



Schlussbericht

zum Teilprojekt 1

im

SysTec - Verbundprojekt

"EpiSys - Experimentelle und theoretische Methoden für die Analyse der Dynamik des epigenetischen "Gene Silencing" in lebenden Zellen"

Förderkennzeichen: 0315502A

Laufzeit des Vorhabens: 1. 9. 2009 - 31. 8. 2012
mit kostenneutraler Verlängerung bis zum 31. 8. 2013

Zuwendungsempfänger: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Ausführende Stelle: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Abteilung Theoretische Systembiologie (B086)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg

Projektleiter: Prof. Dr. Thomas Höfer
Telefon: 06221 54 51380
E-Mail: t.hoefer@dkfz-heidelberg.de

PD Dr. Karsten Rippe
Telefon: 06221 54 51376
E-Mail: karsten.rippe@dkfz.de

Beteiligte Wissenschaftler: Prof. Dr. Ingrid Grummt (DKFZ)

Das in diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315502A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I. Kurze Darstellung..... | 3 |
| 1. Aufgabenstellung..... | 3 |
| 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde..... | 3 |
| 3. Planung und Ablauf des Vorhabens..... | 4 |
| 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde..... | 7 |
| 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen..... | 10 |
| II. Eingehende Darstellung..... | 12 |
| 1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen..... | 12 |
| 2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises..... | 23 |
| 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit..... | 24 |
| 4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans..... | 25 |
| 5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen..... | 25 |
| 6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse..... | 25 |

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Das Verständnis epigenetischer Regulationsmechanismen gewinnt für die medizinische Diagnose und Therapie von Krebs, Entwicklungskrankheiten und anderen Pathologien zunehmend an Bedeutung. Die epigenetische Steuerung wird durch DNA-Methylierung, kovalente Modifikationen der Histone und Protein-Protein/DNA Interaktionen zwischen Histonen und anderen chromosomalen Proteinen vermittelt. Diese Faktoren kontrollieren den Zugriff auf die DNA-Sequenz und damit die Genexpression, sowie DNA-Replikation, Reparatur und Rekombination. Dabei interagieren die epigenetischen Faktoren hochdynamisch miteinander, um so funktionelle Chromatinzustände zu induzieren oder zu propagieren. In einem integrativen Ansatz sollen im *EpiSys*-Verbund deshalb neue experimentelle und theoretische Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung dynamischer epigenetischer Netzwerke in lebenden Zellen entwickelt werden, zusammen mit mathematischen Analysen und Modellierung.

Durch eine Kombination fluoreszenzmikroskopischer Techniken wird zunächst ein Ansatz zur hochaufgelösten Erfassung von Proteinbewegungen und Interaktionen in lebenden Zellen auf verschiedenen Zeit- und Längenskalen entwickelt. Zur Untersuchung der Verteilung und Dynamik von Chromatinmodifikationen *in vivo* werden neue Detektionsverfahren für die wesentlichen epigenetischen Modifikationen in repressiven Chromatinstrukturen implementiert. Anhand der experimentellen Daten werden dann neue Modellierungsansätze ausgearbeitet, die die kombinatorische Komplexität der epigenetischen Chromatin-Modifizierungsmechanismen quantitativ beschreiben und verifizierbare Vorhersagen erstellen. Die Entwicklungen und Anwendungen erfolgen in zwei komplementären experimentellen Systemen. Dies sind zum einen die großräumig mehrere Megabasenpaare umfassende Genrepression im perizentrischen Heterochromatin und zum anderen die lokale Transkriptionsinaktivierung am Promotor von Genen für ribosomale RNA.

Der integrative systembiologische Ansatz wird neue Erkenntnisse in Bezug auf die dynamische epigenetische Modulation der Chromatinorganisation und ihrer Wirkung auf die Genexpression erzielen. Dadurch wird es möglich sein, die komplexe Wirkungsweise von epigenetisch wirkenden Medikamenten besser zu verstehen, sowie neue diagnostische Marker und therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Arbeitsgruppen der Projektpartner Thomas Höfer und Karsten Rippe sind auf derselben Etage im BioQuant (Zentrum für Quantitative Analyse von molekularen und zellulären Biosystemen) angesiedelt. Durch die räumliche Nähe wurde bereits vor dem Start des vorliegenden Projektes ein

intensiver Austausch gepflegt und gemeinsame Projekte realisiert. Darüber hinaus haben die beiden Gruppenleiter seit 2007 in der Helmholtz-Allianz „Systembiologie der Signalwege in Krebszellen“ (SBCancer) miteinander kooperiert. Auch zu der Gruppe von Ingrid Grummt bestand bereits vor Antragstellung ein regelmäßiger Kontakt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

In dem vorliegenden Vorhaben wurden Meilensteine zu den Arbeitspaketen AP1, AP2, AP3, AP4 und AP6 bearbeitet:

Teilprojekt DKFZ-KR:

Im Teilprojekt DKFZ-KR wurden insgesamt 10 Meilensteine zu den Arbeitspaketen AP1, AP2 und AP3 bearbeitet:

AP1: Inneres Heterochromatin-Netzwerk

Meilenstein 1: Charakterisierung der Heterochromatin-Foci

Meilenstein 2: Messung von Proteinmobilität und Chromatininteraktionen

Meilenstein 3: Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen

Meilenstein 4: Perturbationen des Heterochromatin-Zustandes

AP2: Dynamik des rDNA-spezifischen epigenetischen Gen-Silencing

Meilenstein 5: Diffusion und Bindung von ribosomalen Heterochromatin-Proteinen

Meilenstein 6: Dynamik und Interaktionen von rDNA-spezifischen ncRNAs

Meilenstein 7: Chromatinremodellierungs-Komplex NoRC

AP3: Räumlich aufgelöste Fluoreszenzfluktuations-Mikroskopie zur Bestimmung von Beweglichkeiten und Interaktionen chromosomaler Proteine

Meilenstein 8: Weiterentwicklung des STFM-Instruments

Meilenstein 9: Softwareentwicklung zur Berechnung, Analyse und Darstellung von STFM-Daten

Meilenstein 10: Vergleichende Messungen mit STFM und konventionellem FCS

Teilprojekt DKFZ-IG:

Im Teilprojekt DKFZ-IG wurden insgesamt 7 Meilensteine zu den Arbeitspaketen AP2 und AP4 bearbeitet:

AP2: Entschlüsselung der regulatorischen Netzwerke, die die Chromatinstruktur und Transkriptionsaktivität von rRNA-Genen auf epigenetischer Ebene regulieren

Meilenstein 1: Etablierung von Zelllinien, die GFP-markierten TIP5 im Nukleolus exprimieren.

Meilenstein 2: Etablierung von TIP5-defizienten Zelllinien.

Meilenstein 3: Messung der zellulären Lokalisation und Mobilität GFP-markierter Proteine bzw. Fluoreszenz-markierter ncRNA.

Meilenstein 4: Funktioneller ‚Cross-talk‘ von Komponenten des epigenetischen Netzwerks.

AP4: Entwicklung von Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen und Nukleinsäuren, die an der Gen-Silencing beteiligt sind

Meilenstein 5: Synthese und funktionelle Analyse von fluoreszenzmarkierter ‚pRNA‘.

Meilenstein 6: Visualisierung von pRNA in lebenden Zellen.

Meilenstein 7: Analyse der Rolle von ncRNA bei Heterochromatin-Bildung und rDNA Silencing.

Teilprojekt DKFZ-TH:

Im Teilprojekt DKFZ-TH wurden insgesamt 10 Meilensteine zu den Arbeitspaketen AP1, AP2 und AP6 bearbeitet:

AP1: Inneres Heterochromatinnetzwerk

Meilenstein 1: Entwicklung eines stochastischen kinetischen Modells für die Induktion und Propagation von Heterochromatin.

Meilenstein 2: Erweiterung des Netzwerkes durch Einbeziehung synergistischer und antagonistischer Wechselwirkungen

Meilenstein 3: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Histonmodifikationen, Proteinrekrutierung und Strukturierung der Chromatinfaser

Meilenstein 4: Experimentelle Überprüfung und iterative Verbesserung des Modells des HP1-Interaktionsnetzwerkes

AP2: Entschlüsselung der regulatorischen Netzwerke, die die Chromatinstruktur und Transkriptionsaktivität von rRNA-Genen auf epigenetischer Ebene regulieren

Meilenstein 1: Erstellen eines Netzwerkmodells der epigenetischen Regulation der ribosomalen RNA-Gene

Meilenstein 2: Kinetisches Modell der NoRC-abhängigen Histonmodifikationen und DNA-Methylierung

Meilenstein 3: Experimentelle Überprüfung und iterative Verbesserung des Modells für NoRC-abhängiges rRNA-Gensilencing

AP6: Modellierungsmethoden für die kombinatorische Komplexität epigenetischer Netzwerke

Meilenstein 1: Umfassendes Netzwerkmodell der Histonmodifikationen und Proteininteraktionen

Meilenstein 2: Strukturelle Analyse der Netzwerkmodelle

Meilenstein 3: Methoden zur Komplexitätsreduktion und Charakterisierung kinetischer Modelle

Das Projekt war ursprünglich auf eine 36-monatige Laufzeit (1. 9. 2009 - 31. 8. 2012) ausgelegt. In allen drei Teilprojekten konnten die bewilligten Stellen z.T. erst verspätet besetzt werden. Im

