

Genetisches Institut  
Fachbereich 08 (Fachrichtung Biologie)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Identifikation und funktionelle  
Charakterisierung von kombinierten Genom-Bindestellen  
für CTCF und TR**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades**

vorgelegt von Oliver Weth  
Gießen, April 2009

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters  
1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz  
2. Gutachter: Prof. Dr. Tina Trenczek

---

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1	CTCF – ein Transkriptionsfaktor, viele Funktionen .....	2
2.2	Isolatoren organisieren das Genom.....	6
2.3	Der Thyroidhormon-Rezeptor .....	8
2.4	Zusammenspiel von CTCF und TR .....	10
2.5	Zielsetzung der Arbeit .....	12
<b>3</b>	<b>Material</b> .....	<b>14</b>
3.1	Geräte .....	14
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	15
3.3	Chemikalien .....	16
3.4	Enzyme .....	18
3.5	DNA-Längenstandards .....	19
3.6	Komplettausrüstungen.....	19
3.7	Protein-Molekulargewichtsmarker .....	20
3.8	Bakterienstämme .....	20
3.9	Eukaryontische Zelllinien.....	21
3.10	Antibiotika .....	22
3.11	Vektoren .....	22
3.12	Antikörper .....	24
3.13	Allgemeine Vorbereitungen.....	24
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>26</b>
4.1	Allgemeines Arbeiten mit DNA .....	26
4.1.1	Lagerung.....	26
4.1.2	Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse .....	26
4.1.2.1	Minipräparation .....	26
4.1.2.2	Midipräparation .....	27
4.1.2.3	Maxipräparation mit CsCl-Dichtegradient .....	27
4.1.3	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	29
4.1.4	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung .....	29
4.1.5	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	30
4.2	Enzymatische Modifikation von DNA.....	30
4.2.1	Restriktionsspaltung .....	31
4.2.2	Auffüllen von 5`-Enden.....	31
4.2.3	Dephosphorylierung .....	31
4.2.4	Ligation .....	32

---

4.2.5	Multimerisieren und Klonieren von DNA-Fragmenten in einen episomalen Vektor .....	32
4.2.6	Sequenzierung von DNA .....	33
4.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	33
4.2.8	<i>realtime</i> -PCR .....	34
4.3	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	34
4.3.1	Agarosegele.....	35
4.3.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	35
4.4	Arbeiten mit RNA .....	36
4.4.1	Lagerung.....	36
4.4.2	Isolierung von RNA .....	36
4.4.3	RT-PCR .....	36
4.5	Arbeiten mit Bakterien .....	37
4.5.1	Vermehrung und Lagerung .....	37
4.5.2	Herstellung kompetenter Bakterien .....	38
4.5.3	Transformation von Bakterien .....	39
4.6	Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien .....	39
4.6.1	Lagerung und Auftauen von eukaryontischen Zellen.....	39
4.6.2	Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	40
4.6.3	Einfrieren eukaryontischer Zellen .....	41
4.6.4	DNA-Transfer in Zellen.....	41
4.6.5	Hormoninduktion in der transienten Transfektion .....	43
4.6.6	Ernte und Aufschluss der Zellen.....	43
4.6.7	Aktivitätsbestimmung der Luciferase (Luc-Assay) .....	44
4.6.8	Aktivitätsbestimmung der $\beta$ -Galactosidase.....	44
4.7	Arbeiten mit Proteinen.....	45
4.7.1	Lagerung von Proteinen .....	45
4.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	45
4.7.3	Herstellung von Ganzzellextrakt.....	46
4.7.4	Denaturierende Polyacrylamidgele.....	46
4.7.5	Blotten der Proteine .....	48
4.7.6	Immunodetektion.....	48
4.7.7	In vitro Transkription/Translation .....	49
4.7.8	Expression rekombinanter Proteine.....	50
4.7.9	Affinitätsaufreinigung GST-fusionierter Proteine.....	51
4.7.10	GST-Pulldown .....	51
4.8	Untersuchung von DNA-Protein-Interaktion.....	52

---

4.8.1	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) .....	52
4.8.2	Gelretardierungsexperiment (EMSA).....	54
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
5.1	Identifikation eines gemeinsamen Interaktionspartners von CTCF und TR.....	56
5.1.1	TRIP12 und E6AP interagieren mit CTCF und TR- $\beta$ .....	57
5.1.2	E6-AP zeigt geringen Einfluss im Enhancer-Blockade-Assay.....	60
5.2	Identifikation benachbarter Bindestellen von CTCF und TR .....	63
5.2.1	Als Ausgangspunkt dienen 126 durch TR regulierte Gene .....	63
5.2.2	Identifikation von CTCF-Bindestellen 40 kb stromauf- bzw. abwärts des Transkriptionsstarts.....	64
5.2.3	Identifikation von möglichen TR-Bindestellen mit Hilfe des <i>NUBIScan</i> - Algorithmus.....	65
5.2.4	Alle CTCF-Bindestellen zeigen <i>in vitro</i> -Bindung .....	68
5.2.5	Etwa 50% der vorhergesagten TR-Elemente zeigen <i>in vitro</i> -Bindung.....	69
5.2.6	CTCF bindet <i>in vivo</i> - TR kann mangels geeignetem Antikörper nicht nachgewiesen werden.....	71
5.3	Klonierung der kombinierten Bindestellen in episomale Vektoren und funktionelle Analysen.....	74
5.3.1	Klonierung in einen episomalen Vektor .....	74
5.3.2	Das kombinierte Bindeelement des $ERR\alpha$ Gens zeigt in 2 Zelllinien hormonsensitive Enhancer-Blockade .....	76
5.3.3	Das $ERR\alpha$ -Element wirkt als Isolator und nicht als Repressor auf den Promotor .....	79
5.3.4	Die Enhancer-Blockade ist von TR abhängig .....	80
5.4	Endogene Genregulation .....	83
5.4.1	$ERR\alpha$ wird in den untersuchten Zelllinien durch E2 nicht aber durch T3 reguliert .....	84
5.4.2	Die ChIP-Analyse zeigt spezifische Promotorbindung von CTCF, Pol II und Cohesin.....	87
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
6.1	Identifikation von kombinierten Bindestellen für CTCF und TR.....	90
6.2	Der Einfluss von CTCF, TR und deren Cofaktoren auf die hormonsensitive Enhancer- Blockade.....	93
6.3	Endogene Regulation des $ERR\alpha$ -Gens.....	98
6.4	Ausblick.....	99
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>107</b>
8.1	Enhancer-Blockade-Assay .....	107

---

8.2	Übersicht T3-regulierte Gene .....	110
8.3	Vektoren.....	113
8.4	Oligonukleotide .....	116
8.5	Abkürzungsverzeichnis .....	125

## 1 Zusammenfassung

Die phänotypischen Unterschiede von Zellen und deren Antwort und Anpassung an Umwelteinflüsse wird unter anderem durch Regulation der Gentranskription gewährleistet. Der in Vertebraten ubiquitär exprimierte und hoch konservierte Transkriptionsfaktor CTCF ist auf vielfältige Weise in die Regulation der Expression genetischer Information involviert. Die Tatsache, dass CTCF in höheren Eukaryoten der einzig bekannte Faktor ist, der Enhancer-Blockade vermitteln kann, verdeutlicht seine große Bedeutung. Dabei werden Gene von unerwünschten Enhancer-Einflüssen abgeschirmt, die für die Regulation anderer Gene verantwortlich sind. CTCF-Bindestellen können sich in enger räumlicher Nachbarschaft zu Bindestellen für den Thyroidhormon-Rezeptor (TR), einem Mitglied der Familie der Kernhormonrezeptoren befinden. Für diese kombinierten Bindestellen wurde bereits gezeigt, dass Thyroidhormon (T3) die Enhancer-Blockade regulieren kann. Es stellt sich die Frage, durch welche Faktoren die hormonsensitive Enhancer-Blockade reguliert wird, und ob weitere benachbarte Bindestellen für CTCF und TR im Genom existieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit E6-AP ein zusätzlicher Cofaktor von CTCF und TR identifiziert werden. GST *Pulldown*-Experimente zeigen eine *in vitro*-Interaktion von E6-AP mit CTCF und in der Anwesenheit von Hormon mit TR. E6-AP übt zwei voneinander unabhängige Funktionen aus. Zum einen ist es ein Coaktivator für Kernhormonrezeptoren, zum anderen fungiert E6-AP als E3-Ubiquitin-Ligase. In Studien, bei denen E6-AP im Enhancer-Blockade-Assay überexprimiert wurde, zeigt sich ein geringer Einfluss auf die Enhancer-Blockade.

Des Weiteren wurden 126 durch den TR regulierte Gene mittels *in silico*-Analysen auf kombinierte CTCF- und TR-Bindestellen untersucht. Dabei konnten 17 Gene identifiziert werden, die eine benachbarte Bindestelle von CTCF und TR haben. Die Durchführung von EMSA-Experimenten verifizierte bei 10 kombinierten Bindestellen eine *in vitro*-Interaktion mit der jeweiligen Sonde. Die neu identifizierten Elemente wurden in ein Vektorsystem integriert, welches es erlaubt, diese auf ihre Funktionalität hin in Bezug auf hormonsensitive Enhancer-Blockade zu untersuchen. Dabei zeigt das benachbarte Bindeelement des  $ERR\alpha$ -Gens Enhancer-Blockade, die durch die Zugabe von T3 aufgehoben wird. Wie schon für die Bindestellen F1 und F2 aus dem Hühner-Lysozym-Silencer gezeigt wurde, ist auch bei der kombinierten Bindestelle des  $ERR\alpha$  Gens die Vermittlung einer funktionellen Enhancer-Blockade in der Abwesenheit von Hormon unmittelbar von der Präsenz des TR abhängig.

## 2 Einleitung

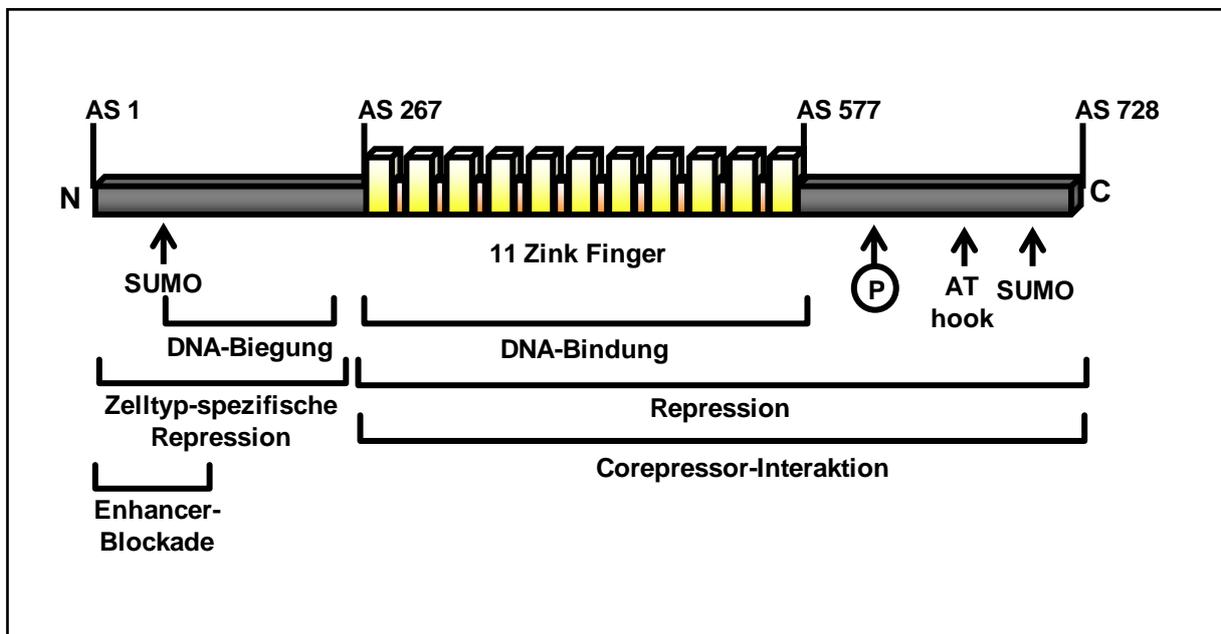
Die Realisierung der genetischen Information unterliegt verschiedensten Regulationsmechanismen, die die zeitliche, entwicklungs- und zelltypspezifische Expression von Genen sicherstellen. Das Genom von höheren Eukaryoten besteht am Beispiel des Menschen aus ca.  $3,2 \times 10^9$  Basenpaaren und besitzt eine Länge von etwa zwei Metern. Die einzelnen DNA-Moleküle sind innerhalb des Zellkerns, der einen Durchmesser von  $10\mu\text{m}$  hat, verpackt und nehmen definierte Territorien ein (Cremer et al., 2001). Es ist absehbar, dass benachbarte Chromosomen und auch Abschnitte eines einzelnen Chromosoms in Kontakt treten. Dabei können regulatorische Elemente mit Promotoren interagieren und die Expression des entsprechenden Gens beeinflussen. Damit es nicht zu unerwünschten Effekten kommt, muss die dreidimensionale Anordnung des Chromatins gezielt kontrolliert werden. Um Gene vor unerwünschten Interaktionen mit Enhancern abzuschirmen, existieren im Genom höherer Eukaryoten definierte Sequenzen, sogenannte Isolatoren, welche von Isolatorproteinen gebunden werden. In Vertebraten ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur ein Protein bekannt, welches in der Lage ist, einen Promotor von einem Enhancer abzuschirmen und auf diesem Weg in die Genregulation einzugreifen. Dabei handelt es sich um den multivalenten Transkriptionsfaktor CTCF, der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

### 2.1 CTCF – ein Transkriptionsfaktor, viele Funktionen

Der Transkriptionsfaktor „*CCCTC-Binding Factor*“ (CTCF) ist, bis auf amakrine Zellen der Säugetierretina (Canto-Soler et al., 2008), ubiquitär exprimiert und innerhalb verschiedener Spezies hoch konserviert (83-84 % auf Aminosäure (AS)-Ebene bei Vertebraten) (Burke et al., 2002; Lobanekov et al., 1990). Entdeckt wurde er im Kontext zweier verschiedener Gene: Im regulatorischen Bereich des c-myc-Gens des Huhns bindet er das „footprint V“-Element (FPV), eine reprimierende Region, die drei Wiederholungen des Sequenzmotivs „CCCTC“ beinhaltet (Lobanekov et al., 1990). Zeitlich parallel wurde im Hühner Lysozym-Gen das Silencer-Element „Footprint 1“ (F1) identifiziert, welches von einem Repressor Protein, dem „Negativen Protein 1“ (NeP 1), gebunden wird (Baniahmad et al., 1990). Einige Jahre später zeigten Analysen, dass dieses Protein identisch mit CTCF ist (Burcin et al., 1997). Die 727 AS dieses Faktors bilden 3 strukturelle Domänen aus: Die zentrale DNA-Bindedomäne besteht aus 11 Zinkfingern (1 bis 10 vom Typ  $C_2H_2$ , 11 vom Typ  $C_2HC$ ) und wird von 267 AS auf N-terminaler Seite und 150 AS, die den C-terminalen Bereich

bilden, flankiert (Abb. 2.1) (Vostrov et al., 2002). CTCF sollte folglich ein Molekulargewicht von 82 kDa besitzen, läuft aber aufgrund bestimmter Sequenzen im N-Terminus nach Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel einer Lauflänge entsprechend eines Molekulargewichts von etwa 130 kDa (Klenova et al., 1997). Durch den Einsatz verschiedener Kombinationen von Zinkfingern der hoch konservierten, zentralen Domäne ist CTCF in der Lage, an eine große Anzahl von Zielgenen zu binden (Filippova et al., 1996). Dies machte es lange Zeit nicht möglich, eine Konsensussequenz zu ermitteln. Durch genomweite *ChIP-on-chip*-Experimente wurden kürzlich 13804 Bindestellen identifiziert, die es möglich machten, einen Konsensus zu berechnen (Kim et al., 2007). Darüberhinaus zeigt sich eine starke Korrelation zwischen der Anzahl der Gene eines Chromosoms und der Gesamtheit von CTCF-Bindestellen. Die drei Domänen N-Terminus, Zinkfinger-Domäne und C-Terminus stellen auch funktionelle Domänen des Faktors dar. So ist die N-terminale-Domäne an der Repression und Aktivierung von Transkription beteiligt und darüber hinaus auch für DNA-Biegung nach Bindung von CTCF an die DNA verantwortlich, was zu einer unterschiedlichen 3-dimensionalen Struktur und demnach unterschiedlichen Rekrutierung von Cofaktoren führen könnte (Arnold et al., 1996). Die Repressionsdomäne konnte auf 20 AS im N-Terminus eingeeengt werden, die jedoch keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Motiven für die Rekrutierung von Corepressoren aufweist (Drueppel et al., 2004). Weiterhin konnte der für die Enhancer-Blockade verantwortliche Bereich, die Aminosäuren 2-61, innerhalb dieser Domäne identifiziert werden (Bardenhagen, Diplomarbeit 2003). Neben der DNA-Bindung besitzt die Zinkfingerdomäne und der C-terminale Bereich mindestens zwei voneinander unabhängige Repressionsdomänen (Lutz et al., 2000). Im carboxyterminalen Abschnitt des Proteins findet sich ein potentiell Kern-Lokalisationssignal, ein „AT-Hook“, der für die Stabilisierung der DNA-Bindung verantwortlich sein könnte, sowie Erkennungsstellen für die Casein-Kinase II (Abb. 2.1) (Klenova et al., 1993). Letztere führt zu einer posttranslationalen Modifikation, welche die durch CTCF vermittelten Funktionen moduliert. So ist z.B. bekannt, dass die durch CTCF verursachte Repression des c-myc-Gens durch Phosphorylierung von vier Serinen im C-Terminus zur Aktivierung führt. Mutation dieser AS führt zu einer signifikanten Verstärkung der transkriptionellen Repression des Promotors, ohne jedoch die Kernlokalisierung oder DNA-Bindung von CTCF zu beeinflussen (El-Kady and Klenova, 2005; Klenova et al., 2001). Des Weiteren kann die Poly(ADP)-Ribosylierung (PARlierung) von CTCF ebenfalls dessen Funktion beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass die PAR-Polymerase (PARP-1) CTCF durch Übertragung mehrere Ribose-Einheiten *in vivo* modifiziert (Yu et al., 2004). Weitere Studien führten zum Nachweis, dass diese posttranslationale Modifizierung für den Vorgang der CTCF-vermittelten Enhancer-Blockade notwendig ist. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass die PARlierte Form von CTCF im Nukleolus von differenzierten oder

apoptotischen Zellen anzutreffen ist und dort die nukleoläre Transkription inhibiert (Torrano et al., 2006).



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Proteins CTCF**

Angegeben sind die Positionen der ersten und letzten Aminosäure (AS), sowie Beginn und Ende der annähernd zentral gelegenen DNA-Bindedomäne. Diese enthält 11 Zinkfinger-Motive. Funktionelle Domänen sind durch Klammern markiert. N, Aminoterminus; C, Carboxyterminus; P, Phosphorylierungsstellen für die Casein-Kinase II; SUMO, SUMOlierungsstelle.

Kürzlich wurde berichtet, dass CTCF an zwei konservierten Stellen im C- und N-terminalen Bereich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* SUMOliert wird (Abb. 2.1) (MacPherson et al., 2009). Diese Modifizierung ist ein weiteres Beispiel, wie die Funktion von CTCF posttranslational gesteuert werden kann. Die SUMOlierung ist funktionell wichtig für die Repression des *c-myc*-Promotors.

Studien innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten darüber hinaus, dass die Zinkfinger 1-4 von CTCF von den Histon-Acetyltransferasen (HATs) p300 und pCAF zumindest *in vitro* acetyliert werden können. Die funktionelle Bedeutung dieser Modifikation von CTCF auf z.B. Zellwachstum oder Enhancer-Blockade konnte abschließend noch nicht geklärt werden (Jörg Leers, persönliche Mitteilung).

Neben der Repression von Genen sind für CTCF noch eine Reihe weiterer Funktionen bekannt. Es wurde bisher ein Beispiel beschrieben, bei dem sich CTCF aktivierend auf die Genexpression auswirkt. Das humane Amyloid  $\beta$ -Precursor Protein (APP)-Gen, das in der Alzheimererkrankung involviert ist, wird von CTCF an einer Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstarts gebunden, und dadurch wird eine erhöhte APP-Genexpression als Antwort auf TGF $\beta$  vermittelt (Burton et al., 2002; Vostrov and Quitschke, 1997).

Darüber hinaus ist CTCF auch in die Regulation der X-Inaktivierung involviert. In dem *Choice/Imprinting*-Zentrum von *Tsix* wurden durch ChIP-Analysen mehrere CTCF-Bindestellen identifiziert (Chao et al., 2002). In weiblichen Säugetierzellen kontrolliert das sogenannte X-Inaktivierungszentrum, das zwei nichtkodierende Gene, *Xist* und seinen Antisense-Gegenspieler *Tsix*, umfasst, die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen. CTCF bildet mit seinem Cofaktor YY1 einen Komplex, der für die Transaktivierung von *Tsix* auf dem zukünftigen aktiven X-Chromosom und als Konsequenz daraus die Abschaltung von *Xist*, benötigt wird (Donohoe et al., 2007). Abgesehen davon hat CTCF aber auch einen direkten Einfluss auf den Promotor von *Xist* (Navarro et al., 2006). Zusätzlich ist CTCF an der Regulation von Bereichen auf dem X-Chromosom beteiligt, die von der Inaktivierung ausgenommen sind (Filippova et al., 2005). An den Grenzen dieser Bereiche wurden Bindestellen für CTCF identifiziert, die eine Aufrechterhaltung von aktiven bzw. inaktiven Domänen nahe legt (Barski et al., 2007; Kim et al., 2007).

Durch Studien in unserer Arbeitsgruppe werden CTCF in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedliche Funktionen zugeschrieben, da CTCF eine dynamische, Zellzyklus-abhängige Lokalisation aufweist (Zhang et al., 2004). In der Interphase ist CTCF im Nukleus lokalisiert. Während des Zellzyklus zeigt der Faktor jedoch eine dynamische Verteilung, wobei CTCF während Metaphase und Anaphase mit den Centrosomen assoziiert ist. Demgegenüber ist CTCF in der Telophase im *Midbody* und dem neu geformten Nukleus zu finden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CTCF mit mitotischen Chromosomen assoziiert ist. Im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen bleibt die spezifische Bindung von CTCF an Zielgenen auch in der Mitose erhalten und propagiert so den epigenetischen Status der Zelle durch die Mitose (Burke et al., 2005). Chromatinschleifen, die durch CTCF organisiert werden und für die Enhancer-Blockade verantwortlich sind, bleiben während der Mitose erhalten. So zeigen *chromosome conformation capture* Analysen (3C-assay) die Interaktion zwischen der *Igf2*-DMR1 und der H19-ICR sowohl während der Interphase als auch der Mitose. Aktuelle Studien beschreiben ein komplexes dreidimensionales *knotted loop*-Modell, wodurch die Enhancer in diesem Bereich vom *Igf2*-Promotor ferngehalten werden (Qiu et al., 2008). Diese Konfiguration bleibt auch während der Mitose größtenteils bestehen und liefert somit einen Mechanismus für das epigenetische Gedächtnis.

Diese Beispiele zeigen, dass CTCF ein bemerkenswert multivalenter Transkriptionsfaktor ist, der in vielen kritischen Regulationsvorgängen der Zelle eine Rolle spielt und durch eine Vielzahl von Mechanismen moduliert wird. Auf die für eine geregelte Genexpression unerlässliche Enhancer-Blockade, die im Kontext des *Igf2*- und H19-Lokus bereits angesprochen wurde, wird in den nächsten Abschnitten genauer eingegangen.

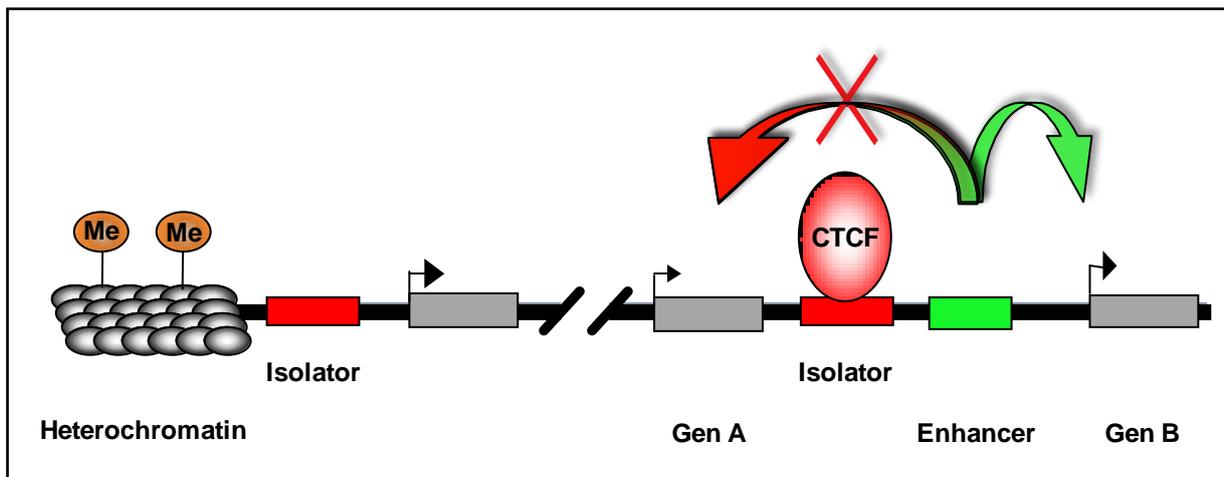
## 2.2 Isolatoren organisieren das Genom

Eine weitere Funktion von CTCF konnte durch seine Identifizierung als Faktor, der an Isolatoren bindet, beschrieben werden (Bell et al., 1999). Der erste detailliert charakterisierte Isolator in Vertebraten war *chs4*, der im Bereich des 5' Ende des Hühner  $\beta$ -Globin-Lokus lokalisiert ist. Isolatoren sind DNA-Sequenzen, die Grenzelemente zwischen aktivem und inaktivem Chromatin darstellen (Wolffe, 1994). Die lineare Anordnung der Gene und der sie kontrollierenden DNA-Elemente, wie Enhancer oder Silencer, erfordert die Existenz solcher Grenzelemente. Diese regulatorischen DNA-Elemente wirken weitgehend unabhängig von ihrer Position oder Orientierung relativ zu einem Gen. Dies hat eine unspezifische Wirkung auf zwei Gene zur Folge, wenn das regulatorische DNA-Element zwischen ihnen positioniert ist. Ein Isolator ist in der Lage, die Wirkung des Enhancers oder Silencers spezifisch auf eines der Gene zu beschränken (Abb. 2.2). Isolatoren ermöglichen also die Etablierung genomischer Domänen unterschiedlicher Aktivität. Des Weiteren sind sie in der Lage, die Ausbreitung von Heterochromatin zu stoppen. Diese Barrierefunktion eines Isolators schirmt ein Transgen von Positionseffekten ab und verhindert so die Ausbreitung einer inaktiven Chromatinstruktur, die vor allem durch fehlende Acetylierung und H3 K9/27-Methylierung gekennzeichnet ist (Kellum and Schedl, 1991; Pikaart et al., 1998).

Die ersten, als Isolatoren identifizierten DNA-Sequenzen, waren die *scs*- und *scs'*-Elemente aus *Drosophila* (Udvardy et al., 1985). Sie markieren die Grenzen des *Heat Shock Locus* und gaben erste Hinweise auf die Existenz von Chromatin-Domänen höherer Ordnung. Der bisher einzige Faktor aus Vertebraten, für den gezeigt werden konnte, dass seine Bindung an Isolatorelemente zur Enhancer-Blockade essentiell ist, ist das Protein CTCF (Bell et al., 1999). Für alle untersuchten Isolatorelemente in Vertebraten konnte die Bindung des Faktors nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der Enhancer-Blockade ist nicht abschließend geklärt und es werden mehrere Modelle diskutiert, welche die Isolatoraktivität zu erklären versuchen. Für jedes einzelne Modell gibt es Hinweise, die aber nicht ausreichen, um das Phänomen in seiner Gesamtheit zu verstehen. Das *Tracking*-Modell basiert auf der Idee, dass CTCF mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert und ein Signal, das entlang der DNA vom Enhancer zum Promotor wandert, blockiert (Bell and Felsenfeld, 1999; Chernukhin et al., 2007). Dem gegenüber steht das *Looping*-Modell. Dieses geht dabei von einer Schleifenbildung des Chromatins aus, die aufgrund der Umlagerung zu einer Trennung von Enhancer und Promotor führt (Bell and Felsenfeld, 1999; Yusufzai et al., 2004). Es wird spekuliert, dass bei der Aktivierung der Globin-Gene durch die LCR beide Modelle eine Rolle spielen (Zhao and Dean, 2004).

Es ist vorstellbar, dass CTCF allein für die Interaktion von Chromatin verantwortlich ist und dadurch eine Schleifenbildung vermittelt. An DNA gebundenes CTCF ist in der Lage zu dimerisieren und könnte so zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden (Pant et al., 2004). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Cofaktoren eine Rolle spielen. CTCF interagiert mit Nukleophosmin, einem Matrixprotein der Kernhülle, von dem ein großer Teil im Kernkörperchen lokalisiert ist. Beide Proteine sind *in vivo* an Isolator-Elemente gebunden, und diese DNA-Abschnitte werden abhängig von Nukleophosmin zu den Kernkörperchen rekrutiert (Yusufzai et al., 2004). Dies könnte dabei helfen, Chromatinschleifen zu organisieren.



**Abb. 2.2: Isolatoren verhindern die Ausbreitung von Heterochromatin und vermitteln durch Bindung von CTCF Enhancer-Blockade**

Schematische Darstellung der Enhancer-Blockade im Genom. Gene sind als graue Balken dargestellt, auf die Enhancer unspezifisch wirken können (Pfeile). Auch die Ausbreitung von Heterochromatin kann Genaktivität beeinflussen. Die Anwesenheit von Isolatoren verhindert zum einen die Ausbreitung des Heterochromatins und zum anderen durch Bindung von CTCF die aktivierende Wirkung von Enhancern (rotes Kreuz) auf Gen A, jedoch nicht auf Gen B.

Die Analyse des Proteins Cohesin, welches für das Zusammenhalten von Schwesterchromatiden zu Beginn der S- bis zur G2-Phase bekannt ist, resultierte in der Identifikation von Bindestellen, die zu jenen von CTCF identisch sind (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Stedman et al., 2008; Wendt et al., 2008). Cohesin besteht aus vier Untereinheiten, die eine ringförmige Struktur bilden und so Schwesterchromatiden zusammenhalten und für eine geregelte Chromosomenverteilung während der Zellteilung sorgen (Ivanov and Nasmyth, 2007). Cohesin ist auch während der Interphase an DNA gebunden, und die Vermutung einer zusätzlichen Funktion bei der Regulation der Genexpression liegt nahe. Tatsächlich zeigen Reporter-Assays eine verringerte Aktivität des Hühner  $\beta$ -Globin-Isolators bei vermindertem Proteinlevel von Rad21, einer

Cohesin-Untereinheit (Parelho et al., 2008; Wendt et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Cohesin an der Regulation des endogenen H19/Igf2-Isolators beteiligt ist. Spekuliert wird über ein Modell, bei dem Cohesin dabei hilft, Chromatinschleifen zu bilden und diese zu stabilisieren.

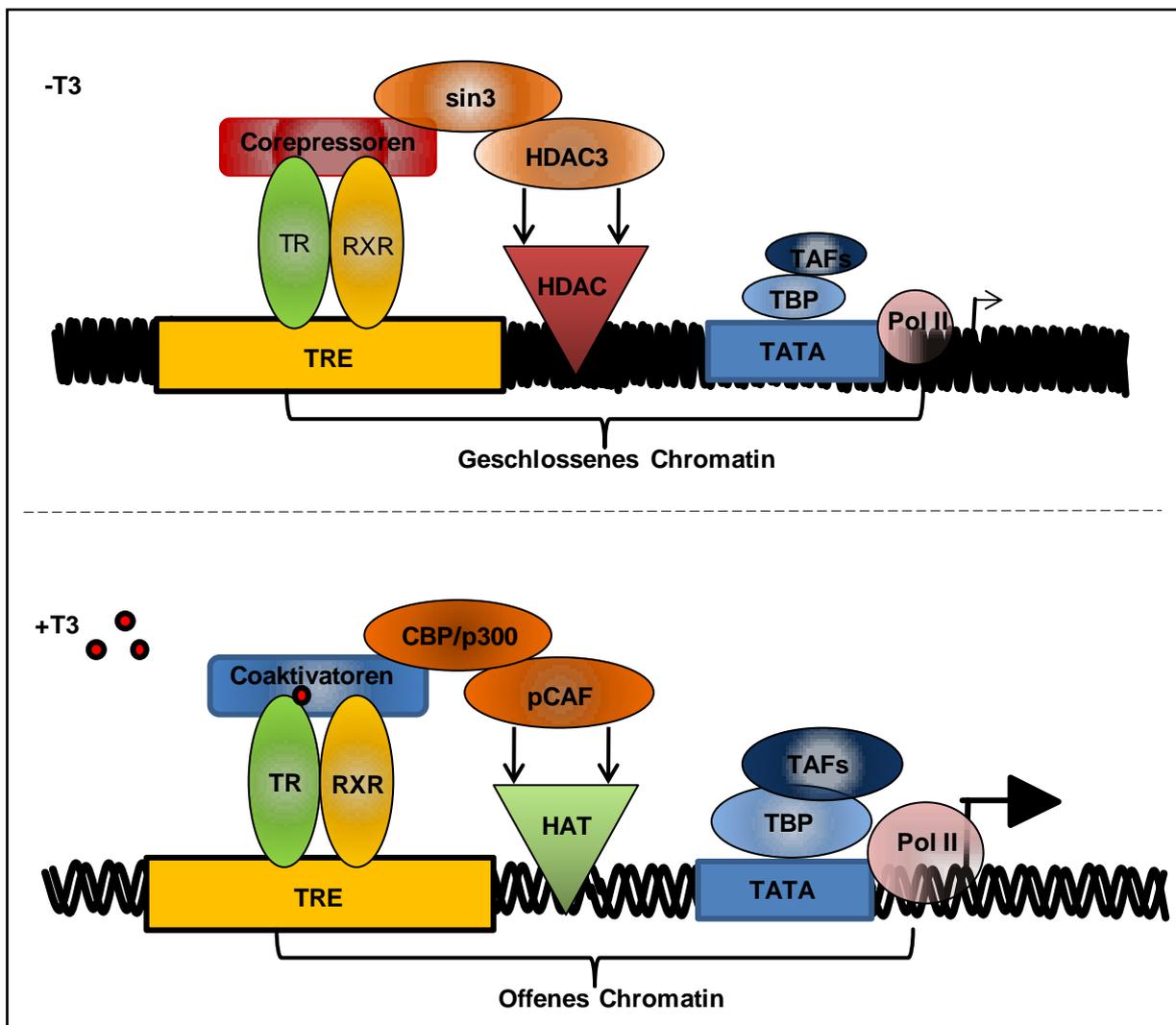
Der angesprochene Igf2/H19-Lokus ist eines der am Besten untersuchten Beispiele in Bezug auf Enhancer-Blockade, an dessen *Differentially Methylated Region* (DMR) CTCF in Abhängigkeit des Methylierungsstatus bindet (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000). Die Expression der Gene Igf2 und H19 erfolgt jeweils nur vom paternalen bzw. maternalen Allel, was als genomische Prägung (*Imprinting*) bezeichnet wird. Während der Gametogenese wird das paternale Allel im Unterschied zum maternalen in hohem Maße methyliert. Dies führt zu einer differentiellen Expression der Gene während der Embryogenese. An diesem *Imprinting* beteiligt ist die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade. Die Allel-spezifische Expression der H19- und Igf2-Gene wird durch die ICR, die -2 bis -4,4 kb relativ zum Transkriptionsstart des H19-Gens liegt, reguliert. Es wurde nachgewiesen, dass die ICR durch Bindung von CTCF als Isolator auf dem maternalen Allel wirkt. Die Bindung von CTCF verhindert die Aktivierung des maternalen Igf2-Promotors durch die stromabwärts vom H19-Gen positionierten Enhancer. Aufgrund der starken Methylierung des paternalen Chromosoms im Bereich der ICR kann CTCF nicht binden, und es wird folglich keine Enhancer-Blockade ausgeübt. Dies hat zur Folge, dass der paternale Igf2-Promotor zugänglich für den Enhancer und aktiv ist. Dieses Beispiel zeigt, dass die durch CTCF vermittelte Enhancer-Blockade nicht immer konstitutiv, sondern, wie in diesem Fall durch DNA-Methylierung, regulierbar ist. Eine weitere Möglichkeit der Feinregulierung durch CTCF stellt die hormonsensitive Enhancer-Blockade auf kombinierten CTCF/TR-Bindestellen dar, auf die in den nächsten Abschnitten eingegangen wird.

### **2.3 Der Thyroidhormon-Rezeptor**

Der Thyroidhormon-Rezeptor (TR) gehört zur Gruppe der kernlokalisierten Hormonrezeptoren, die konservierte Domänstrukturen aufweisen und als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren fungieren, wobei sie einen großen Einfluss auf Entwicklung, Wachstum und Metabolismus von Zellen ausüben. Es existieren mindestens neun verschiedene Formen des TR. Die Rezeptoren für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen stammen von zwei verschiedenen Genen. Fünf dieser Isoformen, unter ihnen TR $\beta$ 1 (Koenig et al., 1988), TR $\beta$ 2 (Hodin et al., 1989), TR $\beta$ 3, TR $\Delta\beta$ 3 und TR $\alpha$ 1 (Thompson et al., 1987), sind in der Lage, T3 zu binden und entstehen durch die Auswahl unterschiedlicher Promotoren bzw. alternatives Spleißen. Des Weiteren existieren vier Isoformen TR $\alpha$ 2 (Benbrook and Pfahl,

1987), TR $\alpha$ 3, TR $\Delta\alpha$ 1 und TR $\Delta\alpha$ 2, die nicht in der Lage sind, T3 zu binden (O'Shea and Williams, 2002).

Die zentrale DBD des TR besteht aus 2 Zinkfingern, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und binden können. Trijodthyronin (T3) ist ein Ligand für den TR und bindet im C-terminus an die Liganden-Bindedomäne (LBD), die aus zwölf amphipatischen Helices besteht und hormonabhängig mit Coaktivatoren bzw. Corepressoren interagiert (Feng et al., 1998; Hu and Lazar, 1999). Die Bindung von Hormon löst eine Konformationsänderung, vor allem von Helix 12, aus, die zu einer veränderten Interaktion mit Coaktivatoren bzw. Corepressoren und damit zu einer veränderten Genaktivität führt (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung der basalen Repression und transkriptionellen Aktivierung in Abhängigkeit von T3 eines positiv regulierten Gens**

TR interagiert hormonabhängig mit Corepressoren oder Coaktivatoren, die wiederum Histondeacetylasen (HDAC) und Histonacetyltransferasen (HAT) rekrutieren, was zu einer offenen bzw. geschlossenen Chromatinstruktur führt. Die Größe der schwarzen Pfeile zeigt die Genaktivität an.

Neben Coaktivatoren, die Histonacetyltransferase-Aktivität besitzen, spielen auch Ubiquitin-Ligasen wie *E6-associated protein* (E6-AP) eine Rolle (Nawaz et al., 1999). E6-AP wurde erstmals als Protein identifiziert, welches mit dem E6-Protein des humanen Papilloma-Virus interagiert und als Komplex mit diesem p53 ubiquitiniert und somit dessen Degradation durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg einleitet (Scheffner et al., 1993). Viele Kernhormonrezeptoren, darunter auch der Östrogen-Rezeptor (ER) und der TR werden im Zuge ihrer Genaktivierung ubiquitiniert und durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut (Dace et al., 2000; Li et al., 2006). Der ER und TR werden hormonabhängig zu den jeweiligen *Hormone Response Elements* (HREs) von Zielgenen rekrutiert (Liu et al., 2006). Diese zyklische Bindung und Aktivierung benötigt zumindest im Fall des ER die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes und könnte auch auf andere Rezeptoren übertragbar sein (Reid et al., 2003).

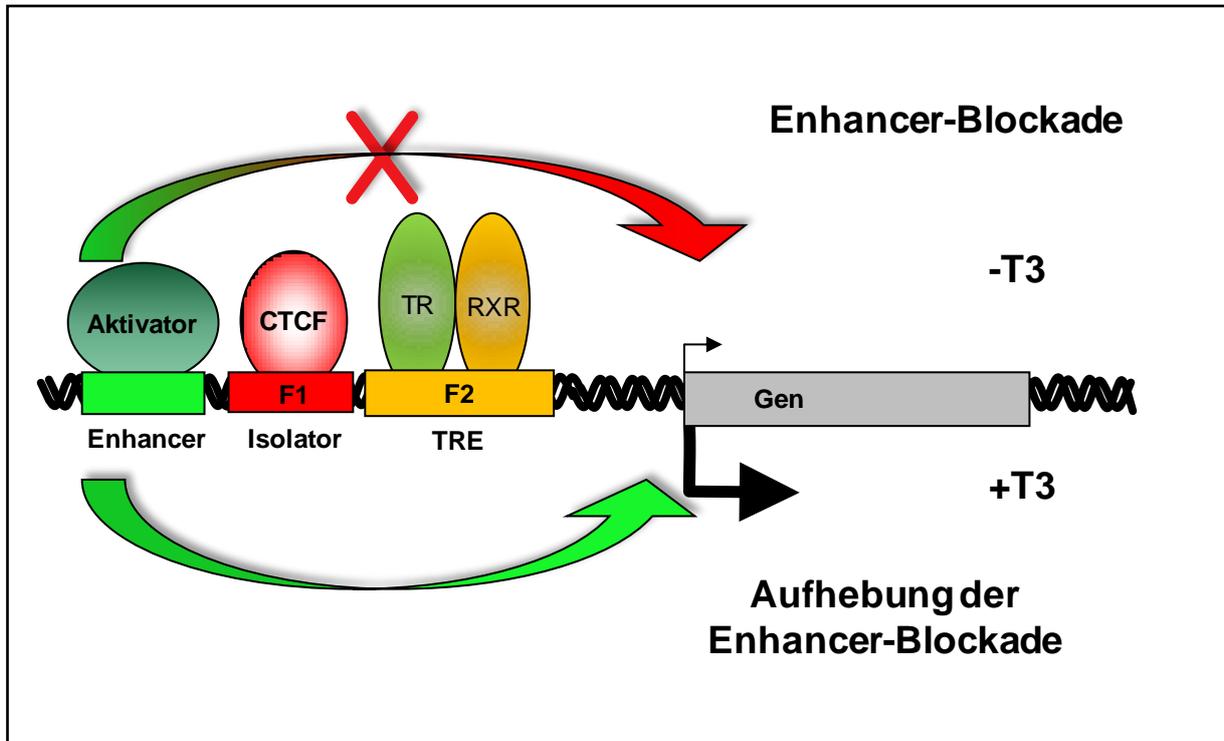
TR bindet häufig zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an die *Thyroid hormone response elements* (TRE), die in sogenannte positive und negative Elemente eingeteilt werden (Glass, 1994). Die TREs bestehen aus halbseitigen Erkennungssequenzen (AGGT(C/A)A) mit verschiedenen Anordnungen, wie z.B. Palindromen, invertierten Palindromen und direkten Wiederholungen mit Abständen von jeweils sechs, vier oder null Nukleotiden (Desvergne, 1994). Bei positiven TREs werden Gene in der Abwesenheit von T3 reprimiert und bei der Bindung von Liganden die Transkription entsprechend stimuliert, wohingegen bei negativen TREs Gene in der Abwesenheit von T3 aktiviert und unter Hormoneinfluss entsprechend reprimiert werden. Zumindest teilweise wird die transkriptionelle Aktivität durch die Rekrutierung von Coaktivatoren bzw. Corepressoren beeinflusst (Oetting and Yen, 2007).

TR-Bindestellen sind in einigen Fällen in unmittelbarer Nähe von Bindestellen für CTCF lokalisiert. Diese enge Nachbarschaft könnte Hinweise auf ein funktionelles Zusammenspiel der beiden Faktoren geben.

## **2.4 Zusammenspiel von CTCF und TR**

Der modulare Aufbau von CTCF und TR-Bindestellen wurde erstmalig für den Silencer aus dem Lysozymgen des Huhnes beschrieben (Baniahmad et al., 1990). Dieses Silencer-Element, das 2,4 kb oberhalb des Startpunktes der Transkription liegt, besteht aus der CTCF-Bindestelle F1 und der Erkennungsstelle F2 für den TR. Beide sind durch 20 Basenpaare voneinander getrennt. Das TRE des F2 ist als ein *everted repeat* angeordnet, welches von 6 Basen getrennt wird (ER6). TR bindet an das F2-Element als Monomer, Homodimer oder bevorzugt als Heterodimer mit dem RXR (Arnold et al., 1996). In

Gegenwart von T3 ist das F1F2-Modul in der Lage, die Transkription synergistisch zu aktivieren bzw. in Abwesenheit von T3 zu reprimieren (Banahmad et al., 1990; Kohne et al., 1993)



**Abb. 2.4: Durch T3 wird die Blockierung von Enhancern aufgehoben**

Schematische Darstellung der hormonsensitiven Enhancer-Blockade. CTCF und das TR/RXR-Heterodimer binden an einen Isolator (F1) und ein benachbartes TRE (F2). Dadurch wird die Aktivierung eines Enhancers auf ein Gen verhindert (rotes Kreuz) und das Gen wird kaum exprimiert. Die Anwesenheit von T3 führt zur Aufhebung der Enhancer-Blockade (grüner Pfeil) und somit zur Steigerung der Genexpression.

