-NH ₂
	H3_K27ac_SAPS*	Ac-KAARK(ac)SAPSTGGVKKPHRYRK(Biotinoyl)-NH ₂
	H3_K27ac_S28ph_SAPS*	Ac-KAARK(ac)S(ph)-APSTGGVKKPHRYRK(Biotinoyl)-NH ₂
	H3_K27ac_STPS*	Ac-KAARK(ac)STPSTCGVKPHRYRPK(Biotinoyl)-NH ₂
H3_K27ac_S28ph_STPS*	Ac-KAARK(ac)S(ph)-TPSTCGVKPHRYRPK(Biotinoyl)-NH ₂	
XopH-Peptide	Positivkontrolle*	Ac-DADEY(ph)LIPQQGW-NH ₂
	Substrat*	Ac-KVDVDEY(ph)DENKFW-NH ₂
	Nicht-Substrat*	Ac-GRKKIKY(ph)KSLTRNW-NH ₂

3.3 Radiochemikalien

γ -³³P-(ATP) (111TBq/mmol, 370 MBq/ml) von Hartmann Analytik (Braunschweig)

3.4 Puffer

TBS:	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
TBST:	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween20
Sirt-Puffer Mikroarray:	20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
Sirt-Puffer Lösung:	100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
KAT-Puffer ³⁷⁰ :	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT
ARTD-Puffer:	50 mM Tris (pH 8,0), 4 mM MgCl ₂ , 50 μ M etheno-NAD ⁺ , 20 mM NaCl, 250 μ M DTT
Myt1/Wee1-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0,04% Triton X-100, komplett EDTA-frei
Prk1-Puffer:	60mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 3 mM MgCl ₂ , 3mM MnCl ₂ , 1,2 mM DTT
MSK1-Puffer:	25 mM Tris (pH 7,5), 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM EGTA, 5 mM β -Glycerophosphat, 2,5 mM DTT, 0,01% TritonX-100
XopH-Puffer:	50 mM HEPES (pH 7,0), 100 mM NaCl, 5% Glycerol, 0,1 % β -Mercaptoethanol, 1 mM MgCl ₂
PBS:	Applichem PBS-Puffertabletten (pH 7,4) (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Phosphat)

3.5 Antikörper

Primäre Antikörper: Ethenoadenosin (1G4), sc-52666 Maus monoklonal IgG2a und Ethenoadenosin (6A544), sc-71077 Maus monoklonal IgG2a von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg); anti-GST-Antikörper (Ziege) von GE Healthcare (Freiburg); anti-GST-SPIN1-Antikörper (183-229; animal 5865) (Kaninchen) von AG Prof. Roland Schüle (Universität Freiburg)

Primäre modifikationsspezifische Antikörper: anti-acetyllysin-Antikörper [7F8] Maus (monoklonal) von abcam (Cambridge, UK) (= anti-Kac-Antikörper 1); anti-acetyllysin-Antikörper(Ac-K-103) Maus (monoklonal)(= anti-Kac-Antikörper 2), anti-acetyllysin-Antikörper (Ac-K2-100) Kaninchen (monoklonal) (=anti-Kac-Antikörper 3) und anti-Phosphotyrosine-Antikörper (pY-Ak) P100 (Maus) von Cell Signaling Technologies (CST, Leiden, Niederlande); anti-succinyllysin-Antikörper Kaninchen von PTM-Biolabs (Chicago, USA) (=anti-Ksuc-Antikörper)

Primäre sequenzspezifische Antikörper: anti-H2A/H4S1phospho-Antikörper und anti-H3S28phospho-Antikörper Kaninchen (polyklonal) von Upstate (Darmstadt); anti-H3K27me2/3-Antikörper Maus (monoklonal), anti-H3K27me3-Antikörper Maus (monoklonal), anti-H3K36me1-Antikörper Kaninchen (polyklonal), anti-H3K36me2-Antikörper Kaninchen (polyklonal), anti-H3K36me3-Antikörper Kaninchen (polyklonal), anti-H3K4me1-Antikörper Kaninchen (polyklonal) und anti-H3K4me2-Antikörper Kaninchen (polyklonal) von Active Motif (Carlsbad, USA); anti-H3K9me1-Antikörper Maus (monoklonal) und anti-H3K9me2-Antikörper Maus (monoklonal) von abcam (Cam-

bridge, UK); anti-H3K9me3-Antikörper Maus (monoklonal) von Diagenode (Seraing, Belgien); anti-H4K16ac-Antikörper Kaninchen (polyklonal) von Millipore (Darmstadt) und anti-H4K16ac-Antikörper Kaninchen (polyklonal) von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

Sekundäre Antikörper: anti-Kaninchen IgG (H+L), Dylight 649 von Pierce (Rockford, USA); anti-Maus IgG (H+L), Dylight 649 von Thermo Scientific (Braunschweig); anti-Ziege IgG (H+L), Dylight 649 und anti-Flag-Antikörper (Kaninchen), Dylight 649 von Rockland (Limerick, USA) und anti-Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor 532 von Invitrogen (Carlsbad, USA)

3.6 Bestimmung der Peptidkonzentration

Die Peptidkonzentration wurde unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$, mit A = Absorption, ϵ = Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$], c = Peptidkonzentration [M], d = Schichtdicke der Küvette [cm]) bestimmt. Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte nach Gill und von Hippel.³⁷¹

3.7 Festphasenpeptidsynthese

Die Peptide wurden nach der Fmoc-Methode am Fmoc-Rink MBHA Harz synthetisiert.³⁷² Nach der Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen wurde das Peptid mit 98% Trifluoressigsäure (TFA) vom Harz entfernt. Die TFA wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Diethylether gefällt, anschließend filtriert und mit kaltem Diethylether gewaschen. Die Peptide wurden entweder lyophilisiert oder direkt mittels präoperativer *reserved-phase* Hochdruckflüssigchromatographie (RP-HPLC) gereinigt. Hierfür wurde eine Merck/Hitachi-HPLC unter Benutzung einer RP-18-Säule (Merck HiBar/LiChrospher 100, 250 x 25 mm RP-18 (5 μm)) genutzt. Über einen 80-minütigen linearen Gradienten von 20% Acetonitril (ACN) bis 60% ACN (v/v) und Wasser, beide mit 0,1% TFA versetzt, wurde das Peptid von den Nebenprodukten getrennt. Die Reinheit der Fraktion wurde mittels analytischer HPLC (Agilent 1100, Säule: Kinetex 2,6 μm XB-C18 100 A, 50 x 3,0 mm) und Massenspektrometrie (Frau Dr. A. Schierhorn) analysiert. Die Chromatogramme und Massenspektren der synthetisierten Peptide sind dem analogen Anhang A1 zu entnehmen.

3.8 Peptidmikroarrayinkubationen

3.8.1 Verwendete Peptidmikroarrays

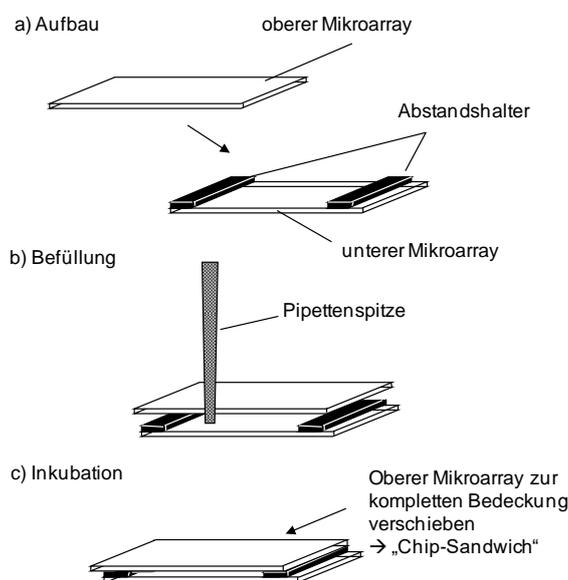
Alle der in dieser Arbeit verwendeten Peptidmikroarrays (Tabelle 3.2) präsentieren jedes immobilisierte Peptid dreifach. Eine Auflistung der immobilisierten Peptide ist für jeden verwendeten Mikroarray dem elektronischen Anhang E1 zu entnehmen.

Tabelle 3.2:Übersicht der verwendeten Peptidmikroarrays

Name	Proteine	Peptidgesamtanzahl
Acetylom- (nicht-acetyliert) Mikroarray	13mere Peptide mit zentralem Lysin, die beschriebene humane Acetylierungsstellen präsentieren; 384 Peptide als Kontrolle mit zentralem acetylierten Lysinrest	5983 x 3 = 17949
Acetylom- (acetyliert, Kac) Mikroarray	13mere Peptide mit zentralem acetylierten Lysin, die humane Acetylierungsstellen präsentieren; 384 Peptide als Kontrolle mit zentralem unacetylierten Lysinrest	5983 x 3 = 17949
Histonmikroarray	20mere Peptide aus den humanen Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 und ihren Varianten mit bis zu 6 posttranslational modifizierten Aminosäureresten pro Peptid	3874 x 3 = 11622
PhosphoTyrosin- Mikroarray	13mere Phosphopeptide mit zentralem, phosphorylierten Tyrosin ³⁷³⁻³⁷⁵	6204 x 3 = 18612
Annotated Phospho- Sites-Mikroarray	13mere Peptide; humane Phosphorylierungsstellen	1143 x 3 = 3429

3.8.2 Untersuchung der Bindung rekombinanter Proteine an auf Mikroarrays immobilisierten Peptiden

Die Inkubation der Peptidmikroarrays erfolgte entweder manuell oder halbautomatisch unter Nutzung der Hybstation HS400 von Tecan.^{104,118} Die Waschschritte wurden jeweils für 5 Minuten durchgeführt, wenn nicht abweichend angegeben. Die Temperatur war Raumtemperatur bei der manuellen Inkubation bzw. 25°C bei der halbautomatischen Inkubation (Abweichungen sind an entsprechender Stelle vermerkt). Bei der manuellen Inkubation wurden zwei Peptidmikroarrays mit den Peptidpräsentierenden Seiten der Mikroarrayoberfläche gegeneinander gedeckelt^{108,376} (Abbildung 3.1).

**Abbildung 3.1:** Prinzip der manuellen Inkubation von Peptidmikroarrays mittels „Chip-Sandwich“.

Zwischen den beiden Peptidmikroarrays befanden sich zwei Abstandshalter, die eine definierte Reaktionskammer mit etwa 350 µl Probenvolumen bildeten. Kapillarkräfte ermöglichen das luftblasenfreie Befüllen der Reaktionskammer zwischen den beiden Peptidmikroarrayoberflächen, die dann in

einer Feuchtekammer für die entsprechende Zeit inkubiert wurden. Anschließend wurden die Peptidmikroarrays mit Tween20-haltigen Waschpuffer, Waschpuffer ohne Tween20 und destilliertem Wasser gewaschen (jeweils dreimal), bevor sie in einer Mikroarray-Zentrifuge getrocknet wurden.

Bei der halbautomatischen Inkubation folgte einer Vorwäsche mit 2x (Tween20-haltigem) Waschpuffer 1, 1x Waschpuffer 2, bevor das Zielprotein im Assaypuffer zugegeben wurde. Anschließend wurde 5x mit Waschpuffer 1 und 1x mit Waschpuffer 2 gewaschen. Es folgte die Inkubation des Primärantikörpers in Antikörper-Puffer und den Waschschritten mit 5x Waschpuffer 1 und 1x Waschpuffer 2. Nach der Inkubation des fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers erfolgten erneut die Waschschriffe 5x mit Waschpuffer 1 und 1x mit Waschpuffer 2. Hierauf folgte zusätzlich ein 2-maliges Waschen mit dH₂O. Anschließend wurden die Peptidmikroarrays mit Stickstoff getrocknet.

Das Fluoreszenzbild wurde mittels eines Genepix 4000B-Fluoreszenzscanners von Molecular Devices (Sunnyvale, USA), mit 100% Laserpower und einer PMT von 500, 550 und 600 generiert. Die Fluoreszenzbilder wurden im *Standard tagged image file (tif)*-Format gespeichert und mittels der GenePix Pro 7.2 Software und der *GenePix Array List (gal)*-Datei analysiert. Die Ergebnisse wurden als *GenePix results (gpr)*-Datei gespeichert.

3.8.3 Auswertung der Peptidmikroarrays

Diese Arbeit nutzte den Mittelwert der Signalintensitäten für alle Pixel, die innerhalb des Spots lagen, die bei einer Wellenlänge von 635 nm oder 532 nm ausgelesen wurden (F635mean bzw. F532mean). Der Bildauswertung folgten einige statistische Analysen mittels R³⁷⁷ (analoger Anhang A2) oder Microsoft Excel, um die Substrate oder Binder zu identifizieren und aus diesen ihre entsprechenden Substrat- bzw. Bindemotive (*Two-sample-Logo*³⁷⁸) zu erstellen. Für die Errechnung der *Two-sample-Logos* wurde der t-Test als statistischer Test ausgewählt und der Aminosäurerest wird gezeigt, wenn der p-Wert unter 0,05 liegt.³⁷⁹

3.8.4 Untersuchung der Bindung modifikations- und sequenzspezifischer Antikörper auf Peptidmikroarrays

Inkubation des Histonmikroarrays mit modifikationsspezifischen Antikörpern: Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: TBS+3%BSA, modifikationsspezifischer Antikörper Anti-Kac-Antikörper-Mischung (1:2000, 1:1:1-Mix aus anti-acetyllisine-Antikörper aus Maus und Kaninchen (abcam #61384, CST #9814S, CST #9681S) oder anti-Kac-Antikörper einzeln (1:2000, anti-acetyllisine-Antikörper aus Maus und Kaninchen (abcam #61384, CST #9814S, CST #9681S)) in TBS+3% BSA-Puffer, halbautomatische Inkubation: 1 Stunde; Inkubation mit Sekundär-Antikörper-Mischung aus Dylight 649-konjugierten Anti-Maus IgG und anti-Kaninchen-IgG (1:5000 in

TBS+3% BSA, 1:1-Mix) für 30 Minuten; Kontrollinkubation: Sekundär-Antikörper-Kontrollinkubation mit Assaypuffer ohne die Zugabe eines modifikationsspezifischen Antikörpers.

Inkubation mit anti-succinyllysine-Antikörper: Inkubation mit anti-Ksuc-Antikörper (1:400) in TBS-Puffer+0,1% Tween20+5% BSA (entsprechend Datenblatt), Chip-Sandwich, über Nacht, 4°C; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Sekundärantikörper anti-GST-Antikörper (Ziege), 1:2000-Verdünnung in TBS+3%BSA-Puffer, 30 Minuten; Inkubation mit Tertiärantikörper Dylight 649-konjugierten anti-Ziege IgG (1:10000 in TBS+3% BSA), 1 Stunde; Kontrollinkubation anti-Ksuc-Antikörper: nur Assaybuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl in Zielproteininkubationsschritt.

Inkubation des Histonmikroarrays mit sequenzspezifischen Antikörpern: Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: TBS+3%BSA, siehe Tabelle 3.3 für die Konzentration der sequenzspezifischen Antikörper, halbautomatische Inkubation: 1 Stunde; Inkubation mit Sekundär-Antikörper-Mischung aus Dylight 649-konjugierten Anti-Maus IgG und anti-Kaninchen-IgG (1:5000 in TBS+3% BSA, 1:1-Mix) für 30 Minuten; Kontrollinkubation: Sekundär-Antikörper-Kontrollinkubation mit Assaypuffer ohne die Zugabe eines sequenzspezifischen Antikörpers.

Tabelle 3.3: Sequenzspezifische Antikörper-Inkubation.

Sequenzspezifische Antikörper	Lot #	Ak-konzentration
Anti-H2A/H4S1ph-Antikörper	20341	1 µg/ml
Anti-H3K4me1-Antikörper Kaninchen (polyklonal)	21008001	2, 1, 0,2 µg/ml
Anti-H3K4me2-Antikörper Kaninchen (polyklonal)	01008001	1 µg/ml
Anti-H3K9me1-Antikörper Maus (monoklonal)	941182	2, 1, 0,2 µg/ml
Anti-H3K9me2-Antikörper Maus (monoklonal)	GR110728-1	2, 1, 0,2 µg/ml
Anti-H3K9me3-Antikörper Maus (monoklonal)	1	0,4 µg/ml
Anti-H3K27me2me3-Antikörper Maus (monoklonal)	33311011	1 µg/ml
Anti-H3K27me3-Antikörper Maus (monoklonal)	32012003	1 µg/ml
Anti-H3S28ph-Antikörper Kaninchen (polyklonal)	27707	2 µg/ml
Anti-H3K36me1-Antikörper Kaninchen (polyklonal)	23012001	1 µg/ml
Anti-H3K36me2-Antikörper Kaninchen (polyklonal)	08308001	1 µg/ml
Anti-H3K36me3-Antikörper Kaninchen (polyklonal)	12912002	1 µg/ml
Anti-H4K16ac-Antikörper Kaninchen (polyklonal) Millipore	1838712	1 µg/ml
Anti-H4K16ac-Antikörper Kaninchen (polyklonal) SantaCruz	D0510	1,3 µg/ml

3.8.5 Untersuchung der Bindung rekombinanter Readerdomänen auf Peptidmikroarrays

Inkubation des Histonmikroarray und Kac-Acetylom-Mikroarray mit Bromodomänen: Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 25mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5, 3% BSA, 20µg pro Assay BRD4(1) und BRD4(2) (beide N-terminal mit einem His-Tag und C-terminal mit einem Flag-Tag markiert), Chip-Sandwich: über Nacht, 4°C; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Sekundärantikörper anti-Flag-AntikörperDyLight 649 Kaninchen, 1:1000-Verdünnung in TBS+3%BSA-Puffer, 1 Stunde; Kontrollinkubation: nur mit anti-Flag-Antikörper.

Inkubation des Histonmikroarray mit Spindlin1 (GST-SPIN1): Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit 50µg/mL Zielprotein GST-SPIN1(49-262) in TBS+3%BSA, Chip-Sandwich: über Nacht, 10°C; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Primärantikörper anti-GST-Antikörper (Ziege), 1:2000-Verdünnung in TBS+3%BSA-Puffer für 30 Minuten; Inkubation mit Sekundärantikörper Dylight 649-konjugierten anti-Ziege IgG (1:10000 in TBS+3% BSA), 1 Stunde; Kontrollinkubation: GST-Kontrolle mit einer Konzentration von 25 µg/ml.

Inkubation des Histonmikroarray mit Spindlin1 (SPIN1): Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit 50µg/mL Zielprotein SPIN1(49-262)PP (SPIN1PP = Spindlin1, bei der der GST-*Tag* mit PreScission Protease abgeschnitten wurde) in TBS+3%BSA, Chip-Sandwich: über Nacht, 10°C; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Primärantikörper anti-GST-SPIN1-Antikörper (183-229; animal 5865) (Kaninchen), 1:2000-Verdünnung in TBS+3%BSA-Puffer, 30 Minuten; Inkubation mit Sekundärantikörper Dylight 649-konjugierten anti-Kaninchen IgG (1:5000 in TBS+3% BSA), 1 Stunde.

Inkubation des Histonmikroarray mit Chromodomäne CHD1: Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit Zielprotein: 50µg/ml GST-CHD1 in TBS+3%BSA, Chip-Sandwich: über Nacht, 6°C; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Primärantikörper: anti-GST-Antikörper (Ziege), 1:2000-Verdünnung in TBS+3%BSA-Puffer; 30 Minuten; Inkubation mit Sekundärantikörper Dylight 649-konjugierten anti-Ziege IgG (1:10000 in TBS+3% BSA), 1 Stunde; Kontrollinkubation: GST-Kontrolle mit einer Konzentration von 25µg/ml.

3.8.6 Untersuchung von Acetylierungen auf Peptidmikroarrays

Inkubation des Acetylom-Mikroarrays mit Acetyltransferasen: Waschpuffer 1 = TBST (pH 8,0); Waschpuffer 2 = TBS (pH 8,0); Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10% Glycerin, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, die Konzentration des eingesetzten Ac-CoA orientierte sich für die verschiedenen KATs an den entsprechend publizierten K_M -Werten (100µM für Tip60 (festgelegter Wert), 3µM für PCAF³⁸⁰, 120µM für p300³⁸¹, 7,5µM für GCN5³⁸²), 200 µg/mL p300/GCN5/PCAF/Tip60, Chip-Sandwich: 3 Stunden; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Primärantikörper Anti-Kac-Antikörper-Mischung (1:2000, 1:1:1-Mix): anti-acetyl-Lysine-Antikörper aus Maus und Kaninchen (abcam #61384, CST #9814S, CST #9681S) in TBS+3% BSA-Puffer, 1 Stunde; Inkubation mit Sekundärantikörper-Mix (1:5000, 1:1-Mix): DyLight649 anti-Maus IgG (H+L) und anti-Kaninchen IgG (H+L) in TBS+3% BSA-Puffer, 30 Minuten, 25°C; Kontrollinkubation: 50 mM Ac-CoA und 3%BSA in TBS (pH 8,0).

Inkubation der Acetylom-Mikroarrays (acetyliert und nicht-acetyliert) mit ADP-Ribosyltransferasen ARTD1 und ARTD10: Waschpuffer 1 = TBST (pH 8,0); Waschpuffer 2 = TBS (pH 8,0); Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 50 mM Tris (pH 8,0), 4 mM MgCl₂, 50 μM etheno-NAD⁺, 20 mM NaCl, 250 μM DTT, 1 μl DNA (EcoRT), 5 μg/ml hARTD1 und hARTD10, Chip-Sandwich, 4 Stunden, Raumtemperatur; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Ethenoadenosin (1G4), sc-52666 Maus (monoklonal) IgG2a und Ethenoadenosin (6A544), sc-71077 Maus (Monoklonal) IgG2a (1:1-Mix), 1:1000 Verdünnung in TBS (pH 8,0)+3% BSA-Puffer, 1 Stunde; Inkubation mit Sekundärantikörper Dylight 649-konjugierten anti-Maus IgG (1:5000 in TBS(pH 8,0)+3% BSA), 30 Minuten; Kontrollinkubation: etheno-NAD⁺-Kontrolle.

3.8.7 Untersuchung von Phosphorylierungen auf Peptidmikroarrays (Radioaktiv-Assay)

Die Kinase wurde 3-4 Stunden bei Raumtemperatur in Assaypuffer mit 10 μM ATP und [γ-³³P]-ATP inkubiert. Anschließend wurden die Mikroarrays 2x mit TBS-Puffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl) gewaschen. Weitere Waschschrte mit 2x Phosphorsäure (pH 2,0), 2x deionisiertem Wasser, 2x Methanol folgten mit jeweils 5 min Waschzeit, bevor die Mikroarrays an der Luft getrocknet wurden. Die eingebaute Radioaktivmarkierung wurde mittels Phosphorimager-Platten (Fuji BAS-MS) detektiert. Danach erfolgte das Auslesen der Platten mittels des Phosphorimager-Scanners (FujiFilm FLA-7000).

radioaktive Inkubation des Histonmikroarrays mit den Kinasen Myt1 und Wee1: Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,04% Triton X-100, komplett EDTA-frei, 10 μM ATP und 18,5MBq [γ-³³P]-ATP, 80nM Myt1, 4,1 μg pro Assay Wee1, Chip-Sandwich: 4 Stunden; Kontrollinkubation: analog zu Inkubation mit Zielprotein, jedoch in Abwesenheit der Kinase.

radioaktive Inkubation des Histonmikroarrays mit der Kinase MSK1: Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 25 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 5 mM beta-Glycerophosphat, 2,5 mM DTT, 0,01% TritonX-100, 10 μM ATP und 7,4MBq [γ-³³P]-ATP, 10 μg/Assay MSK1, Chip-Sandwich: 4 Stunden.

radioaktive Inkubation des Annotated PhosphoSites-Mikroarray und des Histonmikroarrays mit der Kinase Prk1: Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3mM MgCl₂, 3mM MnCl₂, 1,2 mM DTT, 10 μM ATP und 7,4MBq [γ-³³P]-ATP, 4,1 μg/Assay Prk1, Chip-Sandwich: 3 Stunden.

3.8.8 Untersuchung von Dephosphorylierung auf Peptidmikroarrays

Inkubation der PhosphoTyrosin-Mikroarrays mit Phosphatase XopH und XopH-C267A-Mutante:

Waschpuffer 1 = PBST (pH 7,5) (PBS-Puffer + 0,1% Tween20); Waschpuffer 2 = PBS (pH 7,5); Mikroarrayoberflächenblockierung mit PBST + 3% BSA, 10min; Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 50 mM HEPES, pH 7,0, 100mM NaCl, 1mM Dithiothreitol (DTT), 1mM MgCl₂ und 3% BSA, 10 µg/ml XopH und XopH-C267A-Mutante, halbautomatische Inkubation: 2 Stunden; Inkubation mit Primärantikörper anti-PhosphoTyrosin-Antikörper P100 (10µg/ml in PBST+3%BSA), 1 Stunde; Inkubation mit Sekundärantikörper Dylight 649-konjugierten anti-Maus IgG (1µg/ml in PBST+3% BSA), 30 Minuten; Kontrollinkubation anti-pY100-Ak: Parallelinkubation ohne Enzym zur Ermittlung der Start-Signalintensitäten für jeden Spot; Maskierungskontrollinkubation mit anti-XopH-Antikörper (1:5000 in PBST+3%BSA), 1 Stunde, Sekundärantikörper-Inkubation mit Anti-Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor 532(1µg/ml in PBST+3%BSA), 30 Minuten; Maskierungskontrollinkubation mit kompetitiven pTyr2-Substrat: analog zu Inkubation mit Zielprotein, jedoch 1 Minute Vorinkubation mit 600 µM pTyr2-Substrat DADEY(ph)LIPQQG; Maskierungskontrollinkubation mit Inhibitor: analog zu Inkubation mit Zielprotein, jedoch 9 Minuten Vorinkubation mit 100 µM Natrium-Orthovanadat; Kontrollinkubation Harnstoff-Wäsche: analog zu Inkubation mit Zielprotein, jedoch zusätzlichen Waschschritten mit Harnstoff (1x 20 min 6M Harnstoff (in dH₂O, pH 7,4), 1x 20 min 3M Harnstoff (in dH₂O, pH 7,4), 3x 5 min dH₂O und Zentrifugentrocknung) vor der Inkubation mit Primärantikörper.

3.8.9 Untersuchung von Deacylierungen auf Peptidmikroarrays

Inkubation des Histonmikroarrays mit den Sirtuinen (Bedingungen entspr. ⁷⁷):

Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 1,5 mM NAD⁺, 3% BSA, 358 nM Sirtuin1/Sirtuin2/Sirtuin6/Sirtuin7, halbautomatische Inkubation: 2 Stunden, 30°C; Inkubation mit Primärantikörper: 10x anti-Kac-Antikörper-Mischung (1:200, 1:1:1-Mix): anti-Acetyllysine-Antikörper aus Maus und Kaninchen (abcam #61384, CST #9814S, CST #9681S) in TBS+3%BSA-Puffer, 1 Stunde; Inkubation mit Sekundärantikörper-Mix (1:5000, 1:1-Mix): DyLight649 anti-Maus IgG (H+L) und anti-Kaninchen IgG (H+L) in TBS+3%BSA-Puffer, 30 Minuten; Kontrollinkubation enzymatische Negativkontrolle (in Abwesenheit von NAD): Assaypuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 3% BSA, 358 nM Sirtuin1/Sirtuin2/Sirtuin6/Sirtuin7, 2 Stunden, 30°C; Kontrollinkubation anti-Kac-Antikörper: Nur Assaybuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl in Zielproteininkubationsschritt; Kontrollinkubation Sekundärantikörper: Nur Assaybuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl in Zielprotein- und

Primärantikörperinkubationsschritt; NAD⁺-Kontrolle: Nur Assaypuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 1,5 mM NAD⁺, 3% BSA in Zielproteininkubationsschritt.

Inkubation des Histonmikroarrays mit Sirtuin5 und dem anti-Ksuc-Antikörper: Waschpuffer 1 = TBST; Waschpuffer 2 = TBS; Inkubation mit Zielprotein: Assaypuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 1,5 mM NAD⁺, 3% BSA, 358 nM Sirtuin 5, halbautomatische Inkubation: 2 Stunden, 30°C; Inkubation mit anti-Ksuc-Antikörper (1:400) in TBS-Puffer+0,1% Tween20+5% BSA (entsprechend Datenblatt), Chip-Sandwich, über Nacht, 4°C; Transfer in Hybstation; Inkubation mit Sekundärantikörper anti-GST-Antikörper (Ziege), 1:2000-Verdünnung in TBS+3%BSA-Puffer, 30 Minuten; Inkubation mit Tertiärantikörper Dylight 649-konjugierten anti-Ziege IgG (1:10000 in TBS+3% BSA), 1 Stunde; Kontrollinkubation anti-Ksuc-Antikörper: nur Assaybuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl in Zielproteininkubationsschritt.

3.9 *In vitro* Experimente Peptidsubstrate und MALDI-ToF

Die Lösungen der MALDI-ToF-Experimente enthielten: 0,5 µM Sirtuin1 oder Sirtuin2, 250 µM Peptidsubstrat, 1 mM NAD⁺ im Assay-Puffer (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,8) und wurden 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mittels 1 µl 10%iger TFA wurden die Proben mit Zip-Tips entsalzt und mittels MALDI-ToF (MALDI-Ultraflex-II ToF/ToF Massenspektrometer von Bruker Daltonic (Bremen), Matrix: 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Methanol) analysiert.

3.10 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter mittels HPLC

Die Substrate (0,5 – 50 µM) wurden im jeweiligen Assaypuffer für jeweils 5 Minuten bei 37°C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Enzym (10 nM Sirt1, 50 nM Sirt2, 0,05 mg/mL XopH) gestartet, wie beschrieben bei ²¹². Das Abstoppen der Reaktion (1-120 min) erfolgte durch Zugabe von 10% (v/v) TFA, so dass eine finale Konzentration von 1% TFA (v/v) vorlag.

Die gestoppten Reaktionslösungen wurden mittels analytischer HPLC (Agilent 1100) und einer Kinetex 2,6 µm XB-C18 100 A, 50x 3,0mm Säule analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Integration der Peakflächen von Substrat (acetylierte bzw. phosphorylierte Peptide) und Produkt (deacetylierte bzw. dephosphorylierte Peptide). Aus dem Verhältnis der Substrat- zu Produktpeakflächen konnte die Konzentration des gebildeten Produktes berechnet werden. Die erhaltene Produktkonzentration wurde gegen die Zeit aufgetragen, um die Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion zu bestimmen. Der Anstieg wurde mittels linearer Regression ermittelt. Anhand einer nichtlinearen Regression nach dem Michaelis-Menten-Model wurden die kinetischen Parameter K_M und V_{max} unter Verwendung des Programms GraphPad Prism 5.01 errechnet.

4 Ergebnisse

Generell müssen bei den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen die Spezifitäten hinsichtlich Bindung oder enzymatischer Aktivität unterschieden werden. *Reader*domänen binden spezifische Modifikationen oder Sequenzmotive. Dasselbe gilt auch für Antikörper. Die Antikörper binden an das spezifische Epitop oder die spezifische Modifikation. Dagegen wirken Enzyme auf eine andere Art und Weise, indem sie die Substrate nicht nur binden, sondern diese auch spezifisch verändern. Diese Veränderung erfolgt entweder durch das Einführen einer chemischen Gruppe oder Modifikation durch die „schreibenden“ Enzyme (*writer*), wie Transferasen oder Kinasen, oder durch das Entfernen der chemischen Gruppe durch entfernende Enzyme (*eraser*), wie z.B. Deacylasen oder Phosphatasen. Dabei werden die Enzyme und ihre Aktivität über das Modifizieren der Substrate (Substratspezifität) und die bindenen Proteine hinsichtlich ihrer Bindung (Bindungsspezifität) unterschieden. Für beide gibt es weitere Spezifitäten, die Ihre Eigenschaften genauer definieren. Die Eigenschaft eines Proteins eine spezifische Aminosäuresequenz zu binden wird als Sequenzspezifität bezeichnet. Das affine Binden an posttranslationale Modifikationen wird entsprechend als Ac(et)yl-, Methyl- oder Phosphorspezifität bezeichnet.

Zur systematischen Analyse der verschiedenen Proteine mit ihren Bindungsspezifitäten und zur Identifizierung ihrer Substratspezifitäten wurden diese mit verschiedenen Peptidmikroarrays untersucht.

4.1 Bindungsspezifitäten von Antikörpern

Zur Untersuchung der Bindungsspezifitäten werden die Peptidmikroarrays zuerst mit modifikations- bzw. sequenzspezifischen Antikörpern inkubiert (Abbildung 4.1). Die Detektion der Bindung erfolgt mittels fluoreszenz-markierter sekundärer Antikörper.

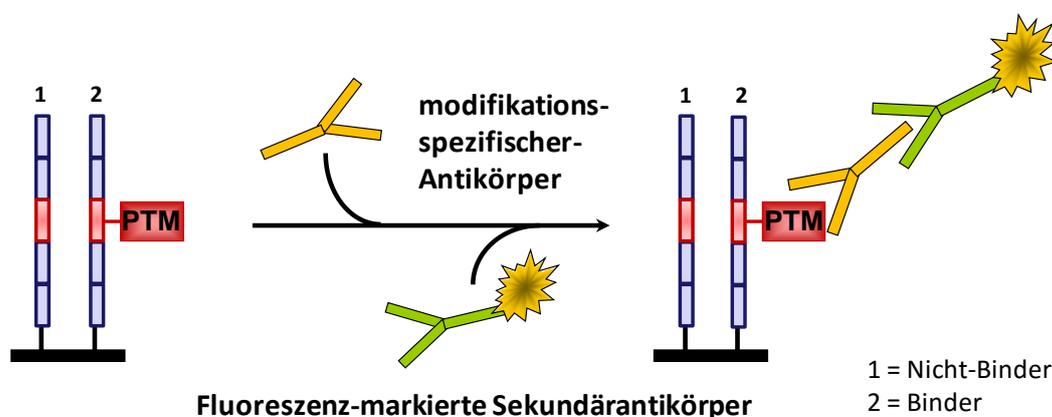


Abbildung 4.1: Assay-Prinzip zur Untersuchung der Bindung von modifikationsspezifischen Antikörpern, wie z.B. anti-succinyllysin-Antikörpern, auf Peptidmikroarrays. Der Nachweis erfolgt mittels fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper, um damit die Bindungsspezifitäten bestimmen zu können.

4.1.1 Voruntersuchung der einzusetzenden Antikörperkonzentration

Im Vorfeld der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe drei modifikationsspezifische anti-Kac-Antikörper (zwei aus Maus, einer aus Kaninchen) auf den Acetylom-Mikroarrays charakterisiert und hinsichtlich ihrer Detektion von acetylierten Lysinresten getestet.⁷⁷ Wie aus dem Venn-Diagramm (Abbildung 4.2 A) ersichtlich wird, bindet keiner der getesteten Antikörper alle auf dem Mikroarray präsentierten Kac-Peptide. Lediglich 3567 (66,0 %) der präsentierten Kac-Peptide wurden von allen drei anti-Kac-Antikörpern erkannt. Weitere 1371 (25,3 %) wurden von zwei der drei Antikörper gebunden. 383 Peptide wurden nur von einem anti-Kac-Antikörper erkannt. Von den auf dem Acetylom-Mikroarray präsentierten 5407 Peptiden wurden 86 (1,6 %) von keinem der drei Antikörper gebunden. Deshalb wurde beschlossen eine Mischung aller drei anti-Kac-Antikörper zu verwenden, da hier 98,4 % aller auf dem Acetylom-Mikroarray präsentierten acetylierten Peptide zuverlässig gebunden werden.

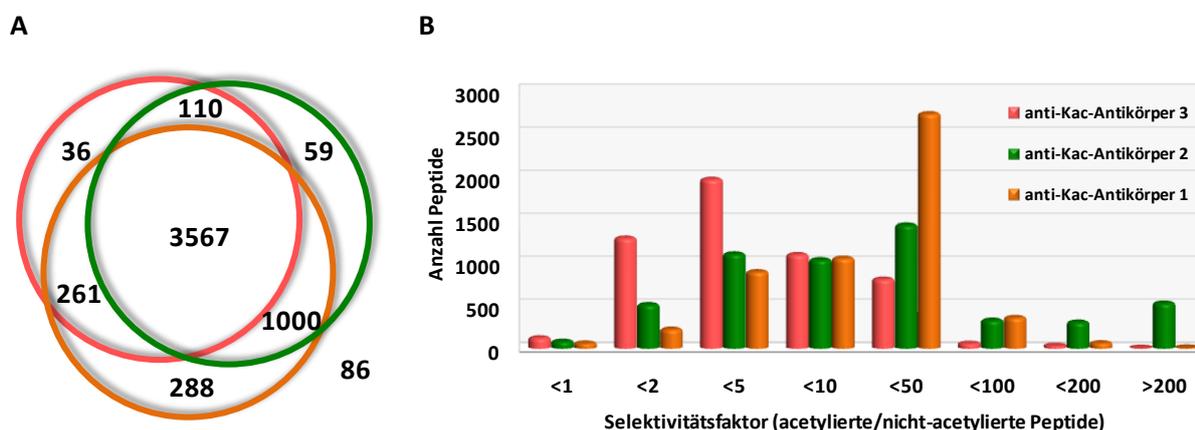


Abbildung 4.2: Antikörpercharakterisierung von drei anti-Kac-Antikörpern. **A** Venn-Diagramm zeigt die Anzahl der durch die einzelnen anti-Kac-Antikörper gebundenen Peptide auf dem Acetylom-Mikroarray (insgesamt 5407 Peptide präsentiert). **B** Das Diagramm zeigt für jeden anti-Kac-Antikörper die Bindungspräferenz für das acetylierte gegenüber dem nicht-acetylierten Peptid (Selektivitätsfaktor). Ein Selektivitätsfaktor von 10 bedeutet, dass das acetylierte Peptid 10-fach besser (10-fach höheres Signal) als das nicht-acetylierte Peptid erkannt wird. Die Ordinate gibt die Anzahl der durch die einzelnen anti-Kac-Antikörper erkannten Peptide an. anti-Kac-Ak 1 = anti-Kac-Ak aus Maus von abcam, anti-Kac-Ak 2 = anti-Kac-Ak aus Maus von Cell Signaling (CST), anti-Kac-Ak 3 = anti-Kac-Ak aus Kaninchen von CST. Experimentelle Durchführung durch Ulrike Obeck.

Zusätzlich wurde auch die Selektivität der anti-Kac-Antikörper untersucht (Abbildung 4.2 B). Das Diagramm zeigt die Bindungspräferenz für das acetylierte gegenüber dem nicht-acetylierten Peptid (Selektivitätsfaktor). Es sind Unterschiede zwischen den einzelnen Antikörpern zu erkennen. Während der anti-Kac-Antikörper 3 die meisten Peptide mit einem Selektivitätsfaktor bis zu 10 erkennt, erkennt der anti-Kac-Antikörper 1 die meisten Peptide mit Selektivitätsfaktoren zwischen 10-50. Insgesamt erkennen alle drei anti-Kac-Antikörper die acetylierten Peptide bis auf wenige Ausnahmen (Selektivitätsfaktor <1) immer stärker als die nicht-acetylierten Peptide.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mischung der drei modifikationsspezifischen anti-Kac-Antikörper auch auf dem Histonmikroarray untersucht (elektronischer Anhang E2). Die Auswertung zeigt nicht nur die Erkennung einzelner PTMs (wie z.B. ein acetyliertes Lysin auf dem Acetylom-Mikroarray), sondern auch die von multiplen PTMs. Dabei wurde untersucht, ob die Bindung der anti-Kac-Antikörper durch benachbarte PTMs beeinflusst wird bzw. ob die anti-Kac-Antikörper immer noch zuverlässig binden, wenn mehrere verschiedene (multiple) PTMs innerhalb des immobilisierten Peptids vorhanden waren (Abbildung 4.3).

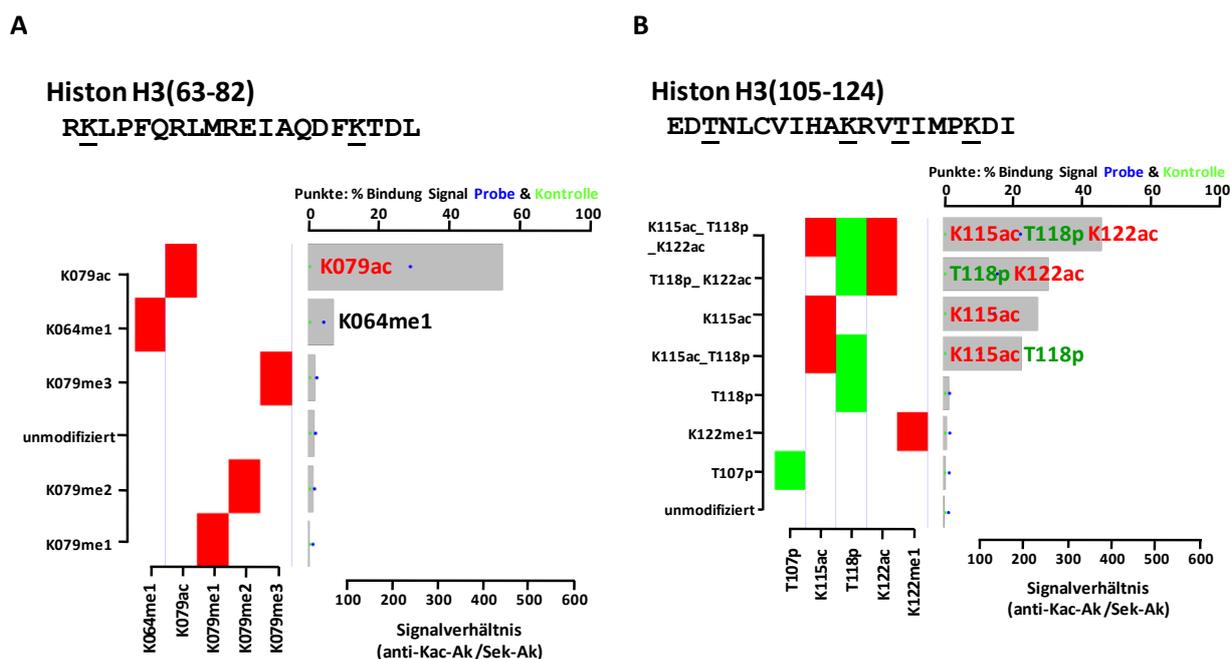


Abbildung 4.3: Detektion von acetylierten Lysin(en) durch die anti-Kac-Antikörper-Mischung. **A** Die anti-Kac-Antikörper-Mischung bindet an acetylierte Lysine (Einzel-PTM). **B** Aber auch Peptide mit multiplen PTMs können durch die anti-Kac-Mischung gebunden werden. Beide Abbildungen zeigen jeweils die Peptide (unmodifiziert und modifiziert) des untersuchten Histonabschnitts mit der entsprechenden Aminosäuresequenz. Die *heatmap* zeigt durch Farbkodierung die Präsenz der jeweiligen PTM mit ihrer Position innerhalb der untersuchten Peptidsequenz an. Lysinmodifikationen sind in rot, Argininmodifikationen in blau und Phosphorylierungen in grün dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt das Signalverhältnis von anti-Kac-Antikörpern (anti-Kac-Ak) zu Sekundärantikörpern (Sek-Ak). Die Peptide sind dabei in absteigender Reihenfolge der Signale angeordnet. Für weitere Erklärungen, wie diese Abbildungen zu lesen sind, siehe analoger Anhang A2.

Die Bindungs- und Acetylspezifität der anti-Kac-Antikörper wurde exemplarisch anhand eines Histon H3-Peptids (Aminosäuren 63-82) gezeigt (Abbildung 4.3 A). Das dargestellte Histonpeptid enthält zwei Lysine, K64 und K79, wobei K79 nicht nur in acetylierter, sondern auch in mono-, di- und trimethylierter Form präsentiert wurde. Das Signalverhältnis für das K79Ac-Peptid ist ca. 450. Dieser Wert bedeutet, dass das Signal des acetylierten Peptids nach Inkubation mit den anti-Kac-Antikörpern 450-fach höher war als das Signal der Sekundärantikörper-Kontrolle. Es wird ersichtlich, dass die anti-Kac-Antikörper die Acetylierung zuverlässig erkennen. Dies wird unterstützt durch den Fakt, dass das unmodifizierte Peptid kein Signal aufweist.

Peptide, welche neben der Lysin-Acetylierung noch andere PTMs aufweisen, wurden ebenfalls erkannt (Abbildung 4.3 B). Hier wurde das H3-Peptid (Aminosäuren 105-124) ausgewählt, welches an zwei Lysinen (K115 und K122) und an zwei Threoninen (T107 und T118) modifiziert wurde. Auch an diesem Beispiel wird ersichtlich, dass das unmodifizierte Peptid nicht von der anti-Kac-Antikörper-Mischung gebunden wurde. Das Signalverhältnis unterschied sich jedoch in Abhängigkeit von der Anzahl der posttranslationalen Modifizierungen innerhalb des Peptids. Polyacetylierte Peptide wurden mit höheren Signalen detektiert, da die Affinität der anti-Kac-Antikörper gesteigert wird. Das stärkste Signal wurde für das an beiden Lysinen acetylierte Peptid detektiert (400-fach höheres Signal). Dabei beeinflusst die Phosphorylierung am T118 die Bindung der anti-Kac-Antikörper nicht. Denn obwohl die Phosphatgruppe eine voluminöse und geladene Gruppe ist, beeinflusst dies nicht die Bindung der anti-Kac-Antikörper. Das wird durch die Peptide T118p+K122Ac und K115ac+T118p bestätigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Mischung von anti-Kac-Antikörpern die acetylierten Lysine spezifisch sowohl in einzel-modifizierter als auch in Form multipler Modifikationen bindet und somit für den Einsatz in den weiteren Assays geeignet ist. Die Phosphorylierung von Threonin- und Serinresten scheint die Bindung der Antikörper nicht zu beeinflussen.

4.1.2 Untersuchung der Bindungsspezifitäten von modifikationsspezifischen Antikörpern

Neben der bereits durchgeführten Charakterisierung der anti-Kac-Antikörper-Mischung wurden auf dem Histonmikroarray diemodifikationsspezifischen anti-Kac-Antikörper einzeln analysiert. Die vollständigen Datensätze sind dem elektronischen Anhang E2 zu entnehmen. Die Signale dieser Antikörper für alle einzel-modifizierten Peptide des Histonmikroarrays sind in der *heatmap* in Abbildung 4.4 dargestellt.

Das Kontrollexperiment mit den Sekundärantikörpern zeigte keine Signale. Die anti-Kac-Antikörper zeigen die meisten und stärksten Signale für acetylierte Lysine. Der anti-Kac-Antikörper 2 wies Kreuzreaktivitäten für methylierte Lysine, methylierte Arginine und Phosphorylierungen auf. Sowohl anti-Kac-Antikörper 1 als auch 2 (beide aus Maus) zeigen eine Kreuzreaktivität zu propionylierten Lysinen, wenn auch meist mit einem verringerten Signal.

Zusätzlich wurde ein modifikationsspezifischer anti-Ksuc-Antikörper untersucht (elektronischer Anhang E2). Aus der *heatmap* (Abbildung 4.4) ist eine Modifikationsspezifität des anti-Ksuc-Antikörpers für die succinylierten Lysine zu erkennen. Hier ist eine Darstellung hilfreich, die veranschaulicht, ob eine Präferenz des Antikörpers für eine Aminosäuresequenz in der Umgebung von dem succinyliertem Lysin besteht und ob dieser eine Spezifität für die chemische Struktur des Acylrestes aufweist (Acylspezifität). Dabei wird die Acylspezifität unterschiedlich betrachtet, entweder hinsichtlich einer

Kreuzreaktivität gegenüber einer alternativen Acylmodifikation oder hinsichtlich der Unterscheidung zwischen acylierten und nicht-acylierten Peptiden.

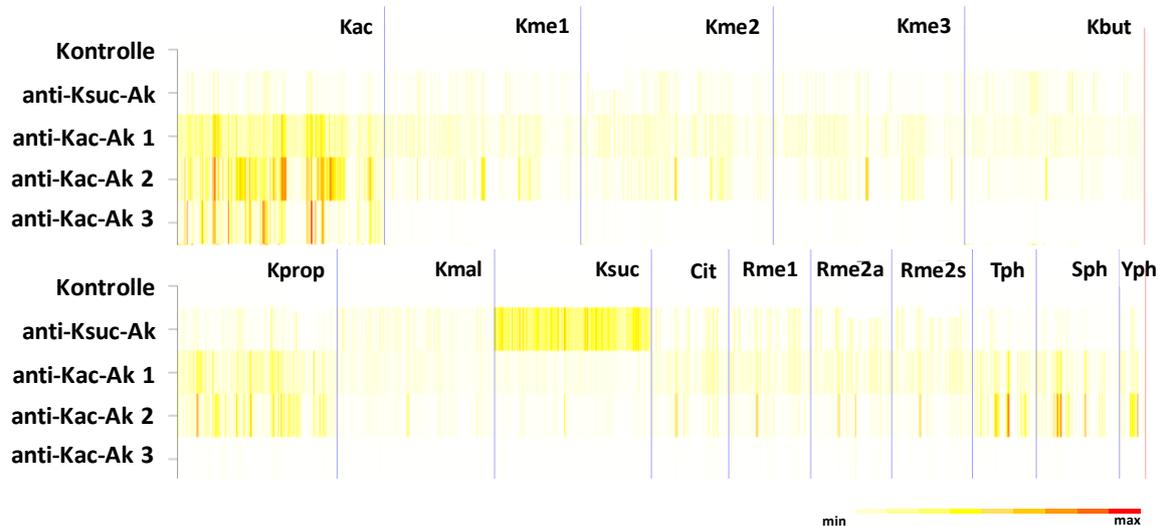


Abbildung 4.4: Heatmap der Signale der vier modifikationsspezifischen Antikörper (einen anti-Ksuc-Antikörper und drei anti-Kac-Antikörper, anti-Kac-Ak 1 = anti-Kac-Ak aus Maus von abcam, anti-Kac-Ak 2 = anti-Kac-Ak aus Maus von CST, anti-Kac-Ak 3 = anti-Kac-Ak aus Kaninchen von CST) für alle angegebenen Einzel-PTM-Peptide des Histonmikroarrays. Jeder Strich repräsentiert dabei ein einzel-modifiziertes Peptid. Die Signale sind durch eine Farbskala von weiß für kein Signal, über eine Gelb- und Orangefärbung für schwache bis mittlere Signale bis zu rot für das stärkste Signal indiziert. Jede Zeile repräsentiert einen Antikörper. Die Kontrolle bezieht sich auf die Signale der Sekundärantikörper.

Für eine genauere Analyse der Sequenzspezifität des anti-Ksuc-Antikörpers wurden die 13 Lysine des Histons H3 exemplarisch näher betrachtet (Abbildung 4.5). Das Histon H3 wurde ausgewählt, da es das am besten untersuchte Histonprotein ist.^{169,171,247} Die Signale der H3-Peptide wurden im Diagramm der Abbildung 4.5 A zur besseren Übersicht auf das stärkste Signal (H3K56) normiert (100%). Alle succinylierten Lysine wurden durch den anti-Ksuc-Antikörper erfolgreich gebunden, mit mindestens 25% des Maximumsignals für H3K37suc. Sieben der 13 H3-Ksuc-Peptide zeigten Signale von über 60% im Vergleich zum succinylierten H3K56. Damit weist der modifikationsspezifische anti-Ksuc-Antikörper keine Sequenzspezifität auf. Das wird auch aus der Abbildung 4.5 ersichtlich, da alle Succinylierungen in den Histonpeptiden gebunden werden.

Werden die Signalverhältnisse der succinylierten H3-Peptide zu den entsprechenden unmodifizierten Peptiden gebildet, wird fast die Hälfte der succinylierten H3-Peptide über 30-fach stärker als ihre unmodifizierte Form gebunden (Abbildung 4.5B). Das Signalverhältnis ist für das H3K79suc-Peptid sogar fast 120-fach höher. Für alle succinylierten H3-Peptide erkannte der anti-Ksuc-Antikörper die succinylierten Peptide mindestens 10-fach besser als die unmodifizierten Peptide.

Zusätzlich wurde die Acylspezifität des anti-Ksuc-Antikörpers für die in der Literatur publizierten Ksuc-Modifizierungsstellen innerhalb des Histons H3, untersucht.²⁴⁸ Dazu wurden in Abbildung 4.5 C die relativen Signale der acylierten Peptide aufgetragen und diese auf das höchste Signal (K122suc)

normiert (100%). Der Graph zeigt die affine Bindung des anti-Ksuc-Antikörpers für die Lysin-Succinylierung. Alle anderen Acylierungen zeigten 10- bis 100-fachniedrigere Signale, da diese durch den anti-Ksuc-Antikörper nicht gebunden werden.

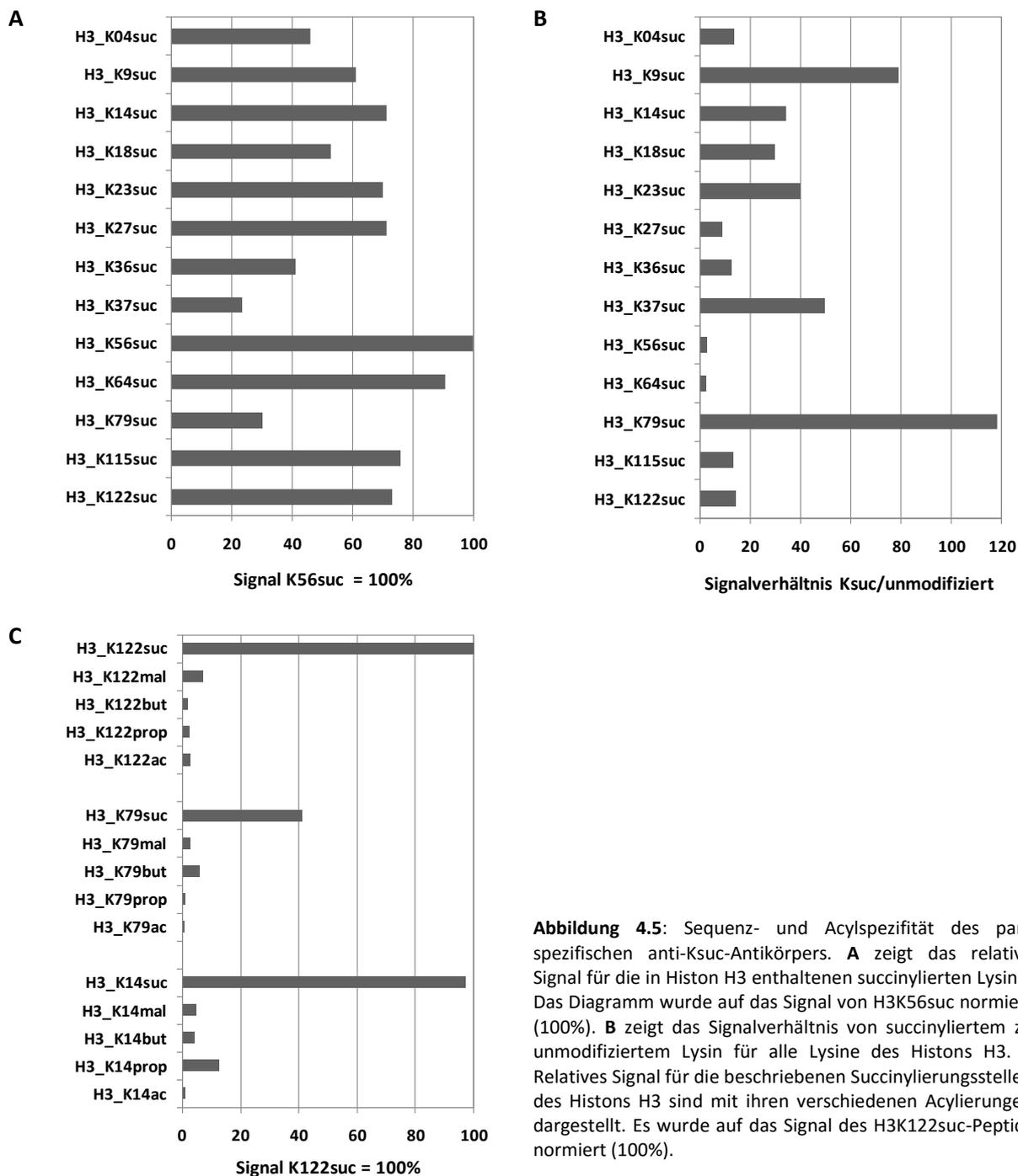


Abbildung 4.5: Sequenz- und Acylspezifität des pan-spezifischen anti-Ksuc-Antikörpers. **A** zeigt das relative Signal für die in Histon H3 enthaltenen succinylierten Lysine. Das Diagramm wurde auf das Signal von H3K56suc normiert (100%). **B** zeigt das Signalverhältnis von succinyliertem zu unmodifiziertem Lysin für alle Lysine des Histons H3. **C** Relatives Signal für die beschriebenen Succinylierungsstellen des Histons H3 sind mit ihren verschiedenen Acylierungen dargestellt. Es wurde auf das Signal des H3K122suc-Peptids normiert (100%).

4.1.3 Untersuchung der Bindungsspezifitäten von sequenzspezifischen Antikörpern

4.1.3.1 Sequenz- und Acylspezifitäten von sequenzspezifischen Antikörpern

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Gunter Reuters (Institut für Biologie, Abteilung Entwicklungsgenetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) wurden 14 kommerzielle sequenzspezifische Antikörper auf Ihre Bindungsspezifitäten auf dem Histonmikroarray getestet (Abschnitt 3.8.4). Im Kontrollexperiment konnten keine Signale und damit auch keine falsch-positive Erkennung oder Kreuzreaktivität von den Sekundärantikörpern detektiert werden.

Eine Übersicht aller Ergebnisse der getesteten sequenzspezifischen Antikörper ist in der *heatmap* in der Abbildung 4.6 gezeigt. Die detaillierten Datensätze sind in dem elektronischen Anhang E2 gezeigt.

In der *heatmap* sind links in den ersten beiden Spalten die Signale der beiden anti-H4K16ac-Antikörper von Millipore und Santa-Cruz dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die anti-H4K16ac-Antikörper von Millipore und Santa-Cruz unspezifischer und kreuzreaktiver als die anderen getesteten Antikörper sind. Vor allem propionylierte und butyrylierte Lysine werden erkannt. Vereinzelt sind auch schwache Signale für phosphorylierte, malonylierte oder methylierte Peptide detektierbar. Beide Antikörper erkennen nicht nur die H4K16ac-Modifizierungsstelle, sondern auch andere acetylierte Lysine innerhalb der anderen Histone. Beide Antikörper liefern für die H4K16ac-Modifizierungsstelle die stärksten Signale.

Die drei anti-H3K9me(1/2/3)-Antikörper sind spezifischer und binden hauptsächlich an ihre ausgewiesene Modifikationsstelle. Hierbei werden teilweise auch die anderen von dem Antikörper eigentlich nicht adressierten Methylierungsgrade (di- und trimethylierte Lysine vom Kme1-spezifischen Antikörper) „erkannt“. Die anti-H3K9me1- und anti-H3K9me2-Antikörper von Abcam besitzen eine höhere Spezifität, als der anti-H3K9me3-Antikörper von Diagenode. Der anti-H3K9me3-Antikörper erkennt zudem noch andere trimethylierte Lysine in anderen Histonen.

Der anti-H3K4me1-Antikörper bindet an seine H3K4me1-Modifikationsstelle, erkennt aber auch noch einige andere monomethylierte Lysine aus anderen Histonen. Der anti-H3K4me2-Antikörper bindet zwar hauptsächlich das dimethylierte Lysin des Histons H3, allerdings sind auch schwache Signale für andere dimethylierte Lysine detektierbar (z.B. das H3K18me2 und H3K27me2).

Der anti-H3K27me3-Antikörper erkennt seine ausgewiesene Zielmodifikationsstelle, aber auch andere Kme3-modifizierte Peptide. Interessant ist, dass hier eine Phosphorylierung des benachbarten H3S28 die Erkennung des Antikörpers stark beeinträchtigt.

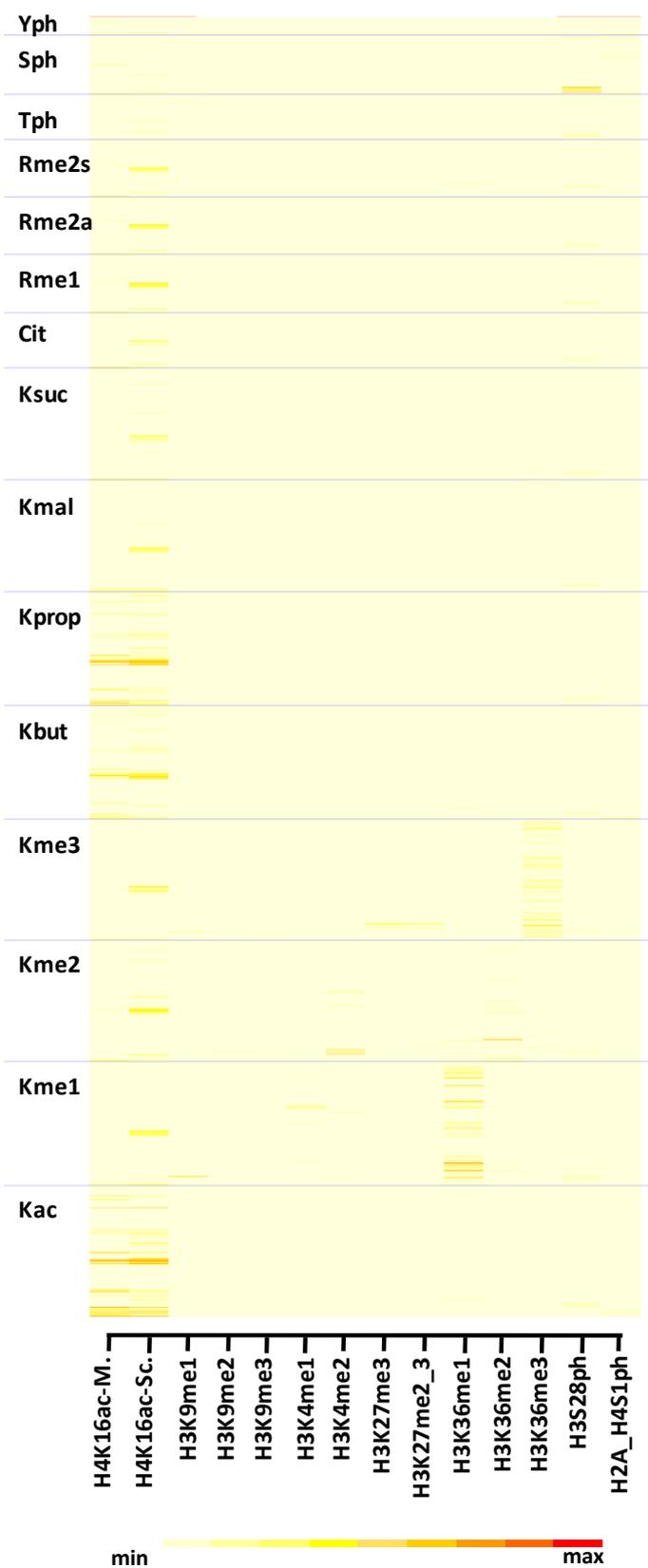


Abbildung 4.6: Bindungsspezifitäten der 14 getesteten sequenzspezifischen Antikörper. *Heatmap* zeigt die Signale für die 14 kommerziell erworbenen, sequenzspezifischen Antikörper für alle angegebenen Einzel-PTM-Peptide des Histonmikroarrays. Jeder Strich repräsentiert dabei ein einzel-modifiziertes Peptid. Die Signale sind durch eine Farbskala von weiß für kein Signal, über eine Gelb- und Orangefärbung für schwache bis mittlere Signale bis zu rot für das stärkste Signal indiziert. Jede Spalte repräsentiert einen sequenzspezifischen Antikörper. H4K16ac-M.= anti-H4K16ac-Ak von Millipore, H4K16ac-Sc.= anti-H4K16ac-Ak von Santa Cruz.

Darüber hinaus erkennt der anti-H3S28ph-Antikörper auch das H3S10ph-Peptid (Abbildung 4.8). Diese Kreuzreaktivität wird wahrscheinlich durch eine sehr ähnliche Sequenz zwischen diesen beiden Peptiden (H3K09-Modifikationsstelle: ARK-pS-TGG, H3K27-Sequenz: ARK-pS-APS) hervorgerufen, und muss bei der Verwendung dieses Antikörpers bedacht werden.

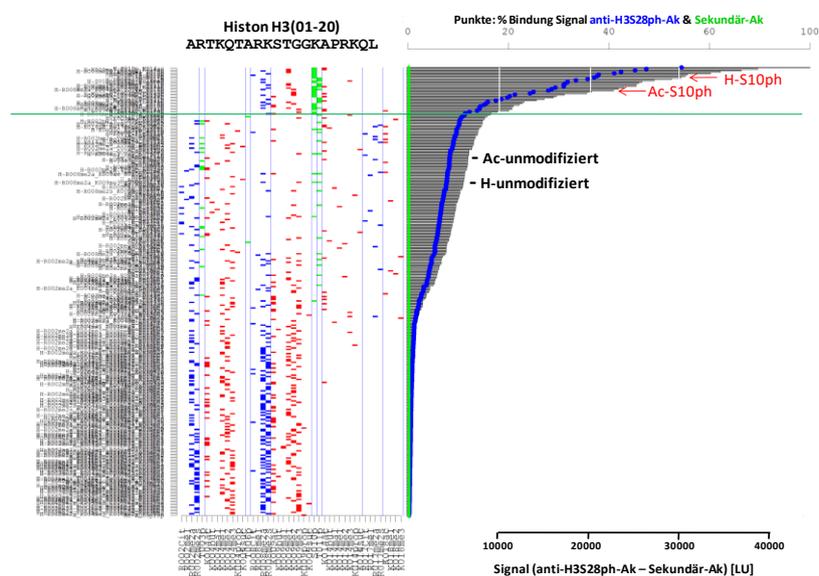


Abbildung 4.8: Bindungsspezifität des H3S28ph-Antikörpers für den N-Terminus des Histons H3 (AS 1-20) inklusive der H3S10-Phosphorylierungsstelle. Gezeigt sind die Signale des anti-H3S28ph-Antikörpers mit abgezogenem Sekundärantikörper-signal. Oberhalb der grünen Linie sind alle H3S10-phosphorylierten Peptide des Histonomikroarrays dargestellt. Für weitere Erklärungen, wie diese Abbildungen zu lesen sind, siehe analoger Anhang A2.

