



# Spurlose Synthese von asymmetrisch modifizierten, bivalenten Nukleosomen

Carolin C. Lechner, Ninad D. Agashe und Beat Fierz\*

**Abstract:** Kombinationen verschiedener posttranslati onaler Modifikationen (PTMs) von Histon-Proteinen haben einen direkten Einfluss auf die epigenetische Genregulation. Obwohl Histone paarweise in Nukleosomen vorliegen, sind die individuellen Histonvarianten nicht zwangsläufig gleich modifiziert, sondern weisen oftmals unterschiedliche PTMs auf (sie sind „asymmetrisch“). Insbesondere in embryonalen Stammzellen (ESCs) existiert eine „bivalente“ Chromatinsignatur, gekennzeichnet durch die Koexistenz von H3, entweder trimethyliert an Lysin 4 (H3K4me3) oder 27 (H3K27me3) im gleichen Nukleosom. Wir beschreiben hier ein generell anwendbares und modulares Verfahren zur Herstellung von asymmetrisch modifizierten Nukleosomen. Mittels dieser Methode können wir darlegen, dass die H3K27-spezifische Lysin-Methyltransferase (KMT) Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) in bivalenten Nukleosomen durch H3K4me3 inhibiert wird, allerdings nur solange sich die PTM auf demselben H3-Molekül befindet. Im Gegensatz dazu stimuliert die Anwesenheit von H3K27me3 die Aktivität von PRC2 über das gesamte Nukleosom, und hebt den hemmenden Effekt von H3K4me3 auf. Um in ESCs eine bivalente Chromatinsignatur zu erhalten, muss folglich die Aktivität von PRC2 entweder lokal eingeschränkt oder gar aktiv rückgängig gemacht werden.

Die Grundeinheit von Chromatin, das Nukleosom, besteht aus je zwei Kopien der Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4, welche von einem 147 Basenpaare langen Fragment DNA umwickelt sind. Histone unterliegen einer Vielzahl von PTMs, die eine direkte Rolle in der Regulation von Chromatin-basierten Prozessen und epigenetischer Signalübertragung spielen.<sup>[1]</sup> Nukleosomen bestehen aus zwei pseudosymmetrischen Hälften mit je einer Kopie pro Histon.<sup>[2]</sup> Die individuellen Proteine eines Histonpaares innerhalb eines Nukleosoms können unterschiedlich modifiziert sein. Dadurch ergibt sich eine von der PTM-Verteilung abhängige Asymmetrie. Tatsächlich wurden asymmetrisch modifizierte Nukleosomen mittels Massenspektrometrie<sup>[3]</sup> sowie durch genomweite Kartierung in verschiedenen Zellarten identifiziert.<sup>[4]</sup>

In ESCs konnte eine asymmetrische Chromatinsignatur mit einer biologischen Funktion in Verbindung gebracht werden. Zwei PTMs, H3K4me3 und H3K27me3, die mit Transkriptionsaktivierung bzw. -repression einhergehen, werden von unterschiedlichen KMTs übertragen: Die Familie der mixed-lineage leukemia (MLL) KMTs ist spezifisch für H3K4. PRC2 dagegen ist verantwortlich für die Methylierung von H3K27.<sup>[5]</sup> Aufgrund ihrer antagonistischen Funktionen finden sich die zwei PTMs vornehmlich in unterschiedlichen Bereichen des Genoms.<sup>[6]</sup> Tatsächlich können diese zwei PTMs aber sowohl in ESCs als auch in einigen Krebszellen gleichzeitig auftreten, vorzugsweise in spezifischen Promotoren. Solche Regionen werden „bivalente“ Domänen genannt.<sup>[3,7]</sup> Interessanterweise wurde zudem gezeigt, dass bivalente Nukleosomen asymmetrisch in Bezug auf H3K4me3 und H3K27me3 sind (*trans*-bivalent).<sup>[3]</sup> Wie diese asymmetrische Chromatinsignatur entsteht und aufrechterhalten wird, ist derzeit noch unklar. Eine vertiefte Analyse der beteiligten KMTs sollte jedoch aufschlussreiche Einblicke in diese Prozesse geben.