Diese Anordnung von benachbarten Bindestellen ist aber nicht auf das Hühner-Lysozymgen beschränkt. Im humanen c-myc-Gen befindet sich ca. 2,1 kb stromaufwärts die sogenannte *TR-N site* des humanen c-myc-Gens (Klenova et al., 1993). Zusätzlich gibt es in diesem Gen noch drei weitere Bindestellen für CTCF. Proximal zum P2-Promotor im ersten Exon befindet sich die *CTCF target site* (CTS) A (Lobanekov et al., 1990). Das benachbarte TRE befindet sich 35 Bp stromabwärts von dieser Bindestelle und wird bevorzugt von TR/RXR-Heterodimeren gebunden (Perez-Juste et al., 2000). Im ersten Exon befinden sich noch zwei weitere CTS B und C. Diese Stellen sind auch bekannt als Pausierungsregionen für die DNA-Polymerase II (Krumm et al., 1995; Strobl and Eick, 1992). CTCF und TR können direkt miteinander interagieren, obwohl eine kooperative DNA-Bindung bislang nicht beobachtet werden konnte (Arnold et al., 1996; Perez-Juste et al., 2000).

Darüber hinaus zeigten Studien mit den kombinierten CTCF/TR-Bindestellen des Hühner-Lysozyngens und des humanen c-myc-Gens, dass T3 die Enhancer-Blockade, die ebenfalls durch diese Elemente vermittelt wird, aufheben kann (Abb. 2.4) (Arnold et al., 1996; Lutz et al., 2003). Ursache dafür ist jedoch nicht der Verlust der CTCF-Bindung, was mittels Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) am Hühner-Lysozyngens gezeigt werden konnte. Es wurde auch beobachtet, dass die Histon H4-Acetylierung im Bereich der CTCF-Bindestelle in Anwesenheit von T3 signifikant ansteigt. Diese mit der Aufhebung der Enhancer-Blockade zunehmenden Acetylierung tritt nicht nur im Bereich der Bindestelle, sondern auch am Enhancer und Promotor auf (Lutz et al., 2003).

Interessante Ergebnisse stammen in diesem Zusammenhang auch von der ICR des H19/Igf2-Locus. Mittels *Footprint*-Analyse wurden in dieser Region Sequenzen außerhalb der CTCF-Bindestellen untersucht. In murinen, primären Embryo-Fibroblasten, die nur die maternale oder paternale ICR tragen, wurden 5 *Footprints* identifiziert, die spezifisch für das maternale Allel sind. Jedes dieser *Footprints* umfasst mindestens zwei hexamere Bindestellen für Kernhormon-Rezeptoren und befindet sich jeweils neben einer CTCF-Bindestelle. Es konnte gezeigt werden, dass die identifizierten Sequenzen Komplexe binden, die den RXR $\alpha$  und ER $\beta$  beinhalten. Wenn Keimzellextrakt von Föten verwendet wird, der zu einem Zeitpunkt isoliert wurde, an dem die unterschiedliche Methylierung der ICR stattfindet, wird beobachtet, dass die *Footprint*-Sequenzen die Rezeptorkomplexe nur dann binden, wenn der Extrakt von männlichen Keimzellen stammt (Szabo et al., 2004). So schien das Zusammenspiel von CTCF und Kernhormonrezeptoren sich nicht nur auf den TR/RXR-Heterodimer zu beschränken und neben der regulierbaren Enhancer-Blockade eventuell auch an der Etablierung des *Imprinting* beteiligt zu sein. Dies war besonders interessant, da bekannt ist, dass CTCF für die Weitergabe des *Imprintings*, jedoch nicht für die Etablierung des Methylierungsmusters benötigt wird (Pant et al., 2003; Schoenherr et al., 2003; Szabo et al., 2004). Jedoch zeigten nachfolgende Studien, dass die Mutagenese der potentiellen NHRs zu keinem Unterschied in der Etablierung des *Imprinting*-Musters führt (Szabo et al., 2006). Somit bleibt die funktionelle Bedeutung der Rezeptor-Bindestellen in der Nachbarschaft zu CTCF-Bindestellen in der murinen ICR noch unklar.

## **2.5 Zielsetzung der Arbeit**

Da regulierte Isolatoren eine wichtige Funktion haben war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Cofaktoren auf hormonsensitive Enhancer-Blockade zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Identifikation von Proteinen gelegt, die sowohl mit CTCF als auch mit TR interagieren, um deren Einfluss im episomalen Enhancer-Blockade-Assay zu

---

untersuchen. Es sollte geklärt werden, ob gemeinsame Co-Faktoren die Regulation erklären können.

Darüberhinaus stellt sich die Frage, ob diese Art an Genregulation einen häufig genutzten Mechanismus darstellt und es weitere kombinierte Bindestellen im menschlichen Genom gibt. Für die beiden kombinierten CTCF- und TR-Bindestellen aus dem Hühner-Lysozymgen und dem humanen c-myc-Gen, die eine hormonsensitive Enhancer-Blockade zeigen, existiert kein geeignetes Zellsystem, in dem die entsprechenden Gene durch T3 reguliert werden und am endogenen Locus eventuelle Veränderungen des Chromatins oder der Rekrutierung von Proteinen an die DNA studiert werden könnten. Daher ist die Identifikation und Charakterisierung weiterer kombinierter Bindestellen Schwerpunkt dieser Arbeit.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

Analysewaage	Janke&Kunkel, Kern, Mettler
Autoklav	Bachofer, Tecnomara
Autoradiographieverstärkerfolien	DuPont
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Blotapparatur	Pharmacia
Einfrierbehälter	Nalgene
Elektrophoresekammern	BioRad; Mighty Small, Hoefer; Peqlab
Entwicklermaschine	M35 X-Omat Processor, Kodak
Filmkassetten	Rego, DuPont
Geigerzähler	Berthold LB1210 B, Bachofer
Geltrockner	Geldryer Model 583, BioRad
Luminometer	SIRIUS, Berthold Detection Systems
Mikroliterpipetten	Gilson, Eppendorf
Mikroskope	Zeiss
pH-Meter	Schott, inoLab
Pipettierhilfe	Pipettboy, Integra Biosciences
Quarzküvetten	Hellma
Reinstwasser-Filteranlage	Millipore
Rollinkubatoren	Bachofer
Rotator	Neolab rotator 2-117, MAGV
Schüttler	Mixer 5432, Eppendorf
Sonifier	B12, Branson
Spannungsgeber	Feathervolt 250, Stratagene
Spektralphotometer	Ultraspec 3100, Amersham
Szintillationszähler	1600 TR, Packard Bell
Thermocycler	Rotorgene RG-3000, Corbett Research
Thermo-Schüttelschrank	Infors, Bellco Glass, Memmert
Trockenschränke	Memmert, Bachhofer
Tubesealer	Beckmann
UV-Transilluminator	Bachofer (366nm), UVP (254nm)
Vakuumzentrifuge	Bachofer, Savant

---

Videoanlage	INTAS
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal
Zentrifugen	Hettich Mikroliter
	Heraeus Minifuge RF
	Heraeus Cryofuge 20/30
	Beckman J2-MC Kühlzentrifuge
	Beckman L-70 und XL 70
Zentrifugenrotoren	Beckman VTI 90
	Beckman Ti 50.2
	Beckman JA 10
	Beckman JA 17

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Einfriergefäße	Cryotube, Nunc
Einwegkanülen	Braun
Einwegspritzen	Dispomed, Braun
Faltenfilter	Ø 240 mm, Schleicher&Schuell
Filter (0,45 µm)	Millipore
Filtertips	Gilson, Greiner
Gaze	Param
Glasperlen	Roth
Glaspipetten	Brand
Handschuhe	Roth
Membran	Hybond XL, Amersham
Pasteurpipetten	Hirschmann
PCR-Gefäße	Biozym
PCR-Gefäße ( <i>realtime</i> )	Corbett Research
Petrischalen/ Gewebekulturschalen	Greiner
Photometerküvetten	Ratiolab
Pipettenspitzen	Gilson, Greiner, Sarstedt
PVDF-Membran	Immobilon, Millipore
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Brand
Reaktionsgefäße 1,5 ml/2,0 ml	Eppendorf
Röntgenfilme	X-Omat AR, Kodak
Rundfilter	Ø 110 mm, Schleicher&Schuell

---

Skalpell	Braun
Schraubdeckelgefäße	Sarstedt
Sterilfilter	Minsart®, Sartorius
Tücher	fusselfrei, Kimberly-Clark
Whatman-Papier	3MM, Whatman
Zellkulturschalen, -flaschen	Greiner
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Falcon, TPP

### **3.3 Chemikalien**

Acrylamid	Roth
Agar	BD Biosciences
Agarose	IBI, Roth
AG®1-X8 Resin	BioRad
Aktivkohle	Sigma
all-trans Retinsäure	Sigma
Ampicillin	Merck
APS	Serva
ATP	Boehringer Mannheim
Bactotrypton	Applichem
Betain	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck
Bradford Reagenz	Roth
Bromphenolblau	Merck
BSA	Roche
Caesiumchlorid	Roth
Calciumchlorid	Roth
Chloramphenicol	Roth
Chloroform	Merck
9-cis-Retinsäure	Sigma
Coomassie Brilliantblau R-250	Merck
D-Glucose	Merck
DTT	Sigma
DMEM	Gibco
DMSO	Serva
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	MBI Fermentas

---

EDTA-Natriumsalz	Roth
EGTA-Natriumsalz	Serva
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	10 mg/ml, Roth
Formamid	Fluka
FCS	Gibco
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycogen	Boehringer
G418	Gibco
Glycin	Merck
Glycogen	Serva
HEPES	Roth
Hygromycin	PAA
IPTG	Applichem
Iscove`s DMEM	Gibco
Isopropanol	Merck
jetPEI™	Biomol
Kalbsthymus-DNA	Boehringer
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Roth
Kalium-di-hydrogenphosphat-3-hydrat	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Lachssperma-DNA	Sigma
Lithiumchlorid	Sigma
D-Luciferin	PJK GmbH
Magermilchpulver	Fluka
Manganchlorid	Merck
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Serva
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Merck
Natriumacetat	Roth
Natrium-Bicarbonat	Serva
Natriumbutyrat	Sigma
Natriumchlorid	Roth

---

Natriumdeoxycholat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natrium-di-hydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
o-Nitro-phenol- $\beta$ -Galactopyranosid	Roche
NP-40	Serva
Oligonucleotide	Invitrogen
PenStrep-Lösung	Gibco
Phenol	Roth
PMSF	Sigma
Protein A-Agarose	50 % slurry, Upstate
Proteinmarker (6H, 7B)	Sigma
Puromycin	Fluka
Radiochemikalien	Amersham
Roti <sup>®</sup> -Quant	Roth
RPMI	Gibco
Saccharose	Serva
Salzsäure	Merck
SDS	ultra pure, Roth
Select Peptone (Casein Hydrolysat)	Difco
Sephadex G50	Pharmacia
Streptomycin	Sigma
TEMED	BioRad
Tetrazyklin	Serva
T3	Sigma
Tris	Merck
Triton X-100	Serva
Tween 20	Roth
Xylencyanol	Sigma

### **3.4 Enzyme**

Alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA-Polymerase	Promega

---

Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
Lysozym	Boehringer
Pfu-Polymerase	MBI Fermentas
Proteinase K	MBI Fermentas
RNAse A	DNase-frei, Sigma
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polymerase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase	Boehringer, NEB
Trypsin	Merck

### **3.5 DNA-Längenstandards**

#### **λ DNA EcoRI/HindIII (MBI)**

Fragmentgrößen (bp)

21227

5148

4973

4268

3530

2027

1904

1584

1375

947

831

564

125

#### **pUC19 DNA MspI (MBI)**

Fragmentgrößen (bp)

501

489

404

331

242

190

147

111

110

67

### **3.6 Klomplettausrüstungen**

GeneAmp® RNA PCR Core-Kit

Roche

GFX™ PCR, DNA and Gel band  
purification-Kit

Amersham

Plasmid Midiprep-System	Marligen Biosciences
pGEM <sup>®</sup> - Easy Vector-System	Promega
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction-Kit	Qiagen
RNeasy <sup>®</sup> Mini-Kit	Qiagen
SYBR <sup>®</sup> Green JumpStart <sup>™</sup>	
Taq ReadyMix <sup>™</sup>	Sigma
TNT <i>in vitro</i> Transkription/ Translation-Kit	Promega

### 3.7 Protein-Molekulargewichtsmarker

#### 7B, gefärbt (Sigma)

Größe (kD)

175

116

93

65

57

36

31

### 3.8 Bakterienstämme

#### Escherichia coli XL1-Blue MRF<sup>-</sup> (Stratagene)

Der Stamm besitzt den Genotyp:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F^{\prime}proAB lacI^qZ\Delta M15Tn10 (Tet^r)]$ .

Er enthält keine der bekannten Restriktionssysteme [ $\Delta(mcrA)183$ ,  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ ], und besitzt keine Endonuklease (*endA*). Es fehlt auch die Fähigkeit zur Rekombination (*recA*). Eine Resistenz besteht gegen Tetracyclin.

#### BL 21(DE 3) pLys s (Studier et al., 1990)

Dieser Stamm trägt den Genotyp  $F^{\prime} ompT gal[dmc][lon] hsdS_B(r_B^{\prime} m_B^{\prime})$  mit DE3, einem  $\lambda$ -Prophagen, der das IPTG induzierbare T7-Polymerase-Gen trägt. Er besitzt weder *lon*- noch *ompT*-Proteasen. Weiterhin enthält er ein Plasmid, welches das T7-Lysozym und die

Chloramphenicol-Acetyltransferase codiert. Er wurde zur Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet.

### **3.9 Eukaryontische Zelllinien**

#### HEK-293T (ATCC-Nr. CRL-11268™)

HEK-293 Zellen wurden aus primären embryonalen humanen Nierenzellen etabliert, die mit Adenovirus 5 DNA transformiert wurden. 293T Zellen sind ein Derivat der 293 Zelllinie, die zusätzlich ein temperatursensitives Gen für das SV40-Antigen tragen. Sie sind in hohem Maß transfizierbar und replizieren sehr effizient Plasmide, die einen SV40-Replikationsursprung besitzen. Sie wachsen als Monolayer mit epithelialer Morphologie auf Gewebekulturschalen. Sie wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep in 5%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37°C kultiviert.

#### MCF-7 (ATCC-Nr. HTB-22™)

MCF-7-Zellen entstammen einem Pleuraerguss einer 69-jährigen Krebspatientin mit metastasierendem Mammakarzinom. Die Zelllinie wurde 1970 etabliert und zeigt ein epithel oder kolonieförmiges adhärentes Wachstum in Zellkulturschalen. Zur besonderen Charakteristik dieser Zellen zählt die starke Expression des  $\alpha$ -Subtypes der Östrogenrezeptoren, wodurch eine starke Reaktivität auf Östrogene resultiert. Die Kultivierung erfolgte in DMEM/HAM F12-Medium im Verhältnis 1:1 mit 10% FCS und 1% Pen/Strep in 5%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre.

#### HepG2 (ATCC-Nr. HB-8065™)

Die humane Zelllinie HepG2 wurde 1979 aus einer Leberbiopsie eines Kindes, das an einem primären Hepatoblastom erkrankt war, isoliert. Diese Zelllinie besitzt noch viele Funktionen, die für normale humane Hepatozyten typisch sind. In Kultur sezernieren Hep G2-Zellen die meisten Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, Fibrinogen,  $\alpha$ -Fetoprotein und Apolipoproteine in das Medium. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen HepG2-Zellen als flache, polygonal wachsende Zellen mit einer Größe von 12-19 $\mu$ m. Sie wachsen größtenteils, aber nicht ausschließlich als Monolayer. Im Zellrasen zeigen HepG2-Zellen epitheloides Wachstum, das am Rand unregelmäßiger und aufgebläht erscheint. Bei längeren Kultivierungszeiten kommt es zu einem dreidimensionalen Wachstum. In den Zellhaufen sind die interzellulären Verbindungen sehr intensiv, so dass eine Dissoziation mit Trypsin erschwert ist. Die Kultivierung erfolgte in DMEM Medium mit 10% FCS bei 37°C in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### N2a (Neuro-2a, ATCC-Nr. CCL-131<sup>TM</sup>)

Diese Zelllinie besteht aus Maus-Neuroblastomzellen. Sie weisen die Morphologie von neuronalen und amöboiden Stammzellen auf. Sie wachsen adhärent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen. Sie werden in DMEM mit 10% FCS bei 37° C in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

### N2aβ

Die klonale Zelllinie N2a wurde stabil mit der β1 Isoform des humanen TR transfiziert und in DMEM mit 10% FCS kultiviert (Lebel et al., 1994). Durch die stabile Integration besitzen sie ein Hygromycin-Resistenzgen.

### HeLa (ATCC-Nr. CCL-2<sup>TM</sup>)

HeLa-Zellen sind aus einem stark wachsenden Zervixkarzinoms gewonnen, die seit 1951 in Gewebekultur gezüchtet werden. Die Patientin Henrietta Lacks, von deren Zervixkarzinom diese Zellen abstammen, gab dieser Zelllinie ihren Namen. Die Kultivierung erfolgte in DMEM Medium mit 10% FCS bei 37°C in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

## **3.10 Antibiotika**

**Ampicillin**-Vorratslösung: 100 mg/ml in dd H<sub>2</sub>O

Einsatz in Flüssigkultur und Agarplatten 100 µg/ml

**Chloramphenikol**-Vorratslösung: 34mg/ml in Ethanol

Einsatz zur Amplifikation 1:200

**Kanamycin**-Vorratslösung: 50mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

Einsatz in Flüssigkultur und Agarplatten 100µg/ml

**Puromycin**- Vorratslösung 2mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

Einsatz in Flüssigkultur zwischen 1,5 und 14 µg/ml

**Geneticin (G418)** Vorratslösung 350 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

Einsatz in Flüssigkultur 800µg/ml

## **3.11 Vektoren**

### Reporterkonstrukte

- (DR4)<sub>2</sub>-tkluc (Dana et al., 1994)
- pBSK (CTCF/TR Bindestellen) O. Weth, siehe Anhang

- pCMV-LacZ U. Deutsch, Bad Nauheim
- pGL3control Promega
- p3 $\alpha$  F. Rüger, (Diplomarbeit 2001)
- p3 $\alpha$  (CTCF/TR Bindestellen) O. Weth, siehe Anhang
- p3 $\alpha\Delta$ enh F. Rüger, (Diplomarbeit 2001)
- pGL3 Promotor Promega
- pREP (CTCF/TR Bindestellen +-Enh.) O. Weth, siehe Anhang
- pRep C. Weth, Doktorarbeit
- pRep E C. Weth, Doktorarbeit
- pRep F1F2 C. Weth, Doktorarbeit
- pRep F1F2 E C. Weth, Doktorarbeit
- pRep 5x(F1F2) C. Weth, Doktorarbeit
- pRep 5x(F1F2) E C. Weth, Doktorarbeit

#### Plasmide für die bakterielle Expression

- pGEX-4T1avi-CTCF J. Leers
- pGEX-4T1avi-CTCF Zf J. Leers
- pGEX-4T1avi-CTCF Nterm J. Leers
- pGEX-4T1avi-CTCF Cterm J. Leers
- pGEX-4T1avi-TR $\beta$  C. Weth, Doktorarbeit
- pGEX-4T1avi J. Leers
- pGEX-4T-E6-AP (Nawaz et al., 1999)
- pGST-CTCF H. Greb

#### Plasmide für die eukaryontische Expression

- pcDNA3 Flag CTCF Jörg Leers
- pcDNA3 Flag E6AP O. Weth, siehe Anhang
- pcDNA3 Flag E6AP CtoA O. Weth, siehe Anhang
- pcDNA3 Flag linker O. Weth, siehe Anhang
- pcDNA6-TR Invitrogen
- pCMV Sport6 Trip12 RZPD (IRAVp968B0762D6)
- pEGFP-C2 Clontech
- pRS-hTR $\beta$  (Thompson and Evans, 1989)
- pT7-hTR $\beta$  A. Baniahmad, 1991

Sonstige

- |                          |   |
|--------------------------|---|
| • pBluescript II SK(+/-) | Stratagene  |
| • pBK-CMV                | Stratagene  |
| • pCDNA3                 | Invitrogen  |
| • pGEM E6-AP C→A         | (Huibregtse et al., 1995)   |
| • pREP4                  | Invitrogen  |
| • pREP4-ss               | J. Leers, aus dem kommerziellen Vektor pREP4 wurden der RSV-Promotor und die Polyadenylierungsstelle entfernt |

**3.12 Antikörper**

Anti-CTCF (c-terminal)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Hühner CTCFs gerichtet ist (Dr. Klenova). 5 µl für ChIP
Anti-RNA Polymerase II	PolII, Santa Cruz N-20, 2 µg für ChIP
Anti-mouse-HRP	Meerettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Maus-Immunglobuline 1:20.000 in PBS-T für Western Blot
Kontroll-IGG	Kaninchen, Abcam ab46540 1 5µg für ChIP
Kontroll-IGG	Maus, Santa Cruz sc-2025 5µg für ChIP
Anti-TRβ	Affinity BioReagents, MA1-216 Klon J52 Monoklonaler Maus-Antikörper 1-5 µl für ChIP
Anti-Gapdh	Polyklonale Kaninchen-Antikörper, 1:5000 in PBS-T für Western Blot
Anti-SCC1 (Cohesin)	Kaninchen, Abcam ab992 1-2µg für ChIP
Anti-Flag	Maus, Sigma M2 1:6000 in 0,5% Milch für Western

**3.13 Allgemeine Vorbereitungen**

Gelpuffer und Nährmedien wurden ausschließlich mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt, sterile Lösungen durch Autoklavieren oder bei Vorliegen hitzelabiler Komponenten durch Sterilfiltration hergestellt. Die Konzentrationsangaben der Lösungen beziehen sich auf

---

deren Endkonzentration. Glasgeräte wurden autoklaviert oder 4 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert.

## 4 Methoden

### 4.1 Allgemeines Arbeiten mit DNA

#### 4.1.1 Lagerung

Die Lagerung von DNA erfolgte in Wasser oder TE-Puffer bei -20°C oder 4°C.

TE-Puffer	
Tris/HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

#### 4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

##### 4.1.2.1 Minipräparation

Die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab wurde nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Sie dient der schnellen und einfachen Aufreinigung einer größeren Anzahl von Plasmid enthaltenden Bakterienkolonien. Einzelne Klone wurden von einer Agarplatte isoliert und in 3 ml Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) mind. 12 Stunden bei 37°C geschüttelt. Von dieser LB-Übernachtskultur wurden 1,5 ml Bakteriensuspension mit 6.000 rpm für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde die Probe gevortext und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 µl der Lösung 3 dazu pipettiert, die Proben anschließend invertiert und die Zelldebris 3 min mit 13.000 rpm bei RT abzentrifugiert. 380 µl des Überstands, der die Plasmid-DNA enthält, wurden vorsichtig abgenommen und kräftig mit 300 µl Isopropanol gemischt. Das Ausfällen der DNA erfolgte durch eine anschließende Zentrifugation für 3 min mit 13.000 rpm bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach restlosem Entfernen des Überstandes durch Trocknen der Proben in der *Speedvac* oder im Brutschrank wurde das Pellet bei RT unter für 30 min in 30 µl TE-Puffer mit RNase (20 µg/ml) gelöst. Für Restriktionsverdauung wurden diesem Ansatz jeweils 1 µl entnommen.

<b>Lösung 1</b>		<b>Lösung 2</b>	
Glukose	50 mM	NaOH	0,2 N
Tris/HCl pH 8,0	25 mM	SDS	1%
EDTA	10 mM	frisch ansetzen, ddH <sub>2</sub> O vorlegen	

<b>Lösung 3</b>	
Kaliumacetat	24,5 g
Eisessig	35 ml
pH 4,8 einstellen, mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen	

#### 4.1.2.2 Midipräparation

Zur Aufreinigung mittlerer Mengen an DNA wurde die Komplettausrüstung von Marligen Biosciences verwendet. Dabei wurde strikt nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

#### 4.1.2.3 Maxipräparation mit CsCl-Dichtegradient

Zur Aufreinigung größerer Mengen an DNA wurde ebenfalls die modifizierte Bakterienaufschlussmethode nach Birnboim und Doly verwendet. Die Abtrennung der Plasmid-DNA von RNA und genomischer Bakterien-DNA erfolgte mit Hilfe zweimaliger Dichtezentrifugation in einem CsCl-Gradienten (Radloff et al., 1967). Zu 360 ml TB-Medium wurden 40 ml Phosphat-Puffer, zur Selektion geeignete Antibiotika und Bakterien aus einer Vorkultur gegeben. Nach einer Inkubation von 6-8 h bei 37°C im Schüttelinkubator wurde die Bakterienkultur optional zur Plasmidamplifikation mit 400 µl einer Chloramphenicol-Lösung (34 mg/ml, in Ethanol) versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 10-16 Stunden wurden die Zellen für 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 10 ml Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 20 ml frisch bereiteter Lösung 2 wurde der Aufschluss sehr gut gemischt und für 5-10 min auf Eis inkubiert, was zur DNA-Denaturierung führt. Nach Zugabe von 15 ml Lösung 3, starkem Schütteln und erneuter Inkubation für 5 min auf Eis, erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 5000 rpm und RT. Dieser Schritt dient der Neutralisierung, wobei hauptsächlich Plasmide wieder in Lösung gehen. Der Überstand wurde zu gleichen Volumenteilen in zwei 50 ml Falcons überführt, mit 0,6 VT Isopropanol (20 min, RT) gefällt und anschließend präzipitiert (10 min, 5000 rpm, RT).

Die getrockneten Pellets wurden in je 1,5 ml TE-Puffer durch Schütteln bei 37°C gelöst und wieder in einem Falcon vereint. Dann wurden 4,25 g CsCl zu jeder Probe hinzugefügt und bei 37°C gelöst. Danach wurden 500 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm, bei der große Mengen an Proteinen abgetrennt wurden. Der Überstand wurde in ein Beckmann Quickseal™-Zentrifugenröhrchen (13 x 51 mm) überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde daraufhin mit einer 50%-igen (w/w) CsCl-Lösung oder ddH<sub>2</sub>O so aufgefüllt, dass die Probe ein Gesamtgewicht zwischen 9,5 und 9,8 g besaß. Es folgte das Zuschweißen des Zentrifugenröhrchens und die Überführung in einen Vertikalrotor (Vti90). Der erste Gradient wurde durch eine Ultrazentrifugation bei 55000 rpm über Nacht ausgebildet. Bei diesem Schritt trennen sich die Bestandteile nach ihrer spezifischen Dichte im CsCl-Dichtegradienten auf. Die dann sichtbare Plasmid-DNA-Bande wurde mit Hilfe einer Injektionskanüle und einer Einwegspritze abgesaugt, in ein neues *Quick-Seal*-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 50%-iger CsCl-Lösung (w/w) auf 9,5-9,8 g gebracht und für 4 h bei 70000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde erneut abgezogen, in ein 15 ml Falcon überführt und mit je 2 ml CsCl-gesättigtem Isopropanol überschichtet. Durch intensives Vortexen ging das restliche Ethidiumbromid aus der DNA-Lösung in die obere Isopropanolphase über, die abgenommen und entsorgt wurde. Dieser Vorgang wurde sofort wiederholt, bis beide Phasen klar waren, um dann anschließend die untere Phase noch zweimal mit CsCl-gesättigtem Isopropanol zu überschichten und auszuschütteln. Daraufhin wurde die wässrige Phase mit 2 VT H<sub>2</sub>O verdünnt, die DNA durch Zugabe von 0,6 VT Isopropanol und 10-minütiger Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 5000 rpm) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Ausbeute in bis zu 500 µl TE-Puffer gelöst. Die Menge der DNA wurde anschließend spektralphotometrisch bestimmt und die Qualität der Plasmide durch Restriktionsspaltung und Gelelektrophorese überprüft.

<b>TB-Medium</b>	
Select Peptone	12 g/l
Hefe-Extrakt	24 g/l
Glycerin	0,4% (v/v)
Autoklaviert	

<b>Phosphat-Puffer</b>	<b>10x</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72 M
Autoklaviert	

### 4.1.3 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Isolierung genomischer DNA wurde zuerst das Medium von den eukaryontischen Zellen abgesaugt, die Zellen mit 1xPBS gewaschen und daraufhin mittels Trypsin von der Schale abgelöst. Um die Trypsinierung zu stoppen, wurden die Zellen mit Medium versetzt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 1000 rpm geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem 5 – 10fachen Volumen an Extraktionspuffer resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen 3 h bei 55°C inkubiert. Nach dem Abkühlen (ca. 15 min bei RT) wurde ½ VT Phenollösung hinzugegeben, 10 min rotierend inkubiert und mit 1/2 VT Chloroform gemischt. Nach erneutem 10minütigem Rotieren erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min, 8000 rpm). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 VT Chloroform versetzt. Es erfolgte wiederum eine rotierende Inkubation für 10 min und eine anschließende Zentrifugation bei 8000 rpm für 10 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und einer Ethanol-Fällung unterzogen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in TE gelöst, wobei die Menge an TE von der Pelletgröße abhängig ist.

<b>Extraktionspuffer</b>	
NaCl	200 mM
EDTA	100 mM
SDS	0,2%
Proteinase K	100 µg/ml
frisch ansetzen	

### 4.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Beseitigung von Proteinen aus wässriger DNA-Lösung (Ausubel, 1989 ). Durch eine darauffolgende Ethanolpräzipitation werden Salze entfernt.

Die wässrige DNA-Lösung wurde zunächst auf ein geeignetes Volumen (mindestens 200 µl) mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, mit 1 VT equilibriertem Phenol versetzt und mit einem Vortexer gründlich vermischt. Ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm diente der Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge an Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und gut vermischt. Nach erneuter Phasentrennung (10 min, 13.000 rpm) wurde die obere Phase nochmals einer Aufreinigung mit Chloroform unterzogen. Anschließend wurde die wässrige und jetzt

proteinfreie Phase zur Fällung der DNA mit 2 VT 100%-igem Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation für 15 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm). Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach einer erneuten kurzen Zentrifugation getrocknet. Das Lösen der DNA in TE oder ddH<sub>2</sub>O erfolgte für 10 min auf einem Rüttler.

<b>NaAc-Lösung</b>	
Natriumacetat	3 M
pH mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen	

#### 4.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Ausubel, 1989 ; Ausubel F. M., 1989) erfolgte durch Absorbionsmessung bei 260 nm in einer Quarzküvette. Dabei wurde die DNA in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Konzentration wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$c = OD_{260} \times n \times f$$

c: Konzentration

n: 50 µg/ ml für dsDNA, 40 µg/ ml für ssDNA und RNA, 30 µg/ ml für Oligonukleotide bei 1 cm Küvetten-Schichtdicke

f: Verdünnungsfaktor

OD<sub>260</sub>: Optische Dichte bei 260nm

#### 4.2 Enzymatische Modifikation von DNA

Modifikationen von DNA wurden mit Hilfe von Enzymen durchgeführt, die gemäß den Herstellerangaben verwendet wurden.

### 4.2.1 Restriktionsspaltung

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen geschnitten werden (Roberts and Macelis, 1991). Diese Enzyme erkennen eine spezifische Nukleotidabfolge einer doppelhelikalen DNA, an der sie entweder direkt (Typ II Endonukleasen) oder an einem davon entfernten Bereich (Typ I Endonukleasen) schneiden können. Hierbei entstehen überstehende (*sticky*) Enden oder glatte (*blunt*) Enden (Ausubel, 1989). Die Aktivität eines jeden Enzyms ist in *Units* (engl.: Einheiten) angegeben. Ein *Unit* ist die Menge eines Enzyms, die nötig ist, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen. Im Allgemeinen wurden 2-3 Enzymeinheiten pro µg Plasmid-DNA verwendet und 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 4.2.2 Auffüllen von 5'-Enden

Wenn nach Restriktionsverdau zwei DNA-Fragmente entstanden, deren Enden nicht zueinander komplementär waren, und diese miteinander ligiert werden sollten, war es notwendig, diese Enden durch eine Polymerase-Reaktion zu glatten Enden mit Desoxynukleotiden aufzufüllen. Das hierfür verwendete Enzym war das Klenow-Enzym, das der großen Untereinheit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase I aus *E. coli* entspricht, oder die T4 DNA Polymerase. Diese Enzyme katalysieren die Addition von Desoxynukleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe eines DNA-Moleküls, das einen 5'-Überhang besitzt und somit sowohl als Primer als auch als Matrize dient. Ferner besitzt das Klenow-Enzym eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Für das Auffüllen von 5'-Überhängen wurden bis zu 5 µg DNA in 1 x Klenow- oder T4-Reaktionspuffer mit 1 µl eines 25 mM dNTP-Mixes und 10 *Units* Klenow-Enzym oder T4 DNA Polymerase in einem Volumen von 10 µl für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Für 10 µg DNA wurden 10 *Units* Enzym der Firma MBI zusammen mit 4 µl eines 4 mM dNTP-Mixes eingesetzt und für 30 min bei RT inkubiert.

### 4.2.3 Dephosphorylierung

Das Einbringen eines DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor, welcher zwei gleiche Enden aufweist, wird durch die Religationseigenschaft des Vektors erschwert. Durch die hydrolytische Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppen des Vektors mittels alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIAP) kann dessen Re-Ligation verhindert werden. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte mit einer Enzym-Einheit für 1 Stunde bei 37°C im

zugehörigen Reaktionspuffer. Nach beendeter Reaktion wurde die Phosphatase durch Phenol/Chloroform-Extraktion oder Gelelektrophorese von der DNA separiert.

#### 4.2.4 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert ATP- und  $Mg^{2+}$ -abhängig die Verbindung von 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen zu Phosphodiesterbindungen (Ausubel, 1989). Bei glatten Enden wurden dabei Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:4 und bei überhängenden Enden 1:2 in Ligase-Puffer mit einem Enzym-*Unit* Ligase pro  $\mu g$  Gesamt-DNA inkubiert. Im Falle kohäsiver Enden erfolgte die Ligation für mind. 3 Stunden bei RT, im Falle glatter Enden über Nacht bei 4°C.

#### 4.2.5 Multimerisieren und Klonieren von DNA-Fragmenten in einen episomalen Vektor

Ausgangspunkt für die Klonierung waren PCR-Produkte der jeweiligen genomischen Bereiche. Diese wurden mit der Taq-Polymerase amplifiziert, welche die Eigenschaft besitzt, nach Ende der Strangsynthese einen 5'-Adenosin-Überhang zu bilden, so dass das Produkt direkt in den kommerziellen Vektor pGEM<sup>®</sup>-T kloniert werden kann.

Die Multimerisierung erfolgte in dem Vektor pBSK in drei Schritten. Zunächst wurde das Insert mit den kombinierten Bindestellen mittels der SpeI/XbaI-Schnittstellen aus dem pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ausgeschnitten und in die gleichen Schnittstellen des Vektors pBSK einkloniert. Das zur Multimerisierung benötigte Insert wurde durch Verdau des pBSK-Vektors mit SpeI/NotI präpariert. Parallel wurde in einem zweiten Ansatz der Vektor mit den Enzymen NotI/XbaI geschnitten. Dies führt zu einem linearisierten Vektor mit eingebautem Insert. Durch Ligation des Inserts mit dem linearisierten Vektor kommt es zur Bildung eines Dimers. Die Erkennungssequenz der kompatiblen Enden der SpeI- und XbaI-Schnittstellen werden hierbei zerstört. Die Tetra- bzw. Pentamerisierung erfolgte nach dem gleichen Prinzip, jedoch dienten teilweise die neu erhaltenen Plasmide als Ausgangspunkt.

Sowohl die monomeren als auch die multimeren Inserts wurden im nächsten Schritt direktional in den Vektor p3 $\alpha$ -5'-3' (Rüger, Diplomarbeit) kloniert. Dieser Vektor ist ein Derivat des kommerziellen Vektors pGL3 (Promega), welcher neben dem durch einen SV40-Promotor aktiviertes Luciferase-Gen und einem SV40-Enhancer zusätzlich zum Ursprungsvektor eine zweite *Multiple Cloning Site* (MCSII) zwischen Reporter gen und

Enhancer enthält. Das direktionale Klonieren erfolgte durch Linearisierung des Vektors mittels SpeI in der MCSII und dem Einklonieren des SpeI/XbaI-geschnittenen Inserts. Aufgrund der kompatiblen Enden der beiden Enzyme kann der Einbau des Inserts in beide Richtungen erfolgen. Die Orientierung des Inserts wurde durch einen Testverdau ermittelt, die auf Grundlage der Position der wiederhergestellten SpeI-Schnittstelle beruhte.

Im finalen Schritt wurde der für die Luciferaseexpression verantwortliche regulatorische Bereich ausgeschnitten und in den Vektor pREP-ss, ein Derivat des kommerziellen Vektors pREP4, aus dem der RSV-Promotor und die Polyadenylierungsstelle entfernt wurden, in die Schnittstellen NotI und NheI einkloniert.

#### 4.2.6 Sequenzierung von DNA

Um Plasmide, die aus einer Minipräparation stammen, zu sequenzieren, musste die DNA zuvor noch einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließenden Ethanol-Fällung unterzogen werden. Plasmide aus einer Maxipräparation konnten direkt verwendet werden. 0,6 µg des zu sequenzierenden Plasmids wurden zusammen mit 20 pmol geeignetem Primer in einem Volumen von 7 µl in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die Sequenzierung wurde von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

#### 4.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren, um spezifische DNA-Fragmente in einer exponentiell verlaufenden Polymerisierungsreaktion zu amplifizieren. Drei wesentliche Komponenten kommen dabei zum Einsatz: eine hitzestabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase, ein Plasmid oder ein DNA-Fragment, das der Polymerase als Matrize dient und schließlich zwei Primer, die komplementär zu den flankierenden Regionen der zu amplifizierenden Sequenz sind, an die sie antiparallel hybridisieren und deren freies 3'-OH Ende der Polymerase als Substrat für die Addition von freien Desoxynukleotiden dient.

Die Reaktionen der PCR erfolgen zyklisch, wobei die Einzelreaktionen der PCR temperaturabhängig sind und in drei Schritten verlaufen. Der Denaturierung bei 94°C, bei der sich die beiden Stränge der DNA trennen, folgt die Hybridisierung der Primer bei 45-65°C an die DNA-Einzelstränge. Die anschließende Elongation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, schließt den Zyklus ab. Für gewöhnliche Amplifizierungen wurde die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Sollten die PCR-Produkte jedoch für Klonierungen dienen, wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da sie eine *Proof Reading*-

Aktivität besitzt. Bei der Auswahl von geeigneten Primern wurde darauf geachtet, dass sie eine Länge von 17-28 Nukleotiden im hybridisierenden Bereich und einen GC-Gehalt von 50-60% besaßen. Die Primer sollten am 3'-Ende ein G oder C besitzen und die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) optimalerweise zwischen 55 und 80°C liegen.

#### **4.2.8 *realtime*-PCR**

Die *realtime*-PCR wird angewendet, um eine quantitative Echtzeitanalyse von spezifischen DNA-Fragmenten durchzuführen. Die Produktzunahme wird durch Fluoreszenzlicht gemessen, welches in Abhängigkeit zur Produktmenge entsteht. Hierfür wurde der Farbstoff *SYBR Green I* verwendet. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 480nm, das Emissionsmaximum lag bei 520nm. Der Farbstoff bindet sequenzunabhängig in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA und nur gebundener Farbstoff fluoresziert nach Anregung. Das Amplikon sollte eine Länge von 100-200 bp besitzen. Bei diesem sensiblen System sind die Reaktionszeiten des Amplifizierungszyklus wesentlich kürzer als bei der herkömmlichen PCR (Denaturierung 95°C 10 sec, Annealing 58-60°C 10 sec, Verlängerung 72°C 10 sec). Zum Abschluss der Reaktion wurde eine Schmelzkurve erstellt, um die Eigenschaften des amplifizierten Produkts bestimmen zu können. Verwendet wurde das *SYBR<sup>®</sup> Green JumpStart<sup>™</sup> Taq ReadyMix<sup>™</sup>* von Sigma. Dieser Mix enthält die für die Amplifikation der DNA erforderliche Reagenzien *SYBR Green I fluorescent dye*, Taq-Polymerase,  $Mg^{2+}$ , Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und dNTPs (wobei dTTP durch dUTP ersetzt wurde) und liegt als 2fach Mix vor. In einen 10 µl PCR-Ansatz wurden zu 5 µl 2fach *SYBR Green Mix* 3µl  $H_2O$ , je 0,5 µl Primer (10 pmol/µl) und 1 µl Template pipettiert.

### **4.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten**

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, das die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung nutzt. Dieses Verfahren wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt.

### 4.3.1 Agarosegele

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten, die eine Länge über 100 bp aufweisen, eignen sich Agarosegele als Matrix (Southern, 1979). Der Trennbereich dieser Gele kann durch Einstellung der Agarosekonzentration (0,6 – 3,5% (w/v)) variiert werden.

Zur Herstellung analytischer Agarosegele wurde Agarose in 1xTAE-Puffer in einem Mikrowellenherd erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben und die Gel-Lösung in eine Flachbettapparatur gegossen (Johnson and Grossman, 1977). Nach Erkalten des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit 1xTAE-Puffer befüllt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 1/6 VT Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zum Längenvergleich wurde 0,5 µg eines DNA-Längenstandards in einer weiteren Spur aufgetrennt. Die bei der Elektrophorese verwendete Spannung betrug 5-10 V/cm Elektrodenabstand. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht (266 nm) fotografiert. Die DNA-Banden waren unter UV-Licht sichtbar, da Ethidiumbromid die Eigenschaft besitzt, zwischen die DNA-Basen zu interkalieren und dann zu fluoreszieren.

<b>TAE-Puffer</b>	<b>50x</b>
Tris	242 g/l
Eisessig pH 7,7	57,1 ml
EDTA	18,6 g/l

<b>Gel-Ladepuffer</b>	
Fikoll	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Xylencyanol	0,05% (w/v)

<b>Ethidiumbromid- Lösung</b>
10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O

### 4.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um ein spezifisches DNA-Fragment aus einem DNA-Gemisch zu isolieren, wurden ebenfalls Agarosegele zur Auftrennung verwendet. Nach der Separierung wurde die zu isolierende DNA-Bande mit Hilfe eines Transilluminators bei 365 nm detektiert. Die Bande wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte mit dem *Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) oder dem QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

## **4.4 Arbeiten mit RNA**

### **4.4.1 Lagerung**

Die Lagerung von RNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in RNase freiem Wasser.

### **4.4.2 Isolierung von RNA**

Für die Isolierung der in den geernteten Zellen befindlichen gesamt-RNA wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Zellen, die als *Monolayer* in einer Kulturschale wuchsen, wurden zuerst trypsiniert und zentrifugiert (5 min, 1000 rpm, RT). Nach Waschen des Zellpellets mit 1xPBS, wurden die Zellen unter Verwendung eines milden Detergens (RLT-Puffer) mit  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und durch das zusätzliche Passagieren durch eine Kanüle homogenisiert. Das Lysat wurde daraufhin mit 1 VT 70%-igem EtOH versetzt. Bei der anschließenden Zentrifugation adsorbierte die Silicongelmembran einer Trennsäule die freigewordene RNA. Nach mehreren Waschvorgängen wurde die adsorbierte RNA mit 50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser ausgewaschen und in einem ebenfalls RNase-freien Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt.

### **4.4.3 RT-PCR**

Reverse Transkriptasen sind Enzyme, die die Umschreibung der einzelsträngigen RNA in eine doppelsträngige Komplementär-DNA (cDNA) katalysieren. Die Reverse Transkriptase ermöglicht die Untersuchung der Expressionsstärke eines Gens anhand der mRNA-Menge (und somit auch der cDNA-Menge). Die hergestellte cDNA kann dann über PCR ausgewertet werden.

Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkriptase und Oligo-dT als Primer in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RT-PCR mit dem RNA-PCR-Kit der Firma GeneAmp durchgeführt:

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$
25 mM $\text{MgCl}_2$	4 $\mu\text{l}$
10x PCR Puffer II	2 $\mu\text{l}$
DEPC-Wasser	3 $\mu\text{l}$ -RNA Volumen
DGTP	2 $\mu\text{l}$
DATP	2 $\mu\text{l}$
DCTP	2 $\mu\text{l}$
DTTP	2 $\mu\text{l}$
Rnase-Inhibitor	1 $\mu\text{l}$
MuLV	1 $\mu\text{l}$
Random-Primer	je 0,5 $\mu\text{l}$
Oligo-dT	
RNA	1 $\mu\text{g}$
Endvolumen	20 $\mu\text{l}$

RT-PCR Programm:

10 min - RT, 15 min - 42 °C, 5 min - 99 °C, 5 min - 5 °C

Für die anschließende PCR wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  eingesetzt.