Der anti-H2A/H4S1ph-Antikörper bindet ebenfalls die ausgewiesenen Phosphorylierungsstellen. Allerdings konnte auch hier eine Kreuzreaktivität zu anderen phosphorylierten, methylierten und acetylierten Histonpeptiden nachgewiesen werden.

4.1.3.2 Histonvariantenspezifität von sequenzspezifischen Antikörpern

Die sequenzspezifischen Antikörper wurden auch hinsichtlich ihrer Histonvariantenspezifität untersucht. Ein Teil der Daten ist in den *Box-Plots* in Abbildung 4.9 dargestellt (elektronischer Anhang E2 für kompletten Datensatz). Es sind die einzel-modifizierten Peptide für jeden Antikörper aufgetragen. Die blauen Punkte in den *Box-Plots* repräsentieren die Zielpeptide mit ihren jeweiligen Histonvarianten. Es wird ersichtlich, dass beispielsweise der anti-H3K9me1-Antikörper nicht histonvariantenspezifisch ist, da die Signale für die Zielpeptide aller Histonvarianten ähnlich sind (Abbildung 4.9 A). Die anderen Antikörper, wie anti-H3K9me2-, anti-H3K9me3- und anti-H3K27me3-Antikörper (Abbildung 4.9 B-D), weisen eine Histonvariantenspezifität auf. Diese drei genannten Antikörper zeigen für ein Peptid mit di- oder trimethyliertem H3K9 bzw. H3K27 in einer Histonvariante eine höhere Bindungsaffinität als das bei dem entsprechenden Peptid einer anderen Histonvariante der Fall ist.

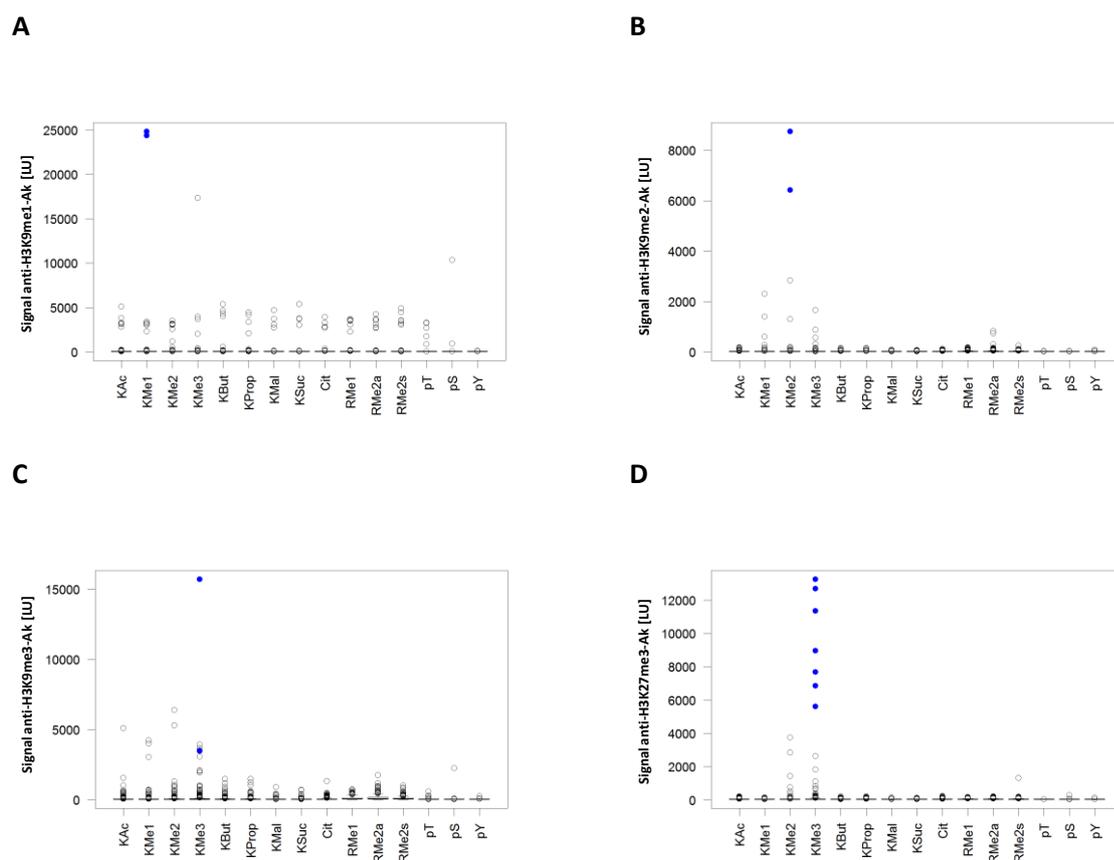


Abbildung 4.9: Box-Plots zur Darstellung der Histonvariantenspezifität von sequenzspezifischen Antikörpern. Die Ordinate gibt jeweils die Signale der einzelnen sequenzspezifischen Antikörper an. Auf der Abszisse sind die einzelnen PTMs dargestellt. Jeder Punkt des *Box-Plots* repräsentiert ein Peptid. Die blaue Einfärbung repräsentiert die Zielsequenz mit ihren jeweiligen Histonvarianten. **A** anti-H3K9me1-Antikörper von Abcam. **B** anti-H3K9me2-Antikörper von Abcam. **C** anti-H3K9me3-Antikörper von Diagenode. **D** anti-H3K27me3-Antikörper von Active Motif.

In einer weiteren Untersuchung wurden für drei ausgewählte sequenzspezifische Antikörper (H3K9me1, H3K9me2 und H3K4me1) verschiedene Konzentrationen (0,2, 1 und 2 $\mu\text{g/ml}$) auf den Histonmikroarrays inkubiert. Damit sollte der Einfluss der eingesetzten Antikörperkonzentration auf die Erkennung der Peptidpitope und der gemessenen Signalintensitäten ermittelt werden. Im Idealfall wird bei höherer Konzentration des Antikörpers kein höheres Signal auf den Peptidmikroarrays detektiert. Dies würde bedeuten, dass bereits die in dem Peptidspot präsentierten Epitope für den Antikörper zugänglich sind. Es können nicht mehr Epitope gebunden werden, auch wenn mehr Antikörper im Experiment zur Verfügung stehen. Hier sind die Antikörper bereits so dicht innerhalb des Spots gepackt, so dass eine Sättigung vorliegt. Sind allerdings noch mehrere Epitope für den Antikörper zugänglich, bewirkt die Steigerung der eingesetzten Antikörperkonzentration eine Steigerung des detektierten Signals auf dem Peptidmikroarray. Die Ergebnisse für beide Szenarien sind in Abbildung 4.10 anhand eines jeweiligen Beispiels dargestellt. Für den anti-H3K9me1-Antikörper kann keine Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörperkonzentration festgestellt werden (Abbildung 4.10 A). Die Erkennung der spezifischen (auch der unspezifischen) Modifikationsstellen wird nicht durch die

Antikörperkonzentration beeinflusst. Dagegen zeigt sich für den anti-H3K4me1-Antikörper, dass hier eine Erhöhung der Antikörperkonzentration auch zu einer Erhöhung des Signals führt (Abbildung 4.10 B).

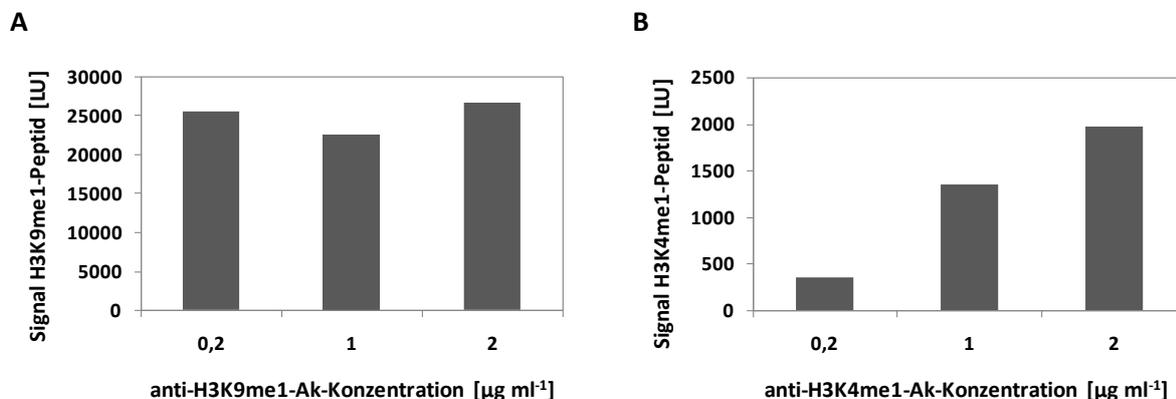


Abbildung 4.10: Untersuchung des Einflusses der im Assay eingesetzten Antikörperkonzentrationen auf die Epitoperkennung. **A** Die Erkennung des Epitops durch den anti-H3K9me1-Antikörper ist unabhängig von der eingesetzten Antikörperkonzentration. **B** Eine veränderte Antikörperkonzentration vom anti-H3K4me1-Antikörper führt zu einer veränderten Signalstärke des Epitops.

4.2 Untersuchung der Bindungsspezifitäten von *Reader*domänen

Das Assay-Prinzip zur Untersuchung der Bindungsspezifitäten von *Reader*domänen ist in Abbildung 4.11 für das Beispiel einer Bromodomäne dargestellt. Die Flag-fusionierte Bromodomäne bindet an die acetylierten Lysinseitenketten innerhalb des immobilisierten Peptids. Die Detektion erfolgt mittels eines fluoreszenz-markierten anti-Flag-Antikörpers.

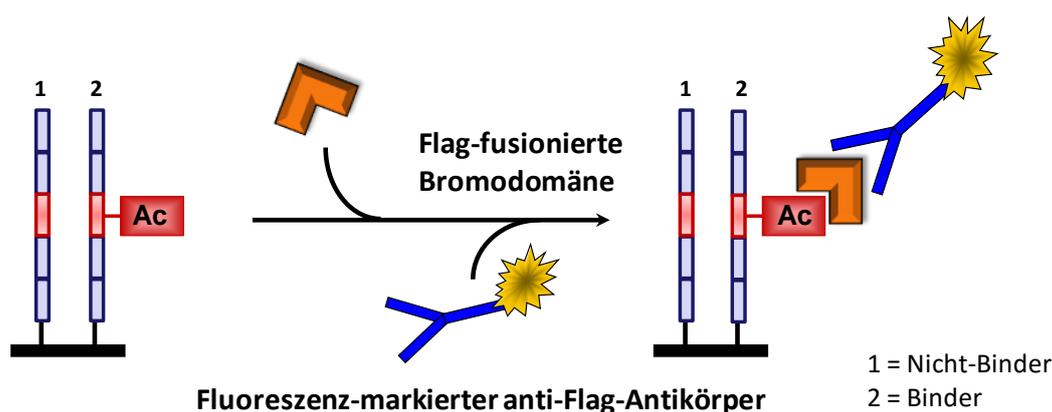


Abbildung 4.11: Assay-Prinzip zur Untersuchung der Bindung von fusionierten *Reader*domänen, wie z.B. einer Flag-fusionierten Bromodomäne. Der Nachweis der Bindung an die auf dem Peptidmikroarray immobilisierten Peptide erfolgt mittels fluoreszenz-markierter gegen die Fusion gerichteter Sekundärantikörper (z.B. anti-Flag-Antikörper).

4.2.1 Untersuchung der Bindungsspezifitäten der Bromodomänen BRD4(1) und BRD4(2)

Die Untersuchung der *Reader*domänen auf Acyl- und Sequenzspezifität wurde für zwei ausgewählte Vertreter der Familie der Bromodomänen vorgenommen (Abschnitt 3.8.5). Dafür wurde das Bromodomänen-enthaltene Protein 4 (BRD4) mit seinen zwei Acetyllysin-bindenden Domänen, BRD4(1) und BRD4(2), ausgewählt. Die Resultate sind dem elektronischen Anhang E2 zu entnehmen. Der Übersicht halber wird in diesem Abschnitt nur eine Auswahl der Resultate bezüglich der Histon H4 abgeleiteten Peptide präsentiert.

In Abbildung 4.12 sind die Signale für alle 11 Lysine des Histons H4, bei denen nur ein Lysin acetyliert ist, dargestellt. In Abbildung 4.12 A wird eine Präferenz in der Bindung von BRD4(1) für H4K91ac ersichtlich. Dieselben Binder wurden auch für die zweite Bromodomäne BRD4(2) mit vergleichbaren Signalen beobachtet (siehe Abbildung 4.12 B).

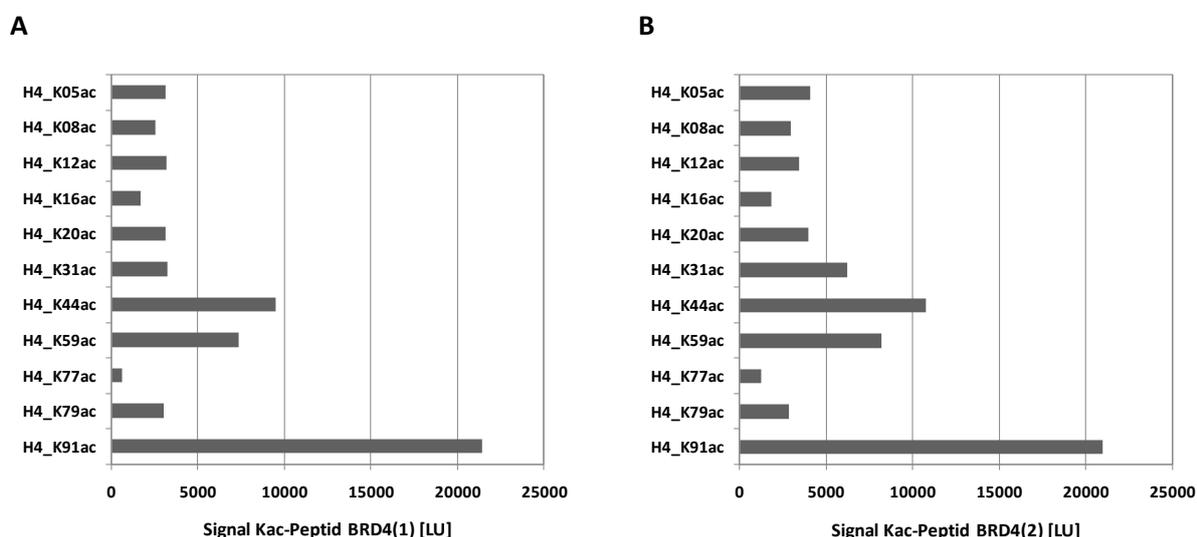


Abbildung 4.12: Sequenzspezifität von BRD4(1) und BRD4(2). **A** Signale von BRD4(1) für die acetylierten Lysine des Histons H4. **B** Gezeigt sind für die acetylierten Lysine des Histons H4 die entsprechenden Signale der mit BRD4(2) inkubierten Histonmikroarrays.

Zur Bestimmung der Acetylselektivität der Bromodomänen wurde ein Vergleich der Signale der Histon H4-Peptide herangezogen (Abbildung 4.13). Dabei wird das Signal des acetylierten Peptids ins Verhältnis zu dem entsprechenden unmodifizierten Peptid gesetzt. Es ergeben sich für BRD4(1) Signalverhältnisse zwischen 0,5 (H4K77) und 2 (H4K44) (Abbildung 4.13 A). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für BRD4(2) beobachtet werden (Abbildung 4.13 B), obwohl hier insgesamt die Signale für die acetylierten Peptide etwas höher waren. Damit lag auch der Bereich der Signalverhältnisse insgesamt höher, so dass die meisten (8 der 11 Peptide) über einem Signalverhältnis von 1,5 lagen.

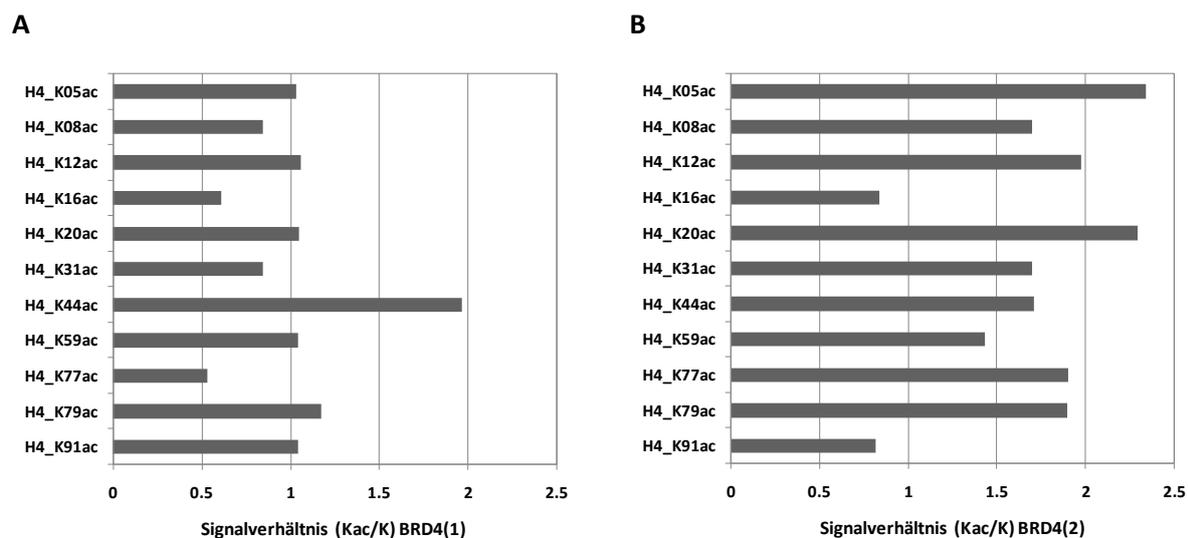


Abbildung 4.13: Acetylselektivität von BRD4(1) (A) und BRD4(2) (B). Das Signalverhältnis von acetylierten zu unmodifizierten Peptidpaaren für die Lysine des Histons H4 ist dargestellt.

Weder BRD4(1) noch BRD4(2) zeigen eine Präferenz für acetylierte Lysine (Abbildung 4.14).

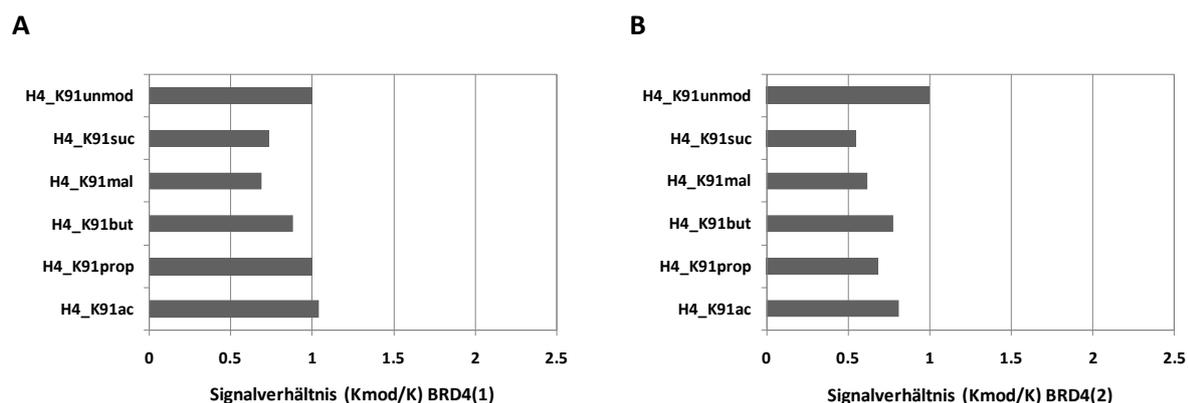


Abbildung 4.14: Acylspezifität von BRD4(1) und BRD4(2). Gezeigt ist das Verhältnis der Signale nach der Inkubation mit BRD4(1) (A) oder BRD4(2) (B) für alle acylierten H4K91-Peptide (Kmod) zu dem Signal des unmodifizierten Peptids.

4.2.2 Untersuchung der Bindungsspezifitäten der Chromodomäne CHD1

Die Erkennung von methylierten Lysinen erfolgt unter anderem durch Chromodomänen wie z.B. die humane Chromodomäne 1 (CHD1), die an H4K4me_{2/3} bindet. Diese *Readerdomäne* wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Schüle von der Albert-Ludwig-Universität Freiburg und Prof. Dr. Wolfgang Sippl von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg auf dem Histonmikroarray untersucht. Ziel dieser Charakterisierung war es, die Chromodomäne auf ihre Sequenzspezifität und Methylspezifität an Histonpeptiden zu untersuchen. Zusätzlich sollten neue Bindungsstellen identifiziert und der Einfluss von benachbarten Modifikationen auf die Bindung der *Readerdomäne* aufgezeigt werden.

Der komplette Datensatz der CHD1-Untersuchung ist dem elektronischen Anhang E2 zu entnehmen. Es zeigt die Signale für die Bindung von der Chromodomäne CHD1 an die auf dem Histonmikroarray immobilisierten Peptide. Bei den Signalen wurden bereits die Signale der GST-Kontrolle abgezogen (nachfolgend als Signal CHD1 bezeichnet). Es wird ersichtlich, dass CHD1 überwiegend an methylierte Lysin- und Argininreste bindet, deren Peptide meist aus dem Histonprotein H2A, aber auch aus H3 und H4 stammen. Hier werden auch die Peptide erkannt, bei denen Arginin gegen Citrullin ausgetauscht wurde. Auch andere Modifikationen, wie Acylierungen oder Phosphorylierungen werden erkannt. Zudem bindet CHD1 einige unmodifizierte Peptide.

Abbildung 4.15 zeigt die Signale von CHD1 für die Peptide des *N*-Terminus des H3-Proteins, wobei das unmodifizierte Peptid als Referenz dient. Die Abbildung 4.15 A zeigt die Signale der Peptide mit jeweils einer einzelnen Modifikation, entweder der Methylierung einer Lysin- (H3K4) oder einer Argininseitenkette (H3R2), mit all ihren möglichen Methylierungsgraden (mono-, di- (symmetrisch, asymmetrisch) oder trimethyliert), oder die Phosphorylierung des Threonins (H3T3). Das höchste Signal war das monomethylierte H3K4-Peptid, gefolgt von dem trimethylierten H3K4-Peptid und dem dimethylierten Peptid (H3K4me2).

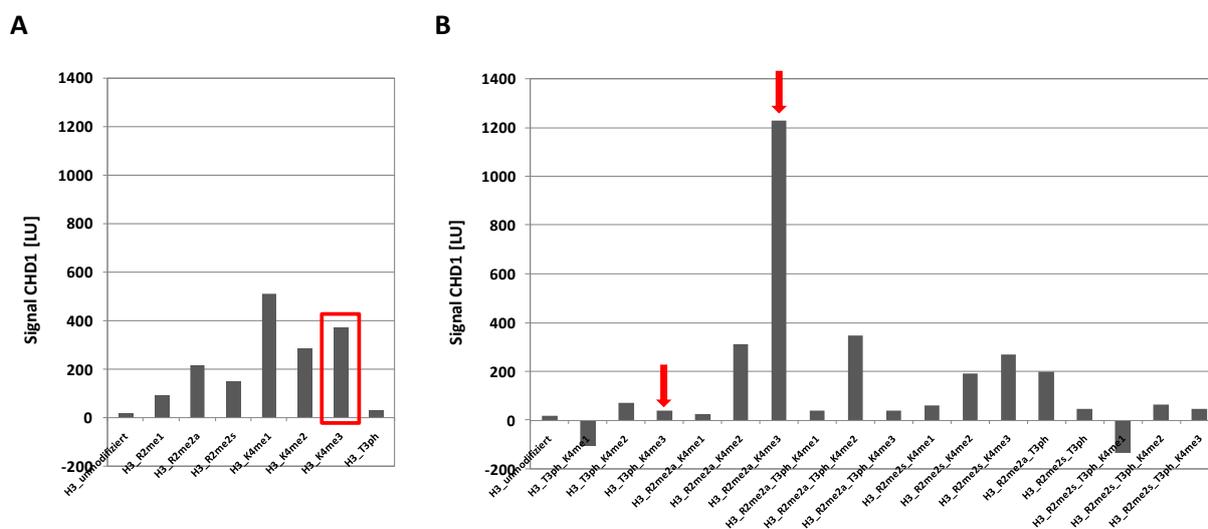


Abbildung 4.15: Bindungsspezifität von CHD1 am *N*-Terminus von Histon H3. **A** Gezeigt sind die Signale von CHD1 der H3K4-Modifikationsstelle mit Einzel-PTMs. Die in der Literaturbeschriebene Modifikationsstelle H3K4me3 ist hervorgehoben durch die rote Umrandung.³⁸³ **B** Zur Untersuchung des *cross-talks* sind die multiplen PTMs in der *N*-terminalen Region des Histons H3 gezeigt. Die roten Pfeile verweisen auf Signale mit bestimmten PTMs, die den Einfluss benachbarter PTMs auf die Bindung von CHD1 an H3K4me3 demonstrieren.

In Abbildung 4.15 B sind die Peptide mit multiplen PTMs dargestellt. Auffällig sind die Signale, die mit den roten Pfeilen gekennzeichnet sind. Eine Phosphorylierung des Threonins in der -1-Position zum H3K4me3 führt zu einem etwa 100-fach reduzierten Signal. Die Methylierung des Argininrestes in der -2-Position (R2me2a) hingegen führt zu einer Signalsteigerung um das 3,3-fache im Vergleich zur Einzel-PTM von H3K4me3. Das H3R2me2aK4me3-Signal ist größer als die Summe der beiden Einzel-

PTM-Signale von H3R2me2a und H3K4me3. Das Signal der Kombination dieser beiden Modifikationen zu der H3K4me3-Modifikation (H3_R2me2a_T3ph_K4me3) ist vergleichbar wie das H3T3ph_K4me3-Signal. Das zeigt, dass die Phosphorylierung des H3T3 einen größeren Einfluss auf die Bindung von CHD1 hat als die Argininmethylierung in der -2-Position. An dem Peptid H3_R2me2a_T3ph_K4me3 wird der Einfluss des Methylierungsgrades auf die Bindung von CHD1 verdeutlicht. Ist die Lysinseitenkette des H3K4 di- anstatt trimethyliert, steigert das die Bindung von CHD1. Das Signal ist vergleichbar mit dem Signal des H3K4me3-Peptids.

Auf dem Histonmikroarray wurden aber noch wesentlich stärkere Signale detektiert als die beschriebene Modifikationsstelle H4K4me3 (Abbildung 4.15 A roter Kasten).

Das Peptid aus dem Histon H2A (Aminosäuresequenz 26-45) zeigt ein 10-fach höheres Signal als das H3K4me3-Peptid (Abbildung 4.16 roter Kasten). Damit liefert das Experiment einen Hinweis darauf, dass das Bindungsmotiv für die Chromodomäne CHD1 aus RxxRK (H2AR34-x-x-R37-K38) besteht.

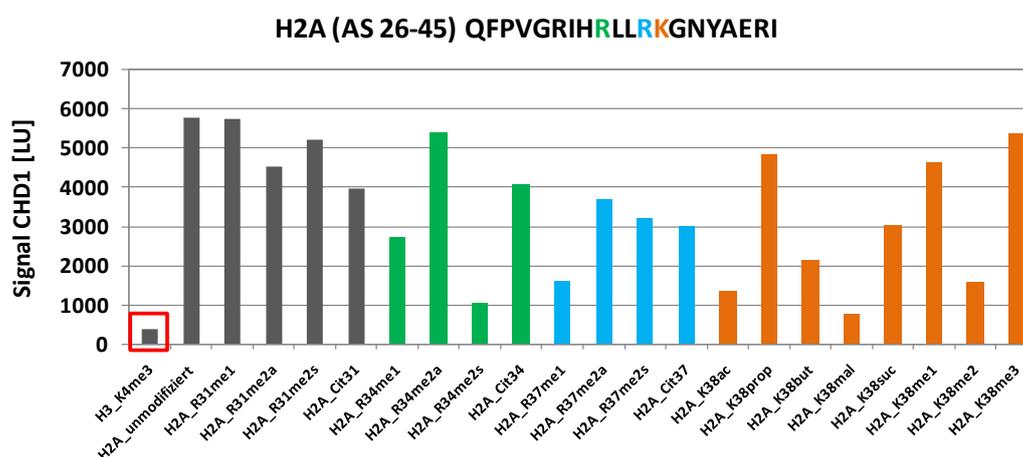


Abbildung 4.16: Bindungsspezifitäten von CHD1 mit unterschiedlichen Methylierungsgraden oder durch Citrullin ausgetauschten Argininen für das Histon H2A (AS 26-45). Es sind die Signale von CHD1 gezeigt.

Dieses RxxRK-Motiv ist auch in einem anderen Peptid mit einem anderen Überlappungsbereich (H2A Aminosäuresequenz 33-52) auf dem Histonmikroarray präsentiert. Dieses bestätigt die 10-16-fach höheren Signale für H2AK38me2 als für H3K4me3 (Abbildung 4.17). Diese Schlussfolgerungen werden unterstützt durch die H2AK38mal- und H2AK38suc-Peptide. Die negative Ladung verhindert die Bindung der Readerdomäne an diese Modifikationsstelle (siehe Abbildung 4.17 rote Pfeile), wohingegen eine neutrale (acetyliertes, butyryliertes oder propionyliertes H2AK38) oder positive Ladung (methylertes H2AK38) die Bindung von CHD1 nicht beeinflusst.

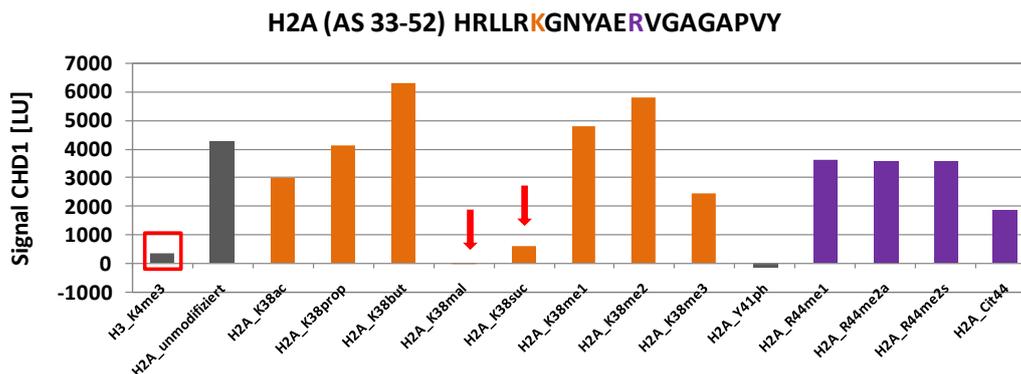


Abbildung 4.17: Bindungsspezifität von CHD1 für das Peptid H2A (AS 33-52). Gezeigt sind die Signale von CHD1 für die Peptide mit unterschiedlichen Einzel-PTMs (acyliertes H2AK38, phosphoryliertes H2AY41, sowie unterschiedliche Methylierungen/Arg-Cit-Austausch für H2AR44). Der rote Kasten gibt das Referenzsignal H3K4me3 an. Die roten Pfeile zeigen die Inhibierung der Bindung von CHD1 durch die negativen Ladungen des malonylierten und succinylierten Lysins 38 von H2A.

Die Untersuchung von CHD1 zeigte noch ein anderes starkes Signal (8-fach höher als H3K4me3), welches das RxxRR-Motiv (H3R49-x-x-R52-R53) enthält. Hier ist das H3R52 die Schlüsselstelle: wenn Arg52 durch Citrullin ausgetauscht wird, bindet CHD1 nicht mehr (siehe Abbildung 4.18 roter Pfeil). Anhand der beiden benachbarten Argininreste H3R49 und H3R53 konnte ausgeschlossen werden, dass die Inhibierung der CHD1-Bindung generell nur durch einen Arginin-Citrullin-Austausch hervorgerufen wird.

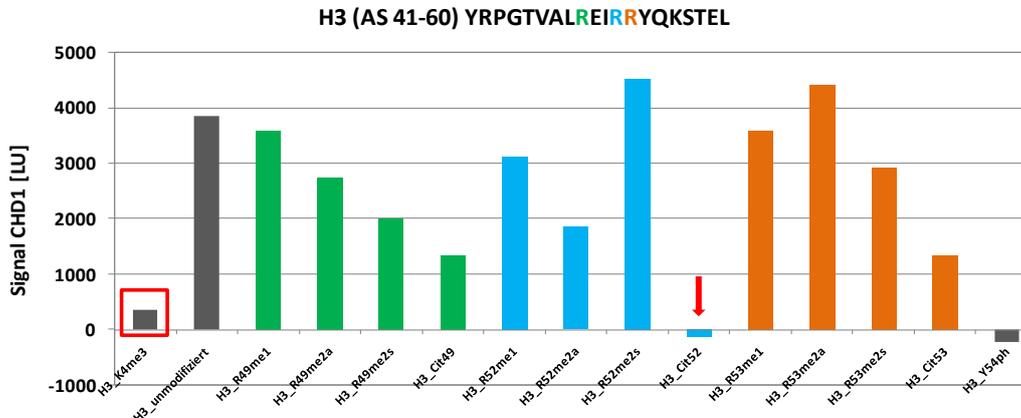


Abbildung 4.18: Bindungsspezifität von CHD1 für das Peptid H3 (AS 41-60). Die Signale der CHD1-Bindung sind dargestellt für die Peptide mit unterschiedlichen Arginin-Methylierungsgraden, sowie erfolgtem Arginin-Citrullin-Austausch an den Argininen H3R49, H3R52 und H3R53. Der rote Kasten hebt das Referenzsignal H3K4me3 hervor. Der rote Pfeil verweist auf die Inhibierung der Bindung von CHD1 durch Citrullin anstelle von H3R52.

Mittels des Histonmikroarrays konnte auch am Histon H4 eine neue Bindungsstelle identifiziert werden. Die generell starke Bindung an das unmodifizierte Histon H4-Peptid (Aminosäuresequenz 31-50) weist eine 10-fach stärkere Bindung als an der H3K4me3-Modifizierungsstelle auf (Abbildung 4.19). Auch dieses Peptid weist erneut das Bindungsmotiv RxxRR und ein zusätzliches KR-Motiv auf. Dabei konnte H4R45 als Schlüsselstelle identifiziert werden. Das H4R45 sollte methyliert sein, da ansonsten keine Bindung detektiert werden kann (siehe Abbildung 4.19 roter Pfeil).

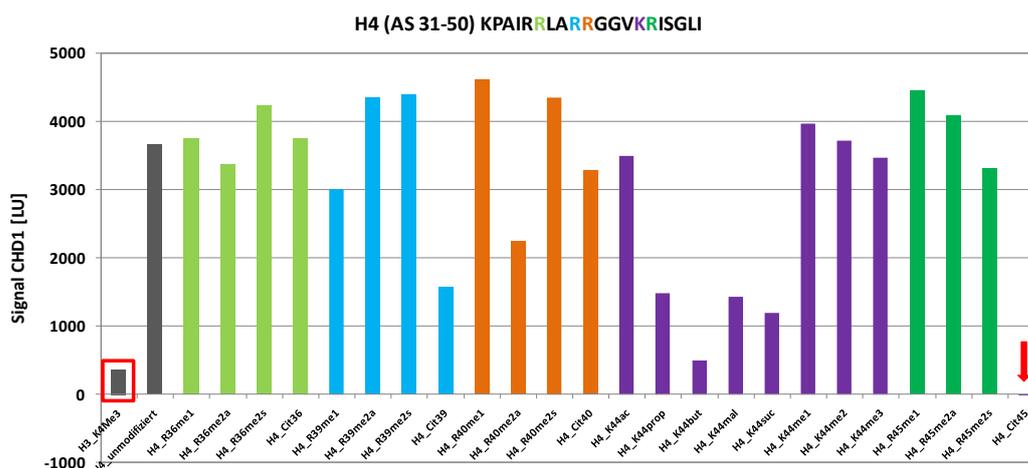


Abbildung 4.19: Bindungsspezifität von CHD1 für das Peptid H4 (AS 31-50). Die Signale der CHD1-Bindung sind dargestellt für die Peptide mit unterschiedlichen Arginin-Methylierungsgraden, sowie erfolgtem Arginin-Citrullin-Austausch an den Argininen H4R36, H4R39, H4R40 und H4R45. Zusätzlich wurde für H4K44 die Bindungsspezifität von CHD1 für verschiedenen Methylierungen oder Acylierungen gezeigt. Der rote Kasten markiert das Referenzsignal H3K4me3. Der rote Pfeil verweist auf die Inhibierung der Bindung von CHD1 durch Citrullin anstelle H4R45.

Ingesamt kann festgestellt werden, dass die in der Literatur beschriebene H3K4me3-Bindungsstelle bestätigt werden konnte.³⁸³ Darüber hinaus konnten durch den Histonmikroarray allerdings noch drei bessere Binder (H2A_R34_R37, H3R52, H4R45) identifiziert werden. Dabei weist CHD1 eine Modifikationsspezifität für methylierte Lysine und Arginine auf, die durch *cross-talk* mit benachbarten Modifikationen beeinflusst werden. Allerdings ist hier auch eine gewisse Flexibilität für andere Modifikationen gegeben, sofern diese nicht die wichtigen Schlüsselstellen des Bindungsmotivs betreffen. So konnte für CHD1 eine Sequenzspezifität mit einem R-x-x-R-K/R-Bindungsmotiv innerhalb der Histone H2A, H3 und H4 nachgewiesen werden.

In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Schüle und Prof. Jung (beide von der Universität Freiburg i.Br.) wurden von den obigen Vorschlägen vier Peptide (H2A (AS 33-52) K38me2, H3 (AS 41-60) R52me2a, H4 (AS 31-50) K44me2 und H4 (AS 31-50) R39me2a) synthetisiert, die in Lösungsexperimenten validiert werden.

4.2.3 Untersuchung der Bindungsspezifitäten der Tudor-ähnlichen Domäne Spindlin1

Die Erkennung von methylierten Lysinresten durch die Tudor-ähnliche Domäne Spindlin 1 wurde unter Nutzung des Histonmikroarrays untersucht. Dazu wurde zum einen GST-fusioniertes Spindlin1 untersucht, welches durch einen anti-GST-Antikörper gebunden wurde. Die Signale dieses Experimentes werden nachfolgend als GST-SPIN1 bezeichnet. Die kompletten Daten zu diesem Experiment sind in dem elektronischen Anhang E2 enthalten. Zum anderen wurde auf einem weiteren Histonmikroarray das fusionsfreie Spindlin1 untersucht, welches durch einen anti-SPIN1-Antikörper gebunden wurde. Die Signale dieses Experimentes werden nachfolgend als SPIN1 bezeichnet. Beide Untersuchungen zeigten spezifische Spindlin1-bindende Peptide. Die Binder weisen sowohl im SPIN1-

Experiment als auch im GST-SPIN1-Experiment hohe Signale auf und zeigten in der GST-Kontrollinkubation keine Signale.

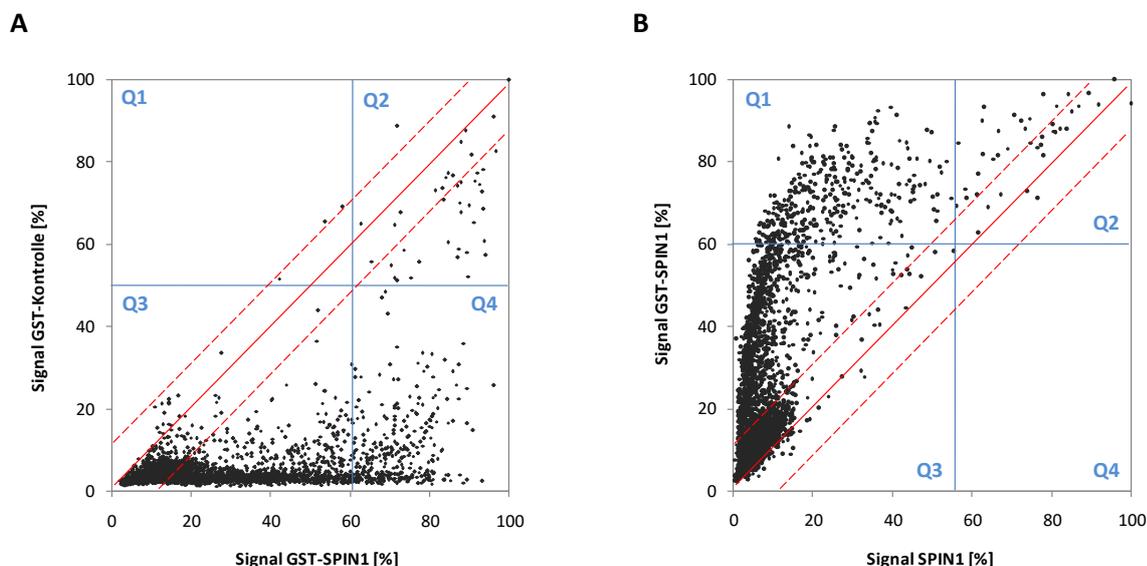


Abbildung 4.20: Streudiagramme aller Signale der Spindlin1-Experimente. **A** Streudiagramm aller Signale von GST-SPIN1 gegen die GST-Kontrolle. **B** Streudiagramm aller Signale von SPIN1 gegen alle Signale von GST-SPIN1. Alle Signale innerhalb eines Experimentes wurden auf das jeweils stärkste Signal normiert (100%). Die blauen Linien markieren die Akzeptanzgrenzen oberhalb derer die Peptide als Binder definiert wurden (56 % für SPIN1, 61 % für GST-SPIN1 und 49 % für GST-Kontrolle). Zur besseren Orientierung wurden in jedes Streudiagramm eine 45°-Gerade (rote Linie) und ein entsprechender Toleranzbereich (rot-gestrichelte Linien) eingetragen. Innerhalb dieses rot-markierten Bereichs ist bei der Auftragung zwei unterschiedlicher Datensätze keine klare Aussage über die Peptide möglich. Werden hingegen zwei ähnliche Datensätze aufgetragen, sind die Gemeinsamkeiten innerhalb des rot-markierten Bereiches zu finden.

Die Streudiagramme zeigen, dass auch im GST-Kontrollexperiment Signale durch unspezifische Antikörperbindung detektiert wurden (Abbildung 4.20 A, Quadrant Q2). Diese Signale wurden in der Analyse zur Identifizierung von Bindern ausgeschlossen, da diese keine eindeutige Aussage über die Peptide als Spindlin1-spezifische Binder zulassen.

Basierend auf den Streudiagrammen und der Analyse der Signale konnten 40 Binder identifiziert werden. Hierbei wurde die Grenze so gesetzt, dass die Signale im GST-SPIN1-Experiment oberhalb von 61 % und im SPIN1-Experiment oberhalb von 56 % liegen mussten (Abbildung 4.20 B, Quadrant Q2). Wird zusätzlich das Ausschlusskriterium der GST-Kontrolle hinzugefügt (Signale in der GST-Kontrolle < 49 %), verbleiben acht Spindlin1-spezifische Binder (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Übersicht der 8 Binder von Spindlin1.

Spindlin1-Binder	Name	Peptidsequenz
1	H2A (AS 31-50) K36me3	Ac-HRLLRK(me3)GNYAERVGAGAPVY-NH ₂
2	H2A (AS 31-50) K36me3	Ac-HRLLRK(me3)GNYSERVGAGAPVY-NH ₂
3	H2B (AS 31-50) K43me3	Ac-RSRKESYSVYVYK(me3)VLKQVHP-NH ₂
4	H3 (AS 40-59)	Ac-YRPGTVALREIRRYQKSTEL-NH ₂
5	H3 (AS 40-59) R48me1	Ac-YRPGTVALR(me1)EIRRYQKSTEL-NH ₂
6	H3 (AS 40-59) R48me2a	Ac-YRPGTVALR(me2a)EIRRYQKSTEL-NH ₂
7	H3 (AS 50-69) K63me1	Ac-IRRYQKSTELLIRK(me1)LPFQRL-NH ₂
8	H3 (AS 50-69) K63me3	Ac-IRRYQKSTELLIRK(me3)LPFQRL-NH ₂

Zwei der acht Spindlin1-spezifischen Binder entstammen aus dem Histon H2A (AS 31-50) mit trimethyliertem H2AK36. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Peptiden ist, dass es zwei Varianten des Histons H2A, mit einem Ala-Ser-Austausch an der 40. Position, darstellt.

Deshalb sollte für diese beiden Binder nochmal die Histonvariantenspezifität von SPIN1 am Beispiel der H2A-Peptide untersucht werden. Es gibt für dieses H2A-Peptid drei Histonvarianten. An der 40. Position des Histons H2A ist entweder ein Alanin (GNYA-Variante) oder ein Serin (GNYS-Variante) vertreten. Bei der 3. Histonvariante ist an der 38. Aminosäureposition ein Asparagin gegen ein Histidin ausgetauscht (GHYA-Variante). Die Histonvariantenspezifität von SPIN1 ist in der Abbildung 4.21 dargestellt. Es wird ersichtlich, dass hier die Bindung an die GHYA-Variante geringer als bei den anderen beiden Histonvarianten ist. Auch zeigt sich eine Präferenz für die trimethylierten Lysine.

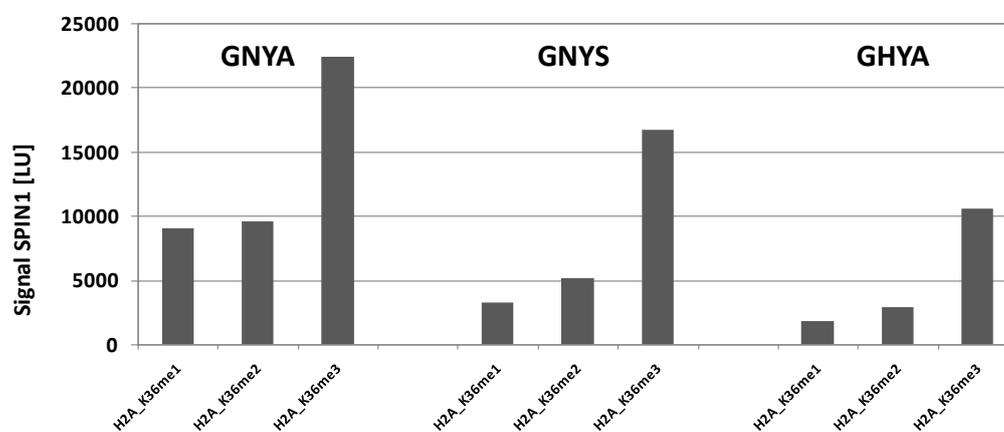


Abbildung 4.21: Histonvariantenspezifität von SPIN1. Das Diagramm stellt die Signale der SPIN1-Bindung an 3 Peptidvarianten für das Histon H2A (AS 31-50) mit den drei Lysinmethylierungsgraden dar.

Zusätzlich wurde noch eine alternative Auswertung der Daten vorgenommen, die die Signal-Rausch-Verhältnisse der Peptide als Grundlage nutzte. Hier sollte aufgrund des erhöhten Hintergrundes durch unspezifische Bindung des Proteins an die Mikroarrayoberfläche die obigen Binder verifiziert werden. Dazu wurden die Signale der Experimente ins Verhältnis zu dem mittleren Hintergrundsignal des Histonmikroarrays (Rauschen) gesetzt, so dass sich ein Signal-Rausch-Verhältnis für jedes einzelne immobilisierte Peptid errechnen lässt. Als Grenze für die Akzeptanz zu einem guten Signal wurde hier ein Signal-Rausch-Verhältnis von größer als 20 gesetzt. Weist das Signal-Rausch-Verhältnis für das GST-SPIN1- und das SPIN1-Experiment einen Wert größer als 20 und für das entsprechende Peptid im GST-Kontrollexperiment ein Signal-Rausch-Verhältnis kleiner als 20 auf, ergeben sich 11 Spindlin1-spezifische Binder (Tabelle 4.2). In diesen 11 Peptiden sind bereits fünf der acht obigen Spindlin1-Binder enthalten.

Tabelle 4.2: Übersicht der Spindlin1-spezifischen Binder auf Basis der Signal-Rausch-Verhältnisse. Es wurden auch fünf gemeinsame Binder identifiziert (siehe Tabelle 4.1).

Spindlin1-Binder (SNR)	Name	Peptidsequenz	gemeinsame Binder
1	H2A (AS 31-50) K36me3	Ac-HRLLRK(me3)GNYSERVGAGAPVY-NH ₂	x
2	H2B (AS 31-50) K43me3	Ac-RSRKESYSVYVYK(me3)VLKQVHP-NH ₂	x
3	H3 (AS 40-59) R48me1	Ac-YRPGTVALR(me1)EIRRYQKSTEL-NH ₂	x
4	H3 (AS 40-59) R48me2a	Ac-YRPGTVALR(me2a)EIRRYQKSTEL-NH ₂	x
5	H3 (AS 40-59) R48me2s	Ac-YRPGTVALR(me2s)EIRRYQKSTEL-NH ₂	
6	H3 (AS 40-59) R51me2s	Ac-YRPGTVALREIR(me2s)RYQKSTEL-NH ₂	
7	H3 (AS 40-59) R52me1	Ac-YRPGTVALREIRR(me1)YQKSTEL-NH ₂	
8	H3 (AS 40-59) R52me2a	Ac-YRPGTVALREIRR(me2a)YQKSTEL-NH ₂	
9	H3 (AS 40-59) R52me2s	Ac-YRPGTVALREIRR(me2s)YQKSTEL-NH ₂	
10	H3 (AS 50-69) K63me3	Ac-IRRYQKSTELLIRK(me3)LPFQRL-NH ₂	x
11	H4 (AS 81-100) K91but	Ac-VTAMDVVYALK(but)RQGRTLYGF-NH ₂	

Aus der Analyse der Mikroarraydaten lassen sich zwei Peptidbereiche (H4 AS 81-100 bzw. AS 83-102 und H3 AS 41-60 bzw. AS 51-70) identifizieren, bei denen die Signale weitgehend unabhängig von der Modifikation der Seitenketten sind. In diesen Fällen zeigen sich auch mit den unmodifizierten Peptiden starke Signale. Bis jetzt ist noch nicht bekannt, wo diese Peptide mit Spindlin1 interagieren, es könnte möglicherweise eine ganz andere Region als die Bindetasche für trimethylierte Lysinseitenketten sein.

Zusammenfassend kann hier eine Methylspezifität von Spindlin1 festgestellt werden, da die meisten Signale durch Bindung der Spindlin1-Domäne an Histon H3-Peptide mit methylierten Lysin- oder Argininresten hervorgerufen wurden.

Da Spindlin1 als spezifische *Reader*domäne für die Methylierungsstellen H3K4me3 und H3R8me2a beschrieben ist, sollte diese *N*-terminale Histon H3-Region detaillierter betrachtet werden (Abbildung 4.22). Die H3K4me3-Modifizierungsstelle weist ein Signal von etwa 50% der oben beschriebenen SPIN1-spezifischen Binder auf. Dies ist besonders in der Inkubation mit SPIN1 zu sehen, in dem das Signal für den stärksten Binder von 22500 LU auf 11000 LU abgefallen ist.

Bei der Betrachtung der Einzel-PTMs in Abbildung 4.22A wird ersichtlich, dass die Bindungsaffinität von SPIN1 für den trimethylierten H3K4-Binder über die di- und monomethylierten H3K4-Peptide bis hin zum unmodifizierten H3-Peptid abnehmen. Dies bestätigt die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Prof. R. Schüle. Die Phosphorylierung des Threonins H3T3 in der -1-Position von H3K4 verringert die Bindung an die methylierten H3K4-Peptide nicht nur für das trimethylierte, sondern auch für die di- und monomethylierten H3K4-Peptide. Das Signal fällt hier bei dem mono- und dimethylierten Peptid auf das Niveau des unmodifizierten Peptids herab. Eine Verstärkung der Bindung wird durch zusätzliche methylierte Arginin- oder Lysinreste in der näheren Umgebung der H3K4-Modifizierungsstelle erreicht. Besonders deutlich wird dies für die Kombination von R8me2a und K9me3 zu den H3K4me1/2/3-Modifizierungen. Ist in der Kombination anstelle des asymmetrisch dimethylierten H3R8 ein symmetrisch dimethyliertes Arginin enthalten, hat das auf das trimethylierte K4-Signal kei-

nen Einfluss und nur eine leicht verstärkende Wirkung für die mono- oder dimethylierte H3K4-Peptidmodifikation. Auf der rechten Seite der Abbildung 4.22 B sind weitere Signale dargestellt bei denen die umgebenden Modifikationen einen Einfluss auf eine verstärkte Bindung der *Readerdomäne* an das Peptid hatten.

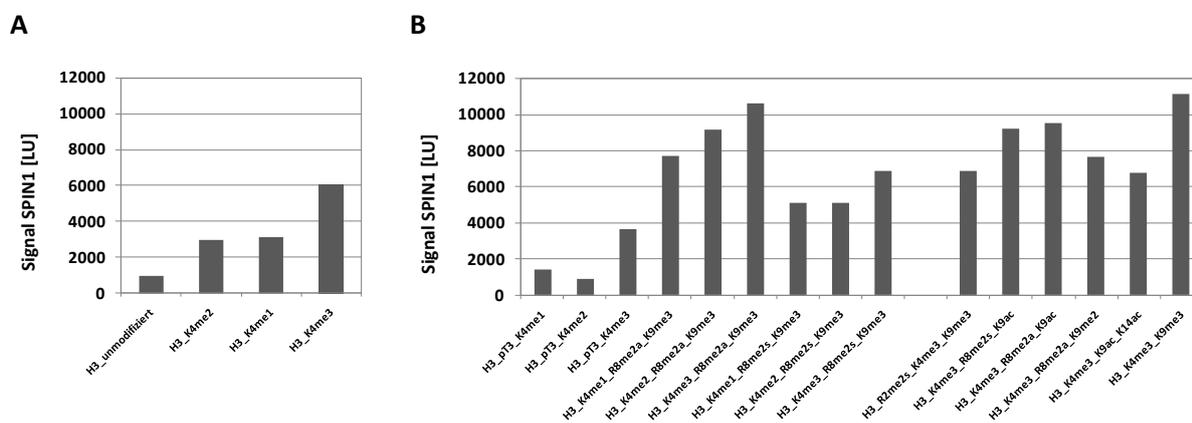


Abbildung 4.22: Bindungsspezifität von Spindlin1 für die H3K4me-Modifizierungsstelle. Die Diagramme zeigen die Signale von SPIN1 für das unmodifizierte H3-Peptid, die drei Einzel-methylierten H3K4-Peptide (**A**), sowie verschiedene multiple PTMs (**B**) innerhalb der den N-Terminus des Histons H3-darstellenden Peptide (H3 AS 1-20).

Ein Ziel der Untersuchung von Spindlin1 auf Histonmikroarrays war die Identifizierung neuer Binder. Dazu wurden im Anschluss an die Histonmikroarrayexperimente drei Peptide ausgewählt und synthetisiert. Das erste ausgewählte Peptid war H3K9me3. Bei dem H3K9me3-Peptid handelt es sich um eine alternative Modifizierungsstelle, die in dem Histonmikroarrayexperiment ebenfalls nur mit dem trimethyliertem Lysin gute Bindung gezeigt und ein 31-fach höheres Signal für GST-SPIN1 ergeben hat. Zusätzlich wurde an dieser H3K9-Modifikationsstelle auch mit einem acetylierten Lysinrest eine gute Bindung detektiert (28-fach höheres Signal für GST-SPIN1), so dass auch dieses Peptid synthetisiert wurde. Als drittes Peptid wurde das H4K91ac synthetisiert (30-fach höheres Signal für GST-SPIN1). Die Peptide können nun weiter mittels *Docking* und Isothermaler Titrationskalorimetrie charakterisiert werden.

Darüber hinaus wurde diese *Readerdomäne* ausgewählt, um einen Oberflächenvergleich von den Histonmikroarrays durchzuführen. Aufgrund von unspezifischer Bindung von Proteinen an die Mikroarrayoberflächen können hohe Hintergrundsignale verursacht werden. Dies kann jedoch erheblich das Signal-Rausch-Verhältnis eines Peptidmikroarrayexperimentes verringern. Für den Oberflächenvergleich wurden drei verschiedene Trägeroberflächen ausgewählt. Einerseits zwei verschiedene Oberflächen des Herstellers PolyAn in Berlin (PolyAn_2D- und PolyAn_3D-Oberfläche) und andererseits die Oberfläche des Herstellers Scienion (Berlin). Diese drei Oberflächen mit den darauf immobilisierten Histonpeptiden wurden mit SPIN1 inkubiert (Abbildung 4.23).

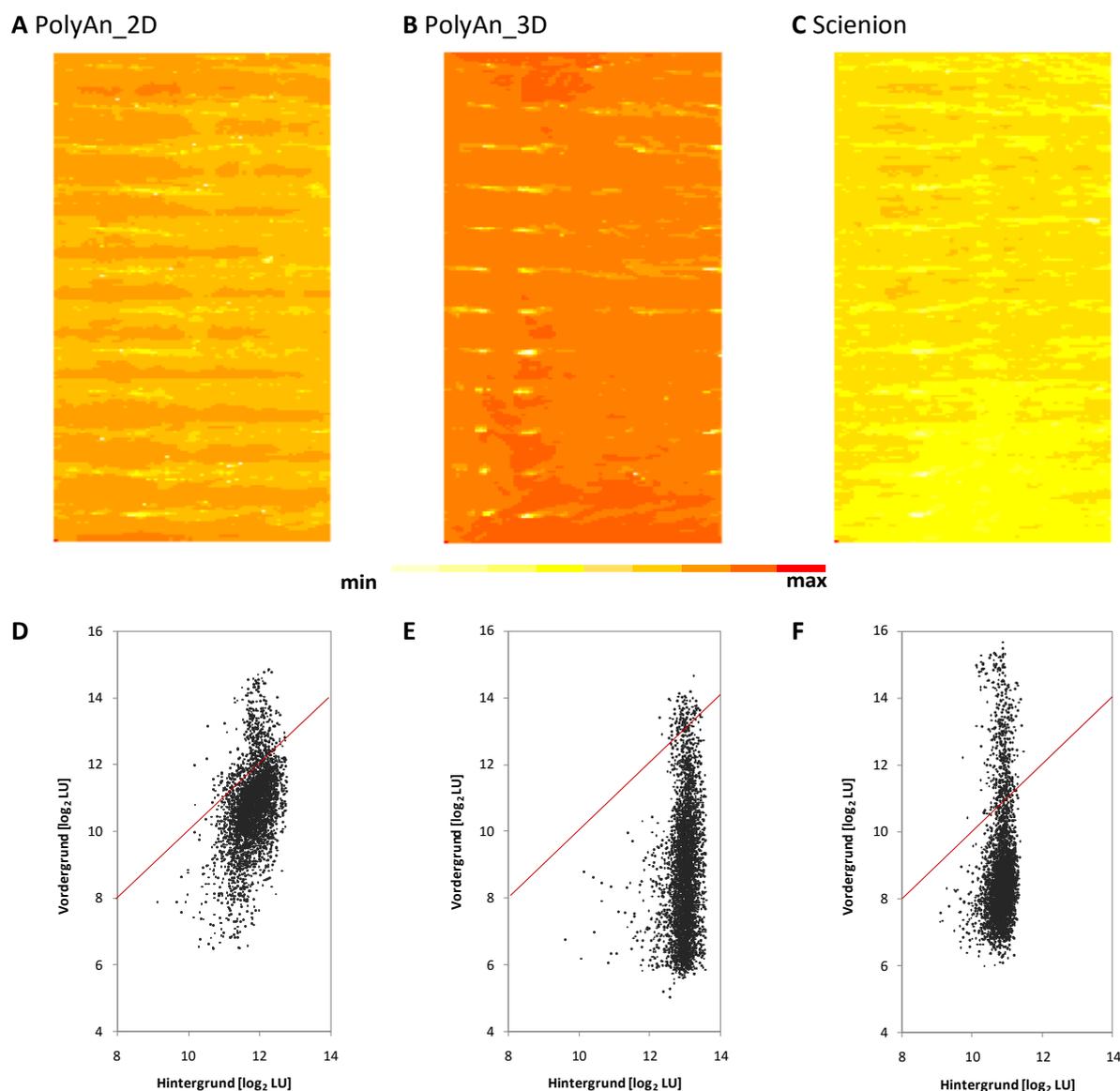


Abbildung 4.23: Oberflächenvergleich von Histonmikroarrays mit SPIN1. **A-C** Eine Visualisierung der Hintergrundsignale ist in den *heatmaps* für die Mikroarrayoberflächen PolyAn_2D (**A**), PolyAn_3D (**B**) und Scienion (**C**) gezeigt. Aus den Abbildungen wird die räumliche Heterogenität des Hintergrundes ersichtlich (niedriges Hintergrundrauschen ist durch Gelbfärbung, hohe Hintergrundsignale sind durch Rottöne indiziert). **D-F** Die Streudiagramme stellen den Signalintensitäten des Hintergrundes die Signalintensitäten innerhalb des Spots (Vordergrund) für die Mikroarrayoberflächen PolyAn_2D (**D**), PolyAn_3D (**E**) und Scienion (**F**) gegenüber. Die rote Gerade gibt eine Orientierung, wenn die Signale des Hintergrundes denen des Vordergrundes entsprechen.

Aus den *heatmaps* werden für alle drei untersuchten Mikroarrayoberflächen heterogene Hintergrundsignale ersichtlich (Abbildung 4.23 A-C). Ein gemittelter globaler Hintergrund zur Korrektur der (Vordergrund-)Signale ist bei Fluoreszenzmessungen daher nicht geeignet. Die Software zur Auswertung der Fluoreszenzbilder erlaubt hier jedoch die räumliche Variation des Hintergrundes zu berücksichtigen, indem der lokale Hintergrund berechnet wird. Der lokale Hintergrund wird definiert als die den Spot direkt umgebende Fläche und richtet sich nach dem Spottedurchmesser (Abbildung 4.24 A, B). In einigen Fällen kann das Hintergrundsignal, durch unspezifische Bindung des Zielproteins an die Mikroarrayoberfläche, höher als das Signal des Vordergrundes sein (Abbildung 4.24 C, grüner Pfeil).

Ein direkter Vergleich der Signale des Hintergrundes mit denen des Vordergrundes ist mittels der Streudiagramme (Abbildung 4.23 D-F) möglich. Dabei ist bei allen drei getesteten Mikroarrayoberflächen zwar das Rauschen oberhalb von 2^{10} LU, allerdings innerhalb eines relativ kleinen dynamischen Bereichs (Rauschen variiert maximal um den Faktor 4). Dagegen ist der Bereich des Signals wesentlich größer (Signale variieren zwischen 2^6 und 2^{16}). Das Signal wird also durch das Rauschen nicht beeinflusst.

Die PolyAn_2D- und die Scienion-Oberfläche zeigen gegenüber der PolyAn_3D-Oberfläche geringeres Rauschen. Da hierüber hinaus die PolyAn_2D-Oberfläche eine höhere Reproduzierbarkeit innerhalb der verschiedenen Produktchargen besitzt (Daten nicht gezeigt), wurden in dieser Arbeit die PolyAn_2D-Oberflächen verwendet.

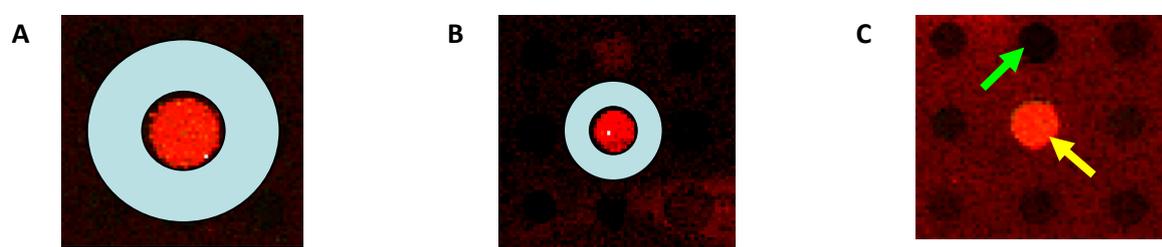


Abbildung 4.24: Bestimmung des lokalen Hintergrundsignals (blauer Kreis) entsprechend des Spotdurchmessers (roter Spot). Der Durchmesser des Hintergrundes wurde als das 3-fache des Spotdurchmessers definiert. Somit variiert die Fläche des Hintergrundes für große Spots (A) oder kleine Spots (B), wobei die Fläche innerhalb des Spots ausgespart ist und nicht mit in die Berechnung des Hintergrundsignals eingeht. C Die Signale des Hintergrundes sind entweder höher (grüner Pfeil) oder niedriger (gelber Pfeil) als das Signal innerhalb des Spots. Innerhalb des Spots sind die Oberflächeneigenschaften durch die immobilisierten Peptide verändert, so dass unspezifische Bindung reduziert wird.