Teilprojekt DKFZ-KR konnte nur eine der drei Doktorandenstellen sofort besetzt werden, insbesondere die verspätete Besetzung der dritten Doktorandenstelle führte zu einer ca. einjährigen Verzögerung der Arbeiten im AP3. Auch im Teilprojekt DKFZ-IG konnte die bewilligte Postdoktorandenstelle erst zum 1. 6. 2010 für zunächst nur ein Jahr besetzt werden, ab Januar 2012 wurde die Stelle dann mit einem Doktoranden besetzt und erst ab September 2012 wieder mit einem Postdoktoranden. Im Teilprojekt DKFZ-TH wurde die bewilligte Postdoktorandenstelle erst zum 1. 2. 2010 zunächst mit einer Doktorandin besetzt, die nach 7 Monaten promovierte und danach noch 6 weitere Monate als Postdoktorandin im Projekt mitarbeitete. Im Anschluss an ihr Ausscheiden wurde die Stelle zum 1. 3. 2012 wieder mit einem Doktoranden besetzt. Aus der verspäteten Stellenbesetzung resultierte eine verzögerte Datenbereitstellung seitens DKFZ-KR und DKFZ-IG für die Modellierung in DKFZ-TH. Im Teilprojekt DKFZ-KR gab es außerdem bei den genomweiten Sequenzierungen unerwartete technische Schwierigkeiten, die auf ungenügende Spezifität und Effizienz kommerzieller Antikörper für Suv3-9h1/2 und Suv4-20h1/2 zurückzuführen sind. Im Teilprojekt DKFZ-IG gab es unerwartete Schwierigkeiten bei der Etablierung der Zelllinien, die GFP-markierte Proteine stabil exprimieren und spezifisch im Nukleolus lokalisieren. Letztendlich war es nicht möglich, Zelllinien zu erhalten, die für die vorgesehenen, technisch anspruchsvollen Experimente geeignet sind. Auch die Herstellung der JMJD2b-Zelllinie erwies sich als technisch anspruchsvoller als erwartet. Bezüglich der Modellierungsarbeiten im Teilprojekt DKFZ-TH kam hinzu, dass auch die numerischen Simulationen der Modelle sehr zeitaufwändig sind (1-10 Tage Rechenzeit für eine Simulation mit einem Parametersatz, je nach Größe der simulierten Chromatindomäne). Da es sich hier um neuartige Modelle handelt, war eine Abschätzung des Rechenaufwandes bei der Antragstellung nur sehr grob möglich; die tatsächlichen Rechenzeiten liegen eine Größenordnung über den ursprünglich erwarteten.

Aufgrund der dargestellten Verzögerungen erfolgte die Beantragung einer 12monatigen Laufzeitverlängerung, die am 16. 7. 2012 bewilligt wurde. Hierbei wurde die Bearbeitung folgender Meilensteine nach hinten verschoben:

Teilprojekt DKFZ-KR: AP1: Meilenstein 2, Meilenstein 3, Meilenstein 4

AP2: Meilenstein 5, Meilenstein 6

AP3: Meilenstein 9, Meilenstein 10

Teilprojekt DKFZ-IG: AP2: Meilenstein 1, Meilenstein 3

AP4: Meilenstein 5, Meilenstein 6, Meilenstein 7

Teilprojekt DKFZ-TH: AP1: Meilenstein 3, Meilenstein 4

AP2: Meilenstein 2, Meilenstein 3

AP6: Meilenstein 1, Meilenstein 2, Meilenstein 3

Aufgrund der Laufzeitverlängerung konnte das Projekt trotz personeller Engpässe und vorab nicht kalkulierbaren experimentellen Herausforderungen erfolgreich durchgeführt werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Ein zentraler Aspekt der epigenetischen Programmierung ist die Bildung von transkriptionell inaktiven Chromatinkonformationen („gene silencing“), auch als Heterochromatin bezeichnet. Die Heterochromatinbildung wird über mehrere Mechanismen vermittelt und umfasst die de novo Methylierung von DNA, Modifikation der Histonden sowie Änderungen der Position oder Integrität der Nucleosomen. Einmal etabliert, wird der heterochromatische Status durch die Bindung chromosomaler Proteine wie z.B. HP1 aufrechterhalten (Verschure et al., 2005). Die vielfältige Interaktion der Chromatin-modifizierenden Prozesse und deren Organisation in positive und negative feedback loops hat zur Beschreibung eines Signal-Netzwerkmodells für Chromatin geführt (Schreiber und Bernstein, 2002). Abbildung 1 verdeutlicht die molekularen Interaktionen, welche den globalen Heterochromatin-Status definieren und fasst damit den aktuellen Wissensstand in der Literatur und aus den Vorarbeiten der Projektpartner zum Zeitpunkt der Antragsstellung zusammen (Wachsmuth et al., 2008).

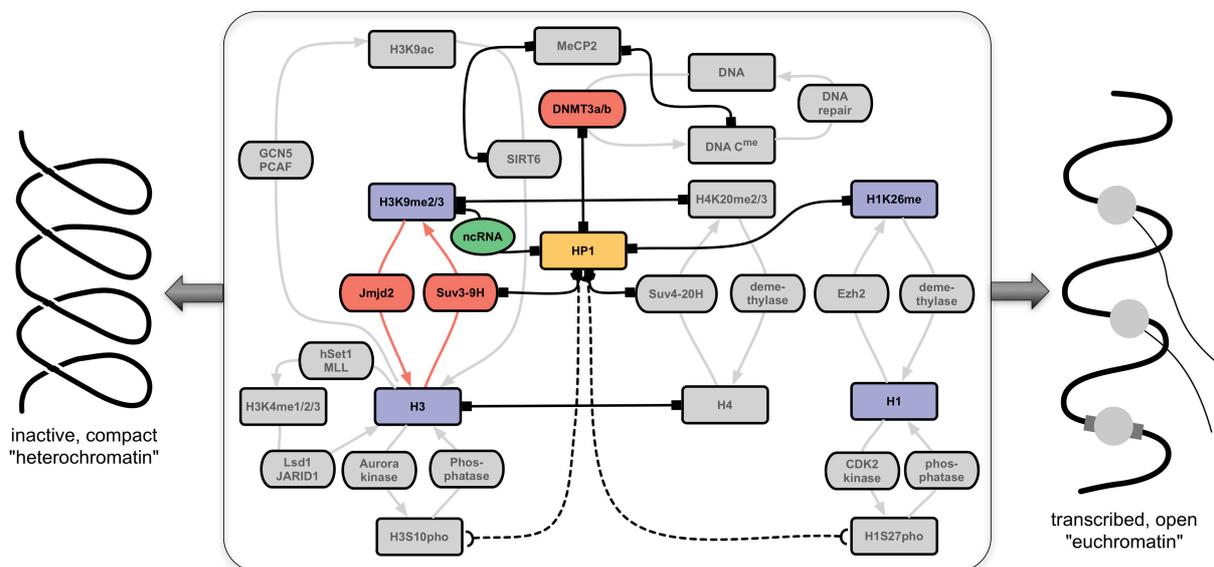


Abb. 1 Regulatorisches epigenetisches Netzwerk, das den Übergang zwischen biologisch inaktivem Heterochromatin und transkriptionell kompetentem Euchromatin vermittelt.

Auch die epigenetische Regulation der rRNA-Synthese wird über Eu- und Heterochromatin vermittelt. Die Heterochromatin-Bildung und Silencing am rDNA Locus stellt ein ideales experimentelles System dar, um die Fragestellungen im vorliegenden Projekt zu bearbeiten. Vom Teilprojekt DKFZ-IG war beschrieben worden, dass der Nucleolar Remodeling Complex (NoRC) die Heterochromatinbildung und transkriptionelle Stilllegung am rRNA-Promotor veranlasst (Santoro et al., 2002). Die Interaktion von promotor-assoziiertem RNA (pRNA) mit NoRC sowie die Rolle von pRNA in NoRC-abhängigen

Prozessen der epigenetischen Kontrolle der rDNA-Transkription war zum Zeitpunkt der Antragstellung nur unvollständig verstanden und daher Gegenstand der Arbeiten in Teilprojekt DKFZ-IG. Es waren bereits theoretische Modelle über epigenetische Regulationsmechanismen anhand von Nukleosomenmodifikation beschrieben (Dodd et al., 2007 und Sneppen et al., 2008). Aber diesen Modellen mangelte es an präzisen molekularen Mechanismen, um diese experimentell bestätigen zu können. Das Teilprojekt DKFZ-TH hatte es sich daher zum Ziel gesetzt, aussagekräftige Modelle über die komplexe Dynamik epigenetischer Netzwerke zu entwickeln.

Aufgrund weitreichender methodischer Vorarbeiten war ein schneller Einstieg in das hier beschriebene Projekt gewährleistet. Im Teilprojekt DKFZ-KR waren Methoden zur Bildgebung und Mobilitätsmessung wie confocal laser scanning fluorescence microscopy (CLSM), fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), fluorescence correlation spectroscopy (FCS) und single particle tracking (SPT) bereits erfolgreich etabliert. Darüber hinaus war mit dem STFM (Spatially and Temporal Fluctuation Microscope) eine neue Generation von FCS-Instrumenten entwickelt worden, um eine hochempfindliche Erfassung von Mobilitäts-Bildern zu erlauben. Die Datenanalyse im Teilprojekt DKFZ-KR konnte auf im Vorfeld bereits erfolgreich angewandte Techniken aufbauen (Fejes Tóth et al., 2004; Görisch et al., 2005). Darüber hinaus waren in der Arbeitsgruppe Rippe GFP/YFP/mRFP1-markierte Vektoren und das *lacO/Lac-GFP*-System (Robinett et al., 1996) für Arbeiten in AP1 verfügbar.

Im Teilprojekt DKFZ-IG waren Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie (Western Blot, Affinitäts-Chromatographie, PCR, Northern Blot, Sequenzierung, etc.) sowie Methoden zur Analyse epigenetischer Parameter (Chromatin-Immunopräzipitation, Histon-Azetylierung, Bisulfit-Mutagenese, etc.) etabliert. Für die Visualisierung der pRNA in lebenden Zellen (AP4, Meilenstein 6) konnte an zwei veröffentlichte Methoden zu unmarkierter pRNA angeknüpft werden (Mayer et al. 2006, 2008).