## 4.5 Arbeiten mit Bakterien

### 4.5.1 Vermehrung und Lagerung

Die Vermehrung der beschriebenen Bakterienstämme erfolgte bei 37°C auf LB-Agarplatten oder als Schüttelkultur in LB-Medium, eventuell mit geeigneten Antibiotika angereichert. Auf Agarplatten können die Bakterien bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum hinweg wurden 100 $\mu\text{l}$  einer LB-Bakteriensuspension 600 $\mu\text{l}$  frisches LB-Medium und 400 $\mu\text{l}$  Glycerin zugegeben. Die einzelnen Komponenten wurden gut gemischt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (Ausubel, 1989).

<b>LB-Medium</b>	
Bactotrypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,5 autoklaviert	

<b>Agarplatten</b>	
Bactotrypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

Der Agar für die Agarplatten wurde autoklaviert, auf ca. 50°C in einem Wasserbad abgekühlt, und nach Zugabe geeigneter Antibiotika in Petri-Schalen gegossen. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

<b>Glycerinstock</b>	
Bakteriensuspension	100µl
LB-Medium	600µl
Glycerin	400µl

#### 4.5.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Zellen sind *E.coli*-Zellen, die durch Calciumeinschlüsse besonders geeignet sind, fremde DNA aufnehmen zu können. Die Herstellung kompetenter Bakterien und deren Transformation mit Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983) durchgeführt (Hanahan, 1983). Bei dieser Methode können Transformationseffizienzen von bis zu  $10^7$  Transformanten pro µg Plasmid-DNA erreicht werden. Für die Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 200 ml LB-Medium mit 1 ml Bakterien einer ÜN-Flüssigkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 geschüttelt. Nach Erreichen der vorgesehenen Bakteriendichte wurden die Bakterien für 10 min bei 3000 rpm und 4°C pelletiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Puffer, Gefäße und Glaspipetten wurden ebenfalls auf diese Temperatur vorgekühlt. Das Pellet wurde vorsichtig in 40 ml TB-Puffer resuspendiert und 10 min inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 3200 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 9,3 ml TB-Puffer und 0,7 ml DMSO resuspendiert und 10 min inkubiert. Die Proben wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **4.5.3 Transformation von Bakterien**

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen wird Transformation genannt. Die Kompetenz wird zuvor durch eine Behandlung mit Calcium- oder anderen zweiwertigen Ionen (siehe 4.6.2) generiert. Sie bewirkt auf eine noch unbekannt Art und Weise eine wesentlich leichtere Aufnahme der DNA (Mandel and Higa, 1970). 50-200  $\mu$ l transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100-500 ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz und einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis folgte eine Hitzebehandlung für 90 sec bei 42°C. Danach wurde 2 VT LB-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min bei 4000 rpm) wurde das Bakterienpellet in 100  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und anschließend auf einer Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatte enthielt ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum. Nach 10-16 Stunden Inkubation bei 37°C konnten Einzelkolonien isoliert werden.

## **4.6 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien**

Für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden ausschließlich sterile Puffer, Medien, Glasgeräte und Zentrifugenröhrchen verwendet. Alle Arbeiten wurden in Sterilboxen durchgeführt.

### **4.6.1 Lagerung und Auftauen von eukaryontischen Zellen**

Ein Aliquot ( $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen) in flüssigem Stickstoff gelagerter Zellen wurde bei RT aufgetaut und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Um das DMSO, das aus dem Einfriermedium stammt, auszuwaschen, wurden die Zellen mit 9 ml Medium verdünnt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen in eine Maxi-Kulturschale mit vorgelegten 10 ml Medium ausgesät.

### 4.6.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden in Gewebekulturschalen und, wenn nicht anders deklariert, in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep-Lösung in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C kultiviert.

Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurden sie in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsrate umgesetzt. Das Umsetzen adhärenter Zellen erfolgte vor Erreichen der Konfluenz. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS-Puffers wurden die Zellen 2 - 5 min in Versen-Trypsin-Lösung inkubiert. Die proteolytische Reaktion des Trypsins bewirkte das Ablösen der Zellen von den Gewebekulturschalen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml frischen Mediums abgestoppt, die abgelösten Zellen vorsichtig resuspendiert und im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 auf neue Kulturschalen ausgesät.

<b>DMEM-Medium</b>	
DMEM	13,38 g/l
Na-Bicarbonat	3,7 g/l
HEPES	25 mM
Autoklaviert	

<b>RPMI-Medium</b>	
	17,66 g/l
	3,024 g/l
autoklaviert	

<b>Pen/Strep-Lösung</b>	
Penicillin	10.000 units/ml
Streptomycin	10.000 units/ml

<b>PBS-Puffer</b>	
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, pH7,4	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
autoklaviert	

<b>Versen-Trypsin-</b>		<b>Versen-Trypsin-</b>	
<b>Lösung A</b>		<b>Lösung B</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6 mM	CaCl <sub>2</sub>	0,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	MgSO <sub>4</sub>	0,4 mM
NaCl	137 mM	Zutaten in 1/5 des	
		Endvolumens lösen	
KCl	2,6 mM	Lösung A+B vereinen	
EDTA	3 mM	auf Endvolumen auffüllen	
Trypsin	aus 0,125% (w/v)	steril filtrieren	
Rinderpankreas			
Zutaten in 3/4 des	0,125% (w/v)	bei -20°C lagern	
Endvolumens lösen,			
pH 7,0 einstellen			

#### 4.6.3 Einfrieren eukaryontischer Zellen

Zum Einfrieren wurden die Gewebekulturzellen mit Versen-Trypsin-Lösung (s. o.) abgelöst und nach Zugabe von Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1.000 rpm, RT), in 1 ml frisches Medium aufgenommen und in ein Cryogefäß überführt. Dazu wurde jeweils 1 ml Einfriermedium pipettiert. Die Ampullen wurden in einem Einfrierbehälter bei -70°C über Nacht langsam abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

<b>Einfriermedium</b>	
DMEM-Medium	45%
FCS	40%
DMSO	15%

#### 4.6.4 DNA-Transfer in Zellen

##### CaPO<sub>4</sub>-Methode

In dieser Arbeit wurde vor allem die CaPO<sub>4</sub>-Methode zur Transfektion von eukaryontischen Zellen verwendet. Die eingesetzte DNA formiert zusammen mit dem Calciumphosphat Kristalle, die sich an die Zellen anhaften und von diesen über einen noch unbekanntem, endocytotischen Mechanismus aufgenommen werden. Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor ihrer Transfektion so ausgesät, dass sie bei Abschluss des

Experimentes fast konfluent waren. Transiente Transfektionen für Reporterassays wurden jeweils im Duplett angefertigt, aus denen ein Mittelwert und die korrespondierende Standardabweichung erstellt wurde. Für Transfektionen wurden die sog. HEBS-Methode angewendet, die mit 6-well Schalen (Luc-Assay) durchgeführt wurde.

Ein Ansatz, der pro well ( $9,6 \text{ cm}^2$ ) für die Transfektion verwendet wurde, setzt sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz: 5,4  $\mu\text{g}$  DNA  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 183,6  $\mu\text{l}$  aufgefüllt  
21,6  $\mu\text{l}$  10xHEBS → vortexen  
10,8  $\mu\text{l}$  2M CaCl<sub>2</sub> → jede einzelne Probe sofort nach Zugabe  
vortexen

Nach der Zugabe von 10,8  $\mu\text{l}$  CaCl<sub>2</sub> wurde der Ansatz für genau 11 min bei 20°C inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. 8-16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1xPBS-Puffer gewaschen und mit frischem Medium überschichtet.

10xHEBS					
HEPES	pH	7,2	mit	HCl	200 mM
einstellen					
NaCl					1,37 M
Glucose					60 mM
KCl					50 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					7 mM

### jetPEI™

Polyethyleneimin (PEI) ist ein organisches Polymer, das eine hohe Dichte an Aminogruppen besitzt, die protoniert werden können. Herrscht im Milieu ein physiologischer pH, so bindet dieses Polykation sehr stark an DNA. Wie das genaue Einschleusen der PEI-DNA-Komplexe funktioniert, ist noch unbekannt. Das PEI-Verfahren ist bei vielen Zellen sehr effektiv, jedoch scheint die Membran durch diese Aufnahmemethode sehr durchlässig zu sein, so dass die Zellen sehr sensibel gegenüber Umweltfaktoren werden.

Für die Transfektion von HepG2-Zellen, wurde das Jet-PEI-Kit von Biomol verwendet. Für ein well wurden 3  $\mu\text{g}$  DNA in 100  $\mu\text{l}$  150 mM NaCl und 3,6  $\mu\text{l}$  Jet-PEI ebenfalls in 100  $\mu\text{l}$  150 mM NaCl gegeben. Daraufhin wurden beide Lösungen miteinander vermischt, wobei zu beachten ist, dass PEI in die DNA-enhaltende Lösung gegeben wird. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben 15-30 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben.

#### 4.6.5 Hormoninduktion in der transienten Transfektion

In DNA-Transfereexperimenten mit Hormoninduktion war es notwendig, die Zellen mindestens einen Tag vor dem Transfer in hormonfreiem oder T3-freiem Medium zu halten. Hierfür wurde das dem Medium zugesetzte fötale Kälberserum von endogenem Gesamthormon oder T3 befreit. Für die Herstellung von Serum ohne Hormon wurden 500 ml FCS für 2 Stunden mit 25 g Aktivkohle bei RT gerührt, anschließend 1 Stunde bei 6000 rpm zentrifugiert und zweimal sterilfiltriert (Porengröße bei der ersten Filtration 0,8 µm, bei der zweiten Filtration 0,2 µm). Das so behandelte Serum wurde in Aliquots zu 50 ml bei -20°C eingefroren. Um das FCS vom T3 zu befreien, wurden Anionenaustauscher-Beads verwendet. Für 250 ml FCS wurden 10 µg Beads dreimal mit ddH<sub>2</sub>O äquilibriert (5 min, 3000 rpm, 4°C), um dann mit dem FCS für 5 Stunden bei RT rotierend inkubiert zu werden. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4°C) und das FCS im Überstand erneut mit 10 µg äquilibrierten Beads ÜN bei RT rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads zentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4°C) und der Überstand über einen Faltenfilter (Ø 240 mm) von restlichen Beads befreit. Das vom T3 depletierte FCS wurde daraufhin zweimal sterilfiltriert (Porengröße bei der ersten Filtration 0,8 µm, bei der zweiten Filtration 0,2 µm) und in Aliquots bei -20°C eingefroren.

Die Hormonzugabe zum Medium erfolgte nach dem eigentlichen DNA-Transfer. In den durchgeführten Experimenten wurde jeweils eine Endkonzentration von 10<sup>-6</sup> M T3/E2 verwendet. Nach 48 Stunden erfolgte eine erneute Zugabe, da die Hormone im Medium nach dieser Zeit abgebaut wurden.

#### 4.6.6 Ernte und Aufschluss der Zellen

24-72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Das Medium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei RT mit 250 µl Lysepuffer inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Schalen aufgestellt und der Zellextrakt in Reaktionsgefäße überführt. Bis zur Messung wurde der Extrakt auf Eis aufbewahrt.

<b>Lysepuffer</b>	
Tris/HCl pH 7,5	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	8 mM
EDTA	1 mM
Triton X100	1%
Glycerin	15%
pH 7,1-7,5	15%
frisch : DTT	1 mM

#### 4.6.7 Aktivitätsbestimmung der Luciferase (Luc-Assay)

Die Messung der Genaktivität beim Einsatz der Luciferase (Luc) als Reporter gen erfolgte über die Quantifizierung des gebildeten Enzyms Luciferase. Dazu wurde der Proteinextrakt aus den transfizierten Zellen mit einem Überschuss des Substrates Luciferin und ATP inkubiert und die Stärke der Umsatzreaktion anhand der Lichtemission bestimmt. Zur Messung der Proben wurden jeweils 100 µl Proteinextrakt 4 Sekunden nach Einstellen in das Gerät automatisch mit 100 µl Luciferin-ATP-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 5 Sekunden wurde die Lichtemission über einen Zeitraum von 10 Sekunden gemessen und als Summe gezählt (Integration).

<b>Luciferin-ATP-Lösung</b>	
D-Luciferin	90 mg/l
ATP	0,8 mM
pH 7	

#### 4.6.8 Aktivitätsbestimmung der $\beta$ -Galactosidase

Das Reporterplasmid pCMV-lacZ, welches ein  $\beta$ -Galactosidase-Gen enthält, wurde in transienten Transfektionen zur Normalisierung der Transfektionseffizienz eingesetzt. Die Aktivität des Enzyms wird photometrisch anhand eines gelben Farbumschlags detektiert. *o*-Nitrophenol wird von *o*-Nitro-phenol- $\beta$ -Galactopyranosid (ONPG) abgespalten und kann quantitativ im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 420 nm erfasst werden kann. Es wurden 5-50 µl Proteinextrakt mit 750 µl Z-Puffer und 200 µl ONPG versetzt und bis zum Farbumschlag bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Die Enzymaktivität ergibt sich aus der Farbveränderung pro Zeit, d.h. nach ausreichender Farbveränderung wurden alle Proben

gleichzeitig direkt im Photometer gemessen. Die Enzymaktivität wurde anhand folgender Formel errechnet:

$$OD_{420 \text{ nm}} \times 1000 = \text{LacZ-Wert}$$

Eine Normalisierung erfolgte indem die Luciferase-Einheiten anschließend zu den entsprechenden LacZ-Werten ins Verhältnis gesetzt wurden (Luc/LacZ).

<b>Z-Puffer</b>		<b>ONPG-Lösung</b>	
$K_2HPO_4 \times 2H_2O$	60 mM	$KPO_4$ pH=7,0	0,1 M
$KH_2PO_4 \times H_2O$	40 mM	ONPG	4 g/l
KCl	10 mM		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,1 mM		
pH 7, sterilfiltrieren			

## 4.7 Arbeiten mit Proteinen

### 4.7.1 Lagerung von Proteinen

Alle Arbeiten mit Proteinen wurden bei 4°C oder auf Eis ausgeführt. Es wurden nur sterile Geräte und Lösungen benutzt. Für die Lagerung bei -80°C wurde den Proteinen 1/10 VT Glycerin zugesetzt.

### 4.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgt spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Sie basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie-Lösung von 495 nm zu 595 nm, wenn Protein zur Lösung hinzugefügt wird.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1-10 µl Proteinlösung mit 200 µl Roti<sup>®</sup>-Quant versetzt und durch Zugabe von 0,25 M Tris/HCl pH 7,8 auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Die Proben wurden gegen einen proteinfreien Leerwert bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration errechnet sich aufgrund einer Eichkurve gemäß der Formel:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{595 \text{ nm}} \times 19,89 / \text{eingesetztes Volumen}$$

### 4.7.3 Herstellung von Ganzzellextrakt

Diese Methode zur Herstellung von Ganzzellextrakt wurde für eine anschließende immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot verwendet. Die Zellen wurden hierfür nach Waschen mit 1xPBS-Puffer auf der Zellkulturschale mit einem Gummischaber in 5xSDS-Auftragspuffer geerntet. Um die enthaltene genomische DNA zu zerstören, wurde der Extrakt für 2x10 Sekunden bei Level 1 sonifiziert. Zu 200µl Probe wurden 600µl H<sub>2</sub>O, 800µl Methanol und 200µl Chloroform pipettiert und anschließend gevortext. Die Lösung wurde für 5 Minuten bei 6000rpm zentrifugiert, wobei sich eine milchige mittlere Phase ausbildet welche die Proteine enthält. Das Pellet wurde mit 2ml Methanol versetzt und für weitere 5 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der Speedvac getrocknet und in 90µl 1x PBS und 10µl 10% SDS aufgenommen. Für die anschließende Proteinbestimmung musste ein Aliquot mit Wasser verdünnt werden (1:10), da SDS die Bradfordreaktion stört. Vor Auftragen von gleichen Proteinmengen für den Western Blot wurden die Proben gekocht und zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min).

<b>SDS-Auftragspuffer</b>	<b>5x</b>
Tris/HCl pH 6,8	62,5 mM
Glycerin	20% (v/v)
SDS	2% (w/v)
β-Mercaptoethanol	5% (v/v)
Bromphenolblau	0,125% (w/v)

### 4.7.4 Denaturierende Polyacrylamidgele

Um ein einzelnes Protein in einem Gemisch nachzuweisen, bedarf es einer Auftrennung der Proteine und ihrer anschließenden Visualisierung entweder durch direkte Anfärbung (z.B. Coomassie) oder mittels einer spezifischen Nachweisreaktion (Immunoblot).

In dem von Ulrich Lämmli 1970 erstmals beschriebenen System lassen sich Proteinmischungen unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe auftrennen (Laemmli, 1970). Bei diesem Verfahren dient das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Entfalten der Proteinstrukturen. Dabei lagern sich pro AS durchschnittlich zwei Moleküle SDS an und geben allen Proteinen eine elipsoide Raumstruktur, was eine ausschließlich durch das Molekulargewicht abhängige Auftrennung ermöglicht. Eine stark reduzierende Chemikalie (β-Mercaptoethanol) bricht zusätzlich alle Disulfid-Bindungen auf. Auf diese Weise standardisierte Proteinmischungen können über die regulierbare Matrix eines

Polyacrylamidgels der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei wird die doppelt negative Ladung von SDS ausgenutzt, die alle Eigenladungseffekte der Proteine überdeckt und eine Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und erfolgt in Richtung Anode.

Das verwendete Gelsystem steht senkrecht und besteht aus zwei Polyacrylamid-Bereichen, die sich im pH-Wert unterscheiden und nacheinander von den Proteinen durchlaufen werden. Dabei fokussiert das obenliegende Sammelgel die Proteinprobe in einem schmalen Band, bevor mit dem Wechsel zum Trenngel der pH-Anstieg eine Auftrennung bewirkt. Dabei kann die Porengröße des Trenngels mit unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration variiert werden, so dass eine optimale Auftrennung in jeweils verschiedenen Molekulargewichts-Bereichen gewährleistet ist. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde parallel ein standardisiertes Proteingemisch (Marker) aufgetragen. Alle Zubehörteile des Gelsystem Hoefer Mighty Small wurden mit entionisiertem Wasser und 70% (v/v) Ethanol gereinigt. Es wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30:0,8 (w/v)) benutzt, die 10 bis 15%-ig im Trenngel, und 6%-ig im Sammelgel eingesetzt wurde. Die gewünschten Gellösungen wurden für Trenn- und Sammelgel separat angesetzt.

<b>Sammelgel</b>	<b>6%</b>	<b>Trenngel</b>	<b>10%</b>	<b>7,5%</b>
0,5M Tris/HCl pH6,8	2,5 ml	1,5M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
PAA/BAA (37,5:1)	1,3 ml	PAA/BAA (37,5:1)	3,3 ml	2,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,1 ml	ddH <sub>2</sub> O	4,1 ml	4,9 ml
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	100 µl	100 µl
APS	50 µl	APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl	5 µl

Zur Polymerisierung wurden zunächst das Trenngel und später das Sammelgel in die vorbereiteten Gießstände gefüllt. Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurden sie in eine entsprechende Apparatur eingespannt und mit 1 X Lämmli-Puffer gefüllt.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Auftragspuffer (5x konz.) versetzt und 5 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und in die Probenauftragstaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit 20 mA pro Gel (Einlaufen der Proben in die Matrix) begonnen und dann bei 25-30 mA weitergeführt.

Eine Visualisierung von Proteinbanden wurde durch Färbung der Gele in Coomassie-Lösung (60 min) ermöglicht. Die Nachweisgrenze dieser Methode lag im Bereich von 0,4µg Protein pro Bande. Die Entfärbung (mehrere Stunden) des Hintergrundes durch Entfärbelösung erfolgte genauso wie die Färbung auf einem Schüttler bei RT. Nach vollständiger Entfärbung der Gele konnten diese auf einem Leuchttisch ausgewertet und durch Fotografie dokumentiert werden.

<b>Entfärbelösung</b>		<b>Coomassie-Färbelösung</b>	
Methanol	40% (v/v)	Coomassie blue R250	0,2% (w/v)
Eisessig	10% (v/v)	in Fixierer	

<b>Lämmli-Puffer</b>		<b>10x</b>
Tris		250 mM
Glycin		1920 mM
SDS		1%

#### 4.7.5 Blotten der Proteine

Der Elektrobplot erlaubt den Transfer von zuvor in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran. Da diese Proteine mit SDS beladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode und können so aus der Gelmatrix heraus auf eine Membran transferiert werden.

In dieser Arbeit wurde die so genannte *Wetblot*-Methode angewendet. Nach Aktivierung der Membran in 100% Methanol wird diese auf das Gel aufgelegt. Vor und hinter diese Anordnung werden jeweils drei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere und jeweils eine Schwammmatte gesetzt. Dieses Sandwich wird im Anschluss so in den Blotrahmen eingelegt, dass die PVDF-Membran auf der Seite der Anode (weiße Seite) liegt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt der Transfer der negativ geladenen Proteine auf die Membran. Der Transfer wird in einer mit 1x Transfer-Puffer gefüllten Wetblot-Apparatur bei 4°C und 100V Spannung für 1 Stunde durchgeführt.

<b>Blotpuffer</b>		<b>10x</b>
Glycin		1,92 M
Tris		250 mM

#### 4.7.6 Immunodetektion

Die Immunodetektion ist eine sensitive Nachweismethode für Proteine. Diese Methode beruht auf der immunologischen Reaktion zwischen einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) mit seinem Antigen (Protein). Zur Visualisierung dieses Antikörper/Antigen-Komplexes dient ein gegen den Primärantikörper gerichteter,

enzymgekoppelter Sekundärantikörper. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper wird eine Signalverstärkung erreicht, die zusammen mit der hohen Sensitivität der Enzymreaktion die Empfindlichkeit dieses Nachweissystems ausmacht.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Primärantikörper aus Mäusen in Kombination mit geeigneten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern eingesetzt. Nach dem Elektroblob wurde die „proteinbeladene“ PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 2 Stunden bei 20°C mit einer fettfreien Milchlösung (5% (w/v) Milchpulver in PBST) inkubiert. Die abgesättigte Membran wurde daraufhin für 1-2 Stunden mit dem in PBST verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten (3 x 5 min mit PBST), zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Primärantikörpern, wurde die Membran für eine weitere Stunde mit einem entsprechend in PBST verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen (s.o) und stand danach für die Nachweisreaktion mit dem ECL-Kit zur Verfügung. Hierzu wurde die Membran auf einem Stück Haushaltsfolie mit einem Gemisch aus gleichen Anteilen der ECL-Detektionslösung A und B benetzt und für eine Minute inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran in Folie verpackt, in einer Filmkassette befestigt und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Signalentstehung bei diesem Entwicklersystem beruht auf einer verstärkten Peroxidase-katalysierten Chemilumineszenz. In den meisten Fällen reichten Expositionen zwischen 5 Sekunden und 5 Minuten aus, um ausreichende Signalintensitäten zu erreichen.

<b>PBST</b>	
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O pH7,4	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Tween 20	0,1%

#### 4.7.7 In vitro Transkription/Translation

Für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translationsreaktion wurde eine Komplettausrüstung der Firma Promega verwendet, wobei die Durchführung gemäß den Herstellerangaben erfolgte. Die Arbeiten wurden ausschließlich mit Handschuhen, RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen sowie mit nukleasefreiem Wasser durchgeführt. Der Puffer und alle anderen Komponenten wurden auf Eis aufgetaut. Im Folgenden ist die

Zusammensetzung eines 1x Ansatzes aufgelistet, welcher bei Bedarf vervielfacht wurde. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für 90 min bei 30°C inkubiert.

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$
TNT-Reticulocyt-Lysat oder Wheat-germ Extrakt	6,25 $\mu\text{l}$
TNT Reaktionspuffer	0,5 $\mu\text{l}$
Aminosäure-Mix (ohne Methionin)	0,25 $\mu\text{l}$
<sup>35</sup> S-Methionin (15 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0,25 $\mu\text{l}$
TNT Polymerase (T7, T3, SP6)	0,25 $\mu\text{l}$
Rnasin	0,5 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	3,5 $\mu\text{l}$
Endvolumen	12,5 $\mu\text{l}$

Sollte der Einfluss von Hormon auf die Interaktion zwischen einem *in vitro* translatierten Rezeptor und einem GST-Fusionsprotein untersucht werden, wurde der Translationsansatz mit einer entsprechenden Menge Hormon für 20 min bei RT vor dem *Pulldown* inkubiert (siehe auch).

#### 4.7.8 Expression rekombinanter Proteine

In dieser Arbeit wurde die Expression eukaryontischer Gene als GST-Fusion in *E. coli* durchgeführt. Nach der Transformation eines entsprechenden Plasmids wurde ein Einzelklon für 12 h bei 37°C in 5 ml TB mit 25  $\mu\text{l}$  Glucose (20%) und geeignetem Antibiotikum vermehrt. Die Kultur wurde in 400 ml TB-Medium ohne Antibiotikum mit 40 ml Phosphatpuffer und 20 ml Glucose (20%) überführt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,7 bis 0,8 bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration im Medium) die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins. Der Ansatz wurde für weitere 3-7 h bei 18-25°C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Nach Abschluß der Inkubation wurden die Bakterien pelletiert (10 min, 3200 rpm, 4°C) und in 30 ml STE-Puffer gut resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet nochmal in 30 ml STE-Puffer resuspendiert. Die Bakterienlyse

wurde durch Aktivierung des endogenen Lysozyms mittels Einfrieren ÜN bei -20°C verstärkt. Danach wurden die Proben bei RT aufgetaut und die Proteine durch Zugabe von 300 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>, 15 µl 2 M MnCl<sub>2</sub>, 300 µl DNase I (1mg/ml), 300 µl RNase A (1 mg/ml) und 300 µl Lysozym (50 mg/ml) rotierend für 30-45 min freigesetzt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (30 min, 11.000 rpm, 4°C) entfernt und der Überstand bei -80°C in Aliquots aufbewahrt.

<b>STE-Puffer</b>	
NaCl	150 mM
Tris/HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

#### 4.7.9 Affinitätsaufreinigung GST-fusionierter Proteine

Diese Methode zur Aufreinigung der rekombinanten GST-Fusionsproteine beruht auf der spezifischen Enzym/Substrat-Wechselwirkung von GST mit Glutathion. Durch Immobilisierung des Glutathions an einer Matrix aus Sepharose lassen sich GST-Fusionsproteine durch Zentrifugation von den restlichen Bestandteilen des Proteinextraktes trennen.

Bevor die Glutathion-Sepharose für Bindereaktionen eingesetzt wurde, fand ein Waschschrift mit 1xPBS statt, um u.a. das aus der Lagerung stammende Ethanol zu entfernen. Der aufzureinigende Extrakt wurde mit einer entsprechenden Menge der äquilibrierten Matrix für 2 h bei 4°C inkubiert. Bei Proteinextrakten, die aus einer 400 ml Bakterienkultur stammten, wurden z.B. 300 µl der Sepharose eingesetzt. Anschließend wurde die Sepharose mittels Zentrifugationsschritten (5 min, 1000 rpm, 4°C) dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Für EMSA Experimente erfolgte zum Abschluß der Aufreinigung die Elution der GST-Fusionsproteine durch Aufnahme der Beads in Waschpuffer mit zugegebenem Glutathion (Endkonzentration 20mM).

<b>Waschpuffer</b>	
Tris/HCl pH 8	100 mM
NaCl	100 mM

#### 4.7.10 GST-Pulldown

Dieses Verfahren eignet sich zur *in vitro* Analyse von Interaktionen zwischen Proteinen und beruht auf einer Immobilisierung von Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose (Kaelin et al., 1991). Immobilisierte GST-Fusionsproteine wurden in

einem zweiten Schritt mit *in vitro* translatiertem,  $^{35}\text{S}$ -markiertem Protein inkubiert. Im Falle einer Bindung beider Proteine miteinander wurde das  $^{35}\text{S}$ -markierte Protein ebenfalls immobilisiert und konnte nach Copräzipitation anschließend autoradiographisch nachgewiesen werden.

Die GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Jeweils 30  $\mu\text{l}$  äquilibrierte Beads wurden zweimal mit Waschpuffer, der mit 1,5 mg/ml BSA angesetzt wurde, um unspezifische Bindungen zu verhindern, gewaschen (5 min, 2000 rpm, 4°C). Nach der letzten Zentrifugation folgte die Bindereaktion. Dafür wurden 5  $\mu\text{l}$  eines *in vitro* Transkriptions/Translationsansatzes (siehe 4.8.7) pro Reaktion zusammen mit 170  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (1,5 mg/ml BSA) dazugegeben. Nach einer zweistündigen rotierenden Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze dreimal für 15 min mit Waschpuffer (ohne BSA) gewaschen, bevor sie mit 1xSDS-Auftragspuffer versetzt wurden. Als Input wurden 5% des Überstandes der Kontrollbindereaktion mit GST vor den Waschschrinen genommen. Gebundene GST-Fusionsproteine wurden anschließend durch Coomassie-Färbung,  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteine mittels Autoradiographie visualisiert.

## **4.8 Untersuchung von DNA-Protein-Interaktion**

### **4.8.1 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)**

Mit dieser Methode können in Zellsystemen *in vivo*-Bindungen von Proteinen an genomischer Kern-DNA nachgewiesen werden. Alle Puffer müssen frei von DNA sein und es wurden ausschließlich Filtertips verwendet, um DNA-Kontaminationen zu verhindern.

Jeweils eine Maxischale, ca.  $10^7$  Zellen, wurde entsprechend des Experiments behandelt, z.B. für eine bestimmte Zeit mit Hormon inkubiert. Danach erfolgte zuerst der DNA/Protein-Crosslink in den Zellen. Dafür wurde 37%-iges Formaldehyd, welches zuvor für 4h bei 65°C inkubierte, in einer Endkonzentration von 1% direkt zum Zellkulturmedium hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei RT inkubiert. Dabei erfolgte die kovalente Bindung der interagierenden Proteine an die DNA. Die Kreuzvernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 1/7 Volumen 1M Glycin und weiterer Inkubation von 5 min bei RT beendet. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 1 ml kaltes 1xPBS, das mit 1 mM PMSF versehen wurden, geerntet. Daraufhin wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, in 1 ml SDS Lysepuffer (+ Proteinaseinhibitoren, 1 mM PMSF) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Sonifizierung (7-10x 10 sec, Level 1, konstanter Puls) im 15 ml

Falcon auf Eis bewirkte die vollständige Zellyse und die mechanische Fragmentierung des kreuzvernetzten Chromatins. Dabei entstanden Chromatinfragmente einer mittleren Größe von ca. 500 bp. Anschließend erfolgte die Abtrennung von Zellbruchstücken durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C. Der Überstand konnte nach diesem Schritt mit 5% Glycerin versetzt und bei -80°C bis zur Immunopräzipitation gelagert oder direkt weiter verwendet werden.

Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden je 200 µl Aliquot mit 1800 µl Dilutionspuffer + 1mM PMSF aufgefüllt. 20 µl des Überstandes wurden für den Input bei -20°C aufbewahrt. Vor der eigentlichen Präzipitation wurde der Zellextrakt vorgereinigt. Hierfür wurden je 30 µl Protein A-Agarose Beads (50% *slurry*) einmal mit Dilutionspuffer äquilibriert und anschließend mit dem verdünnten Zellextrakt (2 ml) und 5 µl Präimmunserum bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben bei 2000 rpm (5 min, 4°C), wurde der Überstand mit 1-5 µg des entsprechenden Antikörpers über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit 5 µl Präimmunserum inkubiert. Die Bindung der gebildeten Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von je 30 µl Protein A-Agarose, die mit Dilutionspuffer äquilibriert wurde, und anschließender Inkubation für 2 h bei 4°C. Die Präzipitate wurden mit jeweils 1 ml Niedrigsalzpuffer, Hochsalzpuffer, LiCl-Puffer und zweimal mit je 1 ml TE gewaschen. Das Waschen bestand aus einer 5minütigen Inkubation (rotierend) bei 4°C und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 2000 rpm. Die DNA/Protein-Komplexe wurden daraufhin durch zweimalige Inkubation mit je 250 µl Elutionspuffer (rotierend) für 15 min bei RT eluiert. Der Input wurde ebenfalls mit Elutionspuffer auf 500 µl aufgefüllt. Durch die Zugabe von 20 µl 5 M NaCl und anschließender Inkubation bei 65°C ÜN erfolgte die Auflösung der durch Formaldehyd vermittelten DNA/Protein-Bindung. Die freigesetzten Proteine und enthaltene RNA wurden zuerst mit 5 µg RNase A für 2 h bei 37°C und anschließend mit 20 µg Proteinase K bei 45°C zerstört. Um das für den Verdau notwendige Milieu zu schaffen, wurden dem Präzipitat zuvor 10 µl 0.5 M EDTA und 100 µl 0.5 M Tris-HCl pH 6,8 zugesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung unter Verwendung von 10 µg Glykogen als *Carrier*. Die Fällung erfolgte bei -80°C für 10min und weiteren 30min bei -20°C. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 43 µl ddH<sub>2</sub>O und 7 µl TE aufgenommen. Für PCR oder *realtime*-PCR wurden je 1 µl als Template verwendet.

<b>SDS Lysepuffer</b>		<b>Dilutionspuffer</b>	
SDS	1%	SDS	0,01%
EDTA	10 mM	Triton X100	1,1%
Tris/HCl pH 8,1	50 mM	EDTA	1,2 mM
Proteaseinhibitor-Mix	1:1000	Tris/HCl pH 8,1	16,7 mM
		NaCl	167 mM
<b>Niedrigsalzpuffer</b>		<b>Hochsalzpuffer</b>	
SDS	0,1%	SDS	0,1%
Triton X100	1%	Triton X100	1%
EDTA	2 mM	EDTA	2 mM
Tris/HCl pH 8,1	20 mM	Tris/HCl pH 8,1	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	500 mM
<b>LiCl-Puffer</b>		<b>TE-Puffer</b>	
LiCl	0,25 M	Tris	10 mM
NP40	1%	EDTA	1 mM
Deoxycholat	1%	pH 8	
EDTA	1 mM		
Tris/HCl pH 8,1	10 mM		

#### 4.8.2 Gelretardierungsexperiment (EMSA)

Bei dieser Art von Experimenten kann die Bindung von Proteinen an kurze, radioaktiv markierte DNA-Fragmente durch eine verringerte Mobilität der entstehenden DNA-Protein-Komplexe gegenüber der ungebundenen DNA nachgewiesen werden. Nach der Autoradiographie zeigen sich dabei neben der nicht von Protein besetzten DNA-Bande („Freie Probe“), welche die höchste Mobilität besitzt, eine oder mehrere Banden geringerer Mobilität, welche durch die Bildung verschiedener DNA-Protein-Komplexe hervorgerufen werden.

##### Herstellung einer radioaktiven Sonde

Zunächst erfolgte die Markierung eines Stranges. Dazu wurden 100 pm DNA mit 1µl T4-Polynukleotid-Kinase und 50µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP in einem Gesamtvolumen von 30µl mit entsprechendem Volumen an Puffer Tango für 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 100pm des komplementären Stranges erfolgte eine weitere Inkubation für 15min

bei 37°C. Diese zweischrittige Markierungsreaktion ist nötig, da die T4-Polynukleotid-Kinase bei einzelsträngiger DNA eine höhere Effizienz der 32P-Übertragung besitzt als bei doppelsträngiger DNA. Im Anschluss erfolgte das Annealing der beiden komplementären Stränge im von 100°C auf Raumtemperatur abkühlenden Wasserbad. Nach diesem Schritt erfolgte die Aufnahme in 70µl 1x Bandshift-Puffer mit zugegebenem Methylenblau und die Aufreinigung der Probe über eine Sephadex G-50-Säule. Die Lagerung der radioaktiven Probe erfolgte bei -20°C bis unmittelbar vor Benutzung.

### EMSA-Reaktion

1-4 µl *E.coli*- exprimiertes GST-Fusionsprotein (1µl für GST und 4µl für GST-Fusionsproteine) wurde zunächst in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1x Bandshift-Puffer mit Kompetitor-DNA versetzt, um unspezifische Interaktionen mit der DNA zu verhindern. Nach 20 min RT wurde dann 1µl der markierten Probe zum Ansatz hinzugegeben und wiederum für 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf ein 5%-iges PAA-Gel geladen und bei einer maximalen Stärke von 150 Volt für 3-4 h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in 10% MeOH/5% CH<sub>3</sub>COOH fixiert und für 1,5 h im Geltrockner getrocknet. Zur Detektion wurde das getrocknete Gel gegen einen Röntgenfilm exponiert, wobei die Expositionszeit in Abhängigkeit von der Stärke der Strahlung zwischen 4 Stunden und 3 Tagen variiert wurde.

<b>Bandshift-Puffer</b>	2x
Hepes pH 7,4	40 mM
Glycerin	20%
KCl	40 mM
MgCl	2 mM
DTT	10 mM
ZnCl <sub>2</sub>	20µM
BSA	200µg/ml
NP40	0,04%

<b>TBE-Puffer</b>	5x
Tris	450 mM
Borat	450 mM
EDTA	10mM

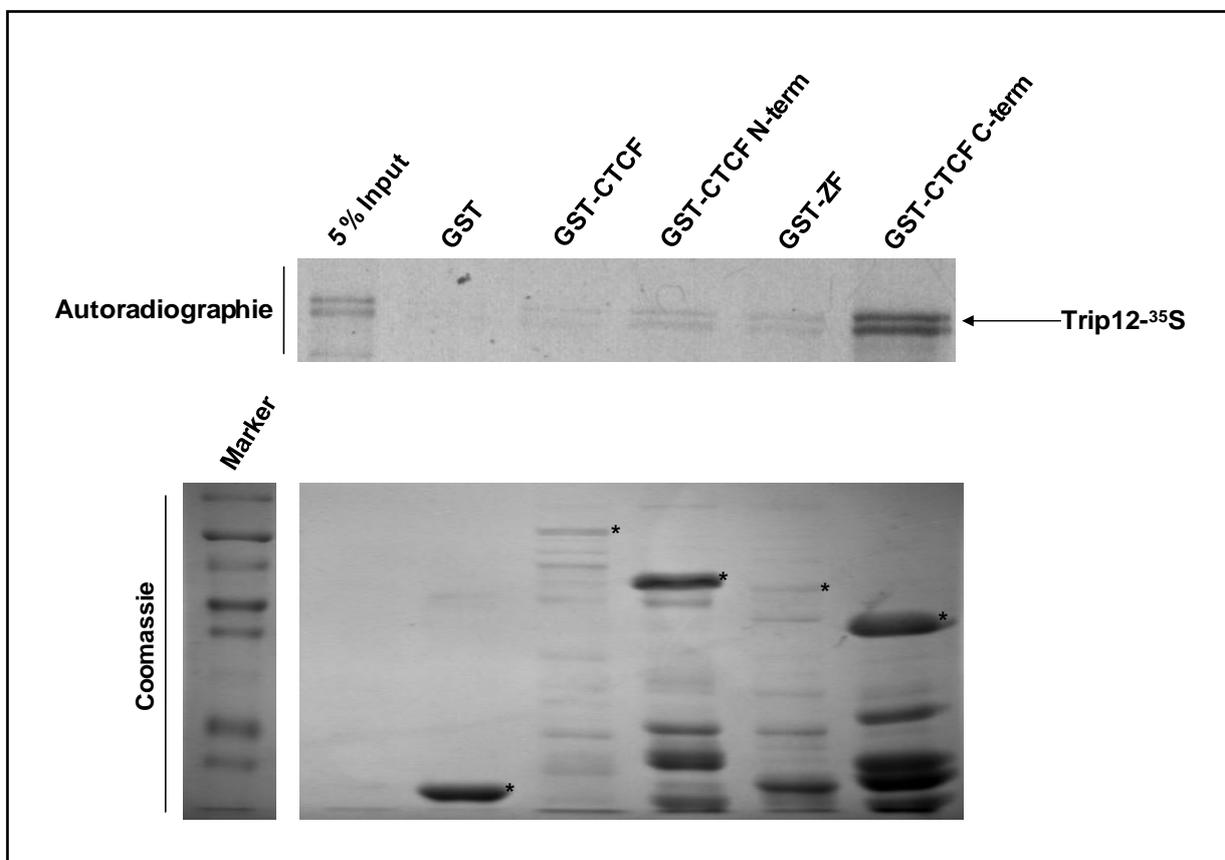
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Identifikation eines gemeinsamen Interaktionspartners von CTCF und TR

Es ist anzunehmen, dass bei der hormonsensitiven Enhancer-Blockade Cofaktoren, die durch CTCF und/oder TR rekrutiert werden, eine entscheidende Rolle spielen. Bis heute sind mit Sin3A, Alien, RXR und p53 vier Proteine bekannt, die sowohl mit CTCF als auch mit TR interagieren. Bei Studien, die zur Identifizierung von Interaktionspartnern für CTCF durchgeführt und freundlicherweise von S. van de Nobelen zur Verfügung gestellt wurden, zeigte sich unter anderem TRIP12 als möglicher Kandidat. MEL-Zellen die entweder mit der prokaryotischen Biotin-Ligase BirA als Kontrolle oder mit rekombinantem CTCF und BirA stabil transfiziert wurden, dienten in *Pulldown*-Experimenten als Ausgangspunkt, um Interaktionspartner von CTCF zu identifizieren. Dabei wurde biotinyliertes CTCF an Streptavidinbeads gebunden und mit allen putativen Interaktionspartnern auf einem Gel aufgetrennt und anschließend in der Massenspektroskopie analysiert. In diesen Studien wurde unter anderem TRIP12 identifiziert (S. van de Nobelen, Doktorarbeit). Ursprünglich wurde das Protein als *TR interacting protein 12* beschrieben und computergestützte Analysen zeigen eine 45%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der c-terminalen Domäne mit E6-AP (Lee et al., 1995). Für TRIP12 wurde eine sogenannte WWE- und eine HECT-Domäne (*homologous to E6-AP carboxyl terminus*), die ein Merkmal von E3-Ubiquitin-Ligasen ist, beschrieben (Aravind, 2001). E6-AP wurde erstmals als Protein identifiziert, welches mit dem E6-Protein des humanen Papilloma-Virus interagiert und als Komplex mit diesem p53 ubiquitiniert und somit dessen Degradation durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg einleitet (Scheffner et al., 1993). Auch ER $\alpha$  wird spezifisch von E6-AP gebunden und ubiquitiniert, was zur Regulierung des endogenen Levels des Rezeptors beiträgt (Li et al., 2006). Des Weiteren besitzt E6-AP eine zusätzliche, von dieser unabhängigen, Funktion als Coaktivator für verschiedene Kernhormon-Rezeptoren (Nawaz et al., 1999). Diese Informationen führten zur näheren Betrachtung von TRIP12 und E6-AP in Bezug auf direkte Interaktion mit CTCF und TR $\beta$  sowie dem Einfluss auf hormonsensitive Enhancer-Blockade.

### 5.1.1 TRIP12 und E6AP interagieren mit CTCF und TR- $\beta$

Die *Pulldown*-Bedingungen, bei denen TRIP12 als Interaktionspartner von CTCF identifiziert wurde, lassen es nicht zu die direkte physische Bindung der beiden Proteine zu belegen. Über E6-AP liegen keine Informationen bezüglich einer Interaktion mit CTCF und TR vor. Um eine direkte Protein-Protein Interaktion nachzuweisen wurden *GST-Pulldown*-Experimente durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurde GST-CTCF und einzelne GST-CTCF-Domänen, die an Glutathion-Agarose-Beads immobilisiert wurden, mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem TRIP12 inkubiert, auf einem Gel aufgetrennt und das Signal für TRIP12 durch eine Autoradiographie visualisiert.



**Abb. 5.1: TRIP12 interagiert *in vitro* mit CTCF**

GST, GST-CTCF und einzelne CTCF-Domänen wurden zusammen mit *in vitro*-translatiertem,  $^{35}\text{S}$ -markiertem TRIP12 inkubiert. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Autoradiographie visualisiert das Signal für TRIP12 vor (5% Input) und nach der Inkubation. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine und ein Pfeil verweist auf die Laufhöhe von TRIP12.