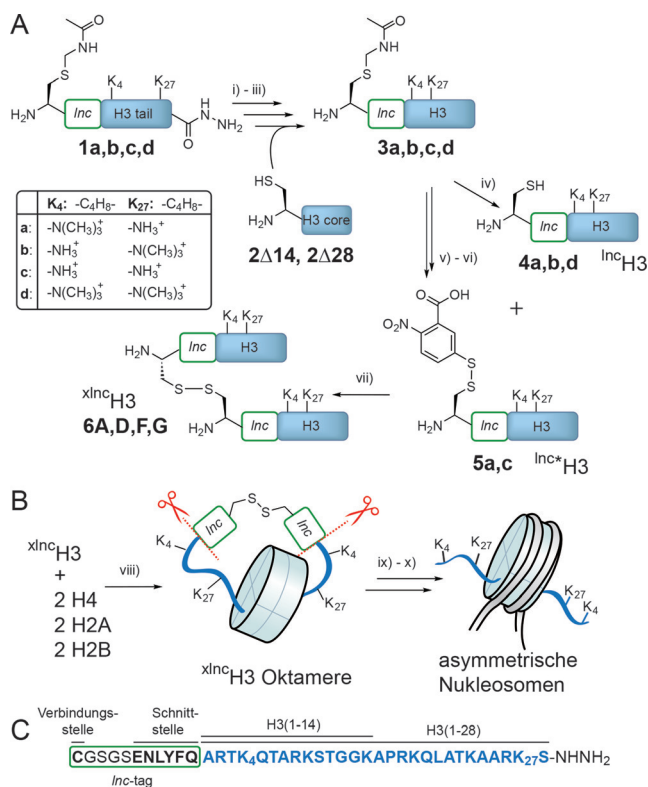
Zur Erforschung der biochemischen Funktionen von asymmetrischem Chromatin sind chemisch exakt definierte Nukleosomen notwendig. Bisherige Methoden, um asymmetrische PTMs in Nukleosomen einzubringen, basieren auf einer statistischen Rekonstitution von Histonoktameren, ausgehend von einem Histongemisch. Anschließend werden die gewünschten asymmetrischen Oktamere mittels sequenziellen Affinitätsreinigungen mithilfe von orthogonalen Peptid-tags angereichert.<sup>[3,8]</sup> Aufgrund der inhärent schwierigen Präparation wurden auf diesem Wege bisher nur Nukleosomen hergestellt, welche ein einzelnes modifiziertes Histon enthielten. Außerdem können verbleibende Peptidsequenzen, die für die Affinitätsreinigung verwendet wurden, biologische Tests verfälschen. Dennoch wurde mit derartig hergestellten Nukleosomen gezeigt, dass die enzymatische Aktivität von PRC2 durch Methylierung an H3K4 inhibiert wird.<sup>[3]</sup> Umgekehrt stimuliert bereits bestehendes H3K27me3 die PRC2-Aktivität.<sup>[3,9]</sup>

Für weiterführende Untersuchungen zu bivalentem Chromatin sind jedoch neue Methoden notwendig, welche einerseits keine unnatürlichen Peptidsequenzen oder andere Spuren zurücklassen und es andererseits ermöglichen, direkt die supramolekulare Zusammensetzung von Nukleosomen zu kontrollieren. Wir beschreiben hier ein spurloses und modulares Verfahren zur Synthese chemisch reiner, beliebig modifizierter, asymmetrischer Nukleosomen. Mittels einer Reihe von Nukleosomen, hergestellt durch unser neues Verfahren, untersuchten wir sodann die Aktivität von PRC2 abhängig vom Chromatinstatus, und zogen Rückschlüsse auf die Entstehung und Aufrechterhaltung von bivalentem Chromatin.

[\*] Dr. C. C. Lechner, N. D. Agashe, Dr. B. Fierz  
Laboratory of Biophysical Chemistry of Macromolecules, Institute of Chemical Sciences and Engineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL)  
1015 Lausanne (Schweiz)  
E-Mail: beat.fierz@epfl.ch

Hintergrundinformationen und ORCID IDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201510996> zu finden.