Bereits durchgeführte Modellierungsarbeiten im Teilprojekt DKFZ-TH hatten zur Beschreibung eines Konzeptes geführt, das die reversiblen Proteinassemblierungsschritte und die von Proteinkomplexen katalysierten Reaktionen während der DNA-Reparatur beschreibt (Dinant et al. 2009 und Lujisterburg et al. 2010). Dieses Konzept stellte einen wichtigen Ausgangspunkt für die im Projekt geplanten Modellierungsarbeiten zu epigenetischen Netzwerken (siehe Abb. 1), insbesondere zur Beherrschung der kombinatorischen Vielfalt, dar. Für das Kernnetzwerk der Heterochromatinregulation durch HP1/Suv3-9 war im Vorfeld bereits ein erstes Arbeitsmodell erstellt worden. Die erforderlichen mathematischen und numerischen Methoden zur Lösung und Analyse von gewöhnlichen und partiellen Differentialgleichungssystemen, zur Modellierung stochastischer Prozesse und zur Parameterschätzung aus experimentellen Daten waren im Teilprojekt DKFZ-TH etabliert.

Verwendete Fachliteratur:

Dinant, C., Luijsterburg, M.S., **Höfer, T.**, Von Bornstaedt, G., Vermeulen, W., Houtsmuller, A.B. and Van Driel, R. (2009) Assembly of multi-protein complexes that control genome function. *J. Cell Biol.* 185 (1), 21-26, 2009

Dodd, I.B., Micheelsen, M.A., Sneppen, K., Thon, G. (2007) Theoretical analysis of epigenetic cell memory by nucleosome modification. *Cell*, 129, 813-822.

Fejes Tóth, K., Knoch, T. A., Wachsmuth, M., Stöhr, M., Frank-Stöhr, M., Bacher, C. P., Müller, G., **Rippe, K.** (2004). Trichostatin A induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J. Cell Sci.* 117, 4277-4287.

Görisch, S. M., Wachsmuth, M., Fejes Tóth, K., Lichter, P., **Rippe, K.** (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility, *J. Cell Sci.* 118, 5825-5834.

Luijsterburg, M.S., von Bornstaedt, G., Gourdin, A.M., Politi, A.Z., Mone, M.J., Warmerdam, D.O., Goedhart, J., Vermeulen, W., van Driel, R., **Höfer, T.**: Stochastic and reversible assembly of a multiprotein DNA repair complex ensures accurate target site recognition and efficient repair. *Journal of Cell Biology* 189 (3), 445-463, 2010.

Mayer, C., Neubert, M., **Grummt, I.**: The structure of NoRC-associated RNA is crucial for targeting the chromatin remodeling complex NoRC to the nucleolus. *EMBO Rep.* (2008) 9, 774-780.

Mayer, C, Schmitz, K., **Grummt, I.**, Santoro, R.: Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol. Cell* (2006) 22, 351-361.

Robinett, CC, Straight, A, Li, G, Willhelm, C, Sudlow, G, Murray, A, Belmont, AS (1996) In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol* 135, 1685-1700.

Santoro, R., Li, J., **Grummt, I.**: The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature Genetics* (2002) 32, 393-396.

Schreiber, S.L., Bernstein, B.E. (2002) Signaling network model of chromatin. *Cell*, 111, 771-778.

Sneppen, K., Micheelsen, M.A., Dodd, I.B. (2008) Ultrasensitive gene regulation by positive feedback loops in nucleosome modification. *Mol. Syst. Biol.*, 4, 182.

Verschure, PJ, van der Kraan, I, de Leeuw, W, van der Vlag, J, Carpenter, AE, Belmont, AS, van Driel, R (2005) In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. *Mol Cell Biol* 25, 4552-4564.

Wachsmuth, M., Caudron-Herger, M., **Rippe, K.** (2008). Genome organization: balancing stability and plasticity. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 2061-2079.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das vorliegende Vorhaben war Kooperationspartner des Verbundvorhabens "EpiSys - Experimentelle und theoretische Methoden für die Analyse der Dynamik epigenetischen 'Gene Silencings' in lebenden Zellen" mit insgesamt folgenden 9 Partnern:

- PD Dr. Karsten Rippe, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (Projekt-Koordinator) (Teilprojekt DKFZ-KR)
- Prof. Dr. Ingrid Grummt, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (Teilprojekt DKFZ-IG)
- Prof. Dr. Thomas Höfer, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (Projektkoordinator) (Teilprojekt DKFZ-TH)
- Prof. Dr. Roland Eils, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Teilprojekt UNI-HD-RE)
- PD Dr. Karl Rohr, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Teilprojekt UNI-HD-KaRo)
- Prof. Dr. Heinrich Leonhardt, Ludwig-Maximilian-Universität München (Teilprojekt LMU-HL)
- Prof. Dr. Gunnar Schotta, Ludwig-Maximilian-Universität München (Teilprojekt LMU-GS)
- Dr. Malte Wachsmuth, EMBL, Heidelberg, (Teilprojekt EMBL-MW)

Die Verwertung der Ergebnisse innerhalb des Konsortiums wurde über einen Kooperationsvertrag geregelt, dem alle Parteien des Verbundvorhabens rechtskräftig zugestimmt haben. In regelmäßigen Projekttreffen wurde über Fortschritte berichtet und der weitere Fortgang des Projekts diskutiert und abgestimmt (s. beigefügte Liste der Projekttreffen als Anhang). Darüber hinaus wurde auf Konferenzen ein intensiver Austausch über die Projektergebnisse mit Meinungsbildnern aus dem Feld geführt.

Ergebnisse des EpiSys-Projekts wurden u.a. auf folgenden Konferenzen dargestellt:

- Spatio-temporal dynamics challenges from fluorescence data. July 13-16, 2010, Warwick University, UK. (KR)
- Chromatin Days, Oct 7-8, 2010, Interdisciplinary Research Institute USR 3078 CNRS, Lille, France (KR)
- International Conference on Systems Biology (ICSB) 2011, Aug 28 - Sep 1, 2011 (KR und TH)
- Inselsymposium, Universität Konstanz 14-15 Juni 2012 (IG)
- Epigenetics Meeting 5.-8. Dez 2012, Freiburg (KR)
- EMBO Conference Chromatin and Epigenetics, 8-12 Mai, 2013, Heidelberg (KR und TH)
- Systems Biology of Human Disease, 12-14 Juni 2013, Heidelberg (KR)
- Keystone Symposium Long Noncoding RNA, 27 Februar-4 März, Santa Fe (IG)
- Keystone Symposium Chromatin Mechanisms and Cell Physiology, 23-28 März, Oberstdorf (TH)

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen

Teilprojekt DKFZ-KR:

AP1 Inneres Heterochromatin-Netzwerk

Meilenstein 1: Charakterisierung der Heterochromatin-Foci

Um die Struktur der Heterochromatin-Foci quantitativ zu charakterisieren, wurden mittels dreidimensionaler konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (CLSM) Bildstapel in 3 bzw. 4 Farben von DNA, HP1, Suv39h1 und H3K9-Methylierung aufgenommen. Es wurden Anzahl, Größe, DNA-Dichte und der Histon H3K9-Methylierungsstatus vermessen und die dynamischen Eigenschaften wurden in lebenden Zellen verfolgt. Dazu wurde das Chromatin mit autofluoreszierendem Histonprotein H2A-RFP markiert. Der Meilenstein 1 wurde wie geplant abgeschlossen.

Meilenstein 2: Messung von Proteinmobilität und Chromatininteraktionen

Für die Proteine HP1 α , HP1 β , HP1 γ , Suv39h1, Suv39h2, Suv4-20h1, Suv4-20h2 (zusammen mit Teilprojekt LMU-GS) und die Histon-Demethylasen Jmjd2b und Jmjd2c wurden Chromatininteraktions- und Beweglichkeitsparameter bestimmt. Aus den Analysen und Modellierungen (zusammen mit Teilprojekt DKFZ-TH) ergab sich ein indirekter Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Histonmethylierung. Diese Kopplung wurde experimentell durch zusätzliche Messung der Proteine MeCP2, MBD1 und DNMT1 charakterisiert, die an Cytosin-methylierte perizentrische Heterochromatinbereiche binden und mit den Histonmethylasen Suv39h1 bzw. Suv39h2 interagieren. Lokalisation, Mobilität und Interaktionen von MeCP2, MBD1 und DNMT1 wurden quantifiziert und in das quantitative Netzwerkmodell integriert. Diese Arbeiten wurden abgeschlossen und Ergebnisse sind in den aktuellen Arbeiten Hahn et al. 2013, Müller-Ott et al., Manuskript unter Begutachtung sowie in einer weiteren Studie (Zhang et al., Manuskript in Vorbereitung) beschrieben. Meilenstein 2 ist somit abgeschlossen.

Meilenstein 3: Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen

Die in Zusammenarbeit mit Teilprojekt LMU-HL durchgeführte Entwicklung des "Fluorescence-two/three-hybrid-system" (F2H bzw. F3H) wurde abgeschlossen und publiziert (Chung et al., 2011). Weitere Untersuchungen von HP1 α , HP1 β und HP1 γ in telomerischem und perizentromerischem Heterochromatin wurden durchgeführt. Experimente zur Interaktionsanalyse von HP1 α , HP1 β , HP1 γ , Suv4-20h1 und Suv4-20h2 mit dem F2H-Assay wurden abgeschlossen und veröffentlicht (Hahn et al., 2013).

Eine systematische Interaktionsanalyse von HP1 α , HP1 β , HP1 γ , Suv39h1, Suv39h2, Suv4-20h1, Suv4-20h2, MeCP2, MBD1 und DNMT1 mit dem F2H System und mittels Fluoreszenzkreuzkorrelations-Experiments (FCCS) wurde ebenfalls durchgeführt und abgeschlossen (Müller-Ott et. al., Manuskript unter Begutachtung).