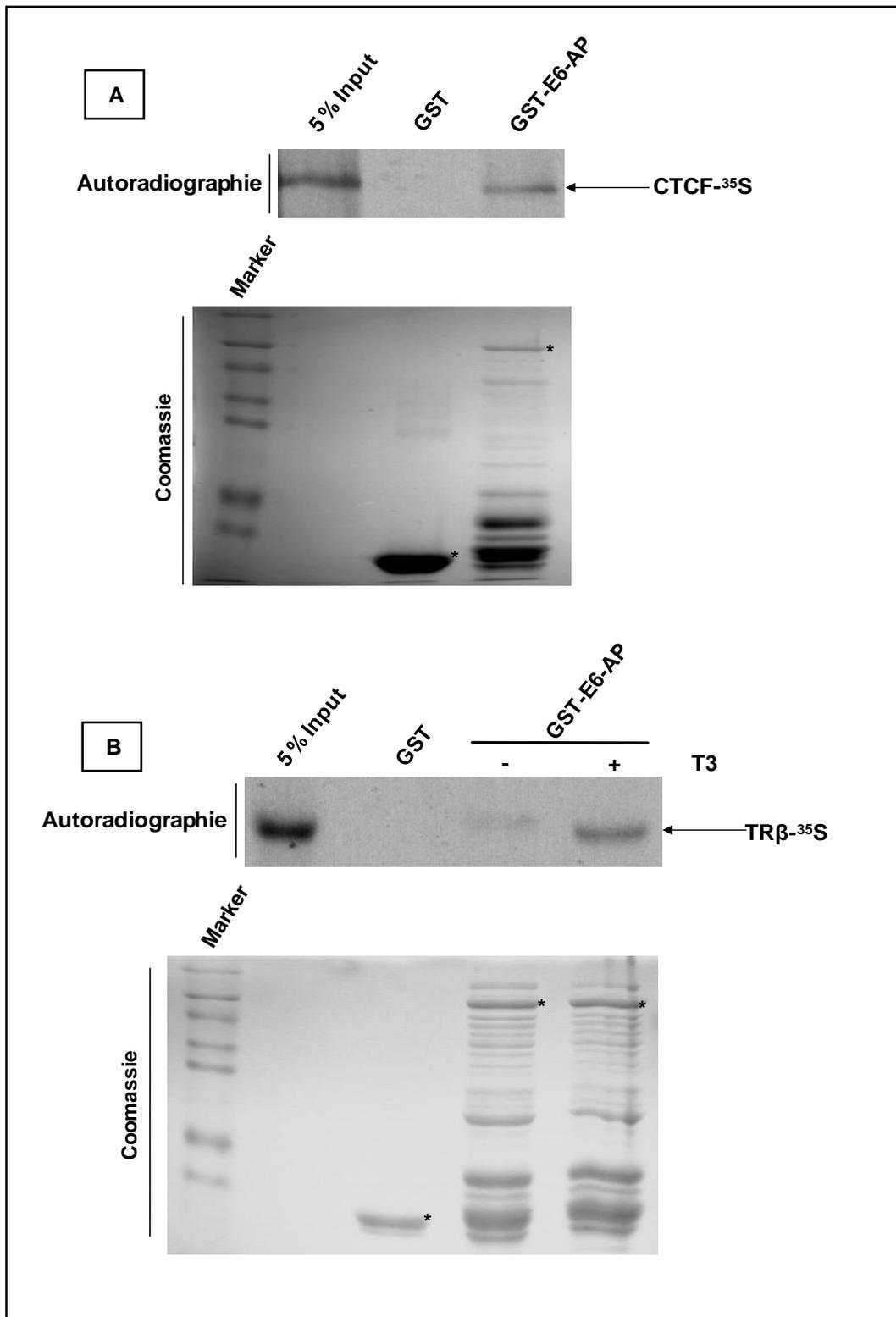
Alle getesteten GST-Fusionsproteine interagieren mit TRIP12, wobei GST allein nicht interagiert (Abb. 5.1). Aufgrund der unterschiedlichen GST-Konstrukte, die sich nicht alle in

gleichem Ausmaß in *E.coli* exprimieren ließen, ist es nicht möglich alle vergleichend in Bezug auf die Stärke der Interaktion mit TRIP12 zu beurteilen. Das mit Coomassie gefärbte Gel zeigt mit Sternchen markiert die Laufhöhe der entsprechenden GST-CTCF Fusionsproteine und zeigt gleiche Mengen an eingesetztem Protein bei GST, GST-CTCF N-term und GST-CTCF C-term sowie GST-CTCF und GST-CTCF ZF. Dabei wird ersichtlich, dass die C-terminale Domäne wesentlich besser als die N-terminale Domäne mit TRIP12 interagiert und es keinen Unterschied bei der Interaktion zwischen GST-CTCF und GST-CTCF ZF mit TRIP12 gibt.

Um die Interaktion von E6-AP mit CTCF zu testen, wurde GST-E6-AP, das an Glutathion-Agarose-Beads immobilisiert wurde, mit <sup>35</sup>S-markiertem CTCF inkubiert, auf einem Gel aufgetrennt und das Signal für CTCF durch eine Autoradiographie visualisiert. Das in vitro translatierte und radioaktiv markierte CTCF-Protein erzeugt ein deutliches Signal im GST-*Pulldown*, wobei GST als Negativkontrolle keine Interaktion mit CTCF zeigt (Abb. 5.2 A).

Der Ligand von Hormonrezeptoren spielt oftmals eine große Rolle bei Interaktionen zwischen Rezeptoren und anderen Proteinen, wie z.B. Cofaktoren. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Hormon die Interaktion zwischen E6-AP und TR $\beta$  beeinflusst. Bei der Inkubation von GST bzw. GST-E6-AP mit <sup>35</sup>S-markiertem TR $\beta$  zeigt sich eine hormonabhängige Interaktion (Abb. 5.2 B). In der Gegenwart von 10<sup>-4</sup> M T3 wird im GST-*Pulldown* eine deutliche Bande sichtbar, die in der Abwesenheit von Hormon fast vollständig verschwindet. Bei der GST-Kontrolle kommt es zu keiner Interaktion.

Damit konnte eine direkte Interaktion von CTCF mit TRIP12 bzw. E6-AP gezeigt werden. Des Weiteren bindet E6-AP nur in der Gegenwart von T3 den Thyroidhormon-Rezeptor



**Abb. 5.2: E6AP interagiert in vitro mit CTFCF und in Anwesenheit von T3 mit TRβ**

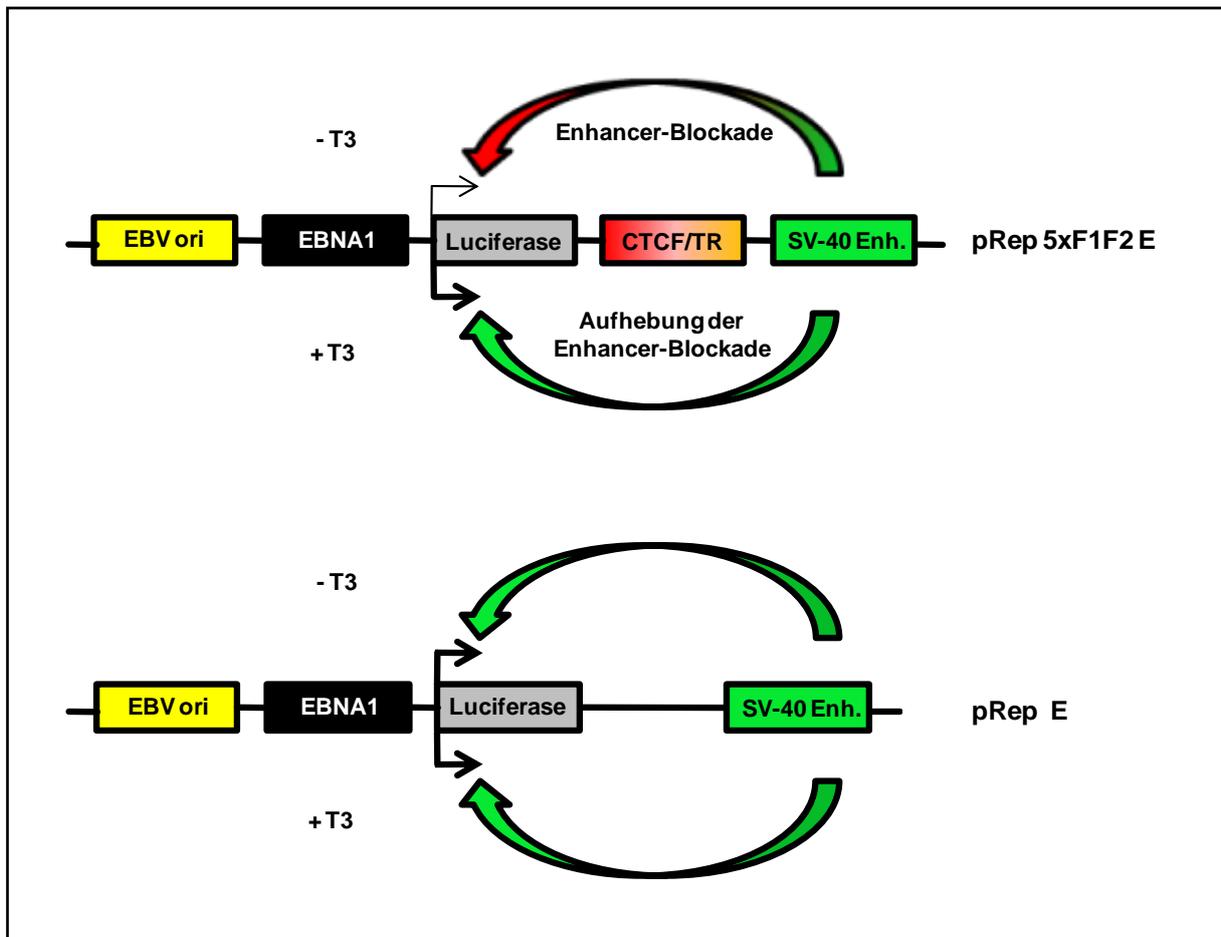
(A) GST und GST-E6-AP wurden zusammen mit *in vitro*-translatiertem, <sup>35</sup>S-markiertem TRβ in der An- bzw. Abwesenheit von 10<sup>-4</sup> M T3 inkubiert. (B) GST und GST-E6-AP wurden zusammen mit *in vitro*-translatiertem, <sup>35</sup>S-markiertem CTFCF inkubiert. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine Autoradiographie visualisiert das Signal für TRβ bzw. CTFCF vor (5% Input) und nach der Inkubation. Sternchen kennzeichnen die GST-Proteine und ein Pfeil verweist auf die Laufhöhe von TRβ bzw. CTFCF.

### 5.1.2 E6-AP zeigt geringen Einfluss im Enhancer-Blockade-Assay

Nachdem die Interaktion von TRIP12 und E6-AP sowohl mit CTCF als auch mit TR- $\beta$  gezeigt wurde, sollte nun ein möglicher Einfluss auf die hormonsensitive Enhancer-Blockade im episomalen System untersucht werden. Dafür wurde die Kodierungssequenz für E6-AP aus dem für die prokaryotische Expression bestimmten GST-Vektor ausgeschnitten und in einen für eukaryotische Expression geeigneten Vektor 3' eines Flag-tags einkloniert. Das gleiche Prozedere wurde mit E6-APmut, einer Mutante, die durch einen Austausch der Aminosäure 833 von Cystein zu Alanin nicht in der Lage ist Ubiquitin-Moleküle auf andere Proteine zu übertragen, durchgeführt. Diese Mutante sollte es ermöglichen, die beiden Funktionen von E6-AP zu unterscheiden und im Besonderen die Auswirkung einer möglichen Ubiquitinierung zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte TRIP12 nicht in einen geeigneten Vektor für die eukaryotische Expression zusammen mit einem Flag-tag einkloniert werden. Die Gründe hierfür waren vor allem Probleme die cDNA mit Primern, die zusätzliche Schnittstellen zum späteren Klonieren besitzen, mittels PCR zu amplifizieren. Somit konnte TRIP12 und dessen Einfluss im episomalen System nicht getestet werden.

Zur Analyse von E6-AP in Bezug auf die Enhancer-Blockade wurden HEK293T-Zellen mit dem Referenzvektor (pRep E), welcher dem episomalen Konstrukt pRep 5xF1F2 E entspricht mit Ausnahme der fehlenden kombinierten Bindestelle zwischen Enhancer und Promotor, und den im Rahmen dieser Arbeit neu klonierten Expressionsplasmiden für Flag-E6-AP bzw. Flag-E6-APmut transfiziert. Die Bindestellen für CTCF (F1) und TR (F2), die in das episomale System kloniert wurden, stammen aus dem Hühner-Lysozym-Silencer (Banahmad et al., 1990). Parallel wurde ein Expressionsplasmid für TR- $\beta$  und Lac-Z transient in die Zellen eingebracht. Das Verhältnis der Messwerte von der gegen die Lac-Z-Aktivität normalisierten Luciferaseaktivität des Referenzvektors zu den Werten des 5xF1F2 Konstrukts sind ein Maß für die Enhancer-Blockade. Für die spätere Expressionsanalyse mittels Western Blot wurde von jedem Transferansatz ein zusätzliches 6*well* transfiziert und parallel zu dem Luciferaseassay ausgewertet. Das episomale Testsystem wurde in unserem Labor als Standardexperiment für den Nachweis einer funktionellen Enhancer-Blockade etabliert (C. Weth, Doktorarbeit 2006). Das Konstrukt pRep 5xF1F2 E zeigt in transienten Transfektionen in der Abwesenheit von Hormon, in N2a $\beta$ -Zellen, eine ca. 8fach geringere Luciferaseaktivität als der Kontrollvektor pRep E. In der Gegenwart von  $10^{-6}$  M T3 wird dieser Effekt aufgehoben. Dieses System wurde im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Studien verwendet.

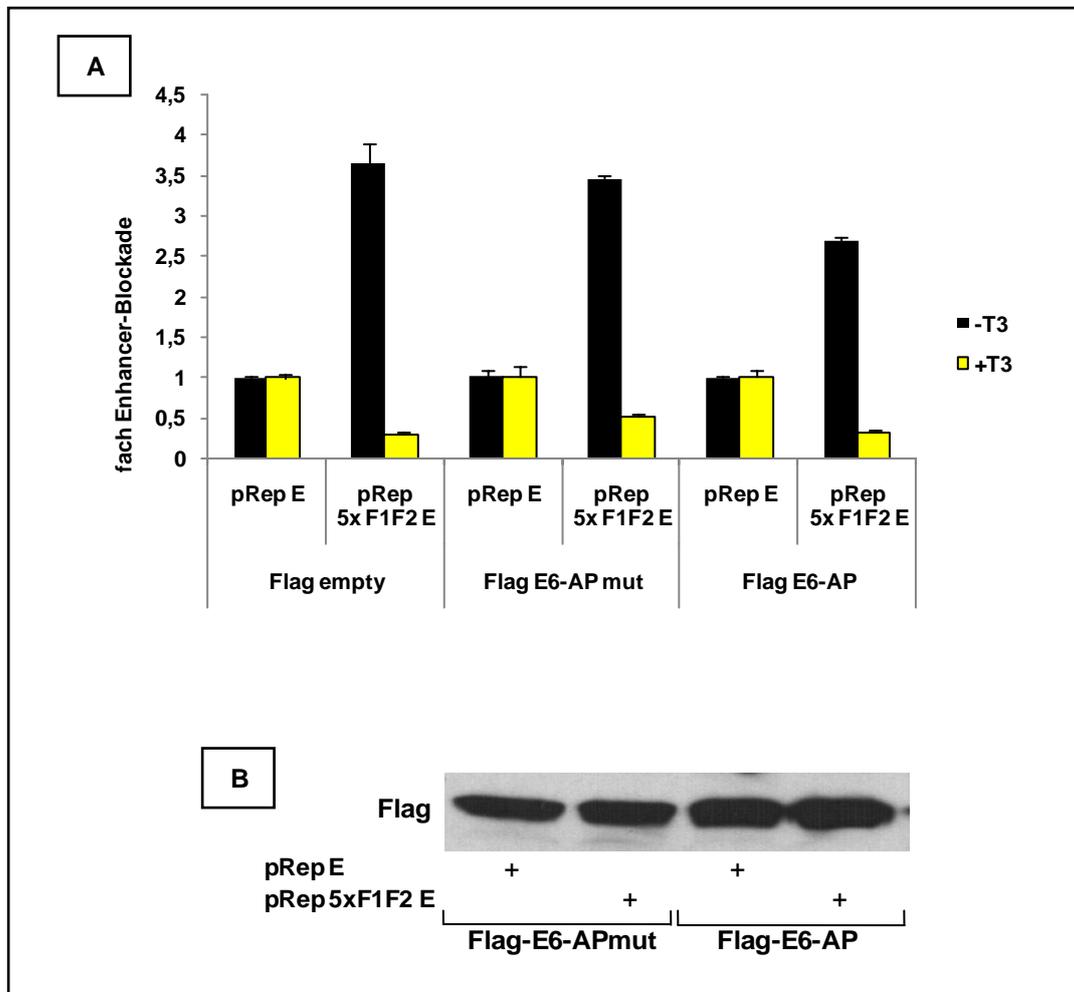


**Abb. 5.3: Die Blockierung des Enhancers durch die kombinierte CTCF (F1) und TR (F2) Bindestelle kann durch T3 aufgehoben werden**

Schematische Darstellung der hormonsensitiven Enhancer-Blockade. CTCF und TR binden an einen Isolator und ein benachbartes TRE. Dadurch wird die Aktivierung eines Enhancers auf ein Gen verhindert (rotgrüner Pfeil) und das Gen wird kaum exprimiert. Die Anwesenheit von T3 führt zur Aufhebung der Enhancer-Blockade (grüner Pfeil) und somit zur Steigerung der Genexpression. Die Luciferaseexpression des Referenzvektors (pRep E) wird nur marginal durch T3 beeinflusst.

Bei der Auswertung zeigt sich in dem Kontrollexperiment (Flag-empty) wie erwartet in der Abwesenheit von Hormon eine 3,5fache Enhancer-Blockade, die durch die Gabe von  $10^{-6}$  M T3 aufgehoben wird (Abb. 5.4 A). Die Überexpression von Flag-E6-APmut führt zu keiner Veränderung dieses Wertes. Der mutierte Faktor vermittelt somit in diesem experimentellen Ansatz keinen Einfluss als Coaktivator, was auch eine verstärkte Aktivierung in der Anwesenheit von Hormon zur Folge haben würde. Bei der Überexpression von Flag-E6-AP ist in der Abwesenheit von Hormon die Luciferaseaktivität leicht erhöht, was im Umkehrschluss zu einer etwas verringerten Enhancer-Blockade von ca. 2,5fach führt. Ob diese Reduzierung tatsächlich auf den Einfluss von E6-AP und nicht auf natürliche Schwankungen, die dem experimentellen Ansatz geschuldet sind, zurückzuführen ist, kann abschließend nicht geklärt werden. In einzelnen Experimenten wurde in der Abwesenheit

von Hormon sowohl eine leichte Erhöhung auf 4fach als auch eine Reduzierung der Enhancer-Blockade auf 1,5fach beobachtet. Die Expressionskontrolle zeigt im Western Blot Signale gleicher Stärke für E6-AP und E6-APmut sowohl in dem Transferansatz für den Referenz-Vektor pRep E als auch für pRep 5x F1F2 E (Abb. 5.4 B). Die Variationen sind daher nicht auf unterschiedliche Expressionen von E6-AP oder E6-APmut zurückzuführen.



**Abb. 5.4: Überexpression von E6-AP hat keinen signifikanten Einfluss auf Enhancer-Blockade**

(A) HEK293T-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Zusätzlich wurden 0,2 µg eines Expressionsplasmid für TR-β und 0,5 µg für Flag-empty, Flag-E6-AP bzw. Flag-E6-APmut cotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in der An- oder Abwesenheit von 10<sup>-6</sup> M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolllexperiments (pRep E) in der An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade der jeweiligen Episomen ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines cotransfizierten β-Galactosidase Vektors (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von 4 unabhängigen Versuchen gezeigt. (B) Western Blot eines zusätzlich für jeden Transferansatz transfiziertem 6wells Nachweis mit monoklonalem α-Flag-Erstantikörper.

In N2a $\beta$ -Zellen zeigen sich die gleichen Resultate wie in HEK293T-Zellen mit der experimentellen Einschränkung, die Expression von Flag-E6-AP und Flag-E6-APmut wegen einer zu geringen Transfereffizienz nicht mittels Western Blot detektieren zu können. Bei der Cotransfektion von Flag-E6-AP zeigt sich in der Abwesenheit von Hormon eine ca. 6,5fache Enhancer-Blockade im Vergleich zu 8,5fach (Anhang: Abb. 8.1). Die Überexpression von E6-APmut führt in der Abwesenheit von Hormon zu einer 10fachen Enhancer-Blockade. In allen Ansätzen wird bei der Inkubation der Zellen in T3-haltigem Medium die Blockade aufgehoben. Auch hier zeigen sich, wie schon weiter oben für HEK293T-Zellen beschrieben, zwischen einzelnen Experimenten Variationen, die es nicht zulassen einen signifikanten Effekt, der von E6-AP verursacht wird, zu postulieren.

Es konnte eine direkte Interaktion von E6-AP mit CTCF und in der Gegenwart von T3 mit dem Thyroidhormon-Rezeptor gezeigt werden. Die Überexpression von E6-AP im Luciferase-Assay hat aber nur einen geringen Einfluss auf die Enhancer-Blockade.

## **5.2 Identifikation benachbarter Bindestellen von CTCF und TR**

Es stellt sich die Frage, ob die hormonsensitive Enhancer-Blockade einen Mechanismus darstellt, welcher nur vereinzelt oder häufiger zu beobachten ist. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden zwei kombinierte CTCF- und TR-Bindestellen identifiziert, die eine hormonsensitive Enhancer-Blockade zeigen (Lutz et al., 2003). Diese stammen aus dem Hühner-Lysozym und dem humanen c-myc-Gen. Für beide existiert aber kein geeignetes Zellsystem, in dem die entsprechenden Gene durch T3 reguliert werden und am endogenen Locus eventuelle Veränderungen des Chromatins oder der Rekrutierung von Proteinen an die DNA studiert werden könnten. Daher ist die Identifikation weiterer benachbarter Bindestellen ein wichtiger Schritt und Schwerpunkt dieser Arbeit, um hormonsensitive Enhancer-Blockade an endogenen Genen untersuchen zu können.

### **5.2.1 Als Ausgangspunkt dienen 126 durch TR regulierte Gene**

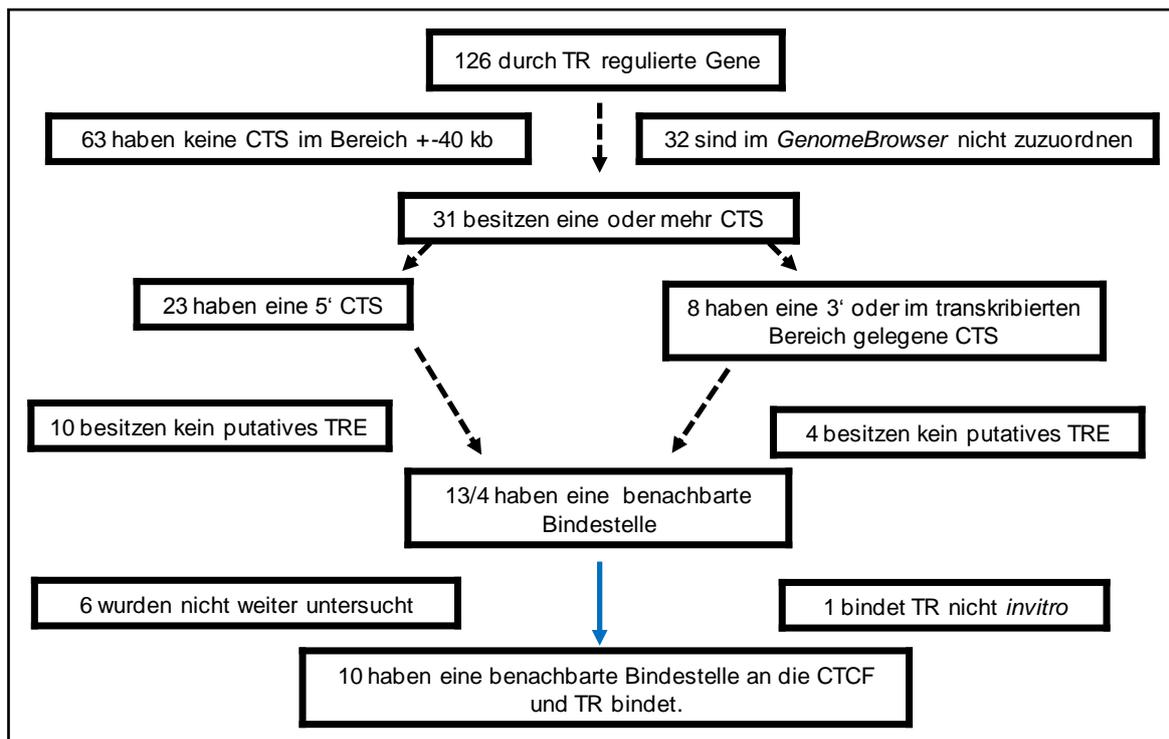
Um die Auswahl der Gene, die eine benachbarte CTCF- und TR-Bindestelle besitzen könnten, auf potenzielle Kandidaten zu fokussieren, wurde auf Microarray-Datensätze aus 3 unabhängigen Publikationen zurückgegriffen, die Gene identifiziert haben, welche von TR reguliert werden. In der ersten Publikation ist die Expression in 37 von 588 untersuchten Genen hoch oder runter reguliert. Hierbei wurde Herzgewebe von Ratten, die 15 Tage mit T3 behandelt wurden, gegen eine Kontrollgruppe untersucht (De et al., 2004). Weitere 55 durch

den TR regulierte Gene wurden in quantitativen Microarray-Versuchen identifiziert. Fluoreszierende cDNA, präpariert aus hypothyroiden und mit T3 behandelten Mäusen, wurde auf einen cDNA-Microarray hybridisiert, welcher 2225 unterschiedliche Mausgene repräsentiert, und anschließend eine Computeranalyse durchgeführt, um die relativen Unterschiede in der Genexpression zu untersuchen (Feng et al., 2000). Darüber hinaus wurden 33 Gene durch Genexpressionsprofile von murinem Lebergewebe von normalen und TR $\beta$ -defizienten Mauslinien nach 2 Stunden und 5 Tagen Induktion mit Thyroidhormon identifiziert. Somit konnten direkte und eventuelle sekundäre Langzeiteffekte und vor allem der Einfluss von TR $\beta$  unterschieden werden (Flores-Morales et al., 2002). Diese Gene wurden noch durch die Phosphoenolpyruvat Carboxy-Kinase (PEPCK) vervollständigt, ein Gen welches zelltypspezifisch, vor allem in der Leber, durch den TR reguliert ist und die Initiation der Gluconeogenese kontrolliert (Loose et al., 1985; Park et al., 1995). Somit dienen die hier beschriebenen Gene als Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung bezüglich einer kombinierten CTCF- und TR-Bindestelle. Eine detaillierte Übersicht der einzelnen Gene befindet sich im Anhang (Tabelle 8.1).

### 5.2.2 Identifikation von CTCF-Bindestellen 40 kb stromauf- bzw. abwärts des Transkriptionsstarts

Durch genomweite Untersuchungen von CTCF-Bindestellen stehen Datensätze zur Verfügung, mit Hilfe derer einzelne Gene untersucht werden können (Kim et al., 2007). In *ChIP on chip*-Experimenten wurden insgesamt 13804 CTCF-Bindestellen in primären humanen Fibroblasten identifiziert. Des Weiteren wurde ein Konsensus-Motiv, welches aus 20 Basenpaaren besteht und zur Vorhersage von CTCF-Bindestellen dient, beschrieben. Ein wichtiges Programm hierbei ist der *GenomeBrowser*, ein internetbasiertes Werkzeug zur Visualisierung von genomischen Daten und derer Annotationen. Dabei ist das Programm so gestaltet, dass externe Annotationsdatensätze jederzeit importiert werden können. Da die Datensätze für die CTCF-Bindestellen aus humanen Zellen stammen wurde jedes der durch den TR regulierten murinen Gene, wenn möglich, in den *GenomeBrowser* (*UCSC GenomeBrowser, human may 2004 assembly*) zusammen mit dem Datensatz für CTCF übertragen und einzeln kontrolliert, ob eine Bindung im Bereich 40 kb vor bis 40kb nach Transkriptionsstart vorliegt. 31 der untersuchten Gene besitzen eine oder mehrere Bindestellen für CTCF im untersuchten Bereich, wobei 64 Genregionen mit dem heutigen Wissensstand nicht von CTCF gebunden werden (Abb. 5.5 und Anhang: Tabelle 8.1). Die übrigen Gene konnten im *GenomeBrowser* weder mit Namen noch mit der Genbank-Eintragsnummer (*Accession number*) gefunden werden und somit auch nicht weiter

charakterisiert werden. Es wurde eine weitere Unterteilung der Gene, die eine CTCF-Bindestelle besitzen, vorgenommen. Das „klassische“ Beispiel aus dem Hühnerlysozym-Gen liegt im Promotorbereich des Gens und so wurden analog dazu die CTCF-Bindestellen in promotornahe (5' des Transkriptionsstarts) und Bindestellen im transkribierten oder stromabwärts liegende Sequenzbereiche unterteilt. Die Mehrzahl, nämlich 23 Bindestellen, liegen im 5' Bereich, die übrigen 8 entsprechend 3' davon.



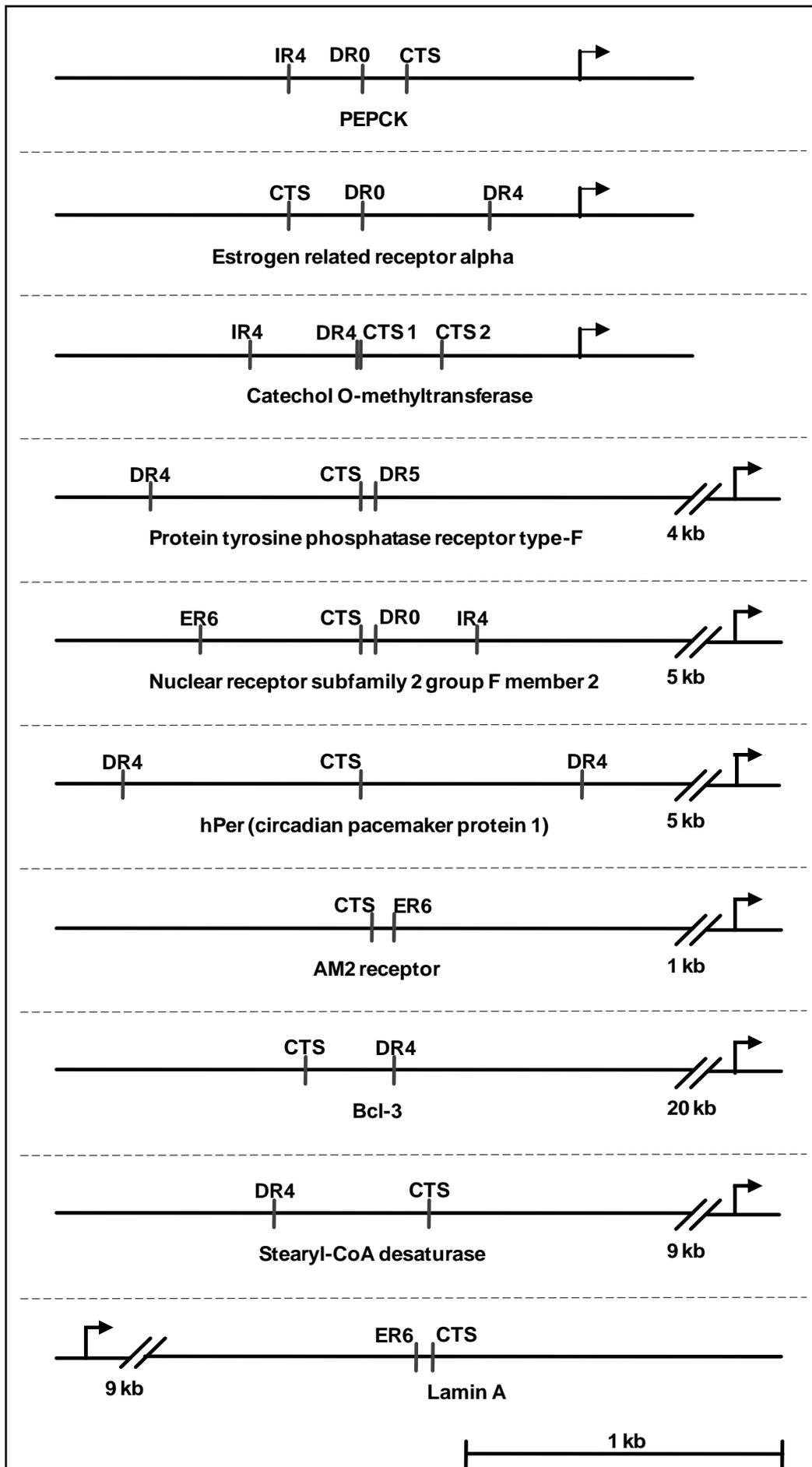
**Abb. 5.5: Von 126 untersuchten Genen besitzen 10 eine kombinierte Bindestelle für CTCF und TR**

Die 126 Gene aus dem murinen Genom wurden im ersten Schritt auf das humane Genom übertragen. Pfeile (schwarz gestrichelt = *in silico*, blau = *in vitro* Analysen) markieren jeweils Gene die weiter untersucht wurden. CTS = *CTCF Target Site*, TRE = *Thyroid hormone receptor Response Element*.

### 5.2.3 Identifikation von möglichen TR-Bindestellen mit Hilfe des *NUBIScan*-Algorithmus

Kernhormonrezeptoren werden durch eine Vielzahl von Hormonen, weiteren endogenen Substanzen und exogenen Molekülen aktiviert. Diese beeinflussen die Regulation ihrer Zielgene durch Bindung an Promotoren oder Enhancer auf spezifischen Erkennungssequenzen. Diese zu identifizieren ist meist der erste Schritt, um detailliertes Wissen über den Regulationsmechanismus eines Gens zu erhalten. Der *NUBIScan*-Algorithmus ist ein Computerprogramm, das verwendet wird, um Erkennungssequenzen von

Kernhormonrezeptoren vorherzusagen (Podvinec et al., 2002). Der Algorithmus bewertet dabei die Verteilung von Nukleotiden in einer Matrix und kombiniert die Werte beider Halbseiten, die für die Bindung von Dimeren erforderlich sind. Der TR erkennt eine Vielzahl an Bindemotiven als Monomer, Homodimer oder Heterodimer zusammen mit RXR. Dabei besteht eine Halbseite aus der Konsensussequenz AGGT(C/A)A, die in unterschiedlichen Ausrichtungen, wie z.B. Palindromen, invertierten Palindromen und direkten Wiederholungen mit Abständen von jeweils sechs, vier oder null Nukleotiden zueinander stehen können. In der Computeranalyse wurde auf Bindestellen des Typs DR0, DR4, DR5 (*direct repeat*), IR4 (*inverted repeat*) und ER6 (*everted repeat*), die alle dafür bekannt sind, TR zu binden, fokussiert (Desvergne, 1994). Von den 23 Genen, die eine 5' CTCF-Bindestelle haben, besitzen 10 keine putative TR-Bindestelle, die übrigen 13 zeigen aber im *NUBIScan*-Algorithmus eine mögliche Zielsequenz (Abb. 5.5). Bei den restlichen 8 Genen zeigen 4 eine negative und 4 eine positive Vorhersage. Damit haben ca. 50% (17 von 31) der untersuchten CTCF-Bindestellen eine mögliche benachbarte TR-Bindestelle. Um die Auswahl weiter einzugrenzen, wurden 6 Gene nicht weiter untersucht. Die Kriterien für den Ausschluss waren recht unterschiedlich wie z.B. ein niedriger Vorhersagewert (*Score*), für die TR-Bindung, relativ große Distanz (>800bp) zwischen der CTCF- und der TR-Bindestelle oder keine genaue Vorhersage für ein CTCF-Bindeelement, sondern nur ein relativ großer Sequenzbereich, der durch die *ChIP on chip*-Experimente bekannt war. Die einzelnen Namen der detailliert untersuchten Gene, Anzahl und Ausrichtung der CTCF- und TR-Bindestellen sind in Abbildung 5.6 zu sehen.

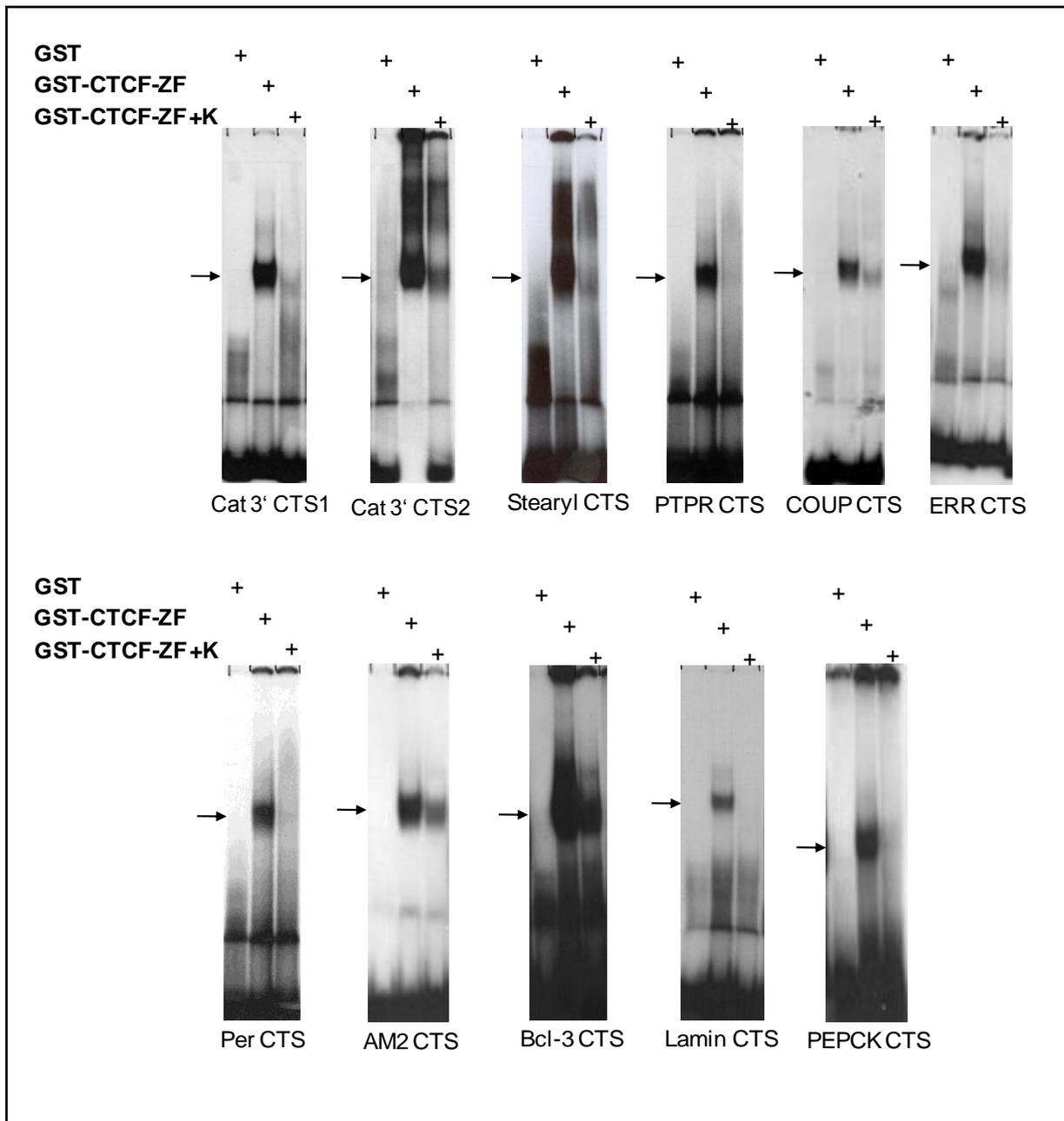


**Abb. 5.6: Schematische Darstellung der Gene mit kombinierter CTCF- und TR-Bindestelle.**

Die einzelnen Skizzen zeigen jeweils die Bezeichnung des Gens und den Bereich in Basenpaaren (bp), der auf eine putative TR-Bindestelle untersucht wurde. Durch einen schwarzen Pfeil ist der Transkriptionsstart gekennzeichnet. Eine CTCF-Bindestelle ist mit CTS und eine TR-Bindestelle entsprechend mit DR0, DR4, DR5, IR4, DR0 oder ER6 markiert.

**5.2.4 Alle CTCF-Bindestellen zeigen *in vitro*-Bindung**

Wie bereits zuvor erwähnt wurde, basieren die Vorhersagen für CTCF-Bindung auf *ChIP on chip*-Datensätzen und einer Konsensussequenz, die es ermöglicht, diese im Genom vorherzusagen. Die Rohdaten der *ChIP on chip*-Signale beinhalten die kompletten Intervalle, unabhängig von der Signalstärke des Arrays, und umfassen somit mehrere hundert Basenpaare. Deswegen wurden alle, im Rahmen dieser Arbeit, vorhergesagten CTCF-Elemente hinsichtlich der *in vitro*-Bindung von *E.coli*-exprimierter GST-CTCF Zinkfinger-Domäne (GST-CTCF ZF) untersucht. Diese Proteinextrakte erzeugen im EMSA mit der jeweiligen radioaktiv markierten Sonde ein deutliches Signal (Abb. 5.7). Diese Interaktion kann durch einen Überschuss an nicht-radioaktiv markierter F1 wt-Bindestelle (bekannte CTCF-Bindestelle des Hühner-Lysozym-Gens) in allen Ansätzen komplett oder stark kompetiert werden, was zeigt, dass die Bindung von GST-CTCF ZF spezifisch ist. In allen Ansätzen wurde ein großer Überschuss an Lachssperma-DNA verwendet, um eine Kompetition nur durch die zusätzliche DNA auszuschließen. GST allein ist nicht in der Lage eine retardierte Bande zu erzeugen. Diese Ergebnisse zeigen, dass CTCF alle vorhergesagten Sequenzen *in vitro* bindet.



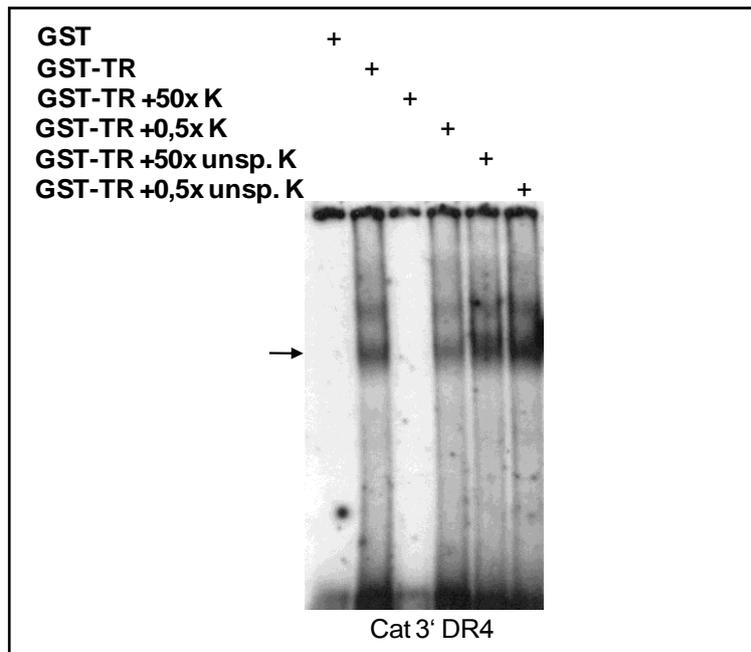
**Abb. 5.7: CTCTF bindet im EMSA an alle vorhergesagten Elemente**

0,5-2  $\mu\text{g}$  *E.coli*-exprimiertes und aufgereinigtes GST als Negativkontrolle oder GST-CTCF ZF wurden zusammen mit jeweils 1 pM radioaktiv markiertem Oligonukleotid und 2  $\mu\text{g}$  Lachssperma-DNA inkubiert und anschließend auf einem 5%-igen PAA-Gel aufgetragen. Für Konkurrenzexperimente wurden die Ansätze zusätzlich mit einem 50fach Überschuss an nicht-radioaktiv markierter DNA-Sonde (K = Kompetitor F1) versetzt. Pfeile markieren die Laufhöhe von GST-CTCF ZF.

### 5.2.5 Etwa 50% der vorhergesagten TR-Elemente zeigen *in vitro*-Bindung

Analog zu den CTCTF-Bindestellen wurden auch alle vorhergesagten TR-Bindestellen im EMSA auf *in vitro*-Bindung überprüft. Im Unterschied zu den CTCTF-Elementen basieren die

Vorhersagen für TR ausschließlich auf dem *NUBIScan*-Algorithmus und wurden noch nicht in der Literatur beschrieben. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung von E.coli-exprimiertem GST-TR wurde in einem zufällig ausgewählten Fall mit der TR Bindestelle aus dem Hühner-Lysozym-Gen (F2) und zusätzlich auch mit einer mutierten Bindestelle (F2mut) kompetiert. Die Sonde Cat 3' DR4 führt zu einer klaren Retardierung, wenn sie mit GST-TR inkubiert wird (Abb. 5.8). Dieses Signal kann durch einen 50fachen Überschuss an spezifischem Kompetitor (F2) komplett und bei der 0,5fachen Menge bereits teilweise kompetiert werden. Die mutierte F2 Bindestelle, die nicht in der Lage ist TR zu binden (Weth, Doktorarbeit 2006), bewirkt keine Abschwächung der retardierten Bande, was zeigt, dass die Bindung von GST-TR spezifisch ist und nicht durch die zusätzliche DNA hervorgerufen wird. In allen weiteren Bandshift-Experimenten wurde lediglich mit einem 50-fachen Überschuss an spezifischem Kompetitor gearbeitet. Die Sonde Stearyl DR4 zeigt eine deutlich verringerte Mobilität, wenn sie mit GST-TR inkubiert wird. Dieses Signal kann durch einen 50fachen Überschuss an spezifischem Kompetitor stark reduziert werden. GST allein ist nicht in der Lage eine retardierte Bande zu erzeugen (Abb. 5.9). Die Bindung ist demnach spezifisch für dieses Element. Bei den Sonden PTPR DR5, COUP DR0, ERR DR0, Per DR4 5', AM2 ER6, Bcl-3 DR4, Lamin ER6 und PEPCK IR4 konnten ebenfalls Banden mit geringerer Mobilität, die spezifisch kompetierbar sind, festgestellt werden. Die Sonde ERR $\alpha$  DR4 erzeugt keine retardierte Bande, wenn sie mit GST-TR inkubiert wird. Auch in der Abwesenheit von unspezifischer Lachssperma-DNA konnte kein Signal beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es findet demnach keine Bindung von GST-TR im EMSA an diese Sonde statt. Ebenfalls keine retardierte Bande zeigen die Sonden Cat 3' IR4, PTPR DR4, COUP IR4, ERR DR4, Per DR4 3' und GHR DR5/4. Die putative kombinierte Bindestelle des *growth hormone receptors* ist damit die einzige, die keine Bindung im EMSA zeigt. Ein Signal, welches nicht kompetiert werden kann, wird bei den Sonden COUP ER6 und PEPCK DR0 identifiziert. Dies deutet auf unspezifische Bindung von Protein an diese DNA-Elemente hin und ist demnach zumindest *in vitro* keine Bindestelle für den TR. Etwa die Hälfte (10 von 19) der so untersuchten DNA-Sonden zeigen im EMSA ein spezifisches Signal und konnten so als neue TR-Bindestellen identifiziert werden.