Wir setzten uns zum Ziel, eine Strategie zu entwickeln, um zwei verschiedentlich modifizierte H3-Proteine vorübergehend über eine kovalente Bindung zu verknüpfen. Dadurch kann ihr Einbau in dasselbe Histonoktamer und nachfolgend in ein asymmetrisches Nukleosom erzwungen werden. Zudem sollten alle chemischen Gruppen, die zur Querverbindung benötigt wurden, wieder entfernbare sein, um eine spurlose Synthese zu gewährleisten (Schema 1 A,B). Auf-



**Schema 1.** Rückstandslose chemische Synthese von asymmetrisch modifizierten Nukleosomen. A) Generelle Syntheseroute zur Herstellung asymmetrisch modifizierter <sup>x</sup>IncH3 Dimere. i) Überführung des Inc-Peptid-Hydrazids in einen TFET-Thioester; ii) Ligation des Inc-Peptid-Thioesters mit einem C-terminalen H3-Proteinfragment; iii) In-situ-Entschwefelung; iv) Entfernung der AcM-Schutzgruppe am N-terminalen Cystein oder v) + vi) AcM-Entschützung und In-situ-Modifikation des Cysteins mit DTNB; vii) Herstellung eines Heterodisulfids. B) viii) Rückfaltung von Histonoktamern unter Verwendung von <sup>x</sup>IncH3-Dimeren; ix) Rekonstitution von Nukleosomen und Auflösung des <sup>x</sup>Inc; x) Proteolytische Abspaltung des Inc-tags von Nukleosomen mittels TEV-Protease. C) Konzept des Inc-tags für die chemische Synthese kovalent verknüpfbarer H3-Proteine.

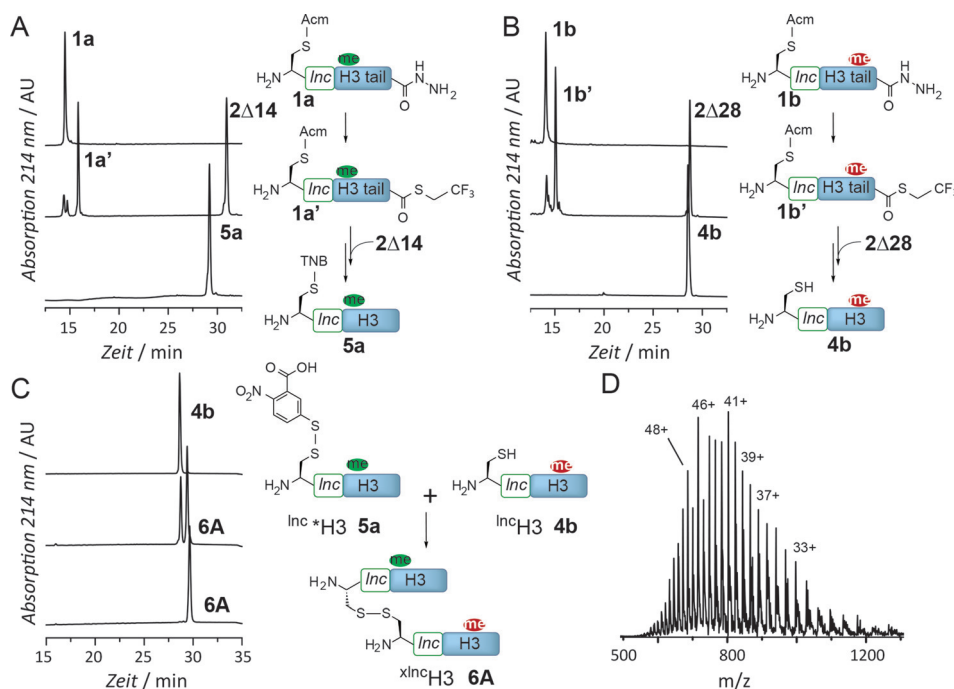
grund dieser Überlegungen konzipierten wir eine Peptidsequenz, den „link and cut“-tag (Inc-tag), welche neben einem Cystein für die Querverbindung eine Erkennungssequenz für die Tabakmosaikvirus (TEV)-Protease enthält (Schema 1 C). H3, welches sowohl den Inc-tag, dessen Cystein geschützt vorliegt, als auch die gewünschten PTMs enthält, wird sodann mittels exprimierter Proteinligation (EPL) und anschließender Entschwefelung hergestellt.<sup>[10]</sup> Nachfolgend werden einerseits die Cysteine geschützt (<sup>Inc</sup>H3) und andererseits der Inc-tag aktiviert (<sup>Inc\*</sup>H3), letzteres allerdings nur in einem Teil der H3-Proteine. Dies ermöglicht ein kombinatorisches Zu-

sammenfügen zu Heterodisulfiden, die für die Herstellung von Histonoktamern verwendet werden. Nach finaler Inkorporation in asymmetrische Nukleosomen wird der Inc-tag proteolytisch abgespalten, um jegliche Spuren der vorangegangenen Synthese zu beseitigen.