Meilenstein 4: Perturbationen des Heterochromatin-Zustandes

Die Perturbationen erfolgten mittels Protein-*knock-out*, *-knock-down* und Überexpressions-Experimenten sowie eine *Heat shock*-Behandlung der Zellen und induziertem RNA-Abbau mittels Mikroinjektion von RNase A. Diese Arbeiten wurden zunächst für HP1 α , HP1 β , HP1 γ , Suv39h1/2 und Suv4-20h1 durchgeführt und abgeschlossen (Hahn et al. 2013; Müller-Ott et. al., Manuskript unter Begutachtung). Außerdem wurden Experimente zur Hemmung der Histondeacetylierung durch TSA und zur Hemmung der DNA-Methylierung durch 5-Deazacytidin durchgeführt (Müller-Ott et. al., Manuskript unter Begutachtung) und die Überexpression der Histon H3K9me3 Demethylase Jmjd2c beschrieben (Zhang et al., Manuskript in Vorbereitung).

AP 2 Dynamik des rDNA-spezifischen epigenetischen Gen-Silencing

Meilenstein 5: Diffusion und Bindung von ribosomalen Heterochromatin-Proteinen

Die Analyse der Mobilität von HP1 α , Suv39h1 und Jmjd2c wurden im Nucleolus durchgeführt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu anderen Chromatinbereichen mit geringer DNA-Dichte. Außerdem wurde die Lokalisierung von Heterochromatin-Proteinen und assoziierten RNAs im Nucleolus charakterisiert. Hierzu wurden Experimente mit Propidiumiodid (PI) und *Upstream Binding Factor* UBF durchgeführt, welche es erlauben, die Nucleoli in den Fluoreszenzmikroskopie-Experimenten zu identifizieren. Anschließend wurde durch unspezifischen RNaseA-Abbau für HP1 und Suv39h1 untersucht, inwieweit diese RNA-abhängig im Nucleolus lokalisiert sind. Es zeigte sich keine Anreicherung beider Proteine und nur eine schwache Abhängigkeit der Chromatinbindung von RNA. Damit wurde dieser Meilenstein abgeschlossen.

Meilenstein 6: Dynamik und Interaktionen von rDNA-spezifischen ncRNAs

Die Chromatininteraktion und Diffusion von Fluoreszenz-markierten RNAs im Nucleolus wurde mittels *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) charakterisiert. Die Resultate zeigen, dass 30% der RNA im Nucleolus immobilisiert ist. Es wurden die Kompartimente Nucleolus, Euchromatin, Heterochromatin-Foci und Cytoplasma verglichen. Außerdem wurden Lokalisierungs- und Chromatininteraktionsanalysen einer Reihe spezifischer RNA-Sequenzen durchgeführt, die in Teilprojekt DKFZ-IG identifiziert wurden. Damit wurde dieser Meilenstein abgeschlossen.

Meilenstein 7: Chromatinremodellierungs-Komplex NoRC

Mittels konfokaler Mikroskopie wurde die Lokalisation und Chromatininteraktion des NoRC-Komplexes untersucht. Dies geschah durch die Verwendung von GFP-markierten Snf2H- bzw. Tip5-Fusionsproteinen, die beide Bestandteil der NoRC-Komplexes sind. Für Snf2H wurde eine vollständige Charakterisierung durchgeführt. Zunächst geschah dies mittels FRAP und FCS (Erdel et al., 2010). Zur verbesserten Zeitauflösung wurde mit 3PEA (Pixel-wise Photobleaching Profile Evolution Analysis) eine neue Methode durchgeführt, die zum Patent angemeldet wurde (Patentanmeldung Erdel & Rippe, 2011). Die Ergebnisse wurden außerdem publiziert (Erdel et al., 2012).

AP3 Räumlich aufgelöste Fluoreszenzfluktuations-Mikroskopie zur Bestimmung von Beweglichkeiten und Interaktionen chromosomaler Proteine

Meilenstein 8: Weiterentwicklung des STFM-Instruments

Ein sensitiverer Detektor (Andor EMCCD-Kamera IXON-Plus) wurde in das STFM System integriert und durch Referenzmessungen charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Signal-Rauschverhältnis um den Faktor 3-5 deutlich verbessert hat. Dadurch konnten intrazelluläre Messungen der Proteinmobilität und -Interaktion bei deutlich niedrigeren Proteinkonzentrationen durchgeführt werden, was insbesondere für endogene GFP-markierte Proteine in niedriger Konzentration wie Suv4-20h1/h2 Konstrukte wichtig war. Die Weiterentwicklungen an der Hardware des STFM-Instruments wurden erfolgreich abgeschlossen und erlaubt eine parallele Messung an mehreren hundert Punkten gleichzeitig mit 30-50 μ s Zeitauflösung.

Meilenstein 9: Softwareentwicklung zur Berechnung, Analyse und Darstellung von STFM-Daten

Zur Beschreibung der gegenüber dem Punkt-FCS veränderten optischen Geometrie wurde eine neue theoretische Beschreibung ausgearbeitet. Dazu wurde eine verbesserte Beschreibung des Anregungs- bzw. Detektionsvolumens mit einem Doppel-Kegel („*double cone*“) entwickelt und implementiert. Das Verfahren wurde *in vitro* validiert und mit Literaturdaten bzw. mit Messungen von einem konventionellen FCS Gerät verglichen. Damit wurden Diffusions- und Interaktionsparameter aus den Fluoreszenzkorrelationskurven extrahiert. Es wurde eine neue Datenanalyse- und Visualisierungssoftware entwickelt, um die experimentellen Daten effizient für verschiedene Proteine analysieren zu können. Damit konnten auch die gegenüber Punkt-FCS deutlich erhöhten Intensitätsfluktuationsdaten von ~ 2 Gb pro 30 sec Messung effizient prozessiert werden. Die Software wurde für *in vitro*- und *in vivo*-Messungen fertiggestellt. Damit konnten Daten in lebenden Zellen aufgenommen und ausgewertet werden, ohne dass das eigentliche Signal von GFP bzw. GFP-markierter Proteine durch zusätzliche Intensitätsfluktuationen durch Chromatin- bzw.

Zellbewegungen überlagert wird. Die Arbeiten wurden erfolgreich abgeschlossen und ein Manuskript dazu ist zur Zeit in Überarbeitung (Baum et al., Nat. Comm., in Revision).

Meilenstein 10: Vergleichende Messungen mit STFM und konventionellem FCS

Es wurden vergleichende FCS-Messungen von GFP und Quantum Dots *in vitro* mit dem Zeiss LSM 710 ConfoCor 3 System und dem STFM durchgeführt. Anschließend wurden Messungen in lebenden Zellen mit GFP Monomer, Trimer und Pentamer sowie mikroinjizierten Quantum Dots durchgeführt. Wir können zeigen, dass der Anomalie-Parameter für Bewegungen von Partikeln im Zellkern durch räumliche Kreuzkorrelationsanalysen mit dem STFM bestimmt werden kann. Weitere vergleichende Messungen wurden mit HP1 bzw. der Chromodomäne von HP1 durchgeführt. In einem iterativen Zyklus wurden die Vergleichsmessungen in MS 10 erfolgreich in die Softwareentwicklung in MS 9 integriert. Wie in unserer Studie dargestellt, ergeben sich mit dem STFM System exzellente Messmöglichkeiten um Multiskalen-Mobilitätskartierungen in lebenden Zellen durchzuführen, bei denen die Messgenauigkeit mit der konventionellen Punkt-FCS Methode vergleichbar ist. Darüberhinaus ergeben sich durch die parallele Hochdurchsatzdatenaufnahme völlig neue Möglichkeiten (Baum et al. 2014, in Revision).

Teilprojekt DKFZ-IG:

AP 2 Entschlüsselung der regulatorischen Netzwerke, die die Chromatinstruktur und Transkriptionsaktivität von rRNA-Genen auf epigenetischer Ebene regulieren

Meilenstein 1: Etablierung von Zelllinien, die GFP-markierten TIP5 im Nukleolus exprimieren

Es war geplant GFP-markiertes TIP5 Protein (eine Untereinheit von NoRC) unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren CMV-Promoters zu exprimieren. Die Versuche, die zelluläre Lokalisation und Mobilität von GFP-markiertem TIP5 in Abhängigkeit von externen Signalen bzw. nach Hemmung bestimmter Chromatin-modifizierender Enzyme zu messen, waren allerdings nicht erfolgreich, da TIP5-überexprimierende Zelllinien nach einigen Passagen die Expression von TIP5 einstellen bzw. durch Apoptose eliminiert werden. Außerdem zeigte es sich, dass keine bevorzugte nukleoläre Lokalisation von überexprimiertem TIP5-Protein zu beobachten ist. Dies ist jedoch Voraussetzung für die Messung der Dynamik, Lokalisation und Interaktion von NoRC und spezifischen epigenetischen Regulatorproteinen unter normalen Bedingungen bzw. nach metabolischem oder zellulärem Stress. Wir haben daher Zelllinien etabliert, die 10-fach weniger TIP5 exprimieren. Allerdings waren auch diese Zelllinien nicht geeignet die geplanten Experimente durchzuführen, da die Menge von GFP-TIP5 zu gering war, um NoRC mittels Fluoreszenz-Fluktuations-Mikroskopie zu messen. Es wurde daher trotz intensiver Bemühungen der Meilenstein 1 nicht erreicht.