4.3 Substratspezifitäten von *writern*

4.3.1 Untersuchung der Substratspezifitäten der Acetyltransferasen p300, GCN5, PCAF und Tip60

Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Lysinacetyltransferasen (KATs) auf den Acetylmikroarrays hatte das Ziel Substrate für die einzelnen KATs zu identifizieren. Dazu wurde der Peptidmikroarrays mit einer Acetyltransferase inkubiert, die die chemische Gruppe von dem Co-Substrat Acetyl-CoenzymA auf das Peptidsubstrat überträgt (Abbildung 4.25). Die Detektion erfolgt mittels modifikationsspezifischer anti-Kac-Antikörper, an die die fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper binden.

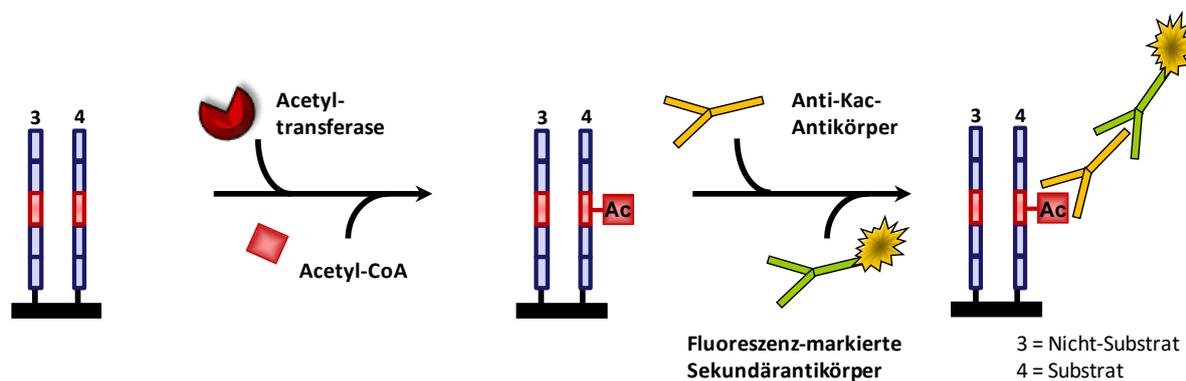


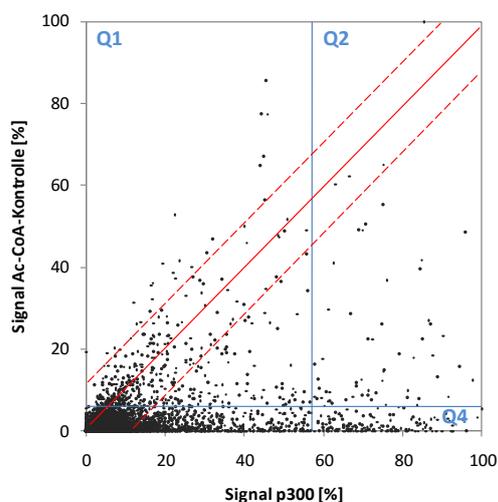
Abbildung 4.25: Assay-Prinzip mittels Fluoreszenz-Detektion zur Untersuchung von Acetyltransferasen. Der Peptidmikroarray wird zuerst mit dem modifikationsübertragenden Enzym und dem Co-Substrat inkubiert. Die so transferierte Modifikation wird mittels der anti-Kac-Antikörper, gefolgt von fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern detektiert.

In den in Abbildung 4.26 gezeigten Streudiagrammen wurden die Signale der Acetyltransferase gegen die Signale der Ac-CoA-Kontrolle aufgetragen. Bei dieser Auswertung wurden jedoch nur die Signale der auf dem Mikroarray immobilisierten Peptide mit freiem Lysin dargestellt, da bei den acetylierten Lysinpeptiden sonst keine Aussage über die Acetylierung durch die KATs möglich ist. Hier könnten neben den bereits enthaltenen zentralen acetylierten Lysinresten noch weitere Lysine innerhalb der präsentierten Peptidsequenzen acetyliert werden.

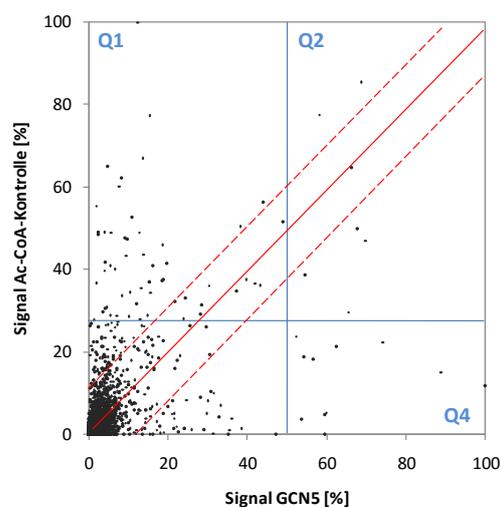
Bei den Streudiagrammen fällt auf, dass die meisten Peptide nur geringe Signale aufweisen. Sie wurden also nicht acetyliert. Aus den Streudiagrammen A und B der Abbildung 4.26 wird ersichtlich, dass p300 und GCN5 eine höhere Anzahl immobilisierter Peptide acetyliert haben. GCN5 weist Substrate auf, die über 4-fach besser erkannt werden (Signal von GCN5 > 51 %, Ac-CoA-Kontrollsignal < 28 %, Abbildung 4.26 B Quadrant Q4). Die Signale im Quadrant Q1 in Abbildung 4.26 B zeigen einige erhöhte Signale durch unspezifische Bindung an die Mikroarrayoberfläche (Rauschen). PCAF und Tip60 zeigen für einige Substrate stärkere Signale als im Ac-CoA-Kontrollexperiment (Abbildung 4.26 C und D, jeweils Quadranten Q4 und Q2 (unterhalb der rot-gestrichelten Linie)), wenn auch die Unterschiede zwischen den Signalen zwischen den beiden Experimenten insgesamt nicht so deutlich sind.

Auffällig bei p300 ist, dass viele Peptide ein Signal > 57 % aufweisen (Abbildung 4.26 A). Diese Peptide zeigen im Ac-CoA-Kontrollexperiment keine Signale (Ac-CoA-Signal < 6 %, Abbildung 4.26 A Quadrant Q4) und sind deshalb putative Substrate von p300. Allerdings wurden hier auch im Ac-CoA-Kontrollexperiment einige Signale identifiziert, die im p300-Experiment keine oder nur sehr geringe Signale aufwiesen (Abbildung 4.26 A Quadrant Q1).

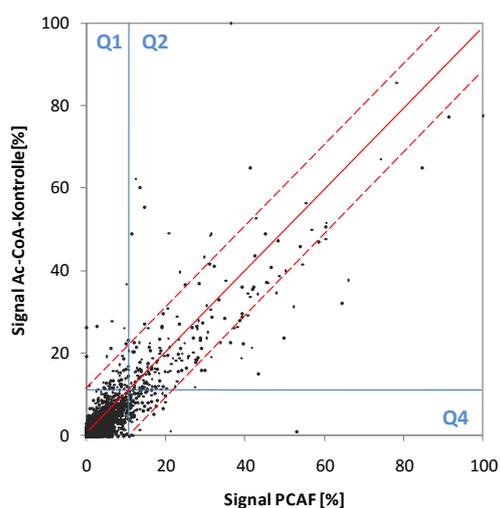
A p300



B GCN5



C PCAF



D Tip60

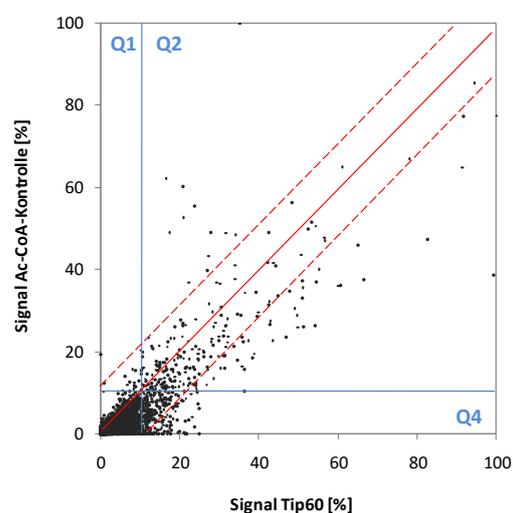
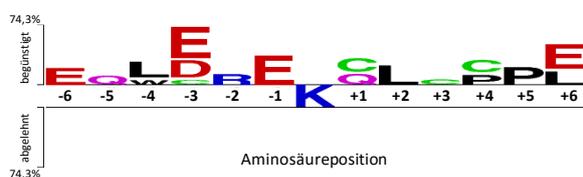


Abbildung 4.26: Streudiagramme der Signale der Acetyltransferasen auf Acetylom-Mikroarrays. Jeder Punkt repräsentiert ein Peptid mit seinem entsprechenden Signal. Es wurden jeweils die Signale der Acetyltransferasen p300 (A), GCN5 (B), PCAF (C) und Tip60 (D) gegen die Signale der Ac-CoA-Kontrolle aufgetragen. Alle Signale innerhalb eines Peptidmikroarrays wurden auf das jeweils stärkste Signal normiert (100%). Die blauen Linien markieren die Akzeptanzgrenzen oberhalb derer die Peptide als Substrate definiert werden. Zur besseren Orientierung wurden in jedes Streudiagramm eine 45°-Gerade (rote Linie) und ein entsprechender Toleranzbereich (rot-gestrichelte Linien) eingetragen. Innerhalb dieses rot-markierten Bereichs ist keine Aussage über die Peptide als putative Substrate möglich, da sie in beiden Experimenten ähnliche Signale gezeigt haben.

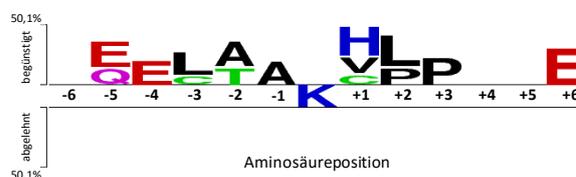
Aus den Daten wurde anschließend das Verhältnis der Signale der Acetyltransferase zur Ac-CoA-Kontrolle errechnet. Die Grenze für die Akzeptanz als Substrat wurde bei einem Verhältnis > 20 gezogen. Aus den Substraten wurden die 10 besten ausgewählt, um daraus ein *Two-sample-Logo* zu erstellen. Dabei wurden die Peptide, die mehr Lysine als dem zentralen Lysin enthielten aus der Berechnung ausgeschlossen. Ansonsten kann hier keine klare Aussage getroffen werden, welches oder

wie viele der im Peptid enthaltenen Lysine acetyliert wurde. Die *Two-sample*-Logos für die untersuchten Acetyltransferasen sind in Abbildung 4.27 dargestellt.

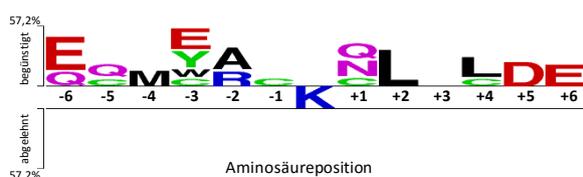
A p300



B GCN5



C PCAF



D Tip60

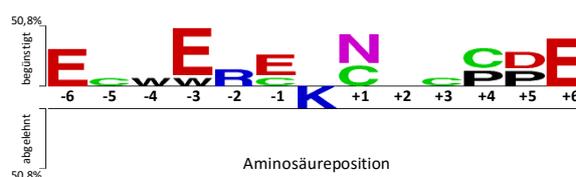


Abbildung 4.27: *Two-sample*-Logos der Acetyltransferasen p300 (A), GCN5 (B), PCAF (C) und Tip60 (D). Zur Erstellung der *Two-sample*-Logos wurden aus den Substraten die besten 10 der jeweiligen KATs ins Verhältnis gesetzt zu allen auf dem Acetylom-Mikroarray präsentierten Peptide, die nur ein einzelnes Lysin enthielten.

Aus den verschiedenen *Two-sample*-Logos ist eine Bevorzugung für saure Aminosäuren in vielen Positionen (-6, -5, -4, -3, -1, +5, +6) zu erkennen. Diese zeigten dabei teilweise eine Präferenz von über 40%. Das bedeutet, dass in den 10 besten Substraten an dieser Position eine saure Aminosäure 40%-mal häufiger vorkommt als in allen auf dem Mikroarray immobilisierten Peptiden. In der -2-Position wird von drei der vier KATs ein basisches Arginin bevorzugt und von denselben KATs wird in der +1-Position zum acetylierten Lysin ein Asparagin oder Glutamin bevorzugt. In den C-terminalen Positionen (+2- bis +5-Position) vom Lysin bevorzugen die hier getesteten KATs eine ungeladene, kleine hydrophobe Aminosäure, wie beispielsweise Prolin oder Leucin.

4.3.2 Untersuchung der Substratspezifitäten der ADP-Ribosyltransferasen ARTD1 und ARTD10

Auch die ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die mittels der Peptidmikroarrays gemessen wurde. Die Transferierung der chemischen Gruppe des Co-Substrates etheno-NAD⁺ (ϵ NAD⁺) durch humane ARTD auf das Peptidsubstrat wurde über anti- ϵ NAD⁺-Antikörpern, gefolgt von fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern detektiert (Abbildung 4.28). Es sollten damit die Sequenzspezifitäten der ADP-Ribosyltransferasen charakterisiert werden.

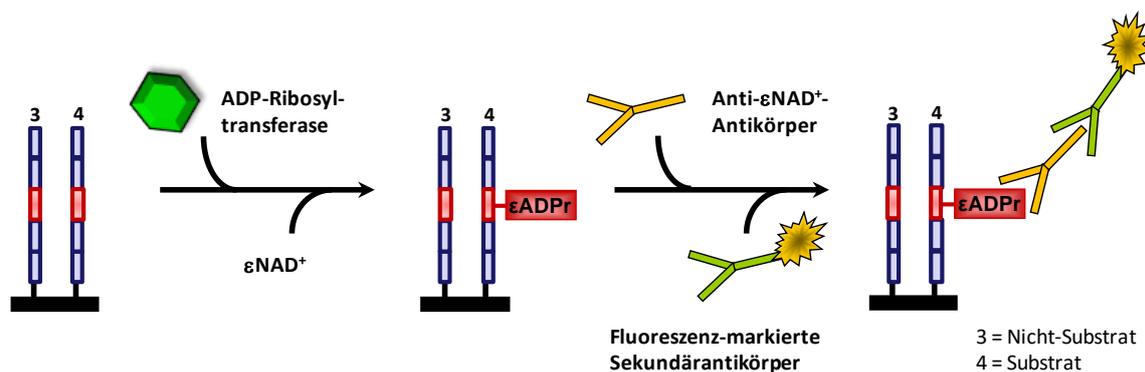
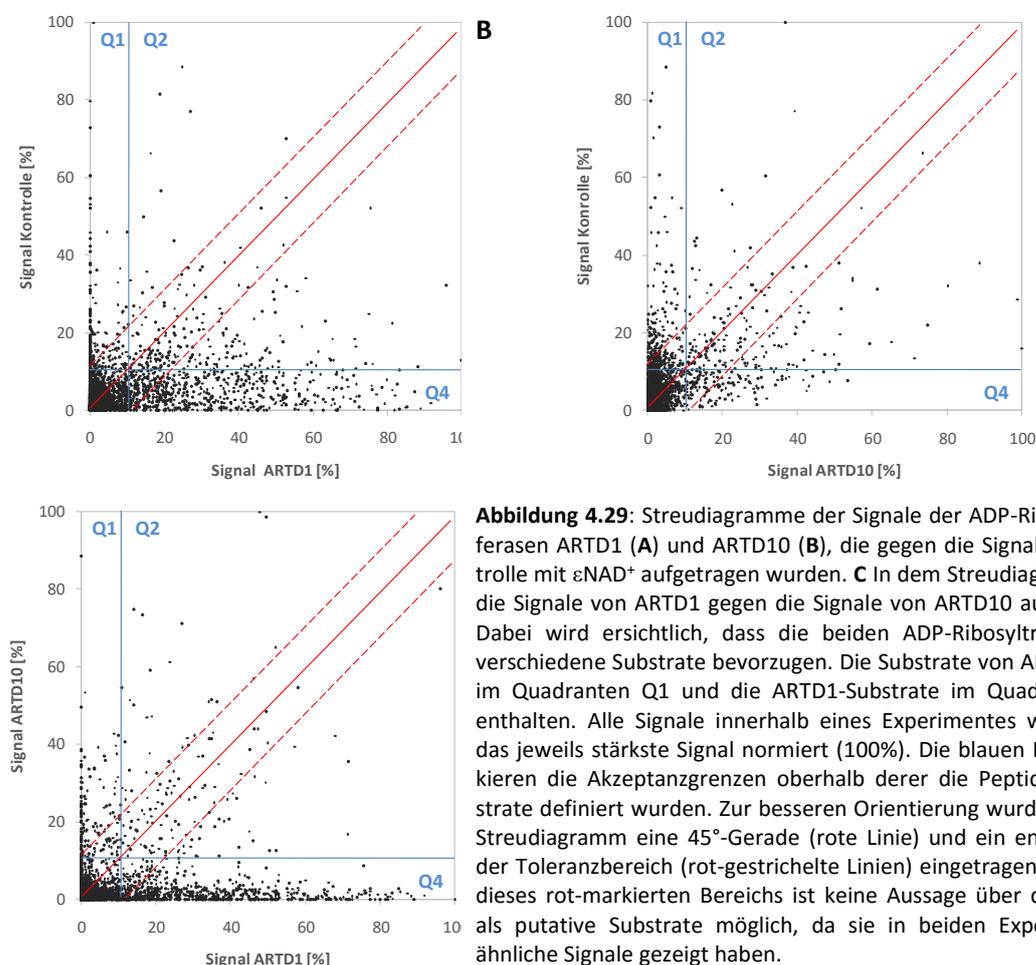


Abbildung 4.28: Assay-Prinzip zur Untersuchung der ADP-Ribosyltransferasen. Der Peptidmikroarray wird mit dem Enzym und dem Co-Substrat etheno-NAD⁺ (ϵ NAD⁺) inkubiert. Die ϵ ADP-ribosylierte (ϵ ADPr) Aminosäure wird mittels anti- ϵ NAD⁺-Antikörpern, gefolgt von fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern detektiert.

Die Signale der jeweiligen ADP-Ribosyltransferase wurden in den Streudiagrammen in Abbildung 4.29 A und B jeweils den Signalen der etheno-NAD⁺-Kontrolle gegenübergestellt. Es ist für beide ARTDs eine Signalzunahme zu erkennen. Dabei verteilen sich die Signale für die Poly-ADP-Ribosyltransferase ARTD1 entlang der Abszisse (Abbildung 4.29 C). Dagegen zeigt die Mono-ADP-Ribosyltransferase ARTD10 eine größere Streuung der Signale, indem der Großteil der Signale unterhalb von 40% und nur ein paar wenige Signale in dem Bereich oberhalb von 40% liegen.



Aus den gewonnenen Daten des Acetylom-Mikroarrays wurde das Verhältnis der Signale von ARTD1 zu den entsprechenden Signalen des Kontrolllexperiments bestimmt. Die in den 200 besten Substraten enthaltenen Aminosäuren wurden ins Verhältnis aller auf den Acetylom-Mikroarray präsentierten Peptiden gesetzt. Damit lässt sich die Aminosäureverteilung und favorisierte Aminosäuremuster anhand der *Two-sample-Logos* errechnen (Abbildung 4.30).

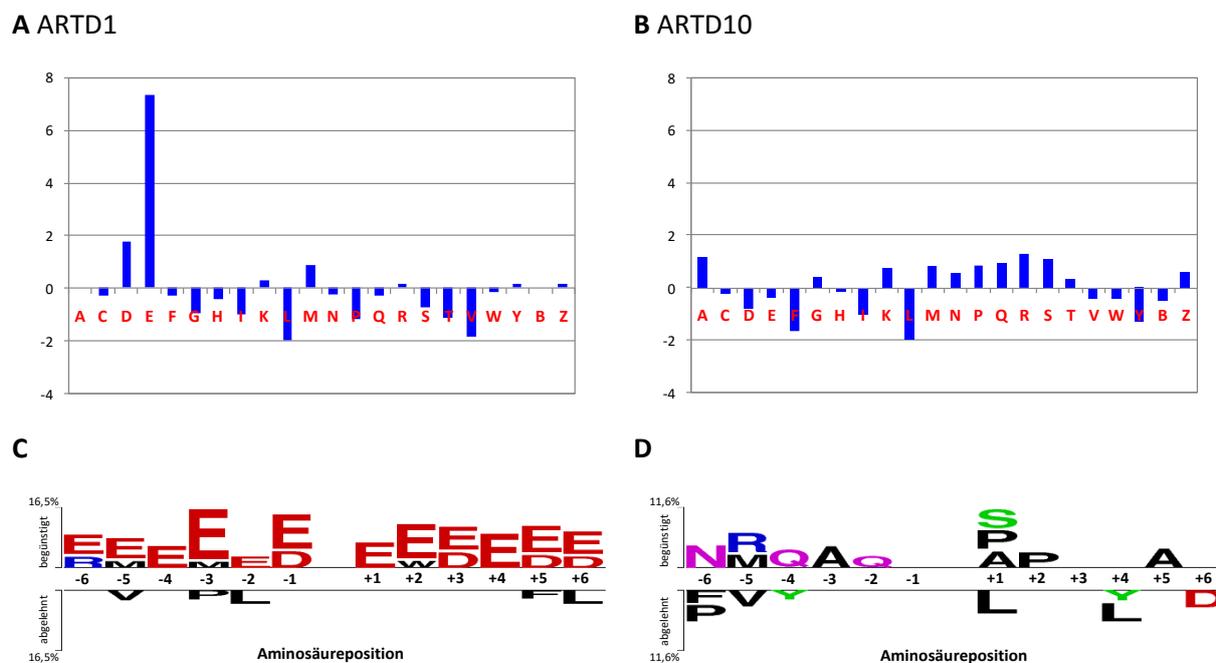


Abbildung 4.30: Aminosäureverteilung und *Two-sample-Logos* der ADP-Ribosyltransferasen ARTD1 und ARTD10. Es wurden die Aminosäuren der 200 besten Substrate von ARTD1 (A) und ARTD10 (B) ins Verhältnis zu allen auf dem Acetylom-Mikroarray präsentierten Aminosäuren gesetzt. Daraus kann eine Häufigkeit an bevorzugten Aminosäuren innerhalb der 200 besten Substrate errechnet werden. Der Buchstabe B in der x-Achse entspricht dabei den acetylierten Lysinen, der Buchstabe Z repräsentiert Alanine, die zum Auffüllen von kürzeren Peptiden genutzt wurden. Zur Erstellung der *Two-sample-Logos* wurden die 200 besten Substrate der jeweiligen ADP-Ribosyltransferase (ARTD1 (C) und ARTD10 (D)) ins Verhältnis gesetzt zu allen auf dem Acetylom-Mikroarray präsentierten Peptiden.

Für ARTD1 zeigt sich eine Präferenz für saure Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure), indem diese beiden Aminosäuren innerhalb der 200 besten Substrate 2-fach (für Asparaginsäure), bzw. 7,5-fach (für Glutaminsäure) häufiger vertreten sind im Vergleich zu allen Aspartaten oder Glutamaten auf dem Acetylom-Mikroarray (Abbildung 4.30 A). Dies zeigt sich auch bei der Analyse der 200 besten Substrate nach Aminosäuremustern, in der eine Präferenz für saure Aminosäuren, insbesondere Glutamat, ersichtlich wird (Abbildung 4.30 C). Im Gegensatz dazu zeigt sich für ARTD10 kein Muster an bevorzugten Aminosäuren (Abbildung 4.30 B). Allerdings werden aromatische Aminosäuren, wie Phenylalanin und Tyrosin, in den 200 besten Substraten im Vergleich zu der Gesamtheit der auf dem Peptidmikroarray präsentierten Peptide abgelehnt (Abbildung 4.30 D). Auch Aspartat in der +6-Position wird von ARTD10 nicht begünstigt. Beide ADP-Ribosyltransferasen zeigen in ihren 200 besten Substraten eine vergleichbare Ablehnung für Leucin.

4.3.3 Untersuchung der Substratspezifitäten der Kinasen Wee1, Myt1, MSK1 und Prk1

Bei der Inkubation mit Kinase (Abbildung 4.31) und radioaktiv-markiertem γ - ^{33}P -ATP wird das γ -Phosphat auf die adressierte phosphorylierbare Aminosäure übertragen, unter gleichzeitiger Freisetzung von ADP. Die Detektion erfolgt mittels eines photosensitiven Films.

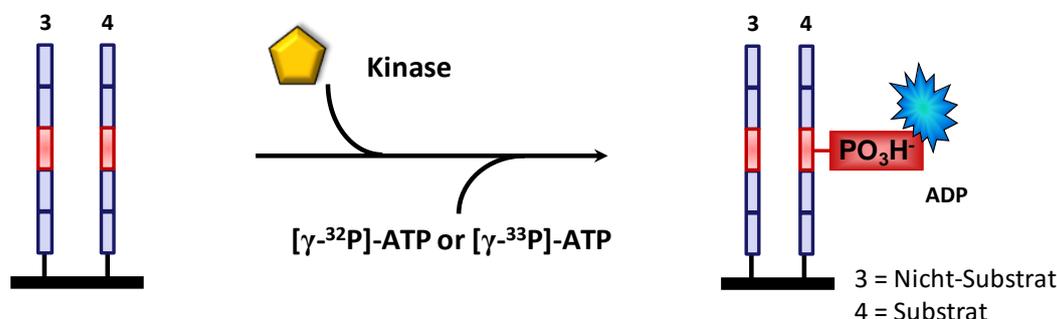


Abbildung 4.31: Assay-Prinzip des Radioaktiv-Assays zur Untersuchung von Kinasen. Die enzymatische Aktivität der Kinasen auf Peptidmikroarray erfolgt unter Nutzung von radioaktiv-markierten ATP. Dies führt zur Phosphorylierung des Substrates und der Freisetzung von ADP. Das eingebaute $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ oder $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ wird durch Phosphorimager visualisiert.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Sippl von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde die dual-spezifische Kinase Wee1 auf den Peptidmikroarrays charakterisiert, um den Einfluss *descross-talks* von verschiedenen PTMs auf deren Aktivität zu untersuchen. Der Datensatz ist in dem elektronischen Anhang E2 dargestellt. Abbildung 4.32 zeigt die Signale von Wee1 für die entsprechenden H2B-Peptide mit der beschriebenen Phosphorylierungsstelle H2BY37.¹⁵⁵ Dabei stellen alle auf dem Histonmikroarray immobilisierten H2B-Peptide putative Substrate von Wee1 dar und könnten phosphoryliert werden.

Ein *cross-talk* zwischen dem Lysin 43 und der Fähigkeit der Kinase das Tyrosin 37 zu phosphorylieren wird ersichtlich. Wird das H2BK43 acyliert (Abbildung 4.32 blaue Markierung) begünstigt dies die Phosphorylierung, wohingegen eine Methylierung des Lysinrestes die Y37-Phosphorylierung eher verhindert. Die Acetylierung und die Monomethylierung des Lysins 43 hatten dagegen kaum Einfluss auf die Substrateigenschaften. Vorteilhaft für die Phosphorylierung der Ziel-Modifikationsstelle wirkt sich ebenfalls der *cross-talk* mit benachbarten bereits vorhandenen Phosphorylierungen (Y40, Y42, S36 und S38) aus. Darüber hinaus konnte die H2BY37 als Phosphorylierungsstelle von Wee1 bestätigt werden.

Zusätzlich wurde Wee1, neben Myt1, auch auf dem Annotated PhosphoSites-Mikroarray untersucht, um Substrate der beiden Kinasen zu identifizieren.³⁸⁴ Das Venn-Diagramm in Abbildung 4.33 zeigt die 21 bzw. 11 identifizierten Substrate für Wee1 bzw. Myt1, in denen vier gemeinsame Substrate enthalten sind. Die auf den Peptidmikroarrays gefundenen Substrate wurden anschließend erfolgreich in Lösung mittels Fluoreszenzpolarisationsassay verifiziert. Die entsprechenden Phosphorylierungsstellen konnten mittels MS-Fragmentationsstudien ermittelt werden. Zusätzliche Kinaseinhibitormessungen validierten die identifizierten Substrate.³⁸⁴

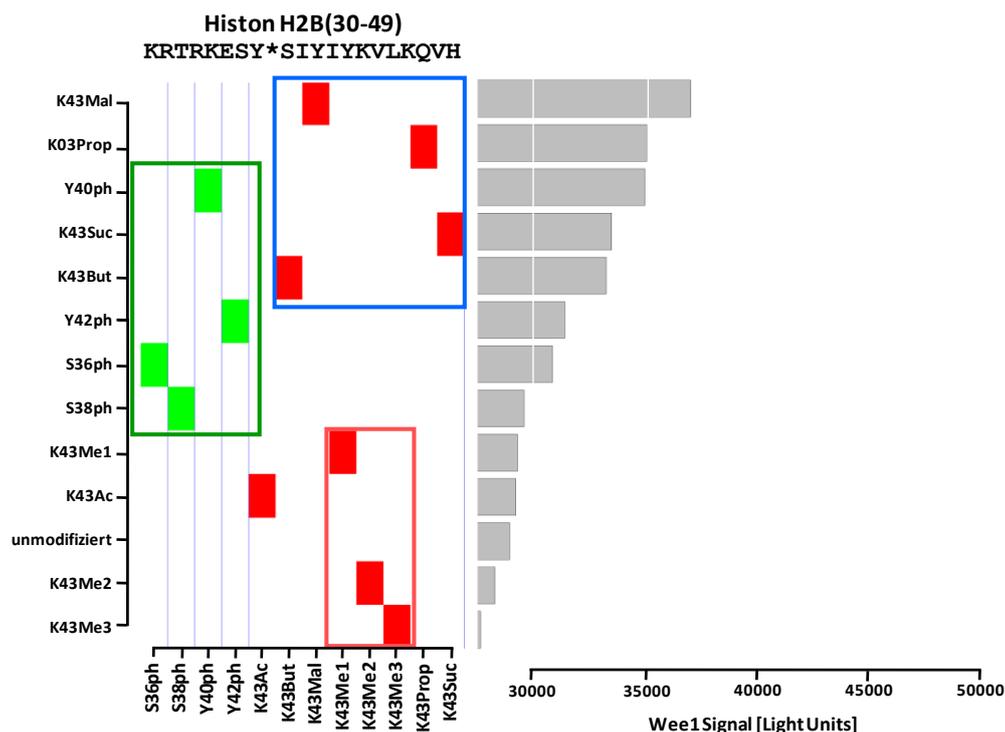


Abbildung 4.32: Substratspezifität von Wee1. Es sind die Signale der Einzel-modifizierten Peptide des Histons H2B (AS 30-49) gezeigt. Die beschriebene Phosphorylierungsstelle H2BY37 ist mit Y* markiert. Die *heatmap* auf der linken Seite zeigt durch Farbkodierung die Präsenz der jeweiligen PTM mit ihrer Position innerhalb der untersuchten Peptidsequenz an. Lysinmodifikationen sind in rot, Phosphorylierungen in grün dargestellt. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite zeigt die Signale von Wee1. Für weitere Erklärungen, wie diese Abbildungen zu lesen sind, siehe analoger Anhang A2.

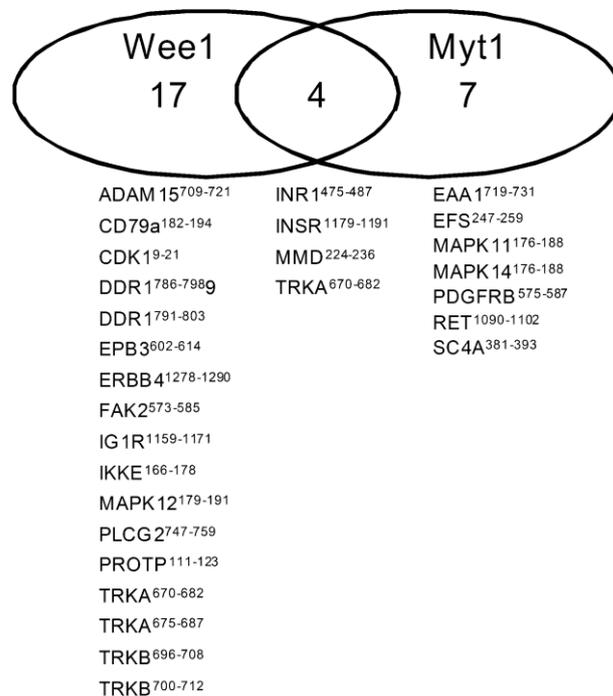


Abbildung 4.33: Identifikation von Peptidsubstraten der Kinasen Wee1 und Myt1 mittels Peptidmikroarrays. Aus allen auf dem Annotated PhosphoSites-Mikroarray präsentierten Peptiden konnten 21 Substrate für Wee1 und 11 Substrate für Myt1 identifiziert werden. Darunter sind 4 Substrate, die von beiden Kinasen phosphoryliert werden können. Eine Übersicht über die detaillierten Peptidsequenzen und die experimentellen Bedingungen sind in Rohe *et al.* publiziert.³⁸⁴ Abbildung wurde entnommen aus³⁸⁴.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Sippl, wurde Myt1 auch auf den Histonmikroarrays analysiert (elektronischer Anhang E2). In Abbildung 4.34 sind die Signale von Myt1 für dieselben Peptide des Histons H2B dargestellt, die bereits auch schon in der Abbildung 4.32 für Wee1 dargestellt wurden. Damit ist ein direkter Vergleich der beiden Vertreter der Wee1-Kinasefamilie möglich. Auch hier wurde der Einfluss von benachbarten PTMs auf die Phosphorylierung untersucht. Die Methylierungen des Lysins 43 haben hier noch relativ geringen Einfluss auf die Aktivität von Myt1. Auch hier zeigt sich, dass das Peptid mit dem monomethylierten Lysin fast die gleiche Signalstärke wie das unmodifizierte Peptid aufweist. Die enzymatische Aktivität wird jedoch durch vorphosphorylierte Aminosäuren, sowie Acylierungen des Lysins 43 herabgesetzt. Hier verursachen die Propionylierung, Butyrylierung, die Malonylierung und die Succinylierung des H2BK43 eine Verringerung des Signals um das 5-fache. Das Kontrollexperiment zeigte keine unspezifische Bindung von ATP oder radioaktiv-markierten $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ an die immobilisierten Peptide.

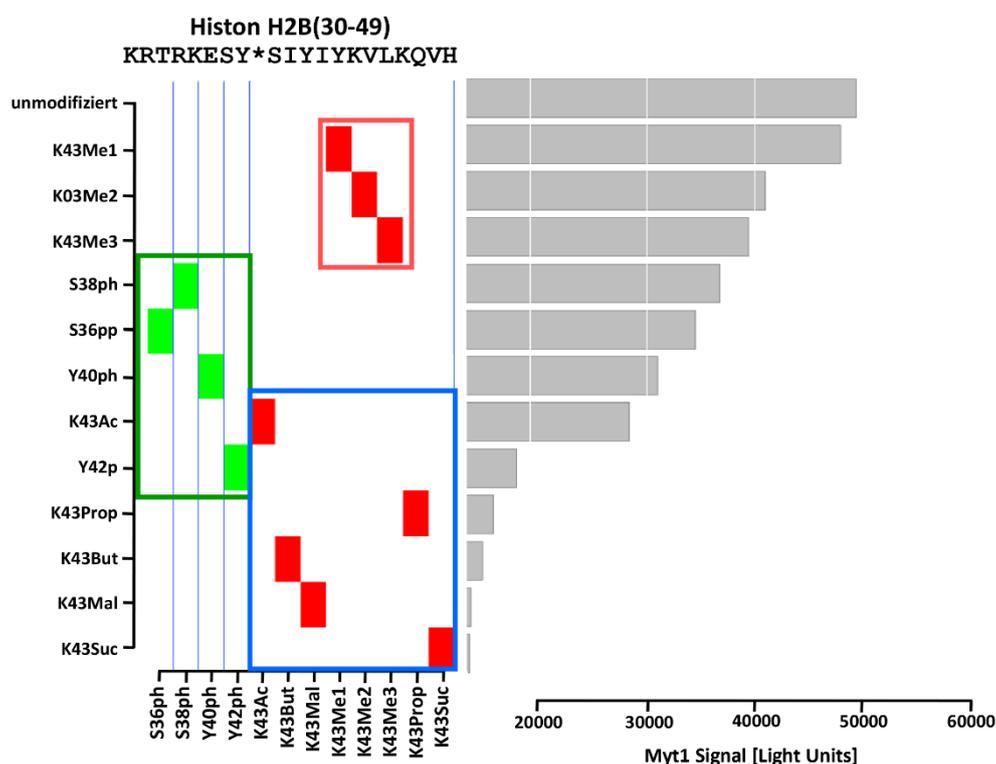


Abbildung 4.34: Substratspezifität von Myt1. Es sind die Signale der Einzel-modifizierten Peptide des Histons H2B (AS 30-49) gezeigt. Die Phosphorylierungsstelle H2BY37 ist mit Y* markiert. Die *heatmap* auf der linken Seite zeigt durch Farbkodierung die Präsenz der jeweiligen PTM mit ihrer Position innerhalb der untersuchten Peptidsequenz an. Lysinmodifikationen sind in rot, Phosphorylierungen in grün dargestellt. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite zeigt die Signale von Myt1 an. Für weitere Erklärungen, wie diese Abbildungen zu lesen sind, siehe analoger Anhang A2.

Die Serin-Kinase MSK1 phosphoryliert die Serine S10 und S28 in der N-terminalen Region von Histon H3, die beide das ARKS-Motiv aufweisen. Die Untersuchung der MSK1 Kinase auf dem Histonmikroarray (elektronischer Anhang E2) konnte die bereits bekannten Phosphorylierungsstellen H2AS1³⁸⁵,

H3S10 und H3S28²⁷⁸ nachweisen. Zusätzlich konnten aber auch neue Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Dazu gehören beispielsweise H2BS37 und H4S47. Obwohl die Phosphorylierung an Histon H2B bereits durch den Einbau von radioaktiv-markiertem ATP detektiert wurde, konnte bisher noch keine Phosphorylierungsstelle identifiziert werden.³⁸⁶Die Signale für die Phosphorylierungsstellen von H2B und H4 sind etwa 5-fach stärker als die des H3S10-Peptids. Wie auch die H3S10 und H3S28-Phosphorylierungsstelle hat auch die H4S47-Phosphorylierungsstelle ein Arginin in der -2-Position (Abbildung 4.35).

Aus der Abbildung 4.35 wird ersichtlich, dass eine Methylierung dieses Argininrestes H4R45 oder durch Citrullin ersetztes Arginin, die Kinase-vermittelte Phosphorylierung der immobilisierten Peptide herabsetzt. Auch längererkettige Modifikationen der Lysinseitenkette in der -3-Position reduzieren die Phosphorylierbarkeit des Serins durch die MSK1. Dagegen beeinflussen die Methylierungen oder Citrullin-Austausche von anderen Arginresten innerhalb der näheren Umgebung der phosphorylierbaren Serine (R36, R39 und R40) die MSK1-Aktivität kaum oder verbessern diese sogar.

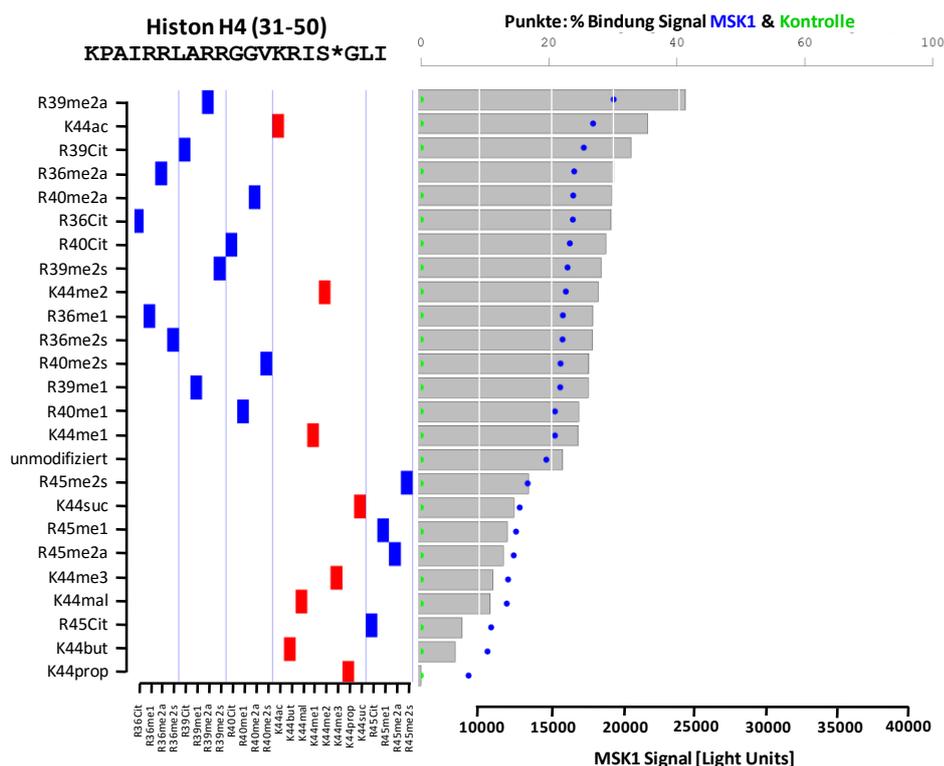


Abbildung 4.35: Substratspezifität von MSK1. Es sind die Signale der Einzel-modifizierten Peptide des Histons H4 (AS 31-50) gezeigt. Die Phosphorylierungsstelle H4S47 ist mit S* markiert. Die *heatmap* auf der linken Seite zeigt durch Farbkodierung die Präsenz der jeweiligen PTM mit ihrer Position innerhalb der untersuchten Peptidsequenz an. Lysinmodifikationen sind in rot, Argininmodifikationen in blau dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die Signale von MSK1. Punkte beziehen sich auf die Achse oberhalb des Balkendiagramms und geben % der Bindung für Signale der Kinase MSK1 (blau) und einer Negativkontrolle (Hintergrundsignale, grün) an. Für weitere Erklärungen, wie diese Abbildungen zu lesen sind, siehe analoger Anhang A2.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Manfred Jung von der Universität Freiburg wurde die Prk1-Kinase auf den Histonmikroarrays untersucht. Ziel war es, die Kinase Prk1 auf dem Histonmikroarray zu untersuchen und dabei den Einfluss des *cross-talks* auf die enzymatische Aktivität zu charakterisieren, sowie eine Identifizierung eines Prk1-Sequenzmotives. Dabei wurde die Kinase per „Chip-Sandwich“ mit zwei verschiedenen Peptidmikroarrays inkubiert: zum einen dem Annotated PhosphoSites-Mikroarray, auf dem mehr als 1100 humane Phosphorylierungsstellen präsentiert werden, und zum anderen dem Histonmikroarray.

Die Inkubation von Prk1 auf den Annotated PhosphoSites-Mikroarray ergab 23 Substrate. Die Substrate sind so definiert, dass das Signal von Prk1 zum Mittelwert aller Hintergrundsignale ein Verhältnis > 150 aufweist. Das stärkste Signal ist dabei fast 1300-fach höher als das mittlere Hintergrundsignal. Die 23 Substrate sind argininreiche Peptide. Anschließend wurde für die Peptidsequenzen dieser 23 Substrate eine Motivanalyse durchgeführt, die die Häufigkeit von bestimmten Aminosäureabfolgen in den Substraten angibt. In den 23 Substraten (Tabelle 4.3) wurde das Motiv RxxSR 5-mal gefunden.

Tabelle 4.3: Motivanalyse der 23 Substrate von Prk1

Häufigkeit	Aminosäuremotiv
5	RxxSR
4	RxxSxR
4	RxLS
4	RSxR
4	LxRxxS
4	ExxEE

In den 23 Substraten war auch H2B als bekanntes Prk1-Substrat vertreten. Dieses konnte auch auf dem zweiten, parallel untersuchten Histonmikroarray als Substrat nachgewiesen werden. Dabei wurden auf dem Histonmikroarray auch Substrate für den *N*-Terminus des Histons H3 gefunden (Abbildung 4.36). Das Threonin T11 im Histon H3 ist als Phosphorylierungsstelle von Prk1 bekannt, konnte jedoch durch die Mikroarrayuntersuchung nicht bestätigt werden. So zeigt sich beim bereits phosphoryliertem H3T11-Peptid ein Signal, das vergleichbar mit den anderen H3-Peptiden ist. Da auch Peptide mit phosphoryliertem H3S10 Signale zeigen, und damit als Phosphorylierungsstelle ausgeschlossen werden können, legt das die Vermutung nahe, dass Prk1 H3T3 oder H3T6 phosphoryliert. Der Einfluss des *cross-talks* auf die durch Prk1-vermittelte Phosphorylierung ist auch in Abbildung 4.36 dargestellt. So erhöht eine Methylierung der Argininreste H3R2 oder H3R8 die Phosphorylierbarkeit des Threoninrestes.

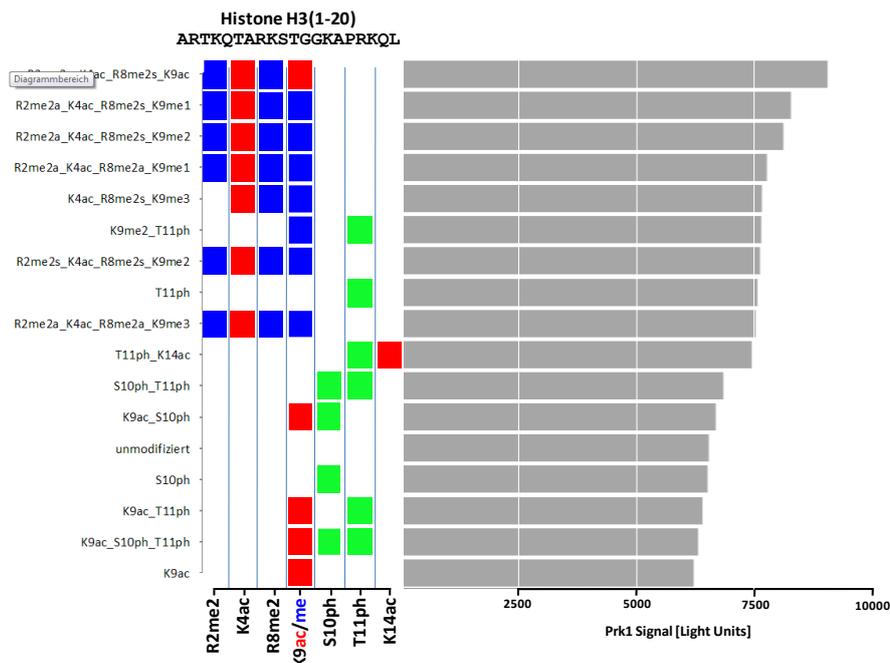


Abbildung 4.36: Substratspezifität von Prk1. Es sind die Signale für die modifizierten Peptide des Histons H3 (AS 1-20) gezeigt. Die *heatmap* auf der linken Seite zeigt durch Farbkodierung die Präsenz der jeweiligen PTM mit ihrer Position innerhalb der untersuchten Peptidsequenz an. Lysinmodifikationen sind in rot, Argininmodifikationen in blau und Phosphorylierungen in grün dargestellt. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite zeigt die Signale von Prk1. Für weitere Erklärungen, wie diese Abbildungen zu lesen sind, siehe analoger Anhang A2.

4.4 Identifikation der Substratspezifitäten von *erasern*

4.4.1 Untersuchung der Substratspezifitäten der Phosphatase XopH

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulla Bonas, Institut für Biologie (Pflanzen-genetik) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, wurde die Tyrosinphosphatase XopH und deren C267A-Mutante auf dem PhosphoTyrosin-Mikroarray untersucht, der 6207 PhosphoTyrosin-haltige Peptide präsentiert. Das Ziel war die Identifikation von Substraten für diese Phosphatase. Dazu wurde der Peptidmikroarray mit der Phosphatase bzw. der Mutante inkubiert (Abbildung 4.37).

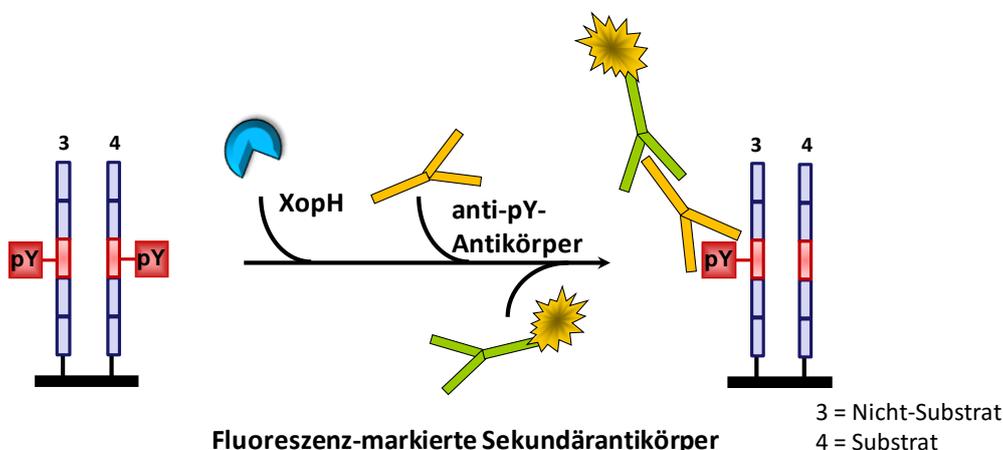


Abbildung 4.37: Assay-Prinzip zur Untersuchung einer Phosphatase am Beispiel von XopH. Der Peptidmikroarray wird zuerst mit dem Enzym inkubiert, gefolgt von anti-pY-Antikörper und fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper. Parallel muss eine Kontrollinkubation, wie hier z.B. die anti-pY-Antikörperkontrolle, durchgeführt werden, die den „Startwert“ des Signals detektiert. Anhand des Verhältnisses zwischen dem Signal der Kontrolle und dem Signal der Phosphatase kann die Signalabnahme errechnet werden.

Die Analyse der Peptidmikroarrayexperimente mit der Phosphatase XopH und ihrer katalytisch inaktiven Mutante C267A konnten 82 Substrate bzw. 238 Binder identifizieren. Als Substrat wurden dabei die Peptide definiert, deren Signal im Vergleich zu dem Kontrollexperiment in Abwesenheit des Enzyms über 70% abnahmen.

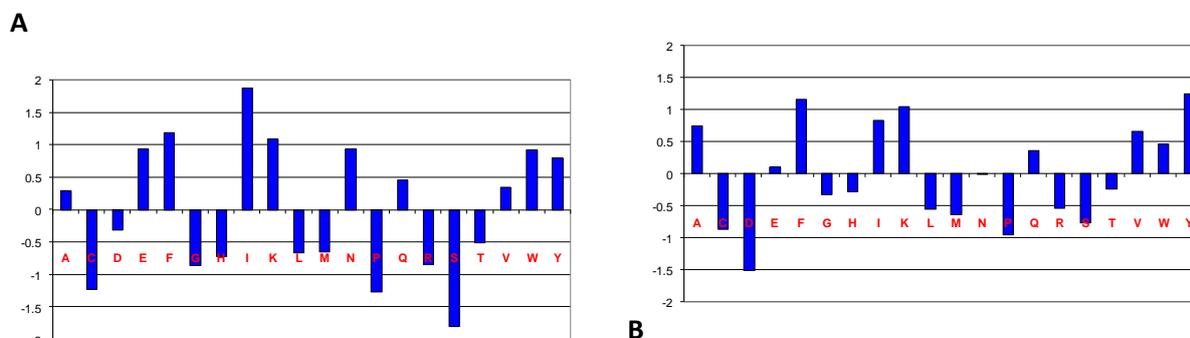


Abbildung 4.38: Aminosäureverteilung der Substrate von XopH und der Binder von XopH-C267A-Mutante. **A** Es wurden die Aminosäuren der 82 Substrate von XopH (Signalabnahme > 70%) ins Verhältnis zu allen auf dem PhosphoTyrosin-Mikroarray präsentierten Aminosäuren gesetzt. Daraus wurde die Häufigkeit an bevorzugten Aminosäuren innerhalb der Substrate errechnet. Positive Werte bedeuten eine häufigere Präsenz der Aminosäure in den untersuchten Substraten an dieser Position. **B** Für die 238 Binder der katalytisch inaktiven Mutante wurden die Aminosäuren ins Verhältnis zu allen auf dem Peptidmikroarray präsentierten Aminosäuren gesetzt.

Die Aminosäureverteilung der 82 Substrate von XopH ist in Abbildung 4.38 A dargestellt. Die statistische Analyse zeigt für XopH eine Präferenz für negativ geladene Aminosäuren. Alle Binder der katalytisch inaktiven Mutante (238 Peptidsequenzen mit einer Signalabnahme >70%) und ihre daraus errechnete Aminosäureverteilung sind in Abbildung 4.38 B gezeigt. Die *trapping* Mutante zeigt eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren.

In Abbildung 4.39 wurden die Signalabnahme von XopH der Signalabnahme der *trapping* Mutante in einem Streudiagramm gegenübergestellt. Substrate würden für XopH eine hohe Signalabnahme und für die Mutante eine geringe Signalabnahme zeigen (Abbildung 4.39 Quadrant Q4). Allerdings verhielt es sich in diesem Experiment umgekehrt: niedrige Signalabnahme für XopH und hohe Signalabnahme für die Mutante.

Deshalb wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Diese sollten untersuchen, ob die Signalabnahme durch eine Maskierung des Epitops verursacht wird. Würde die Phosphatase noch an die immobilisierten Phosphopeptide binden, blockiert das gebundene Enzym das Epitop für den phosphorspezifischen Antikörper. Die Maskierung könnte aber auch durch die Bindung der Mutante hervorgerufen werden. Eine solche Mutante wird als *trapping* Mutante bezeichnet. Die *trapping* Mutante fängt in diesem Fall alle Substrate ab. Indem die *trapping* Mutante an die Substrate bindet, kann das Intermediat zwischen der Phosphatgruppe des PhosphoTyrosins und dem katalytisch wichtigem Cystein nicht gebildet werden, da das Cystein durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Die Katalyse wird

verhindert. Eine erfolgreiche Nutzung einer solchentrapping Mutante auf Peptidmikroarrays wurde bereits gezeigt.³⁸⁷

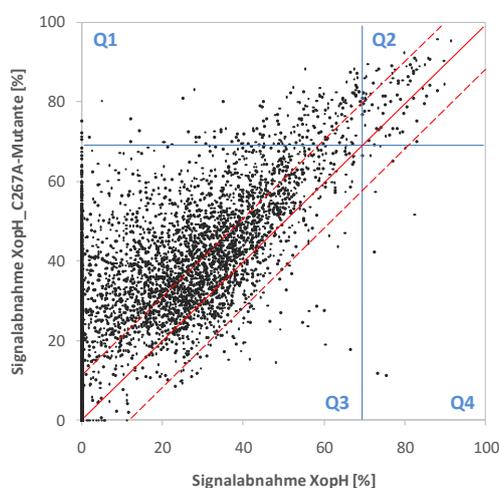


Abbildung 4.39: Streudiagramm der Signalabnahme der Phosphatase XopH auf dem PhosphoTyrosin-Mikroarray. Jeder Punkt repräsentiert ein Peptid mit dem entsprechenden Signalverhältnis in den 3 Experimenten (XopH, XopH-C267A-Mutante, anti-pY-Antikörperkontrolle). Es wurde die Signalabnahme von XopH (Verhältnisse der Signale von XopH zu Antikörperkontrolle) gegen die Signalabnahme der Mutante (Signalverhältnisse von der XopH-C267A-Mutante zu Antikörperkontrolle) aufgetragen. Alle Signale innerhalb eines Experimentes wurden auf das jeweils stärkste Signal normiert (100%). Die blauen Linien markieren die Akzeptanzgrenzen oberhalb derer die Peptide als Substrate bzw. Binder definiert wurden (jeweils 70%). Zur besseren Orientierung wurden in das Streudiagramm eine 45°-Gerade (rote Linie) und ein entsprechender Toleranzbereich (rot-gestrichelte Linien) eingetragen. Innerhalb dieses rot-markierten Bereichs ist keine Aussage über die Peptide (ob Substrate oder Binder) möglich, da beide vergleichbare Signalabnahmen zeigen.

Als erstes Kontrollexperiment wurden die beiden bereits mit der Phosphatase und der XopH-Mutante inkubierten Peptidmikroarrays mit anti-XopH-Antikörper inkubiert. Dies dient der Überprüfung, ob die Mutante noch immer an die Phosphopeptide gebunden ist. Des Weiteren wurden zusätzliche Waschschrte mit 6M Harnstoff durchgeführt, um das gebundene Enzym zu denaturieren und in den darauf folgenden Waschschrten zu entfernen.⁹⁴ Die Ergebnisse sind in den beiden Streudiagrammen in Abbildung 4.40 dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass die Harnstoff-Wäsche zu einer Unterscheidung der auf dem Mikroarray immobilisierten Peptide in Binder (für die katalytisch-inaktive Mutante) und Substrate (für XopH) führte.

Als zweites Kontrollexperiment wurde der Peptidmikroarray mit inhibiertem XopH (Natrium-Orthovanadat) oder in Anwesenheit eines kompetitiven Substrats (pTyr2-Substrat) inkubiert. Die Kontrollexperimente konnten zeigen, dass XopH unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht an die immobilisierten Phosphopeptide bindet. Eine Maskierung des Epitops konnte für XopH dadurch ausgeschlossen werden. Die XopH_C267A-Mutante zeigte eine enzymatische Restaktivität, indem für einige der immobilisierten PhosphoTyrosin-Peptide noch eine Signalabnahme detektiert wurde.

Insgesamt konnten damit 72 Substrate für XopH identifiziert werden. Das sich daraus errechnete *Two-sample-Logo* ist in der Abbildung 4.41 zu sehen. Es zeigt sich eine Präferenz für negativ-geladene Aminosäuren in der -1- und +5-Position, sowie für positiv-geladene Aminosäuren in den -5, +2- und +4-Positionen.

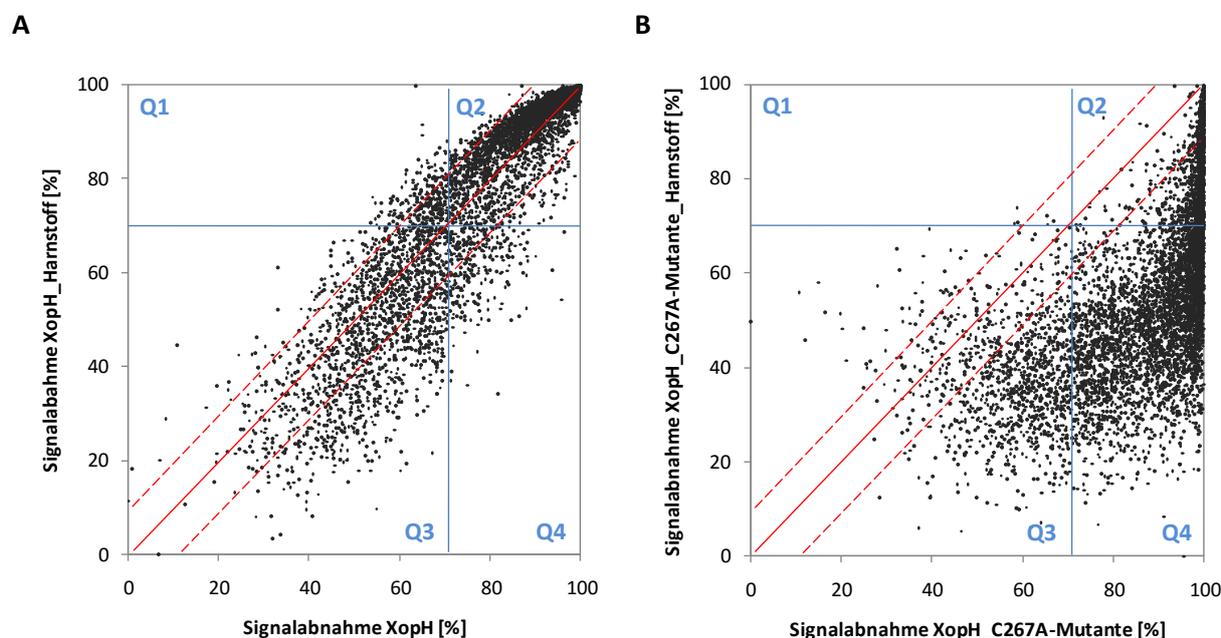


Abbildung 4.40: Einfluss einer Harnstoff-Wäsche auf die Phosphatase-Experimente. Die Streudiagramme zeigen die Signalabnahme der Phosphatase ohne Harnstoff-Wäsche und die Signalabnahme der Phosphatase mit zusätzlichem Harnstoff-Waschschrift. Jeder Punkt repräsentiert dabei ein Peptid, das auf dem PhosphoTyrosin-Mikroarray immobilisiert war. **A** Gezeigt sind die Signalabnahmen der Phosphatase XopH. Die Peptide im Quadrant Q4 sind die Substrate. **B** Das Streudiagramm vergleicht die Signalabnahmen der katalytisch inaktiven XopH-C267A-Mutante. Die Substrate wären hier im Quadrant Q2 zu finden, wohingegen die Peptide im Quadrant Q4 die Binder repräsentieren. Alle Signale innerhalb eines Experimentes wurden auf das jeweils stärkste Signal normiert (100%). Die blauen Linien markieren die Akzeptanzgrenzen oberhalb derer die Peptide als Substrate bzw. Binder definiert wurden (jeweils 70%). Zur besseren Orientierung wurden in das Streudiagramm eine 45°-Gerade (rote Linie) und ein entsprechender Toleranzbereich (rot-gestrichelte Linien) eingetragen. Innerhalb dieses rot-markierten Bereichs ist keine Aussage über die Peptide (ob Substrate oder Binder) möglich, da beide vergleichbare Signalabnahmen zeigen.

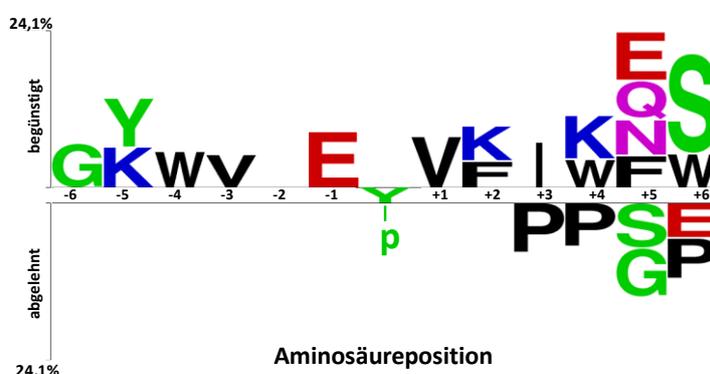


Abbildung 4.41: *Two-sample-Logo* der 72 Substrate von XopH. Das *Two-Sample-Logo* zeigt eine Übersicht über die positionabhängige Aminosäurezuordnung in den Substraten im Vergleich zu allen auf dem PhosphoTyrosin-Mikroarray präsentierten Peptiden.

Aus den vorliegenden Mikroarraydaten wurden jeweils ein Substrat und ein Nicht-Substrat ausgewählt und synthetisiert. Das ausgewählte Substrat (Ac-KVDVDEY(ph)DENKFVW-NH₂) zeigte für XopH eine Signalabnahme von 78%. Beim ausgewählten Nicht-Substrat (Ac-GRKKIKY(ph)KSLTRNW-NH₂) nahm das Signal durch XopH nur zu 14% ab. Zusätzlich wurde noch eine Positivkontrolle (pTyr2-Peptid, Ac-DADEY(ph)LIPQQGW-NH₂, aus AG Bonas) synthetisiert. In einem diskontinuierlichen HPLC-basierten Assay wurden die kinetischen Parameter bestimmt.

Das ausgewählte Nicht-Substrat des Mikroarrayexperiments konnte in den Lösungsexperimenten durch XopH nicht dephosphoryliert werden und bestätigte damit die Mikroarraydaten. Für die Positivkontrolle und für das ausgewählte Substrat konnten die K_M - und k_{cat} -Werte bestimmt werden (Abbildung 4.42).

Die K_M -Werte sind für beide Substrate ähnlich, aber der k_{cat} -Wert ist für das mit dem Mikroarray identifizierte Substrat etwa 3-fach höher als der der Positivkontrolle. Die katalytischen Effizienzen sind mit 350 bzw. 942 s⁻¹ M⁻¹ eher niedrig, verglichen zu denen von anderen Proteintyrosinphosphatasen.^{388,389}

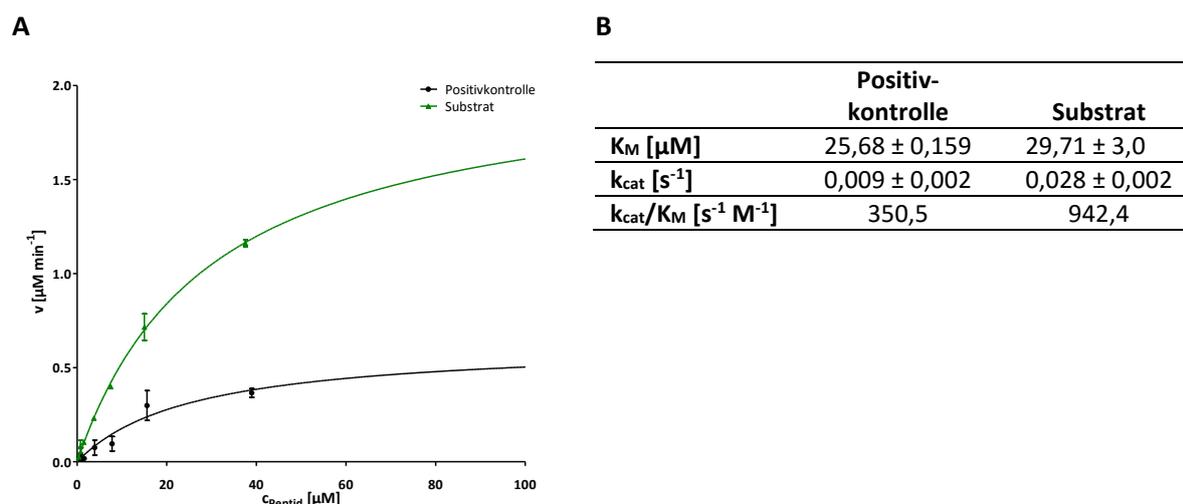


Abbildung 4.42: Kinetische Charakterisierung von XopH. **A** Darstellung der $v/[S]$ -Charakteristik für das Substrat und die Positivkontrolle. Die Reaktionen wurden mit 50 µg/mL XopH und variierenden Peptidkonzentrationen (0,5 – 50 µM) durchgeführt (pH-Wert 7,0 und Temperatur = 37°C) durchgeführt. **B** Zusammenfassung der kinetischen Parameter.