Wir begannen nun mit der Synthese von Peptiden, welche dem N-terminalen Ende von H3 entsprachen, und sowohl den Inc-tag, PTMs als auch ein C-terminales Hydrazid<sup>[11]</sup> beinhalteten (**1a-d**). Peptide mit C-terminalen Hydrazid können in situ durch Oxidation mit Natriumnitrit und anschließende Thiolzugabe in Thioester überführt werden.<sup>[12]</sup> Um das entscheidende Cystein im Inc-tag während der Entschwefelung zu schützen, verwendeten wir die S-Acetamidomethyl(AcM)-Schutzgruppe. Folglich synthetisierten wir Cys(AcM)-Inc-H3(1-14)K4me3 (**1a**) an einem Hydrazin-Harz (Abbildung 1 A). Für die Synthese von Cys(AcM)-Inc-H3K4me3 (**3a**) entschlossen wir uns für ein Eintopfverfahren für Ligation und Entschwefelung.<sup>[13]</sup> Daher wurde das Peptid-Hydrazid zunächst in denaturierendem Puffer mittels Trifluorethanthiol (TFET) in einen Thioester (**1a'**) umgewandelt. Die Ligation wurde durch die Zugabe des C-terminalen H3-Fragments H3(Δ1-14), welches weiterhin ein N-terminales Cystein sowie die üblicherweise verwendete C110A-Mutation enthielt (**2Δ14**), eingeleitet und lief innerhalb von 3 Stunden bei Raumtemperatur vollständig ab. Nach anschließender Entschwefelung und HPLC-Reinigung konnten wir **3a** in guter Ausbeute isolieren (51 %, für Details siehe Hintergrundinformationen).

Entschützung des N-terminalen Cysteins mittels Silberacetat (AgOAc) und anschließende Modifikation mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in einem Eintopfverfahren ergab das aktivierte <sup>Inc\*</sup>H3K4me3 (**5a**, Ausbeute 73 %), den ersten Bestandteil unserer Bibliothek von Inc-tag-Histon. Nach einem ähnlichen Schema, allerdings ohne die Aktivierung des Cysteins mit DTNB, synthetisierten wir <sup>Inc</sup>H3K27me3 (**4b**) ausgehend von Cys(AcM)-Inc-H3(1-28)K27me3 (**1b**) und H3Δ1-28 (**2Δ28**) (Abbildung 1 B). Mit den beiden Bausteinen <sup>Inc\*</sup>H3K4me3 (**5a**) und <sup>Inc</sup>H3K27me3 (**4b**) konnte nun ein Heterodisulfid-verknüpft H3-Dimer hergestellt werden. Dazu wurden **4b** und **5a** (in 20 % Überschuss) in denaturierenden, leicht sauren Bedingungen gemischt. Das sich schnell bildende <sup>x</sup>IncH3K4me3/H3K27me3 (**6A**) (Abbildung 1 C) wurde mittels HPLC gereinigt (Ausbeute 30–40 %) und bis zur weiteren Verwendung als Lyophilisat bei –20 °C gelagert. Zusammenfassend entwickelten wir, einerseits durch optimierte Verwendung von Eintopfverfahren und andererseits durch Minimierung der nötigen HPLC-Reinigungen, eine effiziente und konvergente Syntheseroute.

Anschließend stellten wir Histonoktamere unter Verwendung von **6A** nach etablierten Methoden<sup>[14]</sup> einschließlich abschließender Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie her (Abbildung 2 A). Entsprechend dem symmetrischen Elutionsprofil der Gelfiltration und der SDS-PAGE waren die hergestellten Oktamere homogen und enthielten je ein <sup>x</sup>IncH3-Dimer. Zu diesem Zeitpunkt war die Disulfid-Verknüpfung immer noch intakt, konnte jedoch nach Bedarf durch Reduktionsmittel geöffnet werden (Abbildung 2 B). Die rückgefalteten Oktamere wurden im oxidierten Zustand