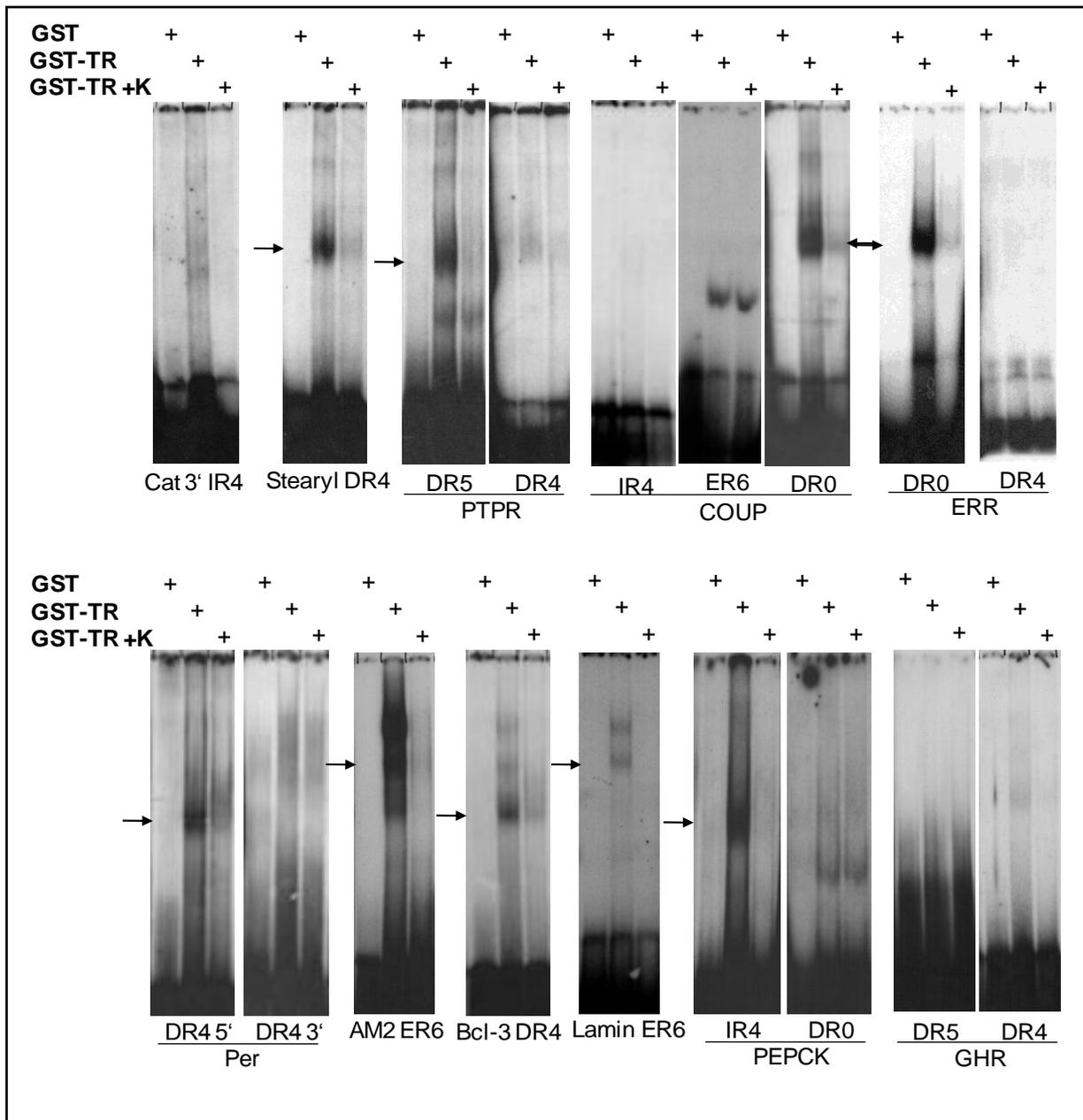


**Abb. 5.8: GST-TR bindet spezifisch an die Sonde Cat 3' DR4**

Mit dem Unterschied zu Abb. 5.7 wurde 1 pM radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit GST oder GST-TR inkubiert und mit spezifischem (K = Kompetitor F2) und unspezifischem Kompetitor (unsp. K = Kompetitor F2mut) in der Gegenwart von 0,2 µg Lachssperma-DNA und 0,1 µl Poly (dI-dC) inkubiert. Der Pfeil markiert die Laufhöhe von GST-TR.

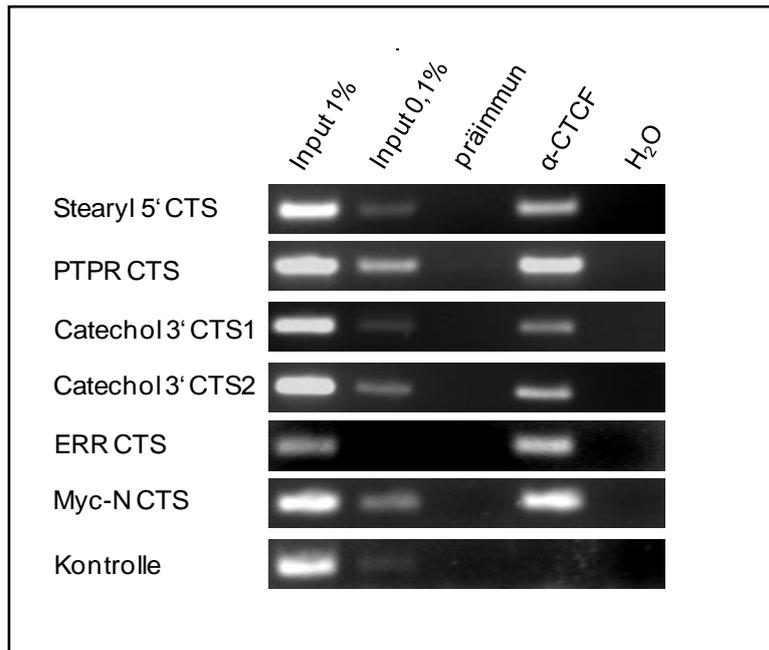
### 5.2.6 CTCF bindet *in vivo* - TR kann mangels geeignetem Antikörper nicht nachgewiesen werden

Um einen *in vivo*-Beweis für die Bindung von CTCF auf den jeweiligen Elementen zu erhalten, wurden ChIP-Analysen mit Chromatin von HeLa-Zellen durchgeführt. Die Präzipitation mit einem CTCF-Antikörper und anschließender Amplifizierung der genomischen Bereiche der humanen CTCF-Bindestellen zeigte eine deutliche Rekrutierung von CTCF (Abb. 5.10). Je nach Bindestelle wurden zwischen 0,1 und 1% des eingesetzten Chromatins präzipitiert. Als Positivkontrolle diente die humane *Myc-N site*, eine bereits publizierte CTCF-Bindestelle (Filippova et al., 1996). Chromatin, welches mit Präimmunserum inkubiert und amplifiziert wurde, diente als Negativkontrolle. Hierbei wurde kein Produkt gebildet. Des Weiteren wurden, um die spezifische Bindung von CTCF auf dem jeweiligen Element zu zeigen, Primer verwendet, die einen Genombereich 4 kb stromaufwärts der möglichen ERR $\alpha$ -CTS amplifizieren (Kontrolle). Hier ist CTCF nicht nachweisbar, was eine spezifische Präzipitation des Chromatins durch den CTCF-Antikörper zeigt. Damit konnte auf allen 5 zufällig ausgewählten CTCF-Bindestellen eine Rekrutierung *in vivo* nachgewiesen werden.



**Abb. 5.9: TR bindet im EMSA an 9 bisher unbekannte Elemente**

Es wurde wie in Abb. 5.8 *E.coli* exprimiertes GST-TR Protein mit den jeweiligen Sonden inkubiert und auf einem 5%-igen PAA-Gel aufgetragen. Es wurde ausschließlich mit einem 50-fachen Überschuss an spezifischer F2-Sonde kompetiert. Pfeile markieren die Laufhöhe von GST-TR.



**Abb. 5.10: CTCF bindet *in vivo* an 5 zufällig ausgewählten Elementen**

HeLa-Zellen wurden 24h vor Versuchsbeginn in Maxischalen ausgesät. Für die ChIP-Analyse wurde der Zellextrakt mit 5µl CTCF-Antikörper oder 5µl Präimmunserum inkubiert. 1 bzw. 0,1% der Chromatinfraction wurde als Input für die PCR verwendet. Die semi-quantitative Amplifikation erfolgte mit Primern spezifisch für die jeweilige CTCF-Bindestelle. Angegeben sind jeweils die Abkürzungen der Gene. Myc-N diente hierbei als Positivkontrolle. Die PCR bestand aus 35-37 Zyklen und ist von den eingesetzten Primern abhängig.

Analog zu den ChIP-Experimenten mit einem CTCF-Antikörper wurden auch Versuche mit einem TR-β Antikörper durchgeführt, um Anhaltspunkte über eine *in vivo*-Bindung auf den benachbarten Elementen zu erhalten. TR-β wird in GH<sub>3</sub>-Zellen, einer murinen Hypophysenzelllinie, nach der Zugabe von T<sub>3</sub> zyklisch zu vier untersuchten Promotoren, darunter auch PEPCK, rekrutiert (Liu et al., 2006). Ein Maximum kann nach 105 Minuten festgestellt werden. Laut Herstellerangaben ist dieser in der beschriebenen Studie verwendete Antikörper in der Lage, den TR-β von Ratten und Menschen in ChIP-Experimenten gleichermaßen zu präzipitieren.

ChIP-Analysen mit dem Chromatin von HeLa- und HepG2-Zellen, die zuvor für 0, 30, 90, 105 und 120 Minuten mit T<sub>3</sub> behandelt wurden, zeigten in der folgenden PCR mit Primern für den Promotor von PEPCK, Myc-N sowie dem benachbarten Bindeelement des PTPR-Gens keine Signale (Daten nicht gezeigt). PEPCK und Myc-N sollten hierbei als Positivkontrolle dienen, die beweisen sollte, dass der Antikörper in der Lage ist, den humanen TR-β auf bekannten Bindestellen zu präzipitieren, um später alle neu identifizierten TR-Bindestellen zu testen. Aber mangels eines adäquaten Antikörpers konnte weder gezeigt noch widerlegt werden, dass TR-β *in vivo* zu den neu beschriebenen Bindestellen rekrutiert wird.

### 5.3 Klonierung der kombinierten Bindestellen in episomale Vektoren und funktionelle Analysen

Damit die neu identifizierten benachbarten Bindeelemente auf ihre Funktionalität hin untersucht werden können, ist es nötig, sie in ein Vektorsystem zu integrieren, welches es ermöglicht die hormonsensitive Enhancer-Blockade zu untersuchen. Entsprechend ihrer genomischen Orientierung relativ zum jeweiligen Transkriptionsstart wurden die kombinierten Bindestellen in einen episomalen Testvektor eingebracht.

#### 5.3.1 Klonierung in einen episomalen Vektor

Ein erster Schritt ist es, den jeweiligen genomischen Lokus mittels PCR zu amplifizieren und in einen adäquaten Vektor (pGEM<sup>®</sup>-T) zu klonieren. Die Primer wurden so konstruiert, dass an den Enden eine Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme XbaI bzw. SpeI entsteht, um das subklonierte Element wieder auszuschneiden. Für 2 benachbarte Elemente (Stearyl und Per) wurden je zwei verschiedene Primerpaare benutzt, die aber in der PCR kein spezifisches Produkt ergaben. Es war daher nicht möglich, diese beiden Elemente auf ihre Funktionalität hin zu untersuchen. Die übrigen wurden in einen episomalen Vektor kloniert, um die hormonsensitive Enhancer-Blockade zu untersuchen.

**Tabelle 5.1: Übersicht der klonierten episomalen Vektoren**

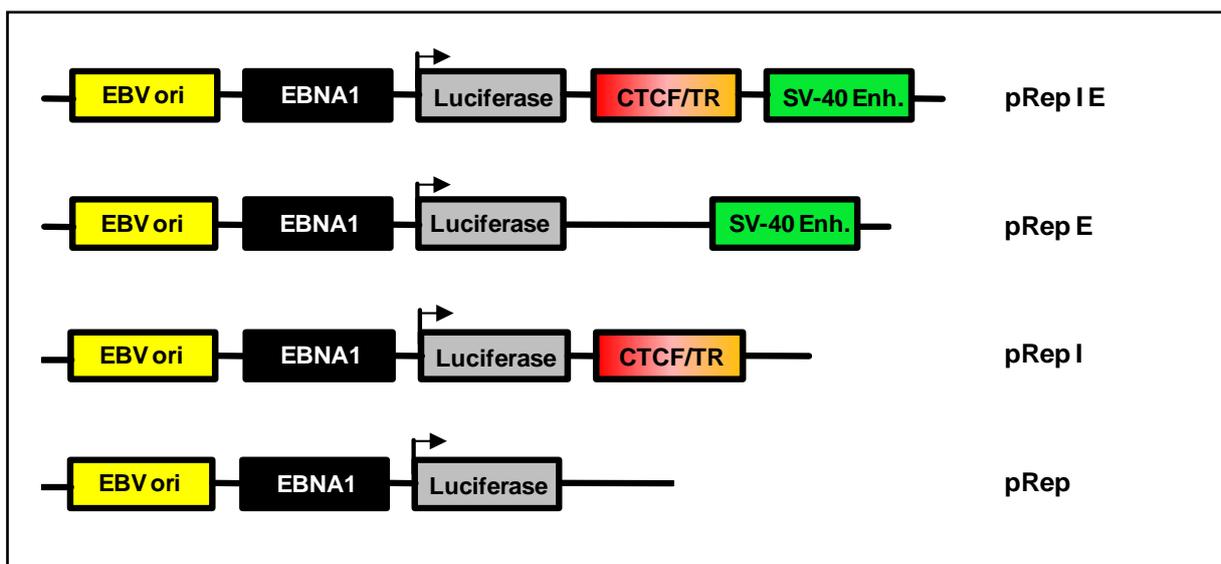
Klonierte Konstrukte sind mit (+) gekennzeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Episomen sind fett (+) markiert.

Kombinierte Bindestellen	pRep Konstrukte					
	Monomer	Tetramer	Pentamer	Monomer	Tetramer	Pentamer
	mit SV40-Enhancer			ohne SV40-Enhancer		
Lamin A (n)	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
Lamin A (r)	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-
PEPCK	<b>+</b>	-	-	<b>+</b>	-	-
ERR $\alpha$	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-
AM2-Rezeptor	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-
Catechol 3'	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
COUP-TF	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-
Bcl-3	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-
PTPR type F	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-

Um schwache Hormoneffekte im Luciferase-Assay zu erkennen, wurden die Inserts mit den kombinierten Bindestellen sowohl als Monomer, Tetramer und in zwei Fällen auch als Pentamer hergestellt (Methoden: 4.2.5). Die Tabelle 5.1 zeigt eine Übersicht der episomalen Konstrukte die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden.

Durch seine episomalen Eigenschaften ist pRep4 für die transiente Transfektion in eukaryotische Säugerzellen optimiert und bleibt hier unter anderem durch das *Eppstein Barr Nuclear Antigen 1* (EBNA-1) und einen viralen *Origin of Replication* (OriP) auch nach einer Zellteilung vorhanden. Neben den Vektoren mit SV 40-Enhancer wurden außerdem Episomen ohne Enhancer hergestellt, die als wichtige Kontrollen dienen, um zwischen Promotorrepression und Enhancer-Blockade, beides Eigenschaften die für CTCF beschrieben wurden, zu unterscheiden (Abb. 5.11).

Mit den klonierten Episomen konnten nun in transienten Reporterversuchen die benachbarten Bindestellen von CTCF und TR in Bezug auf hormonsensitive Enhancer-Blockade untersucht werden.



**Abb. 5.11: Schematische Darstellung der Luciferase-Episomen mit kombinierten CTCF/TR-Bindestellen**

In den p3 $\alpha$  5'-3'-Vektor wurden die monomeren oder multimerisierten CTCF/TR-Bindestellen zwischen SV40-Enhancer und Promotor des Luciferase-Reportergens kloniert. Das Isolator(I)-Enhancer(E)-Promotor-Gen-Element oder Isolator-Promotor-Gen-Element wurde daraufhin ausgeschnitten und in den episomalen Vektor pREP4-ss kloniert.

### 5.3.2 Das kombinierte Bindeelement des ERR $\alpha$ Gens zeigt in 2 Zelllinien hormonsensitive Enhancer-Blockade

Die Bindung von CTCF an Isolatorsequenzen kann die Wirkung eines Enhancers auf Promotoren blockieren, wenn sich die Isolatorsequenz zwischen beiden Elementen befindet. Diese Enhancer-Blockade kann in einigen Fällen durch die benachbarte Bindung des Schilddrüsenhormon-Rezeptors hormonabhängig moduliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden solche benachbarten Bindestellen für TR und CTCF identifiziert und zwischen Enhancer und Promotor eines episomalen Systems kloniert. Dieses Testsystem ermöglicht Rückschlüsse auf die Wirkung von CTCF und die Auswirkungen von Hormonbehandlung auf die Enhancer-Blockade.

Es wurden HepG2-Zellen mit dem Referenzvektor (pRep E), welcher den episomalen Konstrukten entspricht mit Ausnahme der fehlenden kombinierten Bindestelle zwischen Enhancer und Promotor, und den im Rahmen dieser Arbeit neu klonierten Episomen transfiziert. Parallel wurde ein Expressionsplasmid für TR- $\beta$  und Lac-Z transient in die Zellen eingebracht. Das Verhältnis der Messwerte von der gegen die Lac-Z-Aktivität normalisierte Luciferaseaktivität des Referenzvektors zu den Werten der Konstrukte mit CTCF und TR Bindestellen sind ein Maß für die Enhancer-Blockade.

Das Episom pRep F1F2 E dient dabei als Positivkontrolle. In HepG2-Zellen erreicht die Enhancer-Blockade in Abwesenheit von Hormon einen Wert von 1,4. Nach Zugabe von T3 kann eine deutliche Reduzierung auf ca. 0,2 beobachtet werden (Abb. 5.12 A). Die kombinierte Bindestelle AM2 zeigt weder in der Ab- noch in der Anwesenheit von T3 einen Einfluss auf die Aktivität des Luciferasegens und somit sind die Werte bei ca. 1. Die benachbarten Elemente des Lamin-A Gens stammen als einzige aus einem transkribierten Bereich. Da es keinerlei Erfahrung hinsichtlich der Orientierung solcher Elemente in Bezug auf die hormonabhängige Enhancer-Blockade gibt, wurde diese Bindestelle in ihrer natürlichen (n) und reversen (r) Orientierung in das episomale System kloniert. Lamin (n) zeigt im Unterschied zu Lamin (r) in der Abwesenheit von T3 Enhancer-Blockade der Stärke 1,5, die aber nicht signifikant nach Zugabe von Hormon reduziert wird. Dies gilt auch für das Insert Cat 3'. Die Inserts PEPCK, COUP, Bcl-3 und PTPR zeigen in hormonfreiem Medium eine Enhancer-Blockade zwischen 1,4 und 2, welche aber nicht durch die Zugabe von T3 moduliert wird. Eine 2fache Enhancer-Blockade in hormonfreiem Medium zeigt das ERR $\alpha$ -Element, welches im Unterschied zu allen anderen getesteten kombinierten Bindestellen durch die Zugabe von T3 signifikant aufgehoben wird und somit als aussichtsreicher Kandidat für ein neues benachbartes Bindeelement angesehen werden kann.

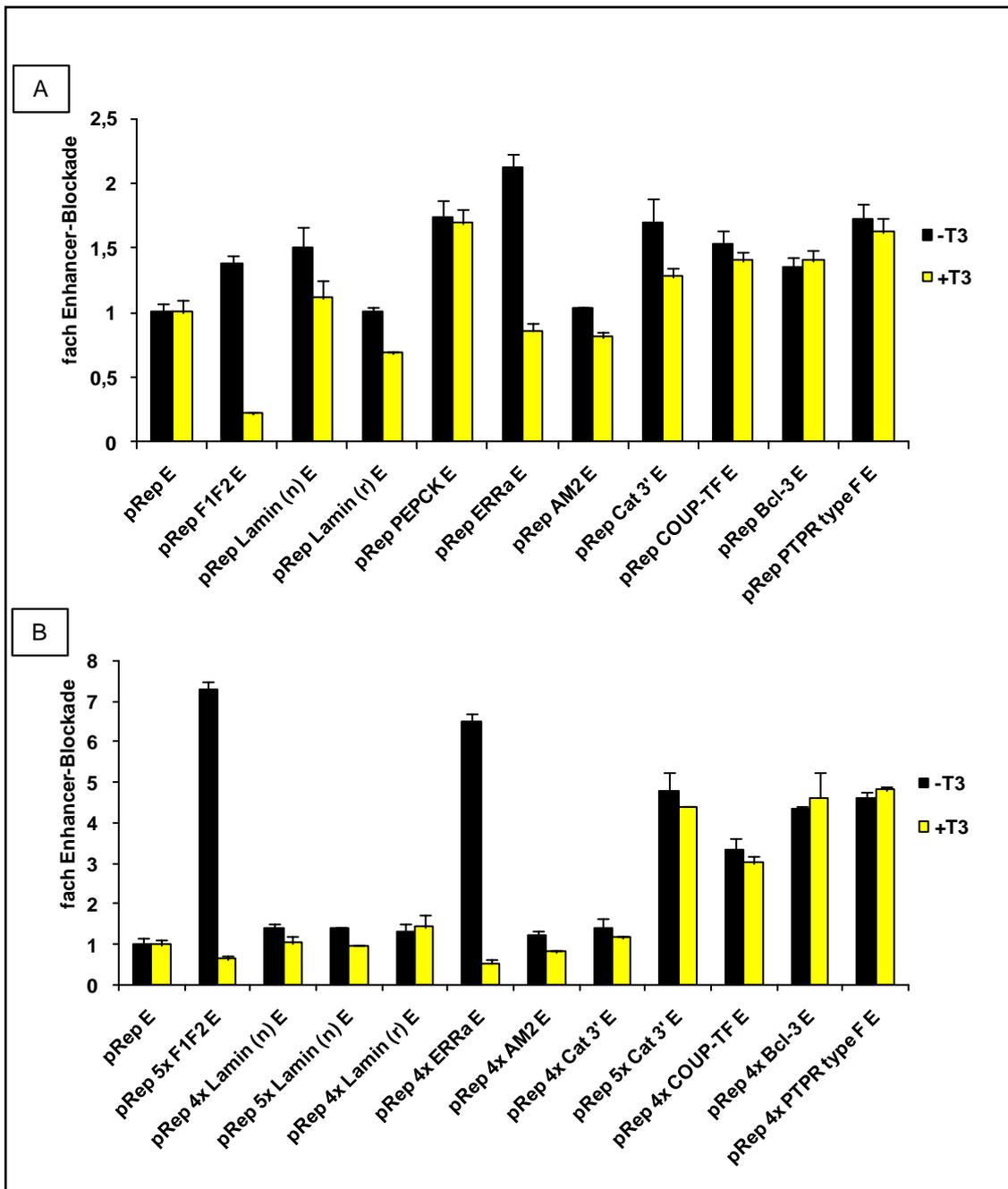
Um mögliche Effekte sowohl in Bezug auf die Enhancer-Blockade als auch auf deren Aufhebung zu untersuchen, wurden alle benachbarten Bindeelemente als Tetramer

multimerisiert. Zwei zufällig ausgesuchte Elemente wurden zusätzlich zu Pentameren multimerisiert, da zum einen die Positivkontrolle (5xF1F2) auch als Pentamer vorliegt und zum anderen gezeigt wurde, dass sich zwei Kopien des Su(Hw) Isolators in ihrer Aktivität als Isolator gegenseitig neutralisieren (Muravyova et al., 2001). Dieser Mechanismus könnte sich unter Umständen auch auf tetramere Kopien eines Isolators übertragen lassen.

Ebenso wie bei den Monomeren zeigt 5xF1F2 (Positivkontrolle) in der Abwesenheit von Hormon Enhancer-Blockade, die aber durch die Multimerisierung auf ca. 7fach ansteigt. Durch T3 kann dieser Effekt komplett aufgehoben werden. Diese Verstärkung der Effekte ist auch bei 4xERR $\alpha$  zu beobachten (Abb. 5.12 B). Ohne Hormon steigt die Enhancer-Blockade auf das Sechsfache an. Zugabe von T3 führt zu einer Aufhebung dieses Effekts. Damit wird das Ergebnis des monomeren Konstrukts bestätigt und die Eigenschaft dieser benachbarten Bindestelle als hormonsensitiver Enhancer-Blocker untermauert. Die anderen Konstrukte können grob in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die Elemente 4/5xLamin(n), 4xLamin(r), 4xAM2 und 4xCat 3' zeigen in hormonfreiem Medium nur eine geringe Enhancer-Blockade von ca. 1,2fach. Durch Zugabe von Hormon verändert sich dieser Zustand nicht. Die übrigen (5xCat3', 4xCOUP, 4xBcl-3 und 4xPTPR) zeigen im Vergleich zu den monomeren Konstrukten in der Abwesenheit von Hormon eine deutlich erhöhte Enhancer-Blockade, die zwischen 4 und 5fach liegt, aber im Unterschied zu F1F2 und ERR $\alpha$  nicht hormonsensitiv ist. Über den Mechanismus der hormonsensitiven Enhancer-Blockade ist noch relativ wenig bekannt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass Co-Faktoren für CTCF und TR dabei eine Rolle spielen. Da Zellkulturen aus unterschiedlichen Geweben eine für den jeweiligen Zelltyp spezifisches Proteom besitzen, wurden die Konstrukte in zwei weiteren Zellsystemen (HeLa und N2a $\beta$ ) getestet. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass N2a $\beta$ -Zellen in Bezug auf das 5xF1F2 Element die stärkste Enhancer-Blockade zeigt. Dies konnte hier bestätigt werden. Es findet eine 9fache Enhancer-Blockade in der Abwesenheit von Hormon statt, die vollständig aufgehoben werden kann (Anhang: Abb. 8.2 B). Mit Ausnahme von 4xLamin (n) und 4xLamin(r) die keine Blockade zeigen, kann bei allen anderen eine Enhancer-Blockade, die zwischen 2 und 4fach liegt, festgestellt werden. Diese ist aber nicht durch die Zugabe von Hormon aufzuheben.

Auch in HeLa-Zellen zeigt sich keine hormonsensitive Enhancer-Blockade der neu klonierten Konstrukte. Die Positivkontrolle 5xF1F2 zeigt eine 5fache Blockade, die hormonsensitiv ist. Die Elemente 4xERR $\alpha$ , 5xCat3', 4xCOUP, 4xBcl-3 und 4xPTPR führen zu einer 2-4fachen Enhancer-Blockade, die aber nicht durch die Zugabe von T3 aufgehoben wird (Anhang: Abb. 8.3 B). Die übrigen zeigen auch in der Abwesenheit von Hormon keinen Effekt.

Durch den Luciferase-Assay konnte mit ERR $\alpha$  ein Gen mit einer bislang unbekanntem funktionellen kombinierten Bindestelle von CTCF und TR identifiziert werden, die in den nachfolgenden Experimenten weiter charakterisiert wird.

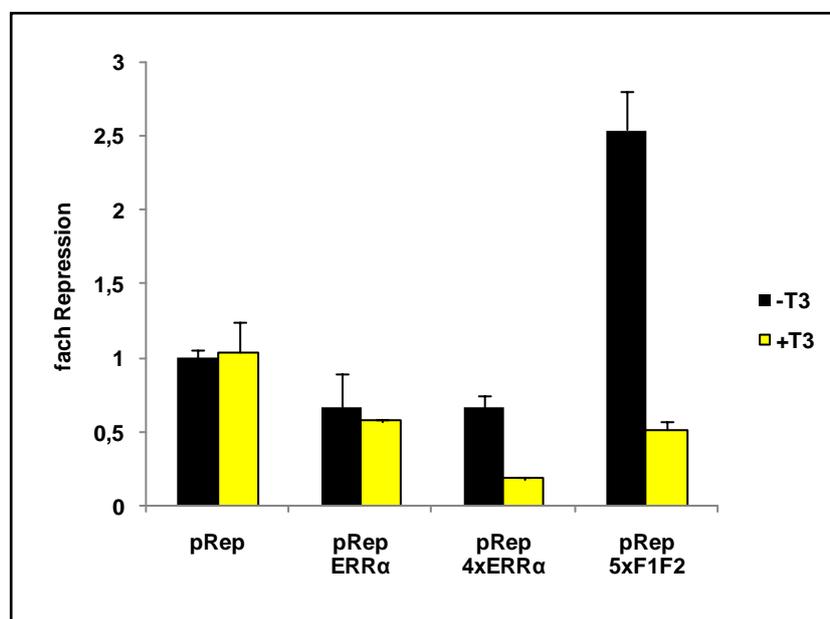


**Abb. 5.12: Die kombinierte Bindestelle ERRα vermittelt im episomalen System hormone-sensitive Enhancer-Blockade**

HepG2 Zellen wurden in 6 wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Zusätzlich wurden 0,2 µg eines Expressionsplasmid für TR-β cotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in der An- oder Abwesenheit von 10<sup>-6</sup> M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontroll-experiments (pRep E) in An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade der jeweiligen Episomen ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines cotransfizierten β-Galactosidase-Vektors (pCMV-LacZ, 0,5 µg) normalisiert. Orientierung der genomischen Sequenz relativ zum Promotor: (natürliche Orientierung (n), reverse Orientierung (r)). Es ist ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängigen Versuchen gezeigt. (A) Episomen mit monomerer Integration der Bindestellen. (B) Multimerisierte Konstrukte.

### 5.3.3 Das ERR $\alpha$ -Element wirkt als Isolator und nicht als Repressor auf den Promotor

Um den Einfluss von CTCF auf die Luciferase-Aktivität durch Genrepression zu untersuchen, wurden die episomalen Vektoren ohne Enhancer transfiziert. Anhand dieser Ergebnisse können die unterschiedlichen Funktionen in Bezug auf Repression und Enhancer-Blockade von CTCF analysiert werden. Für die 5xF1F2 Bindestelle wurde in N2a $\beta$ -Zellen eine 4fache Repression durch CTCF beschrieben, die aber durch die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade deutlich übertroffen wird (C. Weth, Doktorarbeit 2006)



**Abb. 5.13: Das ERR $\alpha$ -Element hat keine reprimierende Wirkung auf den Luciferase-Promotor**

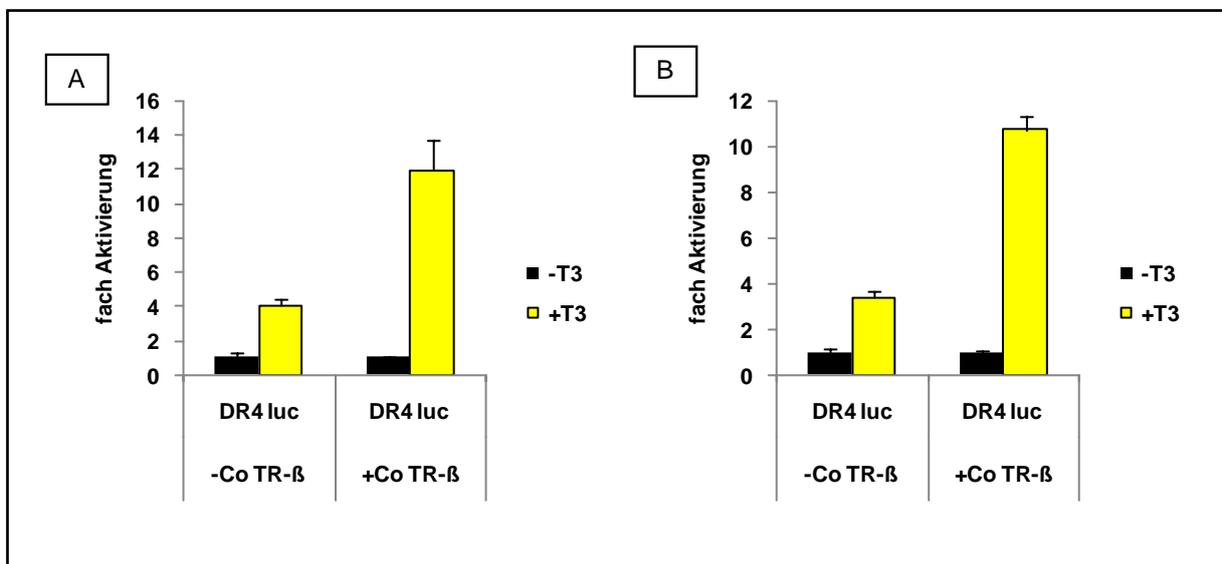
HepG2-Zellen wurden in 6 wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1  $\mu$ g episomalem Reporter ohne SV 40-Enhancer transfiziert. Zusätzlich wurden 0,2  $\mu$ g eines Expressionsplasmid für TR- $\beta$  cotransfiziert. Die Auswertung erfolgte analog zu Abb. 5.12.

In HepG2-Zellen, die in hormonfreiem Medium kultiviert wurden, führt die Transfektion mit pRep 5xF1F2 E und anschließender Auswertung der Luciferaseaktivität zu einem Anteil der Repression von 2,5fach. Sowohl bei dem monomeren als auch bei dem multimeren ERR $\alpha$ -Element zeigt sich keinerlei reprimierende Wirkung auf den Promotor. Der Wert liegt bei beiden Konstrukten ohne Hormon zwischen 0,6 und 0,7fach, was im Umkehrschluss einer leichten Aktivierung gleich kommt (Abb. 5.13). Diese Aktivierung verstärkt sich bei dem multimerisiertem Konstrukt in der Anwesenheit von Hormon auf 0,2fach. Im Unterschied zu dem 5xF1F2-Element übt das ERR $\alpha$ -Element keinerlei Repression aus und das erhöhte Verhältnis der Luciferaseaktivität der Testkonstrukte und des Referenzvektors in der

Abwesenheit von Hormon, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, ist vollständig auf eine funktionelle Enhancer-Blockade zurückzuführen.

### 5.3.4 Die Enhancer-Blockade ist von TR abhängig

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Abhängigkeit der hormonsensitiven Enhancer-Blockade von TR- $\beta$  bereits beschrieben. Wir konnten zeigen, dass in N2a-Zellen, die nur sehr geringe Mengen an endogenem TR- $\beta$  exprimieren, die Enhancer-Blockade in der Abwesenheit von Hormon auf dem 5xF1F2 Element drastisch reduziert ist. Durch eine Überexpression von TR- $\beta$  konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden. Bei einer mutierten F2-Bindestelle konnten wir ebenfalls keine Enhancer-Blockade detektieren. Wie bereits erwähnt zeigt das ERR $\alpha$ -Element in N2a-Zelllinien keine hormonsensitive Enhancer-Blockade und damit kann dieses System nicht genutzt werden. Aus diesem Grund wurden HepG2- und HEK293T-Zellen zu diesen Versuchen herangezogen. Diese Zelllinien besitzen zwar endogenen TR- $\beta$ , aber nicht in dem Ausmaß, um ein Reporteragen, welches unter der Kontrolle von zwei TR-Bindestellen (DR4) steht, voll zu aktivieren. HepG2- und 293T-Zellen zeigen im Luciferase-Reporter-Assay ohne cotransfiziertem TR- $\beta$  eine 4 bzw. 3fache Aktivierung, wenn die Zellen mit T3 behandelt werden im Vergleich zu hormonfreiem Medium (Abb. 5.14 A und B). Werden die Zellen gleichzeitig mit dem Reporterkonstrukt noch mit einem Expressionsplasmid für TR- $\beta$  transfiziert, zeigt sich in der Anwesenheit von Hormon bei beiden Zelllinien eine 12fache Aktivierung. Die endogenen Rezeptor-Level reichen demnach nicht aus, um die Anzahl der Plasmide, die von einer Zelle aufgenommen werden, in ihrer Gesamtheit zu binden. Die Zellsysteme können somit genutzt werden, um die Abhängigkeit der hormonsensitiven Enhancer-Blockade hinsichtlich der Abhängigkeit von TR- $\beta$  zu untersuchen.



**Abb. 5.14: Endogene Level an TR- $\beta$  aktivieren ein Luciferase-Reporterkonstrukt in HepG2- und 293T-Zellen nur zu 30%**

(A) HepG2-Zellen und (B) 293T-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1  $\mu\text{g}$  (DR4)<sub>2</sub>-tkluc- Reporter transfiziert. Zusätzlich wurden 0,2  $\mu\text{g}$  eines Expressionsplasmid für TR- $\beta$  oder ein Leervektor cotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in der An- oder Abwesenheit von  $10^{-6}$  M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Experiments in der Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Aktivierung des Ansatzes mit T3 ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines cotransfizierten  $\beta$ -Galactosidase-Vektors (pCMV-LacZ, 0,5  $\mu\text{g}$ ) normalisiert.

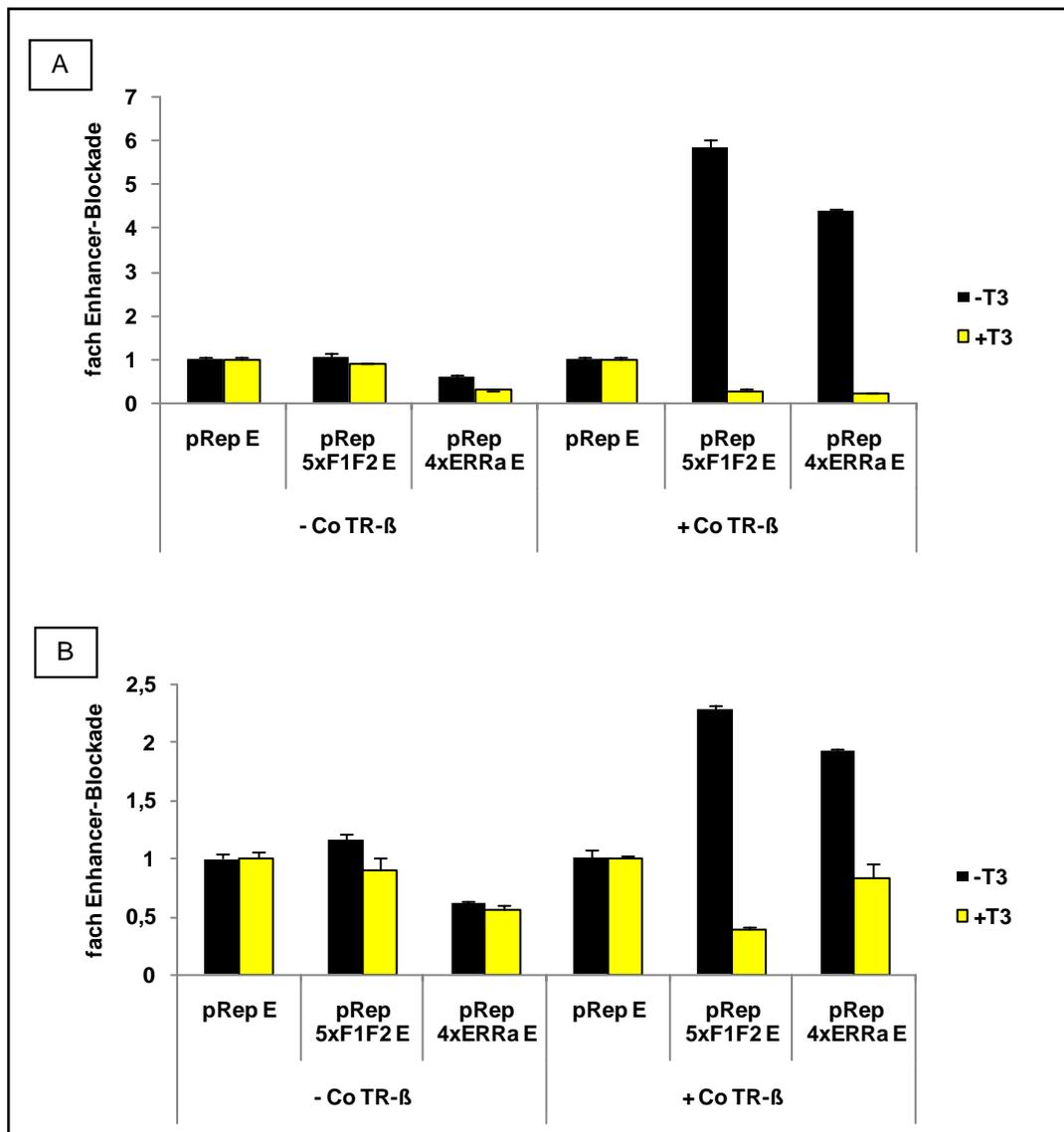
Dafür wurden in HepG2- und HEK293T-Zellen die episomalen Konstrukte pRep 5x F1F2 E als Positivkontrolle oder pRep 4xERR $\alpha$  E mit und ohne Expressionsplasmid für TR- $\beta$  eingebracht und anschließend für 48 h ohne Hormon oder in Anwesenheit von  $10^{-6}$  M T3 kultiviert. Die Ansätze ohne TR- $\beta$  zeigen in beiden Zelllinien sowohl bei F1F2 als auch bei ERR $\alpha$  in der Abwesenheit von Hormon nicht die Fähigkeit eine Enhancer-Blockade zu etablieren (Abb. 5.15 A+B). Wird zusätzlich ein Expressionsvektor für TR- $\beta$  mit den Episomen in die Zellen transfiziert, führt dies zu einer funktionellen Enhancer-Blockade, wenn sich kein Hormon im Medium befindet. In HepG2-Zellen beträgt sie wie weiter oben bereits gezeigt 6 bzw. 4fach für 5x F1F2 und 4xERR $\alpha$ . In 293T-Zellen wird die Enhancer-Blockade nicht so stark ausgebildet und beträgt jeweils 2fach. Durch die Gabe von Hormon kann, wie erwartet, der Effekt in beiden Zelllinien wieder aufgehoben werden.

Für das ERR $\alpha$ -Element sind nahe der TR Bindestelle bereits zwei Halbseiten beschrieben, die von ER- $\alpha$  erkannt werden (Liu et al., 2003). In unserer Arbeitsgruppe konnte im GST-Pulldown unter anderem eine Interaktion von CTCF mit ER gezeigt werden (C. Weth, Doktorarbeit 2006). Eine funktionelle Zusammenarbeit beider Faktoren liegt demnach im Bereich des Möglichen und soll im folgenden Experiment untersucht werden. HepG2-Zellen wurden in hormon- und phenolrotfreiem Medium ausgesät mit den episomalen Konstrukten pRep E und pRep 4xERR $\alpha$  E transfiziert und für 48h mit  $10^{-8}$  M  $\beta$ 17-Estradiol (E2) und/oder  $10^{-6}$  M T3 inkubiert. Die Ansätze ohne Hormon wurden mit  $10^{-6}$  M Tamoxifen behandelt, einem selektiven ER-Modulator, der eingesetzt wurde, um den sich im nicht aktivierten Zustand im Zytoplasma befindlichen ER, in den Zellkern zu befördern.