4.4.2 Untersuchung der Substratspezifitäten der Deacylasen Sirtuin1-Sirtuin7

Das Assay-Prinzip zur Untersuchung von Sirtuinen ist in Abbildung 4.43 dargestellt. Die Detektion erfolgte, indem die Mischung der modifikationsspezifischen anti-Kac-Antikörper, gefolgt von den fluoreszenz-markierten Sekundäntikörpern, auf dem Peptidmikroarray inkubiert wurde. Parallel wurde eine Kontrollinkubation in Abwesenheit des Co-Substrates NAD⁺ durchgeführt.

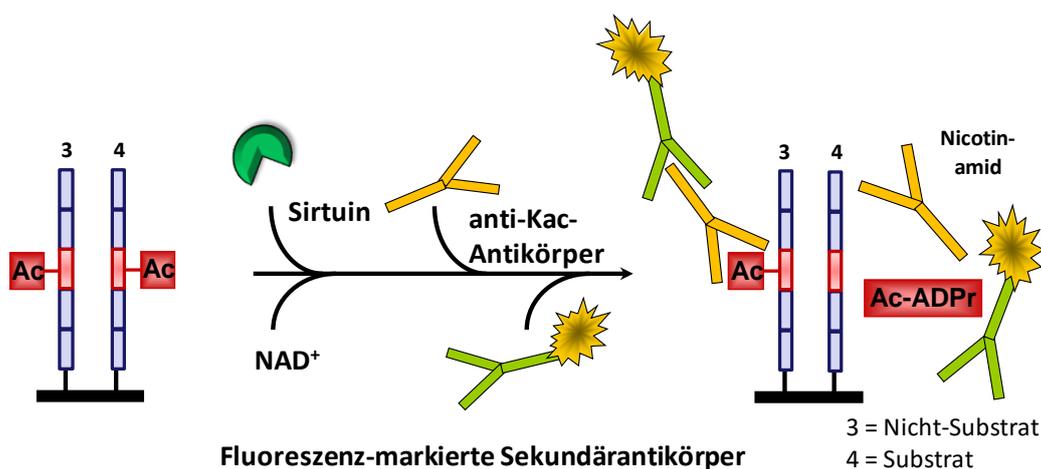


Abbildung 4.43: Assay-Prinzip zur Untersuchung von Sirtuinen. Der Histonmikroarray wird zuerst mit dem Enzym und dem Co-Substrat NAD^+ inkubiert, gefolgt von der anti-Kac-Antikörper-Mischung und fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern. Parallel muss eine Kontrollinkubation durchgeführt werden, die den „Startwert“ des Signals detektiert. Anhand des Verhältnisses zwischen dem Signal der Kontrolle und dem Signal des Sirtuins kann die Signalabnahme errechnet werden.

Die Sirtuine wurden in der Arbeitsgruppe bereits vor Beginn dieser Arbeit auf den Acetylom-Mikrorrays charakterisiert.⁷⁷ Um die enzymatische Aktivität auch hinsichtlich deren Sequenzspezifität und Acylspezifität an Histonen zu charakterisieren, wurden die Sirtuine auf Histonmikroarrays untersucht (Abschnitt 3.8.9).

Im ersten Kontrollexperiment, der Antikörperkontrolle, wurde der Histonmikroarray nur mit der Mischung der anti-Kac-Antikörper, gefolgt von den Sekundärantikörpern, inkubiert (elektronischer Anhang E2). Im Vergleich zu dem in Abschnitt 4.1.1 gezeigten Experiment, wurde an dieser Stelle die Antikörperkonzentration so erhöht, dass nicht nur die acetylierten Lysine zuverlässig detektiert werden, sondern dies auch mit einem hohen Signal als „Startwert“. Die Erhöhung der Antikörperkonzentration führte damit zu einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis.

Das zweite Kontrollexperiment entspricht der enzymatischen Negativkontrolle. Um die Deacetylierung nachzuweisen, muss ein Vergleich mit einem Kontrollmikroarray erfolgen. Dazu wurde der Peptidmikroarray mit dem Enzym, aber ohne das Co-Substrat NAD^+ inkubiert. Somit kann eine enzymatische Deacetylierungsreaktion ausgeschlossen werden. Die Kontrollexperimente wurden nun mit den Sirtuin-inkubierten (in Anwesenheit von NAD^+) Histonmikroarrays verglichen. Anhand des Vergleichs von acetylierten (alle Peptide zeigen ein Signal) zu deacetyliertem Peptidmikroarray (Peptide mit Signalabnahme) lassen sich die Substrate der Deacetylasen identifizieren. Das Verhältnis der Signale (in Ab- zu in Anwesenheit von NAD^+ , $-\text{NAD}^+/\text{+NAD}^+$) wurden in den folgenden Auswertungen genutzt, um die Aktivität der Sirtuine zu ermitteln.

Das dritte Kontrollexperiment (NAD^+ -Kontrolle) untersuchte, ob an die Peptidsequenz gebundenes NAD^+ Einfluss auf die Sirtuinerkennung bzw. Antikörperbindung hat. Die NAD^+ -Kontrolle zeigte keine unspezifische Bindung an die auf dem Histonmikroarray immobilisierten Peptide, bis auf zwei Ausnahmen (H2AK98acK102ac und H2AK122ac) (elektronischer Anhang E2).

Da es sich bei der enzymatischen Reaktion um eine Zwei-Substrat-Reaktion handelt, wurde in der Arbeitsgruppe der Einfluss des Co-Substrates NAD^+ auf die Reaktion untersucht.^{212,390} Es wurden für NAD^+ die K_M -Werte von Sirt2 ($33\mu\text{M}$), von Sirt5 ($41\mu\text{M}$) und von Sirt6 ($386\mu\text{M}$) ermittelt. In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine Konzentration von $1,5\text{mM}$ NAD^+ eingesetzt. Die NAD^+ -Konzentration liegt somit im Sättigungsbereich ($[\text{NAD}^+] \gg [\text{Peptidsubstrat}]$) und kann über den gesamten Reaktionsverlauf als konstant angenommen werden.

4.4.2.1 Untersuchung der Substratspezifität von Sirtuin1 auf Histonmikroarrays

Bei der Untersuchung von Sirtuin1 auf den Histonmikroarrays konnten einige Deacetylierungsstellen für Sirt1 identifiziert werden (elektronischer Anhang E2). Die Sirtuin1-Aktivität wurde anhand des Signalverhältnisses der Peptide von den beiden Inkubationen (in Ab- und Anwesenheit von NAD^+) bewertet. Dabei wurde am Beispiel der H3K122-Acetylierungsstelle die Erkennung der Peptide und deren Zugänglichkeit für das inkubierte Sirtuin untersucht. H3K122ac ist in vier Peptiden an unterschiedlicher Position innerhalb der 20meren immobilisierten Peptide auf dem Histonmikroarray präsentiert (Abbildung 4.44 A). Es wird ersichtlich, dass die Signalverhältnisse vergleichbar sind. Damit ist die Position der modifizierten Aminosäure innerhalb des immobilisierten Peptids für die Zugänglichkeit von Sirt1 und für die Erkennung der Antikörper unabhängig. In Abbildung 4.44 B ist die Sequenzspezifität von Sirtuin1 am Beispiel der 13 Lysine des Histons H3 dargestellt. Für die meisten Lysine wurde eine schwache Deacetylierung gemessen, wobei H3K56 und H3K64 stärker deacetyliert werden.

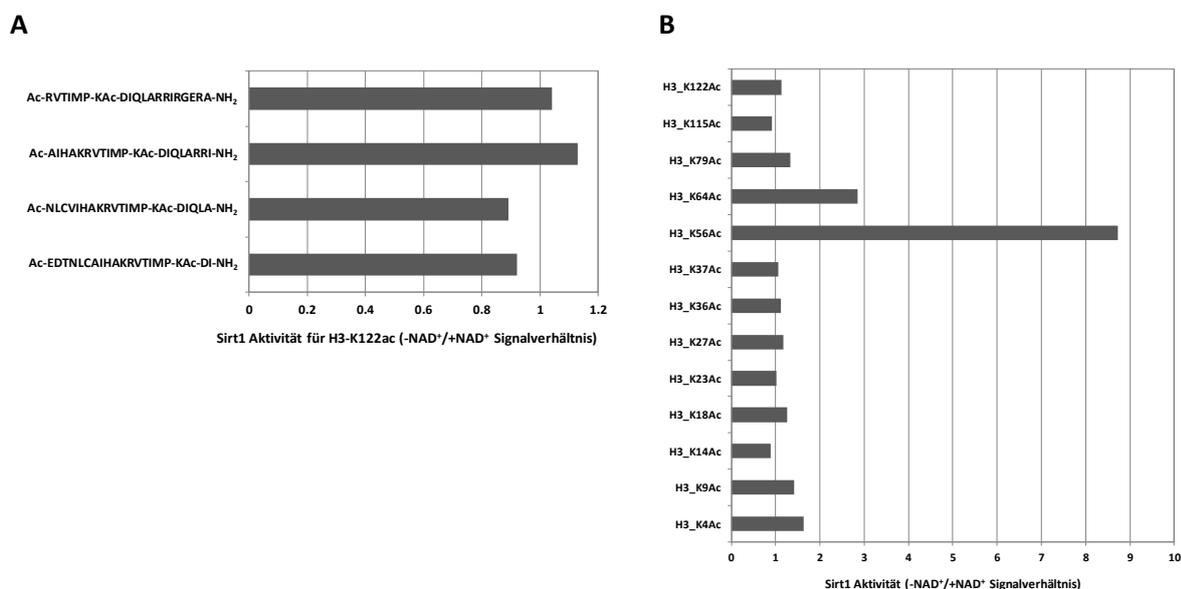


Abbildung 4.44: Substratspezifität von Sirtuin1. **A** Reproduzierbarkeit der Erkennung des acetylierten Lysins 122 an verschiedenen Positionen innerhalb des immobilisierten Peptids. **B** Sequenzspezifität von Sirt1 für die acetylierten Lysine des Histons H3.

Die Acylspezifitäten für die zwei für den *cross-talk* bekannten Modifizierungsstellen H3K9 und H3K27 sind in Abbildung 4.45 zu sehen. Dabei zeigt Sirtuin1 kaum Aktivität für acetylierte Lysine.

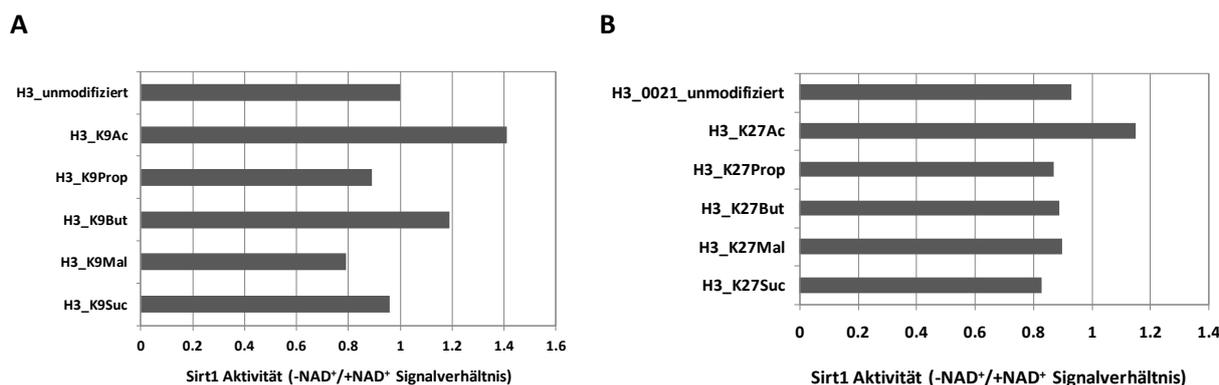


Abbildung 4.45: Acylspezifität von Sirt1 an den Modifikationsstellen H3K9 und H3K27. **A** Darstellung der Deacylaseaktivität von Sirtuin1 an der H3K9-Modifikationsstelle für die acylierten H3K9-Peptide, sowie dem entsprechenden unmodifizierten Peptid. **B** Darstellung der Deacylaseaktivität für die acylierten H3K27-Peptide im Vergleich zum unmodifizierten H3K27-Peptid.

Wird für Sirtuin1 der *cross-talk* anderer PTMs an der H3K9-Modifizierungsstelle (Abbildung 4.46 A) betrachtet, zeigt sich, dass Sirtuin1 kaum beeinflusst wird. Lediglich eine Dimethylierung des Arginins in der -1-Position verstärkt die Deacetylierung des H3K9. Dagegen wirkt eine Phosphorylierung in der +1- oder +2-Position eher verringernd auf die Deacetylaseaktivität. Aus der Auswertung des mit Sirtuin1-inkubierten Histonmikroarrays für die H3K27-Modifizierungsstelle wird ersichtlich, dass die Phosphorylierung in der +1-Position zum acetylierten Lysin keinen Einfluss hat (Abbildung 4.46 B).

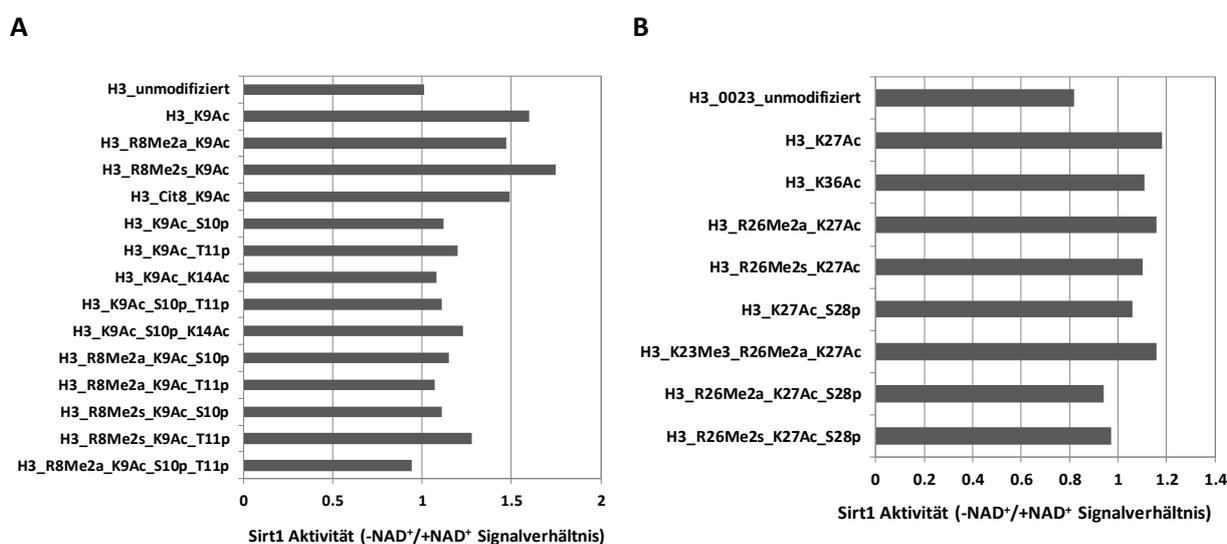


Abbildung 4.46: Sirtuin1 Aktivität an der H3K9-Modifizierungsstelle (A) und H3K27-Modifizierungsstelle (SAPS-Variante) (B) und dessen Beeinflussung durch *cross-talk* mit anderen PTMs.

4.4.2.2 Untersuchung der Substratspezifität von Sirtuin2 auf Histonmikroarrays

Die Charakterisierung von Sirtuin2 auf den Histonmikroarrays ist in dem elektronischen Anhang E2 zu sehen. Die Auswertung der Signalverhältnisse zeigte eine Sequenzspezifität von Sirtuin2 für die Mehrheit der Lysine des Histons H3 (Abbildung 4.47 A). Dabei wird die Deacetylaseaktivität für das H3K56 ersichtlich. Auch H3K9, H3K64, H3K4, H3K18 und H3K122 werden von Sirtuin2 deacetyliert. Für die H3K9-Modifizierungsstelle zeigen die anderen H3K9-Acylierungen vergleichbare Signalver-

hältnisse wie das unmodifizierte Peptid (Abbildung 4.47 B). Diese Tendenz lässt sich für die H3K27-Modifizierungsstelle (Abbildung 4.47 C) nicht bestätigen, da hier neben dem acetylierten auch das propionylierte Lysin höhere Signalverhältnisse als die anderen (unmodifizierten und acylierten) Peptide zeigt.

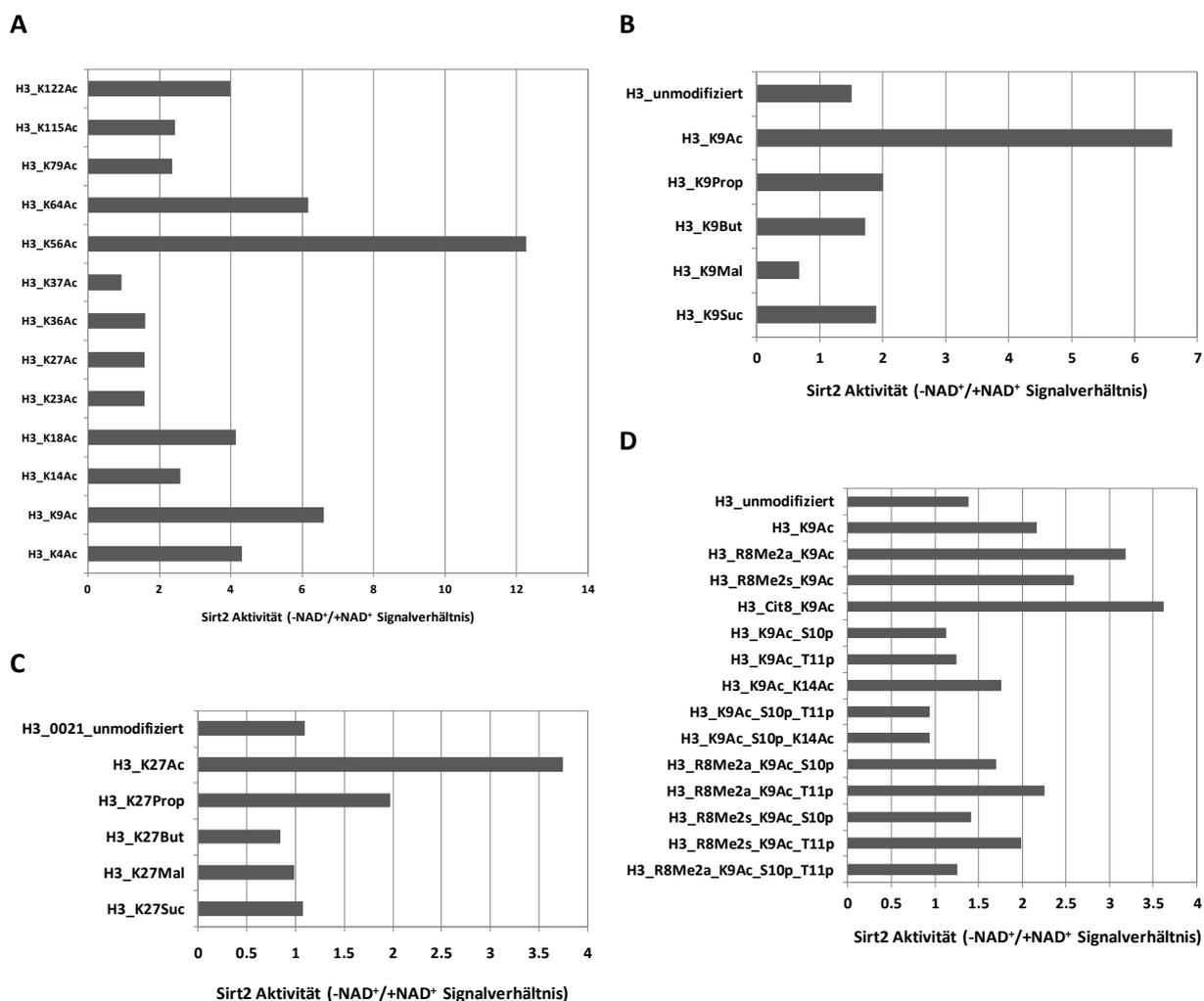


Abbildung 4.47: Substratspezifität von Sirtuin2. **A** Sequenzspezifität von Sirt2 für die acetylierten Lysine des Histons H3. Die Darstellungen der Acylspezifität von Sirt2 für die Modifizierungsstellen H3K9 (**B**) und H3K27 (**C**) zeigen die Deacetylaseaktivität von Sirt2 für die jeweiligen acylierten Peptide und den Vergleich zum entsprechenden unmodifizierten Peptid. **D** Sirtuin2 Aktivität an der H3K9-Modifizierungsstelle und dessen Beeinflussung durch *cross-talk* mit anderen PTMs.

Sirtuin2 wird zudem stärker als Sirtuin1 durch den *cross-talk* mit anderen PTMs beeinflusst (Abbildung 4.47 D). Dabei zeigt sich, dass Veränderungen des Arginins in der -1-Position die Deacetylierung begünstigen, wobei es unabhängig ist, ob des Arginin methyliert oder durch Citrullin ersetzt wurde. Die Phosphorylierung in der +1- und +2-Position verringert die Deacetylaseaktivität von Sirt2 am H3K9ac. Zusätzlich wurde auch die H3K27-Modifizierungsstelle mit Sirtuin2 untersucht (Abbildung 4.48). Es bestätigt sich auch hier, dass die Methylierung von H3R26 oder acetyliertes H3K23 die Deacetylierung von H3K27ac begünstigen.

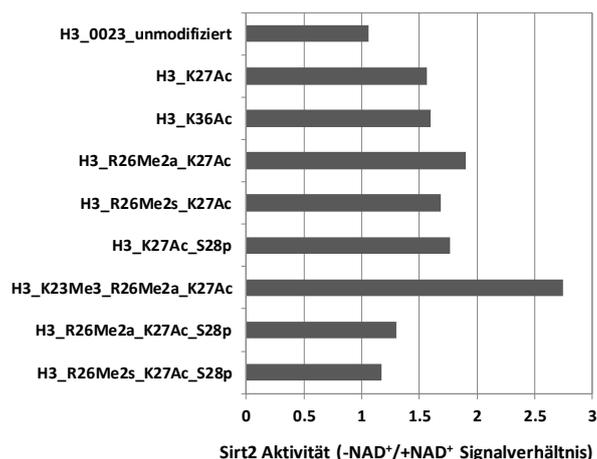


Abbildung 4.48: Sirtuin2 Aktivität an der H3K27-Modifizierungsstelle (SAPS-Variante) und dessen Beeinflussung durch *cross-talk* mit anderen PTMs.

4.4.2.3 Identifizierungen der Sequenzspezifitäten für Sirtuin1 und Sirtuin2

Aus den Datensätzen für Sirtuin1 und Sirtuin2 wurden alle monoacetylierten Peptide ausgewählt. Die Signale der acetylierten Peptide wurden ins Verhältnis zu ihren entsprechenden unmodifizierten Histonpeptiden gesetzt. Ein Signalverhältnis größer als 3 wurde als Akzeptanzgrenzengesetzt. Es wurden 201 solcher monoacetylierten Peptide identifiziert. Diese stellen den Referenzdatensatz dar. Die Substrate wurden durch die Signalabnahme definiert, die damit ein Maß für die Sirtuinaktivität darstellt. Die 10 besten Substrate aus den 201 Peptiden wurden nun ins Verhältnis zu dem Referenzdatensatz gesetzt, um die *Two-sample-Logos* zu generieren. Aus den in Abbildung 4.49 dargestellten *Two-Sample-Logos* der 10 besten Substrate wird ersichtlich, dass sowohl Sirtuin1 als auch Sirtuin2 eine Präferenz für Arginin in der -4-, -1-, +1- und +6-Position zeigt. Beide Sirtuine zeigen in der +2-Position eine Begünstigung für Asparagin oder Glutamin. In den Positionen -3, -2, -1, +1, +5 und +6 wird die Präferenz für ein Leucin ersichtlich. Beide Sirtuinisoforment ziehen zudem in der +5-Position eine saure Aminosäure vor, die von Sirtuin1 auch in der -6-Position begünstigt wird.

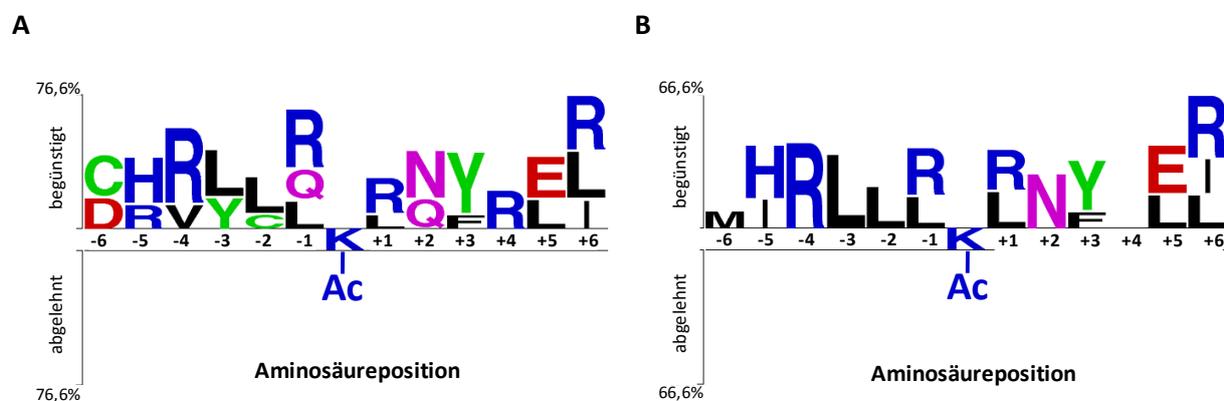


Abbildung 4.49: Two-sample Logos für die 10 besten Substrate von Sirt1 (A) und Sirt2 (B). Zur Erstellung der *Two-sample-Logos* wurden jeweils die 10 besten Substrate ins Verhältnis gesetzt zu den Referenzdatensatz. Der Referenzdatensatz setzte sich aus 201 monoacetylierten Peptide zusammen, die ein Signalverhältnis von acetylierten zu unmodifizierten Peptid > 3 zeigten.

4.4.2.4 *In vitro* Experimente Peptidsubstrate und MALDI-ToF

Einige der auf dem Histonmikroarray immobilisierten Peptide wurden von der JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, zur Verfügung gestellt und per MALDI-TOF analysiert. Die hier beschriebenen Experimente sind Vorabmessungen, da die Peptide mit nur einer Konzentration getestet wurden. Die getesteten Peptidsubstrate sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die MALDI-ToF-Spektren sind dem analogen Anhang A3 zu entnehmen. Die H3K27ac-Peptide (SAPS- und STPS-Varianten) wurden ausgewählt, um die Histonvariantenspezifität auch in Lösung zu untersuchen. Die Anzahl der Pluszeichen gibt die Güte des Substrates an bzw. in welchem Maß das Substrat durch Sirtuin deacetyliert wurde (Tabelle 4.4). Es wird ersichtlich, dass die Mikroarrayergebnisse in Lösung weitestgehend bestätigt werden konnten.

Tabelle 4.4: Vergleich der Mikroarrayergebnisse mit Lösungsexperimenten per MALDI-ToF-Analyse (MALDI). Es wurden dabei ausgewählte Substrate von Sirt1 und Sirt2 verglichen. Bewertung der Güte des Substrats wie folgt: +++ sehr stark deacetyliert, bis – als keinen bzw. negativer Effekt.

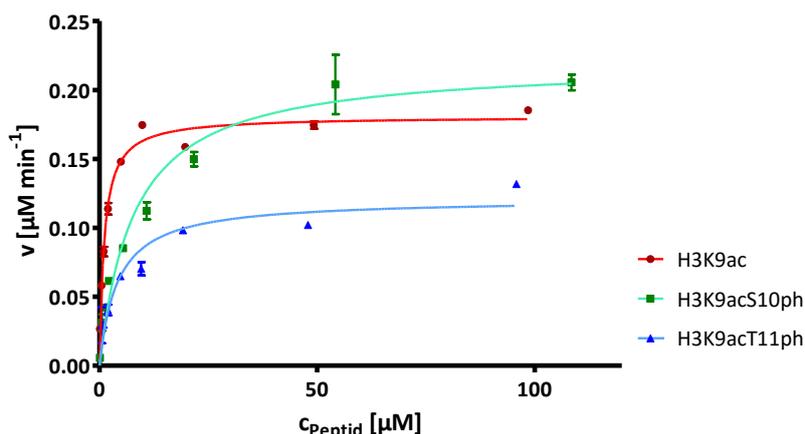
MALDI-ToF-Peptide	Sirtuin1 Mikroarray	Sirtuin1 MALDI	Sirtuin2 Mikroarray	Sirtuin2 MALDI
H3_K9ac H-ARTKQTARK(ac)STGGKAPR-NH ₂	++	++	+++	++
H3_K9ac_S10ph H-ARTKQTARK(ac)S(ph)TGGKAPR-NH ₂	+	+++	+	+
H3_K27ac_SAPS Ac-KAARK(ac)SAPSTGGVKKPHRYRK(Biotinoyl)-NH ₂	++	++	+++	+++
H3_K27ac_S28ph_SAPS Ac-KAARK(ac)S(ph)APSTGGVKKPHRYRK(Biotinoyl)-NH ₂	+++	++	+++	++
H3_K27ac_STPS Ac-KAARK(ac)STPSTCGVKKPHRYRPK(Biotinoyl)-NH ₂	+	+++	++	+++
H3_K27ac_S28ph_STPS Ac-KAARK(ac)S(ph)TPSTCGVKKPHRYRPK(Biotinoyl)-NH ₂	-	++	---	(+)

4.4.2.5 Kinetische Charakterisierung der H3K9-Peptidvarianten für Sirtuin1 und Sirtuin2

Für die kinetischen Untersuchungen der H3K9-Modifizierungsstelle wurden drei Peptide (H3K9ac, H3K9acS10ph, H3K9acT11ph) synthetisiert. Die Peptide wurden hier jedoch auf jeweils vier Aminosäuren um die Kac-Modifikationsstelle verkürzt und C-terminal mit zwei Tryptophanen für eine Detektion bei 280 nm versehen.²¹⁰

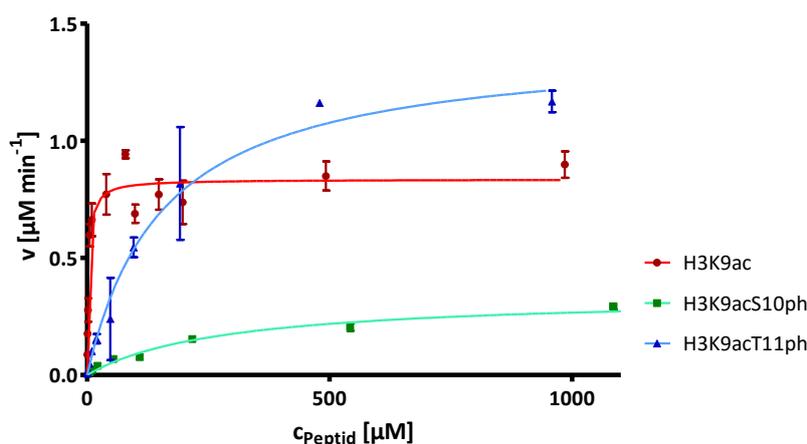
Die kinetische Charakterisierung für Sirtuin1 ist in Abbildung 4.50 dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die Phosphorylierung den K_M -Wert im Vergleich zum H3K9ac-Substrat verringert. Bei den katalytischen Effizienzen bewirkt dies die Änderung um eine Größenordnung.

Die $v/[S]$ -Charakteristik für Sirtuin2 zeigt hier einen deutlichen Einfluss der Phosphorylierung auf die Deacetylaseaktivität (Abbildung 4.51). Es wird ersichtlich, dass die Phosphorylierung in der +1-Position den K_M -Wert des H3K9acS10ph-Substrats etwa 100-fach und die Phosphorylierung in der +2-Position (H3K9acT11ph) ca. 50-fach verringert im Vergleich zum H3K9ac-Substrat. Die katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M ändern sich somit um 2 Größenordnungen.



Kinetische Konstante	H3K9ac	H3K9acS10ph	H3K9acT11ph
K_M [μM]	$1,078 \pm 0,1$	$7,939 \pm 1,3$	$4,158 \pm 0,95$
k_{cat} [s^{-1}]	$0,301 \pm 0,006$	$0,366 \pm 0,017$	$0,202 \pm 0,012$
k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$]	$2,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$

Abbildung 4.50: Kinetische Charakterisierung von Sirt1 und den H3K9-Peptidsubstraten. Die $v/[S]$ -Charakteristik für das acetylierte Substrat (H3K9ac) und die beiden zusätzlich phosphorylierten H3K9ac-Substrate (H3K9acS10ph und H3K9acT11ph) zeigt den Einfluss des *cross-talks* auf die Deacetylaseaktivität von Sirt1. Die Reaktionen wurden mit 10nM Sirt1, 1,5mM NAD^+ und variierenden Peptidkonzentrationen (0,5 – 100 μM) durchgeführt (pH-Wert 7,8 und Temperatur = 37°C). Darunter ist eine Zusammenfassung der kinetischen Parameter aufgelistet.



Kinetische Konstante	H3K9ac	H3K9acS10ph	H3K9acT11ph
K_M [μM]	$3,007 \pm 0,6$	$282,2 \pm 41$	$156,8 \pm 35$
k_{cat} [s^{-1}]	$0,139 \pm 0,005$	$0,057 \pm 0,003$	$0,236 \pm 0,019$
k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$]	$4,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$

Abbildung 4.51: Kinetische Charakterisierung von Sirt2 und den H3K9-Peptidsubstraten. Die Darstellung der $v/[S]$ -Charakteristik für das acetylierte Substrat (H3K9ac) und die beiden zusätzlich phosphorylierten H3K9ac-Substrate (H3K9acS10ph und H3K9acT11ph) zeigt den Einfluss des *cross-talks* auf die Deacetylaseaktivität von Sirt2. Die Reaktionen wurden mit 100nM Sirt2, 1,5mM NAD^+ und variierenden Peptidkonzentrationen (0,5 – 1000 μM) durchgeführt (pH-Wert 7,8 und Temperatur = 37°C). Darunter ist eine Zusammenfassung der kinetischen Parameter aufgelistet.

4.4.2.6 Kinetische Charakterisierung der H3K27-Peptidvarianten für Sirtuin1 und Sirtuin2

Da das ARKS-Motiv in der *N*-terminalen Region des Histon H3 zweimal vorkommt, wurden hier auch diese zwei Peptidsubstrate (H3K27ac, H2K27acS28ph) für eine kinetische Charakterisierung synthetisiert. Es wurde hier analog zu³⁶⁹ die SAPS-Variante ausgewählt.

Die kinetische Charakterisierung der beiden H3K27-Peptidsubstrate mit Sirtuin1 ist in Abbildung 4.52 dargestellt. Beide Peptide weisen sowohl ähnliche K_M - als auch k_{cat} -Werte auf.

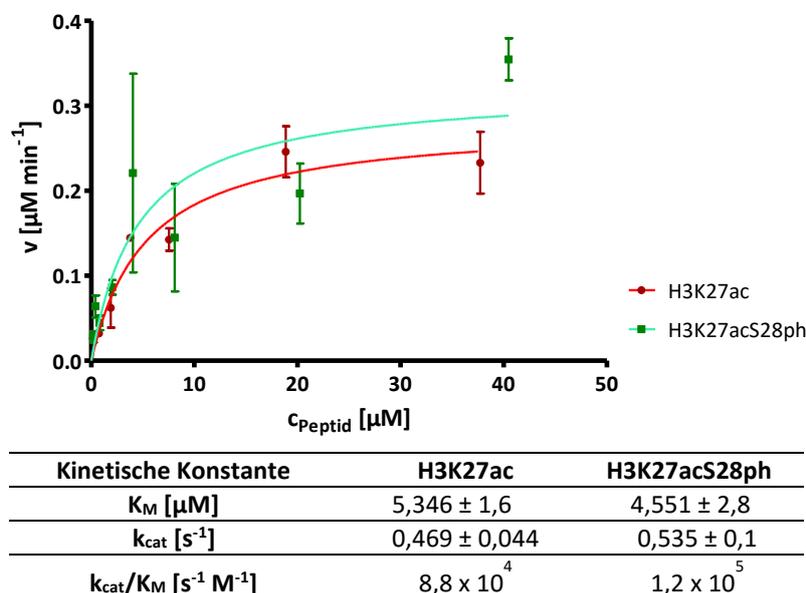


Abbildung 4.52: Kinetische Charakterisierung von Sirt1 und den H3K27-Peptidsubstraten. Die Darstellung der $v/[S]$ -Charakteristik für das acetylierte Substrat (H3K27ac) und das zusätzlich phosphorylierte H3K27acS28ph-Substrat zeigt den Einfluss des *cross-talks* auf die Deacetylaseaktivität von Sirt1. Die Reaktionen wurden mit 10nM Sirt1, 1,5mM NAD^+ und variierenden Peptidkonzentrationen (0,5 – 40 μM) durchgeführt (pH-Wert 7,8 und Temperatur = 37°C). Darunter ist eine Zusammenfassung der kinetischen Parameter aufgelistet.

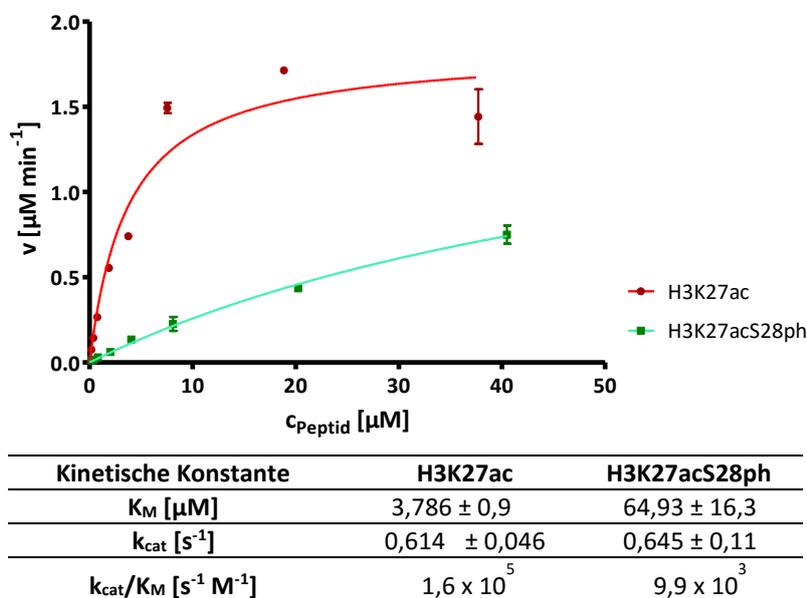


Abbildung 4.53: Kinetische Charakterisierung von Sirt2 und den H3K27-Peptidsubstraten. Die Darstellung der $v/[S]$ -Charakteristik für das acetylierte Substrat (H3K27ac) und das zusätzlich phosphorylierte H3K27acS28ph-Substrat zeigt den Einfluss des *cross-talks* auf die Deacetylaseaktivität von Sirt2. Die Reaktionen wurden mit 50nM Sirt2, 1,5mM NAD^+ und variierenden Peptidkonzentrationen (0,5 – 40 μM) durchgeführt (pH-Wert 7,8 und Temperatur = 37°C). Darunter ist eine Zusammenfassung der kinetischen Parameter aufgelistet.

Die kinetische Charakterisierung von Sirtuin2 und den H3K27-Peptidsubstraten (Abbildung 4.53) zeigt einen Einfluss der Phosphorylierung auf die Deacetylaseaktivität von Sirtuin2. Dies bewirkt einen fast 20-fach niedrigeren K_M -Wert für das H3K27acS28ph-Substrat im Vergleich zum H3K27ac-Substrat.

4.4.2.7 Untersuchung der Substratspezifität von Sirtuin6 auf Histonmikroarrays

In dieser Arbeit sollte Sirtuin6 hinsichtlich der Sequenzspezifität und Acylspezifität auf den Histonmikroarrays untersucht werden. Aufgrund der sehr geringen Sirt6-Aktivität konnten keine Signale detektiert und somit auch keine Sequenz- und Acylspezifität nachgewiesen werden (Abbildung 4.54). Die Lösungsexperimente mit den oben genannten Peptidsubstraten und Sirtuin6 erbrachten keine Ergebnisse.

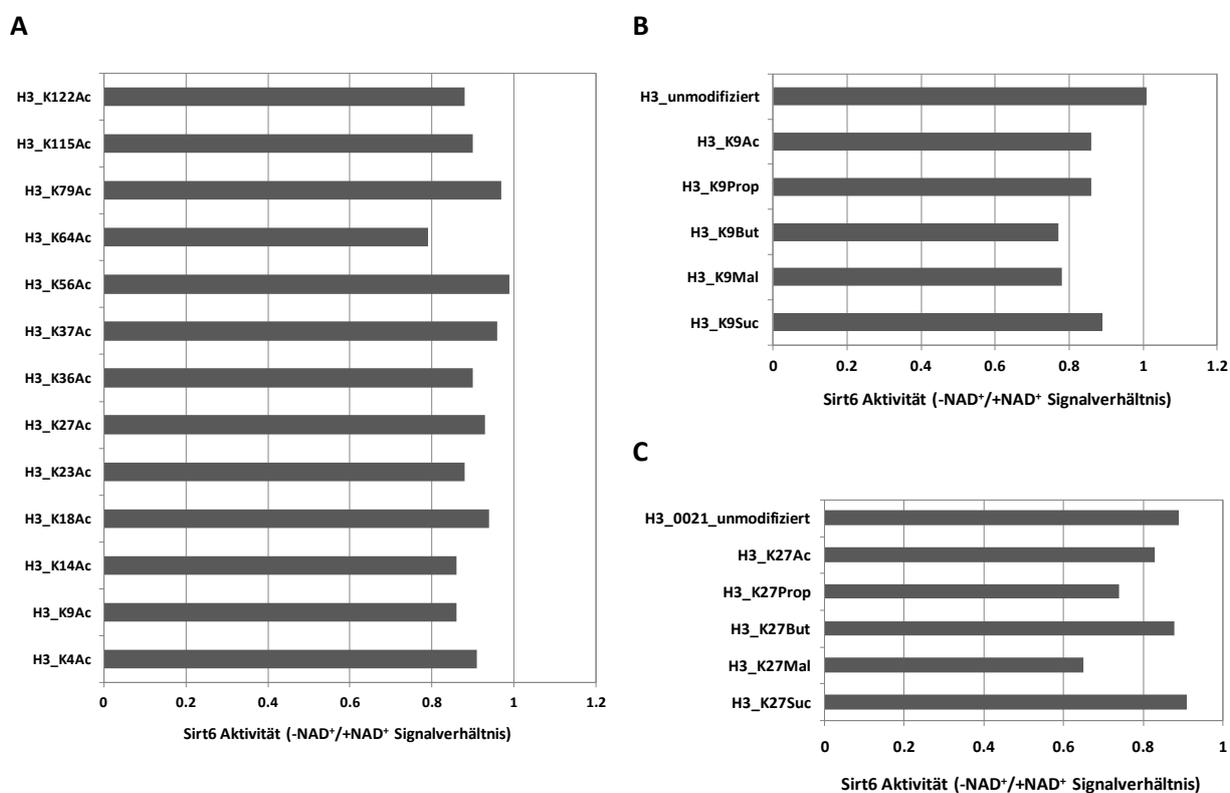


Abbildung 4.54: Substratspezifität von Sirtuin6. **A** Sequenzspezifität von Sirt6 für die acetylierten Lysine des Histons H3. Die Darstellungen der Acylspezifität von Sirt6 für die Modifizierungsstellen H3K9 (**B**) und H3K27 (**C**) zeigen keine Deacetylaseaktivität von Sirt6 für die jeweiligen acylierten Peptide im Vergleich zum entsprechenden unmodifizierten Peptid.

4.4.2.8 Untersuchung der Substratspezifität von Sirtuin7 auf Histonmikroarrays

Die Untersuchung von Sirtuin7 auf den Histonmikroarrays konnte keine Deacetylierung nachweisen (Abbildung 4.55). Die Lösungsexperimente mit den synthetisierten H3-Substraten und Sirtuin7 erbrachten keine Ergebnisse.

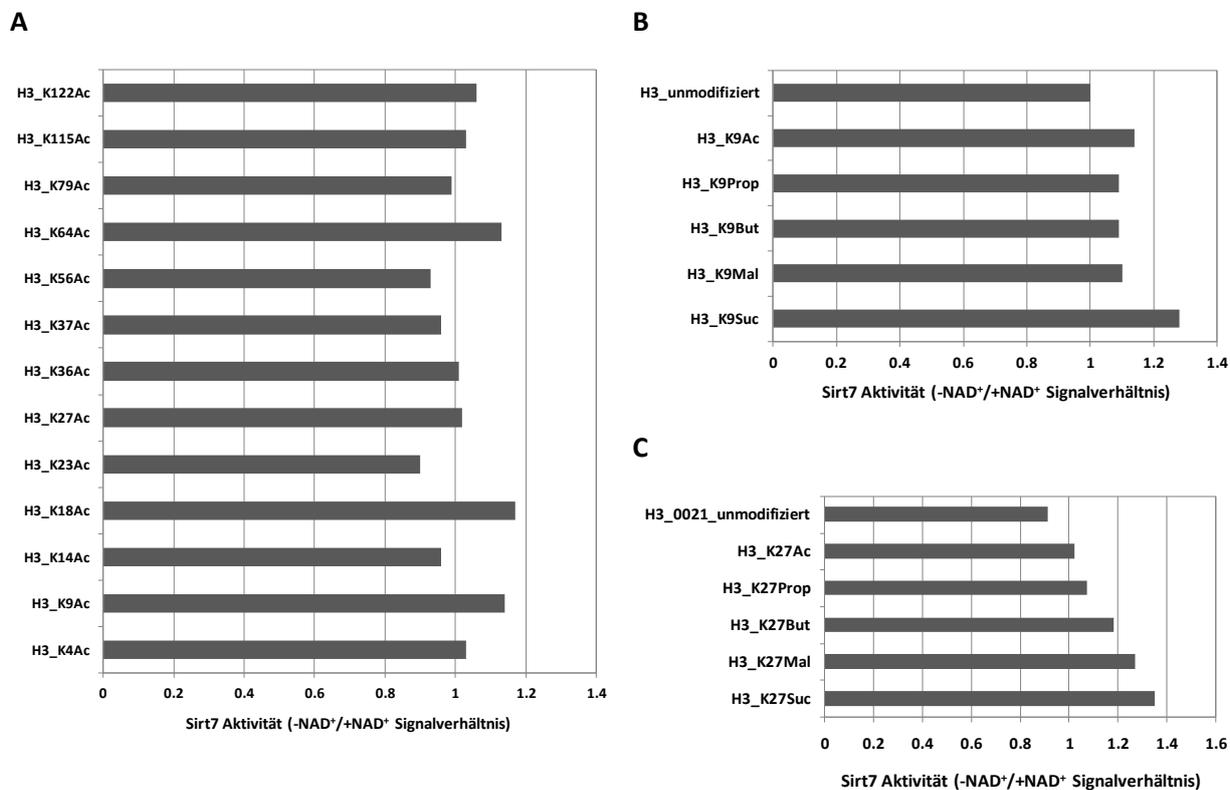


Abbildung 4.55: Substratspezifität von Sirtuin7. **A** Sequenzspezifität von Sirt7 für die acetylierten Lysine des Histons H3. Die Darstellungen der Acylspezifität von Sirt7 für die Modifizierungsstellen H3K9 (**B**) und H3K27 (**C**) zeigen keine Deacylaseaktivität von Sirt7 für die jeweiligen acylierten Peptide und den Vergleich zum entsprechenden unmodifizierten Peptid.

4.4.2.9 Untersuchung der Substratspezifität von Sirtuin5 auf Histonmikroarrays

Auch Sirtuin5 wurde auf den Histonmikroarrays charakterisiert. Am Beispiel des Histons H3 und den 13 Einzel-succinylierten Lysinen wurde die Sequenzspezifität von Sirt5 untersucht (Abbildung 4.56 A). Mit Ausnahme des H3K37suc, sind alle Lysine desuccinyliert wurden. Dabei zeigt sich für H3K64, H3K56 und H3K18 eine hohe Desuccinylaseaktivität (Abbildung 4.56 A). Die Desuccinylaseaktivität als auch eine Demalonylaseaktivität von Sirtuin5 konnte anhand der H3K9- (Abbildung 4.56 B) als auch der H3K27-Modifizierungsstelle (Abbildung 4.56 C) demonstriert werden.

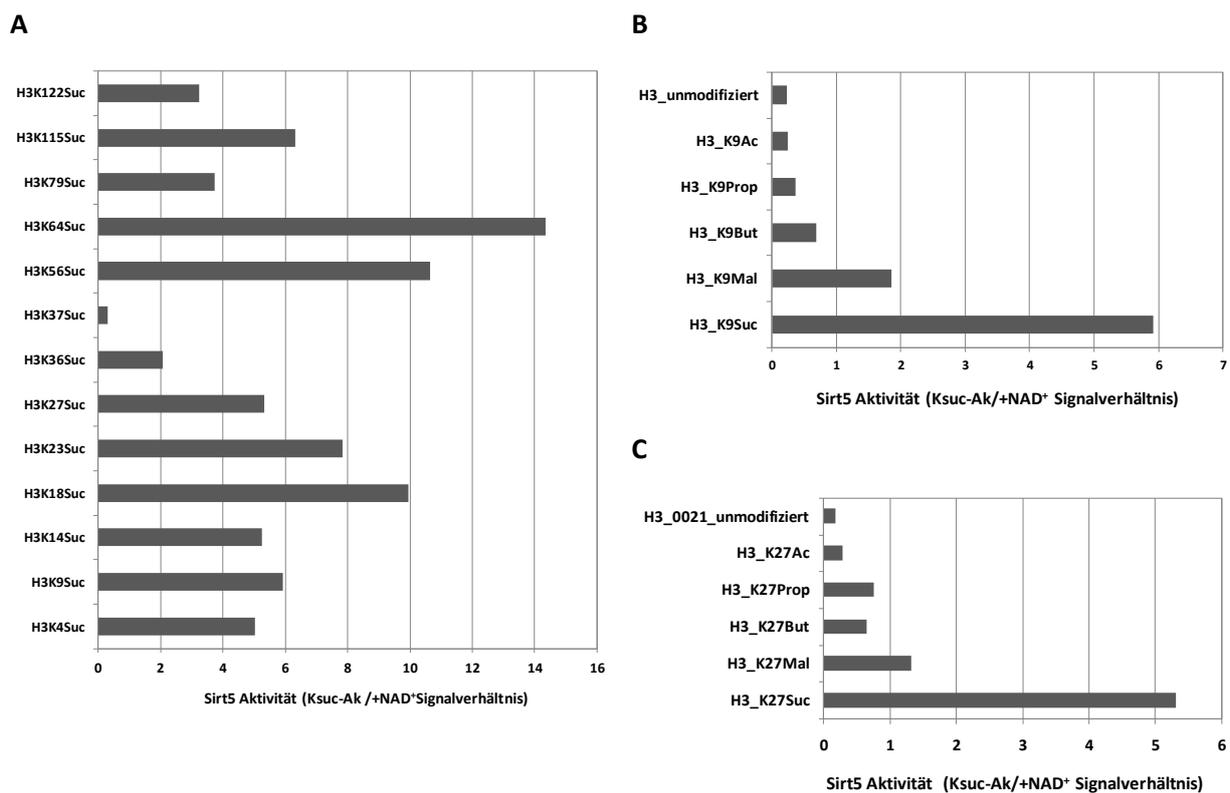


Abbildung 4.56: Substratspezifität von Sirtuin5. **A** Sequenzspezifität von Sirt5 für die succinylierten Lysine des Histons H3. Die Darstellungen der Acylspezifität von Sirt5 für die Modifizierungsstellen H3K9 (**B**) und H3K27 (**C**) zeigen die Deacylaseaktivität von Sirt5 für die jeweiligen acylierten Peptide und den Vergleich zum entsprechenden unmodifizierten Peptid.

5 Diskussion

5.1 Identifizierung von Bindungsspezifitäten

5.1.1 Bindung von modifikations- und sequenzspezifischen Antikörpern

Für die Charakterisierung von Histonmodifikationen werden oft modifikations- und sequenzspezifische Antikörper eingesetzt. Dabei unterscheidet sich die Bindungsspezifität der Antikörper oft von den Herstellerangaben. Mit Hilfe der Histonmikroarrays ist es möglich vergleichende Untersuchungen durchzuführen, um die Sequenzspezifitäten der Antikörper als auch die Kreuzreaktivität mit anderen Modifikationen zu analysieren. Die Analyse der modifikationsspezifischen Antikörper zeigte beispielsweise eine Succinylspezifität und keine Sequenzspezifität des anti-Ksuc-Antikörpers. Die anti-Kac-Antikörper erkennen einen Großteil aller monoacetylierten Peptide, allerdings weisen zwei der anti-Kac-Antikörper Kreuzreaktivitäten auf. So bindet der anti-Kac-Antikörper 2 an eine Reihe von Peptiden mit methylierten Lysinen und Argininen, sowie phosphorylierten Serinen und Threoninen. Sowohl anti-Kac-Antikörper 1 als auch anti-Kac-Antikörper 2 zeigen eine Kreuzreaktivität zu propionylierten Lysinen, was durch die sehr ähnliche chemische Struktur der beiden Acylierungen begründet sein könnte. Am spezifischsten von den hier getesteten anti-Kac-Antikörpern ist der anti-Kac-Antikörper 3.

Sequenzspezifische Antikörper spielen eine zentrale Rolle in der epigenetischen Proteomforschung. Dabei sind besonders die Chromatin Immunopräzipitation^{391–394} und die MS-basierten Proteomanalysen^{395,396} auf die spezifische Interaktion der Histone mit den eingesetzten Antikörpern angewiesen.

Da eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse allerdings von der Spezifität des Antikörpers abhängt, wird eine detaillierte Information über die Bindungsspezifität der eingesetzten Antikörper für die jeweiligen Experimente benötigt. Die Validierung der eingesetzten Antikörper ist ein wesentlicher und notwendiger Schritt, vor allem von *in vivo* Experimenten. Da das Verständnis, wie PTMs an Histonen in Normal- und Krankheitszuständen wirken, von der Qualität der verwendeten Antikörper abhängt, sind stringente Qualitätskontrollen der Antikörper notwendig. So sollten die Antikörper hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, der Kreuzreaktivität (gegenüber anderen Modifikationen oder anderen Modifizierungsgraden oder sogar mit anderen Proteinen), unspezifische Bindung, Variabilität zwischen den Produktchargen, Beeinflussung durch *cross-talk* von benachbarten PTMs oder dem biologischen Einsatzgebiet untersucht werden. Die hohe Rate an Spezifitätsproblemen der Antikörper wirft Bedenken an der Gültigkeit von vielen publizierten ChIP-Daten auf, da diese ohne eine unabhängige Charakterisierung und Validierung der Antikörper (vor Ihrem Einsatz) publiziert wurden.

Zurzeit ist kein standardisiertes Verfahren etabliert, was eine vergleichende, detaillierte Analyse der Bindungsspezifitäten der modifikations- und sequenzspezifischen Antikörper ermöglicht. Dabei wur-

den bereits diverse Strategien vorgeschlagen, um die Antikörperqualität zu verbessern: entweder durch CHIP-Kontrollen³⁹⁷, Vorkehrungen vor dem Einsatz in Western Blots⁴⁶, oder anderen Methoden zur Validierung³⁹⁸ und Erhöhung der Reproduzierbarkeit.^{399,400}

Eine einfache und sensitive Methode zur quantitativen Charakterisierung von poly- und monoklonalen Antikörpern für PTMs in einem Hochdurchsatzverfahren stellen die Peptidmikroarrays dar. Mittels der hier genutzten Peptidmikroarrays konnte dabei der Einfluss von unterschiedlichen Modifikationsgraden (Kme1, Kme2, Kme3) und der Einfluss der Epitoperkennung durch benachbarte umgebende PTMs auf die Antikörperbindung bestimmt werden.

Die Analyse der Histonmikroarrays ergab für die anti-H4K16ac-spezifischen Antikörper neben der Bindung an H4K16ac eine bevorzugte Bindung an multiple Lysinacetylierungen. Obwohl dieser Effekt bereits beschrieben wurde⁴⁴, konnte durch Peptidmikroarrayanalysen (und Analysen von Peptiden mit Lysin-Glutamin-Austausch) ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt durch eine Maskierung der Ladung verursacht wird.³⁸ Allerdings weisen insbesondere auch diese beiden anti-H4K16-Antikörper eine hohe Kreuzreaktivität gegenüber anderen PTMs auf, was generell für eine geringe Spezifität des Antikörpers spricht (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Histonmikroarrayergebnisse der 14 getesteten sequenzspezifischen Antikörper. k.A. = keine Angabe

Sequenz-spezifischer Antikörper	Modifikations-Spezifität	Sequenz-Spezifität	Kreuzreaktivität gegenüber anderen			Cross-talk	Histonvariantenspezifität
			PTMs	Methyl-graden	Histonen		
H4K16aC ^{Millipore}	Nein	Nein	Ja	k.A.	Ja	Ja	Ja
H4K16aC ^{SantaCruz}	Nein	Nein	Ja	k.A.	Ja	Ja	Ja
H3K4me1	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
H3K4me2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja
H3K9me1	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
H3K9me2	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
H3K9me3	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
H3K27me3	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
H3K27me2me3	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
H3K36me1	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	k.A.	Ja
H3K36me2	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	k.A.	Ja
H3K36me3	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
H3S28ph	Nein	Ja	Ja	k.A.	Nein	Ja	Ja
H2AH4S1ph	Nein	Nein	Ja	k.A.	Ja	Ja	Ja

Neben der Erkennung anderer PTMs, ist der Einfluss benachbarter PTMs ein weiteres Problem, wie es sich bei den anti-H3K9me3-Antikörpern zeigte. Insbesondere der Einfluss der benachbarten Phosphorylierung des H3S10 scheint sich zu bestätigen, was die biologische Relevanz dieser Histonregion bestätigt.^{341,345} Eine Beeinträchtigung der benachbarten Phosphorylierung H3S28 auf die Bindung konnte auch für den anti-H3K27me3-Antikörper verifiziert werden. Der dual-spezifische anti-

H3K27me2me3-Antikörper zeigte von allen hier getesteten sequenzspezifischen Antikörpern die höchste Spezifität.

Damit zeigen die Daten die Relevanz der Antikörperauswahl für eine akkurate Unterscheidung zwischen den einzelnen posttranslationalen Modifikationen und den Methylierungsgraden. Eine inkorrekte Entschlüsselung der Histonmethylierung in der genomweiten Analyse aufgrund der Antikörperkreuzreaktivität kann mit spezifischen Antikörpern ausgeschlossen werden.

Neben der hier durchgeführten Charakterisierung von sequenzspezifischen Antikörpern haben sich in den letzten Jahren auch eine Reihe anderer Gruppen dieser Problematik gewidmet und vergleichende Studien mit Mikroarrays durchgeführt, um die Antikörper besser hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften und Spezifitäten zu charakterisieren.^{37,38,40,116} Und obwohl die Anzahl der untersuchten Antikörper (zwischen 36⁴⁰ und 246³⁷) schwankte, war die Gesamtaussage gleich erschreckend: bis zu 40% aller getesteten sequenzspezifischen Antikörper¹¹⁶ sind kreuzreaktiv oder binden an mehr als nur ein Ziel. Allerdings heben die Studien auch hervor, dass eine schlechte Leistung in dem einen Assay nicht unbedingt bedeutet, dass der Antikörper auch in anderen Assays schlecht arbeitet. Deshalb sollten die Ergebnisse immer mit verschiedenen Assays validiert werden.³⁷

Die hier gezeigten Mikroarraydaten ergänzen die oben genannten Studien und verdeutlichen eine Notwendigkeit zur Charakterisierung der über 2 Millionen auf dem Markt erhältlichen Antikörper.³⁵ Deshalb haben verschiedene Gruppen Ihre Ergebnisse der getesteten Antikörper auf freizugänglichen Datenbanken veröffentlicht (histoneantibodies.com, compbio.med.harvard.edu/antibodies/, antibodypedia.com, antibodies-online.com, antibodyregistry.org, pabmabs.com/wordpress, discover.nci.nih.gov/abminer/, sowie diverse *Homepages* der Antikörper vertreibenden Unternehmen).^{35,37,38,401} Die Datenbanken ergänzen sich dabei, da einige auf die Spezifitäten der Antikörper³⁸ und andere auf die Anwendbarkeit in den verschiedenen biochemischen Assays³⁷ fokussieren. Hier könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten noch einmal das Spektrum der Datenbanken erweitern und neue Informationen anbieten. Dies betrifft insbesondere Informationen zur Kreuzreaktivität auf unterschiedliche Methylierungsgrade, das breiteste Spektrum an präsentierten Acylierungsgraden der derzeit erhältlichen Histonmikroarrays, die Vielzahl an Einzel-PTMs und PTM-Kombinationen, sowie der Histonvariantenspezifität.

Die Histonvariantenspezifität der sequenzspezifischen Antikörper wurde bisher noch nicht untersucht und ist auch in den Datenbanken bislang nicht adressiert worden. Für 12 der 14 in dieser Arbeit getesteten sequenzspezifischen Antikörper konnte eine Histonvariantenspezifität nachgewiesen werden, da auf dem Histonmikroarray alle bisher auf UniProt verfügbaren Histonvarianten (15 H2A-Varianten, 15 H2B-Varianten, 5 H3-Varianten und 1 H4-Variante) präsentiert sind.

5.1.2 Bindung von Readerdomänen

Readerdomänen sind in der Regulation von epigenetischen Signalen von großer Bedeutung, da sie die spezifischen PTM-Muster der Histone in die biologische Funktion übersetzen. Dies wird realisiert durch die Bindungsspezifität und Sequenzspezifität der jeweiligen Readerdomäne, als auch durch den Einfluss von zusätzlichen umgebenden PTMs.

Aus der Bestimmung der Selektivität der Bromodomänen BRD4(1) und BRD4(2) gegenüber den acetylierten Peptiden ist keine Acetylselektivität feststellbar. So kann geschlossen werden, dass die acetylierten Peptide nicht besser erkannt werden als die entsprechenden unmodifizierten Peptide. Der schwache Beitrag der Acetylierung des Lysins zu der Bindungsaffinität von BRDs macht die Interaktion von BRDs anfällig für Veränderungen in der Umgebung der Acetylierungsstelle. Die Einführung einer zusätzlichen benachbarten PTM, insbesondere einer Phosphorylierung (z.B. H4Y98ph), resultiert in einer reduzierten Bindungsaffinität der Bromodomänen gegenüber dem adressierten modifizierten Peptid. Dies lässt auf eine Kopplung der Phosphorylierungssignalwege mit den epigenetischen Regulationsmechanismen schließen, wie es auch von Filippakopoulos *et al.* vermutet wird.¹⁶²

Darüber hinaus wurde beschrieben, dass viele Bromodomänen an polyacetylierte Histone binden^{162,239}, was auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. BRD4(1) weist eine Interaktion mit polyacetylierten Histon H4-Peptiden auf, wobei die Mehrheit der identifizierten Peptide an drei oder vier Lysinen acetyliert war. BRD4(2) bindet vor allem an N-terminale H4-Peptide, die mindestens zwei acetylierte Lysine enthalten (elektronischer Anhang E2).

Der geringe Einfluss der Lysinmodifikation auf die Bindung lässt sich auch in den Mikroarraydaten für die Interaktion an andere Lysinacylierungen bestätigen. So zeigt sich für die untersuchten Bromodomänen BRD4(1) und BRD4(2) eine Sequenzspezifität, aber keine klare Acylspezifität. Eine Begründung liegt hier in den Unterschieden der konservierten Bindungstasche der BRDs und den von stark negativ bis stark positiv geladenen, Kac-umgebenden Oberflächen, die den BRDs suggerieren, verschiedene Sequenzen zu erkennen.¹⁶² Beide Bromodomänen weisen die stärkste Bindung gegenüber acetyliertem Lysin auf. Dennoch konnten die hier präsentierten Mikroarraydaten zeigen, dass auch acylierte Lysine von Bromodomänen gebunden werden, was sich auch mit den Resultaten anderer Studien deckt. Die Erkennung von propionyliertem Lysin durch BRD4 wurde von Vollmuth und Geyer bestätigt.⁴⁰² Dabei scheinen fast alle Bromodomänen sowohl acetylierte als auch propionylierte Lysine zu binden³³³, was durch ein konserviertes Asparagin in der Bindungstasche verursacht wird, das die Acetylcarbonylgruppe durch Wasserstoffbrücken „verankert“. Wird dieses Asparagin gegen ein Tyrosin ausgetauscht, wie es in der Unterfamilie der nicht-kanonischen BRDs der Fall ist, wird diese Bindungstasche blockiert.¹⁶² In diesem Fall ist keine Bindung mehr möglich, oder aber eine Bindung an einer anderen Bindungstasche wird favorisiert.⁴⁰³ Die Analyse der Mikroarraysdaten zeigte für die untersuchten Bromodomänen BRD4(1) und BRD4(2) ebenfalls eine Bindung gegenüber butyrylierten

und succinylierten Lysinen, wenn letztere auch nur mit etwa halbiertes Bindungsaffinität. Dies wird bestätigt durch Flynn *et al.*, die eine Teilmenge von Bromodomänen identifizieren konnten, die Butyryllysine und Crotonyllysine an Histonen binden.³³³ Allerdings war in dieser Studie keine der getesteten Bromodomänen, auch nicht BRD4, in der Lage succinylierte Lysine zu binden.³³³ Die Studie zeigt, dass auch die längerkettigen Acylierungen nicht den Acetylierungen vorgezogen werden, was sich auch mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten deckt.