Meilenstein 2: Etablierung von TIP5-defizienten Zelllinien

Der auf shRNA basierte Vektor konnte erfolgreich hergestellt werden. Dieser Vektor ermöglicht es, TIP5 aus verschiedenen Zellen spezifisch zu depletieren. Mit Hilfe dieses spezifischen *knock-out*-Ansatzes haben wir zeigen können, dass die Funktion von NoRC nicht auf die Repression der rRNA Gene beschränkt ist, sondern dass dieser Chromatin-Remodellingkomplex auch eine wesentliche Rolle bei der Heterochromatinbildung an anderen repetitiven genomischen Loci, wie z.B. an Telomeren und Centromeren spielt. *Knock-out* von TIP5 führt zur Reduktion heterochromatischer Histonmodifikationen an Telomeren und Centromeren, was zu verzögerter Chromosomen-Segregation, genomischer Instabilität und Apoptose führt (Abb. 2). Dies ist ein hochinteressanter, biologisch wichtiger Befund, der zeigt, dass die Verpackung in Heterochromatin für die Integrität und Stabilität repetitiver Sequenzen notwendig ist. Diese Arbeiten sind 2013 in *EMBO Reports* publiziert worden (Postepska-Igielska et al., 2013).

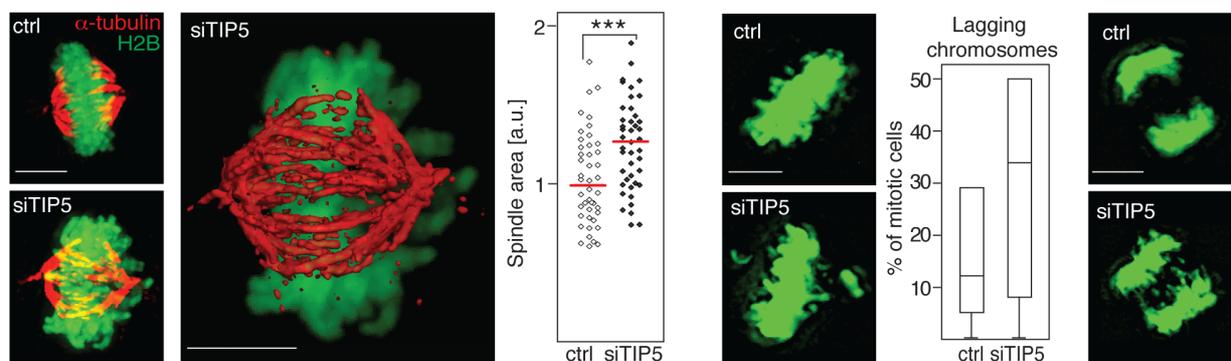


Abb. 2 Knockdown von TIP5 beeinträchtigt die Organisation des mitotischen Spindelapparates sowie die Genomstabilität.

Meilenstein 3: Messung der zellulären Lokalisation und Mobilität GFP-markierter Proteine bzw. Fluoreszenz-markierter ncRNA

Die Erfüllung dieses Meilensteins erfordert die spezifische Lokalisation von fluoreszenzmarkierter RNA und Proteinen im Nucleolus. Dies ist jedoch deutlich schwieriger als geplant, da unsere Versuche, die zelluläre Lokalisation und Mobilität von GFP-markiertem TIP5 in Abhängigkeit von externen Signalen bzw. nach Hemmung bestimmter Chromatin-modifizierender Enzyme zu messen, nicht erfolgreich waren. Nach Transfektion von fluoreszenzmarkierter pRNA war nur ein sehr geringer Teil im Nucleolus lokalisiert, somit konnten auch Proteine, die mit pRNA integrieren, nicht in den Nucleolus rekrutiert werden. Da die Konzentration der ektopischen Moleküle, die notwendig ist, um diese mikroskopisch sichtbar zu machen, meist deutlich höher ist als die der endogenen Moleküle, lokalisieren ektopische Moleküle oft anders als die endogenen. Nach vielen vergeblichen Versuchen haben wir die Probleme des spezifischen *targetings* von exogener RNA in den Nucleolus gelöst, indem wir die RNA mit ‚nucleolar targeting‘ Sequenzen (boxC/D Sequenzen) der U6 snoRNA

fusioniert haben. Die mit boxC/D fusionierten RNAs lokalisieren spezifisch im Nukleolus (Bierhoff et al. in Revision) (Abb. 3).

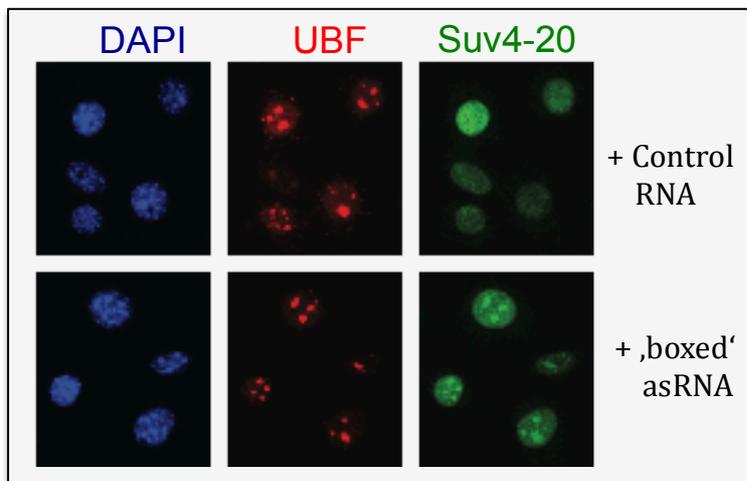


Abb. 3 Antisense RNA rekrutiert GFP-Suv4-20h2 in Nukleoli.

Immunfluoreszenz von UBF und Suv4-20h2 in Zellen, die mit Kontroll-RNA (U6 snoRNA) bzw. asRNA Sequenzen (-1/-205) fusioniert mit Box C/D von U6 snoRNA, transfiziert wurden.

In Zusammenarbeit mit dem Teilprojekt DKFZ-KR wurde die Mobilität fluoreszenzmarkierter ncRNA im Nukleolus gemessen. Darüber hinaus wurden Versuche zur veränderten Lokalisation von GFP-markierter Histondeacetylase SIRT7 nach metabolischem und hypertonischem Stress durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden erfolgreich in der Zeitschrift *Molecular Cell* publiziert (Chen et al., 2013). Darüber hinaus wurde die Mobilität von nukleolärem und nukleoplasmatischem SIRT7 mittels FRAP gemessen.

Meilenstein 4: Funktioneller ‚Cross-talk‘ von Komponenten des epigenetischen Netzwerks

Im Rahmen unserer Arbeiten zur Rolle von nicht-kodierender RNA (ncRNA) im funktionellen ‚Cross-talk‘ von Komponenten des epigenetischen Netzwerks haben wir gefunden, dass eine Fraktion von rRNA-Genen in Antisense-Orientierung transkribiert wird und diese RNA, genannt PAPAS (‘promoter and pre-rRNA antisense’), spezifisch mit der Histon-Methyltransferase Suv4-20h2 interagiert. In Wachstums-arretierten Zellen, z.B. nach Entzug von Serum oder in differenzierten Zellen ist die Konzentration von PAPAS erhöht. Erhöhte Mengen an PAPAS korrelieren mit gesteigerter Trimethylierung von Histon H4 an Lysin 20 (H4K20me3) und verstärkter Chromatin-Kompaktierung. Diese Resultate zeigen einen neuen ncRNA-abhängigen Mechanismus epigenetischer Regulation, durch den die Histon-Methyltransferase Suv4-20h2 an regulatorische Gensequenzen rekrutiert wird, was letztendlich zu Heterochromatinbildung und Repression der Transkription in Wachstums-arretierten Zellen führt. Diese wichtigen Arbeiten waren im ursprünglichen Arbeitsplan so noch nicht konzipiert. Diese Modifikation unseres Forschungsvorhabens ist nicht nur hochaktuell, sondern passt auch perfekt in die Thematik des SysTec-Partnerverbundes. Derartige Untersuchungen sind essentiell für das Verständnis der molekularen Prozesse, die Gen-Silencing bewirken und stellen die Grundlage für quantitative und dynamische Messungen von Einzelschritten des epigenetischen Netzwerkes dar, das die Chromatinstruktur und transkriptionelle Aktivität von rRNA Genen steuert. Die Arbeiten zur

Beteiligung von PAPAS bei der Rekrutierung von Suv4-20 und Kompaktierung von Chromatin führen wir in Kooperation mit der AG von Gunnar Schotta durch. Ein Manuskript, das die Ergebnisse dieser kollaborativen Arbeiten beschreibt, wurde zur Publikation bei *Molecular Cell* eingereicht und wird gegenwärtig revidiert. Obwohl uns der funktionelle ‚Cross-talk‘ von Komponenten des epigenetischen Netzwerks noch mehrere Jahre beschäftigen wird, sind die für diesen Meilenstein vorgesehenen Arbeiten weitgehend abgeschlossen (Xie et al., 2012).

Weiterhin haben wir die Interaktion von pRNA mit dem Chromatin Remodeling Komplex NoRC sowie den DNA Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a/b in RNA-Immünpräzipitations (RIP)-, Gel-Shift- und ‚pull-down‘-Experimenten untersucht und deren Effekt auf DNA Methylierung, Heterochromatin-Bildung und rDNA Transkription analysiert. Wir konnten zeigen, dass pRNA zwei funktionell unterschiedliche Domänen aufweist, die für die Ausbildung von Heterochromatin essentiell sind. Der zentrale Teil von pRNA bildet eine spezifische Sekundärstruktur aus, die von TIP5 erkannt wird und somit zur Rekrutierung von NoRC sowie von NoRC-assoziierten Chromatin-modifizierenden Enzymen (Histon-Deacetylasen bzw. Histon-Methyltransferasen) an den rRNA Promotor essentiell ist. Der 5‘-terminale Teil von pRNA interagiert mit einer regulatorischen Promotorsequenz und bildet eine triple-helikale Struktur aus, an die Methyltransferase DNMT3b spezifisch bindet und benachbarte Cytosin-Basen methyliert. Diese Untersuchungen tragen ganz wesentlich zum Verständnis der molekularen Prozesse bei, die die Chromatinstruktur modifizieren und die Genexpression auf epigenetischer Ebene regulieren.