Wie bereits gezeigt vermittelt das 4xERR $\alpha$ -Element eine hormonsensitive Enhancer-Blockade, wenn TR- $\beta$  cotransfiziert wird. Im Gegensatz dazu kommt es in der Abwesenheit von Hormon zu keiner Ausbildung einer funktionellen Enhancer-Blockade, wenn ausschließlich ER- $\beta$  überexprimiert wird (Abb. 5.16). Werden beide Rezeptoren in die Zellen eingebracht zeigt sich ohne Hormon eine 2,5 bis 3,5fache Enhancer-Blockade. Diese kann sowohl durch Zugabe von T3 als auch einem Gemisch aus T3 und E2 wieder aufgehoben

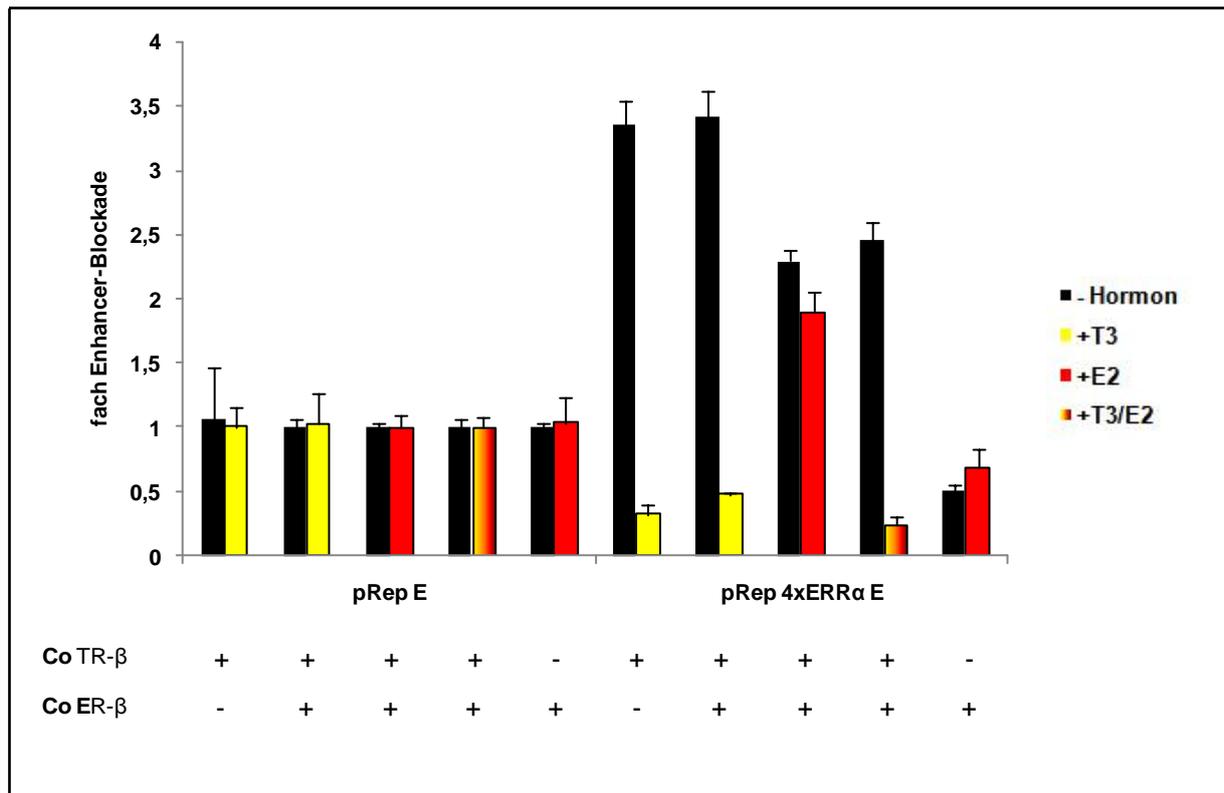
werden. Die Zugabe von E2 allein wirkt sich nicht modulierend auf die Enhancer-Blockade aus.

Es zeigt sich, dass neben dem F1F2-Element aus dem Hühner Lysozymgen auch auf der benachbarten Bindestelle des  $ERR\alpha$ -Gens der Schilddrüsenhormon-Rezeptor eine entscheidende Rolle in der hormonsensitiven Enhancer-Blockade spielt. Im Gegensatz dazu hat der Östrogen-Rezeptor keinen Einfluss in der Ausbildung einer funktionellen Enhancer-Blockade und deren Aufhebung.



**Abb. 5.15: Überexpression von TR-β führt zur Enhancer-Blockade**

(A) HepG2-Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Zusätzlich wurden entweder 0,2 µg eines Expressionsplasmid für TR-β oder der entsprechende Leervektor cotransfiziert. Die Auswertung erfolgte analog zu Abb. 5.12. (B) HEK 293T-Zellen.



**Abb. 5.16: Überexpression von ER-β führt nicht zur Aufhebung der Enhancer-Blockade nach E2 Behandlung auf dem ERRα-Element**

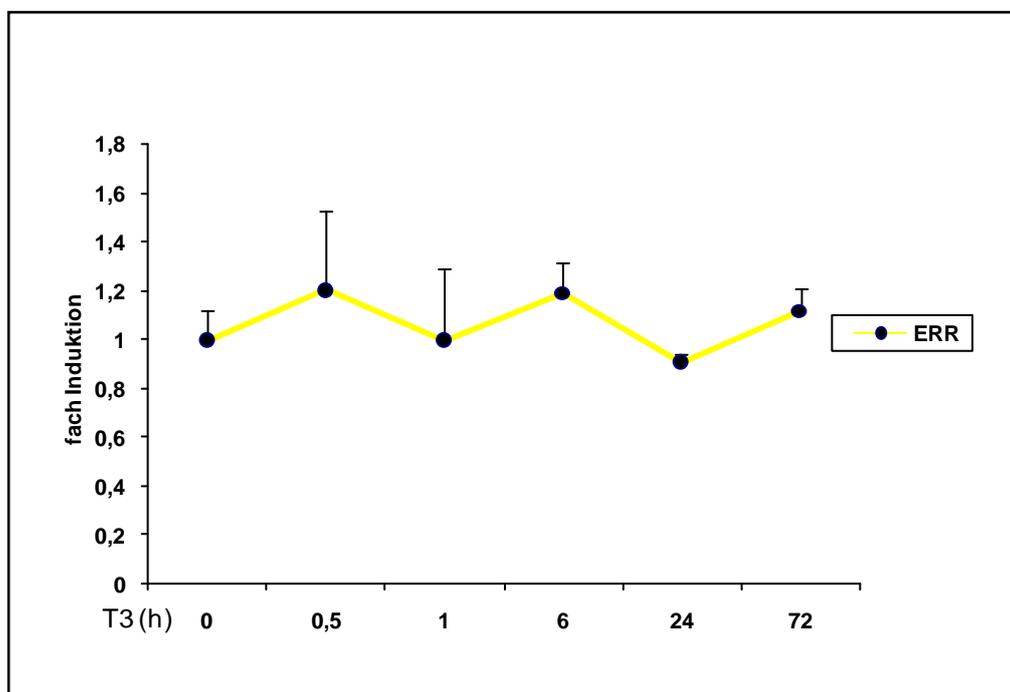
HepG2-Zellen wurden in 6 wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1 µg episomalem Reporter transfiziert. Zusätzlich wurden 0,2 µg eines Expressionsplasmid für TR-β, ER-β oder der entsprechende Leervektor, in unterschiedlichen Kombinationen cotransfiziert. Die Zellen wurden mit 10<sup>-8</sup> M β17-Estradiol (E2) und/oder 10<sup>-6</sup> T3 inkubiert. Ansätze ohne Hormon wurden mit Tamoxifen (Endkonzentration 10<sup>-6</sup> M) behandelt. Die Auswertung erfolgte analog zu Abb. 5.12.

### 5.4 Endogene Genregulation

Nach Identifikation und Verifikation der kombinierten Bindestellen im Genom wurde im nächsten Schritt die endogene Genregulation untersucht. Bislang konnte die hormonsensitive Enhancer-Blockade nur bei stabil integrierten Plasmiden (Lutz et al., 2003) oder im episomalen System gezeigt werden. Des Weiteren existiert kein geeignetes Zellsystem, in dem unter anderem das Hühner-Lysozymgen durch T3 reguliert wird und welches als Modellsystem genutzt werden kann, um Veränderungen des Chromatins oder die Rekrutierung von Proteinen an die DNA zu untersuchen. Aufgrund dessen wurde die Regulation des ERRα-Gens im Folgenden analysiert.

### 5.4.1 $ERR\alpha$ wird in den untersuchten Zelllinien durch E2 nicht aber durch T3 reguliert

Wie bereits beschrieben stammen die Informationen über die Regulation von  $ERR\alpha$  durch T3 aus Herzgewebe von Ratten, die 15 Tage mit Hormon behandelt wurden (De et al., 2004). Aufgrund dieses langen Zeitraums können sekundäre Effekte natürlich nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die Genregulation durch hormonsensitive Enhancer-Blockade in kürzeren Zeitabständen stattfindet und damit eine Feinregulierung des entsprechenden Gens erreicht wird.



**Abb. 5.17: In HepG2-Zellen ist  $ERR\alpha$  nicht durch T3 reguliert**

HepG2-Zellen wurden in 10 cm-Schalen drei Tage in hormonfreiem Medium gehalten und anschließend bei einer Konfluenz von 80% (50% bei 72h) für die angegebenen Zeitpunkte (h) mit  $10^{-6}$  M T3 behandelt. Nach der Isolierung der RNA wurde jeweils  $1\mu\text{g}$  in cDNA umgeschrieben und eine *realtime*-PCR mit  $ERR\alpha$ -spezifischen Primern durchgeführt. Als Referenzgen diente GAPDH, gegen dieses eine Normalisierung der Expression erfolgte. Der Ansatz ohne Hormon wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen auf diesen bezogen. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung der Messwerte aus 2 unabhängigen biologischen und je 2 experimentellen Replikaten.

HepG2-Zellen wurden 3 Tage in hormonfreiem Medium kultiviert und danach für 0,5, 1, 6, 24 und 72 Stunden mit T3 behandelt. Danach wurde die gesamte RNA isoliert und pro Ansatz  $1\mu\text{g}$  in cDNA umgeschrieben. In einer *realtime*-PCR erfolgte die Auswertung der Expressionsmuster für  $ERR\alpha$  und, um eine relative Quantifizierung der PCR zu ermöglichen, auch die Expression des Gens der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

als Referenz. Alle Werte wurden unterstützt durch die mitgelieferte Software (Corbett Research, comparative Quantitation) ausgewertet. Dabei wird der *take off*-Punkt der PCR-Reaktion ermittelt und ins Verhältnis zu einem manuell ausgesuchten Wert (In diesem Fall T3 (h) = 0) gesetzt. Anschließend erfolgte eine weitere Normalisierung gegen die Expression von GAPDH, ein Haushaltsgen, welches nicht durch T3 reguliert wird.

Nach der doppelten Normalisierung der Ergebnisse ist erkennbar, dass zu den untersuchten Zeitpunkten keine signifikante Regulation des ERR $\alpha$ -Gens stattfindet. Nach 0,5 und 6 Stunden zeigt sich eine 0,2fache Erhöhung, die aber eher natürlichen Schwankungen der sehr sensitiven Nachweismethode zuzuschreiben ist (Abb. 5.17). Bei den übrigen drei Zeitpunkten zeigt sich die gleiche Expression wie bei den Kontrollzellen, die nicht mit Hormon behandelt wurden.

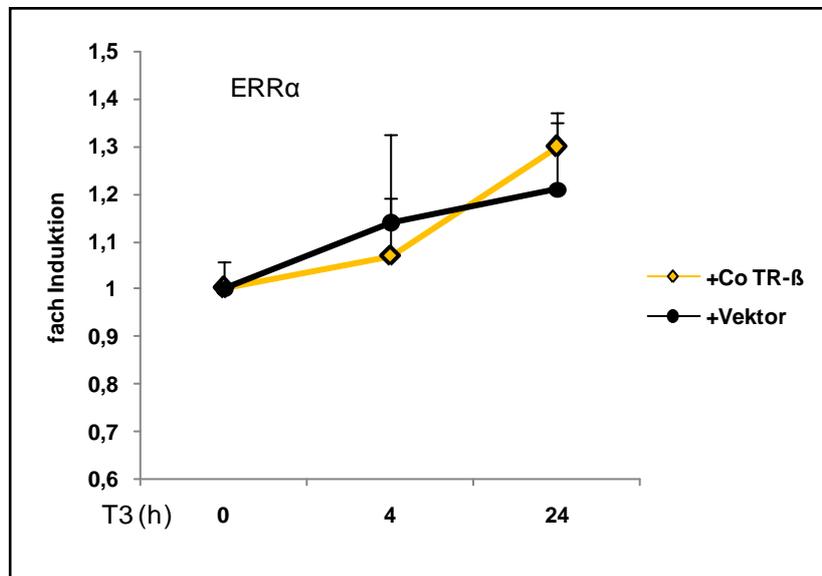
Es ist nicht möglich, HepG2-Zellen zusätzlich mit einem Expressionsplasmid für TR- $\beta$  zu transfizieren und anschließend eine homogene Zellkultur zu erhalten, da die maximale Transfereffizienz für diesen Zelltyp bei ca. 10% liegt. Zu dieser Überlegung kam es, da die hormonsensitive Enhancer-Blockade im episomalen System ebenfalls nur in Zellen, die mit TR- $\beta$  cotransfiziert wurden, festzustellen war. Aus diesem Grund wurde das Expressionsmuster von ERR $\alpha$  in HEK293T-Zellen, bei denen eine Transfereffizienz von über 90% möglich ist, vergleichend mit und ohne cotransfiziertem TR- $\beta$  untersucht.

Die Resultate sind mit dem Expressionsmuster aus HepG2-Zellen vergleichbar. Die Menge an RNA ist nach 4 und 24 Stunden Behandlung mit T3 um 0,1 bzw. 0,2fach im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht (Abb. 5.18). Dabei unterscheiden sich diese mit und ohne cotransfiziertem TR- $\beta$  nur marginal. Es zeigt sich in den zwei untersuchten Modellsystemen, die genutzt wurden, um die hormonabhängige Enhancer-Blockade zu untersuchen, keine T3-abhängige Genregulation von ERR $\alpha$ .

Für ERR $\alpha$  ist eine E2-abhängige Genregulation in MCF-7-Zellen beschrieben. Bereits nach 30 Minuten Inkubation mit  $10^{-8}$  M E2 zeigt sich eine 2,4fache Induktion der Expression. Die Genregulation folgt einem zyklischem Muster mit einem zweiten *Peak* nach 4 Stunden, wobei die Werte nach jeder Induktion (2 und 8 Stunden) wieder auf basale Level sinken (Hu et al., 2008).

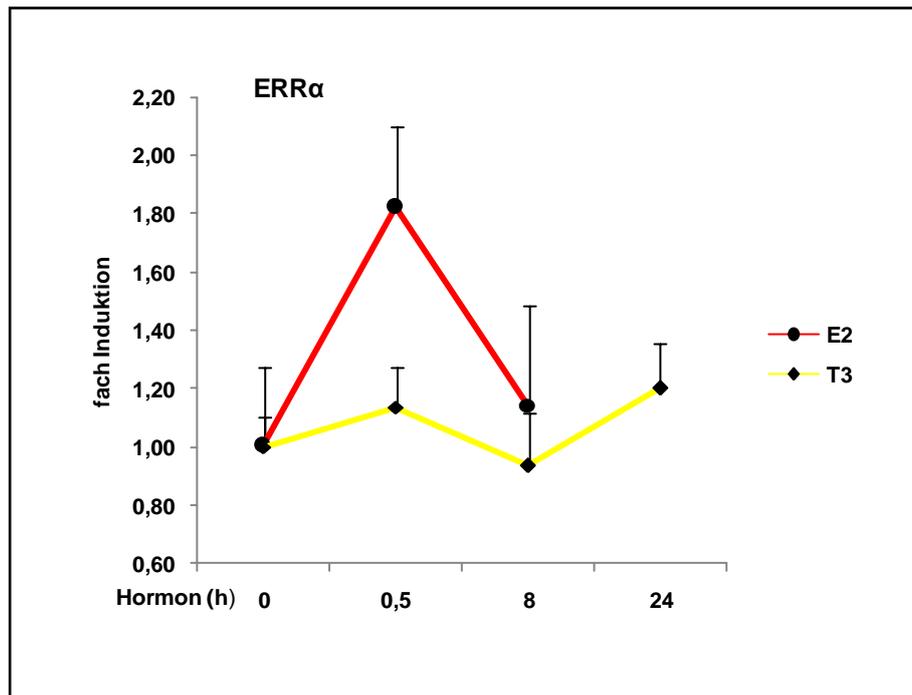
Diese Regulation konnte reproduziert werden, wobei nur zwei Zeitpunkte untersucht wurden. MCF-7-Zellen zeigen nach Inkubation mit  $10^{-8}$  M E2 nach 30 Minuten eine 1,8fache Induktion die nach 8 Stunden wieder auf das Niveau der Kontrollzellen, die nicht mit Hormon behandelt wurden, sinkt (Abb. 5.19). Bei der Behandlung mit  $10^{-6}$  M T3 zeigt sich nach 0,5, 8 und 24 Stunden auch in MCF-7-Zellen keine Veränderung in der Transkriptionsrate des ERR $\alpha$ -Gens.

Dies verdeutlicht, dass die Nachweismethode geeignet wäre eine Veränderung der Genregulation nach T3 Behandlung zu detektieren, aber in allen getesteten Zelllinien kein Einfluss von T3 festzustellen ist.



**Abb. 5.18: Die Expression von ERR $\alpha$  in 293T-Zellen ist nach T3-Behandlung nicht signifikant erhöht**

HEK293T-Zellen wurden in 10 cm-Schalen drei Tage in hormonfreiem Medium gehalten und anschließend bei einer Konfluenz von 80% mit 1,5 $\mu$ g eines TR- $\beta$  Expressionsplasmid transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zu gleichen Teilen auf 3 neue Schalen aufgeteilt und weitere 24 Stunden inkubiert. Die Transfereffizienz lag bei mehr als 90% und wurde in einem Parallelansatz mit eGFP überprüft. Es folgte die Behandlung mit 10<sup>-6</sup> M T3 für die angegebenen Zeitpunkte. Der Ansatz ohne TR- $\beta$ -Expressionsplasmid direkt nach 3 Tagen in hormonfreiem Medium für die angegebenen Zeitpunkte (h) mit 10<sup>-6</sup> M T3 inkubiert. Die Auswertung erfolgte analog zu Abb. 5.17.



**Abb. 5.19: In MCF-7-Zellen ist ERR $\alpha$  durch E2 reguliert**

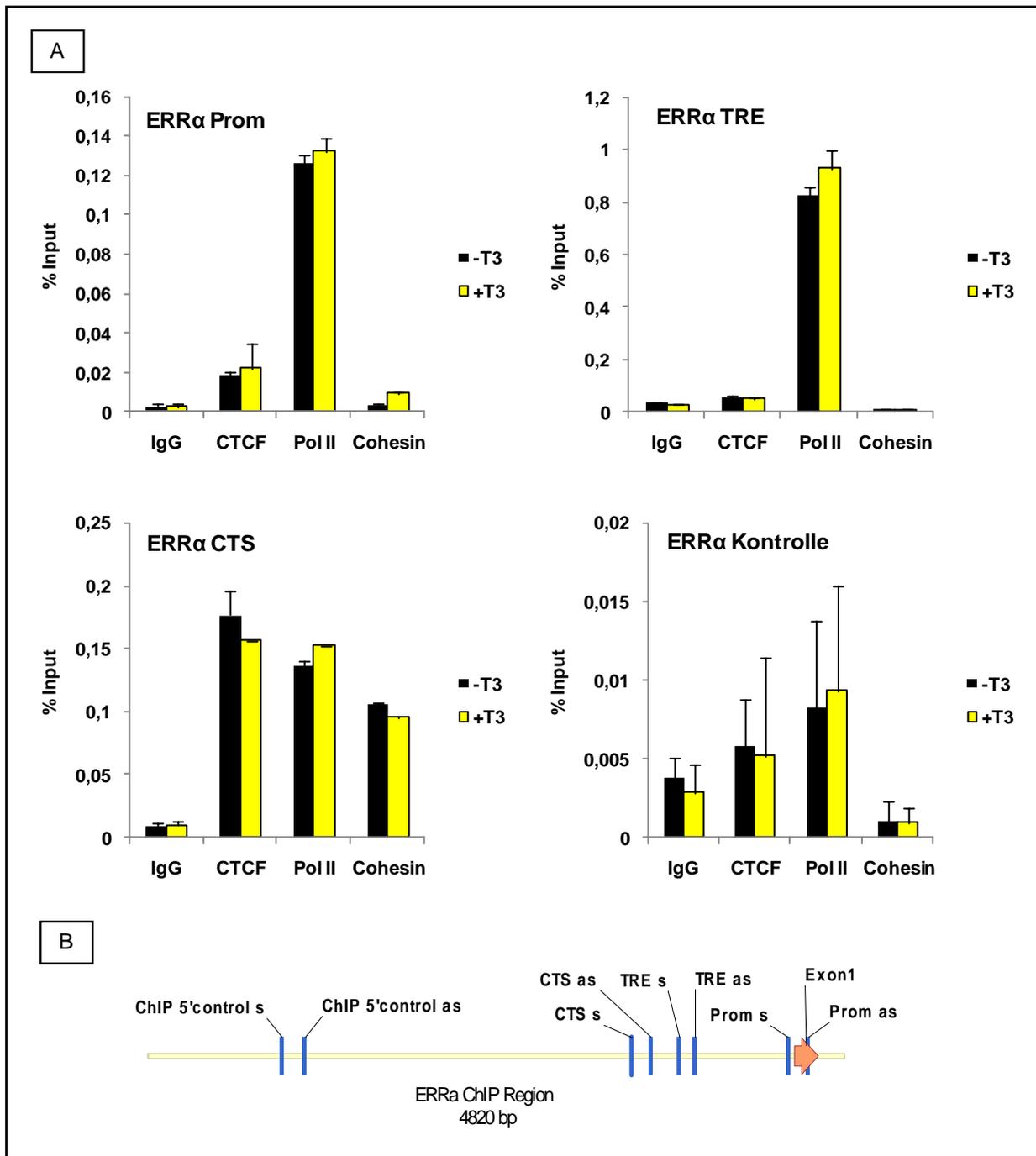
MCF7-Zellen wurden in 10 cm-Schalen drei Tage in phenolrot- und hormonfreiem Medium gehalten und anschließend bei einer Konfluenz von 80% für die angegebenen Zeitpunkte (h) mit  $10^{-8}$  M E2 oder  $10^{-6}$  M T3 behandelt. Die Auswertung erfolgte analog zu Abb. 5.17.

#### **5.4.2 Die ChIP-Analyse zeigt spezifische Promotorbindung von CTCF, Pol II und Cohesin**

Parallel zu den Expressionsstudien wurden ChIP-Analysen mit Antikörpern gegen CTCF, Polymerase II und Cohesin (Scc1 Untereinheit) durchgeführt. Polymerase II sollte als Maß für die Transkription herangezogen werden. Cohesin ist bekannt für das Zusammenhalten von Schwesterchromatiden zu Beginn der S- bis zur G<sub>2</sub>-Phase, um dabei die korrekte Teilung der Chromosomen während des Zellzyklus sicherzustellen. Aktuelle Studien zeigen eine zusätzliche Funktion von Cohesin während der Interphase. Die Identifikation von Cohesin-Bindestellen im Genom von HeLa-Zellen und deren Vergleich mit Bindestellen für CTCF zeigt ein hohes Maß an Colokalisation beider Faktoren (Wendt et al., 2008). Funktionell sind sie an der Regulation des H19-Igf2 Isolators beteiligt. CTCF ist in der Lage Chromosomenschleifen auszubilden, die gewisse Promotor-Enhancer-Interaktionen fördern und andere verhindern. Es wird spekuliert, dass Cohesin dabei hilft diese Schleifen auszubilden und sie zu stabilisieren. ChIP-Analysen sollen Aufschluss über eine mögliche hormonabhängige Rekrutierung der oben genannten Faktoren zu der Promotorregion des ERR $\alpha$ -Gens geben.

Chromatin von hormonfreien bzw. T3-behandelten HEK293T-Zellen wurde mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und in einer anschließenden *realtime*-PCR mit Primerpaaren, die spezifisch für Transkriptionsstart (Prom.), TRE und CTS sind, ausgewertet (Abb. 5.20 B). CTCF wird wie erwartet am stärksten an seine Bindestelle rekrutiert und nur sehr schwach, nämlich 0,02% des Inputs, auf dem Promotor präzipitiert (Abb. 5.20 A). Keine Bindung ist auf dem TRE zu detektieren. Im Gegensatz dazu bindet Polymerase II bevorzugt auf der TR-Erkennungssequenz und nur zu ca. 0,15 % des Inputs auf der CTCF-Bindestelle bzw. der Promotorregion. Cohesin konnte auf der myc-N site, einer CTCF-Bindestelle, in der ChIP Analyse nachgewiesen werden (Stedman et al., 2008). Dieses Ergebnis konnte reproduziert werden und kann somit als Positivkontrolle herangezogen werden (Daten nicht gezeigt). Auf der ERR $\alpha$  CTS zeigt sich die Rekrutierung von Cohesin in gleichem Ausmaß wie auf der myc-N site, nämlich 0,1% des Inputs. Dies ist ein weiteres Beispiel für die Colokalisierung der beiden Faktoren auf DNA-Elementen. Auf der Promotorregion und dem TRE wird keine DNA mit dem Cohesin-Antikörper präzipitiert. Die Resultate der ChIP-Analyse sind spezifisch, da mit keinem der verwendeten Antikörper ein PCR-Produkt mit den Kontrollprimern amplifiziert wurde. Es zeigt sich keine Veränderung bei der Rekrutierung von CTCF, Polymerase II und Cohesin nach Hormonbehandlung der Zellen mit  $10^{-6}$  M T3 für 24 Stunden. Die ChIP-Analyse liefert bei analogem Ansatz mit HepG2-Zellen die gleichen Resultate (Daten nicht gezeigt).

Damit konnte die Bindung der untersuchten Faktoren stromaufwärts des ERR $\alpha$ -Gens nachgewiesen, aber eine Regulation durch Thyroidhormon nicht gezeigt werden.



**Abb. 5.20: CTCF und Cohesin binden stromaufwärts des ERRα-Gens an ihre Zielsequenzen. Polymerase II wird hauptsächlich zum TRE rekrutiert**

(A) HEK293T-Zellen wurden in Maxischalen ausgesät und für 72 Stunden in hormonfreiem Medium kultiviert. Es folgte die Behandlung einer Schale mit  $10^{-6}$  M T3 für weitere 24 Stunden. Für die ChIP-Analyse wurde der Zellextrakt mit Antikörpern gegen CTCF, Pol II und Cohesin oder Präimmunserum inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels *realtime*-PCR mit Primerpaaren, die spezifisch an die entsprechende Region binden, und ist relativ zur eingesetzten Input-DNA dargestellt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen. (B) Schematische Darstellung der ERRα-Promotorregion mit eingesetzten Primerpaaren (sense (s) und antisense (as)). Der Transkriptionsstart ist durch einen orangefarbenen Pfeil markiert. Die Größe des Bereichs ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

## 6 Diskussion

Für die Genexpression sind regulatorische Elemente wie Enhancer und Silencer von entscheidender Bedeutung. Durch die enge Verpackung und die räumliche Struktur des Genoms im Nukleus kann es jederzeit zu unerwünschten Interaktionen dieser Elemente mit Promotoren kommen, die zu einer veränderten Genexpression führen. Um eine geregelte Genaktivität zu gewährleisten, existieren im Genom höherer Eukaryoten Isolatorsequenzen, die in der Lage sind, die Wirkung eines Enhancers auf einen Promotor abzuschirmen, wenn sie von CTCF gebunden werden und sich zwischen Enhancer und Promotor befinden. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Identifikation und Charakterisierung von kombinierten Bindestellen für CTCF und TR. Im Falle der Positionierung einer CTCF-Bindestelle neben einem TRE und der daraus resultierenden Bindung von TR, ist die Enhancer-Blockade nicht wie üblich konstitutiv, sondern kann bei gewissen Modulen durch die Anwesenheit von T3 reguliert werden. Über den Mechanismus dieser hormonsensitiven Enhancer-Blockade ist relativ wenig bekannt. Dies resultiert auch aus der Tatsache, dass noch kein endogenes Modellsystem, an dem regulatorische Vorgänge untersucht werden könnten, identifiziert wurde. Es ist anzunehmen, dass Cofaktoren, die in Abhängigkeit von Hormon rekrutiert werden, eine tragende Rolle spielen. Im Folgenden werden die Ergebnisse, die sich mit dieser Fragestellung auseinandersetzen, diskutiert.

### **6.1 Identifikation von kombinierten Bindestellen für CTCF und TR**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere benachbarte Bindestellen für CTCF und TR identifiziert. Zu Beginn der Arbeit waren zwei Module bekannt, die eine hormonsensitive Enhancer-Blockade zeigen (Lutz et al., 2003). Ein geeignetes Zellsystem, in dem die entsprechenden Gene durch T3 reguliert werden und an deren endogenen Bereichen eventuelle Veränderungen des Chromatins oder der Rekrutierung von Proteinen an die DNA untersucht werden könnten, existiert aber nicht.

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit dienten Gene, die in 3 unabhängigen Publikationen durch Expressionsanalysen identifiziert wurden und durch den Thyroidhormon-Rezeptor reguliert werden (De et al., 2004; Feng et al., 2000; Flores-Morales et al., 2002). Komplettiert wurden diese Gene noch durch PEPCK, welches ebenfalls durch den TR reguliert wird (Loose et al., 1985). Im nächsten Schritt konnten mit Hilfe von Datensätzen zu genomweiten Untersuchungen von CTCF-Bindestellen, die zusammen mit dem jeweiligen T3-regulierten

Gen im *GenomeBrowser* visualisiert wurden, 31 Gene identifiziert werden, bei denen eine CTCF-Bindung im Bereich von 40kb vor bis 40kb nach Transkriptionsstart vorliegt, wobei 64 Genregionen nach heutigem Wissensstand nicht von CTCF gebunden werden. Die übrigen Gene konnten im *GenomeBrowser* weder mit Namen noch mit der Genbank-Eintragsnummer (*Accession number*) gefunden werden und somit auch nicht weiter charakterisiert werden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass die Datensätze für die TR-regulierten Gene aus der Maus und die für die genomweite Bindung von CTCF aus dem Mensch stammen. Es war nur möglich, die Daten für die CTCF-Bindung in Zusammenhang mit den Daten für das menschliche Genom (*UCSC GenomeBrowser, human may 2004 assembly*) darzustellen.

Für die Identifikation von TR-Bindestellen wurde der NUBIScan-Algorithmus verwendet, ein Computerprogramm, welches es ermöglicht, Erkennungssequenzen von Kernhormonrezeptoren vorherzusagen (Podvinec et al., 2002). Dabei zeigten sich bei 17 der 31 CTCF-Bindestellen jeweils mögliche TR-Erkennungssequenzen, die näher als 1kb stromauf- bzw. stromabwärts von diesen liegt.

Es scheint eine Häufung von CTCF-Bindestellen im 5' Bereich relativ zum Transkriptionsstart der jeweiligen Gene zu geben. Nur 8 der 31 möglichen Bindestellen liegen in transkribierten oder 3' gelegenen Bereichen. Die übrigen 23 sind im 5' Bereich des Transkriptionsstarts lokalisiert. Für CTCF ist zwar eine starke Korrelation zwischen der Genzahl des jeweiligen Chromosoms und der Anzahl der CTCF-Bindestellen beschrieben, aber eine Häufung im Promotorbereich ist nicht festzustellen (Kim et al., 2007). Vielmehr zeigt CTCF eine ubiquitäre Verteilung, wobei 46% in intergenischen, 20% in promotornahen und 34% in Introns oder Exons lokalisiert sind. Entsprechend der Anzahl an CTCF-Bindestellen wurden auch mehr kombinierte Elemente im 5' Bereich identifiziert. Etwa 56% (13 von 23) der 5' gelegenen CTCF-Bindestellen haben eine mögliche TR-Erkennungssequenz in unmittelbarer Nähe. Bei den übrigen liegt dieser Wert bei 50% (4 von 8). Exakte Rückschlüsse, ob es sich um eine statistische Häufung von kombinierten Bindestellen im 5' Bereich handelt, lassen sich daraus aber nicht ziehen. Zum einen ist zu wenig über die Verteilung von TR-Bindestellen im Genom bekannt. Es stellt sich die Frage ob TR-Bindestellen generell häufiger im Promotorbereich zu finden sind oder nicht. Eine Häufung von Bindestellen im Promotorbereich liegt für einen Transkriptionsfaktor nahe, aber in genomweiten Studien zu ER-Bindestellen konnte gezeigt werden, dass annähernd alle neu identifizierten Erkennungssequenzen nicht in unmittelbarer Nähe zu Promotoren zu finden sind (Carroll et al., 2006). Nur etwa 4% liegen im Bereich von 1kb proximal zum Promotor. Ob diese Verteilung auch auf den TR zutrifft bleibt spekulativ. Zum anderen reicht die Anzahl der untersuchten Gene nicht aus, um statistisch fundierte Aussagen über eine Akkumulation von kombinierten Bindestellen im 5' Bereich treffen zu können.

Die Auswahl der Gene, deren mögliche Bindestellen für CTCF und TR weiter untersucht wurden, beschränkte sich auf 11. Alle möglichen CTCF-Bindestellen zeigten im EMSA eine Interaktion mit GST-CTCF-ZF, was durch eine Retardierung der radioaktiv markierten DNA-Proben sichtbar wurde. Des Weiteren bindet CTCF *in vivo* an 5 zufällig ausgewählte Elemente, was durch ChIP-Experimente nachgewiesen wurde. Da die Vorhersagen für die CTCF-Bindestellen auf *ChIP on chip*-Datensätzen und einer daraus resultierenden Konsensussequenz basieren, ist dieses Ergebnis erwartet worden. Trotzdem war das Wissen über die exakten Bindestellen, die im EMSA nachgewiesen wurde, eine Voraussetzung für die nachfolgenden funktionellen Analysen. Von den 19 untersuchten putativen TR-Bindestellen zeigten 10 im EMSA eine spezifische Interaktion mit GST-TR. Dies zeigt zum einen, dass der NUBIScan-Algorithmus ein hilfreiches Werkzeug zur Identifizierung von Bindestellen für Kernhormon-Rezeptoren darstellt, aber auch die zwingende Notwendigkeit, diese mit biochemischen Methoden zu verifizieren.

Einen Beweis für die Bindung *in vivo* mittels ChIP-Analyse konnte mangels eines adäquaten Antikörpers weder gezeigt noch widerlegt werden. In murinen GH<sub>3</sub>-Zellen wird TR- $\beta$  nach Zugabe von T<sub>3</sub> zyklisch zu vier untersuchten Promotoren rekrutiert (Liu et al., 2006). Dieses Ergebnis konnte in humanen HeLa- und HepG2-Zellen nicht reproduziert werden, obwohl der Antikörper laut Herstellerangaben in der Lage sein sollte, den TR- $\beta$  von beiden Spezies zu erkennen. Es bleibt die Frage offen, ob in den menschlichen Zellen die untersuchten Bindestellen von TR- $\beta$  gebunden werden, oder ob es mit dem verwendeten Antikörper nicht möglich ist, eine Bindung nachzuweisen. Methodische Probleme sollten nicht die Ursache gewesen sein, da zum einen ChIP-Analysen mit anderen Antikörpern reproduzierbare Ergebnisse hervorgebracht haben. Zum anderen wurden einige Variationen des ChIP-Protokolls getestet, darunter weniger stringente Waschschriffe der DNA-Protein-Antikörper-Komplexe und verschiedene Konzentrationen an Formaldehyd, was zur Kreuzvernetzung von DNA und Proteinen eingesetzt wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bis auf eine mögliche kombinierte Bindestelle alle anderen eine Bindung für CTCF und TR- $\beta$  *in vitro* zeigten. Die Ausrichtung der Elemente zueinander und auch relativ zum Transkriptionsstart gibt aber keinen Hinweis auf ein konserviertes Muster. Die funktionellen Aspekte dieser Bindestellen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

## **6.2 Der Einfluss von CTCF, TR und deren Cofaktoren auf die hormonsensitive Enhancer-Blockade**

Die benachbarten Bindestellen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und in ein episomales Testsystem kloniert wurden, zeigten im Luciferaseassay unterschiedliche Ergebnisse. Die Effekte im Luciferase-Assay konnte in drei Gruppen unterteilt werden. In HepG2-Zellen zeigten sowohl die monomeren als auch die multimeren kombinierten Bindestellen AM2 und Lamin(r) weder in der Ab- noch in der Anwesenheit von T3 einen Einfluss auf die Aktivität des Luciferasegens. Für die monomeren und multimeren Inserts Lamin(n), PEPCK, Cat 3', COUP, Bcl-3 und PTPR wurde jeweils eine Enhancer-Blockade mit teilweise unterschiedlicher Stärke beobachtet, die aber nicht durch T3 moduliert wurde. Eine jeweils 2 bzw. 6fache Enhancer-Blockade zeigte sich bei der monomeren bzw. multimerisierten kombinierten Bindestelle des  $ERR\alpha$ -Gens, die durch die Gabe von T3 aufgehoben wurde. Dabei handelt es sich nicht um Promotorrepression, eine Funktion die ebenfalls durch CTCF vermittelt wird. Dies konnte eindeutig durch die Transfektion von Episomen, die keinen Enhancer besitzen, demonstriert werden.

Es stellt sich natürlich die Frage, wie eine kombinierte Bindestelle aufgebaut sein muss, um hormonsensitive Enhancer-Blockade zu vermitteln. Die Identifikation von  $ERR\alpha$  lässt die Fragezeichen eher noch etwas größer werden. Bei dem seit langem bekannten F1F2-Modul liegen 20 Basenpaare zwischen den Bindestellen für CTCF und TR. Das TR-Element ist ein *everted repeat*, welches von 6 Basen getrennt wird. Die CTCF- und TR-Bindestellen des  $ERR\alpha$ -Gens sind durch ca. 380 Basenpaare getrennt und die TR-Bindestelle ist durch zwei direkt aufeinander folgende Halbseiten (DR0) charakterisiert. Elemente, die dem F1F2-Modul vom Aufbau wesentlich ähnlicher sind, zeigten überraschenderweise keine Enhancer-Blockade und somit auch keinen Hormoneffekt. Das AM2- und das Lamin-Modul bestehen aus einer CTCF-Bindestelle und einer direkt folgenden bzw. durch 10 Basen getrennte TR-Bindestelle (ER6). Demnach scheint die Anordnung der CTCF- und TR-Bindestelle zueinander auf den ersten Blick nicht das entscheidende Kriterium für ein funktionelles Element zu sein. In diesem Zusammenhang müssen also andere Faktoren eine Rolle spielen. Diese These verdeutlicht auch die Tatsache, dass sowohl das F1F2- als auch das  $ERR\alpha$ -Element nicht in allen Zelllinien funktionell sind. Für das F1F2-Element wurde in einer Reihe von Zellen (MEF, NIH3T3 und 293T) eine hormonsensitive Enhancer-Blockade beschrieben, die sich nur hinsichtlich der Blockade-Intensität voneinander unterschied (2-4fach). In JEG3-Zellen jedoch war eine sehr starke Enhancer-Blockade zu beobachten, die aber nicht durch T3 aufgehoben werden konnte (C. Weth, Doktorarbeit 2006). Da JEG3-Zellen funktionellen TR enthalten, ist die konstitutive Enhancer-Blockade vermutlich auf eine andere Zusammensetzung an Cofaktoren in dieser Zelllinie zurückzuführen. Im

Rahmen dieser Arbeit konnte für das ERR $\alpha$ -Element eine hormonsensitive Enhancer-Blockade in HepG2- und HEK293T-Zellen beobachtet werden, wohingegen in HeLa- und N2a $\beta$ -Zellen eine konstitutive Enhancer-Blockade festgestellt wurde.

Sowohl CTCF als auch TR sind in der Lage Cofaktoren zu rekrutieren, und beide sind Ziel von posttranslationalen Modifikationen, welche die unterschiedlichsten Einflüsse haben. Auch wenn keine direkte Interaktion mit HDACs gezeigt werden konnte, so ist CTCF dennoch in der Lage, HDAC-Aktivität aus Kernextrakt zu rekrutieren (Lutz et al., 2000). Dies korreliert mit der Fähigkeit an Sin3A zu binden. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die CTCF-vermittelte Repression sensitiv gegenüber dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) ist. Für F1F2 konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von TSA im episomalen System auch zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führt, was auf eine unmittelbare Beteiligung von HDACs in der CTCF/TR-vermittelten Enhancer-Blockade hinweist (C. Weth, Doktorarbeit 2006). Eine Reduzierung der Enhancer-Blockade um 30% wurde unter Verwendung von 3-ABA, einem Inhibitor der PAR-Polymerase, im episomalen System beobachtet. Die posttranslationale Modifizierung von CTCF durch die PAR-Polymerase spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Enhancer-Blockade. Mittels *insulator trap assay* konnte gezeigt werden, dass die Isolatorfunktion vieler CTCF-Bindestellen sensitiv gegenüber 3-ABA ist (Yu et al., 2004). Für TR/RXR-Heterodimere konnte mittels EMSA eine Interaktion mit der PAR-Polymerase auf bekannten Bindestellen demonstriert werden, wobei die DBD von RXR $\alpha$  eine direkte Bindedomäne darstellt (Miyamoto et al., 1999). Eine Rekrutierung der PAR-Polymerase durch TR/RXR-Heterodimere, die dann wiederum zu einer funktionellen Modifizierung von CTCF führt, wäre vorstellbar.

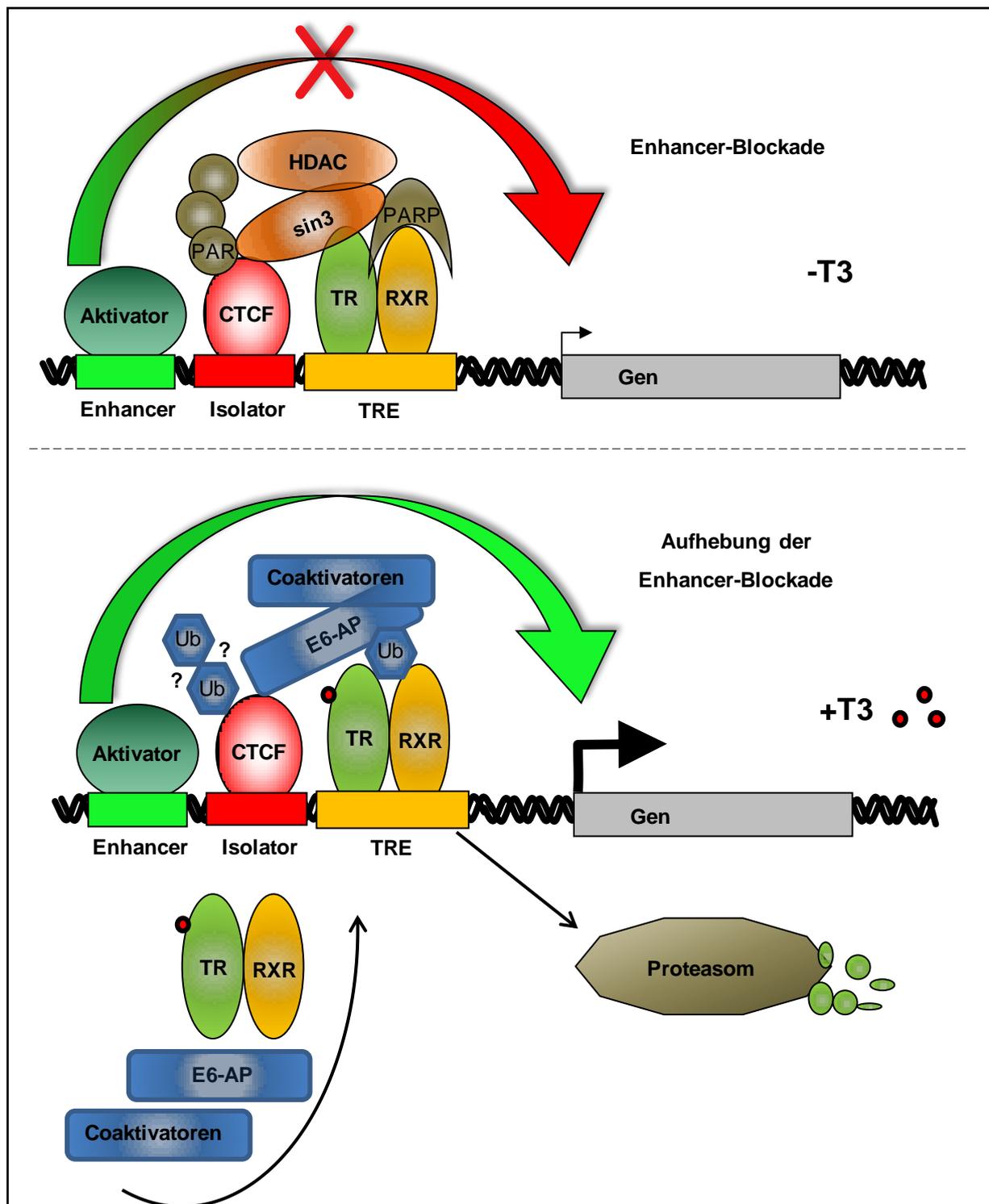
Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Proteins E6-AP im episomalen Enhancer-Blockade-System untersucht. E6-AP ist zum einen dafür bekannt, als Coaktivator für Kernhormonrezeptoren zu fungieren, und zum anderen ist es in der Lage, andere Proteine zu ubiquitinieren, was zu deren Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg führt (Nawaz et al., 1999; Scheffner et al., 1993). In *GST Pulldown*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass E6-AP direkt mit CTCF und in der Gegenwart von T3 mit TR $\beta$  interagiert. Ob CTCF und TR von E6-AP ubiquitiniert werden, ist nicht bekannt. Allerdings konnte dies für ER $\alpha$  gezeigt werden, was zur Regulierung des endogenen Levels dieses Rezeptors beiträgt (Li et al., 2006). Zumindest für den TR wurde eine Ubiquitinierung und, im Zuge der Genaktivierung, der Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg nachgewiesen (Dace et al., 2000). Über CTCF gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Informationen, ob es ubiquitiniert wird und welche möglichen Konsequenzen dies in Bezug auf seine Funktion als Isolatorprotein hätte. Bei dem Enhancer-Blockade-Assay mit dem 5x1F2-Konstrukt und gleichzeitiger Überexpression von E6-AP konnte zwar in der Abwesenheit von Hormon eine leichte Abschwächung der Enhancer-Blockade beobachtet werden, aber dabei handelt es sich nicht

um einen signifikanten Effekt. Die Variation der Einzelexperimente reichte von einer leichten Erhöhung auf 4fach bis zu einer Reduzierung der Enhancer-Blockade auf 1,5fach. Es bleibt die Frage offen, ob E6-AP, obwohl das Protein sowohl mit CTCF als auch TR interagiert, tatsächlich keinen Einfluss auf die hormonsensitive Enhancer-Blockade hat oder aber gewisse Cofaktoren nicht in ausreichender Menge in den Zellen vorhanden waren. In diesem Zusammenhang könnten *snatching*-Effekte auftreten, so dass die Menge an E6-AP, welches nicht an DNA gebunden ist, Cofaktoren, wie z.B. die E2-konjugierenden Enzyme, „wegfängt“ und diese an den Zielsequenzen nicht in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen. In Vorversuchen wurden zwar verschiedene Mengen an Expressionsplasmid für E6-AP transfiziert, was keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte, aber um die gleichmäßige Überexpression mittels Western Blot nachweisen zu können, durfte eine bestimmte Menge nicht unterschritten werden. Eine andere Möglichkeit könnte natürlich eine ausreichende Menge an endogenem E6-AP in den Zellen sein, die es damit nicht ermöglicht, einen gesteigerten Effekt in die eine oder andere Richtung zu erwirken. Hier wäre eine Reduzierung der Proteinlevel unausweichlich, um eventuelle Einflüsse zu detektieren. Die erforderlichen Werkzeuge, wie etwa siRNA gegen E6-AP, standen aber nicht zur Verfügung. Insgesamt bleibt die Frage, ob die Rekrutierung von HDACs, PARlierung, Ubiquitin-Ligasen und anderer Faktoren über CTCF erfolgt, oder aber, ob die Faktoren hierfür erst über TR rekrutiert werden. Für DNA-gebundenen TR ist im Allgemeinen bekannt, dass die Transkriptionsaktivität über Cofaktoren vermittelt wird, die in einer Liganden-abhängigen Weise rekrutiert wurden. Diese Cofaktoren werden in Corepressoren, die Genreprimierung vermitteln, und Coaktivatoren, die zur Genaktivierung führen, unterteilt. Zahlreiche Corepressoren, die direkt an die LBD des TR binden, wurden charakterisiert, dazu zählen unter anderem SMRT/N-CoR, Alien, Cyclin-D1 und SUN-CoR (Rosenfeld and Glass, 2001). Die SMRT/N-CoR Corepressoren kommen einerseits innerhalb anderer Komplexe vor, die HDACs zum DNA-gebundenen Rezeptor rekrutieren, und können andererseits selbst HDACs binden. Diese Chromatin-modifizierenden Enzyme führen zu einer Deacetylierung von Lysinresten der Histonarme, was eine Kondensierung der Chromatinstruktur zur Folge hat, die dadurch weniger zugänglich für Transkriptionsfaktoren wird.