Da die Interaktion von acetylierten Lysinen mit den Bromodomänen eher schwach ist, arbeiten oft mehrere *Readerdomänen* (innerhalb eines Komplexes) zusammen.^{151,162,239,337} Dabei können auch Enzyme *Readerdomänen* enthalten. Beispiele sind hier die Histonacetyltransferasen GCN5 und PCAF, die eine Bromodomäne zur Erkennung acetylierter Histone enthalten.²⁴⁰ So können *in vivo* höhere Bindungsaffinitäten für die spezifische Bindung an die Zielmodifikationsstellen realisiert und Enzyme an das Chromatin rekrutiert werden. Aber auch die Feinabstimmung der epigenetischen Regulation wird oft über eine Kombination von verschiedenen einzelnen PTMs und daran gebundener *Readerdomänen* realisiert.⁴⁰⁴

Die vielfältige Wechselwirkung von PTMs und *Readerdomänen*, mit der synergistischen oder antagonistischen Wirkung innerhalb der epigenetischen Regulation, verlangt noch weitere Untersuchungen. Zukünftige Studien würden so die Entwicklung neuer pharmakologischer Ziele und Biomarker ermöglichen. Ein Beispiel ist hier die Entwicklung von *small molecule* Inhibitoren, die mit dem Acetyllysine um die Bindung an die Bromodomänen konkurrieren und dadurch die Funktionen der BRDs innerhalb ihrer Proteinkomplexe stören.^{249,405,406} und vielversprechende Ergebnisse in den vorklinischen Phasen zeigten.^{407–409} Allerdings sollten die Ergebnisse der Bindungsstudien auf kombinatorischen Bibliotheken kritisch betrachtet werden, weil es möglich ist, dass einige dieser PTMs so *in vivo* nicht vorkommen.¹⁵¹ Dies kann bei den in dieser Arbeit verwendeten Histonmikroarray ausgeschlossen werden, da hier nur beschriebene PTM-Kombinationen präsentiert wurden.

Insgesamt zeigen die Mikroarraydaten, dass die Peptidsequenz einen größeren Einfluss auf die Bindungsspezifität der BRDs hat, als die Acylspezifität, multiple Modifizierungen oder der *cross-talk* mit anderen PTMs, was sich auch mit den Literaturdaten deckt.^{162,265}

Zusätzlich konnten in dieser Arbeit auch die Bindungsspezifitäten anderer *Readerdomänen* identifiziert werden. So konnte für die Tudor-ähnliche Domäne Spindlin1 eine Methylspezifität und für die methylspezifische Chromodomäne CHD1 eine Sequenzspezifität nachgewiesen werden.

5.2 Identifizierung der Substratspezifitäten von *Writern*

5.2.1 Nachweis der Acetylierung durch Acetyltransferasen

Die Untersuchung von vier ausgewählten Acetyltransferasen auf dem Acetylom-Mikroarray hatte das Ziel spezifische Substrate für die einzelnen KATs zu identifizieren. Die Analyse der Mikroarraydaten

konnte das Potential der Acetylom-Mikroarrays für die Ermittlung der Substratspezifität der hier untersuchten Acetyltransferasen als Methode zum Selektivieren von Substraten bestätigen. Dies wurde zum einen durch die geringe Anzahl der potentiell acetylierbaren auf dem Mikroarray präsentierten Substrate gezeigt. Diese verdeutlichen eine Substratspezifität der KATs (Abschnitt 4.3.1). Das Acetyltransferasen sehr wenige Lysine innerhalb eines Proteins modifizieren, ist bekannt.⁴¹⁰ Die Acetylierung sorgt damit für die DNA-Bindung^{411–414}, die Regulierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (z.B. mit Bromodomänen) und Proteininstabilität.⁴¹⁴ Zum anderen konnten für die vier untersuchten KATs *Two-sample-Logos* der ermittelten Substrate erstellt werden, was die bevorzugte Aminosäureumgebung zu der Acetylierungsstelle angibt. Zwar konnten mehrere Studien die Sequenzmotive für Acetylierungsstellen innerhalb verschiedener Zellkompartimente oder für verschiedenen Spezies zeigen^{395,415–419}, jedoch sind für p300, PCAF und Tip60 bislang keine Sequenzlogos publiziert worden. Für GCN5 wurde eine Spezifität in der Erkennung der Sequenz G-K-x-P¹⁸⁴ und S/A-x-K-R/K-L/P⁴²⁰ publiziert, die sich in den Eigenschaften der Aminosäuren auch auf dem Acetylom-Mikroarray (A-K-H/V-L/P) widergespiegelt hat. Das in dieser Arbeit ermittelte *Two-sample-Logo* erlaubt hier eine zusätzliche Auskunft über einen breiteren Sequenzbereich (-6- bis +6-Position) für akzeptierte Substrate. Allerdings wurde kürzlich von Simic *et al.* gezeigt, dass Acylierungen auch spontan ablaufen können, abhängig davon, wie der Energiestatus der Zelle ist und wieviel Acyl-CoA vorliegt.⁴²¹ Das kann in dieser Arbeit weitestgehend ausgeschlossen werden, da sich die eingesetzte Ac-CoA-Konzentration an publizierten K_M -Werten für das Co-Substrat orientierte.

Für die Acetyltransferase p300 konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese auch Crotonylreste auf die Histone übertragen kann und dass diese in einer ähnlichen Weise wie Acetylierungen die transkriptionelle Aktivierung unterstützen.⁴²² Weitere zukünftige Untersuchungen, u.a. mit den Histonmikroarrays, werden hier Auskunft geben, ob die Acetyltransferasen auch noch andere Acylierungen katalysieren können.

5.2.2 Nachweis der ADP-Ribosylierung durch ADP-Ribosyltransferasen

Zur Untersuchung der ADP-Ribosylierung wurden zwei Vertreter durch Acetylom-Mikroarrays genauer charakterisiert, zum einen die Poly-ADP-Ribosyltransferase ARTD1 und zum anderen die Mono-ADP-Ribosyltransferase ARTD10. Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass es nicht nur möglich ist Substrate von ADP-Ribosyltransferasen auf Peptidmikroarrays zu identifizieren, sondern auch deren Sequenzspezifität zu ermitteln. Die detektierten Signale der beiden Experimente unterschieden sich in der Form, dass die Signale für ARTD10 auf einen größeren Bereich verteilt waren. Dies könnte durch die Zugänglichkeit des Antikörpers begründet sein. Hier wären die Epitope zu hoch konzentriert, so dass der Antikörper nicht mehr binden kann.

Für die beiden untersuchten ADP-Ribosyltransferasen konnten *Two-sample*-Logos der 200 besten Substrate erstellt werden, welche das favorisierte Aminosäuremuster und damit die Sequenzspezifität der einzelnen ADP-Ribosyltransferasen indizieren (Abschnitt 4.3.2). Hier muss allerdings dazu gesagt werden, dass die *Two-sample*-Logos nur dann gültig sind, wenn angenommen wird, dass die ADP-Ribosyltransferasen das zentrale Lysin modifizieren. Es ist bislang nicht bekannt, auf welche Aminosäurereste sie übertragen. Lysin, Arginin, Glutamat, Aspartat, Cystein, Phosphoserin und Asparagin wurden als bekannte ADP-Ribose-Akzeptorstellen in eukaryotischen Zellen beschrieben³⁰⁷, was sich tendenziell so auch in den analysierten Aminosäureverteilungen bestätigen lässt. Allerdings können die Lysine auch Akzeptorstellen für Auto-ADP-Ribosylierung sein.³⁰⁶ Kleine *et al.* konnten Glutamat 882 (E882) als eine wichtige Akzeptorstelle von PARP10 für Auto-ADP-Ribosylierung identifizieren.³¹⁹ Die Länge der Poly-ADP-Riboseketten steigert sich dabei proportional zu der Menge an verfügbaren NAD⁺.³⁰⁶ So wurden sowohl das R/H-G-T/S-Motiv als auch das S-T-S-Motiv als essentiell für die NAD⁺-Bindung beschrieben.³⁰⁷ Beide Motive zeigen sich nicht in den *Two-sample*-Logos der hier untersuchten ARTDs, weshalb eine auf NAD⁺-beruhende ADP-Ribosylierung oder eine Auto-ADP-Ribosylierung ausgeschlossen werden kann.

Bislang ist nur wenig bekannt, wie die Substraterkennung durch ARTDs abläuft. Auch wird die Substratspezifität wahrscheinlich durch multiple Parameter beeinflusst. Dies erklärt u.a. die Uneinigkeit der publizierten Fakten: so wurde für ARTD1 einerseits ADP-Ribosylierung an Glutamat von H2B und H1³⁰⁶, andererseits aber Lysin als die eigentliche Zielmodifikationsstelle für die durch ARTD1-vermittelte ADP-Ribosylierung^{306,423} beschrieben. Das Anhängen von ADP-Ribose kehrt die Ladung der positiv-geladenen Lysinseitenkette in eine negative Ladung um. Deshalb wird angenommen, dass die ADP-Ribosylierung einen größeren Einfluss auf die Chromatinstruktur, -funktion und -dynamik hat als andere Modifikationen, wie z.B. Acetylierung.³⁰⁶ Der Einsatz von modifizierten NAD⁺, wie biotinyliertes, radioaktiv-markiertes oder etheno-NAD⁺⁴²⁴ würde es hier ermöglichen ADP-ribosylierte Proteine zu detektieren, und damit helfen weitere Informationen zur Substraterkennung der ARTDs zu gewinnen. Eine andere Möglichkeit ist, die gebildeten ADP-ribosylierten Peptide mit Phosphodiesterase in Mikroarray-gebundene, phosphorylierte Ribose-Peptid-Konjugate zu zerlegen und diese phosphorylierten Konjugate mit einem phosphospezifischen Fluoreszenzfarbstoff nachzuweisen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die enzymatische Reaktion der ADP-Ribosyltransferasen auch auf Peptidmikroarrays durchführbar ist. Der Einsatz von den Histonmikroarrays würde helfen, den Einfluss von anderen Modifikationen auf die Enzymkatalyse des ADP-Ribose-Transfers zu untersuchen.

5.2.3 Nachweis der Phosphorylierung durch Kinasen

Im Gegensatz zur Acetylierung, bei der noch keine Signalkaskaden durch Acetylierung bekannt sind, trägt die Phosphorylierung durch Signalverstärkung erheblich zur Übertragung eines biologischen Signals bei. Das Anhängen der Phosphatgruppe ändert die negative Ladung des Histons und beeinflusst damit die Chromatinstruktur.⁴ Dennoch ist für die meisten Kinasen noch nicht bekannt, wie diese zu den Phosphorylierungsstellen rekrutiert werden.

Mit Hilfe der Annotated PhosphoSites- und Histonmikroarrays konnte in dieser Arbeit eine erfolgreiche Phosphorylierung für alle untersuchten Kinasen MSK1, Prk1, Wee1 und Myt1 nachgewiesen werden. Dabei konnten für MSK1 und Wee1 nicht nur die bekannten Phosphorylierungsstellen bestätigt werden, sondern auch neue Modifizierungsstellen identifiziert werden (Abschnitt 4.3.3).

Die Ergebnisse der Untersuchung von Prk1 konnte das Motiv RxxSR identifizieren, was dem typischen Prk1-Motiv entspricht.⁴²⁵ Die Motivanalyse zeigte ebenso eine Bevorzugung von Prk1 für die Motive RxxSxR, RxLS, RSxR, LxRxxS und ExxEE. Das ähnelt, bis auf das letzte Motiv, sehr den vielen Motivmustern von ACG-Kinasen, zu denen auch die Prk1 gehört.²⁷⁹ Allerdings konnten in den anderen Motiven, die weniger als 4-mal in den 23 Substraten auftraten, das Motiv S-D/E-x-D/E gefunden werden, was auf eine CK2-ähnliche Aktivität deutet. Eine erneute Motivanalyse, bei der alle Arginin-enthaltenen Peptide ausgeschlossen wurden, zeigt eine Präferenz für saure Aminosäuren (Tabelle 5.2). Als Grenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis > 130 angesetzt.

Tabelle 5.2: Motivanalyse der 25 argininfreien Peptide, die bei der Untersuchung von Prk1 auf dem Annotated PhosphoSites-Mikroarray ein Signal-Rausch-Verhältnis > 130 zeigten

Häufigkeit	Aminosäuremotiv
5	EEE
4	ExxEE
4	ExEE
3	VxExE
3	SxxExE
3	SxxEE
3	SxxED
3	SxTxxE
3	QKxxL
3	ExVxE
3	ExExE
3	ExEP
3	EExxE
3	EExE

Die Präferenz für saure Aminosäuren in den Motivanalysen verstärkte die Vermutung der Verunreinigung mit einer CK2-ähnlichen Kinase. Diese könnte möglicherweise durch eine mitelierte Sf9-Zellaktivität oder einer zufälligen Kontamination zweier unterschiedlicher Produkte verursacht worden sein (Information von Prof. Dr. M. Jung). Dies könnte auch der Grund sein, warum auf dem His-

tonmikroarray die Phosphorylierung der bekannten Prk1-Phosphorylierungsstelle H3T11 nicht bestätigt werden konnte. Da es jedoch gelang für die Kinase Prk1 neben dem bekannten Prk1-Motiv^{279,425} weitere Sequenzmotive zu identifizieren, könnte der Histonmikroarray auch Hinweise über neue Phosphorylierungsstellen von Prk1 in den Histonen geben. Diese müssten in weiteren Experimenten, z.B. durch Substitutionsanalysen der identifizierten Substrate oder massenspektrometrischen Analysen, verifiziert werden. Die Analyse des Histonmikroarrays konnte zusätzlich eine Verunreinigung durch CK2 ausschließen, da hier kein Signal für die für CK2 beschriebene Phosphorylierungsstelle H2AY57⁴²⁶ nachgewiesen werden konnte. Die H2AY57-Phosphorylierung durch CK2 reguliert die transkriptionelle Verlängerung. Damit ist CK2 neben einer Vielzahl anderer Kinasen an der epigenetischen Modulation beteiligt. Eine Übersicht über alle bislang publizierten Histonphosphorylierungen mit ihrer epigenetischen Funktion ist in der Tabelle im analogen Anhang A4 aufgelistet.

Für die vierte in dieser Arbeit untersuchte Kinase, Myt1, wurden bislang nur komplette Proteine als akzeptierte Substrate gefunden. Myt1 ist damit restriktiver als Wee1.²⁸³ Molekulare *Dockingsimulationen* von Rohe *et al.* schlagen vor, dass für diese Unterschiede die Erkennung der Substratstrukturen *N-terminal* von der Phosphorylierungsstelle verantwortlich sind.²⁸³ Die Analyse der Histonmikroarraydaten konnte jedoch zeigen, dass hier auch die Modifikationen *C-terminal* von der Phosphorylierungsstelle Einfluss auf die Aktivität von Myt1 haben (Abbildung 4.34). Allerdings wären weitere Studien mit Punktmutationen oder Substitutionen nötig, um die Phosphorylierungsstelle genauer einzugrenzen, da *N-terminal* einige Tyrosine und auch ein Threonin als Phosphatakzeptorstellen vorhanden sind. Myt1 konnte so erstmals auf Histonsubstrate charakterisiert werden, einschließlich der Untersuchung des *cross-talks* von verschiedenen PTMs auf die Myt1-Aktivität. Mit Hilfe der Peptidmikroarray-Technologie konnte Myt1, und parallel auch Wee1, zusätzlich auf Peptidsubstrate bekannter Phosphorylierungsstellen untersucht werden. So konnten erfolgreich Unterschiede als auch gemeinsame Substrate identifiziert werden.³⁸⁴

Die Information über die ermittelte Substratspezifität erlaubt es die biologische Funktion von Myt1 nachvollziehen zu können und damit auch mögliche Ziele *in vivo* vorherzusagen.^{86,90,427} Die putativen Substrate des Mikroarrayexperimentes wurden in Lösung verifiziert.³⁸⁴ Damit schaffen die Ergebnisse der Peptidmikroarrays die Grundlage für eine systematische Entwicklung von Myt1-Kinaseinhibitoren. Da Myt1 die G2/M-Transition im Zellzyklus reguliert, könnten so Inhibitoren für kanzerogene Zellen entwickelt werden.

5.3 Identifikation der Substratspezifitäten von *erasern* am Beispiel der Sirtuine

Sirtuine können einerseits Enzyme modifizieren, mit denen sie zusammen zur Chromatinregulation beitragen. Andererseits sind die Sirtuine auch gegen antagonistische Enzyme, wie z.B. KATs, gerichtet. Das sorgt möglicherweise für eine Feinabstimmung in der Antwort der Zellvorgänge auf äußere Reize, wie z.B. Stress, um den Schutz des Genoms zu gewährleisten. So regulieren die Sirtuine beispielsweise die Acetyltransferasen p300^{428,429}, *males absent on the first* (MOF)⁴³⁰, Tip60^{431–433}, aber auch Poly-ADP-Ribosyltransferasen, wie PARP1.^{434,435} Die Tatsache, dass einige Sirtuine gemeinsame Substrate haben, lässt vermuten, dass sie miteinander kooperieren oder einander vervollständigen, abhängig von verschiedenen Reizen, wie das z.B. bei Sirt1 und Sirt6 und dem Transkriptionsfaktor NF-κB der Fall ist.^{436,437} Obwohl auch viele Nicht-Histon-Substrate durch Sirtuine reguliert werden^{77,202,438}, stellen die Histone doch die hauptsächlichen Substrate der Sirtuine dar. In dieser Arbeit wurden dabei vermehrt die im Zellkern lokalisierten Sirtuine untersucht, da hier eine Interaktion mit Histonen und deren Erkennung bzw. Entfernung von posttranslationalen Modifikationen naheliegt.

5.3.1 Substratspezifität von Sirtuin1 und Sirtuin2

Die Analyse der Histonmikroarrays konnte für Sirtuin1 und Sirtuin2 nicht nur eine Substratspezifität für die bekannten Histonmodifizierungen H3K9ac, H3K56 und H4K16ac^{439–443} bestätigen, sondern zudem auch neue Substrate identifizieren. Dazu gehört z.B. H2AK79ac für Sirt1 und für Sirt2 (elektronischer Anhang E2). Sirt1 ist hier sehr spezifisch für H2AK79, indem die benachbarten acetylierten Lysine zwar durch die anti-Kac-Antikörper-Kontrolle detektiert, aber nicht durch Sirt1 deacetyliert werden. H2AK79ac ist ebenfalls für Sirt2 ein sehr gutes Substrat, wobei ebenso H2AK77ac und zu einem geringeren Grad auch H2AK74 deacetyliert werden. Damit ist bei dieser Sirtuinisoform keine so ausgeprägte Substratspezifität zu sehen wie für Sirt1. Dies zeigt sehr anschaulich, dass die Sirt1-Spezifität nicht ein „Artefakt“ ist, sondern das Enzym hier tatsächlich viel selektiver als Sirt2 ist.

Sirt2 wurde beschrieben spezifisch H4K16ac zu deacetylieren und auch zu einem wesentlich geringeren Grad H3K9ac.^{223,440} Das Ausschalten von Sirt1 oder Sirt2 führt zu einem globalen Anstieg von H4K16ac und H3K9ac.^{223,440} Diese beiden Substrate konnten ebenso wie H3K18ac⁴⁴⁴ nicht nur als Deacetylierungsstellen bestätigt werden, sondern mit Hilfe der Histonmikroarrays konnte zudem auch eine Beeinflussung der Deacetylaseaktivität durch benachbarte Modifizierungen verifiziert werden. So wird beispielsweise die Deacetylierung von H3K18ac noch gesteigert, wenn das Arginin davor (H3R17) entweder durch Citrullin ersetzt oder aber dimethyliert wurde (acetyliertes Peptid H3 AS 1-20, elektronischer Anhang E2).

Insgesamt konnten auf den Histonmikroarrays mehr Substrate für Sirtuin2 als für Sirtuin1 identifiziert werden. Aus der Analyse der Mikroarraydaten wird ersichtlich, dass Sirt2 die unspezifischere (oder

spezifisch wesentlich aktivere) Deacetylase ist und dass alle guten Sirt1-Substrate auch gute Sirt2-Substrate sind. Dagegen konnten aber auch eine Menge Substrate identifiziert werden, die zumindest auf dem Histonmikroarray von Sirt2 gut umgesetzt werden, aber keine Substrate für Sirt1 darstellen.

Die Histonmikroarrays bestätigten zudem, dass die Sirtuine die Konformation der Substrate unterscheiden. Sirtuin1 deacetyliert H3K9ac, H3K14ac und H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, wenn sie als freie Histone und nicht als Teil des Nukleosoms vorliegen.³⁵⁹ So sind die flexiblen Peptidsubstrate besser zugänglich als wenn sie innerhalb der Histonkerne lokalisiert sind. Allerdings haben hier Hsu *et al.* kürzlich gezeigt, dass die Sirtuine Sirt1 und Sirt2 eine höhere Aktivität an Nukleosomen als an Peptidsubstraten zeigen.³⁵⁸ Dabei wird die enzymatische Deacetylierung der nukleosomalen Substrate durch zusätzliche stabilisierende Interaktionen, wie z.B. mit anderen Histonkernen oder anderen N-terminalen Histonregionen innerhalb des Histonoktamers, unterstützt.³⁵⁸ Die Abhängigkeit von den Interaktionspartnern und dem zellulären Kontext könnte die Substratspezifität *in vivo* beeinflussen und die Unterschiede zu den *in vitro* Substratspezifitäten erklären.

5.3.2 Acylspezifität von Sirtuin1 und Sirtuin2

In den letzten Jahren sind vermehrt Beweise publiziert worden, dass einige Sirtuine nur schwache Deacetylaseaktivitäten haben, da ihre Substratspezifitäten eher bei anderen Acylgruppen lagen. So zeigten Sirt1-3 eine effiziente Deacetylaseaktivität *in vitro*^{226,445}, wohingegen Sirt4-7 *in vitro* nur sehr geringe Deacetylaseaktivität zeigen. Die hier durchgeführten Untersuchungen mit Sirtuin1 und Sirtuin2 konnten zeigen, dass beide eine Depropionylaseaktivität besitzen.^{210,213} Und obwohl bei Sir2Tm die Bindungsaffinität von propionylierten gegenüber acetylierten Lysin etwa 4,4-fach höher war, sind die katalytischen Effizienzen für die Depropionylierung und Deacetylierung vergleichbar.³³² Dies konnte in dieser Arbeit insbesondere auch am Beispiel des H2AK38-Peptids gezeigt werden. So stellen acetylierte und propionylierte Lysin für beide Sirtuine gute Substrate dar. Dagegen kann für butyryliertes Lysin keine Aussage getroffen werden, da es von der anti-Kac-Antikörper-Mischung nicht detektiert wird. Allerdings zeigt Sirt2 in der Kristallstruktur eine Präferenz für längere Acylketten, wie butyrylierte oder palmitoylierte Lysine.⁴⁴⁶ Eine effiziente Aktivität zur Deacylierung von butyrylierten²¹⁰, myristoylierten^{445,447,448} oder crotonylierten^{210,215} Lysinen konnte auch für Sirt1-3 nachgewiesen werden, wobei der Mechanismus zur Entfernung der Crotonylgruppe derselbe wie zur Entfernung der Acetylgruppe ist.²¹⁵ Dabei ist die katalytische Effizienz einer Demyristoylierung von H3K9myr etwas stärker ($74000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) als eine Deacetylierung von H3K9ac ($14500 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) durch Sirt2.⁴⁴⁵

Die Erkennung langkettiger Acylgruppen schafft damit eine neue Ebene der Komplexität, die in zukünftigen Studien nach einer systematischen Untersuchung der PTMs und deren „Acylom“-weiter

Analyse ihrer Acylierungsstellen verlangen. Hier könnte die Mikroarray-Technologie helfen die entsprechenden Interaktionspartner zu charakterisieren, indem bereits „vor-modifizierte“ Substrate sowie die unmodifizierten Wildtyp-Sequenzen präsentiert werden und anschließend mit genetischen *knock-out* Zellen oder Geweben mit quantitativen Proteomics-Ansätzen verglichen werden.

5.3.3 Sequenzspezifität von Sirtuin1 und Sirtuin2

Rauh *et al.* konnte bei der Untersuchung der Sirtuinisofomen auf den Acetylom-Mikroarrays Sequenzlogos identifizieren⁷⁷, die auf Unterschiede der Präferenz bestimmter Aminosäuren in den Substraten und damit auf eine Sequenzspezifität schließen lassen.

Die in dieser Arbeit anhand der Histonmikroarrays ermittelten *Two-sample*-Logos von Sirt1 und Sirt2 (Abbildung 4.49) zeigen allerdings keine großen Unterschiede, was auch damit zu erklären ist, dass die Histonpeptide eine ähnliche Peptidsequenz aufweisen. So ist eine Vielzahl an Modifizierungsstellen an den *N*-terminalen Regionen der Histone zu finden, da die Kernregionen der Histone nicht zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus gleich gut zugänglich sind. Besonders an diesen *N*-terminalen Regionen sind viele basische Reste vertreten. Das zeigt sich auch in den *Two-sample*-Logos in der bevorzugten -1-Position des Argininrestes. Dieser kommt sowohl in der nachgewiesenen *cross-talk* Modifizierungsstelle vor dem H3K9 (also das H3R8) als auch vor dem H3K27 (also H3R26) vor. Der Einfluss dieses Arginin in der -1-Position ist bereits an verschiedener Stelle beschrieben worden^{83,449} und führt zu der beschriebenen Wechselwirkung mit *Reader*domänen bzw. Demethylasen. Dabei führt das Entfernen des methylierten Restes am Arginin erst zu einer Phosphorylierung des Serins. Das phosphorylierte Serin ist wiederum die Voraussetzung, dass das Sirtuin rekrutiert wird und somit das Lysin deacetyliert werden kann.

Die Behauptung, dass Sirtuin1 nur Lysine in der Konsensussequenz -R-K-R- deacetyliert^{83,449,450}, konnte mit den auf den Histonmikroarray identifizierten Substraten nicht bestätigt werden. Das Sirtuin1 keine Sequenzspezifität besitzt, wurde auch mittels verschiedener kombinatorischer Peptidbibliotheken gezeigt.^{451–453} So konnten Blander *et al. in vitro* keine Konsensussequenz von Sirtuin1 identifizieren.⁴⁵¹ Auch eine Bibliothek mit etwa 105000 acetylierten Peptiden, die unter Nutzung der *quantum dots*-Technologie und der Fluoreszenzmarkierung der *beads* detektiert wurde, konnte keine Sequenzspezifität von Sirt1 außerhalb einer -2- bis +2-Position nachweisen.⁴⁵² Die Untersuchung der Deacetylaseaktivität von Zellysaten auf goldbeschichteten Peptidmikroarrays und nachfolgender Massenspektrometrie konnte zwar eine Deacetylaseaktivität, aber ebenfalls keine Sequenzspezifität der Sirtuine verifizieren.⁴⁵³ Insgesamt zeigen die Mikroarraydaten in dieser Arbeit, dass Sirtuine nicht von der Aminosäuresequenz, die die Acetylierungsstelle umgibt, abhängig sind. Dies spricht sehr für eine ausgestreckte Konformation des Substrates, und bestätigt damit, dass Sirtuine die ungeordneten Strukturen der Substrate bevorzugen.⁴⁵⁴

5.3.4 *Cross-talk* von Acetylierung und Phosphorylierung am Beispiel von H3K9ac und H3K27ac

Die Forschungen der letzten Jahre haben den Umfang und die potentielle Bedeutung von Acetylierung denen der Phosphorylierung gleichgesetzt.^{333,410,455,456} Dabei wird der Acetylierungsstatus in vielfältiger Weise interpretiert: zur Regulation von enzymatischen Aktivitäten, in der Veränderung der Chromatinstruktur oder durch die Erkennung der Proteinkomplexe durch Bromodomänen. Die Phosphorylierung ist dabei sehr sequenzspezifisch und deshalb werden generell weniger Modifizierungsstellen im Vergleich zu Acetylierungen adressiert. Allerdings kann die Phosphorylierung nicht als individuelle PTM betrachtet werden. Der zelluläre Kontext und der *cross-talk* mit anderen PTMs definieren die Identitäten der interagierenden Proteine und damit auch das endgültige Resultat der Phosphorylierung auf den Zellstatus.⁶

Die Co-Kristallstruktur von Sirt3 und dem Peptidsubstrat in Sirt3-H3K9ac-Komplexen konnte zeigen, dass Sirtuine an acetylierte Peptide durch die Erkennung der Modifikationsstelle und der umgebenden Aminosäuren binden. Mittels der Histonmikroarrays konnte für Sirtuin3 gezeigt werden, dass die Deacetylierung des Lysins9 im Histon H3 durch die Phosphorylierung des H3S10 komplett unterbunden wird.⁶⁷ Dies bestätigt die Abneigung gegenüber negativen Ladungen in der +1-Position von Sirtuin3, die in den Sequenzlogos auf den Acetylom-Mikroarrays identifiziert wurden.⁷⁷

Anhand von zwei ausgewählten Beispielen, wurde der Einfluss benachbarter Phosphorylierungen auf die Deacetylaseaktivität der Sirtuine Sirt1 und Sirt2 untersucht.

Da die Sequenzlogos von Rauh *et al.* für Sirtuin2 eine Inhibierung der katalytischen Effizienz durch negative Ladungen in der +1-Position indizieren, bei einer gleichzeitigen Bevorzugung von Serinen an dieser Position, wurde das auch anhand von Lösungsexperimenten verifiziert. Die kinetischen Messungen von Sirtuin2 konnten anhand des K_M -Wertes einen deutlichen Einfluss der Phosphorylierung auf die Deacetylaseaktivität des H3K9-Substrates bestätigen. Dabei beeinflusst die negative Ladung in der +1-Position die katalytische Effizienz des Sirtuin2 bei der Entfernung des Acetylrestes am H3K9ac stärker als das bei der Phosphorylierung in der +2-Position der Fall ist. Diese Tendenz bestätigt damit die aus den Sequenzlogos von Rauh *et al.* aufgestellte Hypothese. Sirtuin1 scheint dagegen beide Versionen, sowohl das Serin als auch das Phosphoserin zu akzeptieren.^{77,457} Die kinetische Charakterisierung bestätigt die aus den Sequenzlogos gewonnene Vermutung, dass die Phosphorylierung in der +1- und +2-Position die Deacetylierung des H3K9-Substrates nicht so stark beeinflusst. Werden nun die katalytischen Effizienzen von Sirt1 und Sirt2 miteinander verglichen, ist der Effekt der Phosphorylierung bei Sirt1 mit einer Größenordnung ausgeprägter als bei Sirt2 mit zwei Größenordnungen. Der K_M -Wert von H3K9ac ist allerdings für Sirt1 etwas besser als für Sirt2. Bislang ist der Effekt der Phosphorylierung in der +2-Position auf die Deacetylaseaktivität von Sirtuinen kinetisch noch nicht

charakterisiert worden. Die hier gezeigten Daten beweisen erstmals, dass nicht nur die direkt nebeneinanderliegenden Aminosäuren die katalytische Effizienzen der NAD⁺-abhängigen Deacetylasen durch die negative Ladung beeinflussen.

Die Ergebnisse der kinetischen Bestimmung der H3K27-Modifizierungsstelle ergänzen und bestätigen die Ergebnisse der H3K9-Modifizierungsstelle. So sind die Verläufe der $v/[S]$ -Charakteristiken von H3K9 und H3K27 und ihren phosphorylierten Peptidderivaten für Sirtuin1 sehr ähnlich, was sich auch in den kinetischen Parametern zeigt. Der *cross-talk* der benachbarten H3S28-Phosphorylierung, und deren negative Beeinflussung auf die Deacetylaseaktivität von Sirtuin2, konnte auch anhand der H3K27-Substrate bestätigt werden. Zudem lassen die Lösungsexperimente mit den verschiedenen Histonvarianten der H3K27ac-Peptide (SAPS- und STPS-Varianten) per MALDI-ToF auf eine Abhängigkeit der Deacetylaseaktivität nicht nur von der benachbarten Phosphorylierung, sondern auch von der Histonsequenz vermuten (Abschnitt 4.4.2.4). Insgesamt konnten mit den Lösungsexperimenten die aus den Histonmikroarraydaten gewonnenen Aussagen validiert werden.

Obwohl bisher bekannte Sirtuinsubstrate relativ langsam sind (k_{cat} -Werte um 0,01 pro Sekunde), konnten in dieser Arbeit 10- bis 65-fach höhere k_{cat} -Werte bestimmt werden. Dies könnte die Aussage unterstützen, dass die Histone die von den Sirtuinen evolutionsbedingten Substrate darstellen. Bisherige Forschungen konzentrierten sich bislang auf den *cross-talk* mit H3S10ph zu anderen Modifikationen, einschließlich der H3K9-Modifikation. Allerdings wurde hier eher auf methylierte Lysine fokussiert, sodass die Analyse der Deacetylierung noch weitgehend unbekannt ist.^{281,458} Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Phosphorylierung in der +1-Position die Deacetylaseaktivität von Sirtuin2 auf H3K9ac beeinflusst.

Die H3S10-Phosphorylierung kann mit der Acetylierung der umgebenden Lysine H3K9 oder H3K14 gekoppelt werden, wobei die Kombination dieser Modifikationen zusammen für die Aktivierung der Transkription verantwortlich sind.^{361–363} Allerdings wird der H3S28-Phosphorylierer eine bedeutendere Rolle in der transkriptionellen Aktivierung verglichen zur H3S10-Phosphorylierung zugesprochen.³⁶⁹ So untersuchten Lau *et al.* die funktionelle Verbindung der Acetylierung des H3K27 und der Phosphorylierung des H3S28 mittels eines anti-H3K27acS28ph-Antikörpers.³⁶⁹ Der von ihnen postulierte Mechanismus der H3K27ac und H3S10ph-Kopplung schlägt vor, dass die Phosphorylierung von H3S28 einen Austausch von methyliertem zum acetyliertem H3K27 induziert. Laut der Publikation wird dies durch die Rekrutierung einer Acetyltransferase nach der MSK1-vermittelten Phosphorylierung erreicht. Allerdings lassen die in dieser Arbeit gezeigten Daten auch vermuten, dass eine Hemmung der Deacetylase Sirtuin2 zum gleichen Ergebnis führen würde.

Dennoch scheinen Phosphorylierungen generell als Schalter für andere Modifikationen zu wirken. So könnte beispielsweise die Phosphorylierung von H3S10 als Schalter zur Regulation von anderen H3-Phosphorylierungen während der Mitose dienen.²⁸¹ Dies lässt sich durch die Einführung von zwei

negativen Ladungen an einer ehemals neutralen Stelle erklären. Dieser Effekt konnte bereits mit dem Histonmikroarray für die Methylierung des H4R3 demonstriert werden, bei dem die Phosphorylierung des Serins H3S1 die Methylierungsaktivität von PRMT5 ausschaltet.⁹⁹ Von Park *et al.* konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von H2AT17 durch Akt zur Bindung von Akt und Sirtuin2 führt.³³⁶ Dieser Komplex resultiert wiederum in der Deacetylierung von H2A. Zuerst scheint diese „Aktivierung“ des Sirtuins durch die Phosphorylierung den hier gezeigten Daten zu widersprechen. Allerdings konnte die Studie nicht zeigen, dass das H2AK16 in der -1-Position zur Phosphorylierungsstelle deacetyliert wird. So bindet Sirtuin2 an einer internen H2A-Domäne. Das lässt vermuten, dass die Phosphorylierung nicht in der näheren Sequenzumgebung der Deacetylierungsstelle liegt.

Da in der N-terminalen Region des Histons H3 das ARKS(T)-Motiv zweimal vorkommt und die untersuchten Peptidvarianten eine gute Deacetylaseaktivität von Sirtuin2 begünstigen, lässt das auf eine Sequenzspezifität von Sirt2 hinsichtlich dieses Sequenzmotivs vermuten. Deshalb wurden alle (potentiellen) Substrate und Interaktionspartner von Sirtuin2 aus der Literatur und der PhosphoSitePlus-Datenbank zusammengestellt. Es ergaben sich 645 Peptide mit einem Serin und Threonin in den Positionen +1 und +2, die nun mit dem H3-Motiv verglichen wurde. Die Auflistung enthält dabei schon die Ergebnisse für die Peptide dieses Kombinationsmotivs (KST), die auf dem Acetylom-Mikroarray präsentiert und durch Sirt2 deacetyliert worden sind.⁷⁷ Von den 645 Peptiden enthalten 121 (=18,8%) ein Serin in der +1-Position, 88 (=13,6%) ein Threonin in der +2-Position und immerhin 40 (=6,2%) ein Arginin in der -1-Position. Von diesen 645 Peptiden sind 118 (=18,3%) als Phosphorylierungsstellen für Serin (in der +1-Position zur Acetylierungsstelle) beschrieben worden. Weitere 83 (=12,9%) Peptide enthalten ein phosphoryliertes Threonin in der +2-Position und immerhin 8 (=1,2%) der 645 Peptide enthalten das Motiv Kac-Sph-Tph mit allen drei Aminosäuren als beschriebenen Modifikationsstellen. Damit kann für Sirtuin2 eine Sequenzspezifität hinsichtlich des RKS(T)-Motivs nachgewiesen und die Präferenz zur Deacetylierung des Lysins innerhalb dieses Sequenzmotivs verdeutlicht werden. Die Datenbankauswertung belegt überdies die biologische Relevanz der Kombination von Acetylierungsstelle und Phosphorylierungsstellen in der +1- bzw. +2-Position, und könnte einen weiteren Hinweis auf die Schlüsselrolle der benachbarten Phosphorylierung auf eine Sirtuin2-vermittelte Deacetylierung geben. Dies wird zusätzlich bestätigt durch die Analyse der Sirtuin2-Substrate mit einem Serin und Threonin in den Positionen +1 und +2 auf dem Acetylom-Mikroarray⁷⁷, deren Sequenzlogo eine starke Bevorzugung des Arginins in der -1-Position zum deacetylierten Lysin aufweisen (Abbildung 5.1).

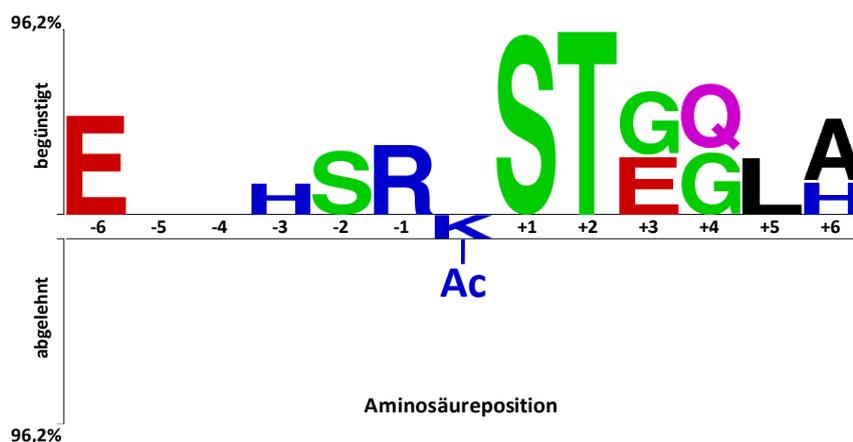


Abbildung 5.1: *Two-sample-Logo* aller Sirtuin2-Substrate mit einem Serin in der +1-Position und einem Threonin in der +2-Position. Die Substrate wurden ins Verhältnis gesetzt zu allen auf dem Acetylom-Mikroarray präsentierten Acetylierungsstellen. Substratselektion und Literaturrecherche durch Dr. David Rauh.

Die Histonmikroarrays erlauben zudem viele neue, bislang nicht charakterisierte Modifikationen zu untersuchen. So ist beispielsweise der *cross-talk* zwischen acylierten und methylierten bzw. phosphorylierten Aminosäuren noch nicht untersucht. Dementsprechend sind auch deren Auswirkungen auf die Chromatinstruktur und –funktion noch nicht bekannt, obwohl die bisher publizierten epigenetischen Untersuchungen einen *cross-talk* aller posttranslationalen Modifikationen vermuten lassen.

5.3.5 Substratspezifität von Sirtuin6

Die Profilierung von Sirtuin6 auf den Histonmikroarrays konnte leider keine Sequenzspezifität und damit auch keine Acylspezifität detektieren. Dies könnte neben einer sehr geringen Enzymaktivität vom eingesetzten Sirtuin6 noch drei andere Ursachen haben.

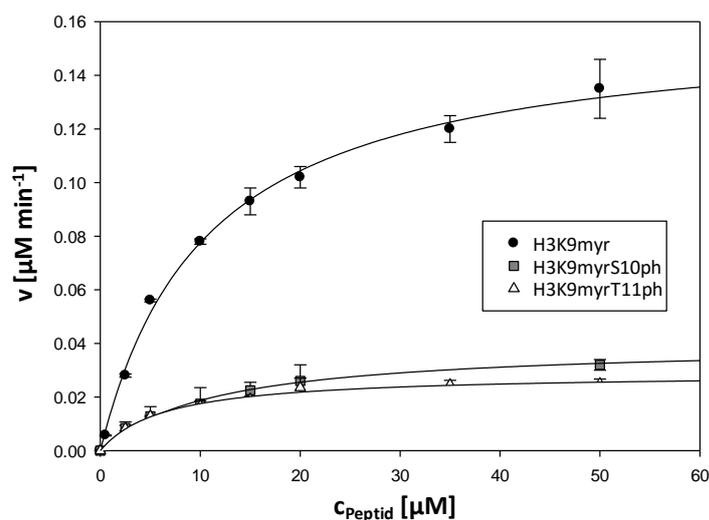
Erstens assoziiert Sirtuin6 mit dem Nukleosomen und deacetyliert dabei H3 und H4, wenn sie als Nukleosom verpackt sind, aber nicht wenn sie als freie Histone vorliegen.³⁵⁹ Damit zeigt Sirt6 genau die umgekehrten Eigenschaften wie Sirtuin1. Allerdings deacetyliert Sirtuin6, genauso wie auch Sirtuin1 und Sirtuin2, H3K9ac²²¹, H3K56ac⁴⁵⁹, H4K5ac, H4K12ac und H4K16ac.³⁵⁹ Diese Redundanz von Sirt1, Sirt2 und Sirt6 deutet auf die zentrale Rolle der Histonacetylierung bei der Chromatinkondensation und der Hemmung der Genexpression hin. Sirt6 zeigt die stärkste Deacetylaseaktivität gegenüber H3K9ac.³⁵⁹ Damit nimmt Sirt6 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Telomerstruktur und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur ein. In Folge eines Doppelstrangbruches der DNA assoziiert Sirt6 mit Chromatin und verringert das Level von H3K9ac. Dadurch wird die Verbindung von Chromatin und DNA-abhängigen Proteinkinasen stabilisiert, die wiederum Reparaturfaktoren den Zugang zu den DNA-Brüchen ermöglichen.⁴⁶⁰ Die Deacetylaseaktivität von Sirt6 wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert. So zeigte Sirt6 *in vitro* nur eine schwache Deacetylaseaktivität, sowohl an einzelnen acetylierten Lysinen als auch an acetyliertem H3K9ac-Peptiden^{221,461–463}, wohingegen Sirt6 *in*

in vivo starke Deacetylaseaktivität aufweist.⁴⁶⁴ Die Aktivität von Sirt6 ist nukleosom-abhängig und die Bindung an das Nukleosom wandelt Sirt6 in seine aktive Konformation um.³⁵⁹

Zweitens konnten auf dem Histonmikroarray kaum Signale detektiert werden, weil die Inkubation von Sirtuin6 ohne die Zugabe von aktivierenden Fettsäuren als Cofaktor durchgeführt wurde. Es wurde gezeigt, dass freie Fettsäuren die schwache *in vitro* Deacetylaseaktivität von Sirt6 stimuliert.²¹⁰ Vor dem Mikroarrayexperiment wurde sich allerdings bewusst dagegen entschieden aktivierende Fettsäure zuzusetzen, da untersucht werden sollte, ob eine benachbarte Acylgruppe als „interner“ Aktivator fungiert. Diese Hypothese konnte leider nicht bestätigt werden. Die im Anschluss durchgeführten Lösungsexperimente konnten ebenfalls keine Deacetylaseaktivität von Sirt6 (in An- und Abwesenheit der Fettsäure) bestätigen.

Drittens wurde in anderen Studien gezeigt, dass Sirt6 höhere katalytische Effizienzen für die Deacylierung von langkettigen Fettsäuregruppen, insbesondere der Myristinsäure, aufweist.²⁰⁹ Diese, auch *in vivo* vorkommende⁴⁶⁵, posttranslationale Modifikation ist leider nicht auf dem Histonmikroarray präsentiert, so dass die Demyristoylaseaktivität von Sirt6 nicht untersucht werden konnte.

Laut den Sequenzlogos von Sirt6 auf den Acetylom-Mikroarrays⁷⁷ sollte eine Phosphorylierung in der +2-Position (H3T11ph) begünstigend für die Substratazeptanz sein. Dies wird unterstützt durch die Kristallstruktur von Sirt6 mit dem myristoyliertem H3K9-Peptid [PDB: 3ZG6], in der einige Arginin- und Lysinreste in der Nähe des +1-Position (H3S10) bzw. +2-Position (H3T11) des Substrats ersichtlich sind. Das sollte eine zusätzliche Interaktion mit den entsprechend phosphorylierten Peptidderivaten ermöglichen und die Bindung des Peptides an das Sirtuin erhöhen. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe die Demyristoylaseaktivität von Sirtuin6 am Beispiel von H3K9myr, H3K9myrS10ph und H3K9myrT11ph kinetisch charakterisiert (Abbildung 5.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Substrates durch die benachbarte Phosphorylierung nicht beeinflusst wird. Dagegen hat die Phosphorylierung Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Demyristoylierung. Damit lässt sich der Einfluss des *cross-talks* mit den benachbarten Phosphorylierungen, wie für Sirtuin2, auch für Sirt6 bestätigen. Allerdings scheint hier die Phosphorylierung des Substrates auch Unterschiede im kinetischen Mechanismus zu verursachen, da bei Sirtuin2 eher die Substratbindung und bei Sirtuin6 eher die Katalyse betroffen sind.



Kinetische Konstante	H3K9myr	H3K9myrS10ph	H3K9myrT11ph
K_M [μM]	$10,6 \pm 0,80$	$11,3 \pm 0,82$	$6,4 \pm 0,80$
k_{cat} [s^{-1}]	$0,0053 \pm 0,0001$	$0,0013 \pm 0,00003$	$0,0010 \pm 0,00004$
k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$]	504	117	144

Abbildung 5.2: Kinetische Charakterisierung von Sirt6 und den H3K9myr-Substraten. Die Darstellung der $v/[S]$ -Charakteristik für das myristoylierte Substrat (H3K9myr) und die zusätzlich phosphorylierten H3K9myrS10ph- und H3K9myrT11ph-Substrate zeigt den Einfluss des *cross-talks* auf die Demyristoylaseaktivität von Sirt6. Die Reaktionen wurden mit 500nM Sirt6, 1,5mM NAD^+ und variierenden Peptidkonzentrationen (2,5 – 50 μM) durchgeführt (pH-Wert 7,8 und Temperatur = 37°C). Darunter ist eine Zusammenfassung der kinetischen Parameter aufgelistet.

Daten wurden erhoben von Dr. Matthias Weiwad.

5.3.6 Substratspezifität von Sirtuin7

Auch für das vierte im Zellkern lokalisierte Sirtuin, Sirtuin7, konnte weder auf dem Histonmikroarray noch in den Lösungsexperimenten mit den H3K9ac- und H3K9myr-Peptidderivaten eine Substratspezifität identifiziert werden. Trotz verschiedener eingesetzter Enzymkonzentrationen (bis maximal 2mM), diverser Sirtuin7-Präparationen (einschließlich einer frisch präparierten Enzymcharge) und verschiedener Testzeiten (maximal 24 Stunden) konnte keine Deacylaseaktivität festgestellt werden. Dies könnte sowohl darauf zurückzuführen sein, dass Sirtuin7 die H3K9-Peptide nicht als Substrate erkennt, oder auch auf eine schlechte *in vitro* Deac(et)ylaseaktivität hinweisen.²¹⁰ Bislang konnte für Sirt7 nur eine einzige Modifikationsstelle in Histonen nachgewiesen werden, H3K18ac.⁴⁶⁶ Auch über die Deacylaseaktivität von Sirtuin7 ist bislang nichts bekannt. Damit konnte die Hypothese, nach der eine Phosphorylierung in der +1- und +2-Position eine Deacetylierung begünstigen, wie es aus den Sequenzlogos der Acetylom-Mikroarrays ersichtlich wird⁷⁷, nicht untersucht werden.

5.4 Einsatz von Peptidmikroarrays in der epigenetischen Forschung

Die Immobilisation von Substraten auf einer planaren Oberfläche bringt gewisse Einschränkungen in der Detektion mit sich. So kann die Anbindung an eine Oberfläche die Substratstruktur verändern

und die Erreichbarkeit der Substrate an das Enzym beeinflussen, besonders wenn das aktive Zentrum oder die Bindungstaschen tief in der Enzymstruktur verborgen sind. Dabei können sich die thermodynamischen⁴⁶⁷, stereospezifischen^{468,469} oder kinetischen⁴⁷⁰ Reaktionsparameter von löslichen, frei beweglichen Substraten gegenüber den immobilisierten Substraten unterscheiden. Ein übliches Problem, dass für die Enzymkatalyse an immobilisierten Substraten überwunden werden muss, ist die unspezifische Proteinadsorption.⁴⁷¹ Diese kann schnell zur Inaktivierung der Enzyme auf den Oberflächen führen. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch weitestgehend durch eine Blockierung der Oberfläche (Abschnitt 3.8.8) oder durch den Einsatz bereits getesteter Enzymkonzentrationen⁷⁷ ausgeschlossen werden. Zudem kann auch die Beladung mit Peptidsubstraten die Effizienz der Reaktion beeinflussen. Ist die Substratbeladung innerhalb eines Spots zu hoch, kann die Reaktionsausbeute der enzymatischen Transformation sehr gering sein. Dies begründet sich wahrscheinlich durch die sterische Behinderung.^{472,473} Durch die Validierung der mit den Peptidmikroarrays identifizierten Substrate in Lösung konnte dieser Effekt in dieser Arbeit vernachlässigt werden.

Beim Gebrauch von Peptiden sollten allerdings ein paar Aspekte bedacht werden. Die *N*-terminalen Regionen der Histone repräsentieren nur einen geringen Teil der Histone. Darüber hinaus, kommen *in vivo* noch die Interaktion der Histone zu dem Histonoktamer und ihre Wechselwirkung mit der umgebenden DNA hinzu, die Einfluss auf die Proteinfunktionen und die Rekrutierung weiterer Interaktionspartner hat. Selbst gut etablierte *Reader*domänen binden nur mit geringer Affinität an Histonmodifikationsstellen.^{73,474} Daher ist es möglich, dass innerhalb der Zelle die lokale Konzentration einer PTM so hoch ist, dass die niedrige Bindungsaffinität ausreicht, um den Binder an die Modifikationsstelle zu binden, selbst wenn es hier zu häufigen „Bindungs-Loslösungs-Vorgängen“ kommt. Peptidmikroarrays helfen hier die Interaktion mit Proteinpартnern zu untersuchen, so dass eine Grundlage für weitere biochemische Analysen zur Untersuchung der mechanistischen Aspekte ermöglicht wird. Die detektierten Signale der Peptidmikroarrays stellen dabei verlässliche Ergebnisse dar. Der Einbau eines Linkers zwischen den immobilisierten Peptiden und der Mikroarrayoberfläche realisiert hier, dass die Epitope oder Substrate sowohl für die Antikörper als auch die Enzyme zugänglich sind. Wurden keine Binder bzw. Substrate auf dem Peptidmikroarray identifiziert, heisst das nicht, dass es *in vivo* auch keine Binder bzw. Substrate sind. Es könnte z.B. eine dreidimensionale Struktur für die Bindung oder Katalyse benötigt sein, die mit den Peptidmikroarrays nicht abgebildet werden kann. In weiteren, auf den Ergebnissen der Peptidmikroarrays basierenden *in vivo* Studien können die komplexeren und heterogeneren Strukturen und Wechselwirkungen innerhalb des zellulären Kontexts untersucht werden.

Die mittels der Mikroarrays-Technologie identifizierten Interaktionspartner können auch durch die Kombination mit massenspektrometrischen Methoden die Charakterisierung der Protein-PTM-Interaktion *in vivo* ermöglichen. Hier kann die Ergänzung der Mikroarrayergebnisse durch die Mas-

senspektrometrie helfen das kombinierte Auslesen von Histonmodifikationen zu beurteilen. Dabei kann abgeklärt werden, ob diese Kombinationen von Modifikationen *in vivo* auf demselben N-Terminus eines Histons oder innerhalb desselben Nukleosoms vorkommt^{475,476}, was in der Form bislang mit den Peptidmikroarrays allein nicht möglich ist.

Zukünftige Verbesserungen der Mikroarray-Technologie könnten das Anwendungsgebiet noch erweitern. Ein Beispiel ist die Entwicklung von sogenannten „*on silico*“ Peptidmikroarrays zur Untersuchung von Antikörperepitopen und diverser Protein-Protein-Interaktionen. Die Kombination von Halbleiterschaltkreisen unter den auf der Silikonoberfläche immobilisierten Histonpeptiden erlaubt in Echtzeit Messungen von Antikörperepitopen und enzymatischer Aktivitäten, wie z.B. von Lysinmethyltransferasen und Kinasen.⁴⁷⁷

Der Anwendungsbereich von Peptidmikroarrays in der epigenetischen Forschung könnte noch erweitert werden, wenn es möglich ist, die immer größer werdende Anzahl an neu entdeckten posttranslationalen Modifikationen zu adressieren. Nicht alle in den letzten Jahren entdeckten Modifikationen, wie z.B. Crotonylierung³² oder Myristoylierung, sind auf dem in dieser Arbeit verwendeten Histonmikroarrays präsentiert. Hier könnte die Entwicklung einer Methode helfen, die es erlaubt, nachträglich die auf dem Peptidmikroarray präsentierten Peptide gezielt zu modifizieren. Dies könnte z.B. durch den Einbau von Nosyl-geschützten Lysinbausteinen realisiert werden, die nach der Mikroarrayherstellung in andere Modifikationen umgewandelt werden könnten. Alternativ könnte auch die Mikroarray-Herstellung weiter vorangetrieben werden. Die Produktion von Mikroarrays mit einer weit größeren Dichte, wie z.B. mit einer Million Peptiden auf einem Standardglasobjektträger (Vortrag von Paul Utz auf HUPO-Konferenz 2012), bietet hier erste Ansätze in diese Richtung. Das könnte auch ermöglichen die Komplexität und die Kombination von präsentierten PTMs zu erweitern und die spezifische Untersuchung von *cross-talk* mit allen Modifikationsmöglichkeiten (inklusive aller Histonvarianten und Kombinationen von Methyl-, Acyllysin und phosphorylierten Aminosäuren) erlauben.

6 Zusammenfassung

Das Erkennen von Histonmodifikationen ist ein Prozess, der von vielen Faktoren beeinflusst wird. Hier ist eine Methode notwendig, die die Histonmodifikationen sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen PTMs untersuchen kann. Das ist der Schlüssel zum Verständnis der Mechanismen, die der epigenetischen Regulation von Zellaktivitäten zugrunde liegen. Peptidmikroarrays stellen eine effiziente Methode für die zuverlässige Identifizierung von Bindungsspezifitäten und Substratspezifitäten von epigenetischen Modifikationen dar.

Dazu wurden in dieser Arbeit zunächst die Bindungsspezifitäten von Antikörpern untersucht. Die untersuchten Antikörper binden posttranslational modifizierte Aminosäuren, entweder unabhängig (modifikationsspezifisch) oder abhängig (sequenzspezifisch) von der umgebenden Aminosäuresequenz. Die präsentierten Ergebnisse zeigen die Charakterisierung der modifikations- und sequenzspezifischen Antikörper hinsichtlich ihrer Sequenzspezifität für die posttranslationale Modifikation und der einzelnen Histonvarianten. Peptidmikroarrays eignen sich damit zur Qualitätskontrolle von Antikörpern, die gegen posttranslational modifizierte Histone gerichtet sind.

Auch eine Analyse der Bindungsspezifitäten von *Reader*domänen war mittels der Peptidmikroarray-Technologie möglich. Dies konnte an zwei ausgewählten Bromodomänen, BRD4(1) und BRD4(2), an einer Tudor-ähnlichen Domäne (Spindlin1) und an einer Chromodomäne (CHD1) gezeigt werden. Für alle vier *Reader*domänen konnte die jeweilige Bindungsspezifität, als auch der Einfluss benachbarter PTMs auf die Bindungsaffinität der *Reader*domäne identifiziert werden.

Durch die systematische Charakterisierung von ausgewählten Vertretern von modifikationstransferierenden Enzymen (*writer*) konnten die jeweiligen Substratspezifitäten identifiziert werden. Mittels der Peptidmikroarrays konnten für vier ausgewählte Acetyltransferasen (p300, GCN5, PCAF und Tip60) *Two-sample*-Logos ermittelt werden, die die bevorzugte Aminosäureumgebung der Acetylierungsstelle angeben. Unter Nutzung der Peptidmikroarray-Technologie konnte auch die ADP-Ribosylierung durch zwei ausgewählte ADP-Ribosyltransferasen (ARTD1 und ARTD10) verifiziert und die Sequenzspezifität identifiziert werden.

Neben der Acetylierung lag ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf Phosphorylierungen. Dazu wurden für vier ausgewählte Kinasen (Wee1, Myt1, MSK1 und Prk1) die Substratspezifitäten charakterisiert. Dabei gelang es nicht nur die bekannten Substrate zu bestätigen (MSK1 und Wee1), sondern es konnten auch neue Substrate identifiziert werden. So wurden für die Myt1-Kinase die neuen Substrate in Lösung und mittels massenspektrometrischer Analysen verifiziert.

Auch bei der Untersuchung von modifikationsentfernenden Enzymen (*eraser*) konnten mittels der Peptidmikroarrays erfolgreich die Substratspezifitäten charakterisiert und neue Substrate identifiziert werden. Die Validierung der neuen Substrate der untersuchten *eraser*, wie z.B. XopH oder der Sirtuine Sirt1 und Sirt2, erfolgte in Lösung und konnten die mittels der Peptidmikroarrays erhaltenen Hin-

weise bestätigen. Die präsentierten Daten der kinetischen Charakterisierung konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung in der +1- und +2-Position zur Acetylierungsstelle die Deacetylaseaktivität von Sirtuin2 beeinflusst. Im Vergleich dazu hat bei Sirtuin1 der *cross-talk* der benachbarten Phosphorylierungen keinen Einfluss auf den K_M -Wert der Reaktion. Die Peptidmikroarrays und Lösungsexperimente konnten damit zeigen, dass eine benachbarte Phosphorylierung die Ladung des Substrats verändert und damit die Deacetylaseaktivität von Sirtuinen reduziert. Mit der Gesamtheit der durchgeführten Untersuchungen kann diese Arbeit das breite Anwendungsgebiet der Peptidmikroarrays demonstrieren. Indem die neu identifizierten Substrate in homogenen Assays und *in vivo* validiert werden, könnte das Wissen über den *cross-talk* der posttranslationalen Modifikationen helfen, die epigenetischen Regulationsprozesse genauer zu verstehen.

Literaturverzeichnis

1. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur. J. Biochem. FEBS***138**, 9–37 (1984).
2. Tropberger, P. & Schneider, R. Going global: novel histone modifications in the globular domain of H3. *Epigenetics***5**, 112–117 (2010).
3. <http://www.epitron.eu/>.
4. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.***21**, 381–395 (2011).
5. Chi, P., Allis, C. D. & Wang, G. G. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat. Rev. Cancer***10**, 457–469 (2010).
6. Rossetto, D., Avvakumov, N. & Côté, J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics***7**, 1098–1108 (2012).
7. Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. & Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.***11**, 1037–1043 (2004).
8. Rothbart, S. B. & Strahl, B. D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta***1839**, 627–643 (2014).
9. Iwasaki, W. *et al.* Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio***3**, 363–369 (2013).
10. Lee, K. K. & Workman, J. L. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***8**, 284–295 (2007).
11. Cheung, P., Allis, C. D. & Sassone-Corsi, P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell***103**, 263–271 (2000).
12. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science***293**, 1074–1080 (2001).
13. Mann, M. *et al.* Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phospho-proteome. *Trends Biotechnol.***20**, 261–268 (2002).
14. Garcia, B. A., Shabanowitz, J. & Hunt, D. F. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.***11**, 66–73 (2007).
15. Siuti, N. & Kelleher, N. L. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat. Methods***4**, 817–821 (2007).
16. Zhang, K. *et al.* Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.***306**, 259–269 (2002).
17. Freitas, M. A., Sklenar, A. R. & Parthun, M. R. Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *J. Cell. Biochem.***92**, 691–700 (2004).
18. Pesavento, J. J., Kim, Y.-B., Taylor, G. K. & Kelleher, N. L. Shotgun annotation of histone modifications: a new approach for streamlined characterization of proteins by top down mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.***126**, 3386–3387 (2004).
19. Medzihradsky, K. F. *et al.* Characterization of Tetrahymena histone H2B variants and posttranslational populations by electron capture dissociation (ECD) Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry (FT-ICR MS). *Mol. Cell. Proteomics MCP***3**, 872–886 (2004).
20. Galasinski, S. C., Louie, D. F., Gloor, K. K., Resing, K. A. & Ahn, N. G. Global regulation of post-translational modifications on core histones. *J. Biol. Chem.***277**, 2579–2588 (2002).
21. Arnaudo, A. M. & Garcia, B. A. Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics Chromatin***6**, 24 (2013).
22. Bliven, S. & Ghassemian, M. Advanced Methods for Identifying Post-translational Modifications with Mass Spectrometry. (2010).
23. Larsen, M. R., Trelle, M. B., Thingholm, T. E. & Jensen, O. N. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques***40**, 790–798 (2006).
24. Lin, S. & Garcia, B. A. Examining histone posttranslational modification patterns by high-resolution mass spectrometry. *Methods Enzymol.***512**, 3–28 (2012).
25. Verbeck, G. F., Ruotolo, B. T., Sawyer, H. A., Gillig, K. J. & Russell, D. H. A fundamental introduction to ion mobility mass spectrometry applied to the analysis of biomolecules. *J. Biomol. Tech. JBT***13**, 56–61 (2002).
26. Steen, H. & Mann, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***5**, 699–711 (2004).
27. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature***422**, 198–207 (2003).

28. Mann, M. & Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**, 255–261 (2003).
29. Yates, J. R., Gilchrist, A., Howell, K. E. & Bergeron, J. J. M. Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 702–714 (2005).
30. Wilm, M. *et al.* Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379**, 466–469 (1996).
31. Ahrné, E., Müller, M. & Lisacek, F. Unrestricted identification of modified proteins using MS/MS. *Proteomics* **10**, 671–686 (2010).
32. Tan, M. *et al.* Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**, 1016–1028 (2011).
33. Spencer, V. A., Sun, J.-M., Li, L. & Davie, J. R. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods San Diego Calif* **31**, 67–75 (2003).
34. Park, P. J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 669–680 (2009).
35. Baker, M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* **521**, 274–276 (2015).
36. Michel, M. C., Wieland, T. & Tsujimoto, G. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **379**, 385–388 (2009).
37. Egelhofer, T. A. *et al.* An assessment of histone-modification antibody quality. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 91–93 (2011).
38. Rothbart, S. B. *et al.* An Interactive Database for the Assessment of Histone Antibody Specificity. *Mol. Cell* **59**, 502–511 (2015).
39. Duan, Q., Chen, H., Costa, M. & Dai, W. Phosphorylation of H3S10 blocks the access of H3K9 by specific antibodies and histone methyltransferase. Implication in regulating chromatin dynamics and epigenetic inheritance during mitosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 33585–33590 (2008).
40. Bock, I. *et al.* Detailed specificity analysis of antibodies binding to modified histone tails with peptide arrays. *Epigenetics* **6**, 256–263 (2011).
41. Fuchs, S. M. & Strahl, B. D. Antibody recognition of histone post-translational modifications: emerging issues and future prospects. *Epigenomics* **3**, 247–249 (2011).
42. Fuchs, S. M., Krajewski, K., Baker, R. W., Miller, V. L. & Strahl, B. D. Influence of combinatorial histone modifications on antibody and effector protein recognition. *Curr. Biol. CB* **21**, 53–58 (2011).
43. Nishikori, S. *et al.* Broad ranges of affinity and specificity of anti-histone antibodies revealed by a quantitative peptide immunoprecipitation assay. *J. Mol. Biol.* **424**, 391–399 (2012).
44. Rothbart, S. B. *et al.* Poly-acetylated chromatin signatures are preferred epitopes for site-specific histone H4 acetyl antibodies. *Sci. Rep.* **2**, 489 (2012).
45. Begley, C. G. & Ellis, L. M. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* **483**, 531–533 (2012).
46. Couchman, J. R. Commercial antibodies: the good, bad, and really ugly. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **57**, 7–8 (2009).
47. Kalyuzhny, A. E. The dark side of the immunohistochemical moon: industry. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **57**, 1099–1101 (2009).
48. Bieler, C. *et al.* Automatisierte Plattform für ELISAs auf Chip-Basis. *LaborPraxis* (2002).
49. Sobek, J., Bartscherer, K., Jacob, A., Hoheisel, J. D. & Angenendt, P. Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **9**, 365–380 (2006).
50. Henkel, S., Wellhausen, R., Woitalla, D., Marcus, K. & May, C. Epitope Mapping Using Peptide Microarray in Autoantibody Profiling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1368**, 209–224 (2016).
51. Nahtman, T. *et al.* Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data. *J. Immunol. Methods* **328**, 1–13 (2007).
52. Pérez-Bercoff, L. *et al.* Whole CMV proteome pattern recognition analysis after HSCT identifies unique epitope targets associated with the CMV status. *PLoS One* **9**, e89648 (2014).
53. Falsey, J. R., Renil, M., Park, S., Li, S. & Lam, K. S. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug. Chem.* **12**, 346–353 (2001).
54. Melnyk, O. *et al.* Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays. *Bioconjug. Chem.* **13**, 713–720 (2002).
55. Lesaichere, M. L., Uttamchandani, M., Chen, G. Y. J. & Yao, S. Q. Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2079–2083 (2002).
56. Panse, S. *et al.* Profiling of generic anti-phosphopeptide antibodies and kinases with peptide microarrays using radioactive and fluorescence-based assays. *Mol. Divers.* **8**, 291–299 (2004).