**Abbildung 1.** Synthese von  $x^{H3K4me3/H3K27me3}$  (**6A**). A) Herstellung von  $^{H3K4me3}$  (**5a**) durch Ligation und Entschwefelung im Eintopfverfahren und anschließende Aktivierung des N-terminalen Cysteins mit DTNB. B) Herstellung von  $^{H3K27me3}$  (**4b**) durch Ligation und Entschwefelung im Eintopfverfahren und anschließende Abspaltung der Acm-Schutzgruppe. C) Herstellung des Heterodisulfids  $x^{H3K4me3/H3K27me3}$  (**6A**) ausgehend von **5a** und **4b**. D) MS-Analyse von **6A** (berechnetes Molekulargewicht (MG): 32 874 Da, gemessenes MG:  $32\,877 \pm 4$  Da).

in 50 % Glycerin bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Mit den synthetischen  $x^{H3K4me3/H3K27me3}$  (**6A**)-Oktameren waren wir schließlich in der Lage, *trans*-bivalente Nukleosomen herzustellen. Wir mischten die **6A** enthaltenden Oktamere mit einem 153 Basenpaare langen DNA-Fragment der „601“-DNA-Sequenz,<sup>[15]</sup> welches die optimale Positionierung von Nukleosomen ermöglicht, und dialysierten die Mischung graduell von hohen (1.4 M KCl) zu niedrigem (10 mM KCl) Salzgehalt.  $x^{H3K4me3/H3K27me3}$  kann dabei oxidiert bleiben bis sich stabile Nukleosomen gebildet haben. Reduktion mit 1 mM Dithiothreitol (DTT) und proteolytischer Verdau mit TEV-Protease schlossen die Synthese von *trans*-bivalenten Nukleosomen (**A**) ab (Abbildung 2C). Wir analysierten die Nukleosomen mittels Massenspektrometrie und detektierten die erwartete Masse von  $H3K4me3/H3K27me3$  (15252 Da) (Abbildung 2D). Zudem bestätigten wir den *trans*-bivalenten Modifikationsstatus mittels Immunopräzipitation (IP) durch einen Antikörper gegen  $H3K27me3$  gefolgt von  $H3K4me3$ -Detektion per Immunoblot (Abbildung 2E).

Nachdem wir nun eine robuste, synthetische Methode etabliert hatten, stellten wir eine Reihe von symmetrisch und asymmetrisch modifizierten Nukleosomen her, um die Aktivität von PRC2 in bivalenten Chromatinomänen zu untersuchen (Abbildung 2F). Wir rekonstituierten sowohl unmodifizierte Nukleosomen (**B**) als auch solche, auf welchen  $H3K4me3$  auf beiden (symmetrisch, *s*- $H3K4me3$ , **C**) oder nur auf einer  $H3$ -Untereinheit (asymmetrisch, *as*- $H3K4me3$ , **D**) eingeführt wurde. Ebenso produzierten wir Nukleosomen, in

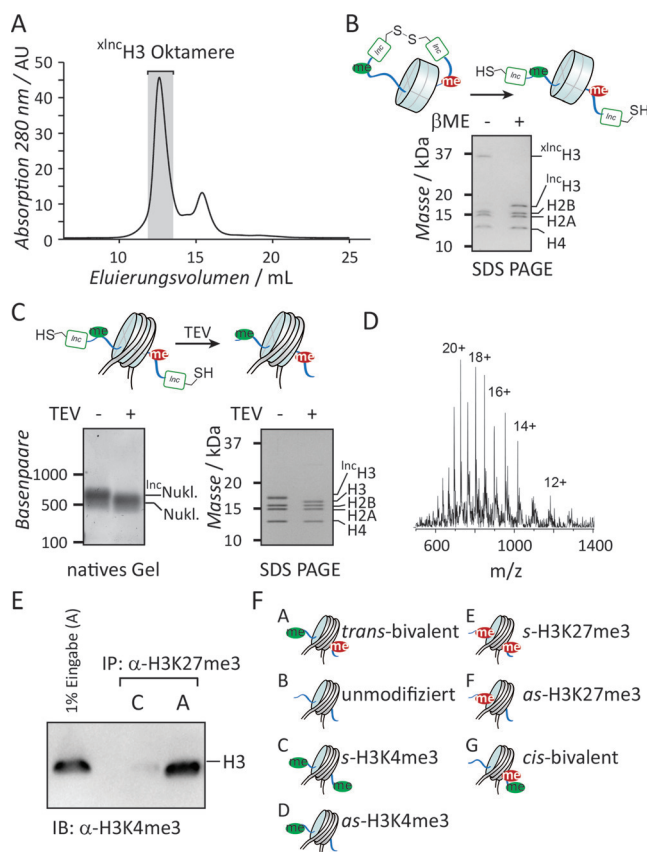
welchen  $H3K27me3$  symmetrisch (*s*- $H3K27me3$ , **E**) oder asymmetrisch (*as*- $H3K27me3$ , **F**) vorlag. Schließlich erzeugten wir *cis*-bivalente Nukleosomen, in welchen sowohl  $K4me3$  als auch  $K27me3$  im gleichen  $H3$ -Molekül angebracht waren (**G**). Mit diesen Nukleosomen führten wir anschließend Messungen der PRC2-Methyltransferase-Aktivität durch, wobei wir rekombinantes PRC2 und  $^3\text{H}$ -S-Adenosylmethionin ( $^3\text{H}$ -SAM) zur Detektion der Methylierung verwendeten. Mit *s*- $H3K4me3$  (**C**) konnten wir keinerlei Aktivität, und mit *as*- $H3K4me3$  (**D**) eine um 50 % reduzierte Aktivität von PRC2 feststellen (Abbildung 3A,C). Ebenso erfolgte keine Methylierung von *s*- $H3K27me3$  (**E**) durch PRC2, was dessen Selektivität für  $H3K27me3$  belegt. Im Gegensatz dazu stimulierten die *as*- $H3K27me3$  (**F**)-Nukleosomen die PRC2-Aktivität.