Durch die Bindung von Ligand an den TR ändert sich dessen Konformation, was zur Folge hat, dass die Corepressor-Komplexe dissoziieren und Coaktivatoren rekrutiert werden. Zu diesen Coaktivatoren gehören die p160-Proteine, die wiederum p300/CBP rekrutieren, die Histon-Acetyltransferase(HAT)-Aktivität besitzen. Der T3-besetzte TR führt auch zur Assoziation mit pCAF/GCN5-Komplexen, die ebenfalls HAT-Aktivität innehaben. Diese Enzymaktivität führt im Gegensatz zur HDAC-Aktivität zu einer offenen Chromatinstruktur (Westin et al., 2000).

Die unmittelbare Nähe einer CTCF-Bindestelle zu einem TRE führt zu der Frage, ob sich die Cofaktoren, die jeweils rekrutiert werden, gegenseitig beeinflussen, was zu einer Stabilisierung eines höheren Komplexes führen könnte. Sowohl auf der CTCF-TR-Bindestelle im  $ERR\alpha$ -Promotor als auch auf dem F1F2-Element wurde gezeigt, dass CTCF die Anwesenheit von TR benötigt, um in der Abwesenheit von Hormon eine funktionelle Enhancer-Blockade aufzubauen (Abb. 5.15). Für das  $ERR\alpha$ -Element sind nahe der TR-Bindestelle bereits zwei Halbseiten beschrieben, die vom ER erkannt werden (Liu et al., 2003). Es stellte sich also die Frage, ob andere Kernhormonrezeptoren in der Lage sind, mit CTCF zu kooperieren. Es konnte aber gezeigt werden, dass die hormonsensitive Enhancer-Blockade nicht durch den ER vermittelt werden kann, sondern die Anwesenheit von TR Voraussetzung für diese Funktion ist (Abb. 5.16). Der Grund für dieses Ergebnis könnte darin liegen, dass ER in der Abwesenheit seines Liganden und der Anwesenheit von Tamoxifen nicht in vollem Umfang mit Corepressoren assoziiert ist (Wen et al., 2009). Es wäre also vorstellbar, dass durch den TR rekrutierte Cofaktoren auch in die Regulierung der CTCF-vermittelten Enhancer-Blockade involviert sind. Denkbar wäre eine Beteiligung von Sin3A-Komplexen, denn sowohl CTCF als auch TR sind mit Sin3A-Komplexen assoziiert. Der Komplex von DNA-gebundenem TR/RXR und CTCF könnte eine Plattform für den Sin3A-Komplex bilden, der dann durch CTCF und TR stabilisiert wird. Gleiches wäre auch für den Cofaktor E6-AP vorstellbar.

Die Anwesenheit von Ligand hat dann die Rekrutierung von E6-AP und dessen Cofaktoren zur Folge, was zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führen könnte. Ob die Ubiquitinierung nur bei CTCF und/oder TR oder eventuell auch bei Histonen stattfindet, bleibt spekulativ. Für den TR ist bekannt, dass die transkriptionelle Aktivität invers mit der Proteinmenge des Rezeptors korreliert (Dace et al., 2000). Nach der Induktion durch T3 sinkt die Anzahl der TR-Moleküle in der Zelle, ein Vorgang, der über den Ubiquitin-Proteasom-Weg gesteuert wird, die Expression von Zielgenen wird aber erhöht. Für Histone ist seit langem bekannt, dass Histon H2A ubiquitiniert werden kann, aber die funktionelle Bedeutung blieb ungeklärt (Goldknopf et al., 1975). Aktuelle Studien zeigten nun eine Verbindung zwischen der Ubiquitinierung von H2A und dem durch Polycomb vermitteltem *Silencing* (Wang et al., 2004). Des Weiteren wurde ubiquitiniertes H2A mit der Initiation der X-Chromosom-Inaktivierung in Verbindung gebracht (Fang et al., 2004). Es gibt demnach neben dem Abbau von Proteinen durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg weitere Funktionen, die durch eine Ubiquitinierung gesteuert werden.



**Abb. 6.1: Modell für den Einfluss von Cofaktoren auf die CTCF/TR-vermittelte Enhancer-Blockade**

In der Abwesenheit von Hormon könnte die Rekrutierung von HDAC-Aktivität über Sin3A auf das kombinierte Bindeelement erfolgen. Die Assoziation von PARP1 mit RXR führt möglicherweise zur PARlierung von CTCF. In Anwesenheit von T3 werden Coaktivatoren zusammen mit E6-AP rekrutiert, was möglicherweise zur Ubiquitinierung von CTCF und zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führen könnte. TR wird ubiquitiniert und durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut. Der zyklische Abbau und die aktivierende Wirkung des Rezeptors sind dabei gekoppelt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle im Text diskutierten Einflüsse in dem Modell dargestellt.

Bei der Beteiligung von Sin3A ist ein Szenario vorstellbar, bei dem die Anwesenheit von Ligand die Rekrutierung von HAT-Komplexen zur Folge hat, was z.B. zur Acetylierung von CTCF und somit zur Aufhebung der Enhancer-Blockade führen könnte. Dieser dynamische und zeitlich sehr schnell ablaufende Wechsel von assoziierten Komplexen an kombinierten Bindeelementen könnte die Schlüsselreaktion sein, die für das Umschalten der Enhancer-Blockade verantwortlich ist. Auch hier muss die Frage gestellt werden, ob die enzymatischen Funktionen nur auf die beteiligten DNA-bindenden Elemente oder auch auf das Chromatin wirkt. Diese offenen Fragen sollten in Zukunft angesprochen und analysiert werden.

### **6.3 Endogene Regulation des *ERR $\alpha$* -Gens**

Das *ERR $\alpha$* -Gen ist im Herzgewebe von Ratten, die 15 Tage mit Hormon behandelt wurden, durch T3 reguliert (De et al., 2004). Da in der vorliegenden Arbeit eine hormonsensitive Enhancer-Blockade der kombinierten CTCF- und TR-Bindestelle des *ERR $\alpha$* -Gens in HepG2- (Leber) und HEK293T-Zellen (Niere) gezeigt wurde, lag der Fokus der endogenen Genregulation auf diesen beiden Zelllinien. Zum einen musste überprüft werden, ob *ERR $\alpha$*  in Zelllinien, die nicht aus Herzgewebe stammen durch T3 reguliert ist, und zum anderen, ob dies in kürzeren Zeitabständen als 15 Tage stattfindet, weil davon ausgegangen wird, dass die Genregulation durch hormonsensitive Enhancer-Blockade in kürzeren Intervallen geschieht und damit eine Feinregulierung des entsprechenden Gens erreicht wird.

Mittels quantitativer *realtime*-PCR wurde die Expression des *ERR $\alpha$* -Gens in der Ab- und Anwesenheit von Hormon untersucht. Sowohl HepG2- als auch HEK293T-Zellen zeigten keine Veränderung der Expressionsmuster nach T3-Behandlung. Eine Überexpression von TR $\beta$  in HEK293T-Zellen führte ebenfalls zu keiner Veränderung. In der Literatur wurde bereits die Regulation von *ERR $\alpha$*  in MCF-7-Zellen durch E2 beschrieben (Hu et al., 2008). Dieses Ergebnis konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden und zeigte die Funktionalität der sehr sensitiven Nachweismethode mittels rt-PCR. Das wiederum bedeutet, dass *ERR $\alpha$*  in den untersuchten Zelllinien zumindest in den analysierten Zeitintervallen nicht durch T3 reguliert ist und methodische Probleme ausgeschlossen werden können.

Zusätzlich zu den Expressionsmustern des *ERR $\alpha$* -Gens wurden ChIP-Analysen in HEK293T- und HepG2-Zellen mit Antikörpern gegen CTCF, Polymerase II und der Scc1-Untereinheit von Cohesin durchgeführt. Dabei wurden Primerpaare verwendet, die spezifisch für den Promotorbereich, das TRE bzw. die CTCF-Bindestelle sind. Es konnte gezeigt werden, dass CTCF und Cohesin fast ausschließlich an die CTS rekrutiert wurden, wobei die Polymerase II an allen Regionen zu finden ist. Allerdings wurden die stärksten Signale für

das TRE beobachtet. Für alle drei Faktoren konnte keine Abhängigkeit in Bezug auf die Behandlung mit T3 festgestellt werden. Da die Rekrutierung der Polymerase II als Maß für die Transkription herangezogen wurde und es keine Veränderung gab, wird die Aussagekraft der Expressionsanalyse bestätigt. Die Identifikation eines geeigneten Zellsystems, um hormonsensitive Enhancer-Blockade am endogenen Locus analysieren zu können, bleibt ein wichtiges Ziel für zukünftige Forschungsarbeiten.

Einen interessanten Aspekt könnte die Involvierung von Cohesin bei der endogenen Regulation des  $ERR\alpha$ -Gens darstellen. In kürzerer Vergangenheit wurde für Cohesin neben dem Zusammenhalten von Schwesterchromatiden zu Beginn der S- bis zur  $G_2$ -Phase, um dabei die korrekte Teilung der Chromosomen während des Zellzyklus sicherzustellen, eine zusätzliche Funktion während der Interphase beschrieben. Ein Vergleich von CTCF- und Cohesin-Bindestellen zeigte ein hohes Maß an Colokalisation beider Faktoren (Wendt et al., 2008). Funktionell sind sie an der Regulation des H19-Igf2 Isolators beteiligt. CTCF ist in der Lage, Chromosomenschleifen auszubilden, die gewisse Promotor-Enhancer-Interaktionen fördern und andere verhindern. Denkbar wäre hier, dass Cohesin dabei hilft, die Schleifen auszubilden und sie zu stabilisieren. Ein möglicher Mechanismus hierbei könnte das Zusammenhalten von zwei CTCF-Bindestellen sein vergleichbar mit der Funktionsweise bei zwei Schwesterchromatiden. Der Beweis hierfür muss aber noch erbracht werden. Eine weitere Frage die sich stellt ist, ob sich der Einfluss von Cohesin auf konstitutive Isolatoren beschränkt oder auch bei regulierbaren Enhancer-Blockade-Elementen eine Rolle spielt. Dies würde voraussetzen, dass Chromosomenschleifen hormonsensitiv ausgebildet werden und dadurch Promotor-Enhancer-Interaktionen je nach Bedarf gefördert oder verhindert werden. Ein Zusammenspiel von hormonabhängigen posttranslationalen Modifikationen von CTCF und TR sowie einer veränderten Chromatinstruktur mit der Ausbildung von distinkten Chromosomenschleifen wäre vorstellbar.

## **6.4 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 weitere kombinierte Bindestellen für CTCF und TR identifiziert und charakterisiert. Dabei zeigte ein Element im episomalen System eine hormonsensitive Enhancer-Blockade. Um mehr Informationen zu erhalten, wie ein solches Modul aufgebaut sein muss, um funktionell zu sein, wäre es interessant einzelne CTCF- und TR-Bindestellen auszutauschen und neu zu kombinieren. Hier stellt sich die Frage, ob die benachbarte Positionierung eines in diesem Zusammenhang funktionellem TRE mit jeder CTCF-Bindestelle hormonsensitive Enhancer-Blockade vermitteln kann oder nicht.

Bei dem Enhancer-Blockade-Assay mit dem 5xF1F2-Konstrukt und gleichzeitiger Überexpression von E6-AP konnte kein signifikanter Einfluss auf die Enhancer-Blockade oder deren Aufhebung nach Zugabe von T3 beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wäre ein *knock-down* von E6-AP mittels siRNA ein interessanter Ansatz, um einen Einblick zu erhalten ob E6-AP als Cofaktor fungiert. Generell gilt die Suche nach Cofaktoren als wichtiger Baustein, um die hormonsensitive Enhancer-Blockade und die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.

Für die Identifikation von weiteren benachbarten Bindestellen stehen seit kurzem neue Daten zur Verfügung. Durch *ChIP on chip* Experimente aus murinem Zerebellumgewebe konnten 91 Gene mit bisher unbekanntem Bindestellen für TR $\beta$  identifiziert werden (Dong et al., 2009). Allerdings umfasste der verwendete *microarray* nicht das komplette Genom, sondern nur den Bereich von -8 kb bis +2 kb relativ zum jeweiligen Transkriptionsstart von 5000 Genen. Dennoch ist es interessant diese Bindestellen mit denen von CTCF abzugleichen, was Gegenstand aktueller Forschungen ist. Weiterhin bleibt die Identifikation eines geeigneten Zellsystems, anhand dessen regulatorische Vorgänge am endogenen Locus studiert werden können, eine große Herausforderung.

## 7 Literatur

- Aravind, L. 2001. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem Sci* 26:273-5.
- Arnold, R., M. Burcin, B. Kaiser, M. Muller, and R. Renkawitz. 1996. DNA bending by the silencer protein NeP1 is modulated by TR and RXR. *Nucleic Acids Res* 24:2640-7.
- Ausubel, F. 1989 *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons.
- Ausubel F. M., B. R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman I. G., Smith J. A., Struhl K. 1989. *Current protocols in molecular biology* Greene Publishing associates and Wiley-Interscience.
- Baniahmad, A., C. Steiner, A. C. Kohne, and R. Renkawitz. 1990. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61:505-14.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev, and K. Zhao. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129:823-37.
- Bell, A. C., and G. Felsenfeld. 1999. Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* 9:191-8.
- Bell, A. C., and G. Felsenfeld. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405:482-5.
- Bell, A. C., A. G. West, and G. Felsenfeld. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98:387-96.
- Benbrook, D., and M. Pfahl. 1987. A novel thyroid hormone receptor encoded by a cDNA clone from a human testis library. *Science* 238:788-91.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23.
- Burcin, M., R. Arnold, M. Lutz, B. Kaiser, D. Runge, F. Lottspeich, G. N. Filippova, V. V. Lobanenkova, and R. Renkawitz. 1997. Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol Cell Biol* 17:1281-8.
- Burke, L. J., R. Zhang, M. Bartkuhn, V. K. Tiwari, G. Tavoosidana, S. Kurukuti, C. Weth, J. Leers, N. Galjart, R. Ohlsson, and R. Renkawitz. 2005. CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin. *Embo J* 24:3291-300.
- Burke, L. J., R. Zhang, M. Lutz, and R. Renkawitz. 2002. The thyroid hormone receptor and the insulator protein CTCF: two different factors with overlapping functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:49-57.
- Burton, T., B. Liang, A. Dibrov, and F. Amara. 2002. Transforming growth factor-beta-induced transcription of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein gene involves interaction between the CTCF-complex and Smads. *Biochem Biophys Res Commun* 295:713-23.
- Canto-Soler, M. V., H. Huang, M. S. Romero, and R. Adler. 2008. Transcription factors CTCF and Pax6 are segregated to different cell types during retinal cell differentiation. *Dev Dyn* 237:758-67.
- Carroll, J. S., C. A. Meyer, J. Song, W. Li, T. R. Geistlinger, J. Eeckhoute, A. S. Brodsky, E. K. Keeton, K. C. Fertuck, G. F. Hall, Q. Wang, S. Bekiranov, V. Sementchenko, E. A. Fox, P. A. Silver, T. R. Gingeras, X. S. Liu, and M. Brown. 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38:1289-97.
- Chao, W., K. D. Huynh, R. J. Spencer, L. S. Davidow, and J. T. Lee. 2002. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science* 295:345-7.

- Chernukhin, I., S. Shamsuddin, S. Y. Kang, R. Bergstrom, Y. W. Kwon, W. Yu, J. Whitehead, R. Mukhopadhyay, F. Docquier, D. Farrar, I. Morrison, M. Vigneron, S. Y. Wu, C. M. Chiang, D. Loukinov, V. Lobanenkova, R. Ohlsson, and E. Klenova. 2007. CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Mol Cell Biol* 27:1631-48.
- Cremer, M., J. von Hase, T. Volm, A. Brero, G. Kreth, J. Walter, C. Fischer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. 2001. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* 9:541-67.
- Dace, A., L. Zhao, K. S. Park, T. Furuno, N. Takamura, M. Nakanishi, B. L. West, J. A. Hanover, and S. Cheng. 2000. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8985-90.
- Dana, S. L., P. A. Hoener, D. A. Wheeler, C. B. Lawrence, and D. P. McDonnell. 1994. Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells. *Mol Endocrinol* 8:1193-207.
- De, K., G. Ghosh, M. Datta, A. Konar, J. Bandyopadhyay, D. Bandyopadhyay, S. Bhattacharya, and A. Bandyopadhyay. 2004. Analysis of differentially expressed genes in hyperthyroid-induced hypertrophied heart by cDNA microarray. *J Endocrinol* 182:303-14.
- Desvergne, B. 1994. How do thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements? *Mol Cell Endocrinol* 100:125-31.
- Dong, H., C. L. Yauk, A. Rowan-Carroll, S. H. You, R. T. Zoeller, I. Lambert, and M. G. Wade. 2009. Identification of thyroid hormone receptor binding sites and target genes using ChIP-on-chip in developing mouse cerebellum. *PLoS ONE* 4:e4610.
- Donohoe, M. E., L. F. Zhang, N. Xu, Y. Shi, and J. T. Lee. 2007. Identification of a Ctf cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. *Mol Cell* 25:43-56.
- Drueppel, L., K. Pfeleiderer, A. Schmidt, W. Hillen, and C. Berens. 2004. A short autonomous repression motif is located within the N-terminal domain of CTCF. *FEBS Lett* 572:154-8.
- Ei-Kady, A., and E. Klenova. 2005. Regulation of the transcription factor, CTCF, by phosphorylation with protein kinase CK2. *FEBS Lett* 579:1424-34.
- Fang, J., T. Chen, B. Chadwick, E. Li, and Y. Zhang. 2004. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* 279:52812-5.
- Feng, W., R. C. Ribeiro, R. L. Wagner, H. Nguyen, J. W. Apriletti, R. J. Fletterick, J. D. Baxter, P. J. Kushner, and B. L. West. 1998. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280:1747-9.
- Feng, X., Y. Jiang, P. Meltzer, and P. M. Yen. 2000. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocrinol* 14:947-55.
- Filippova, G. N., M. K. Cheng, J. M. Moore, J. P. Truong, Y. J. Hu, D. K. Nguyen, K. D. Tsuchiya, and C. M. Disteché. 2005. Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* 8:31-42.
- Filippova, G. N., S. Fagerlie, E. M. Klenova, C. Myers, Y. Dehner, G. Goodwin, P. E. Neiman, S. J. Collins, and V. V. Lobanenkova. 1996. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* 16:2802-13.
- Flores-Morales, A., H. Gullberg, L. Fernandez, N. Stahlberg, N. H. Lee, B. Vennstrom, and G. Norstedt. 2002. Patterns of liver gene expression governed by TRbeta. *Mol Endocrinol* 16:1257-68.
- Glass, C. K. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407.

- Goldknopf, I. L., C. W. Taylor, R. M. Baum, L. C. Yeoman, M. O. Olson, A. W. Prestayko, and H. Busch. 1975. Isolation and characterization of protein A24, a "histone-like" non-histone chromosomal protein. *J Biol Chem* 250:7182-7.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80.
- Hark, A. T., C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. Levorse, and S. M. Tilghman. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405:486-9.
- Hodin, R. A., M. A. Lazar, B. I. Wintman, D. S. Darling, R. J. Koenig, P. R. Larsen, D. D. Moore, and W. W. Chin. 1989. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244:76-9.
- Hu, P., H. K. Kinyamu, L. Wang, J. Martin, T. K. Archer, and C. Teng. 2008. Estrogen induces estrogen-related receptor alpha gene expression and chromatin structural changes in estrogen receptor (ER)-positive and ER-negative breast cancer cells. *J Biol Chem* 283:6752-63.
- Hu, X., and M. A. Lazar. 1999. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402:93-6.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon, and P. M. Howley. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5249.
- Ivanov, D., and K. Nasmyth. 2007. A physical assay for sister chromatid cohesion in vitro. *Mol Cell* 27:300-10.
- Johnson, P. H., and L. I. Grossman. 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16:4217-25.
- Kaelin, W. G., Jr., D. C. Pallas, J. A. DeCaprio, F. J. Kaye, and D. M. Livingston. 1991. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64:521-32.
- Kellum, R., and P. Schedl. 1991. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64:941-50.
- Kim, T. H., Z. K. Abdullaev, A. D. Smith, K. A. Ching, D. I. Loukinov, R. D. Green, M. Q. Zhang, V. V. Lobanenkova, and B. Ren. 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128:1231-45.
- Klenova, E. M., I. V. Chernukhin, A. El-Kady, R. E. Lee, E. M. Pugacheva, D. I. Loukinov, G. H. Goodwin, D. Delgado, G. N. Filippova, J. Leon, H. C. Morse, 3rd, P. E. Neiman, and V. V. Lobanenkova. 2001. Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol* 21:2221-34.
- Klenova, E. M., R. H. Nicolas, H. F. Paterson, A. F. Carne, C. M. Heath, G. H. Goodwin, P. E. Neiman, and V. V. Lobanenkova. 1993. CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol Cell Biol* 13:7612-24.
- Klenova, E. M., R. H. Nicolas, S. U, A. F. Carne, R. E. Lee, V. V. Lobanenkova, and G. H. Goodwin. 1997. Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. *Nucleic Acids Res* 25:466-74.
- Koenig, R. J., R. L. Warne, G. A. Brent, J. W. Harney, P. R. Larsen, and D. D. Moore. 1988. Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5031-5.
- Kohne, A. C., A. Baniahmad, and R. Renkawitz. 1993. NeP1. A ubiquitous transcription factor synergizes with v-ERBA in transcriptional silencing. *J Mol Biol* 232:747-55.
- Krumm, A., L. B. Hickey, and M. Groudine. 1995. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev* 9:559-72.

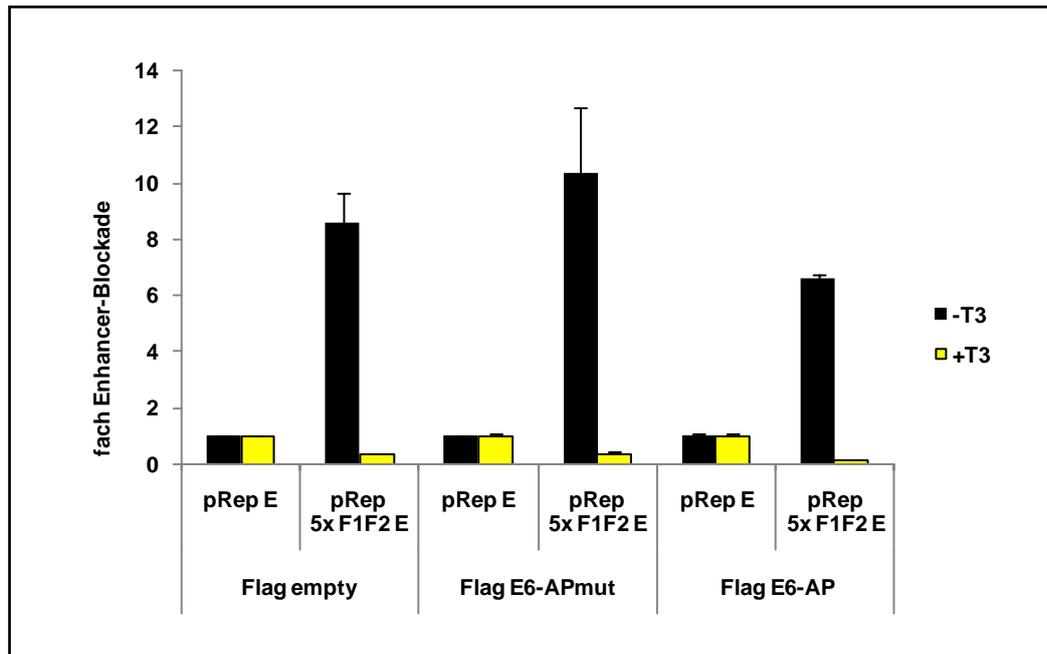
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lebel, J. M., J. H. Dussault, and J. Puymirat. 1994. Overexpression of the beta 1 thyroid receptor induces differentiation in neuro-2a cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2644-8.
- Lee, J. W., H. S. Choi, J. Gyuris, R. Brent, and D. D. Moore. 1995. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 9:243-54.
- Li, L., Z. Li, P. M. Howley, and D. B. Sacks. 2006. E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability. *J Biol Chem* 281:1978-85.
- Liu, D., Z. Zhang, W. Gladwell, and C. T. Teng. 2003. Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinology* 144:4894-904.
- Liu, Y., X. Xia, J. D. Fondell, and P. M. Yen. 2006. Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of coactivator recruitment and histone acetylation. *Mol Endocrinol* 20:483-90.
- Lobanenkova, V. V., R. H. Nicolas, V. V. Adler, H. Paterson, E. M. Klenova, A. V. Polotskaja, and G. H. Goodwin. 1990. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5:1743-53.
- Loose, D. S., D. K. Cameron, H. P. Short, and R. W. Hanson. 1985. Thyroid hormone regulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat liver. *Biochemistry* 24:4509-12.
- Lutz, M., L. J. Burke, G. Barreto, F. Goeman, H. Greb, R. Arnold, H. Schultheiss, A. Brehm, T. Kouzarides, V. Lobanenkova, and R. Renkawitz. 2000. Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 28:1707-13.
- Lutz, M., L. J. Burke, P. LeFevre, F. A. Myers, A. W. Thorne, C. Crane-Robinson, C. Bonifer, G. N. Filippova, V. Lobanenkova, and R. Renkawitz. 2003. Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor. *Embo J* 22:1579-87.
- MacPherson, M. J., L. G. Beatty, W. Zhou, M. Du, and P. D. Sadowski. 2009. The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO. *Mol Cell Biol* 29:714-25.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-62.
- Miyamoto, T., T. Kakizawa, and K. Hashizume. 1999. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biol* 19:2644-9.
- Muravyova, E., A. Golovnin, E. Gracheva, A. Parshikov, T. Belenkaya, V. Pirrotta, and P. Georgiev. 2001. Loss of insulator activity by paired Su(Hw) chromatin insulators. *Science* 291:495-8.
- Navarro, P., D. R. Page, P. Avner, and C. Rougeulle. 2006. Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. *Genes Dev* 20:2787-92.
- Nawaz, Z., D. M. Lonard, C. L. Smith, E. Lev-Lehman, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1999. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19:1182-9.
- O'Shea, P. J., and G. R. Williams. 2002. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol* 175:553-70.
- Oetting, A., and P. M. Yen. 2007. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21:193-208.
- Pant, V., S. Kurukuti, E. Pugacheva, S. Shamsuddin, P. Mariano, R. Renkawitz, E. Klenova, V. Lobanenkova, and R. Ohlsson. 2004. Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of de novo methylation upon maternal inheritance. *Mol Cell Biol* 24:3497-504.
- Pant, V., P. Mariano, C. Kanduri, A. Mattsson, V. Lobanenkova, R. Heuchel, and R. Ohlsson. 2003. The nucleotides responsible for the direct physical contact between the

- chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes Dev* 17:586-90.
- Parelho, V., S. Hadjur, M. Spivakov, M. Leleu, S. Sauer, H. C. Gregson, A. Jarmuz, C. Canzonetta, Z. Webster, T. Nesterova, B. S. Cobb, K. Yokomori, N. Dillon, L. Aragon, A. G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2008. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132:422-33.
- Park, E. A., D. C. Jerden, and S. W. Bahouth. 1995. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by thyroid hormone involves two distinct binding sites in the promoter. *Biochem J* 309 ( Pt 3):913-9.
- Perez-Juste, G., S. Garcia-Silva, and A. Aranda. 2000. An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 275:1307-14.
- Pikaart, M. J., F. Recillas-Targa, and G. Felsenfeld. 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* 12:2852-62.
- Podvinec, M., M. R. Kaufmann, C. Handschin, and U. A. Meyer. 2002. NUBIScan, an in silico approach for prediction of nuclear receptor response elements. *Mol Endocrinol* 16:1269-79.
- Qiu, X., T. H. Vu, Q. Lu, J. Q. Ling, T. Li, A. Hou, S. K. Wang, H. L. Chen, J. F. Hu, and A. R. Hoffman. 2008. A complex deoxyribonucleic acid looping configuration associated with the silencing of the maternal *Igf2* allele. *Mol Endocrinol* 22:1476-88.
- Radloff, R., W. Bauer, and J. Vinograd. 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57:1514-21.
- Reid, G., M. R. Hubner, R. Metivier, H. Brand, S. Denger, D. Manu, J. Beaudouin, J. Ellenberg, and F. Gannon. 2003. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11:695-707.
- Roberts, R. J., and D. Macelis. 1991. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res* 19 Suppl:2077-109.
- Rosenfeld, M. G., and C. K. Glass. 2001. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276:36865-8.
- Rubio, E. D., D. J. Reiss, P. L. Welcsh, C. M. Disteché, G. N. Filippova, N. S. Baliga, R. Aebersold, J. A. Ranish, and A. Krumm. 2008. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8309-14.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, and P. M. Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505.
- Schoenherr, C. J., J. M. LeVorse, and S. M. Tilghman. 2003. CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. *Nat Genet* 33:66-9.
- Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem* 100:319-23.
- Stedman, W., H. Kang, S. Lin, J. L. Kissil, M. S. Bartolomei, and P. M. Lieberman. 2008. Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/*Igf2* insulators. *Embo J* 27:654-66.
- Strobl, L. J., and D. Eick. 1992. Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *Embo J* 11:3307-14.
- Szabo, P. E., L. Han, J. Hyo-Jung, and J. R. Mann. 2006. Mutagenesis in mice of nuclear hormone receptor binding sites in the *Igf2/H19* imprinting control region. *Cytogenet Genome Res* 113:238-46.
- Szabo, P. E., G. P. Pfeifer, and J. R. Mann. 2004. Parent-of-origin-specific binding of nuclear hormone receptor complexes in the H19-*Igf2* imprinting control region. *Mol Cell Biol* 24:4858-68.

- Thompson, C. C., and R. M. Evans. 1989. Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3494-8.
- Thompson, C. C., C. Weinberger, R. Lebo, and R. M. Evans. 1987. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science* 237:1610-4.
- Torrano, V., J. Navascues, F. Docquier, R. Zhang, L. J. Burke, I. Chernukhin, D. Farrar, J. Leon, M. T. Berciano, R. Renkawitz, E. Klenova, M. Lafarga, and M. D. Delgado. 2006. Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism. *J Cell Sci* 119:1746-59.
- Udvardy, A., E. Maine, and P. Schedl. 1985. The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *J Mol Biol* 185:341-58.
- Vostrov, A. A., and W. W. Quitschke. 1997. The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J Biol Chem* 272:33353-9.
- Vostrov, A. A., M. J. Taheny, and W. W. Quitschke. 2002. A region to the N-terminal side of the CTCF zinc finger domain is essential for activating transcription from the amyloid precursor protein promoter. *J Biol Chem* 277:1619-27.
- Wang, H., L. Wang, H. Erdjument-Bromage, M. Vidal, P. Tempst, R. S. Jones, and Y. Zhang. 2004. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431:873-8.
- Wen, J., R. Li, Y. Lu, and M. A. Shupnik. 2009. Decreased BRCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer cells by altering estrogen receptor-coregulator interactions. *Oncogene* 28:575-86.
- Wendt, K. S., K. Yoshida, T. Itoh, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, K. Shirahige, and J. M. Peters. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451:796-801.
- Westin, S., M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 2000. Nuclear receptor coactivators. *Adv Pharmacol* 47:89-112.
- Wolffe, A. P. 1994. Gene regulation. Insulating chromatin. *Curr Biol* 4:85-7.
- Yu, W., V. Ginjala, V. Pant, I. Chernukhin, J. Whitehead, F. Docquier, D. Farrar, G. Tavoosidana, R. Mukhopadhyay, C. Kanduri, M. Oshimura, A. P. Feinberg, V. Lobanenkova, E. Klenova, and R. Ohlsson. 2004. Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat Genet* 36:1105-10.
- Yusufzai, T. M., H. Tagami, Y. Nakatani, and G. Felsenfeld. 2004. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell* 13:291-8.
- Zhang, R., L. J. Burke, J. E. Rasko, V. Lobanenkova, and R. Renkawitz. 2004. Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody. *Exp Cell Res* 294:86-93.
- Zhao, H., and A. Dean. 2004. An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucleic Acids Res* 32:4903-19.

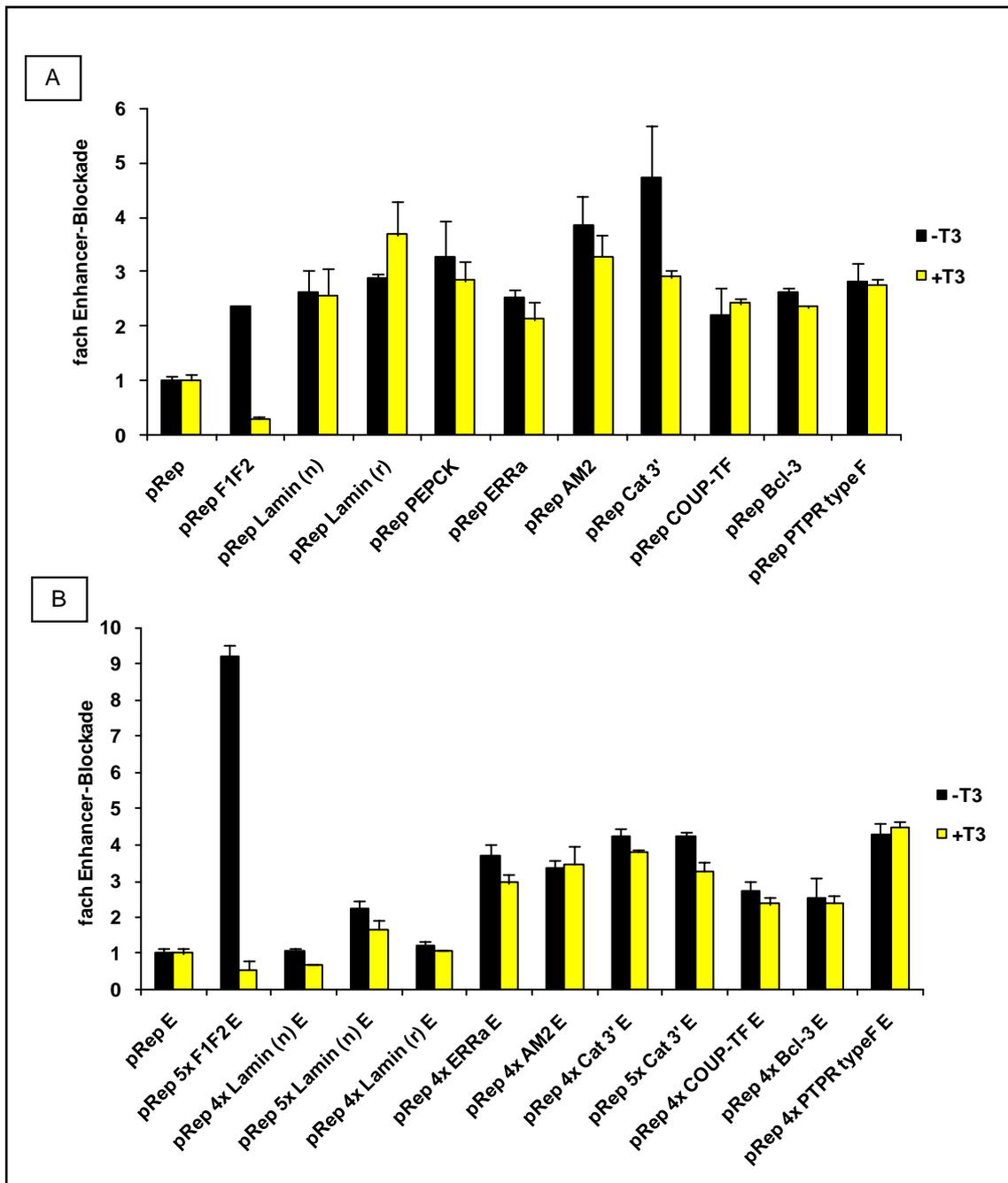
## 8 Anhang

### 8.1 Enhancer-Blockade-Assay



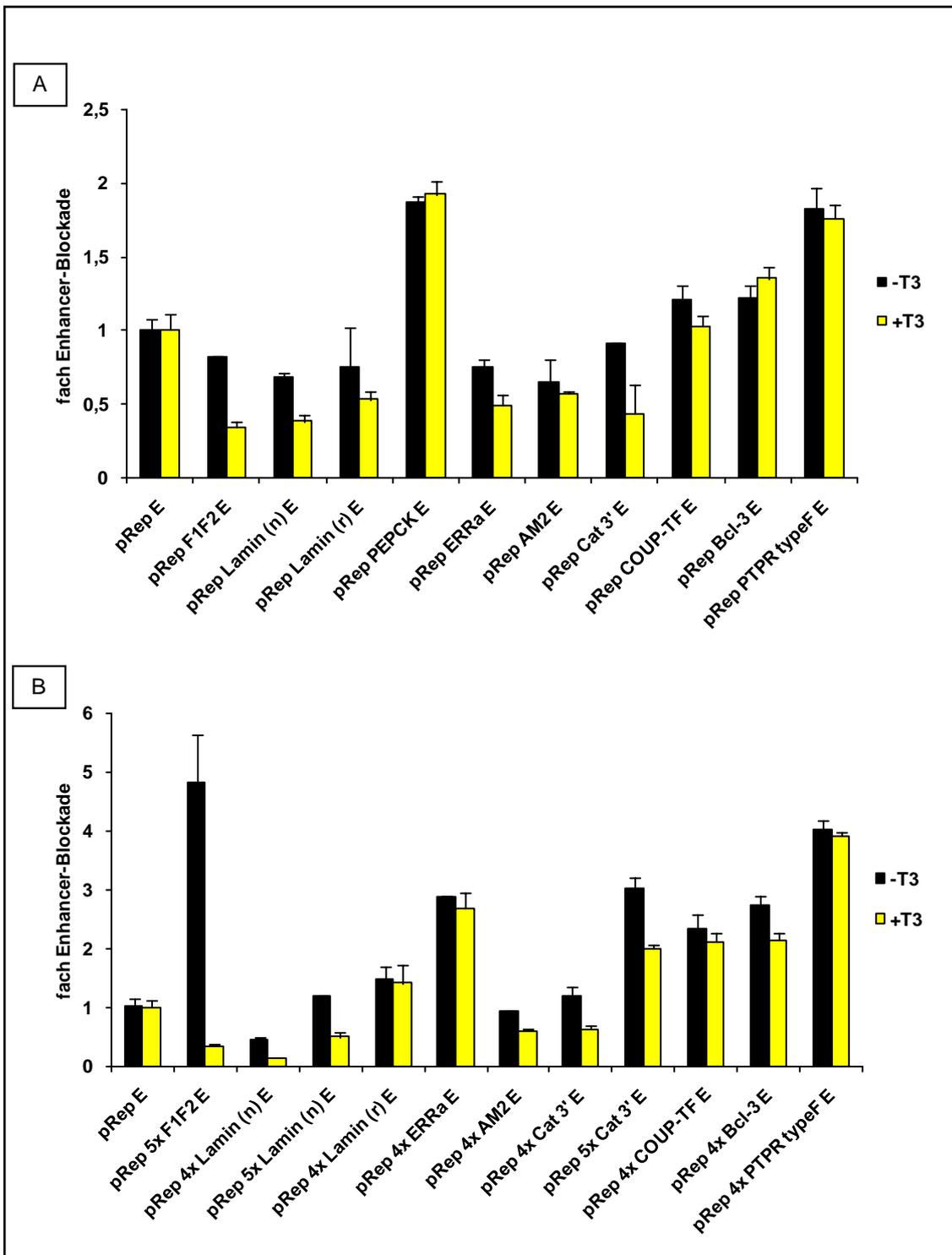
**Abb. 8.1: Überexpression von E6AP hat keinen signifikanten Einfluss auf Enhancer-Blockade**

N2a $\beta$ -Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1  $\mu$ g episomalem Reporter transfiziert. Zusätzlich wurden 0,5  $\mu$ g eines Expressionsplasmid für Flag-E6AP bzw. Flag-E6APmut cotransfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in der An- oder Abwesenheit von  $10^{-6}$  M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrollexperimentes (pRep) in der An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade der jeweiligen Episomen ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter  $\beta$ -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5  $\mu$ g) normalisiert. Es ist ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängigen Versuchen gezeigt.



**Abb. 8.2: Keine der neu identifizierten kombinierten Bindestellen vermittelt in N2a $\beta$ -Zellen hormonsensitive Enhancer-Blockade**

N2a $\beta$  Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und mit 1  $\mu$ g episomalem Reporter transfiziert. Nach 48 h Kultivierung der Zellen in der An- oder Abwesenheit von  $10^{-6}$  M T3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität im Luminometer analysiert. Der Luciferasewert des Kontrolleexperimentes (pRep) in der An- und Abwesenheit von T3 wurde gleich 1 gesetzt und die relative Enhancer-Blockade der jeweiligen Episomen ermittelt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe von cotransfizierter  $\beta$ -Galactosidase (pCMV-LacZ, 0,5  $\mu$ g) normalisiert. Zahlen hinter Lamin zeigen die Orientierung der genomischen Sequenz relativ zum Promotor an (natürliche Orientierung (8), reverse Orientierung (7)). Es ist ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängigen Versuchen gezeigt. (A) Episomen mit monomerer Integration der Bindestellen. (B) Multimerisierte Konstrukte.



**Abb. 8.3: Keine der neu identifizierten kombinierten Bindestellen vermittelt in HeLa-Zellen hormone-sensitive Enhancer-Blockade**

HeLa Zellen wurden in 6wells in hormonfreiem Medium ausgesät und analog zu Abb. 8.1 behandelt. Zusätzlich wurden 0,2µg eines TR-β Expressionsplasmid transfiziert.