57. Wenschuh, H. *et al.* Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers***55**, 188–206 (2000).
58. Reineke, U., Volkmer-Engert, R. & Schneider-Mergener, J. Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr. Opin. Biotechnol.***12**, 59–64 (2001).
59. Pawson, T. & Nash, P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science***300**, 445–452 (2003).
60. Hu, H. *et al.* A map of WW domain family interactions. *Proteomics***4**, 643–655 (2004).
61. Landgraf, C. *et al.* Protein interaction networks by proteome peptide scanning. *PLoS Biol.***2**, E14 (2004).
62. Li, S. S.-C. & Wu, C. Using peptide array to identify binding motifs and interaction networks for modular domains. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***570**, 67–76 (2009).
63. Tong, A. H. Y. *et al.* A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science***295**, 321–324 (2002).
64. Katz, C. *et al.* Studying protein-protein interactions using peptide arrays. *Chem. Soc. Rev.***40**, 2131–2145 (2011).
65. Carducci, M. *et al.* The protein interaction network mediated by human SH3 domains. *Biotechnol. Adv.***30**, 4–15 (2012).
66. Tinti, M. *et al.* The SH2 domain interaction landscape. *Cell Rep.***3**, 1293–1305 (2013).
67. Masch, A., Reimer, U., Zerweck, J. & Schutkowski, M. in *Epigenetic Technological Applications* 169–186 (Academic Press, 2015).
68. Reuter, M. *et al.* Regions of endonuclease EcoRII involved in DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires. *J. Biol. Chem.***274**, 5213–5221 (1999).
69. Dietz, J. *et al.* Inhibition of HIV-1 by a peptide ligand of the genomic RNA packaging signal Psi. *ChemMedChem***3**, 749–755 (2008).
70. Chen, D. S. *et al.* Marked differences in human melanoma antigen-specific T cell responsiveness after vaccination using a functional microarray. *PLoS Med.***2**, e265 (2005).
71. Muscat, S., Pischetsrieder, M., Maczurek, A., Rothmund, S. & Münch, G. Cytotoxicity of Maillard reaction products determined with a peptide spot library. *Mol. Nutr. Food Res.***53**, 1019–1029 (2009).
72. Templin, M. F. *et al.* Protein microarray technology. *Drug Discov. Today***7**, 815–822 (2002).
73. Jones, R. B., Gordus, A., Krall, J. A. & MacBeath, G. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature***439**, 168–174 (2006).
74. Reineke, U., Schneider-Mergener, J. & Schutkowski, M. in *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology* (eds. Ferrari, M., Ozkan, M. & Heller, M. J.) 161–282 (Springer US, 2006).
75. Sun, H., Chen, G. Y. J. & Yao, S. Q. Recent advances in microarray technologies for proteomics. *Chem. Biol.***20**, 685–699 (2013).
76. Foong, Y. M., Fu, J., Yao, S. Q. & Uttamchandani, M. Current advances in peptide and small molecule microarray technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.***16**, 234–242 (2012).
77. Rauh, D. *et al.* An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nat. Commun.***4**, 2327 (2013).
78. Burgardt, N. I. *et al.* Parvulin 17-catalyzed Tubulin Polymerization Is Regulated by Calmodulin in a Calcium-dependent Manner. *J. Biol. Chem.***290**, 16708–16722 (2015).
79. Salisbury, C. M., Maly, D. J. & Ellman, J. A. Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity. *J. Am. Chem. Soc.***124**, 14868–14870 (2002).
80. Sun, H. *et al.* Peptide microarray for high-throughput determination of phosphatase specificity and biology. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.***47**, 1698–1702 (2008).
81. Espanel, X. & Hooft van Huijsduijnen, R. Applying the SPOT peptide synthesis procedure to the study of protein tyrosine phosphatase substrate specificity: probing for the heavenly match in vitro. *Methods San Diego Calif***35**, 64–72 (2005).
82. Kozlov, I. A. *et al.* A high-complexity, multiplexed solution-phase assay for profiling protease activity on microarrays. *Comb. Chem. High Throughput Screen.***11**, 24–35 (2008).
83. Gurard-Levin, Z. A., Kim, J. & Mrksich, M. Combining mass spectrometry and peptide arrays to profile the specificities of histone deacetylases. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.***10**, 2159–2161 (2009).
84. Gurard-Levin, Z. A. & Mrksich, M. The activity of HDAC8 depends on local and distal sequences of its peptide substrates. *Biochemistry (Mosc.)***47**, 6242–6250 (2008).
85. Köhn, M. Immobilization strategies for small molecule, peptide and protein microarrays. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.***15**, 393–397 (2009).
86. Schutkowski, M. *et al.* High-content peptide microarrays for deciphering kinase specificity and biology. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.***43**, 2671–2674 (2004).

87. Mah, A. S. *et al.* Substrate specificity analysis of protein kinase complex Dbf2-Mob1 by peptide library and proteome array screening. *BMC Biochem.***6**, 22 (2005).
88. Schönberg, A. *et al.* The peptide microarray 'ChloroPhos1.0' identifies new phosphorylation targets of plastid casein kinase II (pCKII) in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One***9**, e108344 (2014).
89. Lizcano, J. M. *et al.* Molecular basis for the substrate specificity of NIMA-related kinase-6 (NEK6). Evidence that NEK6 does not phosphorylate the hydrophobic motif of ribosomal S6 protein kinase and serum- and glucocorticoid-induced protein kinase in vivo. *J. Biol. Chem.***277**, 27839–27849 (2002).
90. Rychlewski, L., Kschischo, M., Dong, L., Schutkowski, M. & Reimer, U. Target specificity analysis of the Abl kinase using peptide microarray data. *J. Mol. Biol.***336**, 307–311 (2004).
91. Thiele, A., Zerweck, J., Weiwad, M., Fischer, G. & Schutkowski, M. High-density peptide microarrays for reliable identification of phosphorylation sites and upstream kinases. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***570**, 203–219 (2009).
92. Wolf, A. *et al.* Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 function from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *J. Cell Sci.***126**, 1832–1844 (2013).
93. Papadopoulos, C. *et al.* Splice variants of the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 4 (DYRK4) differ in their subcellular localization and catalytic activity. *J. Biol. Chem.***286**, 5494–5505 (2011).
94. Thiele, A., Weiwad, M., Zerweck, J., Fischer, G. & Schutkowski, M. High density peptide microarrays for proteome-wide fingerprinting of kinase activities in cell lysates. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***669**, 173–181 (2010).
95. Thiele, A., Stangl, G. I. & Schutkowski, M. Deciphering enzyme function using peptide arrays. *Mol. Biotechnol.***49**, 283–305 (2011).
96. McCuaig, R. D. *et al.* PKC-Theta is a Novel SC35 Splicing Factor Regulator in Response to T Cell Activation. *Front. Immunol.***6**, 562 (2015).
97. Rathert, P., Zhang, X., Freund, C., Cheng, X. & Jeltsch, A. Analysis of the substrate specificity of the Dim-5 histone lysine methyltransferase using peptide arrays. *Chem. Biol.***15**, 5–11 (2008).
98. Rathert, P. *et al.* Protein lysine methyltransferase G9a acts on non-histone targets. *Nat. Chem. Biol.***4**, 344–346 (2008).
99. Ho, M.-C. *et al.* Structure of the arginine methyltransferase PRMT5-MEP50 reveals a mechanism for substrate specificity. *PLoS One***8**, e57008 (2013).
100. Burgos, E. S. *et al.* Histone H2A and H4 N-terminal tails are positioned by the MEP50 WD repeat protein for efficient methylation by the PRMT5 arginine methyltransferase. *J. Biol. Chem.***290**, 9674–9689 (2015).
101. Geysen, H. M., Meloan, R. H. & Barteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***81**, 3998–4002 (1984).
102. Cerededo, I. *et al.* Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J. Allergy Clin. Immunol.***122**, 589–594 (2008).
103. Shreffler, W. G., Lencer, D. A., Bardina, L. & Sampson, H. A. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J. Allergy Clin. Immunol.***116**, 893–899 (2005).
104. Masch, A., Zerweck, J., Reimer, U., Wenschuh, H. & Schutkowski, M. Antibody signatures defined by high-content peptide microarray analysis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***669**, 161–172 (2010).
105. Robinson, W. H. *et al.* Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat. Med.***8**, 295–301 (2002).
106. Robinson, W. H., Steinman, L. & Utz, P. J. Protein and peptide array analysis of autoimmune disease. *BioTechniques***Suppl**, 66–69 (2002).
107. Hecker, M. *et al.* High-Density Peptide Microarray Analysis of IgG Autoantibody Reactivities in Serum and Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Mol. Cell. Proteomics MCP***15**, 1360–1380 (2016).
108. Lorenz, P., Kreutzer, M., Zerweck, J., Schutkowski, M. & Thiesen, H.-J. Probing the epitope signatures of IgG antibodies in human serum from patients with autoimmune disease. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***524**, 247–258 (2009).
109. Duburcq, X. *et al.* Peptide-protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. *Bioconjug. Chem.***15**, 307–316 (2004).
110. Cohen, I. R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J. Autoimmun.***29**, 246–249 (2007).
111. Zhu, H., Luo, H., Yan, M., Zuo, X. & Li, Q.-Z. Autoantigen Microarray for High-throughput Autoantibody Profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics Proteomics Bioinformatics***13**, 210–218 (2015).
112. Gaseitsiwe, S. *et al.* Pattern recognition in pulmonary tuberculosis defined by high content peptide microarray chip analysis representing 61 proteins from *M. tuberculosis*. *PLoS One***3**, e3840 (2008).

113. Gaseitsiwe, S. & Maeurer, M. J. Identification of MHC class II binding peptides: microarray and soluble MHC class II molecules. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***524**, 417–426 (2009).
114. Schnatbaum, K. *et al.* Peptide microarrays enable rapid mimotope optimization for pharmacokinetic analysis of the novel therapeutic antibody IMAB362. *Biotechnol. J.***9**, 545–554 (2014).
115. Choung, R. S. *et al.* Determination of B-Cell Epitopes in Patients with Celiac Disease: Peptide Microarrays. *PLoS One***11**, e0147777 (2016).
116. Heubach, Y. *et al.* From spots to beads-PTM-peptide bead arrays for the characterization of anti-histone antibodies. *Proteomics***13**, 1010–1015 (2013).
117. Tinti, M. *et al.* The 4G10, pY20 and p-TYR-100 antibody specificity: profiling by peptide microarrays. *New Biotechnol.***29**, 571–577 (2012).
118. Zerweck, J., Masch, A. & Schutkowski, M. Peptide microarrays for profiling of modification state-specific antibodies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***524**, 169–180 (2009).
119. Funkner, A. *et al.* Peptide binding by catalytic domains of the protein disulfide isomerase-related protein ERp46. *J. Mol. Biol.***425**, 1340–1362 (2013).
120. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.***60**, 523–533 (2003).
121. Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J. & Tan, S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.***41**, 98–105 (2005).
122. Thiele, A., Zerweck, J. & Schutkowski, M. Peptide arrays for enzyme profiling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***570**, 19–65 (2009).
123. Edlund, M., Wikström, K., Toomik, R., Ek, P. & Obrink, B. Characterization of protein kinase C-mediated phosphorylation of the short cytoplasmic domain isoform of C-CAM. *FEBS Lett.***425**, 166–170 (1998).
124. Himpel, S. *et al.* Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J. Biol. Chem.***275**, 2431–2438 (2000).
125. Moilanen, A. M., Karvonen, U., Poukka, H., Jänne, O. A. & Palvimo, J. J. Activation of androgen receptor function by a novel nuclear protein kinase. *Mol. Biol. Cell***9**, 2527–2543 (1998).
126. Inamori, K. *et al.* Optimal surface chemistry for peptide immobilization in on-chip phosphorylation analysis. *Anal. Chem.***80**, 643–650 (2008).
127. Lin, Y. *et al.* Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell***136**, 1073–1084 (2009).
128. Barrett, O. J., Pushechnikov, A., Wu, M. & Disney, M. D. Studying aminoglycoside modification by the acetyltransferase class of resistance-causing enzymes via microarray. *Carbohydr. Res.***343**, 2924–2931 (2008).
129. Lee, J. & Bedford, M. T. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep.***3**, 268–273 (2002).
130. Feilner, T. *et al.* High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol. Cell. Proteomics MCP***4**, 1558–1568 (2005).
131. Song, H., Kerman, K. & Kraatz, H.-B. Electrochemical detection of kinase-catalyzed phosphorylation using ferrocene-conjugated ATP. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 502–504 (2008). doi:10.1039/b714383d
132. Sun, L., Liu, D. & Wang, Z. Microarray-based kinase inhibition assay by gold nanoparticle probes. *Anal. Chem.***79**, 773–777 (2007).
133. Martin, K. *et al.* Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye. *Proteomics***3**, 1244–1255 (2003).
134. Kerman, K., Chikae, M., Yamamura, S. & Tamiya, E. Gold nanoparticle-based electrochemical detection of protein phosphorylation. *Anal. Chim. Acta***588**, 26–33 (2007).
135. Green, K. D. & Pflum, M. K. H. Kinase-catalyzed biotinylation for phosphoprotein detection. *J. Am. Chem. Soc.***129**, 10–11 (2007).
136. Green, K. D. & Pflum, M. K. H. Exploring kinase cosubstrate promiscuity: monitoring kinase activity through dansylation. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.***10**, 234–237 (2009).
137. Uttamchandani, M., Chan, E. W. S., Chen, G. Y. J. & Yao, S. Q. Combinatorial peptide microarrays for the rapid determination of kinase specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***13**, 2997–3000 (2003).
138. Houseman, B. T., Huh, J. H., Kron, S. J. & Mrksich, M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat. Biotechnol.***20**, 270–274 (2002).
139. Versele, M. *et al.* Response prediction to a multitargeted kinase inhibitor in cancer cell lines and xenograft tumors using high-content tyrosine peptide arrays with a kinetic readout. *Mol. Cancer Ther.***8**, 1846–1855 (2009).
140. Reimer, U., Reineke, U. & Schneider-Mergener, J. Peptide arrays: from macro to micro. *Curr. Opin. Biotechnol.***13**, 315–320 (2002).

141. Espanel, X. *et al.* Mapping of synergistic components of weakly interacting protein-protein motifs using arrays of paired peptides. *J. Biol. Chem.***278**, 15162–15167 (2003).
142. De Keersmaecker, K., Versele, M., Cools, J., Superti-Furga, G. & Hantschel, O. Intrinsic differences between the catalytic properties of the oncogenic NUP214-ABL1 and BCR-ABL1 fusion protein kinases. *Leukemia***22**, 2208–2216 (2008).
143. Rupcich, N., Green, J. R. A. & Brennan, J. D. Nanovolume kinase inhibition assay using a sol-gel-derived multicomponent microarray. *Anal. Chem.***77**, 8013–8019 (2005).
144. Shimomura, T. *et al.* Optimization of peptide density on microarray surface for quantitative phosphoproteomics. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.***27**, 13–17 (2011).
145. Kinoshita, E. *et al.* Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin. *Proteomics***12**, 932–937 (2012).
146. Lemeer, S. *et al.* Protein-tyrosine kinase activity profiling in knock down zebrafish embryos. *PLoS One***2**, e581 (2007).
147. Lemeer, S. *et al.* Endogenous phosphotyrosine signaling in zebrafish embryos. *Mol. Cell. Proteomics MCP6*, 2088–2099 (2007).
148. Inamori, K. *et al.* Detection and quantification of on-chip phosphorylated peptides by surface plasmon resonance imaging techniques using a phosphate capture molecule. *Anal. Chem.***77**, 3979–3985 (2005).
149. Shigaki, S. *et al.* A peptide microarray for the detection of protein kinase activity in cell lysate. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.***23**, 271–275 (2007).
150. Akita, S., Umezawa, N., Kato, N. & Higuchi, T. Array-based fluorescence assay for serine/threonine kinases using specific chemical reaction. *Bioorg. Med. Chem.***16**, 7788–7794 (2008).
151. Voigt, P. & Reinberg, D. Histone tails: ideal motifs for probing epigenetics through chemical biology approaches. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.***12**, 236–252 (2011).
152. Garske, A. L., Craciun, G. & Denu, J. M. A combinatorial H4 tail library for exploring the histone code. *Biochemistry (Mosc.)***47**, 8094–8102 (2008).
153. Garske, A. L. *et al.* Combinatorial profiling of chromatin binding modules reveals multisite discrimination. *Nat. Chem. Biol.***6**, 283–290 (2010).
154. Sawicka, A. & Seiser, C. Sensing core histone phosphorylation - a matter of perfect timing. *Biochim. Biophys. Acta***1839**, 711–718 (2014).
155. Mahajan, K., Fang, B., Koomen, J. M. & Mahajan, N. P. H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.***19**, 930–937 (2012).
156. Frederiks, F., Stulemeijer, I. J. E., Ovaa, H. & van Leeuwen, F. A modified epigenetics toolbox to study histone modifications on the nucleosome core. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.***12**, 308–313 (2011).
157. Tropberger, P. *et al.* Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell***152**, 859–872 (2013).
158. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell***128**, 693–705 (2007).
159. Bungard, D. *et al.* Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science***329**, 1201–1205 (2010).
160. Nady, N., Min, J., Kareta, M. S., Chédin, F. & Arrowsmith, C. H. A SPOT on the chromatin landscape? Histone peptide arrays as a tool for epigenetic research. *Trends Biochem. Sci.***33**, 305–313 (2008).
161. Bock, I. *et al.* Application of Celluspot peptide arrays for the analysis of the binding specificity of epigenetic reading domains to modified histone tails. *BMC Biochem.***12**, 48 (2011).
162. Filippakopoulos, P. *et al.* Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell***149**, 214–231 (2012).
163. Bua, D. J. *et al.* Epigenome microarray platform for proteome-wide dissection of chromatin-signaling networks. *PLoS One***4**, e6789 (2009).
164. Matthews, A. G. W. *et al.* RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature***450**, 1106–1110 (2007).
165. Levy, D. *et al.* Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling. *Nat. Immunol.***12**, 29–36 (2011).
166. Hung, T. *et al.* ING4 mediates crosstalk between histone H3 K4 trimethylation and H3 acetylation to attenuate cellular transformation. *Mol. Cell***33**, 248–256 (2009).
167. Kleine-Kohlbrecher, D. *et al.* A functional link between the histone demethylase PHF8 and the transcription factor ZNF711 in X-linked mental retardation. *Mol. Cell***38**, 165–178 (2010).
168. Liu, H. *et al.* Systematic identification of methyllysine-driven interactions for histone and nonhistone targets. *J. Proteome Res.***9**, 5827–5836 (2010).
169. Zhang, Y. *et al.* Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res.***38**, 4246–4253 (2010).

170. Dhayalan, A. *et al.* The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2195–2203 (2011).
171. Rothbart, S. B. *et al.* Multivalent histone engagement by the linked tandem Tudor and PHD domains of UHRF1 is required for the epigenetic inheritance of DNA methylation. *Genes Dev.* **27**, 1288–1298 (2013).
172. Su, Z. *et al.* ChIP-less analysis of chromatin states. *Epigenetics Chromatin* **7**, 7 (2014).
173. Ngo, Y. *et al.* Identification and testing of control peptides for antigen microarrays. *J. Immunol. Methods* **343**, 68–78 (2009).
174. Renard, B. Y. *et al.* rapmad: Robust analysis of peptide microarray data. *BMC Bioinformatics* **12**, 324 (2011).
175. Wisniewski, J. R., Zougman, A., Krüger, S. & Mann, M. Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. *Mol. Cell. Proteomics MCP6*, 72–87 (2007).
176. Tarakhovsky, A. Tools and landscapes of epigenetics. *Nat. Immunol.* **11**, 565–568 (2010).
177. Allfrey, V. G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786–794 (1964).
178. Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 536–550 (2014).
179. Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R. & Verreault, A. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* **436**, 294–298 (2005).
180. Mujtaba, S., Zeng, L. & Zhou, M.-M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521–5527 (2007).
181. Xhemalce, B. & Kouzarides, T. A chromodomain switch mediated by histone H3 Lys 4 acetylation regulates heterochromatin assembly. *Genes Dev.* **24**, 647–652 (2010).
182. Schalch, T. *et al.* High-affinity binding of Chp1 chromodomain to K9 methylated histone H3 is required to establish centromeric heterochromatin. *Mol. Cell* **34**, 36–46 (2009).
183. Parthun, M. R. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* **26**, 5319–5328 (2007).
184. Marmorstein, R. & Roth, S. Y. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 155–161 (2001).
185. Thompson, P. R., Kurooka, H., Nakatani, Y. & Cole, P. A. Transcriptional coactivator protein p300. Kinetic characterization of its histone acetyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 33721–33729 (2001).
186. Poux, A. N. & Marmorstein, R. Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates. *Biochemistry (Mosc.)* **42**, 14366–14374 (2003).
187. Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **64**, 435–459 (2000).
188. Vetting, M. W. *et al.* Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 212–226 (2005).
189. Pillus, L. MYSTs mark chromatin for chromosomal functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 326–333 (2008).
190. Kobayashi, J., Kato, A., Ota, Y., Ohba, R. & Komatsu, K. Bisbenzamidine derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Mol. Cancer* **9**, 34 (2010).
191. Stante, M. *et al.* Fe65 is required for Tip60-directed histone H4 acetylation at DNA strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5093–5098 (2009).
192. Murr, R. *et al.* Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **8**, 91–99 (2006).
193. Kalkhoven, E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1145–1155 (2004).
194. Chrivia, J. C. *et al.* Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855–859 (1993).
195. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120 (2001).
196. Saunders, L. R. & Verdin, E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* **26**, 5489–5504 (2007).
197. Shore, D., Squire, M. & Nasmyth, K. A. Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J.* **3**, 2817–2823 (1984).
198. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–800 (2000).
199. Vaquero, A. The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 303–322 (2009).
200. Sebastián, C., Satterstrom, F. K., Haigis, M. C. & Mostoslavsky, R. From sirtuin biology to human diseases: an update. *J. Biol. Chem.* **287**, 42444–42452 (2012).

201. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. & Denu, J. M. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14178–14182 (2000).
202. Martínez-Redondo, P. & Vaquero, A. The diversity of histone versus nonhistone sirtuin substrates. *Genes Cancer* **4**, 148–163 (2013).
203. North, B. J. & Verdin, E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* **5**, 224 (2004).
204. Du, J. *et al.* Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* **334**, 806–809 (2011).
205. Park, J. *et al.* SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol. Cell* **50**, 919–930 (2013).
206. Lin, Z.-F. *et al.* SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**, 191–195 (2013).
207. Peng, C. *et al.* The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**, M111.012658 (2011).
208. Rardin, M. J. *et al.* SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab.* **18**, 920–933 (2013).
209. Jiang, H. *et al.* SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* **496**, 110–113 (2013).
210. Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350–31356 (2013).
211. Tan, M. *et al.* Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab.* **19**, 605–617 (2014).
212. Roessler, C. *et al.* Chemical probing of the human sirtuin 5 active site reveals its substrate acyl specificity and peptide-based inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 10728–10732 (2014).
213. Garrity, J., Gardner, J. G., Hawse, W., Wolberger, C. & Escalante-Semerena, J. C. N-lysine propionylation controls the activity of propionyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* **282**, 30239–30245 (2007).
214. Smith, B. C. & Denu, J. M. Acetyl-lysine analog peptides as mechanistic probes of protein deacetylases. *J. Biol. Chem.* **282**, 37256–37265 (2007).
215. Bao, X. *et al.* Identification of ‘erasers’ for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *eLife* **3**, (2014).
216. Bosch-Presegué, L. & Vaquero, A. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J.* **282**, 1745–1767 (2015).
217. Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M. & Guarente, L. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280**, 21313–21320 (2005).
218. Roth, M. & Chen, W. Y. Sorting out functions of sirtuins in cancer. *Oncogene* **33**, 1609–1620 (2014).
219. Jeong, S. M., Lee, A., Lee, J. & Haigis, M. C. SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. *J. Biol. Chem.* **289**, 4135–4144 (2014).
220. Lombard, D. B. *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8807–8814 (2007).
221. Michishita, E. *et al.* SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* **452**, 492–496 (2008).
222. Peng, L. *et al.* SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4720–4734 (2011).
223. Vaquero, A. *et al.* SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* **20**, 1256–1261 (2006).
224. Jin, Q. *et al.* Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **213**, 88–97 (2007).
225. Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K. & Horio, Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* **282**, 6823–6832 (2007).
226. Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C. & Horikawa, I. Evolutionarily conserved and non-conserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4623–4635 (2005).
227. North, B. J. & Verdin, E. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One* **2**, e784 (2007).
228. Scher, M. B., Vaquero, A. & Reinberg, D. SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev.* **21**, 920–928 (2007).
229. Kaeberlein, M., McVey, M. & Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**, 2570–2580 (1999).

230. Sinclair, D. A. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech. Ageing Dev.***126**, 987–1002 (2005).
231. Lee, N. *et al.* Comparative interactomes of SIRT6 and SIRT7: Implication of functional links to aging. *Proteomics***14**, 1610–1622 (2014).
232. Finkel, T., Deng, C.-X. & Mostoslavsky, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature***460**, 587–591 (2009).
233. Burnett, C. *et al.* Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature***477**, 482–485 (2011).
234. Gusman, J., Malonne, H. & Atassi, G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis***22**, 1111–1117 (2001).
235. Sanders, B. D., Jackson, B. & Marmorstein, R. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim. Biophys. Acta***1804**, 1604–1616 (2010).
236. Smith, B. C., Settles, B., Hallows, W. C., Craven, M. W. & Denu, J. M. SIRT3 substrate specificity determined by peptide arrays and machine learning. *ACS Chem. Biol.***6**, 146–157 (2011).
237. Tsang, A. W. & Escalante-Semerena, J. C. CobB, a new member of the SIR2 family of eucaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide:5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in cobT mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.***273**, 31788–31794 (1998).
238. Haigis, M. C. & Sinclair, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.***5**, 253–295 (2010).
239. Yun, M., Wu, J., Workman, J. L. & Li, B. Readers of histone modifications. *Cell Res.***21**, 564–578 (2011).
240. Dhalluin, C. *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature***399**, 491–496 (1999).
241. VanDemark, A. P. *et al.* Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Mol. Cell***27**, 817–828 (2007).
242. Owen, D. J. *et al.* The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.***19**, 6141–6149 (2000).
243. Zeng, L. *et al.* Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature***466**, 258–262 (2010).
244. Filippakopoulos, P. & Knapp, S. The bromodomain interaction module. *FEBS Lett.***586**, 2692–2704 (2012).
245. Muller, S., Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Bromodomains as therapeutic targets. *Expert Rev. Mol. Med.***13**, e29 (2011).
246. Colak, G. *et al.* Identification of lysine succinylation substrates and the succinylation regulatory enzyme CobB in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Proteomics MCP***12**, 3509–3520 (2013).
247. Wen, H. *et al.* Recognition of histone H3K4 trimethylation by the plant homeodomain of PHF2 modulates histone demethylation. *J. Biol. Chem.***285**, 9322–9326 (2010).
248. Nardelli, S. C. *et al.* The histone code of *Toxoplasma gondii* comprises conserved and unique posttranslational modifications. *mBio***4**, e00922–00913 (2013).
249. Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.***13**, 337–356 (2014).
250. Ng, S. S., Yue, W. W., Oppermann, U. & Klose, R. J. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS***66**, 407–422 (2009).
251. Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell***33**, 1–13 (2009).
252. Lan, F. & Shi, Y. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Sci. China Ser. C Life Sci. Chin. Acad. Sci.***52**, 311–322 (2009).
253. Bernstein, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell***125**, 315–326 (2006).
254. Rea, S. *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature***406**, 593–599 (2000).
255. Albert, M. & Helin, K. Histone methyltransferases in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.***21**, 209–220 (2010).
256. Xiao, B. *et al.* Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature***421**, 652–656 (2003).
257. Zhao, Q. *et al.* PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.***16**, 304–311 (2009).
258. Maurer-Stroh, S. *et al.* The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem. Sci.***28**, 69–74 (2003).

259. Kim, J. *et al.* Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.***7**, 397–403 (2006).
260. Wang, W. *et al.* Nucleolar protein Spindlin1 recognizes H3K4 methylation and stimulates the expression of rRNA genes. *EMBO Rep.***12**, 1160–1166 (2011).
261. Yang, N. *et al.* Distinct mode of methylated lysine-4 of histone H3 recognition by tandem tudor-like domains of Spindlin1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***109**, 17954–17959 (2012).
262. Zhao, Q. *et al.* Structure of human spindlin1. Tandem tudor-like domains for cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.***282**, 647–656 (2007).
263. Su, X. *et al.* Molecular basis underlying histone H3 lysine-arginine methylation pattern readout by Spin/Ssty repeats of Spindlin1. *Genes Dev.***28**, 622–636 (2014).
264. Franz, H. *et al.* The histone code reader SPIN1 controls RET signaling in liposarcoma. *Oncotarget***6**, 4773–4789 (2015).
265. Patel, D. J. & Wang, Z. Readout of epigenetic modifications. *Annu. Rev. Biochem.***82**, 81–118 (2013).
266. Shimojo, H. *et al.* Novel structural and functional mode of a knot essential for RNA binding activity of the Esa1 presumed chromodomain. *J. Mol. Biol.***378**, 987–1001 (2008).
267. Sims, R. J. *et al.* Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.***280**, 41789–41792 (2005).
268. Shoemaker, C. B. & Chalkley, R. An H3 histone-specific kinase isolated from bovine thymus chromatin. *J. Biol. Chem.***253**, 5802–5807 (1978).
269. Adams, R. R., Maiato, H., Earnshaw, W. C. & Carmena, M. Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J. Cell Biol.***153**, 865–880 (2001).
270. Giet, R. & Glover, D. M. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.***152**, 669–682 (2001).
271. Hsu, J. Y. *et al.* Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell***102**, 279–291 (2000).
272. Murnion, M. E. *et al.* Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J. Biol. Chem.***276**, 26656–26665 (2001).
273. Speliotes, E. K., Uren, A., Vaux, D. & Horvitz, H. R. The survivin-like C. elegans BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol. Cell***6**, 211–223 (2000).
274. Crosio, C. *et al.* Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell. Biol.***22**, 874–885 (2002).
275. Dunn, K. L. & Davie, J. R. Stimulation of the Ras-MAPK pathway leads to independent phosphorylation of histone H3 on serine 10 and 28. *Oncogene***24**, 3492–3502 (2005).
276. Dyson, M. H. *et al.* MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *J. Cell Sci.***118**, 2247–2259 (2005).
277. Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D. & Patel, D. J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.***14**, 1025–1040 (2007).
278. Soloaga, A. *et al.* MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.***22**, 2788–2797 (2003).
279. Pearce, L. R., Komander, D. & Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***11**, 9–22 (2010).
280. Healy, S., Khan, P., He, S. & Davie, J. R. Histone H3 phosphorylation, immediate-early gene expression, and the nucleosomal response: a historical perspective. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.***90**, 39–54 (2012).
281. Liokatis, S. *et al.* Phosphorylation of histone H3 Ser10 establishes a hierarchy for subsequent intramolecular modification events. *Nat. Struct. Mol. Biol.***19**, 819–823 (2012).
282. Metzger, E. *et al.* Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat. Cell Biol.***10**, 53–60 (2008).
283. Rohe, A. *et al.* In vitro and in silico studies on substrate recognition and acceptance of human PKMYT1, a Cdk1 inhibitory kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***22**, 1219–1223 (2012).
284. Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science***270**, 86–90 (1995).
285. Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. & Piwnicka-Worms, H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.***17**, 571–583 (1997).

286. Moorhead, G. B. G., Trinkle-Mulcahy, L. & Ulke-Lemée, A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 234–244 (2007).
287. Cohen, P. The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **4**, E127–130 (2002).
288. Keogh, M.-C. *et al.* A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* **439**, 497–501 (2006).
289. Chowdhury, D. *et al.* gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* **20**, 801–809 (2005).
290. Cook, P. J. *et al.* Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* **458**, 591–596 (2009).
291. de Carvalho, C. E. *et al.* LAB-1 antagonizes the Aurora B kinase in *C. elegans*. *Genes Dev.* **22**, 2869–2885 (2008).
292. Sugiyama, K. *et al.* Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene* **21**, 3103–3111 (2002).
293. Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A. & Inagaki, M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **7**, 11–17 (2002).
294. Espinosa, A., Guo, M., Tam, V. C., Fu, Z. Q. & Alfano, J. R. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol. Microbiol.* **49**, 377–387 (2003).
295. Bretz, J. R. *et al.* A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 modulates plant defence response to infection. *Mol. Microbiol.* **49**, 389–400 (2003).
296. Petnicki-Ocwieja, T. *et al.* Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7652–7657 (2002).
297. Potnis, N. *et al.* Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **25**, 307–320 (2012).
298. Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M.-M. & Pawson, T. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 473–483 (2006).
299. Macdonald, N. *et al.* Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol. Cell* **20**, 199–211 (2005).
300. Herranz, N. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 deaminates lysine 4 in histone H3. *Mol. Cell* **46**, 369–376 (2012).
301. Dehennaut, V., Leprince, D. & Lefebvre, T. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front. Endocrinol.* **5**, 155 (2014).
302. Fujiki, R. *et al.* GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* **480**, 557–560 (2011).
303. Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R. & Yu, X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* **493**, 561–564 (2013).
304. Dai, L. *et al.* Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 365–370 (2014).
305. Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M. & Hottiger, M. O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **70**, 789–829 (2006).
306. Messner, S. *et al.* PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6350–6362 (2010).
307. Hottiger, M. O., Hassa, P. O., Lüscher, B., Schüler, H. & Koch-Nolte, F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 208–219 (2010).
308. Wahlberg, E. *et al.* Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **30**, 283–288 (2012).
309. Amé, J.-C., Spenlehauer, C. & de Murcia, G. The PARP superfamily. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **26**, 882–893 (2004).
310. Sun, Y. *et al.* Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1376–1382 (2009).
311. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. & de Murcia, G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517–528 (2006).
312. Quénet, D., El Ramy, R., Schreiber, V. & Dantzer, F. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in epigenetic events. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 60–65 (2009).
313. Cohen-Armon, M. *et al.* DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol. Cell* **25**, 297–308 (2007).

314. Klenova, E. & Ohlsson, R. Poly(ADP-ribosyl)ation and epigenetics. Is CTCF PART of the plot? *Cell Cycle Georget. Tex***4**, 96–101 (2005).
315. Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C. & Mandel, P. Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3423–3427 (1982).
316. Rouleau, M., Aubin, R. A. & Poirier, G. G. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J. Cell Sci.* **117**, 815–825 (2004).
317. Yu, M. *et al.* PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene***24**, 1982–1993 (2005).
318. Chou, H.-Y. E., Chou, H. T. & Lee, S.-C. CDK-dependent activation of poly(ADP-ribose) polymerase member 10 (PARP10). *J. Biol. Chem.* **281**, 15201–15207 (2006).
319. Kleine, H. *et al.* Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol. Cell***32**, 57–69 (2008).
320. Karras, G. I. *et al.* The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* **24**, 1911–1920 (2005).
321. Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. & Ladurner, A. G. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 624–625 (2005).
322. Chen, D. *et al.* Identification of macrodomain proteins as novel O-acetyl-ADP-ribose deacetylases. *J. Biol. Chem.* **286**, 13261–13271 (2011).
323. Kasamatsu, A. *et al.* Hydrolysis of O-acetyl-ADP-ribose isomers by ADP-ribosylhydrolase 3. *J. Biol. Chem.* **286**, 21110–21117 (2011).
324. Chen, Y. *et al.* Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol. Cell. Proteomics MCP6*, 812–819 (2007).
325. Xie, Z. *et al.* Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol. Cell. Proteomics MCP11*, 100–107 (2012).
326. Zhang, Z. *et al.* Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 58–63 (2011).
327. Weinert, B. T. *et al.* Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep.* **4**, 842–851 (2013).
328. Jiang, T., Zhou, X., Taghizadeh, K., Dong, M. & Dedon, P. C. N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 60–65 (2007).
329. Wisniewski, J. R., Zougman, A. & Mann, M. Nepsilon-formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function. *Nucleic Acids Res.* **36**, 570–577 (2008).
330. King, M. T. & Reiss, P. D. Separation and measurement of short-chain coenzyme-A compounds in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **146**, 173–179 (1985).
331. Liu, B. *et al.* Identification and characterization of propionylation at histone H3 lysine 23 in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 32288–32295 (2009).
332. Bheda, P., Wang, J. T., Escalante-Semerena, J. C. & Wolberger, C. Structure of Sir2Tm bound to a propionylated peptide. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **20**, 131–139 (2011).
333. Flynn, E. M. *et al.* A Subset of Human Bromodomains Recognizes Butyryllysine and Crotonyllysine Histone Peptide Modifications. *Struct. Lond. Engl.* **199323**, 1801–1814 (2015).
334. Huang, H., Sabari, B. R., Garcia, B. A., Allis, C. D. & Zhao, Y. SnapShot: histone modifications. *Cell***159**, 458–458.e1 (2014).
335. Colak, G. *et al.* Proteomic and Biochemical Studies of Lysine Malonylation Suggest Its Malonic Aciduria-associated Regulatory Role in Mitochondrial Function and Fatty Acid Oxidation. *Mol. Cell. Proteomics MCP14*, 3056–3071 (2015).
336. Park, J. H. *et al.* Akt attenuates apoptotic death through phosphorylation of H2A under hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells and hippocampal neurons. *Sci. Rep.* **6**, 21857 (2016).
337. Musselman, C. A., Lalonde, M.-E., Côté, J. & Kutateladze, T. G. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1218–1227 (2012).
338. Baek, S. H. When signaling kinases meet histones and histone modifiers in the nucleus. *Mol. Cell***42**, 274–284 (2011).
339. Lohse, B. *et al.* Posttranslational modifications of the histone 3 tail and their impact on the activity of histone lysine demethylases in vitro. *PLoS One***8**, e67653 (2013).
340. Kim, J. *et al.* RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell***137**, 459–471 (2009).

341. Fischle, W. *et al.* Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature***438**, 1116–1122 (2005).
342. Nelson, C. J., Santos-Rosa, H. & Kouzarides, T. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell***126**, 905–916 (2006).
343. Vermeulen, M. *et al.* Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell***142**, 967–980 (2010).
344. Bartke, T. *et al.* Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell***143**, 470–484 (2010).
345. Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B.-H. & Peters, J.-M. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature***438**, 1176–1180 (2005).
346. Izzo, A. & Schneider, R. Chatting histone modifications in mammals. *Brief. Funct. Genomics***9**, 429–443 (2010).
347. Wang, F. & Higgins, J. M. G. Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks. *Trends Cell Biol.***23**, 175–184 (2013).
348. Prigent, C. & Dimitrov, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell Sci.***116**, 3677–3685 (2003).
349. Goto, H. *et al.* Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J. Biol. Chem.***274**, 25543–25549 (1999).
350. Zhang, B., Dong, Q., Su, H., Birchler, J. A. & Han, F. Histone phosphorylation: its role during cell cycle and centromere identity in plants. *Cytogenet. Genome Res.***143**, 144–149 (2014).
351. Banerjee, T. & Chakravarti, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.***31**, 4858–4873 (2011).
352. Reynolds, N. *et al.* NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *EMBO J.***31**, 593–605 (2012).
353. Liu, H., Hu, Q., D’ercole, A. J. & Ye, P. Histone deacetylase 11 regulates oligodendrocyte-specific gene expression and cell development in OL-1 oligodendroglia cells. *Glia***57**, 1–12 (2009).
354. Fass, D. M. *et al.* in *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012).
355. Hsieh, Y. J., Kundu, T. K., Wang, Z., Kovelman, R. & Roeder, R. G. The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol. Cell. Biol.***19**, 7697–7704 (1999).
356. Mizzen, C. A. *et al.* The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell***87**, 1261–1270 (1996).
357. Katsumoto, T., Yoshida, N. & Kitabayashi, I. Roles of the histone acetyltransferase monocytic leukemia zinc finger protein in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.***99**, 1523–1527 (2008).
358. Hsu, W. W., Wu, B. & Liu, W. R. Sirtuins 1 and 2 Are Universal Histone Deacetylases. *ACS Chem. Biol.***11**, 792–799 (2016).
359. Gil, R., Barth, S., Kanfi, Y. & Cohen, H. Y. SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.***41**, 8537–8545 (2013).
360. Kumar, R. *et al.* Chromatin modifications and the DNA damage response to ionizing radiation. *Front. Oncol.***2**, 214 (2012).
361. Cheung, P. *et al.* Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell***5**, 905–915 (2000).
362. Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J. & Mahadevan, L. C. Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J.***19**, 3714–3726 (2000).
363. Lo, W. S. *et al.* Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell***5**, 917–926 (2000).
364. Kruhlak, M. J. *et al.* Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J. Biol. Chem.***276**, 38307–38319 (2001).
365. McManus, K. J. & Hendzel, M. J. The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.***84**, 640–657 (2006).
366. Lee, E. R., McCool, K. W., Murdoch, F. E. & Fritsch, M. K. Dynamic changes in histone H3 phosphoacetylation during early embryonic stem cell differentiation are directly mediated by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 via activation of MAPK pathways. *J. Biol. Chem.***281**, 21162–21172 (2006).
367. Winter, S. *et al.* 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO J.***27**, 88–99 (2008).
368. Walter, W. *et al.* 14-3-3 interaction with histone H3 involves a dual modification pattern of phosphoacetylation. *Mol. Cell. Biol.***28**, 2840–2849 (2008).

369. Lau, P. N. I. & Cheung, P. Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2801–2806 (2011).
370. Schiltz, R. L. *et al.* Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J. Biol. Chem.* **274**, 1189–1192 (1999).
371. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326 (1989).
372. Coin, I., Beyermann, M. & Bienert, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat. Protoc.* **2**, 3247–3256 (2007).
373. Diella, F., Gould, C. M., Chica, C., Via, A. & Gibson, T. J. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites--update 2008. *Nucleic Acids Res.* **36**, D240–244 (2008).
374. Hornbeck, P. V., Chabra, I., Kornhauser, J. M., Skrzypek, E. & Zhang, B. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics* **4**, 1551–1561 (2004).
375. Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–1362 (1999).
376. Thiele, A. Peptide microarrays for determination of cross-reactivity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **524**, 225–234 (2009).
377. R: The R Project for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
378. Vacic, V., Iakoucheva, L. M. & Radivojac, P. Two Sample Logo: a graphical representation of the differences between two sets of sequence alignments. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **22**, 1536–1537 (2006).
379. <http://www.twosamplelogo.org/cgi-bin/tsl/tsl.cgi>.
380. Langer, M. R., Fry, C. J., Peterson, C. L. & Denu, J. M. Modulating acetyl-CoA binding in the GCN5 family of histone acetyltransferases. *J. Biol. Chem.* **277**, 27337–27344 (2002).
381. Liu, X. *et al.* The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* **451**, 846–850 (2008).
382. Tanner, K. G., Langer, M. R., Kim, Y. & Denu, J. M. Kinetic mechanism of the histone acetyltransferase GCN5 from yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 22048–22055 (2000).
383. Flanagan, J. F. *et al.* Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**, 1181–1185 (2005).
384. Rohe, A. *et al.* Identification of peptidic substrates for the human kinase Myt1 using peptide microarrays. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 4936–4942 (2015).
385. Zhang, Y., Griffin, K., Mondal, N. & Parvin, J. D. Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. *J. Biol. Chem.* **279**, 21866–21872 (2004).
386. Shimada, M., Nakadai, T., Fukuda, A. & Hisatake, K. cAMP-response element-binding protein (CREB) controls MSK1-mediated phosphorylation of histone H3 at the c-fos promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* **285**, 9390–9401 (2010).
387. Ferrari, E. *et al.* Identification of new substrates of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B by Bayesian integration of proteome evidence. *J. Biol. Chem.* **286**, 4173–4185 (2011).
388. Zhang, Z. Y., Maclean, D., Thieme-Seffler, A. M., Roeske, R. W. & Dixon, J. E. A continuous spectrophotometric and fluorimetric assay for protein tyrosine phosphatase using phosphotyrosine-containing peptides. *Anal. Biochem.* **211**, 7–15 (1993).
389. Lim, K. L., Lai, D. S. Y., Kalousek, M. B., Wang, Y. & Pallen, C. J. Kinetic Analysis of two Closely Related Receptor-Like Protein-Tyrosine-Phosphatases, PTP α and PTP ϵ . *Eur. J. Biochem.* **245**, 693–700 (1997).
390. Schuster, S. *et al.* A continuous sirtuin activity assay without any coupling to enzymatic or chemical reactions. *Sci. Rep.* **6**, 22643 (2016).
391. Barski, A. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823–837 (2007).
392. Impey, S. *et al.* Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* **119**, 1041–1054 (2004).
393. Nelson, J. D., Denisenko, O. & Bomsztyk, K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat. Protoc.* **1**, 179–185 (2006).
394. Kuo, M. H. & Allis, C. D. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods San Diego Calif* **19**, 425–433 (1999).
395. Choudhary, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834–840 (2009).
396. Choudhary, C. & Mann, M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 427–439 (2010).

397. Parseghian, M. H. Hitchhiker antigens: inconsistent ChIP results, questionable immunohistology data, and poor antibody performance may have a common factor. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.***91**, 378–394 (2013).
398. Bordeaux, J. *et al.* Antibody validation. *BioTechniques***48**, 197–209 (2010).
399. Helsby, M. A., Fenn, J. R. & Chalmers, A. D. Reporting research antibody use: how to increase experimental reproducibility. *F1000Research***2**, 153 (2013).
400. Bradbury, A. & Plückthun, A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature***518**, 27–29 (2015).
401. Major, S. M. *et al.* AbMiner: a bioinformatic resource on available monoclonal antibodies and corresponding gene identifiers for genomic, proteomic, and immunologic studies. *BMC Bioinformatics***7**, 192 (2006).
402. Vollmuth, F. & Geyer, M. Interaction of propionylated and butyrylated histone H3 lysine marks with Brd4 bromodomains. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.***49**, 6768–6772 (2010).
403. Wen, H. *et al.* ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. *Nature***508**, 263–268 (2014).
404. Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature***447**, 407–412 (2007).
405. Hewings, D. S. *et al.* Progress in the development and application of small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions. *J. Med. Chem.***55**, 9393–9413 (2012).
406. Sanchez, R., Meslamani, J. & Zhou, M.-M. The bromodomain: from epigenome reader to druggable target. *Biochim. Biophys. Acta***1839**, 676–685 (2014).
407. Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature***468**, 1067–1073 (2010).
408. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell***150**, 12–27 (2012).
409. Shi, J. & Vakoc, C. R. The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition. *Mol. Cell***54**, 728–736 (2014).
410. Kouzarides, T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.***19**, 1176–1179 (2000).
411. Gu, W. & Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell***90**, 595–606 (1997).
412. Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y. & Ogryzko, V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature***396**, 594–598 (1998).
413. Zhang, W. & Bieker, J. J. Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***95**, 9855–9860 (1998).
414. Martínez-Balbás, M. A., Bauer, U. M., Nielsen, S. J., Brehm, A. & Kouzarides, T. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.***19**, 662–671 (2000).
415. Shao, J. *et al.* Systematic analysis of human lysine acetylation proteins and accurate prediction of human lysine acetylation through bi-relative adapted binomial score Bayes feature representation. *Mol. Biosyst.***8**, 2964–2973 (2012).
416. Lundby, A. *et al.* Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep.***2**, 419–431 (2012).
417. Shi, S.-P. *et al.* PLMLA: prediction of lysine methylation and lysine acetylation by combining multiple features. *Mol. Biosyst.***8**, 1520–1527 (2012).
418. Lu, C.-T., Lee, T.-Y., Chen, Y.-J. & Chen, Y.-J. An intelligent system for identifying acetylated lysine on histones and nonhistone proteins. *BioMed Res. Int.***2014**, 528650 (2014).
419. Li, Y. *et al.* Accurate in silico identification of species-specific acetylation sites by integrating protein sequence-derived and functional features. *Sci. Rep.***4**, 5765 (2014).
420. Downey, M. *et al.* Acetylome profiling reveals overlap in the regulation of diverse processes by sirtuins, gcn5, and esa1. *Mol. Cell. Proteomics MCP***14**, 162–176 (2015).
421. Simic, Z., Weiwad, M., Schierhorn, A., Steegborn, C. & Schutkowski, M. The ε-Amino Group of Protein Lysine Residues Is Highly Susceptible to Nonenzymatic Acylation by Several Physiological Acyl-CoA Thioesters. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.***16**, 2337–2347 (2015).
422. Sabari, B. R. *et al.* Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol. Cell***58**, 203–215 (2015).
423. Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P. O., Fey, M. & Hottiger, M. O. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res.***37**, 3723–3738 (2009).
424. Krebs, C. *et al.* Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal. Biochem.***314**, 108–115 (2003).

425. Collazos, A. *et al.* Site recognition and substrate screens for PKN family proteins. *Biochem. J.* **438**, 535–543 (2011).
426. Basnet, H. *et al.* Tyrosine phosphorylation of histone H2A by CK2 regulates transcriptional elongation. *Nature* **516**, 267–271 (2014).
427. Schutkowski, M., Reineke, U. & Reimer, U. Peptide arrays for kinase profiling. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **6**, 513–521 (2005).
428. Bouras, T. *et al.* SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J. Biol. Chem.* **280**, 10264–10276 (2005).
429. Black, J. C., Mosley, A., Kitada, T., Washburn, M. & Carey, M. The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol. Cell* **32**, 449–455 (2008).
430. Lu, L. *et al.* Modulations of hMOF autoacetylation by SIRT1 regulate hMOF recruitment and activities on the chromatin. *Cell Res.* **21**, 1182–1195 (2011).
431. Yamagata, K. & Kitabayashi, I. Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 1355–1360 (2009).
432. Wang, J. & Chen, J. SIRT1 regulates autoacetylation and histone acetyltransferase activity of TIP60. *J. Biol. Chem.* **285**, 11458–11464 (2010).
433. Peng, L. *et al.* SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2823–2836 (2012).
434. Rajamohan, S. B. *et al.* SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4116–4129 (2009).
435. Mao, Z. *et al.* SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* **332**, 1443–1446 (2011).
436. Kawahara, T. L. A. *et al.* SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* **136**, 62–74 (2009).
437. Lefort, K. *et al.* A miR-34a-SIRT6 axis in the squamous cell differentiation network. *EMBO J.* **32**, 2248–2263 (2013).
438. Dong, X. C. Sirtuin biology and relevance to diabetes treatment. *Diabetes Manag. Lond. Engl.* **2**, 243–257 (2012).
439. Hansen, J. C. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361–392 (2002).
440. Vaquero, A. *et al.* Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* **16**, 93–105 (2004).
441. Das, C., Lucia, M. S., Hansen, K. C. & Tyler, J. K. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459**, 113–117 (2009).
442. Vempati, R. K. *et al.* p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 56 functions in DNA damage response in mammals. *J. Biol. Chem.* **285**, 28553–28564 (2010).
443. Yuan, J., Pu, M., Zhang, Z. & Lou, Z. Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 1747–1753 (2009).
444. Eskandarian, H. A. *et al.* A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science* **341**, 1238858 (2013).
445. Teng, Y.-B. *et al.* Efficient demyristoylase activity of SIRT2 revealed by kinetic and structural studies. *Sci. Rep.* **5**, 8529 (2015).
446. Moniot, S., Schutkowski, M. & Steegborn, C. Crystal structure analysis of human Sirt2 and its ADP-ribose complex. *J. Struct. Biol.* **182**, 136–143 (2013).
447. Liu, Z. *et al.* Integrative chemical biology approaches for identification and characterization of ‘erasers’ for fatty-acid-acylated lysine residues within proteins. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **54**, 1149–1152 (2015).
448. Feldman, J. L. *et al.* Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD(+) Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation. *Biochemistry (Mosc.)* **54**, 3037–3050 (2015).
449. Gurard-Levin, Z. A., Kilian, K. A., Kim, J., Bähr, K. & Mrksich, M. Peptide arrays identify isoform-selective substrates for profiling endogenous lysine deacetylase activity. *ACS Chem. Biol.* **5**, 863–873 (2010).
450. Gray, C. J., Weissenborn, M. J., Evers, C. E. & Flitsch, S. L. Enzymatic reactions on immobilised substrates. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6378–6405 (2013).
451. Blander, G. *et al.* SIRT1 shows no substrate specificity in vitro. *J. Biol. Chem.* **280**, 9780–9785 (2005).
452. Garske, A. L. & Denu, J. M. SIRT1 top 40 hits: use of one-bead, one-compound acetyl-peptide libraries and quantum dots to probe deacetylase specificity. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 94–101 (2006).
453. Kuo, H.-Y., DeLuca, T. A., Miller, W. M. & Mrksich, M. Profiling deacetylase activities in cell lysates with peptide arrays and SAMDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 10635–10642 (2013).

454. Khan, A. N. & Lewis, P. N. Unstructured conformations are a substrate requirement for the Sir2 family of NAD-dependent protein deacetylases. *J. Biol. Chem.* **280**, 36073–36078 (2005).
455. Norris, K. L., Lee, J.-Y. & Yao, T.-P. Acetylation goes global: the emergence of acetylation biology. *Sci. Signal.* **2**, pe76 (2009).
456. Smith, K. T. & Workman, J. L. Introducing the acetylome. *Nat. Biotechnol.* **27**, 917–919 (2009).
457. Hubbard, B. P. *et al.* Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* **339**, 1216–1219 (2013).
458. Kellner, W. A., Ramos, E., Van Bortle, K., Takenaka, N. & Corces, V. G. Genome-wide phosphoacetylation of histone H3 at Drosophila enhancers and promoters. *Genome Res.* **22**, 1081–1088 (2012).
459. Schwer, B. *et al.* Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21790–21794 (2010).
460. McCord, R. A. *et al.* SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging* **1**, 109–121 (2009).
461. Michishita, E. *et al.* Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 2664–2666 (2009).
462. Pan, P. W. *et al.* Structure and biochemical functions of SIRT6. *J. Biol. Chem.* **286**, 14575–14587 (2011).
463. Grimley, R. *et al.* Over expression of wild type or a catalytically dead mutant of Sirtuin 6 does not influence NFκB responses. *PLoS One* **7**, e39847 (2012).
464. Yang, B., Zwaans, B. M. M., Eckersdorff, M. & Lombard, D. B. The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 2662–2663 (2009).
465. Stevenson, F. T., Bursten, S. L., Fanton, C., Locksley, R. M. & Lovett, D. H. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7245–7249 (1993).
466. Barber, M. F. *et al.* SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature* **487**, 114–118 (2012).
467. Ulijn, R. V., Baragaña, B., Halling, P. J. & Flitsch, S. L. Protease-catalyzed peptide synthesis on solid support. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10988–10989 (2002).
468. Humphrey, C. E., Turner, N. J., Easson, M. A. M., Flitsch, S. L. & Ulijn, R. V. Lipase-catalyzed kinetic resolution on solid-phase via a ‘capture and release’ strategy. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13952–13953 (2003).
469. Halling, P. J., Ulijn, R. V. & Flitsch, S. L. Understanding enzyme action on immobilised substrates. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 385–392 (2005).
470. Gutiérrez, O. A., Chavez, M. & Lissi, E. A theoretical approach to some analytical properties of heterogeneous enzymatic assays. *Anal. Chem.* **76**, 2664–2668 (2004).
471. Ostuni, E., Chapman, R. G., Holmlin, R. E., Takayama, S. & Whitesides, G. M. A Survey of Structure–Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein. *Langmuir* **17**, 5605–5620 (2001).
472. Houseman, B. T. & Mrksich, M. The Role of Ligand Density in the Enzymatic Glycosylation of Carbohydrates Presented on Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 782–785 (1999).
473. Noble, G. T. *et al.* Accelerated enzymatic galactosylation of N-acetylglucosaminolipids in lipid microdomains. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13010–13017 (2012).
474. Stiffler, M. A. *et al.* PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* **317**, 364–369 (2007).
475. Garcia, B. A., Pesavento, J. J., Mizzen, C. A. & Kelleher, N. L. Pervasive combinatorial modification of histone H3 in human cells. *Nat. Methods* **4**, 487–489 (2007).
476. Young, N. L. *et al.* High throughput characterization of combinatorial histone codes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**, 2266–2284 (2009).
477. Price, J. V. *et al.* On silico peptide microarrays for high-resolution mapping of antibody epitopes and diverse protein-protein interactions. *Nat. Med.* **18**, 1434–1440 (2012).
478. Tweedie-Cullen, R. Y. *et al.* Identification of combinatorial patterns of post-translational modifications on individual histones in the mouse brain. *PLoS One* **7**, e36980 (2012).
479. Garcia, B. A. *et al.* Comprehensive phosphoprotein analysis of linker histone H1 from *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **5**, 1593–1609 (2006).
480. Sarg, B., Helliger, W., Talasz, H., Förg, B. & Lindner, H. H. Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1. *J. Biol. Chem.* **281**, 6573–6580 (2006).

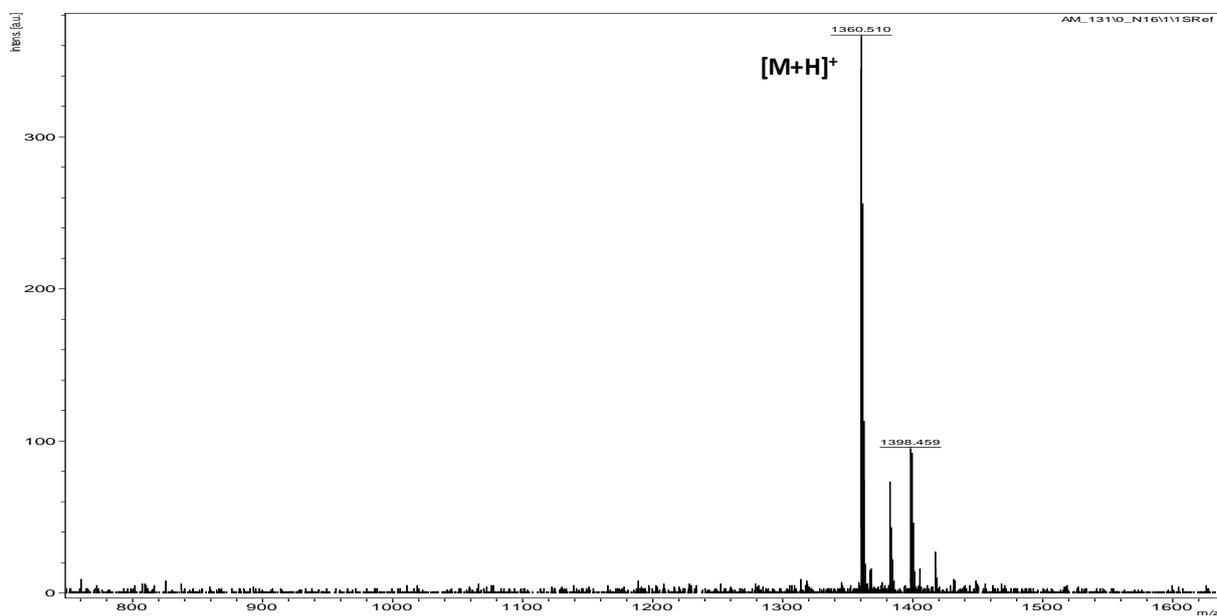
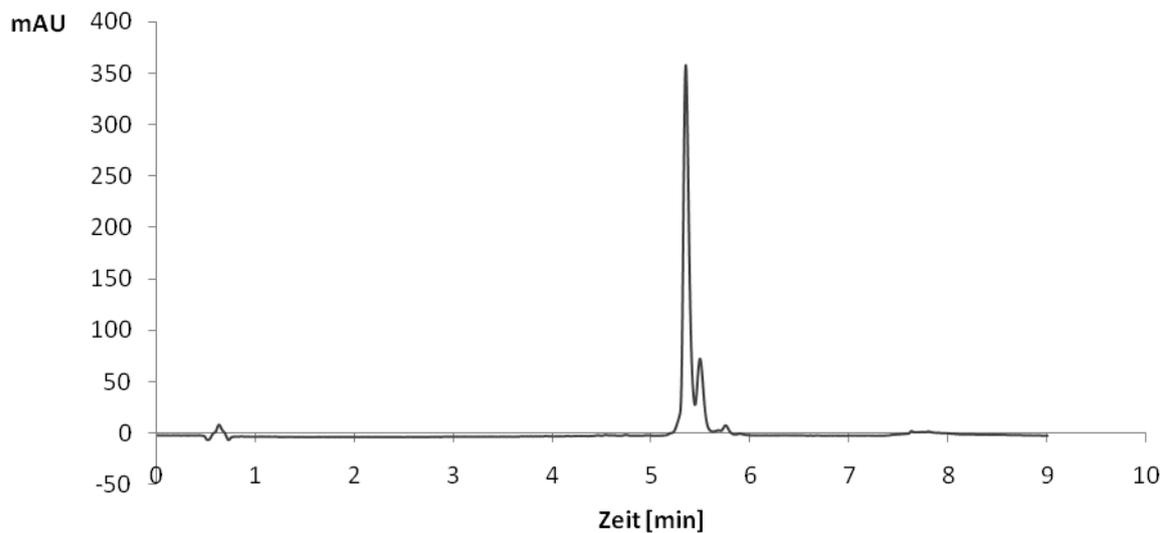
481. Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., Happel, N. & Schneider, R. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J. Biol. Chem.***280**, 38090–38095 (2005).
482. Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P. & Reinberg, D. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol. Cell***14**, 183–193 (2004).
483. Mizzen, C. A. *et al.* Identification and mutation of phosphorylation sites in a linker histone. Phosphorylation of macronuclear H1 is not essential for viability in tetrahymena. *J. Biol. Chem.***274**, 14533–14536 (1999).
484. Chu, C.-S. *et al.* Protein kinase A-mediated serine 35 phosphorylation dissociates histone H1.4 from mitotic chromosome. *J. Biol. Chem.***286**, 35843–35851 (2011).
485. Turner, R. S., Kemp, B. E., Su, H. D. & Kuo, J. F. Substrate specificity of phospholipid/Ca²⁺-dependent protein kinase as probed with synthetic peptide fragments of the bovine myelin basic protein. *J. Biol. Chem.***260**, 11503–11507 (1985).
486. Jakes, S., Hastings, T. G., Reimann, E. M. & Schlender, K. K. Identification of the phosphoserine residue in histone H1 phosphorylated by protein kinase C. *FEBS Lett.***234**, 31–34 (1988).
487. Hale, T. K., Contreras, A., Morrison, A. J. & Herrera, R. E. Phosphorylation of the linker histone H1 by CDK regulates its binding to HP1alpha. *Mol. Cell***22**, 693–699 (2006).
488. Barber, C. M. *et al.* The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma***112**, 360–371 (2004).
489. Zhu, F. *et al.* Phosphorylation of H2AX at Ser139 and a new phosphorylation site Ser16 by RSK2 decreases H2AX ubiquitination and inhibits cell transformation. *Cancer Res.***71**, 393–403 (2011).
490. Hanover, J. A., Krause, M. W. & Love, D. C. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***13**, 312–321 (2012).
491. Aihara, H. *et al.* Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev.***18**, 877–888 (2004).
492. Brittle, A. L., Nanba, Y., Ito, T. & Ohkura, H. Concerted action of Aurora B, Polo and NHK-1 kinases in centromere-specific histone 2A phosphorylation. *Exp. Cell Res.***313**, 2780–2785 (2007).
493. Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y. & Watanabe, Y. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science***330**, 239–243 (2010).
494. Kim, K. *et al.* VprBP has intrinsic kinase activity targeting histone H2A and represses gene transcription. *Mol. Cell***52**, 459–467 (2013).
495. Harvey, A. C., Jackson, S. P. & Downs, J. A. *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A Ser122 facilitates DNA repair. *Genetics***170**, 543–553 (2005).
496. Downs, J. A., Lowndes, N. F. & Jackson, S. P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature***408**, 1001–1004 (2000).
497. Shroff, R. *et al.* Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol. CB***14**, 1703–1711 (2004).
498. Redon, C. *et al.* Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep.***4**, 678–684 (2003).
499. Ward, I. M. & Chen, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.***276**, 47759–47762 (2001).
500. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.***276**, 42462–42467 (2001).
501. Park, E.-J., Chan, D. W., Park, J.-H., Oettinger, M. A. & Kwon, J. DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res.***31**, 6819–6827 (2003).
502. Wen, W. *et al.* MST1 promotes apoptosis through phosphorylation of histone H2AX. *J. Biol. Chem.***285**, 39108–39116 (2010).
503. Xiao, A. *et al.* WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature***457**, 57–62 (2009).
504. Baek, M.-C., Krosky, P. M., He, Z. & Coen, D. M. Specific phosphorylation of exogenous protein and peptide substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. Importance of the P+5 position. *J. Biol. Chem.***277**, 29593–29599 (2002).
505. Ahn, S.-H. *et al.* Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell***120**, 25–36 (2005).
506. Cheung, W. L. *et al.* Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell***113**, 507–517 (2003).