Mechanistische Einblicke konnten wir mit den bivalenten

Nukleosomen gewinnen (Abbildung 3B,C). PRC2 zeigte gesteigerte Aktivität mit *cis*-bivalenten Nukleosomen (**G**), trotz der inhibitorischen Modifikation  $H3K4me3$ . Folglich erstreckt sich deren inhibierender Effekt nicht auf das zweite  $H3$ -Protein innerhalb eines Nukleosoms. Im Gegensatz dazu führten *trans*-bivalenten Nukleosomen (**A**) zu einer niedrigen, aber detektierbaren Aktivität von PRC2. Die stimulatorische Funktion von  $H3K27me3$  innerhalb eines Nukleosoms konnte also die lokale Inhibition durch  $H3K4me3$  partiell aufheben. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass Nukleosomen, die aus einer Mischung von *s*- $H3K4me3$ - und *s*- $H3K27me3$ -Oktameren hergestellt wurden, zu keiner messbaren Aktivität von PRC2 führten (Abbildung 3D). Dieses Ergebnis belegt, dass 1) während der Rekonstitution von Nukleosomen kein Austausch der Histone innerhalb der Oktamere stattfindet, 2) Nukleosomen während der enzymatischen Reaktionen stabil sind und 3) die PRC2-Aktivität nicht zwischen ungekoppelten Nukleosomen in *trans* stimuliert wird. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass innerhalb eines Nukleosoms  $H3K4me3$  die PRC2-Aktivität nur in *cis* inhibiert, d. h. auf dem gleichen  $H3$ -Molekül. Im Gegensatz dazu hat  $H3K27me3$  einen weitreichenden Effekt, vermutlich durch erhöhte PRC2-Rekrutierung und aufgrund von allosterischer Enzymaktivierung (Abbildung 3E).