AP4 Entwicklung von Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen und Nukleinsäuren, die an der Gen-Silencing beteiligt sind

Meilenstein 5: Synthese und funktionelle Analyse von fluoreszenzmarkierter ‚pRNA‘

Die Arbeiten zu ‚pRNA‘ sind abgeschlossen. Der Einsatz von *molecular beacons* zur Charakterisierung von Zielsequenzen regulatorischer ncRNAs erwies sich als nicht praktikabel, da alle getesteten (auch unspezifische) *hairpin*-Oligonukleotide mit einem Fluorophor an einem Ende und einem Quencher am anderen Ende bevorzugt im Nukleolus lokalisierten. Die neuen Arbeiten zur Funktion von antisense RNA konnten weitgehend abgeschlossen (Bierhoff et al., in Revision) werden. Erste genomweite *ChIP-seq*-Experimente, die Aufschluss über die Rolle von antisense RNA bei der Rekrutierung von Suv4-20 und Trimethylierung von H4K20 geben sollen, wurden erfolgreich durchgeführt und relevante Target-Gene wurden validiert.

Meilenstein 6: Visualisierung von pRNA in lebenden Zellen

Die Vorarbeiten zur Visualisierung von antisense RNA in lebenden Zellen sind erfolgreich verlaufen. Mit diesem experimentellen Ansatz haben wir begonnen, die räumliche, zeitliche und quantitative

Veränderungen von RNAs, die den epigenetischen Zustand einzelner Gene oder Genfamilien in Abhängigkeit von Zellwachstum und Differenzierung beeinflussen, nachzuweisen und zu messen. Diese Arbeiten konnten nicht abgeschlossen werden, da die Erfüllung dieses Meilensteins wegen unvorhersehbarer technischer Schwierigkeiten deutlich länger gedauert hat als ursprünglich geplant.

Meilenstein 7: Analyse der Rolle von ncRNA bei Heterochromatin-Bildung und rDNA Silencing

Wie unter Teilprojekt DKFZ-IG, MS 1 erläutert, konnten die geplanten *time lapse imaging*-, FRAP-, FCS- und CP-Experimente zur Aufklärung der Einzelschritte des epigenetischen Netzwerks nicht durchgeführt werden. Wir haben daher alternative experimentelle Ansätze gewählt, um die Funktion von ncRNA bei Heterochromatin-Bildung und rDNA Silencing aufzuklären. Wir haben ‚*gain-of-function*‘ und ‚*loss-of-function*‘ Experimente durchgeführt, d.h. wir haben die Menge spezifischer ncRNAs durch Transfektion synthetischer RNA bzw. durch *knockdown* endogener RNA moduliert und die funktionelle Konsequenz veränderter ncRNA Mengen auf Histonmodifikation, Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Enzymen und DNA Methylierung untersucht. Diese Untersuchungen haben nicht nur wesentliche Beiträge zum Verständnis der Rolle von ncRNA bei der Bildung von Heterochromatin geliefert (Bierhoff et al., 2013; Postepska-Igielska und Grummt 2013), sondern bilden die Grundlage für systembiologische Analyse und Modellierung RNA-abhängiger epigenetischer Prozesse.

Teilprojekt DKFZ-TH:

AP1: Inneres Heterochromatinnetzwerk

Meilenstein 1: Entwicklung eines stochastischen kinetischen Modells für die Induktion und Propagation von Heterochromatin

Wir haben ein stochastisches Modell für die Induktion und Propagation von Heterochromatin entwickelt, das die H3K9-Trimethylierung, die Rekrutierung der Methyltransferasen SUV39h1/2 und von HP1, Demethylierung, und Chromatinlooping beschreibt. Ein wichtige Vorhersage ist, dass Heterochromatin nicht durch bistabile Dynamik sondern durch spezielle Initiationsnuklei mit starker SUV39h1/2-Bindung aufrecht erhalten wird. Das Modell sagt u.a. richtig die Domänengröße von H3K9me3-Bereichen vorher. Dieses Modell ist in einem gemeinsam mit der Rippe-Gruppe erstellten und eingereichten Manuskript gemeinsam mit experimentellen Daten dargestellt (s. Abschnitt II.6, Müller-Ott et al., 2014). Der Meilenstein ist abgeschlossen.

Meilenstein 2: Erweiterung des Netzwerkes durch Einbeziehung synergistischer und antagonistischer Wechselwirkungen

Aufbauend auf den Ergebnissen von Meilenstein 1 wurde ein komplexeres Modell entwickelt, das weitere Modifikationen (H3K9ac, H3K14ac, H3K10phos) und die sie katalysierenden Enzyme

einbezieht. Das Modell beschreibt die Zellzyklusabhängigkeit der Histonmodifikationen (Anna Matveeva PhD thesis: Pericentric heterochromatin in mouse fibroblasts: Specificity, propagation and memory. Heidelberg 2014). Der Meilenstein ist abgeschlossen.

Meilenstein 3: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Histonmodifikationen, Proteinrekrutierung und Strukturierung der Chromatinfaser

Um das Chromatinlooping quantitativ zu beschreiben, wurden experimentelle Daten dazu modelliert und mit den Modellen aus Meilenstein 1 und 2 kombiniert. Das Modell macht überprüfbare Vorhersagen über die Dichte von Initiationsnuklei für die heterochromatische H3K9-Trimethylierung (s. Abschnitt 6, Müller-Ott et al., 2014). Der Meilenstein ist abgeschlossen.

Meilenstein 4: Experimentelle Überprüfung und iterative Verbesserung des Modells des HP1-Interaktionsnetzwerkes

Eine zentrale Vorhersage des entwickelten Modells für die Aufrechterhaltung von Heterochromatin ist die Abwesenheit bistabiler Dynamik. Das Modell steht damit im Widerspruch zu in einem früheren Modell, das für die Vererbung von Chromatinzuständen postuliert wurde (Dodd et al., 2007). Wir haben die Modellvorhersage mit einem Hysterese-Experiment direkt getestet. Dazu wurden monoklonale Fibroblastenlinien mit stabiler ektopischer Expression der H3K9me3-Demethylase Jmjd2 etabliert, deren Expression durch einen Doxocyclin-regulierten Promotor gesteuert werden kann. Eine Zunahme der Jmjd2-Aktivität führt zum Verschwinden der heterochromatischen H3K9me3. In einem bistabilen System (Modell von Dodd et al., 2007) würde die anschließende Reduktion der Jmjd2-Aktivität *nicht* zur Reetablierung des H3K9-trimethylierten Ausgangszustandes führen (Abb. 4A). In einem monostabilen System würde der Ausgangszustand wieder hergestellt (unser Modell). Wir haben die DNA- und H3K9me3-Dichte in Heterochromatinfoci in aufwendigen Experimenten mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie gemessen und in Zusammenarbeit mit der AG Rohr quantifiziert (Abb. 4B). Dabei zeigte das System keine Hysterese (Abb. 4C); das bistabile Modell kann damit für die Aufrechterhaltung der H3K9-Trimethylierung ausgeschlossen werden. Der Meilenstein ist abgeschlossen und die Ergebnisse werden zur Publikation eingereicht (Zhang et al., Manuskript).

AP 2: Entschlüsselung der regulatorischen Netzwerke, die die Chromatinstruktur und Transkriptionsaktivität von rRNA-Genen auf epigenetischer Ebene regulieren

Meilenstein 1: Erstellen eines Netzwerkmodells der epigenetischen Regulation der ribosomalen RNA-Gene

Wir haben ein mathematisches Modell der rRNA-Transkription entwickelt, das die epigenetische Regulation einbezieht. Der Meilenstein ist abgeschlossen.