507. Fernandez-Capetillo, O., Allis, C. D. & Nussenzweig, A. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J. Exp. Med.* **199**, 1671–1677 (2004).
508. Ajiro, K. Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA fragmentation. *J. Biol. Chem.* **275**, 439–443 (2000).
509. Lau, A. T. Y. *et al.* Phosphorylation of histone H2B serine 32 is linked to cell transformation. *J. Biol. Chem.* **286**, 26628–26637 (2011).
510. Maile, T., Kwoczynski, S., Katzenberger, R. J., Wassarman, D. A. & Sauer, F. TAF1 activates transcription by phosphorylation of serine 33 in histone H2B. *Science* **304**, 1010–1014 (2004).
511. Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S. & Higgins, J. M. G. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* **19**, 472–488 (2005).
512. Kang, T.-H. *et al.* Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8533–8546 (2007).
513. Metzger, E. *et al.* Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta(I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature* **464**, 792–796 (2010).
514. Hendzel, M. J. *et al.* Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**, 348–360 (1997).
515. Thomson, S. *et al.* The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.* **18**, 4779–4793 (1999).
516. Anest, V. *et al.* A nucleosomal function for I kappa B kinase-alpha in NF-kappa B-dependent gene expression. *Nature* **423**, 659–663 (2003).
517. Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y.-T. & Gaynor, R. B. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* **423**, 655–659 (2003).
518. Zippo, A., De Robertis, A., Serafini, R. & Oliviero, S. PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nat. Cell Biol.* **9**, 932–944 (2007).
519. Sassone-Corsi, P. *et al.* Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* **285**, 886–891 (1999).
520. Zhong, S. P., Ma, W. Y. & Dong, Z. ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. *J. Biol. Chem.* **275**, 20980–20984 (2000).
521. He, Z. *et al.* Regulation of ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10 by Fyn kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 2446–2454 (2005).
522. Lo, W. S. *et al.* Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**, 1142–1146 (2001).
523. Preuss, U., Landsberg, G. & Scheidtmann, K. H. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res.* **31**, 878–885 (2003).
524. Yang, W. *et al.* PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* **150**, 685–696 (2012).
525. Shimada, M. *et al.* Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**, 221–232 (2008).
526. Govin, J. *et al.* Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev.* **24**, 1772–1786 (2010).
527. Zhong, S. *et al.* Ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28 is mediated by MSK1. *J. Biol. Chem.* **276**, 33213–33219 (2001).
528. Zhong, S. *et al.* MAP kinases mediate UVB-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28. *J. Biol. Chem.* **276**, 12932–12937 (2001).
529. Zhong, S., Goto, H., Inagaki, M. & Dong, Z. Phosphorylation at serine 28 and acetylation at lysine 9 of histone H3 induced by trichostatin A. *Oncogene* **22**, 5291–5297 (2003).
530. Choi, H. S. *et al.* Phosphorylation of Ser28 in histone H3 mediated by mixed lineage kinase-like mitogen-activated protein triple kinase alpha. *J. Biol. Chem.* **280**, 13545–13553 (2005).
531. Hake, S. B. *et al.* Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6344–6349 (2005).
532. Tamada, H. *et al.* Chromatin decondensation and nuclear reprogramming by nucleoplasmin. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 1259–1271 (2006).
533. Caperta, A. D. *et al.* Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. *Cytogenet. Genome Res.* **122**, 73–79 (2008).

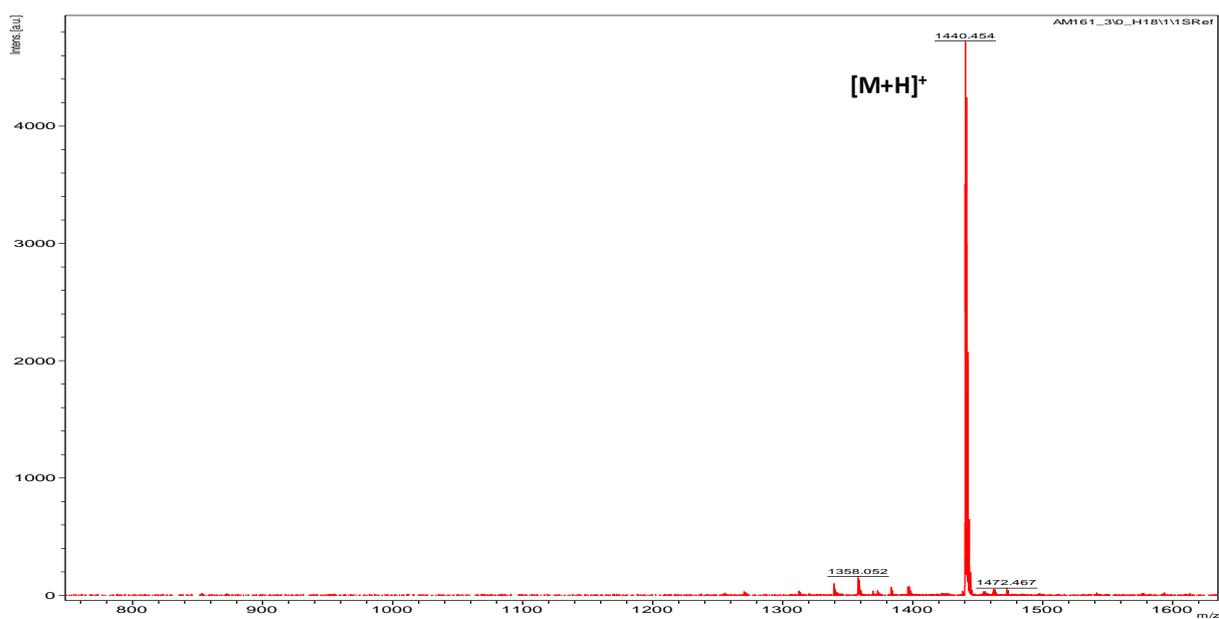
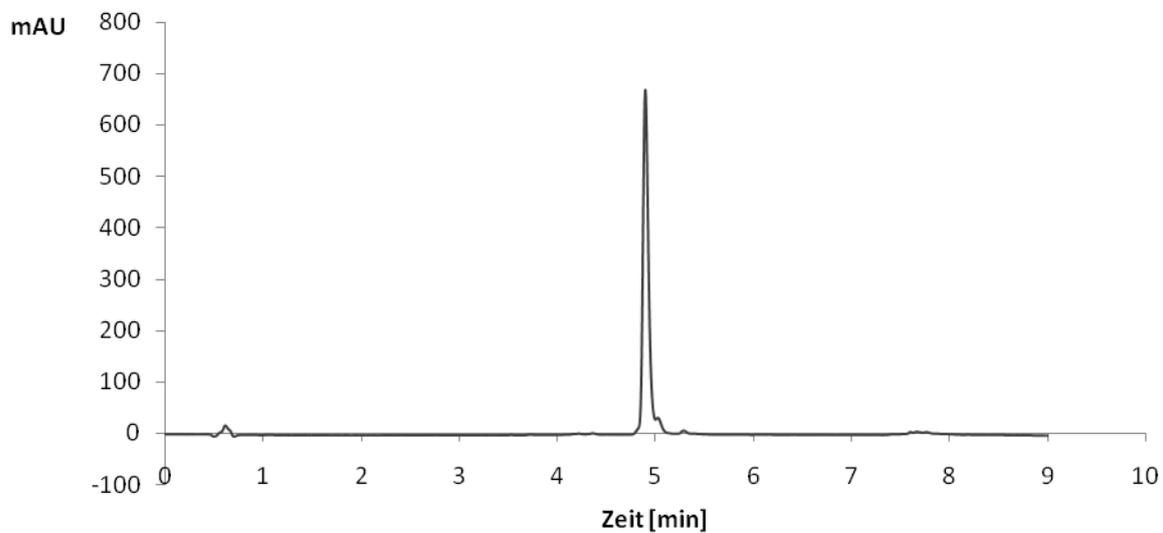
534. Dawson, M. A. *et al.* JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature***461**, 819–822 (2009).
535. Hurd, P. J. *et al.* Phosphorylation of histone H3 Thr-45 is linked to apoptosis. *J. Biol. Chem.***284**, 16575–16583 (2009).
536. Baker, S. P. *et al.* Histone H3 Thr 45 phosphorylation is a replication-associated post-translational modification in *S. cerevisiae*. *Nat. Cell Biol.***12**, 294–298 (2010).
537. Aslam, A. & Logie, C. Histone H3 serine 57 and lysine 56 interplay in transcription elongation and recovery from S-phase stress. *PLoS One***5**, e10851 (2010).
538. Hammond, S. L. *et al.* Mitotic phosphorylation of histone H3 threonine 80. *Cell Cycle Georget. Tex***13**, 440–452 (2014).
539. Gunjan, A. & Verreault, A. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell***115**, 537–549 (2003).
540. Singh, R. K., Kabbaj, M.-H. M., Paik, J. & Gunjan, A. Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. *Nat. Cell Biol.***11**, 925–933 (2009).
541. North, J. A. *et al.* Phosphorylation of histone H3(T118) alters nucleosome dynamics and remodeling. *Nucleic Acids Res.***39**, 6465–6474 (2011).
542. Krishnamoorthy, T. *et al.* Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev.***20**, 2580–2592 (2006).
543. Cheung, W. L. *et al.* Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol. CB***15**, 656–660 (2005).
544. Besant, P. G. & Attwood, P. V. Histone H4 histidine phosphorylation: kinases, phosphatases, liver regeneration and cancer. *Biochem. Soc. Trans.***40**, 290–293 (2012).
545. Kang, B. *et al.* Phosphorylation of H4 Ser 47 promotes HIRA-mediated nucleosome assembly. *Genes Dev.***25**, 1359–1364 (2011).
546. MAHAJAN, K. & Mahajan, N. P. Phosphorylation of histones and uses thereof. (2013).
547. Chou, R.-H. *et al.* EGFR modulates DNA synthesis and repair through Tyr phosphorylation of histone H4. *Dev. Cell***30**, 224–237 (2014).
548. Huang, J. M., Wei, Y. F., Kim, Y. H., Osterberg, L. & Matthews, H. R. Purification of a protein histidine kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The first member of this class of protein kinases. *J. Biol. Chem.***266**, 9023–9031 (1991).

Anhang A1: Chromatographische und massenspektrometrische Analysen der synthetisierten Peptide

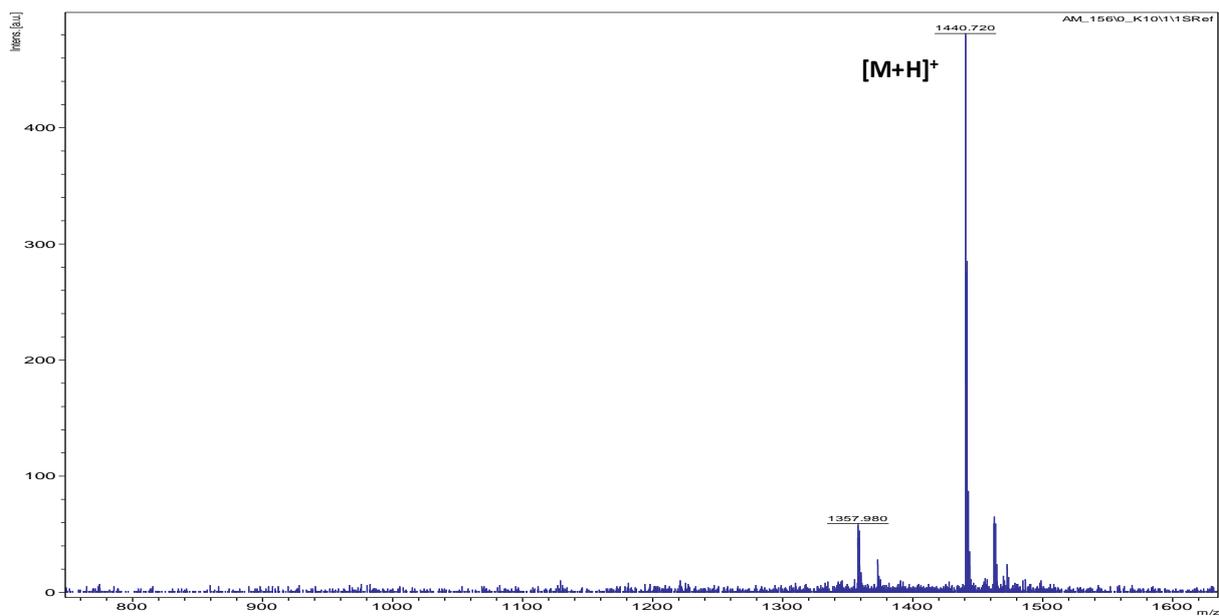
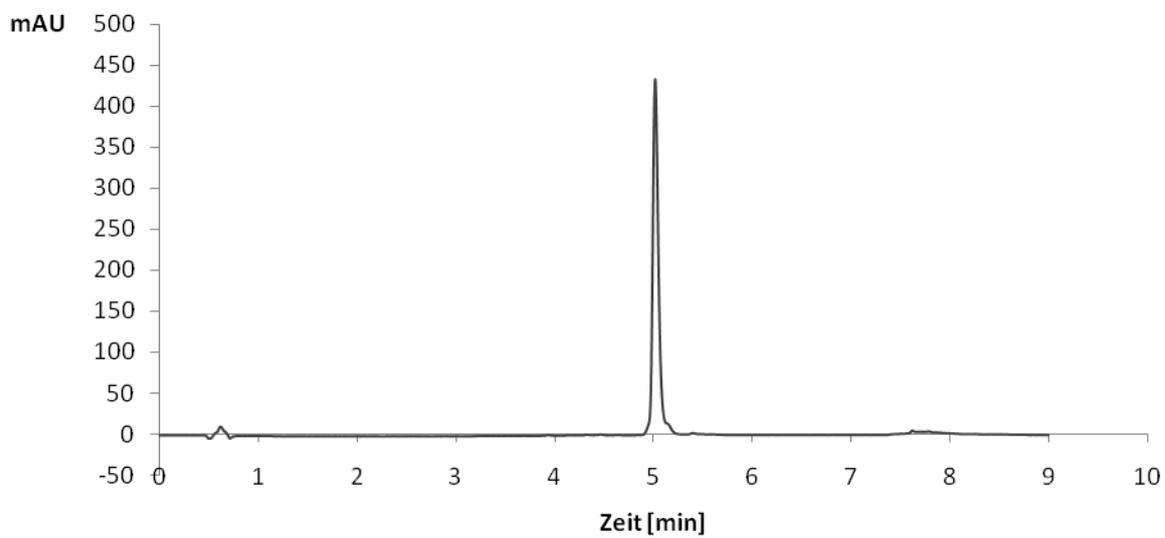
Sirtuin-Kinetik-Peptid H3K9ac:



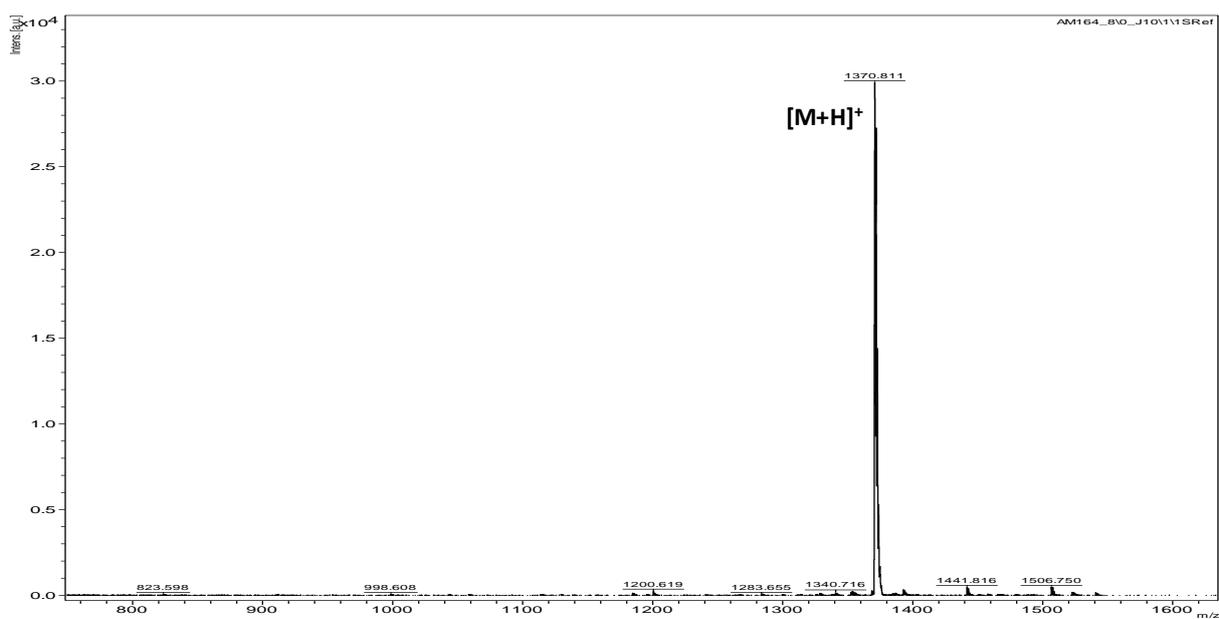
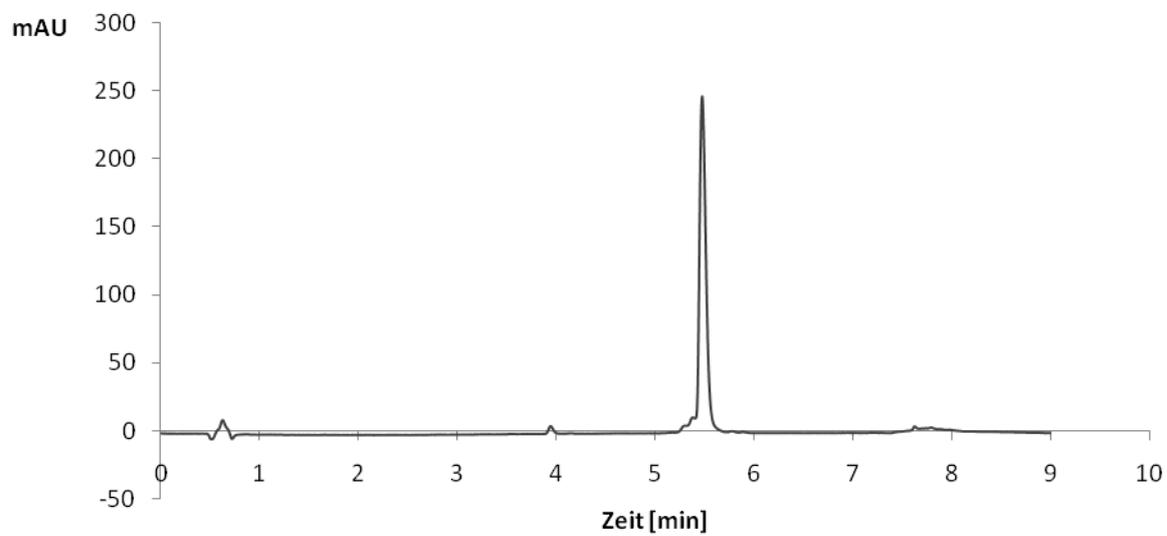
Sirtuin-Kinetik-Peptid H3K9acS10ph:



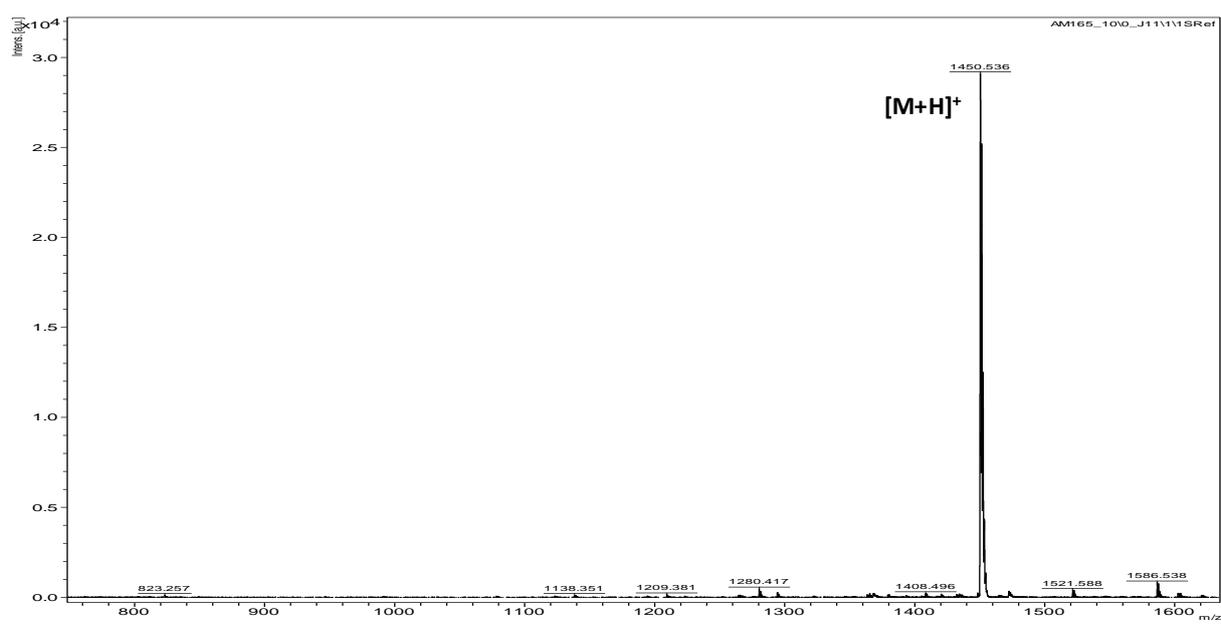
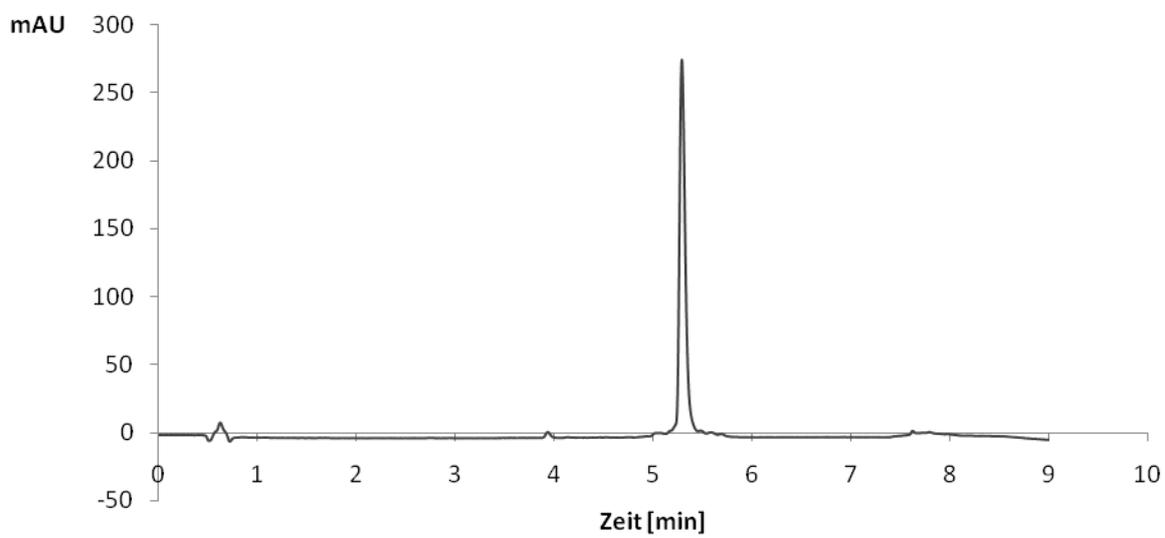
Sirtuin-Kinetik-Peptid H3K9acT11ph:



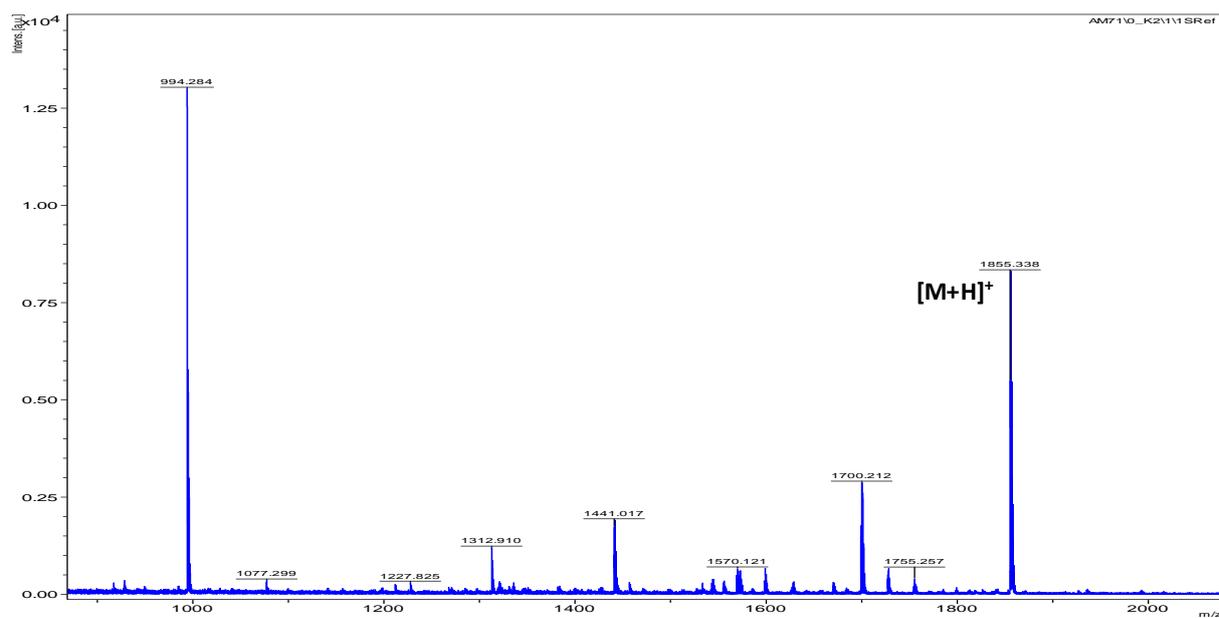
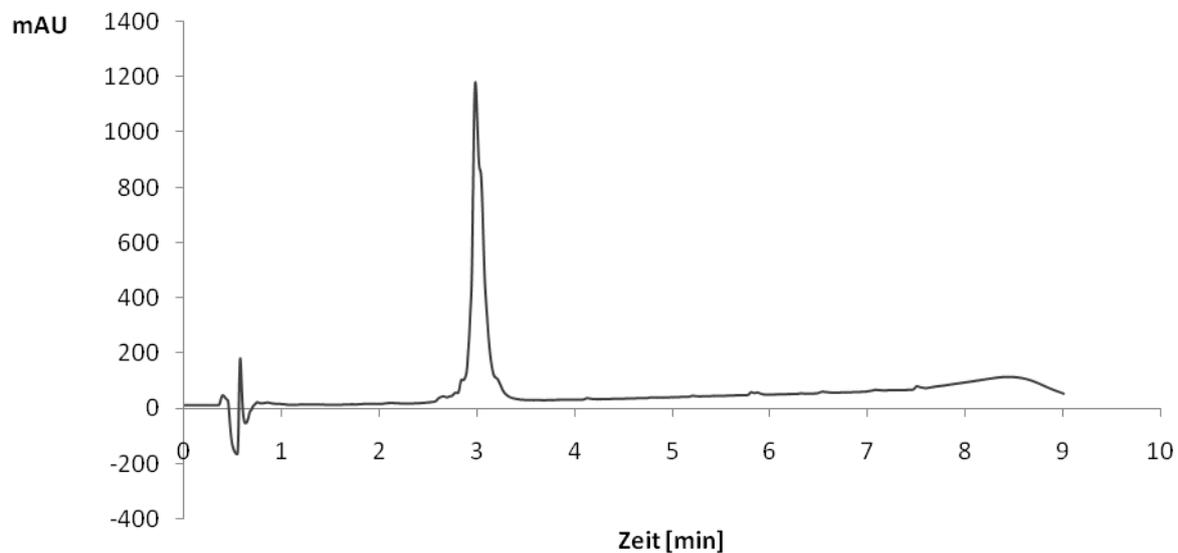
Sirtuin-Kinetik-Peptid H3K27ac:



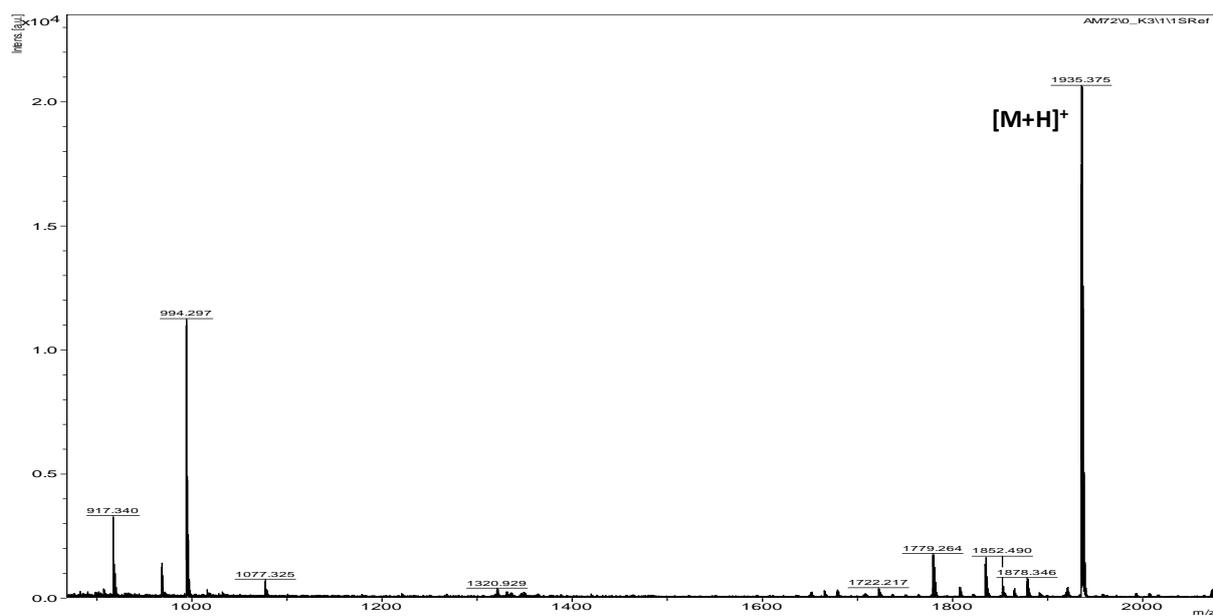
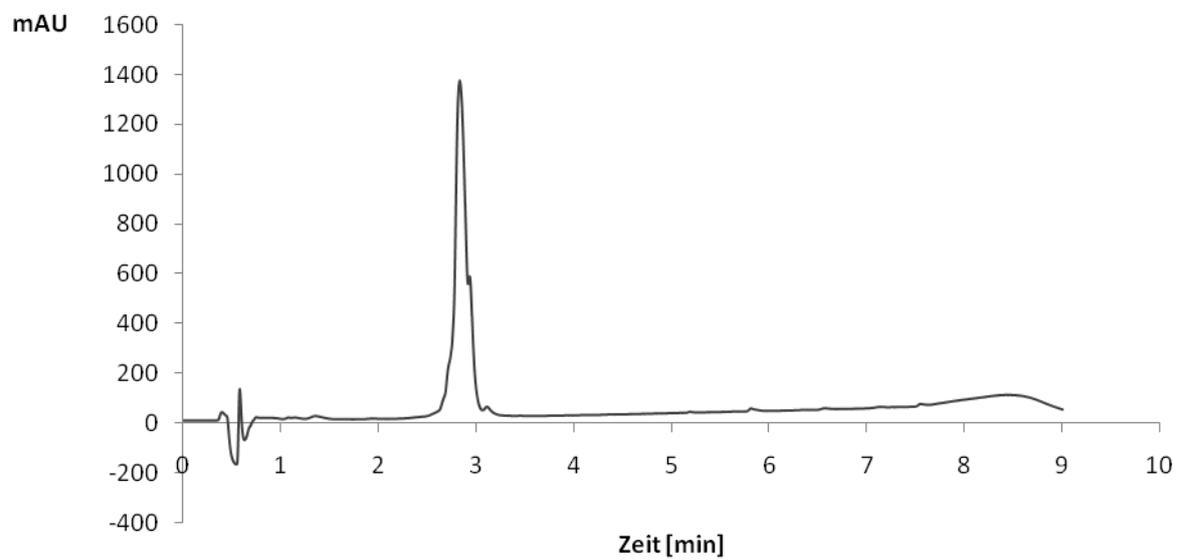
Sirtuin-Kinetik-Peptid H3K27acS28ph:



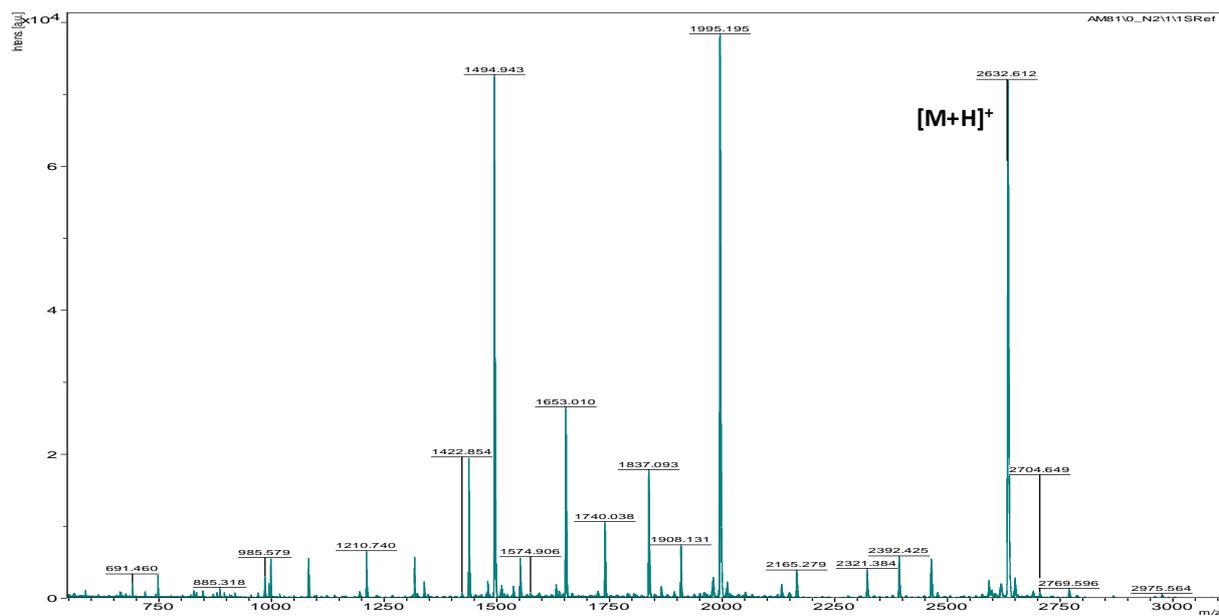
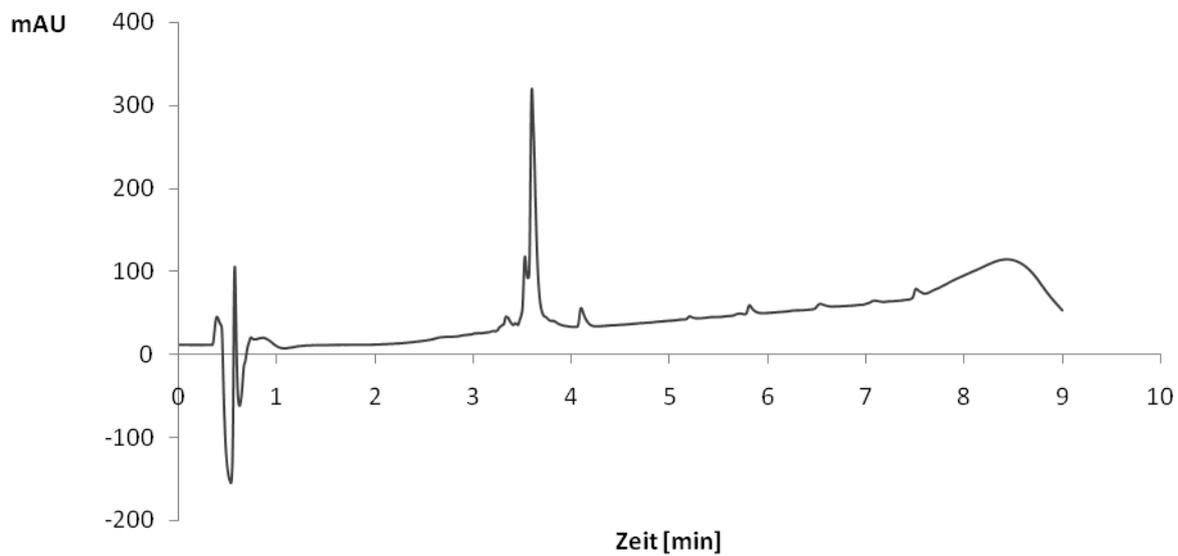
MALDI-ToF-PeptidH3_K9ac:



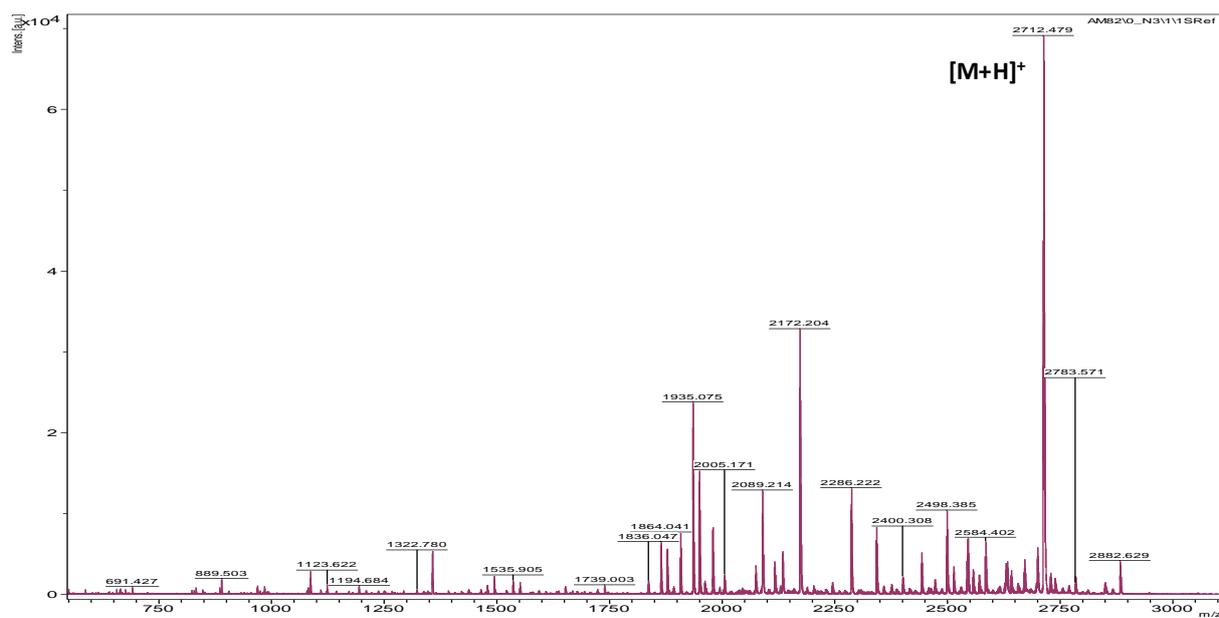
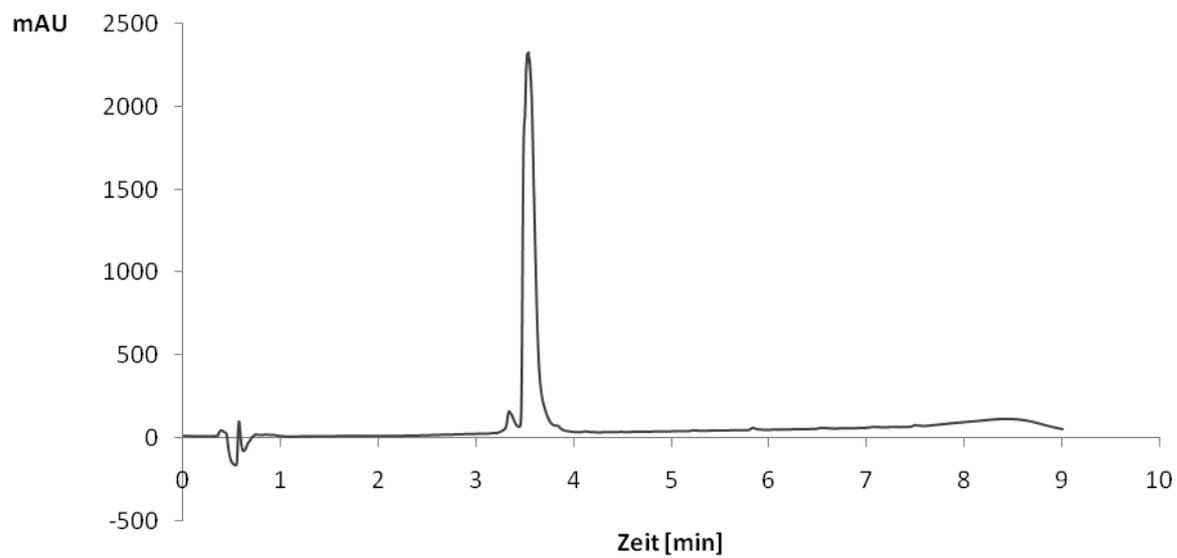
MALDI-ToF-PeptidH3_K9ac_S10ph:



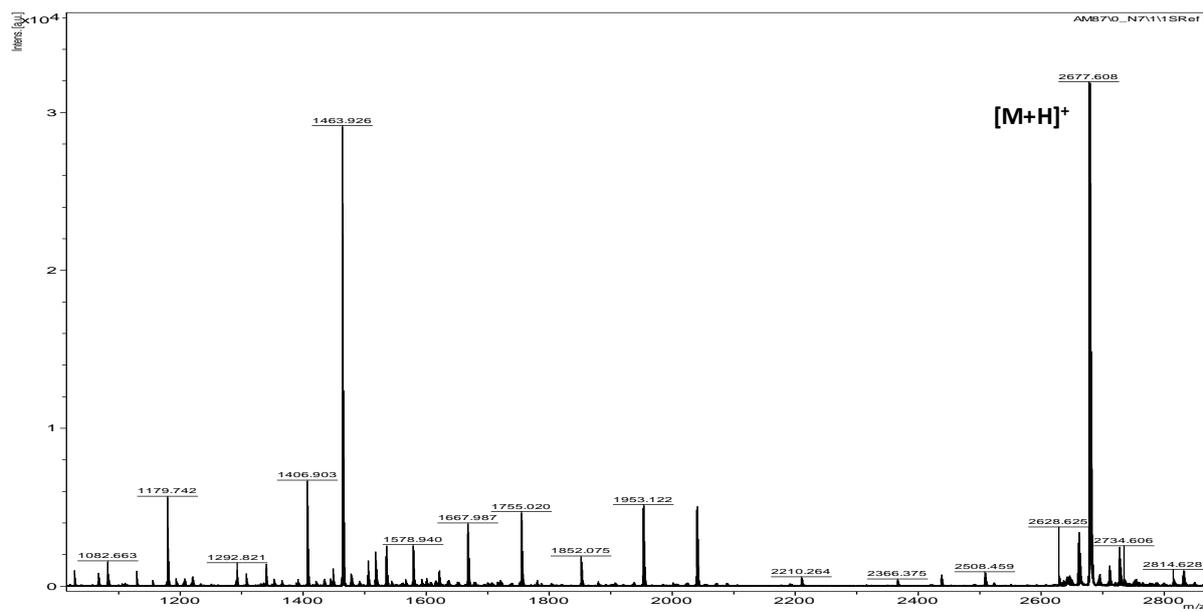
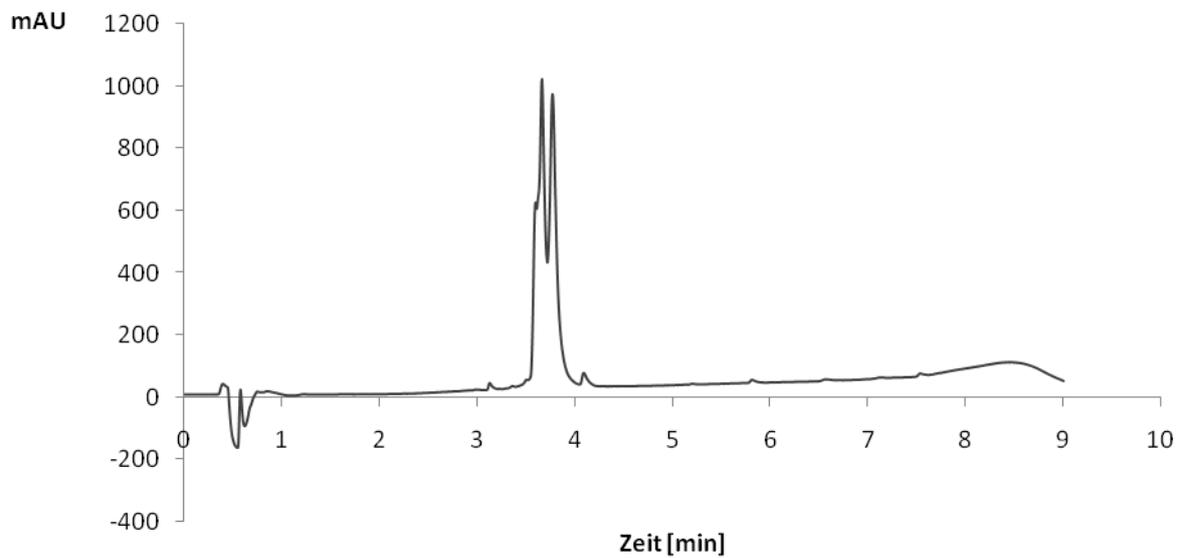
MALDI-ToF-PeptidH3_K27ac_SAPS:



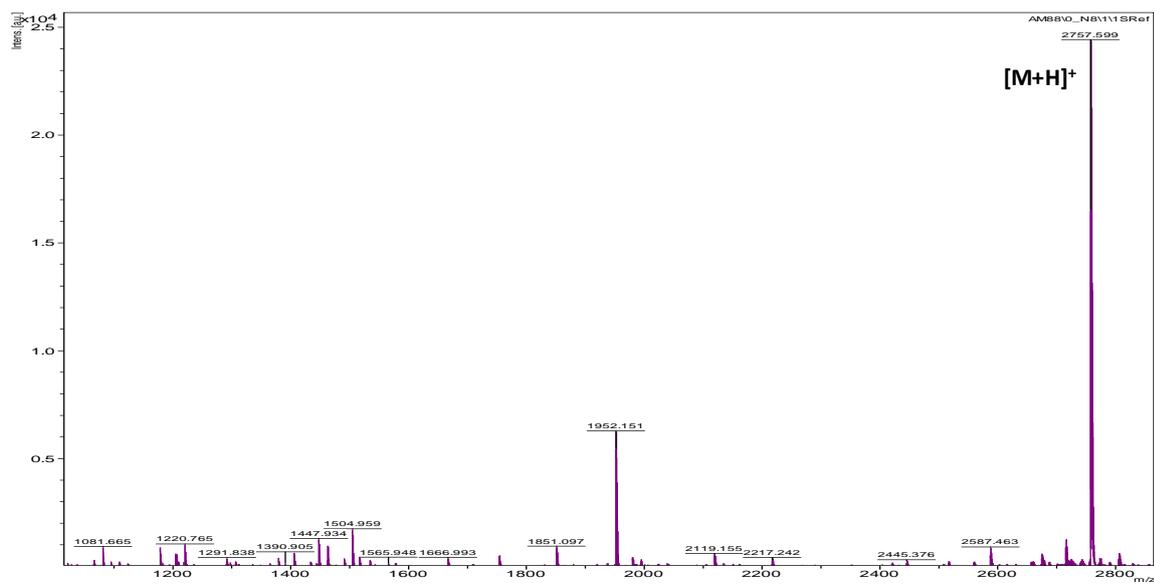
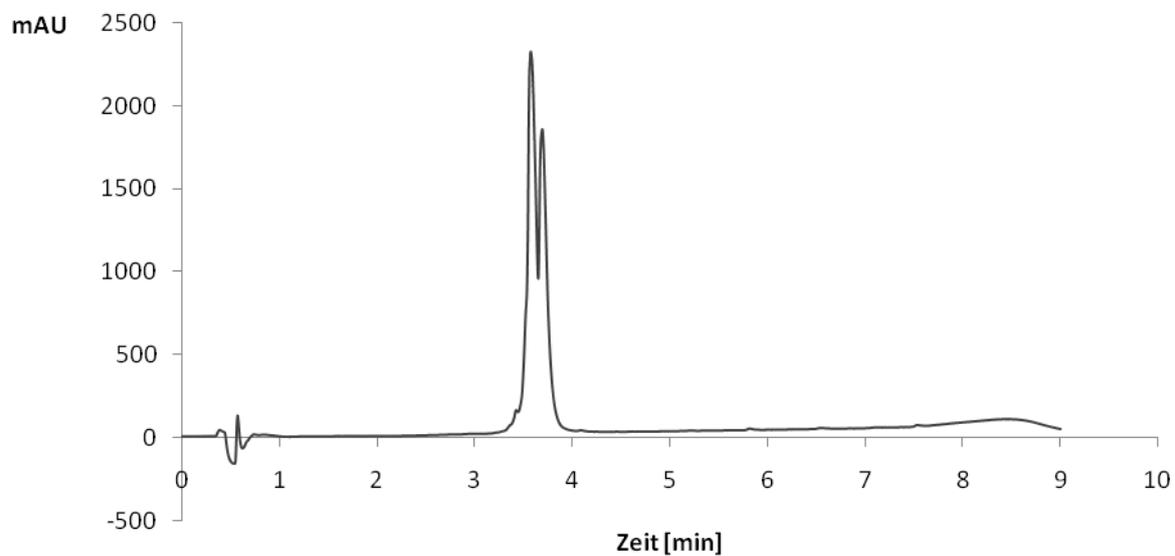
MALDI-ToF-PeptidH3_K27ac_S28ph_SAPS:



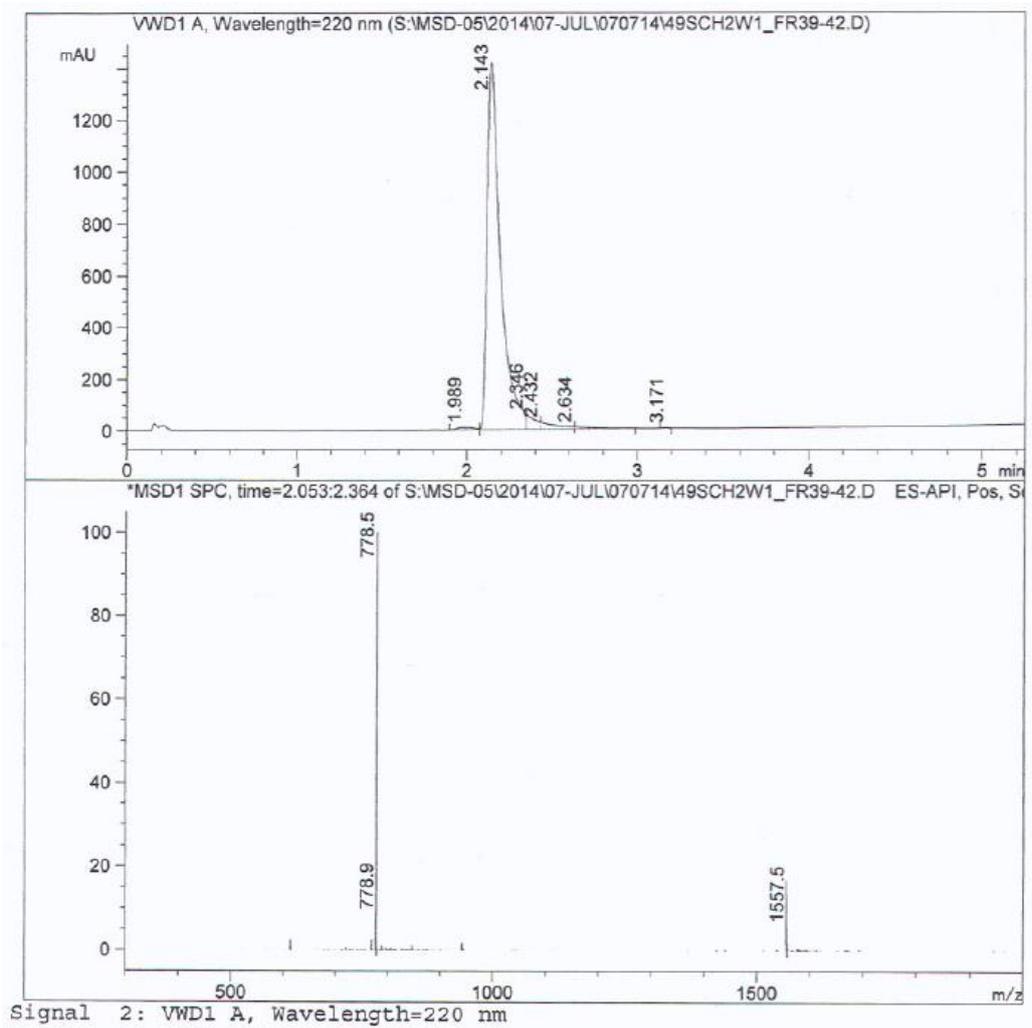
MALDI-ToF-PeptidH3_K27ac_STPS:



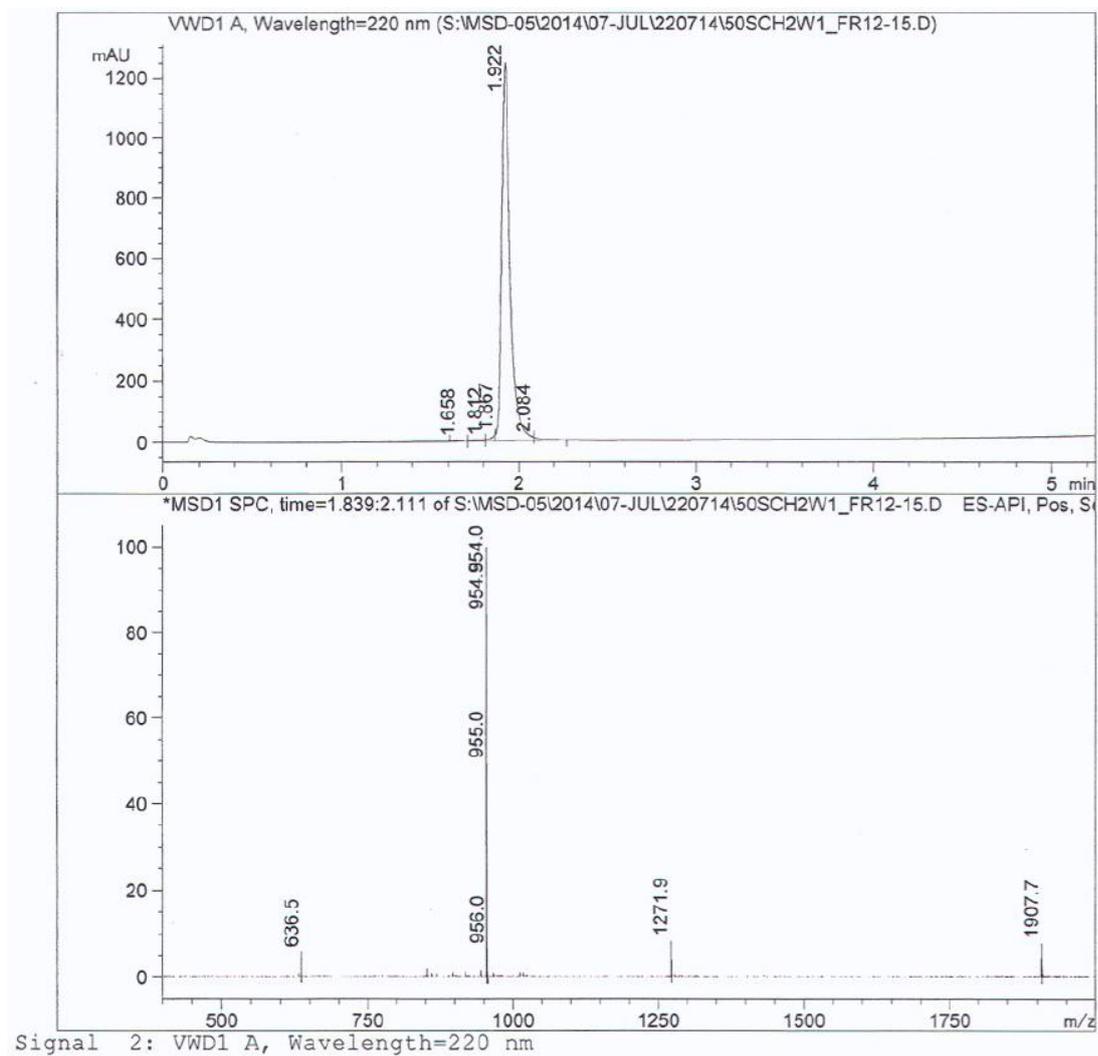
MALDI-ToF-PeptidH3_K27ac_S28ph_STPS:



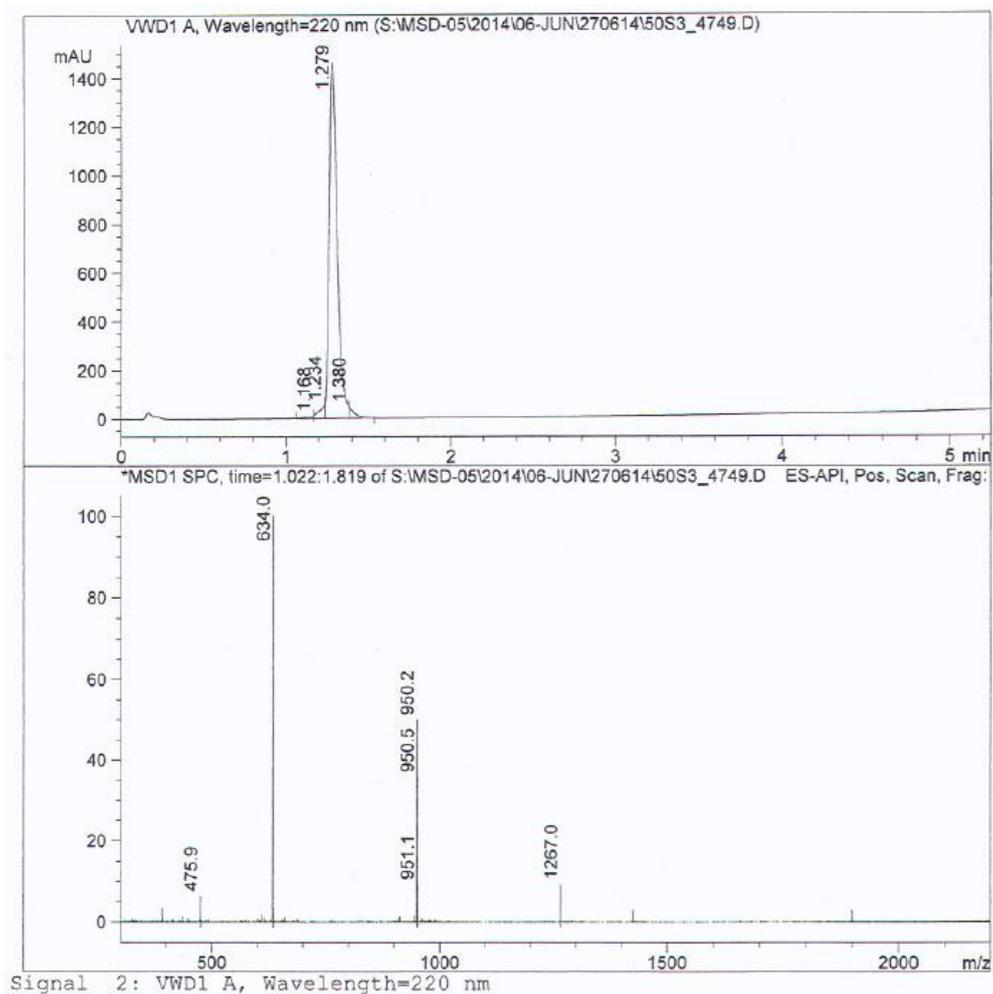
XopH-Peptid Positivkontrolle:



XopH-Peptid Substrat:



XopH-Peptid Nicht-Substrat:



Anhang A2: Erklärung der graphischen Darstellungen der statistischen Auswertung der Histonmikroarrays

Die statistische Analyse des Histonmikroarrays erfolgte mittels des Programms R³⁷⁷. Die Berechnungen basieren auf den F635mean-Signalen der *gpr*-Dateien. Vor der graphischen Darstellung wurden die Signale von allen drei Replika desselben Peptids um Ausreisser korrigiert, indem die 1,5-fache Standardabweichung als Akzeptanzgrenze gezogen wurde. Aus den akzeptierten Signalen wurde der Mittelwert errechnet. Die Mittelwerte wurden graphisch dargestellt und sind im elektronischen Anhang E2 ersichtlich. Dabei gibt es prinzipiell zwei verschiedene Darstellungen: einerseits die Darstellung für jede einzelne Histonsequenz (Abbildung A2 A) und andererseits die Darstellung über die kompletten Histonproteine (Abbildung A2 B). An dieser Stelle wird erklärt, wie diese Darstellungen zu lesen sind.

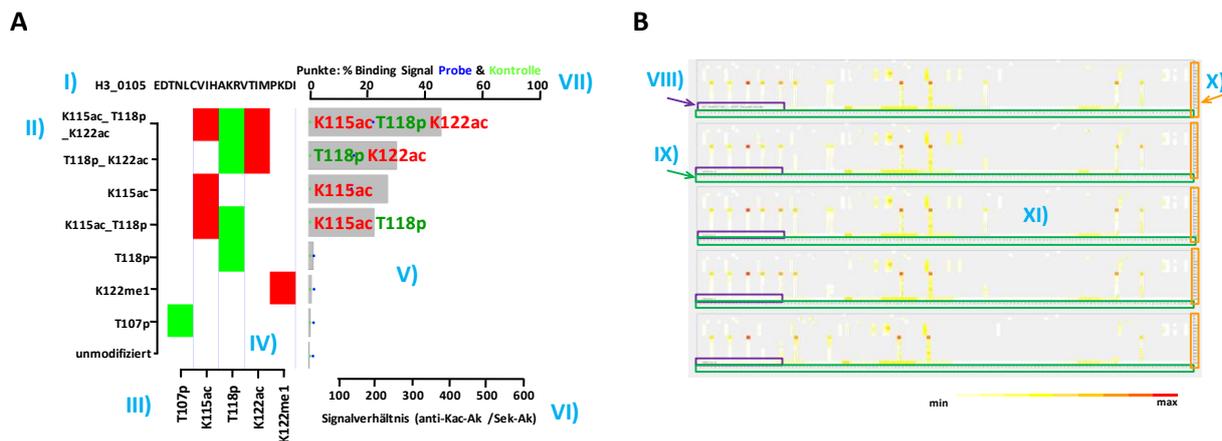


Abbildung A2: Darstellung der statistischen Auswertung der Histonmikroarrays. **A** Gezeigt sind die Signale der (modifizierten) Peptide von einer bestimmten Histonsequenz. **B** Es können auch die Histonproteine mit den entsprechend einzelmodifizierten Aminosäuren graphisch dargestellt werden. Wie diese Abbildungen zu lesen sind, wird im Text erklärt.