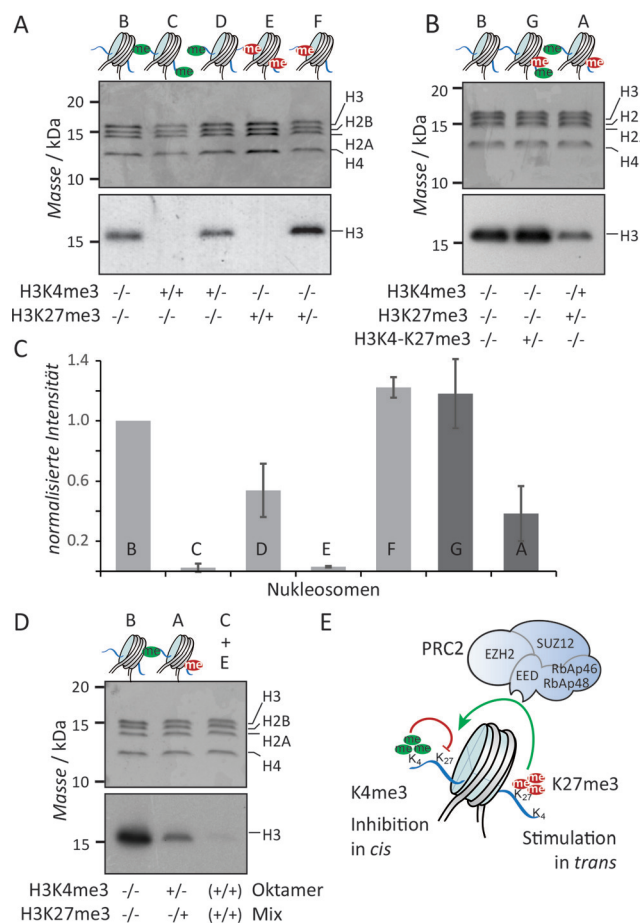
Zusammenfassend haben wir eine modulare und rückstandsfreie Methode entwickelt, um asymmetrisch modifizierte Nukleosomen ausgehend von reversibel verknüpften  $H3$ -Molekülen herzustellen. Synthetisch homogene, asym-





**Abbildung 2.** Herstellung asymmetrischer Nukleosomen. A) Rückfaltung asymmetrischer Oktamere unter Verwendung von **6A** und Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie. Die Fraktionen im schattierten Bereich wurden vereinigt, die Fraktion bei 16 mL entspricht H2A-H2B-Dimeren, die in geringem Überschuss zugegeben wurden. B) Reduktion der Disulfidbindung, analysiert mittels SDS PAGE und Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau (CBB). C) Native, asymmetrisch *trans*-bivalente Nukleosomen (A) werden durch TEV-Proteaseverdau erzeugt, was durch native Agarosegelelektrophorese und Gel-Red-Färbung sowie durch SDS PAGE und CBB-Färbung belegt wird. D) MS-Analyse des H3K4me3/H3K27me3 in den finalen, *trans*-bivalenten Nukleosomen (berechnetes MG: 15252 Da, gemessenes MG: 15249 ± 5 Da). E) Die IP der angegebenen Nukleosomen zeigt den bivalenten Zustand von A. F) Nukleosom-Varianten für Verwendung in enzymatischen Assays.

metrisch modifizierte Nukleosomen haben ein breites Anwendungsspektrum in der epigenetischen Forschung, z. B. in mechanistischen oder Hochdurchsatz-In-vitro-Studien zur Wechselwirkung von Histon-PTMs<sup>[16]</sup> in der quantitativen Chromatin-Immunopräzipitation.<sup>[17]</sup> In dieser Studie haben wir eine Reihe von asymmetrischen Nukleosomen hergestellt und dazu verwendet, den Regulationsmechanismus von PRC2 durch die Kombination von H3K4me3 und H3K27me3 zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass H3K4me3, wenn es bereits vorher auf einem Histon vorhanden ist, PRC2 lokal inhibiert, aber dass dieser inhibitorische Effekt teilweise durch benachbartes H3K27me3 aufgehoben werden kann. Demzufolge nehmen wir an, dass bivalente Domänen in ESCs permanent aktiv aufrechterhalten werden müssen, entweder durch Einschränkung der PRC2-Aktivität oder durch eine lokale Demethylierung von H3K27.



**Abbildung 3.** Regulation von PRC2 in asymmetrischen, bivalenten Nukleosomen. A) Die angegebenen symmetrischen oder asymmetrischen Nukleosomen wurden als Substrate für die PRC2-Methyltransferase-Assays mit <sup>3</sup>H-SAM verwendet. Histone wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt, mit CBB gefärbt (Bild oben) und auf Einbau von <sup>3</sup>H-Methylgruppen mittels Fluorographie untersucht (Bild unten). B) Wie in (A), jedoch unter Verwendung von *trans*- oder *cis*-bivalenten Nukleosomen. C) Densitometrische Quantifizierung des <sup>3</sup>H-Einbaus, gemittelt über mehrere Experimente (n = 3–4). D) Wie in (A), jedoch unter Verwendung von *trans*-bivalenten Nukleosomen oder Nukleosomen, die aus einer 1:1-Mischung aus Oktameren mit symmetrischen H3K4me3 oder H3K27me3 hergestellt wurden. E) Modell für die Regulation von PRC2, Details im Text.