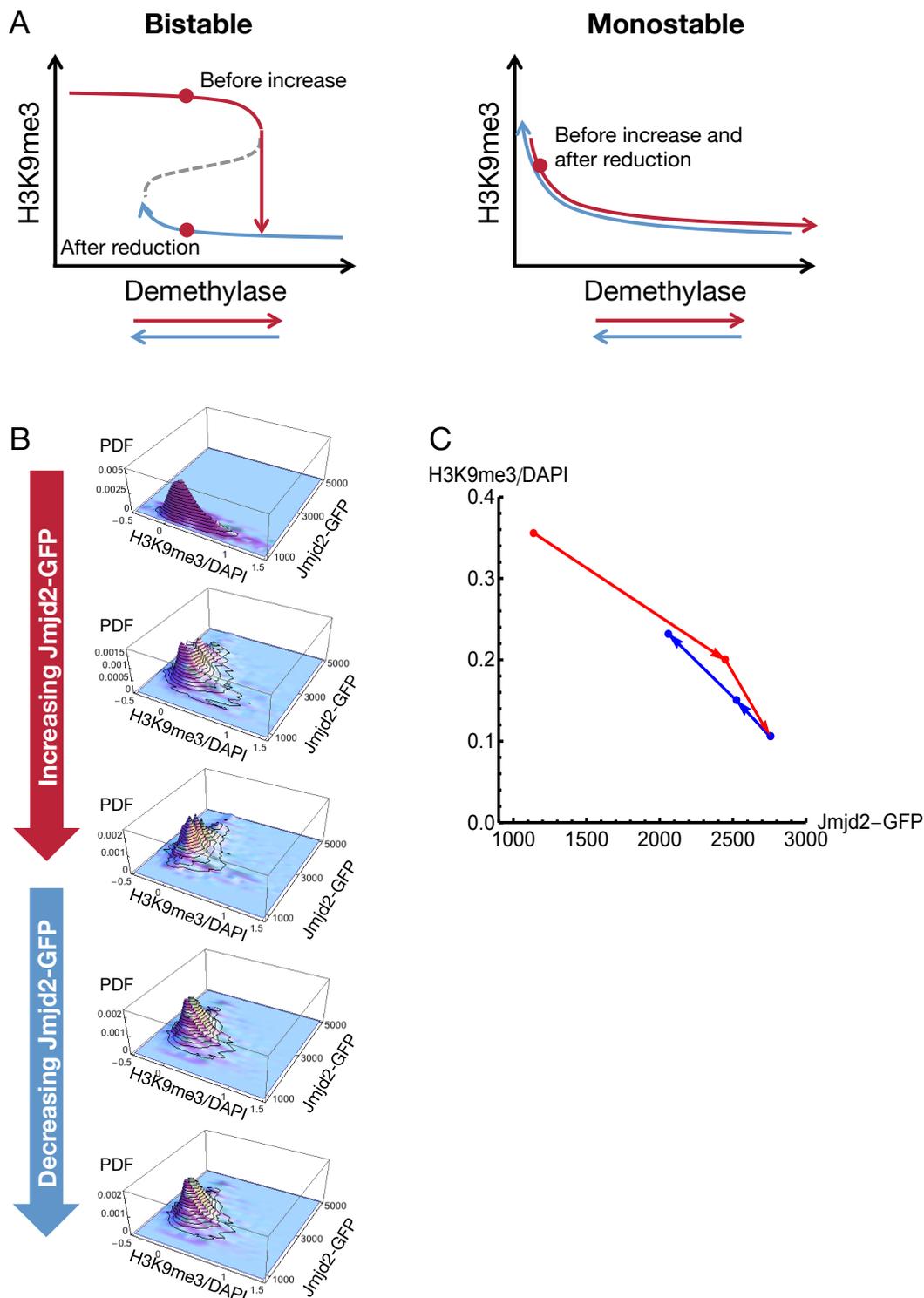


Abbildung 4: Die H3K9-Trimethylierung in Heterochromatinfoci ist monostabil. (A) Vorhersagen der mathematischen Modelle von Dodd et al. (2007) – links, bistabil – und unseres Modells (Müller-Ott et al., eingereicht) – rechte Seite, monostabil. (B) Ergebnis der dreidimensionalen Rekonstruktion der Heterochromatinfoci durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie und automatische Bildanalyse. (C) Dosis-Wirkungsdiagramm zu den Daten in (B). Es existiert keine Hysterese und damit keine Bistabilität.

Meilenstein 2: Kinetisches Modell der NoRC-abhängigen Histonmodifikationen und DNA-Methylierung

Wir konnten zeigen, dass transkriptionelles Bursting auf natürliche Weise durch reversible Histonmodifikationen erklärt werden kann. Zur Abschätzung kinetischer Parameter aus experimentellen Messungen haben wir die numerische Lösung von Reaktions- Diffusionsgleichungen und die Bestimmung von Parametern und Konfidenzintervallen implementiert und erfolgreich an HP1-Daten (AG Rippe) angewendet (Tim Heinemann, MSc-Arbeit: Numerical Fitting of FRAP-Measurements using Reaction-Diffusion Modelling) und publiziert (Luijsterburg et al., 2010; Weiterentwicklung zur effizienteren Parameterschätzung in Verbruggen et al., 2014). Der Meilenstein ist abgeschlossen.

Meilenstein 3: Experimentelle Überprüfung und iterative Verbesserung des Modells für NoRC-abhängiges rRNA-Gensilencing

Im Verlauf unserer Modellierungsarbeiten ergaben sich wiederholt experimentell bisher noch nicht geklärte Fragen über detaillierte molekulare Mechanismen der epigenetischen Regulation. Insbesondere sind Ursache-Wirkungs-Relationen bei verschiedenen Modifikationstypen (Histonmodifikationen, Nukleosomen-Repositionierung und DNA-Methylierung) nicht vollständig aufgeklärt. Wir haben uns daher entschieden, das in MS 1 und 2 entwickelte mathematische Modell auf prinzipielle Prozesse zu vereinfachen, in dem (unabhängig von den zugrundeliegenden detaillierten Mechanismen) aktivierbare, aktive, refraktäre und epigenetisch inhibierte Genzustände unterschieden werden. Dieses vereinfachte Modell wurde an gemessene Zeitreihen der Genaktivität angepasst und kann diese quantitativ beschreiben. An diese Untersuchungen schließen sich außerhalb des vorliegenden Projektes neue Arbeiten an, bei denen Methoden der synthetischen Biologie (Lichtsteuerung von Transkriptionsfaktoren) benutzt werden, um weitere Modellvorhersagen experimentell zu überprüfen. Der Meilenstein ist abgeschlossen.

AP 6: Modellierungsmethoden für die kombinatorische Komplexität epigenetischer Netzwerke

Meilenstein 1: Umfassendes Netzwerkmodell der Histonmodifikationen und Proteininteraktionen

Ein strukturelles Netzwerkmodell für die wichtigsten Histonmodifikationen (H3K9m1/2/3, H3K9ac, H3S10phos, H3K14ac, H3K4me1/2/3 und H4K20me1/2/3) und Proteine (HP1, SUV3-9h1/2, SUV4-20, Jmj-Demethylasen) wurde entwickelt. Es bildete die Grundlage für die kinetische Modellierung in AP1. Der Meilenstein ist abgeschlossen.

Meilenstein 2: Strukturelle Analyse der Netzwerkmodelle

Unsere strukturellen Analysen haben gezeigt, dass das HC-Netzwerk als grundlegende Regulationsmotive eine positive Rückkopplungsschleife (H3K9-Methylierung) und ein Mutual-

Inhibition-Motiv (zwischen Methylierung und Azetylierung) enthält. Der Meilenstein ist abgeschlossen.

Meilenstein 3: Methoden zur Komplexitätsreduktion und Charakterisierung kinetischer Modelle

Durch eine Mean-Field-Näherung konnten wir das in AP1 dargestellte Modell so vereinfachen, dass es einer analytischen Behandlung zugänglich wurde. Diese zeigt, dass kooperative Effekte erforderlich sind, damit die identifizierten positiven Rückkopplungsschleifen und das Mutual-Inhibition-Motiv zu einer selbstorganisierten bistabilen Dynamik und Heterochromatinpropagation führen. Ein plausibler Mechanismus für kooperative positive Rückkopplung wird durch die Dimerisierung von HP1 bereitgestellt, die in das Modell einbezogen wurde. Der Meilenstein ist abgeschlossen. Die im Meilenstein entwickelten Methoden wurden in Verbruggen et al. (2014) angewendet.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personal: Im Rahmen des Projektes wurden folgende Stellen bewilligt:

| | | |
|----------------------|------------------|------------------|
| Teilprojekt DKFZ-KR: | 3x Doktorand | (E13/2, 3 Jahre) |
| Teilprojekt DKFZ-IG | 1x Postdoktorand | (E13, 3 Jahre) |
| Teilprojekt DKFZ-TH: | 1x Postdoktorand | (E13, 3 Jahre) |
| | 1x Doktorand | (E13/2, 3 Jahre) |

Die Besetzung der bewilligten Personalstellen und eventuelle Abweichungen gegenüber der ursprünglichen Planung wurden unter I. 2. (Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde) bereits detaillierter ausgeführt. Bedingt durch die Verzögerungen in der Stellenbesetzung verzögerte sich auch der Fortschritt der Arbeiten. Dem konnte durch die 12-monatige kostenneutrale Verlängerung des Projektes begegnet werden.

Verbrauchsmaterial: Neben modellierenden Arbeiten wurden auch Validierungsexperimente durchgeführt, bei denen der Hauptanteil an Sachkosten für Zellkulturarbeiten, Westernblot, Immunfluoreszenz, Fluoreszenzmikroskopie sowie qPCR-Bedarf entstand. Im Teilprojekt DKFZ-KR wurde eine Mittelumwidmung aus der Position Kosten innerbetrieblicher Leistungen in Material beantragt und vom PTJ am 19.08.2013 genehmigt. Diese Umwidmung resultierte aus dem erhöhten Bedarf an Verbrauchsmitteln und genomweiten Sequenzierungen, um die Fluoreszenzmikroskopie-Analysen zentraler Proteine des epigenetischen Netzwerkes (HP1alpha, HP1beta, HP1gamma, Suv39h1, Suv39h2) sowie der Histonmodifikationen H3K9me3 und H4K20me3 durch genomweite Sequenzierungen zu kartieren. Dies war für die Arbeiten in AP1 und AP3 essentiell, um Vorhersagen aus der Modellierung zu validieren.

Reisemittel:

Die Dienstreisen wurden zum überwiegenden Teil aus alternativen Mitteln finanziert (s. Abschnitt I.5), da die besuchte Konferenzen im Vergleich zu den ursprünglich geplanten modifiziert wurden. Weiterhin hatte sich für die Arbeitsbesuche als zweckmäßig herausgestellt, dass die Münchner Projektpartner Heidelberg besuchten.

Vergabe von Aufträgen:

Das Teilprojekt DKFZ-KR hat die bewilligten FE-Fremdleistungen wie geplant für Sequenzierungen abgerufen. Diese wurden für Arbeiten in AP1 bei den Meilensteinen 1-4 (KR und TH) benötigt und sind in die Studie Müller-Ott et al. eingegangen, die zur Zeit noch unter Begutachtung ist.