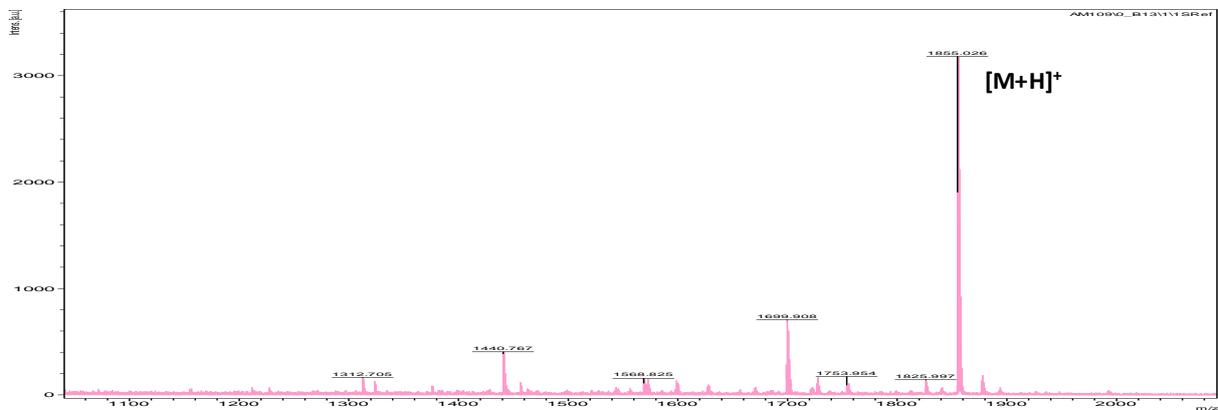
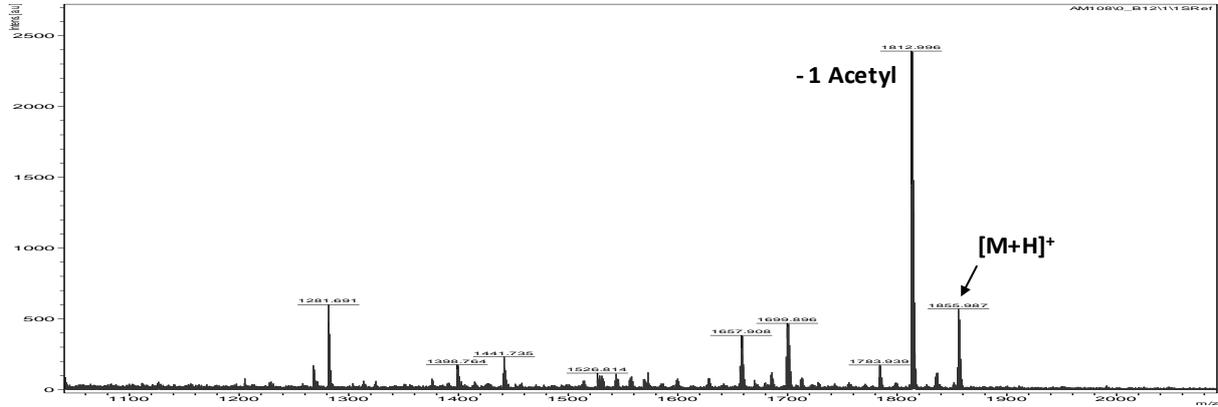
In der Darstellung der einzelnen Histonsequenzen (Abbildung A2 A) ist an der Position I) das Histon (hier H3) mit der ersten Aminosäure des Peptids (in gezeigtem Beispiel 105), sowie die Aminosäuresequenz des Peptids dargestellt. An der Position II) und III) sind die einzelnen Modifikationen, die innerhalb der Peptide der angegebenen Histonsequenz auf dem Histonmikroarray immobilisiert wurden, dargestellt. Die Modifikationen an der Position II) sind entsprechend der im Balkendiagramm (Position V)) aufgetragenen Signale angeordnet. Dagegen zeigt die Achse an der Position III) die PTMs in der Reihenfolge an, wie sie innerhalb der Peptidsequenz vom *N*-Terminus zum *C*-Terminus präsentiert sind (hier von der Aminosäure T107 bis zur Aminosäure K122). Die *heatmap* an der Position IV) stellt die Präsenz der jeweiligen PTMs dar, indem sie farblich markiert sind (weiß bedeutet entsprechend keine PTM). Dabei sind Lysinmodifikationen rot, Argininmodifikationen blau und Phosphorylierungen grün markiert. Das graue Balkendiagramm an der Position V) mit der dazugehörigen Achsen-

beschriftung (Position VI)) zeigt die errechneten Signale bzw. Signalverhältnisse in absteigender Reihenfolge. Das Punktediagramm mit den grünen und blauen Punkten (Position V)) (und der dazugehörigen Achsenbeschriftung an Position VII)) gibt die relative Signalintensität in % (bezogen auf das höchste Signal) an. Der grüne Punkt zeigt hier das Signal der Kontrolle, der blaue Punkt das Signal der Probe an.

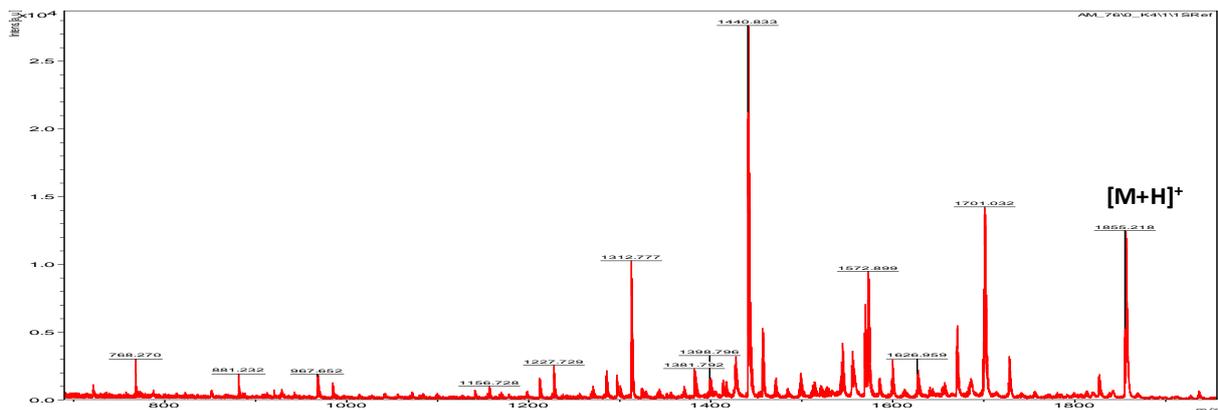
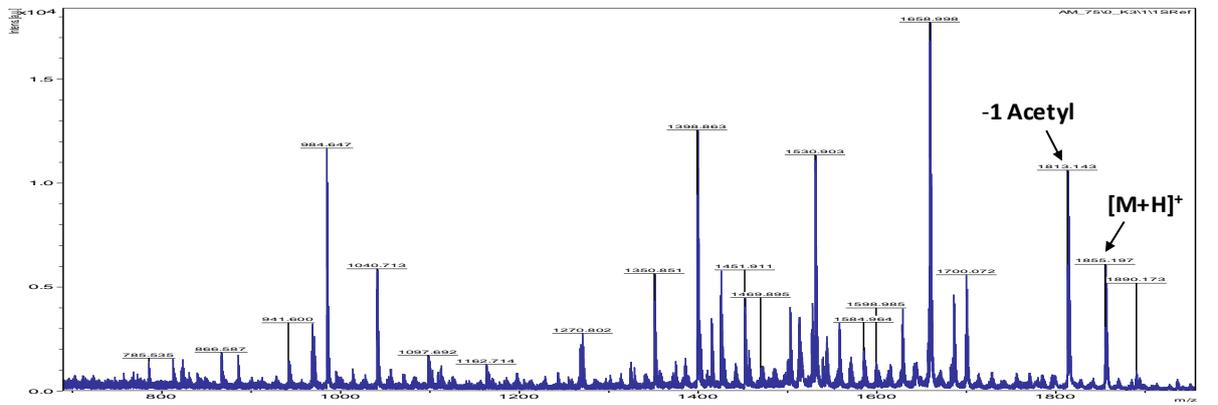
Abbildung A2 B (nur im elektronischen Anhang E2) zeigt die Übersicht des Histonproteins am Beispiel des anti-Ksuc-Antikörpers. Dargestellt sind die auf dem Histonmikroarray präsentierten Histonvarianten (Position VIII) lila umrandet). Die zu den jeweiligen Histonvarianten gehörige Peptidsequenz wird jeweils an den grün umrandeten Positionen (siehe Position IX)) gezeigt. Die *heatmap* (Position XI)) zeigt für jede Aminosäure die entsprechende Einzel-PTM, die an der y-Achse (orange umrandet, siehe Position X)) abgelesen werden kann. In dem gezeigten Beispiel sind starke Signale (rot markiert, siehe Farblegende) für die succinylierten Lysine ersichtlich.

Anhang A3: MALDI-ToF-Spektren der *in vitro* Experimente

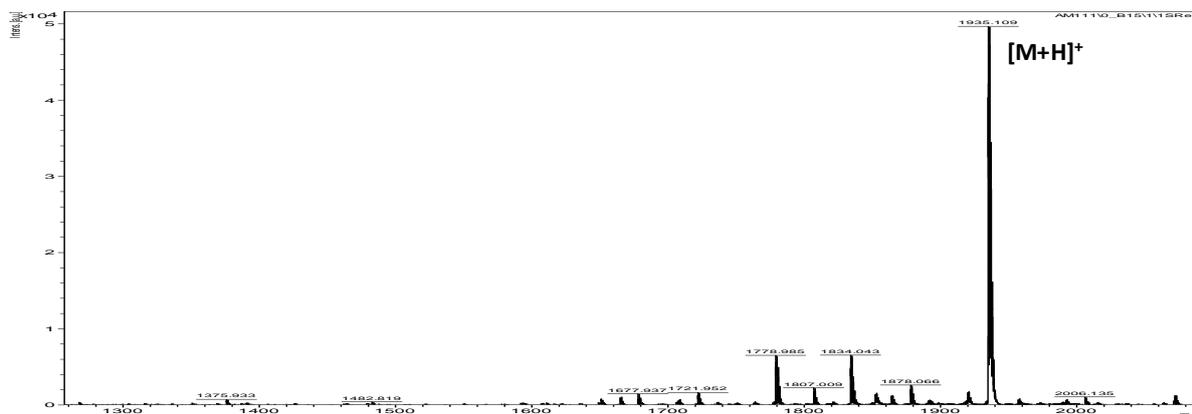
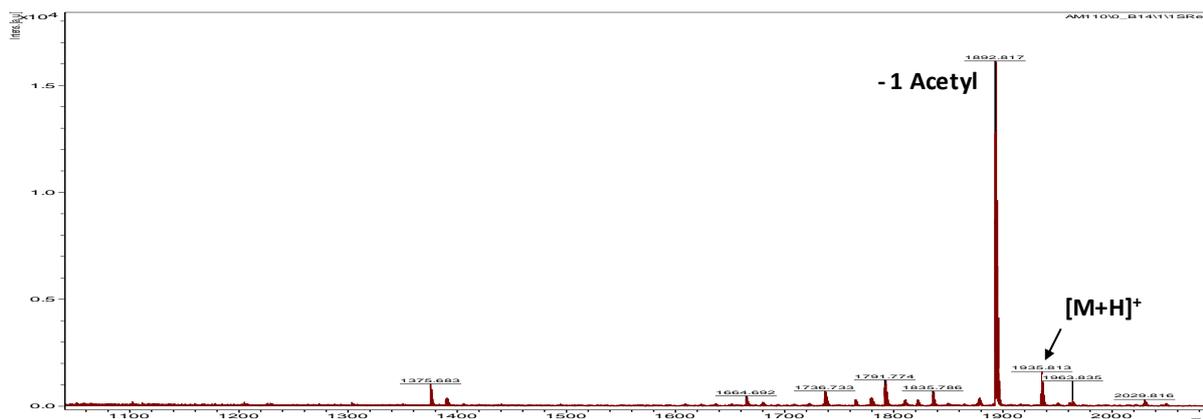
H3_K9ac – Peptid + Sirtuin1 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



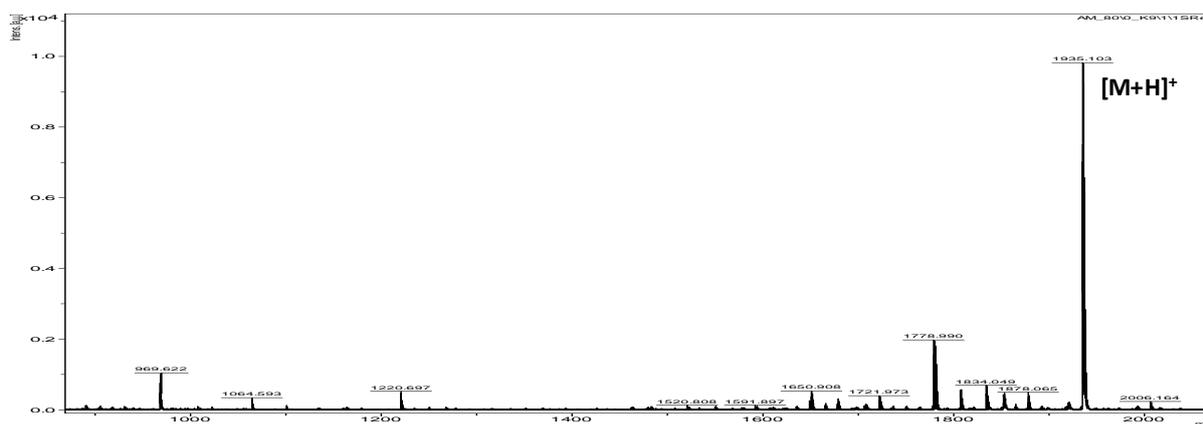
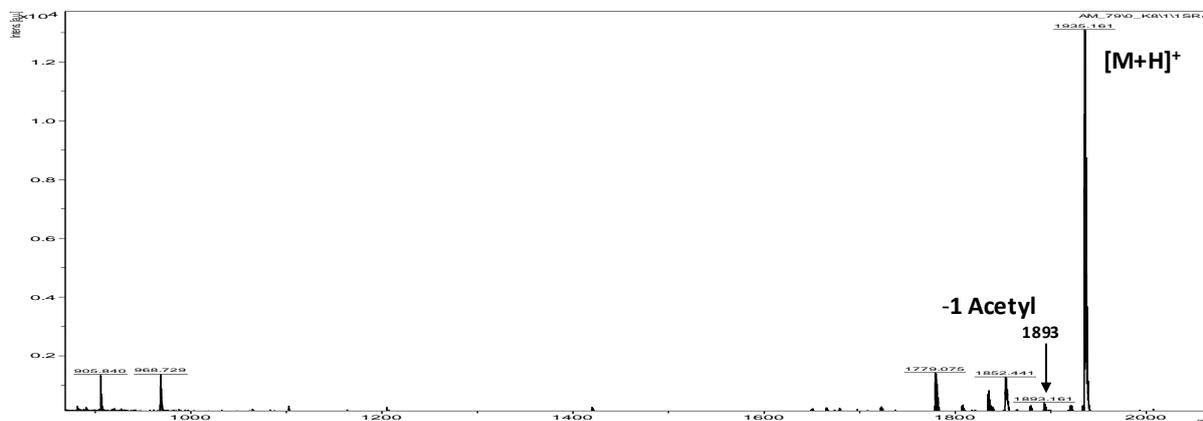
H3_K9ac – Peptid + Sirtuin2 mit NAD⁺ bzw. ohne NAD⁺ (unten)



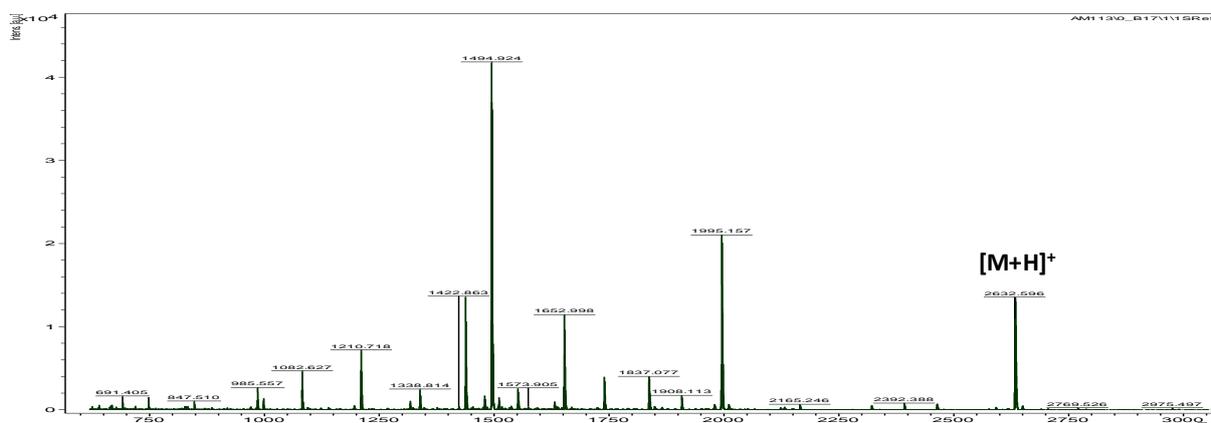
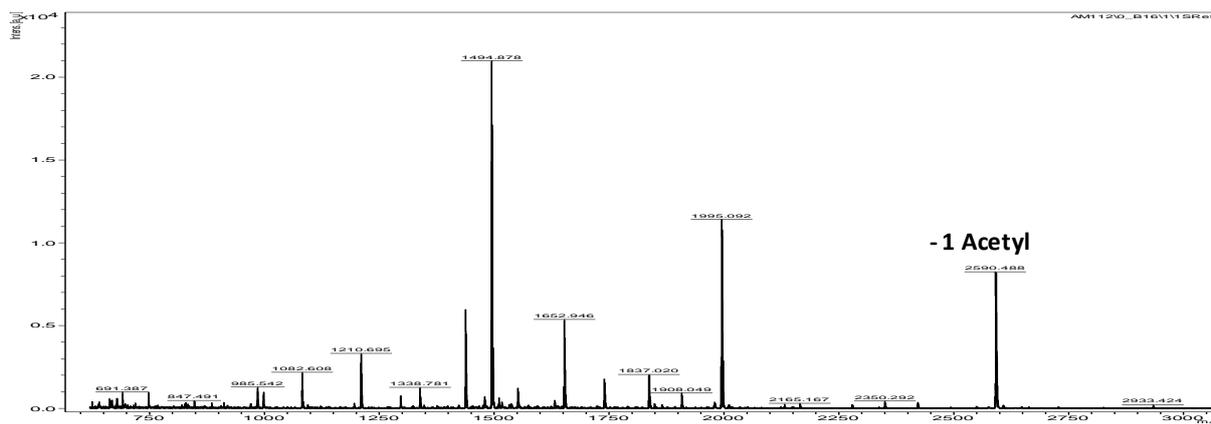
H3_K9ac_S10ph – Peptid + Sirtuin1 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



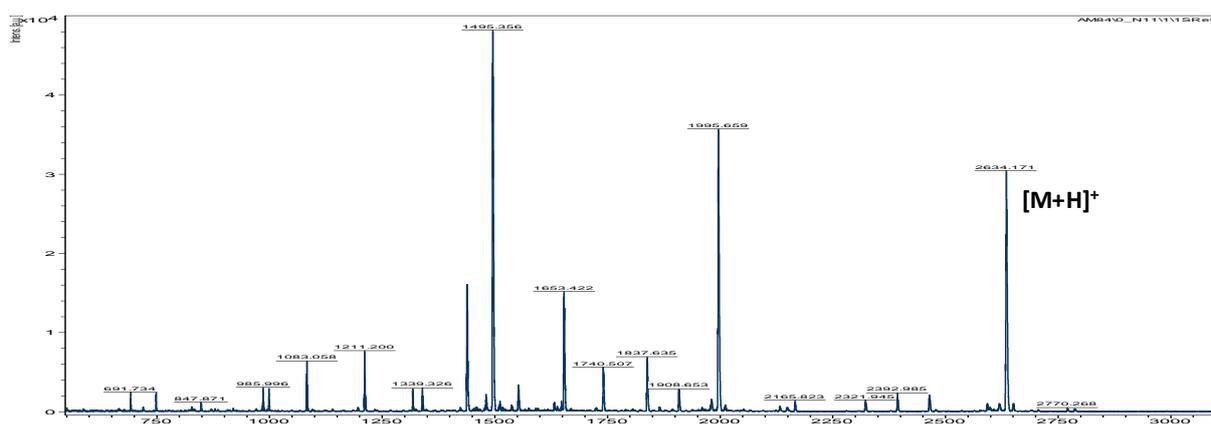
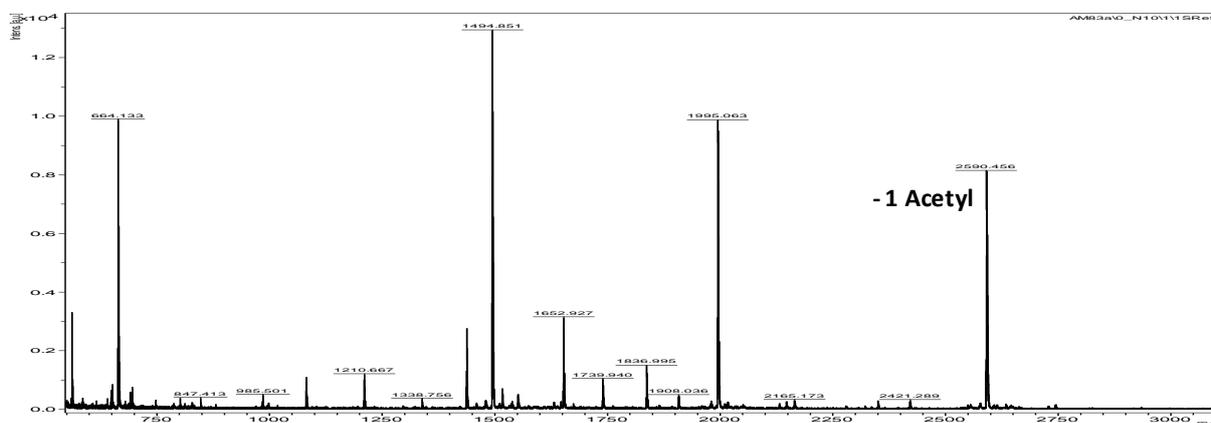
H3_K9ac_S10ph – Peptid + Sirtuin2 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



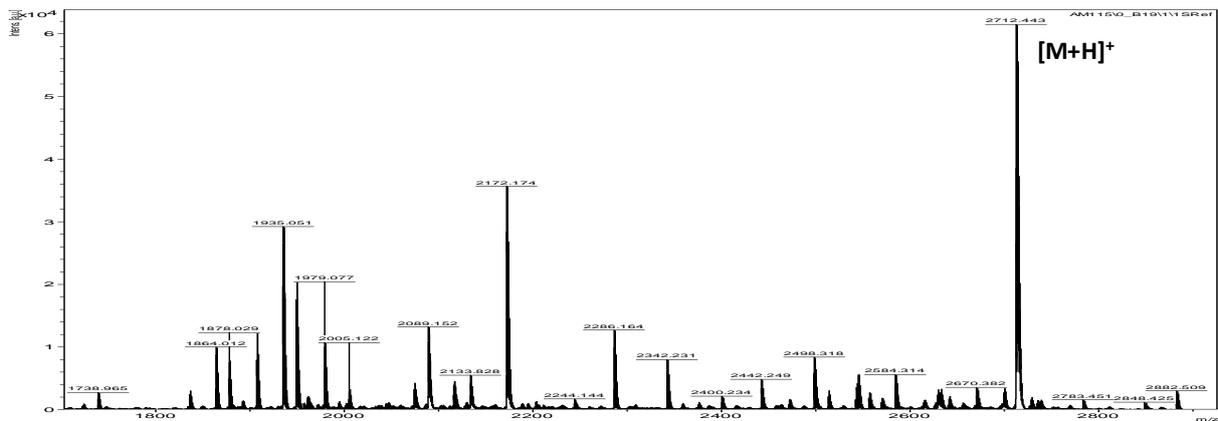
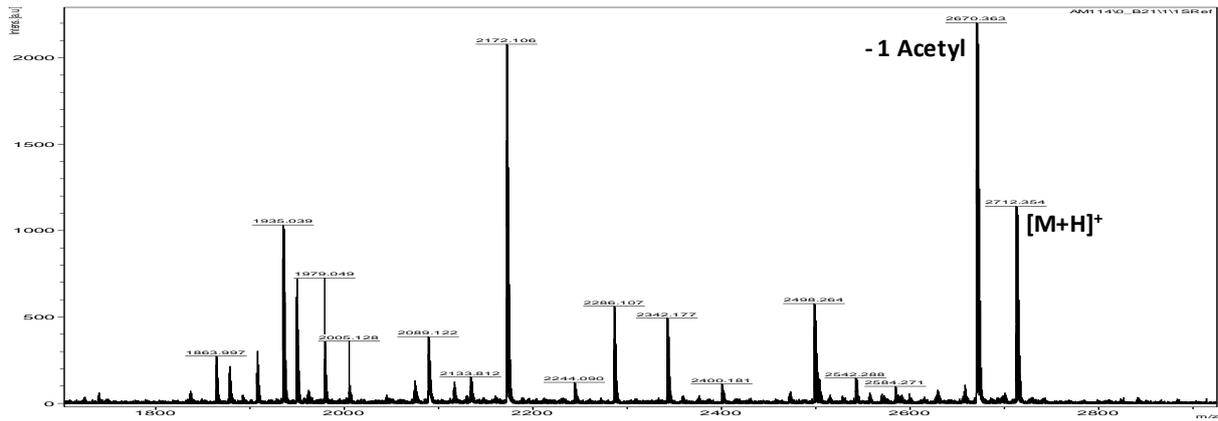
H3_K27ac_SAPS – Peptid + Sirtuin1 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



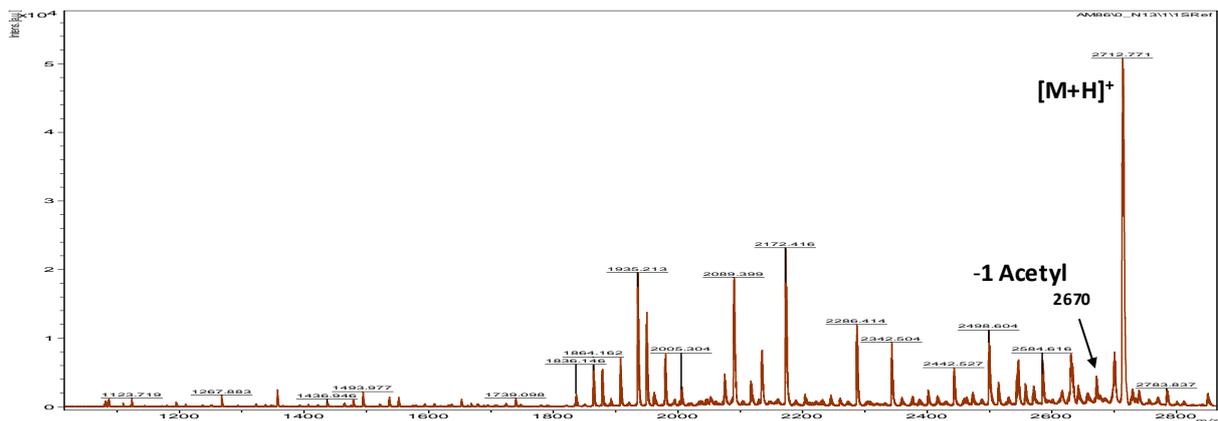
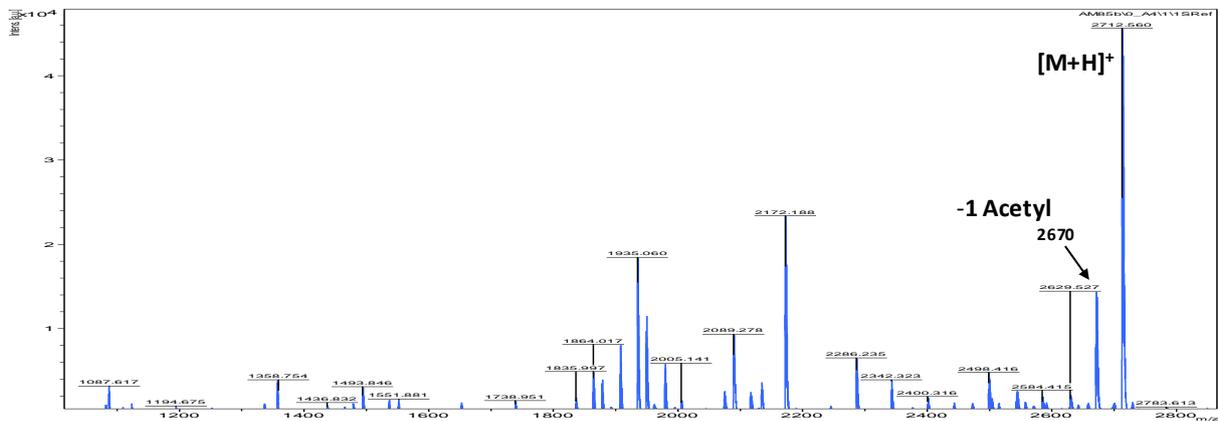
H3_K27ac_SAPS – Peptid + Sirtuin2 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



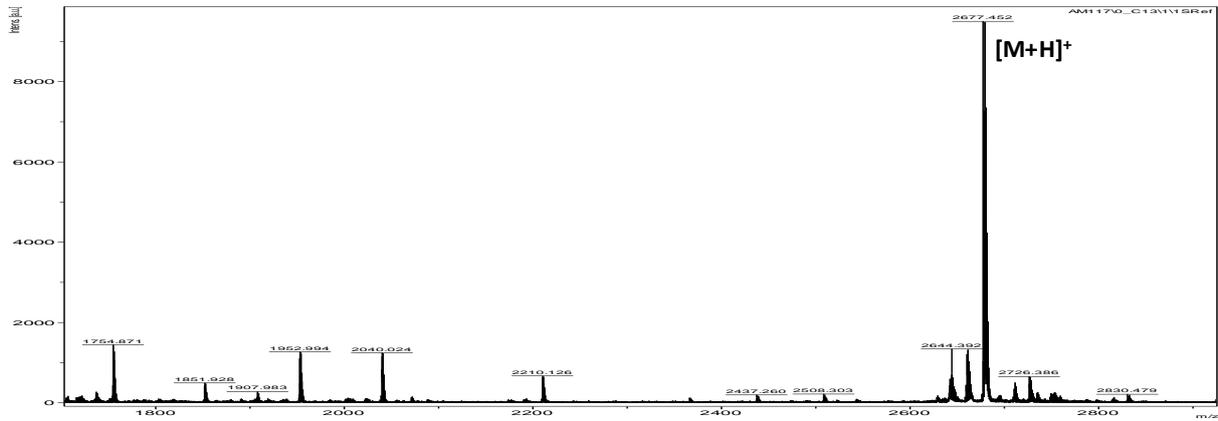
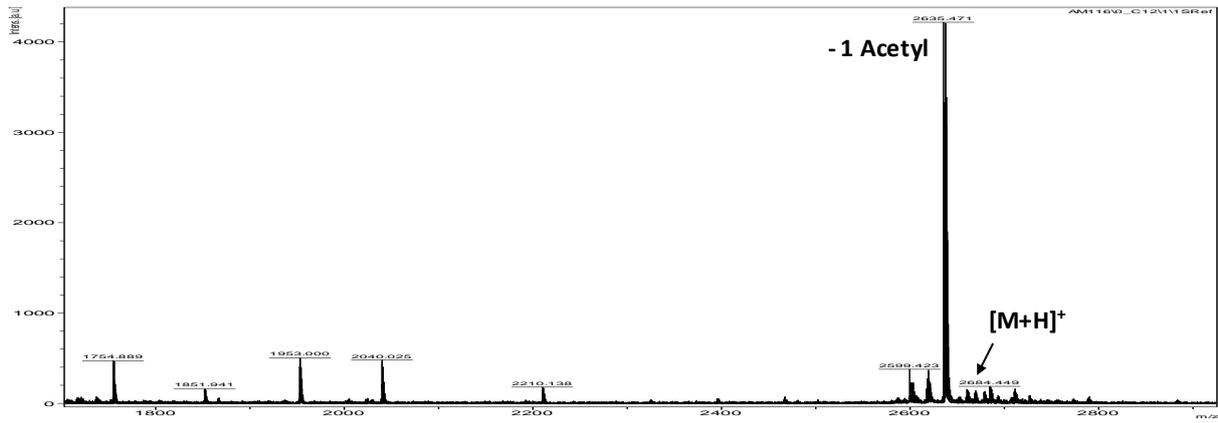
H3_K27ac_S28ph_SAPS – Peptid + Sirtuin1 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



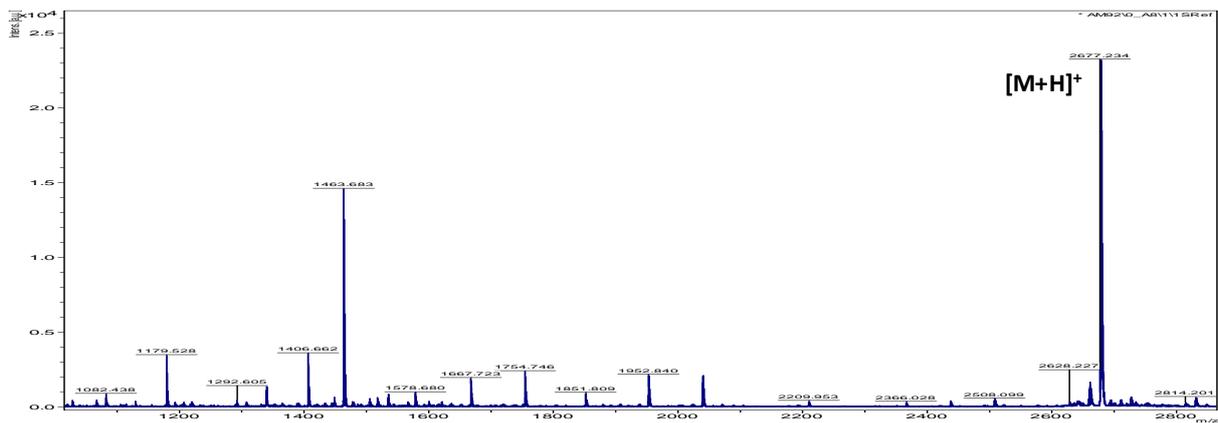
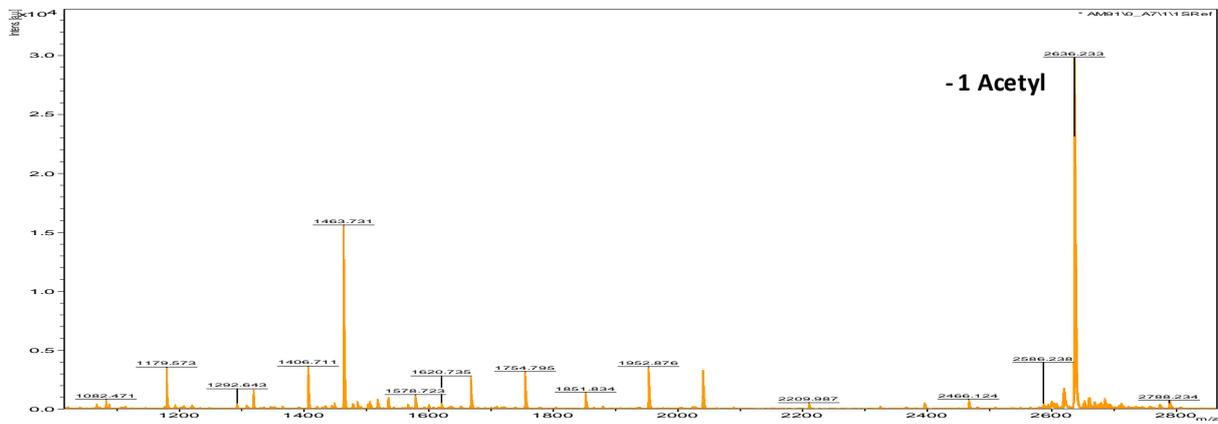
H3_K27ac_S28ph_SAPS – Peptid + Sirtuin2 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



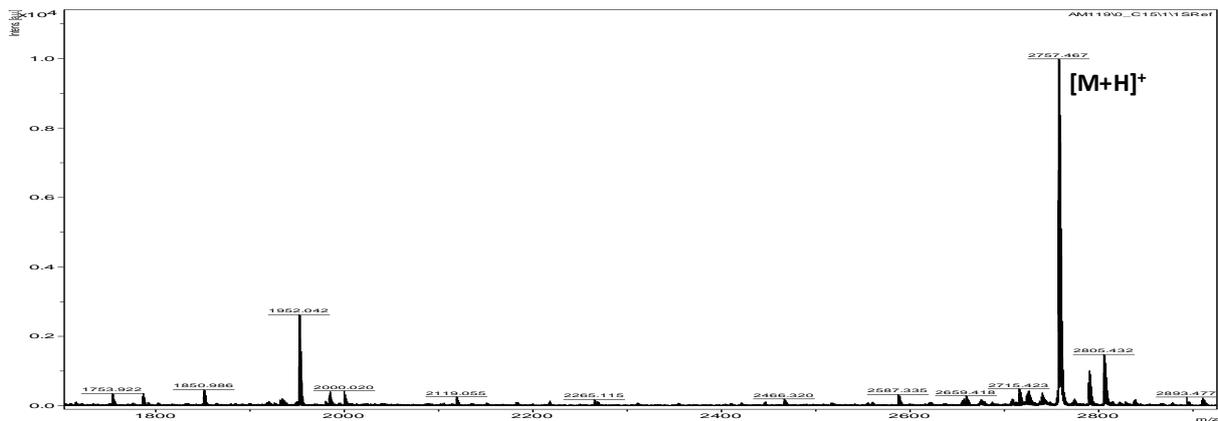
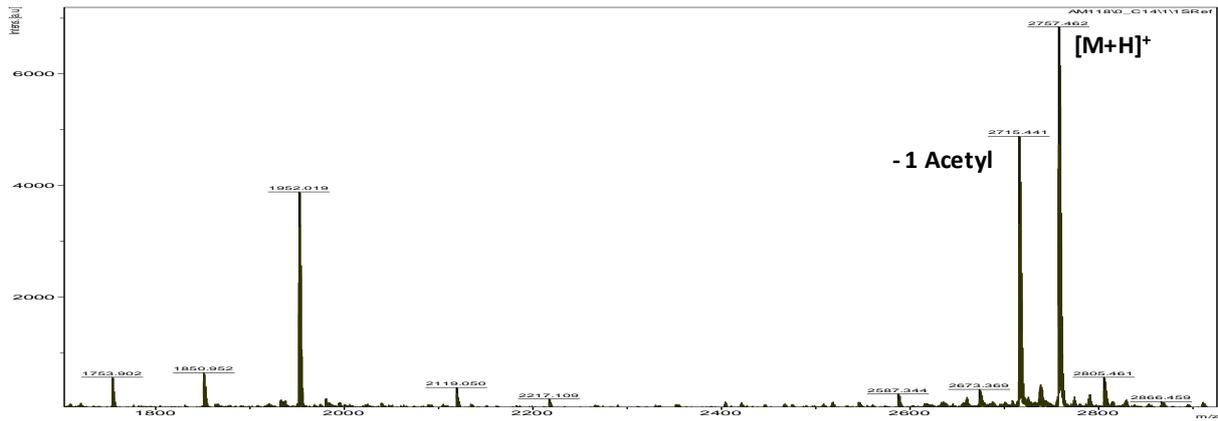
H3_K27ac_STPS – Peptid + Sirtuin1 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



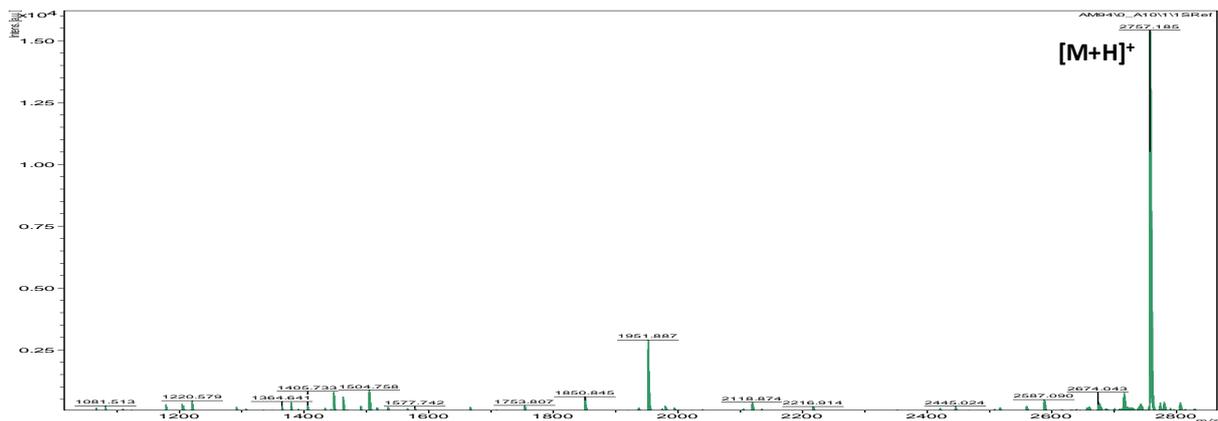
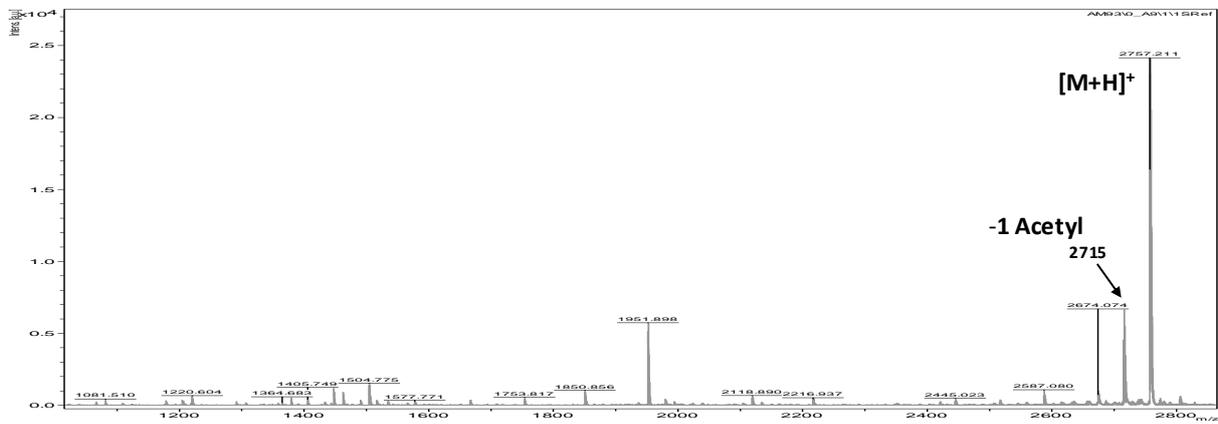
H3_K27ac_STPS – Peptid + Sirtuin2 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



H3_K27ac_S28ph_STPS – Peptid + Sirtuin1 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



H3_K27ac_S28ph_STPS – Peptid + Sirtuin2 mit NAD⁺ (oben) bzw. ohne NAD⁺ (unten)



Anhang A4: Übersicht der Histonphosphorylierungen

Histon	Modifikationsstelle	Kinase	Vorgeschlagene Funktion	Referenz
H1	Ser1	n.a.	n.a.	478
	Thr3	n.a.	n.a.	478
	Ser4	unbekannt	Interphase	478,479
	Ser5 (<i>Tt</i>)	unbekannt	Interphase	479
	Thr10 (H1.5)	P34cdc2/Cyclin B	Mitose	480
	Ser17 (H1.5)	CDC2/CDK2	Interphase	478,480
	Ser27	unbekannt	Aktivierung Transkription, Chromatindenkondensation	481,482
	Ser28	n.a.	n.a.	478
	Thr34	CDC2	Interphase, DNA-Replikation	478,483
	Ser35 (H1.4)	PKA	Mitose	484
	Ser38	PKC	n.a.	485
	Ser40	n. a.	n.a.	334
	Ser42 (<i>Tt</i>)	unbekannt	Interphase, DNA-Replikation	483
	Ser44 (<i>Tt</i>)	unbekannt	Interphase, DNA-Replikation	483
	Thr46 (<i>Tt</i>)	CDC2	Interphase, DNA-Replikation	483
	Thr53 (<i>Tt</i>)	CDC2	Interphase, DNA-Replikation	483
	Ser54	n. a.	n.a.	334
	Tyr70	n. a.	n.a.	334
	Ser103	PKC	n.a.	486
	Thr137 (H1.5)	CDC2/CDK2	Mitose	480
	Thr145 (H1.4)	CDC2/CDK2	Mitose	480
	Thr154 (H1.5)	CDC2/CDK2	Mitose	480
	Thr164	n. a.	n.a.	334
	Ser171 (H1.4)	CDC2/CDK2	Interphase	478,480
	Ser172	CDC2/CDK2	Interphase	480
	Thr179	n. a.	n.a.	334
Ser186 (H1.4)	CDC2/CDK2	Interphase	478,480	
Ser188	CDC2/CDK2	Interphase	480	
S/T	CDC2/CDK2	Mitose, Transkription	487	
H2A	Ser1	unbekannt	Mitose, Chromatinzusammenbau	488
		MSK1	Hemmung Transkription	385
	Ser16	RSK2	EGF-Signalweg, Stabilisierung H2A.X, Verringerung Zelltransformation	489
	Thr17	PKB/Akt	Regulation Apoptose	336
	Tyr50	n. a.	n.a.	334
	Tyr57	CK2	Verlängerung Transkription	426
	Thr59	n. a.	n.a.	334
	Thr101	n.a.	Nukleosomzusammenbau	490
	Thr119 (<i>Dm</i>)	NHK-1	Mitose	491
	Thr119 (<i>mammals</i>)	NHK-1, AuroraB	Regulation Chromatinstruktur, Mitose	492
	Thr120 (<i>mammals</i>)	Bub1	Mitose, Hemmung Transkription	493
	Thr120 (<i>mammals</i>)	VprBP	Mitose, Hemmung Transkription	494
	Ser121 (<i>Sc</i>) (entspricht H2AThr120 in <i>mammals</i>)	Bub1	Aufrechterhaltung chromosomaler Homeostase, DNA-Reparatur, Mitose, Meiose	493
	Ser122 (<i>Sc</i>)	unbekannt	DNA-Reparatur	495
	Ser129 (<i>Sc</i>) (entspricht H2AS139 in <i>mammals</i>)	Mec1, Tel1	DNA-Reparatur	496–498

Histon	Modifikationsstelle	Kinase	Vorgeschlagene Funktion	Referenz
H2A	Ser139 (<i>mammalian</i> H2A.X)	ATR, ATM, DNA-PK	DNA-Reparatur	499–501
		RSK2	EGF-Signalweg, Stabilisierung H2A.X, Verringerung Zelltransformation	489
		MST1	Apoptose	502
	Tyr142 (<i>mammalian</i> H2A.X)	WSTF	DNA-Reparatur	503
H2B	Ser6	n. a.	n.a.	478
		Humane Cytomegalovirus UL97 Proteinkinase	n.a.	504
	Thr7	n. a.	n.a.	478
	Ser10 (<i>Sc</i>) (entspricht H2BSer14 in <i>mammals</i>)	Ste20	Apoptose	505
		Ipl1? (=Aurora B human)	Meiose	6
	Ser14 (<i>vertebrates</i>)	Mst1	Apoptose	506
		unbekannt	DNA-Reparatur	507
	Ser32 (<i>mammals</i>)	PKC	Apoptose-bezogene DNA-Fragmentierung	485,508
		RSK2	EGF-Signalweg	509
	Ser33 (<i>Dm</i>)	TAF1	Aktivierung Transkription	510
	Ser36 (<i>mammals</i>)	AMPK	Aktivierung Transkription	159
		PKA	n.a.	504
		PKC	n.a.	485
	Ser38	Humane Cytomegalovirus UL97 Proteinkinase	n.a.	504
	Tyr40 (<i>Sc</i>) (entspricht H2BTyr37 (<i>Hs</i>))	Swe1 (<i>Sc</i>)	Transkription	155
	Tyr37 (<i>Hs</i>)	Wee1 (<i>Hs</i>)	Transkription	155
	Thr52	n. a.	n.a.	334
	Ser56	n. a.	n.a.	334
	Ser64	n. a.	n.a.	334
	Ser75	n. a.	n.a.	478
	Ser87	Humane Cytomegalovirus UL97 Proteinkinase	n.a.	504
	Thr88	n. a.	n.a.	334
	Ser91	n. a.	n.a.	334
	Ser112	Humane Cytomegalovirus UL97 Proteinkinase	n.a.	504
	Ser114	n. a.	n.a.	478
	Thr115	n. a.	n.a.	334
	Thr119	n. a.	n.a.	334
	Ser124	Humane Cytomegalovirus UL97 Proteinkinase	n.a.	504
H3	Thr3 (<i>mammals</i>)	Haspin	Mitose	511
		VRK1	Chromatinkondensation, Mitose	512
H3	Thr6	PKC β	Aktivierung Transkription, Verhinderung H3K4-Demethylierung, Aufrechterhaltung hormonabhängiger Genaktivie-	513

Histon	Modifikationsstelle	Kinase	Vorgeschlagene Funktion	Referenz
			rung	
		PKC α	Aktivierung Transkription	338
	Ser10	Aurora B	Mitose, Meiose	271,341,514
		MSK1, MSK2	Genaktivierung	278,515
		IKK- α	Aktivierung Transkription	516,517
		VRK1	Chromatinkondensation, Mitose	512
		PIM1	Aktivierung Transkription	518
		Rsk2	Aktivierung Transkription	519
		PKB/Akt	Aktivierung Transkription	517
		ERK1	Transkription, Chromatinkondensation, Antwort auf UVB-Strahlung	6,520
		p38	Transkription, Chromatinkondensation, Antwort auf UVB-Strahlung	6,520
		Fyn	Transkription, Chromatinkondensation, Antwort auf UVB-Strahlung	6,521
		Chk1	Transkription, Chromatinkondensation, Antwort auf UVB-Strahlung	6
		PRK1	Transkription, Chromatinkondensation, Antwort auf UVB-Strahlung	6
	Ser 10 (<i>Sc</i>)	IpL1 (<i>Sc</i>)	Transkription	271
		Snf-1 (<i>Sc</i>)	Aktivierung Transkription	522
	Thr11 (<i>mammals</i>)	Dlk/Zip	Mitose	523
		PRK1	Aktivierung Transkription	282
		PKM2	Transkription	524
		Chk1	Aktivierung Transkription, Reaktion auf DNA-Schäden	525
		Mek1 (<i>Sc</i>)	Meiose (<i>Sc</i>)	526
	Ser28 (<i>mammals</i>)	Aurora B	Mitose	293
		MSK1, MSK2	Genaktivierung	278,527
		JNK1/2	Mitose, Transkription	528,529
		MLTK α	Mitose, Transkription, Antwort auf UVB-Strahlung	530
		ERK1/2	Meiose	528,529
		p38	Meiose	528,529
	Ser31	unbekannt	Mitose	478,531
	Thr32	n.a.	Mitose	532,533
	Tyr41	JAK2	Aktivierung Transkription	534
	Thr45 (<i>mammals</i>)	PKC- δ	Apoptose	535
	Thr45 (<i>Sc</i>)	S-Phase Kinase Cdc7-Dbf4	DNA-Reparatur	536
		AKT1,2 (<i>Sc</i>)	DNA-Replikation	536
	Ser57	unbekannt	Verlängerung Transkription	537
	Thr80	Unbekannt	Mitose	538
	Ser86	n. a.	n.a.	21
	Tyr99 (<i>Sc</i>)	Rad53	Regulation der Histonpegel	539,540
	Thr107	n. a.	n.a.	478
	Thr118	n. a.	Transkription, DNA-Reparatur	541
H4	Ser1	unbekannt	Mitose, Chromatinzusammenbau	488
		Sps1	Mitose, Transkription	542
	Ser1 (<i>Sc</i>)	CK2 (<i>Sc</i>)	DNA-Reparatur, Transkription	543
	His18 (<i>mammals</i>)	HHK	DNA-Replikation	544
H4	Ser47	PAK2	(H3.3-H4) Deposition, Nukleosomzusammenbau	490,545
	Tyr51	n.a.	n.a.	334,546

Histon	Modifikationsstelle	Kinase	Vorgeschlagene Funktion	Referenz
	Tyr72	EGFR	Chromatinmodulation	547
	His75 (<i>mammals</i>)	HHK	DNA-Replikation	544
	His75 (<i>Sc</i>)	Protein Histi- dinkinase	n.a.	548
	Tyr88	ACK1	n.a.	334,546

n.a., nicht angegeben; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *mammals*, Säugetier; *Tt*, *Tetrahymena thermophila*; *vertebrates*, Wirbeltiere; ACK1, Acetyl-CoA Carboxylase Kinase 1; AMPK, Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase; ATM, *Ataxia telangiectasia*-mutierte Proteinkinase; ATR, ATM und Rad3-verwandte Proteinkinase; Bub1, *budding uninhibited by benzimidazoles 1*; CDC2/CDK2, Cyclin-abhängige Kinase 1; Chk, *checkpoint* Kinase; CK2 Caseinkinase II; DNA-PK, DNA-aktivierte Proteinkinase; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; ERK1, extrazelluläres Signal-regulierte Kinase; HHK, Histon H4 Histidinkinase; IKK, I κ B Kinasekomplex; Ipl1 (*Sc*), Aurora B Kinase in *Sc*; JAK, Januskinase; JNK, *c-JunN*-terminale Proteinkinase; Mec1, meiotisch-spezifische Kinase; MLTK, *mixed lineage kinase-like mitogen-activated protein triple kinase*; MSK, Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase; MST, Säugetier-STE20-ähnliche Kinase; NHK-1 Nukleosomale Histonkinase-1; PAK2, P21-aktivierte Kinase 2; PIM, Proto-onkogene Serin/Threoninproteinkinase; p38, p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PKA, Proteinkinase A; PKB, Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PKM2, Pyruvatkinase M2; PRK, Proteinkinase C-verwandte Kinase; Rad53, Strahlungssensitive 53 Kinase; Rsk, p90 ribosomale S6 Proteinkinase; Sps1, STE20-verwandte Kinase 1; TAF1, TATA Bindungsfaktor-assoziierter Faktor; VprBP, Vpr (HIV-1) Bindungsprotein; VRK1, *Vaccinia*-verwandte Kinase 1; WSTF, Williams-Beuren-Syndrom Transkriptionsfaktor (auch bekannt als BAZ1B)

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Mike Schutkowski herzlich für die Möglichkeit danken, bei Ihm in der Arbeitsgruppe an einem solch interessanten Thema zu arbeiten. Vielen Dank für seine immerwährende inspirierende Begeisterung für die diversen biochemischen Prozesse und Zusammenhänge. Für das entgegengebrachte Vertrauen, seine motivierenden und konstruktiven Diskussionen und seine ständige Bereitschaft zur Unterstützung bei allen Fragen rund um mein Promotionsthema möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Prof. Dr. Wolfgang Sippl (MLU Halle-Wittenberg, Medizinische Chemie) danke ich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit, seine Unterstützung und stete Hilfe bei den verschiedenen epigenetischen Fragen. Ein besonderer Dank gilt hier auch Dr. Matthias Schmidt und Dr. Alexander Rohe für die sehr gute Zusammenarbeit und die Zurverfügungstellung der Kinasen WEE1 und Myt1.

Mein Dank gilt weiterhin: Prof. Dr. Clemens Steegborn (Universität Bayreuth) für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die vielen Sirtuinlieferungen; Prof. Dr. Gunter Reuter (Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik der MLU Halle-Wittenberg) und hier besonders auch Matthias Walther für die Bereitstellung der sequenzspezifischen Antikörper; Prof. Dr. Ulla Bonas (MLU Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe Pflanzengenetik) und insbesondere Dr. Doreen Blüher für die gute Zusammenarbeit im XopH-Projekt. Ferner danke ich Prof. Dr. Manfred Jung (Universität Freiburg) für die Bereitstellung von Prk1 und Sirtuin1; Prof. Dr. Roland Schüle (Universität Freiburg) für die Bereitstellung der *Reader*domänen CHD1 und Spindlin1; sowie Prof. Dr. Michael O. Hottiger (Universität Zürich) für die Zurverfügungstellung der Acetyltransferasen und ADP-Ribosyltransferasen.

Dr. Ulf Reimer (JPT) danke ich herzlich für seine extrem große Hilfe bei der bioinformatischen Auswertung der Datenmengen und der Visualisierung der Mikroarraydaten in der bestmöglichen Form. Auch für die inhaltliche Bereicherung dieser Arbeit durch Ideen und seine stetige moralische Unterstützung gebührt ihm mein allergrößter Dank! Weiterhin bedanke ich mich bei Johannes Zerweck (JPT) für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die vielen Ratschläge, alle aufbauenden Worte und die Herstellung der Peptidmikroarrays.

Prof. Dr. Peter Imming danke ich für seine tolle und übersichtlich gestaltete Vorlesung der organischen Chemie, die mir die organische Chemie näherbringen konnte.

Prof. Dr. Elmar Wahle danke ich für seine ebenso interessant gestaltete und sehr gut gelesene Vorlesung der Allgemeinen Biochemie und seine Bereitschaft mich in der Allgemeinen Biochemie zu prüfen und mir somit die Zulassung als Promotionsstudent der Biochemie zu ermöglichen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem BMBF ProNet-T3-Projekt. Dr. Matthias Strutz und Katja Möritz danke ich für die Projektkoordination, ihre stete Unterstützung mit dem „Papierkram“, sowie das super Begleitprogramm der ProNet-T3-Konferenzen.

Der internationalen Graduiertenakademie danke ich für die Vielzahl an hilfreichen Weiterbildungskursen und die unkomplizierte Organisation einer Teilnahme.

Dr. Angelika Schierhorn und Christina Gersching danke ich für die massenspektrometrischen Analysen. Für die Möglichkeit zur Nutzung des Radionuklidlabors danke ich PD Dr. Margret Köck und Karin Klar.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Stephan König für seine wertvollen Anmerkungen beim Verfassen der Dissertation, Dr. Ilona Born für ihre Hilfe bei der Festphasenpeptidsynthese, sowie Dr. David Rauh für seine Unterstützung bei der Datenbank-basierten Suche der Sirtuin2-Substrate. Dr. Matthias Weiwad danke ich für die kinetische Bestimmung von Sirt6 und den myristoylierten H3K9-Peptidderivaten. Dr. Marat Meleshin danke ich für die Synthese und Reinigung von diversen Peptiden und seine Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen.

Ein besonders großer Dank gebührt auch meinen Mitdoktoranden Claudia Rößler, Željko Simić und Theresa Nowak für die super Zusammenarbeit, ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft auf wissenschaftlicher als auch auf privater Ebene, den wohlthuenden Humor und die schöne Zeit.

Allen (auch ehemaligen) Mitgliedern der Arbeitsgruppe Enzymologie sei für das angenehme Arbeitsklima, die ständige Hilfe und Unterstützung im Laboralltag und die gute Zusammenarbeit gedankt.

Für die vielen hilfreichen Anmerkungen und das schnelle Korrekturlesen bin ich Dr. Claudia Rößler zu großem Dank verpflichtet. Dr. Sandra Liebscher und Dr. Andreas Pech danke ich für die hilfreichen Anmerkungen beim Verfassen der Dissertation.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen meiner beruflichen Laufbahn für ihre Unterstützung und Förderung bedanken. Ganz besonders dankbar bin ich hier Dr. Bernhard Renard und Dr. Martin Daneschdar für ihre hilfreichen fachlichen und praktischen Tipps; sowie das bereitwillige Teilen ihres Wissens und ihrer Denkansätze.

Meinen Freunden und dem internationalen Doktorandenstammtisch bin ich sehr dankbar für die tolle Zeit in Halle, die vielen unglaublichen Momente und legendären Parties, die sicherlich noch lange im Gedächtnis bleiben werden. Danke für eure mentale Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ziele und die vielen Erinnerungen, dass es neben der Arbeit noch ein anderes Leben gibt!

Zuletzt, aber nicht weniger herzlich danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, für ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und die mentale Unterstützung, und die Freiheit mein „Dingelchen“ durchzuziehen, auch wenn sie es manchmal nicht ganz nachvollziehen konnten. Vielen Dank, dass ihr mir nicht nur Wurzeln gegeben habt, sondern auch Flügel!

Lebenslauf

Antonia Marie Lydia Masch

geboren am 13. April 1984 in Bad Langensalza

ledig

Schulbildung

09/1994 - 06/2002 Salza-Gymnasium in Bad Langensalza
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

09/2002 - 11/2006 Fachhochschule Jena, University of Applied Sciences
Studiengang: Biomedizintechnik, Spezialisierung: Bioinstrumente
Abschluss: Dipl.-Ing. (FH) für Biomedizintechnik

08/2004 - 02/2005 Praktikumsemester bei „Philips Research Laboratories“ Eindhoven,
Niederlande, Abteilung „Care & Health Applications“
Thema: „Effects of several factors on the performance of the non-
invasive blood analysis setup“

04/2006 - 11/2006 Diplomandin bei „JPT Peptide Technologies GmbH“, Berlin
Abteilung „Array Technologies“
Thema: „Untersuchung zur Herstellung und Anwendung von Hochdichte-
Peptid-Mikroarrays“

Berufserfahrung

06/2007 - 07/2007 Projektarbeit bei „Zeptosens, a Division of Bayer (Schweiz) AG“, Witterswil, Schweiz

10/2007 – 10/2010 JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin

- Gruppenleiterin Peptide Arrays im Bereich Spot-Synthese von Peptiden und Produktion von Peptid-Mikroarrays
- Qualitätsmanagementbeauftragte und interne Auditorin gemäß DIN EN ISO 9001:2008 (06/2008 – 10/2010)

11/2010 – 10/2011 Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
wissenschaftliche Mitarbeiterin in den Funktionseinheiten Seroscreening und New Scaffolds

11/2011 – 09/2016 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut der Biochemie & Biotechnologie, Abteilung Enzymologie
Promotionsstudentin unter Leitung von Prof. Dr. Mike Schutkowski
Thema: Peptidmikroarrays zur Charakterisierung von Bindungs- und Substratspezifitäten

Präsentation wissenschaftlicher Daten

Publikationen

Schnatbaum K, Schmoldt HU, Daneschdar M, Plum LM, Jansong J, Zerweck J, Kühne Y, **Masch A**, Wenschuh H, Fiedler M, Türeci Ö, Sahin U, Reimer U.

Peptide microarrays enable rapid mimotope optimization for pharmacokinetic analysis of the novel therapeutic antibody IMAB362.

Biotechnol J. **2014** Apr;9(4):545-54.

Burgardt NI, Schmidt A, Manns A, Schutkowski A, Jahreis G, Lin YJ, Schulze B, **Masch A**, Lücke C, Weiwad M.

Parvulin 17-Catalyzed Tubulin Polymerization is Regulated by Calmodulin in a Calcium-Dependent Manner.

J Biol Chem. **2015** Jul 3;290(27):16708-22.

Rohe A, Platzer C, **Masch A**, Greiner S, Henze C, Ihling C, Erdmann F, Schutkowski M, Sippl W, Schmidt M.

Identification of peptidic substrates for the human kinase Myt1 using peptide microarrays. *Bioorg Med Chem.* **2015** Aug 1;23(15):4936-42.

Masch A, Reimer U, Zerweck J, Schutkowski M.

Peptide microarrays for profiling of epigenetic targets.

Epigenetics Technological Applications, edited by Y. George Zheng, Elsevier, **2015**

McCuaig RD, Dunn J, Li J, **Masch A**, Knaute T, Schutkowski M, Zerweck J, Rao S.

PKC-Theta is a Novel SC35 Splicing Factor Regulator in Response to T Cell Activation.

Front Immunol. **2015** Nov 5;6:562

Li J, Hardy K, Phetsouphanh C, Tu WJ, Sutcliffe EL, McCuaig RD, Sutton CR, Zafar A, Munnier ML, Zaunders JJ, Xu Y, Theodoratos A, Tan A, Lim PS, Knaute T, **Masch A**, Zerweck J, Brezar V, Milburn PJ, Dunn J, Turner SJ, Seddiki N, Kelleher AD, Rao S.

Nuclear PKC- θ Facilitates Rapid Transcriptional Responses in Human Memory CD4⁺ T Cells via p65 and H2B Phosphorylation.

J Cell Sci. **2016** Jun 15;129(12):2448-61

Konferenz-Vortrag

9th Status Seminar Chemical Biology, 21.-22.01.2014, Frankfurt a. M.:

Systematic analysis of epigenetic modifications using Peptide Microarrays

Poster auf wissenschaftlichen Konferenzen

Functional Genomics and Proteomics, 02.-03.02.**2012**, Frankfurt a. M.:

Masch A, Roessler C, Rauh D, Obeck U, Schutkowski M.

Comprehensive analysis of substrate specificity of human lysine acetyltransferases using peptide microarrays

Human Proteome Organisation, HUPO 11th Annual World Congress, 09.-13.09.**2012**, Boston, USA:

Masch A, Roessler C, Rauh D, Hottiger MO, Schutkowski M.

Unraveling the substrate specificity of human acetyltransferases by peptide microarrays

Advances in Microarray Technology, 05.-06.03.**2013**, Barcelona, Spanien:

Masch A, Rohe A, Schmidt M, Sippl W, Schöppler V, Jansong J, Pawlowski N, Reimer U, Schutkowski M.

Characterizing 'Reader', 'Writer' and 'Eraser' of post-translational modifications by Histone Code Microarrays

Posttranslational Protein Modifications in Epigenetics and Metabolism, 26.-28.05.**2014**, Kopenhagen, Dänemark:

Masch A, Rohe A, Schmidt M, Sippl W, Schöppler V, Jansong J, Pawlowski N, Reimer U, Schutkowski M.

Histone Code Microarrays as tools to analyze systematically epigenetic modifications

5th Halle Conference on Recombinant Proteins, 19.-20.02.**2015**, Halle:

Blueher D, Eschen-Lippold L, Scheel D, **Masch A**, Schutkowski M, Bonas U.

A bacterial pathogen effector protein and cell death elicitor with phosphatase activity

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Ferner erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe. Die vorliegende Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden.

Halle (Saale), den 28.04.2016

Antonia Marie Lydia Masch