## Danksagung

Wir danken Maeva Tobler für technische Assistenz, Aurore Delachat und Ahmed Boumezeur für die Peptide **1e** und **1f** und Julien Hiblot für die TEV-Protease sowie Christian Heinis und Sinan Kilic für Kommentare zum Manuskript. Für finanzielle Unterstützung danken wir der Sandoz Family Foundation, dem NCCR Chemical Biology, dem Schweizerischen Nationalfonds (31003A\_149789) und der EPFL.

**Stichwörter:** Bivalente Domänen · Chromatin · Epigenetik · Exprimierte Proteinligation · PRC2

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 2903–2906  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 2954–2958

- [1] B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, *403*, 41–45.
- [2] a) K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, *389*, 251–260; b) C. A. Davey, D. F. Sargent, K. Luger, A. W. Maeder, T. J. Richmond, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 1097–1113.
- [3] P. Voigt, G. LeRoy, W. J. Drury 3rd, B. M. Zee, J. Son, D. B. Beck, N. L. Young, B. A. Garcia, D. Reinberg, *Cell* **2012**, *151*, 181–193.
- [4] H. S. Rhee, A. R. Bataille, L. Zhang, B. F. Pugh, *Cell* **2014**, *159*, 1377–1388.
- [5] G. Cavalli, B. Schuettengruber, D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc, *Cell* **2007**, *128*, 735–745.
- [6] L. Ringrose, R. Paro, *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 413–443.
- [7] a) B. E. Bernstein, T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber, E. S. Lander, *Cell* **2006**, *125*, 315–326; b) P. Voigt, W. W. Tee, D. Reinberg, *Genes Dev.* **2013**, *27*, 1318–1338; c) J. Rodriguez, M. Munoz, L. Vives, C. G. Frangou, M. Groudine, M. A. Peinado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19809–19814; d) S. A. Bapat, V. Jin, N. Berry, C. Balch, N. Sharma, N. Kurrey, S. Zhang, F. Fang, X. Lan, M. Li, B. Kennedy, R. M. Bigsby, T. H. Huang, K. P. Nephew, *Epigenetics* **2010**, *5*, 716–729.
- [8] a) S. Li, M. A. Shogren-Knaak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18243–18248; b) F. Munari, S. Soeroes, H. M. Zenn, A. Schomburg, N. Kost, S. Schroder, R. Klingberg, N. Rezaei-Ghaleh, A. Stutzer, K. A. Gelato, P. J. Walla, S. Becker, D. Schwarzer, B. Zimmermann, W. Fischle, M. Zweckstetter, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33756–33765.
- [9] a) R. Margueron, N. Justin, K. Ohno, M. L. Sharpe, J. Son, W. J. Drury, P. Voigt, S. R. Martin, W. R. Taylor, V. De Marco, V. Pirrotta, D. Reinberg, S. J. Gamblin, *Nature* **2009**, *461*, 762–U711; b) P. Y. Chang, R. A. Hom, C. A. Musselman, L. Zhu, A. Kuo, O. Gozani, T. G. Kutateladze, M. L. Cleary, *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 137–144; c) Z. Z. Brown, M. M. Muller, H. E. Kong, P. W. Lewis, T. W. Muir, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6457–6461; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6557–6561.
- [10] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779; b) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705–6710; c) L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533; d) Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412.
- [11] G. Stavropoulos, D. Gatos, V. Magafa, K. Barlos, *Lett. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 315–318.
- [12] G. M. Fang, J. X. Wang, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10347–10350; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10493–10496.
- [13] R. E. Thompson, X. Liu, N. Alonso-Garcia, P. J. Pereira, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8161–8164.
- [14] P. N. Dyer, R. S. Edayathumangalam, C. L. White, Y. Bao, S. Chakravarthy, U. M. Muthurajan, K. Luger, *Methods Enzymol.* **2003**, *375*, 23–44.
- [15] P. T. Lowary, J. Widom, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 19–42.
- [16] U. T. Nguyen, L. Bittova, M. M. Muller, B. Fierz, Y. David, B. Houck-Loomis, V. Feng, G. P. Dann, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 834–840.
- [17] A. T. Grzybowski, Z. Chen, A. J. Ruthenburg, *Mol. Cell* **2015**, *58*, 886–899.

Eingegangen am 26. November 2015

Online veröffentlicht am 25. Januar 2016