Investitionen:

Im Rahmen des Projektes wurde im Teilprojekt DKFZ-TH wie geplant ein bewilligtes Macbook angeschafft, das zweckgebunden, d.h. für flexible mobile Modellierungsarbeiten eingesetzt wurde.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die molekularen Mechanismen, die eine spezifische Chromatinstruktur etablieren und somit die Genexpression auf der epigenetischen Ebene regulieren, waren zum Zeitpunkt der Antragstellung nur unzureichend verstanden. Das hier beschriebene Projekt EpiSys stellt daher ein in der deutschen und auch europäischen Förderlandschaft einzigartiges interdisziplinäres Projekt dar, das signifikant zum quantitativen Verständnis von epigenetischen Gen-Silencing-Netzwerken in lebenden Zellen beigetragen hat. Die ehrgeizigen Ziele des Verbundes wurden erreicht durch die synergistische Entwicklung und Anwendung von Fluoreszenzmikroskopie-assoziierten biophysikalischen Techniken und den innovativen Einsatz von fluoreszenten Markern zur Visualisierung der Interaktion von Proteinen und Nukleinsäuren. Die Kombination dieser Techniken mit mathematischer Modellierung und Bildanalyse erlaubte schließlich einen integrativen Ansatz zur Aufklärung von molekularen epigenetischen Mechanismen in Verbindung mit zellulären Funktionen. Nur ein interdisziplinärer Projektverbund bestehend aus Molekularbiologen, Biochemikern, Biophysikern und Mathematikern konnte die komplexe Fragestellung des vorliegenden Projektes umfassend bearbeiten. Die hier vorgestellte Entwicklung von neuen und anspruchsvollen Techniken und die interdisziplinäre Ausrichtung des Vorhabens wären allein im Rahmen von individuell geförderten Forschungsprogrammen nicht realisierbar gewesen. Mit Hilfe des dargestellten integrativen systembiologischen Ansatzes konnten nicht nur allgemein anwendbare neue Methoden und Modelle zur Aufklärung regulatorischer Netzwerke bereitgestellt werden, sondern auch grundlegende Einsichten in die dynamische Organisation von Chromatin und das Verhältnis dieser zur Genexpression gewonnen werden.

Die bewilligten öffentlichen Mittel wurden projektbezogen für die Etablierung neuer Techniken, die kommerzielle Verwertung der generierten Ergebnisse und für deren internationale Sichtbarmachung durch Publikationen und Präsentationen auf Konferenzen angemessen eingesetzt.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Der integrative Ansatz von EpiSys hat zur Entwicklung neuer Methoden und wissenschaftlicher Einsichten in die Dynamik epigenetischer Netzwerke beigetragen. Entsprechend dem Verwertungsplan wurden kommerziell interessante Entwicklungen bezüglich ihrer Patentierung hin geprüft. Das Teilprojekt DKFZ-KR hat im November 2011 die Messung von Proteinmobilität und Interaktion in lebenden Zellen anhand einer neuen FRAP-basierten Methode (3PEA) zum Patent angemeldet. Das Patent umfasst Verfahren, System und Softwareprogramm zur Bestimmung der Mobilität von fluoreszierenden Partikeln.* Neben diesem methodischen Fortschritt wurden die wissenschaftlichen Erkenntnisse des vorliegenden Projektes mittels zahlreicher Publikationen in renommierten Fachzeitschriften (siehe Absatz 6) veröffentlicht. Zu Veröffentlichungen die sich momentan noch in Vorbereitung befinden, werden wir mit der Stabsstelle Technologietransfer am DKFZ Rücksprache halten, um schutzwürdige Ergebnisse zu identifizieren und ggf. zur Patentierung anzumelden. Die Ergebnisse aus der quantitativen Beschreibung epigenetischer Netzwerke in lebenden Zellen können Impulse für die Identifizierung neuer therapeutischer Angriffspunkte epigenetisch wirkender Medikamente liefern.

* Erdel, F. & Rippe, K. (2011) "A method, system and computer program product for determining the mobility of fluorescent particles", European patent application 11188202.3.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es sind keine Ergebnisse von Dritten bekannt geworden, die Einfluss auf die Durchführung des Vorhabens haben.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Aus dem Projekt resultierten folgende Publikationen:

Baum M., Wachsmuth M., Erdel F. and Rippe K. (2013). Mapping the intracellular structure from a diffusing protein's point of view. *Nature Communications*, under revision

Bierhoff, H., Dammert, M., Brocks, D., Dambacher, S., Schotta, G., **Grummt, I.** Regulatory RNA triggers formation of non-canonical heterochromatin in growth-arrested cells. *Mol. Cell*, in revision

Bierhoff, H., Postepska-Igielska, A., **Grummt, I.** (2014) Noisy Silence: Noncoding RNA and heterochromatin formation at repetitive elements. *Epigenetics*, doi 10.4161/epi.26485

Bierhoff, H., Schmitz, K.-M., Maaß, F., Ye, J., **Grummt, I.** (2011) Noncoding RNA in sense and antisense orientation regulate the epigenetic state of ribosomal RNA genes. *Cold Spring Harbor Laboratory Press Vol. LXXV*, 357-364.

Chen, S., Santiago-Reichert, M., Seiler, J., Felbel, K., **Grummt, I.**, Voit, R. (2013) Repression of RNA polymerase I transcription upon stress is caused by inhibition of RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. *Mol. Cell*, 52, 303-313.

Chung, I., Leonhardt, H. & **Rippe, K.** (2011). De novo assembly of a PML nuclear subcompartment occurs through multiple pathways and induces telomere elongation. *J. Cell Sci.* 124, 3603-3618.

Diermeier, S., Németh, A., Rehli, M., **Grummt, I.**, Längst, G. (2013) Homotypic clustering of binding sites is a prerequisite for chromatin specific high affinity binding, enhancer function and activation timing. *PLoS Genetics*, Sept 9 (9), doi 10.1371.

Eck, S., **Rohr, K.**, Biesdorf, A., Müller-Ott, K., **Rippe, K.** & Wörz, S. (2013). A 3D intensity model based on spherical harmonics for automatic 3D segmentation of heterochromatin foci. *Proc. IEEE Internat. Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro (ISBI 2013)*, 1484-1487.

Eck, S., **Rohr, K.**, Müller-Ott, K., **Rippe, K.** & Wörz, S. (2012). Combined model-based and region-adaptive 3D segmentation and 3D co-localization analysis of heterochromatin foci. In *Bildverarbeitung für die Medizin 2012*. Tolxdorff, T., Deserno, T. M., Handels, H. & Meinzer, H.-P., eds., Springer Berlin Heidelberg, 9-14.

Erdel, F. & **Rippe, K.** (2011) "A method, system and computer program product for determining the mobility of fluorescent particles", European patent application 11188202.3.

Erdel, F. & **Rippe, K.** (2012). Quantifying transient binding of ISWI chromatin remodelers in living cells by pixel-wise photobleaching profile evolution analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E3221-E3230.

Erdel, F. & **Rippe, K.** Technology offer „Measurement of protein mobility and interactions in living cells by 3PEA“, DKFZ Office of Technology Transfer, January 2012.

Erdel, F., Müller-Ott, K. P., Baum, M., Wachsmuth, M. & **Rippe, K.** (2011). Dissecting chromatin interactions in living cells from protein mobility maps. *Chromosome Res.* 19, 99-115.

Erdel, F., Schubert, T., Marth, C., Längst, G. & **Rippe, K.** (2010). Human ISWI chromatin-remodeling complexes sample nucleosomes via transient binding reactions and become immobilized at active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 19873-19878.

Grummt, I. and Längst, G. (2013) Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 393-404.

Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A. Y., Eck, S., Wörz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J.-P., Maiser, A., Debs, P., von Melchner, H., **Leonhardt, H.**, Schermelleh, L., Rohr, K., **Rippe, K.**, Storchova, Z. & **Schotta, G.** (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev.* 27, 859-872.

Luijsterburg, M.S., von Bornstaedt, G., Gourdin, A.M., Politi, A.Z., Moné, M.J., Warmerdam, D.O., Goedhart, J., Vermeulen, W., van Driel, R. and **Höfer, T.** (2010) Stochastic and reversible assembly of a multiprotein DNA repair complex ensures accurate target site recognition and efficient repair. *J. Cell Biol.* 189, 445-463 (See also Commentary in *J. Cell Biol.* 189, 388 "Unfaithful proteins no problem for DNA repair").

Müller-Ott, K., Erdel, F., Matveeva, A., Mallm, J. P., Rademacher A., Hahn, M., Marth, C., Zhang, Q., Kaltofen, S., Schotta, G., **Höfer, T.** & **Rippe, K.** Specificity, propagation and epigenetic memory of pericentric heterochromatin in mouse fibroblasts, submitted

Müller, K. P., Erdel, F., Caudron, M., Marth, C., Fodor, B. D., Richter, M., Scaranaro, M., Beoudoin, J., Wachsmuth, M. & **Rippe, K.** (2009). A multi-scale analysis of dynamics and interactions of heterochromatin protein 1 in the nucleus by fluorescence fluctuation microscopy. *Biophys. J.* 97, 2876-2885.

Postepska-Igielska, A., **Grummt, I.** (2014). NoRC silences rRNA genes, telomeres and centromeres. *Cell Cycle*, in press

Postepska-Igielska, A., Kronic, D., Schmitt, N., Greulich-Bode, K., Boukamp, P., **Grummt, I.** (2013) The chromatin remodeling complex NoRC safeguards genomic stability by heterochromatin formation at telomeres and centromeres. *EMBO reports* 14, 704-710.

Verbruggen P,# Heinemann T,# Manders E, von Bornstaedt G, van Driel R* and **Höfer T*** (2014) Robustness of DNA repair through collective rate control. *PLoS Computational Biology* 10:e1003438. (#equal contribution, *joint corresponding authors)

Xie, W., Ling, T., Zhou, Y., Feng, W., Zhu, Q., Stunnenberg, H.G., **Grummt, I.** and Tao, W. (2012). The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 8161-8166.

Zhang, Q., Eck, S., Müller-Ott, K., Matveeva, A., Wörz, S., Claudino, N., **Rohr, K., Rippe, K., Höfer, T.** Heterochromatic histone methylation is reversible without memory. Manuscript.

Anhang:Liste der Projekttreffen:

- 16. 11. 2009 EpiSys Kick-Off meeting (BioQuant, Heidelberg)
- 03. 05. 2010 EpiSys progress meeting (BioQuant, Heidelberg)
- 28. 02. 2011 EpiSys progress meeting (BioQuant, Heidelberg)
- 28. 02. 2012 EpiSys progress meeting (BioQuant, Heidelberg)
- 16. 05. 2013 EpiSys progress meeting (BioQuant, Heidelberg)