## 8.2 Übersicht T3-regulierte Gene

**Tabelle 8.1: Durch T3 regulierte Gene die auf kombinierte Bindestellen hin untersucht wurden.**

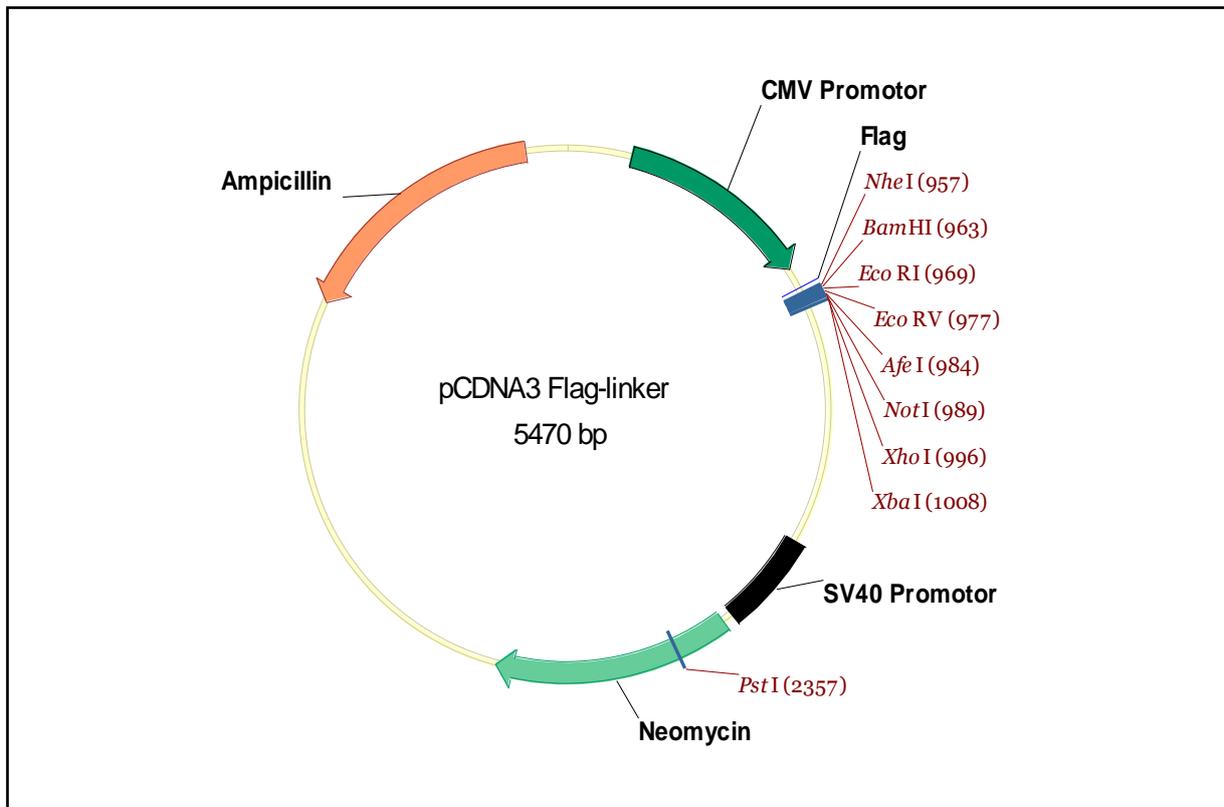
CTCF Bindestelle 40 kb stromauf- bzw. abwärts des Transkriptionsstart (orange), zusätzlich benachbarte TR Erkennungssequenz(grün), n.f. = nicht feststellbar.

Gene	Funktionelle Klassifizierung	Accession No.	CTS	TRE
De et al. 2003				
Cytochrome P450	Metabolismus	M29874	n.f.	
HDL-binding protein		M83789	nein	
Adipocyte fatty acid binding protein		J02874	nein	
Phospholipid transporter protein		L26232	nein	
Cyclo-oxygenase 1		M59979	n.f.	
Insulin responsive glucose transporter		M20747	ja	ja
Cu,Zn-SOD		J02947	nein	
Cardiac muscle myosin heavy chain $\alpha$ isoform	Zytoskelett-Matrixprotein	D00943	nein	
Cardiac muscle myosin heavy chain $\beta$ isoform		M58018	nein	
Matrix metalloproteinase 2		J03210	ja	nein
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)		J05593	nein	
Collagen IV $\alpha$ 1		M11315	n.f.	
Collagen XVI $\alpha$ 1		M92642	n.f.	
L-selectin		M25280	nein	
Junction placoglobulin		M23410	ja	nein
Erythrocyte adducin alpha subunit		X58141	nein	
Atrial natriuretic factor (ANF)	Wachstumsfaktor	HS75640	nein	
Placental growth factor 1		X54936	ja	nein
Estrogen-related receptor alpha (ERR $\alpha$ )	Transkriptionsfaktor	X51416	ja	ja
Retinoic acid receptor alpha (RAR $\alpha$ )		X06614	ja	nein
Retinoic acid receptor gamma (RAR $\gamma$ )		M24857	nein	nein
V-erb-related protein 3, transcription factor COUP2		X12795	nein	
nuclear receptor subfamily 2 group F member 2		X58241	ja	ja
Progesterone receptor		M15716	nein	
Mineralocorticoid receptor		M16801	nein	
Purinoreceptor		U41070	nein	
Vascular endothelial growth factor receptor		AF016050	nein	
Vasopressin V-3 receptor		D31833	nein	
Sterol regulatory element-binding TF 1		U00968	nein	
Protein tyrosine phosphatase receptor type-F		Y00815	ja	ja
Tafazzin	Nicht klassifiziert	X92762	nein	
Feng et al. 2000				
Spot 14 gene	Kohlenhydrat und Fettsäure Metabolismus	X95279	n.f.	
Glucose-6-phosphatase		U00445	nein	
Carbonyl reductase (Cbr1)		U31966	nein	
Insulin-like growth factor binding protein 1 prec.		X81579	nein	nein
Fatty acid transport protein (FATP)		U15976	nein	

Gene	Funktionelle Klassifizierung	Accession No.	CTS	TRE
Cyp4a-10		X69296	nein	
PHAS-II		U75530	n.f.	
Serine/threonine kinase (Akt2)		U22445	nein	
Putative transcription factor of the insulin gene		X17500	nein	
Nuclear-encoded mitochondrial acyltransferase		L42996	nein	
Glycerophosphate dehydrogenase		J02655	Ja	nein
B61	Zellproliferation und Replikation	U26188	nein	
Bcl-3		M90397	ja	ja
Kinesin-like protein (Kip1p)		AF131865	nein	
Chromodomain-helicase-DNA binding protein 1		P40201	nein	
NfiB1-protein (exon 1–12)		Y07685	ja	ja
Putative ATP-dependent RNA helicase PL10		J04847	nein	
Murine vik5variant in the kinase C11 protein		S53216	n.f.	
		X81624	n.f.	
Thymic stromal stimulating factor		D43804	ja	nein
Ubiquitin-activating enzyme E1 X		D10576	ja	ja
b-2 Adrenergic receptor	Signaltransduktion	X15643	n.f.	
Protein kinase C inhibitor (mPKCI)		U60001	nein	
Inhibitory G protein of adenylate cyclase, a chain		M13963	nein	
Terminal deoxynucleotidyltransferase		X04123	ja	nein
Rho-associated, coiled-coil forming protein kinase p160		U58513	nein	
Protein kinase C, u type		AB011812	nein	
Protein kinase z		M94632	ja	nein
Lamin A		D13181	ja	ja
$\alpha$ -2,3-Sialyltransferase	Glykoprotein Synthese	D28941	nein	
$\beta$ -Galactoside $\alpha$ 2,6-sialyltransferase		D16106	ja	nein
T-complex protein 1, $\delta$ subunit	Zelluläre Immunität	P80315	nein	
H-2 class I histocompatibility antigen		Q61147	n.f.	
FK506-binding protein (FKBP65)		L07063	nein	
FK506-binding protein (FKBP23)		AF040252	ja	nein
Myosin binding protein H (MyBP-H)	Zytoskelett Protein	U68267	ja	nein
AM2 receptor		X67469	ja	ja
Cytoskeletal b-actin		X03672	n.f.	
Actin, $\alpha$ cardiac		M15501	nein	
Skeletal muscle actin		M12866	nein	
Capping protein $\alpha$ -subunit		G565961	n.f.	
Actin, $\gamma$ -enteric smooth muscle		M26689	nein	
Major urinary protein 2 precursor	nicht klassifiziert	M27608	nein	
$\beta$ -Globin		AB020013	nein	
$\alpha$ -Globin		L75940	nein	
Putative SH3-containing protein SH3P12		AF078667	nein	
Membrane-type matrix metalloproteinase		X83536	ja	nein
ece1 (endothelin-converting enzyme)		W78610	nein	
$\alpha$ -Adaptin		P17426	n.f.	
Glucose regulated protein 78		D78645	nein	
Lupus Ia protein homolog		L00993	n.f.	
EST		A1646753	n.f.	
Virus-like (VL30) retrotransposon BVL-1		X17124	n.f.	

Gene	Funktionelle Klassifizierung	Accession No.	CTS	TRE
TGN38B		D50032	n.f.	
Mitochondrial genome		L07096	n.f.	
Arylsulfatase A		X73230	ja	ja
Flores-Morales et al. 2002				
Glucose-6-phosphatase	Glukose-Stoffwechsel	RGIAJ68	nein	
L-type pyruvate kinase		RGIAQ41	nein	
FAS (EC 2.3.1.85)	Fett-Stoffwechsel	RGIAN54	n.f.	
6-Phosphogluconate dehydrogenase		RGIAU16	nein	
Hepatic product spot 14		RNAC07	n.f.	
Cytosolic malic enzyme		RGIAN56	nein	
Farnesyl pyrophosphate synthetase		RGIAQ69	nein	
Stearyl-CoA desaturase		RGIAE62	ja	ja
NADH-cytochrome b5 reductase		RGIAA92	ja	ja
Peroxisomal enoyl-CoA hydratase		RGIAJ92	nein	
Cytochrome P450 IVA3		RGIAX68	n.f.	
Lipoprotein lipase		RGIBC49	nein	
Fatty acid transporter (FAT)		RGIAV01	n.f.	
Fatty acid binding protein		RNAA94	n.f.	
Nudix 7	Intermediärer Metabolismus	RGIAM95	n.f.	
Cyclohydrolase I		RGIAJ24	nein	
S-adenosylmethionine decarboxylase		RGIAJ07	nein	
Catechol O-methyltransferase		RGIAM38	ja	ja
Ornithine aminotransferase		RGIAE79	Ja	ja
N-GN-G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase		RGIBA46	n.f.	
Highly similar GTPase-activating protein p-GAP	Signaltransduktion	RGIAM83	n.f.	
μ-Ig		RGIAJ01	n.f.	
N-ras gene for p21 protein		RGIAU48	n.f.	
14-3-3 protein, ε-isoform		RGIAM25	n.f.	
ERK1		RGIAJ95	nein	
PDE1 A		RNAB35	nein	
PDE1 C		RNAB35	nein	
PDE I B		RNAB35	nein	
Epidermal growth factor receptor		RGIAV72	nein	
Epidermal growth factor		RGIAV72	n.f.	
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase α, type II		RGIBA80	n.f.	
GH receptor		RGIBC55	ja	ja
STAT5b	Transkription	RGIAK24	nein	
DNA-binding protein inhibitor ID-1		RGIAQ63	n.f.	
hPer (circadian pacemaker protein) ((PER1))		RGIBA55	ja	ja
NGF-inducible protein PC3	Zellproliferation und Apoptosis	RGIAL89	nein	
Cyclin A		RGIAI87	nein	
Cyclin I 5days responsive		RGIAI37	ja	nein

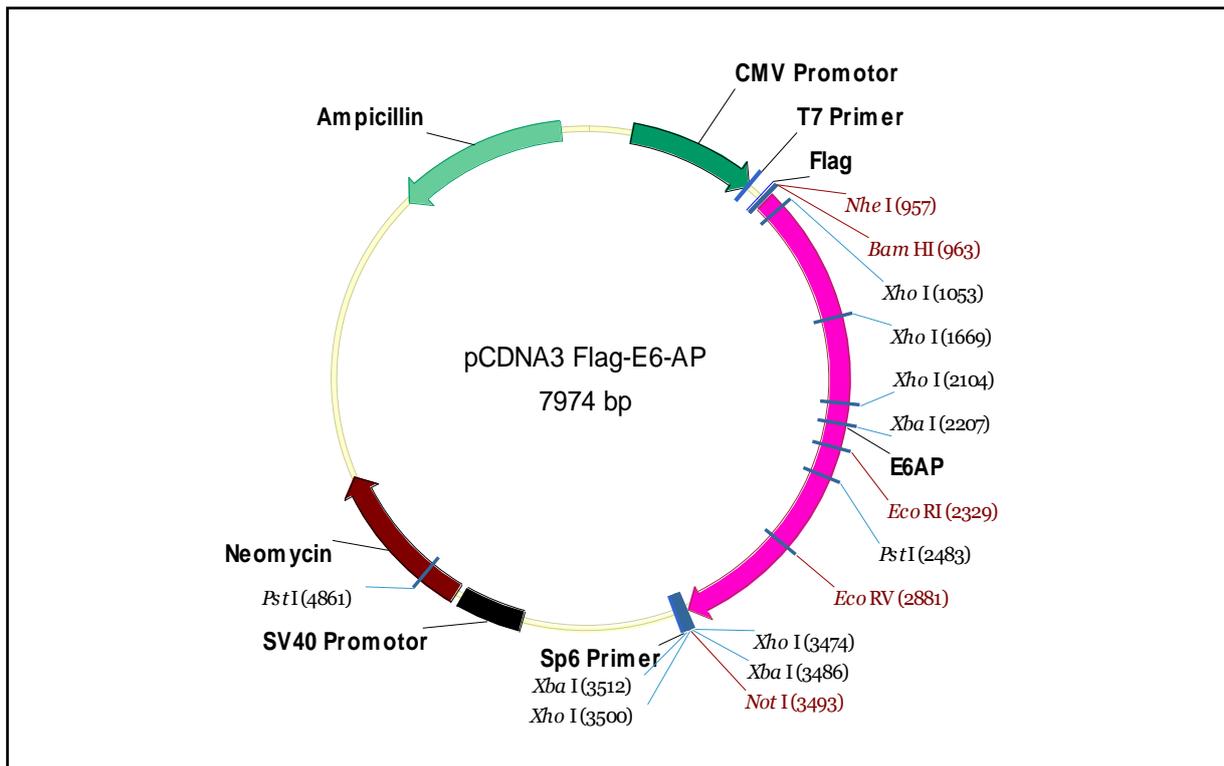
### 8.3 Vektoren



**Abb. 8.4: Schematische Darstellung des Konstrukts pCDNA3 Flag linker**

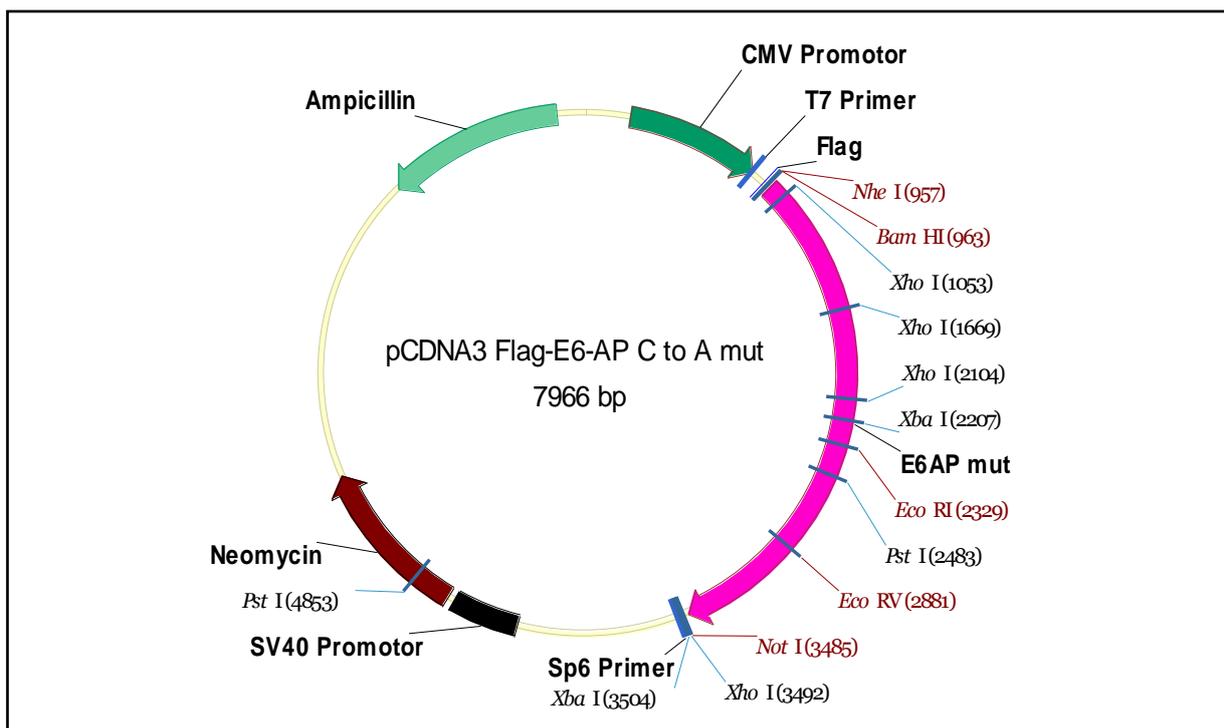
Das Plasmid ist zur eukaryontischen Expression und *in vitro*-Translation von Flag geeignet.

*CMV-Promotor*: Promotor des Cytomegalie-Virus; *T7-Promotor*: Promotor für T7; *SV40-Promotor*: Promotor des Simian-Virus 40; *Neomycin*: Neomycin-Resistenzgen; *Ampicillin*: Ampicillin-Resistenzgen. Klonierungsstrategie: Der Vektor pCDNA3-Flag-CTCF wurde mit *NheI* und *XhoI* geschnitten und über ein Gel aufgereinigt. Dadurch wird die Codierungssequenz für CTCF entfernt. Die Primer pCDNA3-Flag-Polylinker s&as wurden *annealed* und mit dem Vektorrückrad ligiert.



**Abb. 8.5: Schematische Darstellung des Konstrukts pCDNA3 Flag E6-AP**

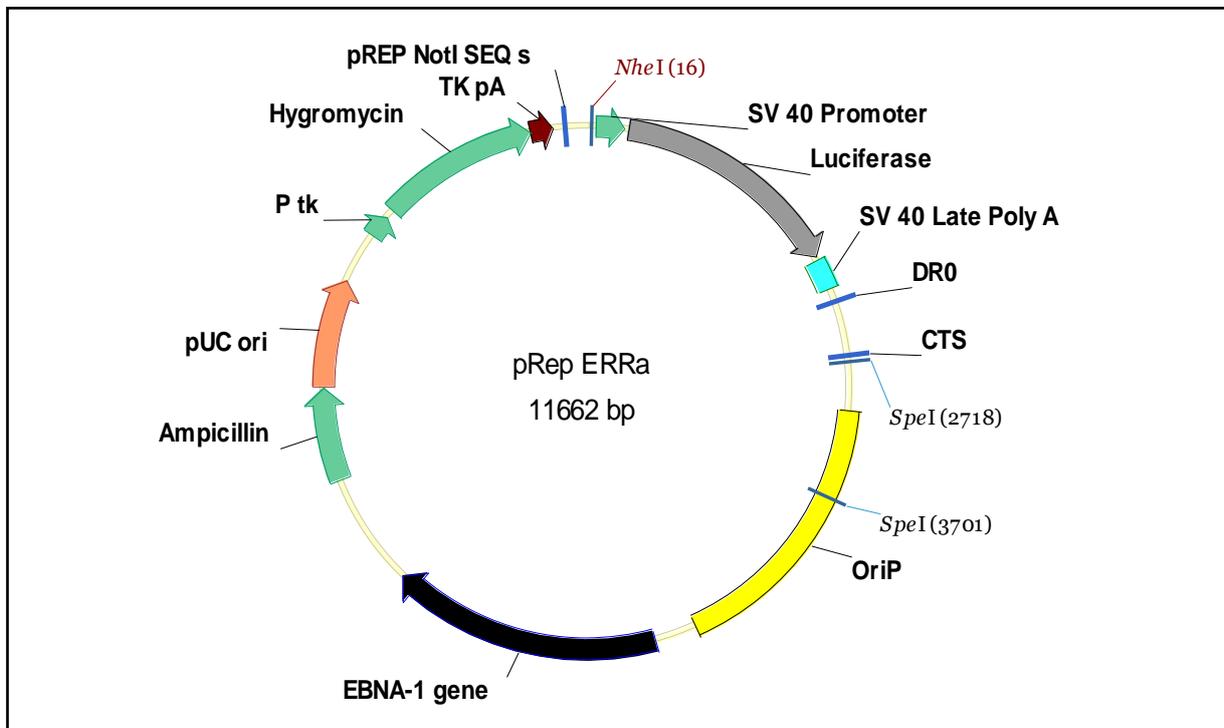
Das Plasmid ist zur eukaryontischen Expression und *in vitro*-Translation von Flag-E6-AP geeignet. Beschreibung s. Abb. 8.4. Klonierungsstrategie: Der Vektor pCDNA3-Flag-linker und pGEX-4T-E6-AP wurden mit *Bam*H1 und *Not*I geschnitten und die Fragmente jeweils über ein Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Kodierungssequenz für E6-AP wurde in den geschnittenen Vektor pCDNA3-Flag-linker inkloniert.



**Abb. 8.6: Schematische Darstellung des Konstrukts pCDNA3 Flag E6-AP mut**

Das Plasmid ist zur eukaryontischen Expression und *in vitro*-Translation von Flag-E6-AP mut geeignet. Beschreibung s. Abb. 8.4. Klonierungsstrategie: Der Vektor pCDNA3-Flag-linker wurde mit BamH1 und EcoRV geschnitten und die Fragmente über ein Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Das Plasmid pGEM E6-AP C→A wurde mit HindIII geschnitten und die Enden mit der T4-Polymerase aufgefüllt. Danach wurde mit BamHI geschnitten und die Fragmente über ein Gel aufgetrennt. Die Kodierungssequenz für E6-AP mut wurde in den geschnittenen Vektor pCDNA3-Flag-linker einkloniert.

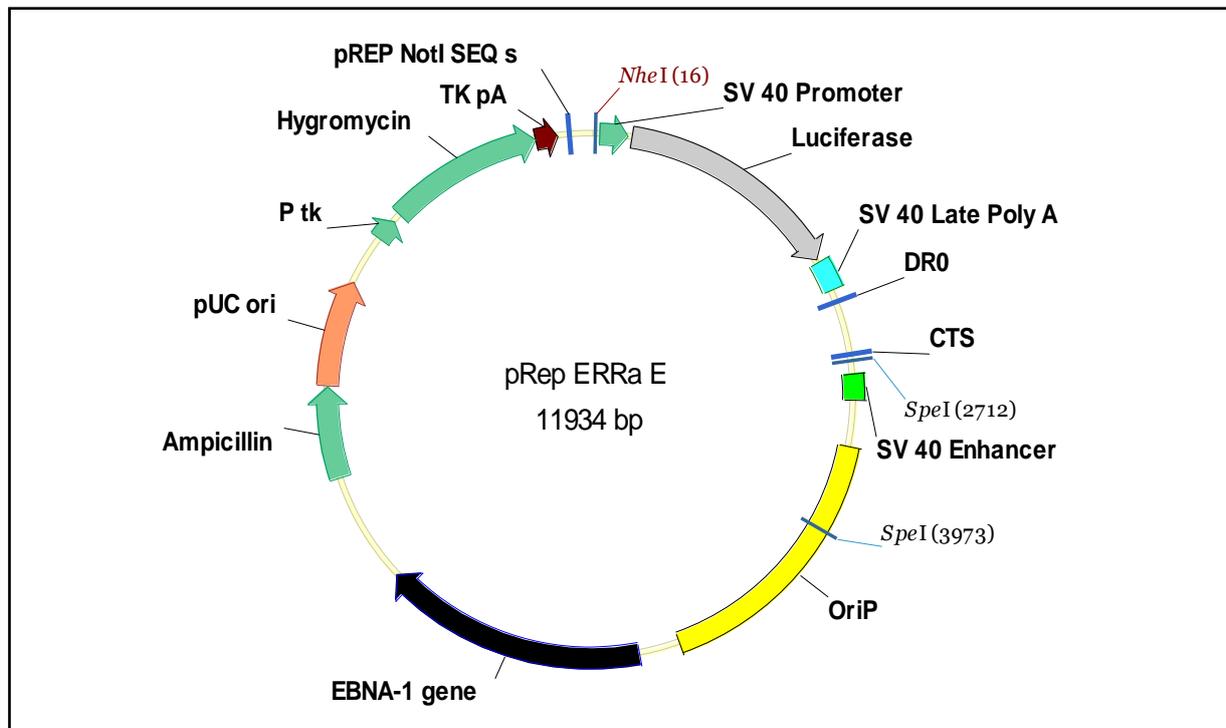
Im Rahmen dieser Arbeit können nicht alle klonierten episomalen Konstrukte dargestellt werden, da dies den Umfang sprengen würde. Beispielhaft ist jeweils ein Konstrukt mit und ohne SV-40 Enhancer abgebildet. Alle übrigen Konstrukte sind in der Datenbank des Genetischen Instituts abgelegt.

**Abb. 8.7: Schematische Darstellung des Konstrukts pRep ERRα**

Der episomale Vektor pRep ERRα wurde für transiente Transfektionen in eukaryontische Zellen verwendet. Dieses Konstrukt besitzt ein Luciferase-Reportergen, dem ein SV40-Promotor vorgeschaltet ist.

*SV40 Late Poly A*: Polyadenylierungsstelle des Simian-Virus 40; *OriP*: viraler Replikationsursprung; *EBNA-1 gene*: virales nukleäres Antigen; *Ampicillin*: Ampicillin-Resistenzgen; *pUC ori*: prokaryontischer Replikationsursprung; *P tk*: Promoter der Thymidinkinase (Herpes Simplex-Virus); *Hygromycin*: Hygromycin-Resistenzgen; *TK pA*: Polyadenylierungsstelle der Thymidinkinase (Herpes Simplex-Virus).

Klonierungsstrategie: Das Episom pRep4-ss wurde mit NotI geschnitten und der Überhang mit T4-Polymerase aufgefüllt. Danach wurde mit NheI geschnitten und das Fragment über ein Gel aufgereinigt. Der Vektor p3α-ERRα wurde mit NheI und EcoRV geschnitten und die Fragmente über ein Gel aufgetrennt und aufgereinigt. Das Promotor-Luciferase-Isolator-Element wurde in den geschnittenen pRep4-ss einkloniert.



**Abb. 8.8: Schematische Darstellung des Konstrukts pRep ERRα E**

Beschreibung siehe Abb. 8.7.

Klonierungsstrategie: Das Episom pRep4-ss wurde mit NotI geschnitten und der Überhang mit T4-Polymerase aufgefüllt. Danach wurde mit NheI geschnitten und das Fragment über ein Gel aufgereinigt. Der Vektor p3α-ERRα wurde mit BamHI geschnitten und der Überhang mit T4-Polymerase aufgefüllt. Danach wurde mit NheI geschnitten und das Fragment über ein Gel aufgetrennt und aufgereinigt. Das Promotor-Luciferase-Isolator-Enhancer-Element wurde in den geschnittenen pRep4-ss einkloniert.

## 8.4 Oligonukleotide

### Oligonukleotide für Bandshift Versuche

Catechol CTScore1 s & as

5' -CCTGCTCTGTCTACCCGAGGGCACCAGAGGGCACGAGAAGGCTGGCTCCCTG- 3'

5' -CAGGGAGCCAGCCTTCTCGTGCCCTCTGGTGCCCTCGGGTAGACAGAGCAGG- 3'

## Catechol CTScore2 s &amp; as

5' -TGAACCTTGCCCCTCTGCAAACACAAGGGGGCGATGGTGGCACTCCAAGCAA- 3'

5' -TTGCTTGGAGTGCCACCATCGCCCCCTTGTGTTTGCAGAGGGGCAAGGTTCA- 3'

## Catechol IR4 s &amp; as

5' -CGTCCAGAGCATGGGTGACCAGCACG- 3'

5' -CGTGCTGGTCACCCATGCTCTGGACG- 3'

## Catechol DR4 s &amp; as

5' -ACCCGAGGGCACCAGAGGGGCACGAGA- 3'

5' -TCTCGTGCCCTCTGGTGCCCTCGGGT- 3'

## Catechol 5'CTS 20mer s &amp; as

5' -CCACTCTTGCCCCAGGCCTGCCCTCTGCTGGGAGCCGGGACACTGAGCTC- 3'

5' -GAGCTCAGTGTCCCGGCTCCAGCAGAGGGCAGGCCTGGGGCAAGAGTGG- 3'

## Catechol 5'DR4 s &amp; as

5' -ACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCG- 3'

5' -CGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGT- 3'

## Stearyl CTS s &amp; as

5' -GGTGCTTTACCTACCAGGGCCACTGGGTGGCAGCAGGACCCTGGCCCCAT- 3'

5' -ATGGGGCCAGGGTCCTGCTGCCACCCAGTGGCCCTGGTAGGTAAAGCACC- 3'

## Stearyl DR4 s &amp; as

5' -ACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCA- 3'

5' -TGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGT- 3'

## PTPR CTScore s &amp; as

5' -CAGTCCCATCCCCTCCTCATACGCCAGGGGGCGCACACGCACTGTTTGTGAA- 3'

5' -TTCACAAACAGTGCGTGTGCGCCCCCTGGCGTATGAGGAGGGGATGGGACTG- 3'

## PTPR DR4 s&amp;as

5' -ACTCCTGACCTCGGGTGTCTGCCCG- 3'

5' -CGGGCAGATCACCCGAGGTCAGGAGT- 3'

PTPR DR5 s & as

5' - TTGTGAATTCAAGTTCAGGACAAAAAC- 3'

5' - GTTTTTGTCTGAACTTGAATTCACAA- 3'

COUP-TF2 CTS s & as

5' -TTTAGGCAGCGAGGACTCTTACACTAGGGGGCAGACAGATACTGTACTTGCT- 3'

5' -AGCAAGTACAGTATCTGTCTGCCCCCTAGTGTAAGAGTCCTCGCTGCCTAAA- 3'

COUP-TF2 IR4 s & as

5' - TACTGAGTTCAGAGTTAAACTCGGCA- 3'

5' - TGCCGAGTTTAACTCTGAACTCAGTA- 3'

COUP-TF2 ER6 s & as

5' - AATTCTGTGCTCTGTCCAGAACATTCAA- 3'

5' - TTGAATGTTCTGGACAGAGCACAGAATT- 3'

COUP-TF2 DR0 s & as

5' -AGATACTGTACTTGCTCTAATCTT- 3'

5' -AAGATTAGAGCAAGTACAGTATCT- 3'

ERR $\alpha$  CTS s & as

5' -GGTTCCTCGAATCACACATGCGGCGCCCCCTGGTGGGGAGACCTTTCGGT- 3'

5' -ACCGAAAGGTCTCCCCACCAGGGGGCGCCGCATGTGTGATTCGAGGAACC- 3'

ERR $\alpha$  DR4 s & as

5' -CGCGATGTCCTTTTGTGTCCTACAAG- 3'

5' -CTTGTAGGACACAAAAGGACATCGCG- 3'

ERR $\alpha$  DR0 s & as

5' -CCGCAGTGACCTTGAGCTTTCTCC- 3'

5' -GGAGAAAGCTCAAGGTCCTGCGG- 3'

Period CTS s & as

5' -CCCATTACCAACTCCTAGTGCCCCCTGTGGCCACTTTGAGAATCACACT- 3'

5' -AGTGTGATTCTCAAAGTGGCCACAGGGGGGCACTAGGAGTTGGTAATGGG- 3'

Period DR4/IR4 s & as

5' -ACAAGAGATCAATTGTGGCCAACCCC- 3'

5' -GGGGTTGGCCACAATTGATCTCTTGT- 3'

Period DR4 s & as

5' -ACTCCTGACCTCAAATGATCTGCCTG- 3'

5' -CAGGCAGATCATTGAGGTCAGGAGT- 3'

AM2 receptor CTS s & as

5' -AACAGCCATAAAACGCCGCCAGAAGGGGGCAGTGACCAAAGCACGTTC- 3'

5' -GAACGTGCTTTTGGTCACTGCCCCCTTCTGGGCGGCGTTTTATGGCTGTT- 3'

AM2 receptor ER6 0,71 s & as

5' -GGCAGTGACCAAAGCACGTTCACTGGC- 3'

5' -GCCAGTGAACGTGCTTTTGGTCACTGCC- 3'

Bcl3 CTS s & as

5' -GAAGGCGTGCCCATGGCAACCGCTAGGTGGTGCCCGTACACCACCAGCCA- 3'

5' -TGGCTGGTGGTGTACGGGCACCACCTAGCGGTTGCCATGGGCACGCCTTC- 3'

Bcl3 DR4 s & as

5' -CAGGAGGATCACCTGAGGTCAGAAAT- 3'

5' -ATTTCTGACCTCAGGTGATCCTCCTG- 3'

PEPCK CTS s & as

5' -AACCATGCTCAGCCACAGTGGCCTCTGCAGGTTGAGGAGGGATTGCTGT- 3'

5' -ACAGCGAATCCCTCCTCAACCTGCAGAGGCCACTGTGGCTGAGCATGGTT- 3'

PEPCK IR4 s & as

5' -GCCCAAGCACAAATGTGACCCTCGGT- 3'

5' -ACCGAGGGTCACATTTGTGCTTGGGC- 3'

PEPCK DR0 s & as

5' -CAAATGTGCTCTTGAGCCTATTTT- 3'

5' -AAAATAGGCTCAAGAGCACATTTG- 3'

Lamin A ER6 s & as

5' -CTAAATGTCCCTCGTTTTGGTCACTGGC- 3'

5' -GCCAGTGACCAAACGAGGGACATTTAG- 3'

Growth hormone receptor DR5 s & as

5' -GTATTTGAGCCACAGCTGAGCTTCTGA- 3'

5' -TCAGAAGCTCAGCTGTGGCTCAAATAC- 3'

Growth hormone receptor DR4 s & as

5' -CGGCGTGACCCCTGGTGAACGGTGGC- 3'

5' -GCCACCGTTCACCAGGGGTCACGCCG- 3'

#### Oligonukleotide für die ChIP-Analyse

Stearyl 5' CTS ChIP s & as

5' -CAGAACAAATTCTTCACTCCTACCT- 3'

5' -TGTGGAGAAAAGTGGTCTCTAGATT- 3'

PTPR CTS ChIP s & as

5' -GGTGAAAAACCACTCACTGGAA- 3'

5' -TTCAGGGATCACGTGGTAATG- 3'

Catechol 3' CTS1 ChIP s & as

5' -AACAGCCTGAGTCCGTGTCTG- 3'

5' -CTTTGCTTGGAGTGCCACC- 3'

Catechol 3' CTS2 ChIP s & as

5' -ACAGCTGCCAACAGCAGAGG- 3'

5' -GCCAGAGGCACACACCTGCT- 3'

ERR CTS ChIP s & as

5' - ATCTGCGGTTCCCTCGAATCA- 3'

5' - ATGTATCGCTGCAGCTCCTT- 3'

ERR 5'control ChIP s & as

5' - TTATGATTTGCGCTGGTTGA- 3'

5' - GCACACAGCAAGTGCTCAAT- 3'

ERR MHRE ChIP s & as

5' - GTCAGTGCAGGACAGCCCGCGTGA- 3'

5' - GATAGGGCCCGGACGGAGAAAGC- 3'

ERR Prom ChIP s & as

5' - AGGAAGCGGAGTAGGAAGC- 3'

5' - GGAGTGCCGGAGTGAGCC- 3'

hmycN ChIP s & as

5' -TGTTTTAAGGAACCGCCTGT- 3'

5' -CGTTCAGGTTTGCGAAAGTA- 3'

hPEPCK ChIP TRE s & as

5' -CTTCCCATGAACTTTGACTG- 3'

5' -CAACTTCCAAGTACTAAACCT- 3'

h $\beta$ -Globin FII s&as

5' -CCTGACCTATATCTGGCAGGAC- 3'

5' -GCACCCACCTTCAATCAAAA- 3'

#### Oligonukleotide zum Sequenzieren

Ölle013 (MCS II, p3 $\alpha$ 1xA)

5'-TTG TAA CCA TTA TAA GCT GC-3'

pRepNot seq\_s & as (Not Ss, pRep4)

5' -TCCACGACTGGACTGAGCAG- 3'

5' -CCCAGTTGGCAAGTTGTACCA- 3'

M13u (Standardprimer)

5' -CGTTGTAAAACGACGGCCAGT- 3'

Sp6 (Standardprimer)

5' -ATTTAGGTGACACTATAG- 3'

pGex\_seq\_s & as (MCS, pGex)

5' -GGTGGCGACCATCCTCCAAA- 3'

5' -GACAAGCTGTGACCGTCTCC- 3'

T7 (Standardprimer)

5' - TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AG- 3'

T3 (Standardprimer)

5'-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3'

### Klonierungs-Oligonukleotide

pCDNA3-Flag-Polylinker

5' -CTAGCGGATCCGAATTCGATATCTAGCGCTGCGGCCGCC- 3'

5' -TCGAGGCGGCCGCAGCGCTAGATATCGAATTCGGATCCG- 3'

AM2 receptor\_Spe&Xba

5' -TTTACTAGTGCAGACACCTAGAAAGTCAGACACT- 3'

5' -TTTTCTAGAGATACTTTGCAGAAGGCAGGC- 3'

Bcl3\_Spe&Xba

5' -TTTACTAGTAAGCTCCGGATGGAAGGCGT- 3'

5' -TTTTCTAGACCGTGTTGGCCAGGTTTGT- 3'

Catechol 3'\_Spe&Xba

5' -TTTACTAGTTGAGTCCGTGTCTGCTTCTGT- 3'

5' -TTTTCTAGACTTTGCTTGGAGTGCCAC- 3'

ERR $\alpha$ \_Spe&Xba

5' -TTTACTAGTATCTGCGGTTCCCTCGAATCA- 3'

5' -TTTTCTAGAGGTGGGTGAAGCCGACTTAAA- 3'

PEPCK\_Spe&Spe

5' -TTTACTAGTCTCAGTTAAAATGCCGCATTG- 3'

5' -TTTACTAGTCCTTTCTTCATCTGGGTATGACATT- 3'

## LaminA\_Spe&amp;Xba

5' -TTTACTAGTGGCTTCTTGTGAAGGGAATCC- 3'

5' -TTTTCTAGAGCAAAAGAAGTAGTGCCTGGAG- 3'

## COUP-TF2\_Spe&amp;Xba

5' -TTTACTAGTCTGACTTAAGAAGCAATTCTGTGC- 3'

5' -TTTTCTAGAGGTCCTCTGAAAAATTTACAGTGCT- 3'

## PTPR\_Spe&amp;Xba

5' -TTTACTAGTGGTGAAAAACCACTCACTGGAA- 3'

5' -TTTTCTAGATTCAGGGATCACGTGGTAATG- 3'

## Stearyl\_Spe&amp;Xba

5' -TTTACTAGTAGGCTTGTCTCGAACTCCTCA- 3'

5' -TTTTCTAGACAGAAAAGAGCAGGCTCTCCA- 3'

## pcDNA3 Flag Polylinker

5' -CTAGCGGATCCGAATTCGATATCTAGCGCTGCGGCCGCC- 3'

5' -TCGAGGCGGCCGCAGCGCTAGATATCGAATTCGGATCCG- 3'

realtime-Oligonukleotide

## Catechol sol\_ r t s &amp; as

5' -GCTGGAACGAGTTCATCCTG- 3'

5' -GCACAGCTGAGTAGCCACAG- 3'

## AM2\_ r t s &amp; as

5' -ATTGTGTCCCCACACTCGAT- 3'

5' -TTGGCTATCAACAGCACAGG- 3'

## Stearyl\_ r t s &amp; as

5' -GGTAGTTGTGGAAGCCCTCA- 3'

5' -AAACCTGGCTTGCTGATGAT- 3'

## PTPR\_ r t s &amp; as

5' -GGGGTGAACAAGCAAAGACTC- 3'

5' -TGGGTTCTCCTGTAGCTTGG- 3'

## GHR\_rt s &amp; as

5' -TTAGCAGAGCACCCCTGGAGT- 3'

5' -TCAGGGCATTCTTTCCATTC- 3'

## Bcl3\_rt s &amp; as

5' -CCCTATACCCCATGATGTGC- 3'

5' -CCACAGACGGTAATGTGGTG- 3'

## PEPCK\_rt s &amp; as

5' -AAGAGACACAGTGCCCATCC- 3'

5' -ACGTAGGGTGAATCCGTCAG- 3'

ERR $\alpha$ \_rt s & as

5' -GGCCCTTGCCAATTCGA- 3'

5' -GGCCTCGTGCAGAGCTTCT- 3'

 $\beta$ -Actin\_rt s & as

5' -AGCCTCGCCTTTGCCGA- 3'

5' -CTGGTGCCTGGGGCG- 3'

 $\beta$ 2M\_rt s & as

5' -AGCGTACTCCAAAGATTCAGGTT- 3'

5' -ATGATGCTGCTTACTGTCTCGAT- 3'

## RNAPoIII\_rt s &amp; as

5' -GCACCACGTCCAATGACAT- 3'

5' -GTGCGGCTGCTTCCATAA- 3'

## GAPDH\_rt s &amp; as

5' -TGCACCACCAACTGCTTAGC- 3'

5' -GGCATGGACTGTGGTCATGAG- 3'

## 8.5 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere (Stromstärke)
$\alpha$	anti
3-ABA	3-Aminobenzamid
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APP	Amyloides Vorläuferprotein
AS	Aminosäure
as	antisense
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
bq	Bequerel [Zerfall/sec]
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Carboxyterminus
°C	Grad Celsius
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
cDNA	<i>complementary</i> DNA
Ci	Curie [=3,7·10 <sup>10</sup> bq]
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (alkalische Kälberdarm-Phosphatase)
CMV	Cytomegalie-Virus
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählimpulse pro Minute)
CsCl	Cäsiumchlorid
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i> (CCCTC-Bindefaktor)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTS	<i>CTCF target site</i> (CTCF-Bindestelle)
Da	Dalton [g/Mol]
DBD	DNA-Bindedomäne
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosid-5`Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt

---

DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMR	<i>Differentially methylated region</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DR	<i>direct repeat</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E6-AP	<i>E6-associated protein</i>
EBV	Eppstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Elektrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Östrogenrezeptor
ER6	<i>everted repeat spaced by 6 nukleotides</i>
ERR $\alpha$	<i>Estrogen related receptor alpha</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
fl	<i>full length</i> (vollständig)
F1, F2	Footprint 1,2 für CTCF/TR-Bindestellen am Hühner-Lysozym-Silencer
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde(n)
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyetyhl)-1-piperazinethan-Sulfonsäure
HRE	<i>hormon response element</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HS	DNase I <i>hypersensitive-site</i>
ICR	<i>Imprinting control region</i>
IP	<i>inverted palindrome</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
k	kilo [ $10^3$ ]
K	Kompetitor
kb	Kilobase (=1000 Basenpaare)

---

kDa	Kilodalton
l	Liter
LacZ	Gen für $\beta$ -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (Medium)
LBD	Liganden-Bindedomäne
LCR	<i>Locus control region</i>
Lsg	Lösung
Lys	Lysozym
m	milli [ $10^{-3}$ ]
M	Molar [mol/l]
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	Molekulargewicht
$\mu$	mikro [ $10^{-6}$ ]
n	nano [ $10^{-9}$ ]
N	Aminoterminus
NaAc	Natriumacetat
Neo <sup>r</sup>	Neomycin (G418)-Resistenz
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
NP40	Nonidet P40; Ethylenphenyl-Polyethylenglycol
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Ori	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
p	pico [ $10^{-12}$ ]
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Poly(ADP)Ribose
PARlierung	Poly(ADP)Ribosylierung
PARP	PAR-Polymerase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Pen	Penicillin
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
PolyA	Polyadenylierungssignal

---

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSV	Rous-Sarcoma-Virus
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Strep	Streptomycin
SV40	Simian-Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Teriffic Broth (Medium)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Bindeprotein
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',n'-Tetramethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TK	Thymidinkinase
T3	3,5,3'-Triiodothyronin, Thyroidhormon
TR	Thyroidhormon-Rezeptor
TRE	<i>Thyroid hormone response element</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Triton-X-100	Oktylphenol-Ethylenglykolether
TSA	Trichostatin A
Tween 80	Polyoxyethylensorbitan-monooleat
u	<i>unit</i> (Einheit)
UV	Ultraviolettes Licht (Wellenlänge < 340 nm)
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt (Spannung)
(v/v)	Volumenanteile
W	Watt (Leistung)
(w/v)	Masse pro Volumen
(w/w)	Massenanteile

## Danksagung

Wenn das Ende naht und die Arbeit eigentlich fertig ist, kommen einem plötzlich die Gedanken an jene, ohne die das Alles nicht möglich gewesen wäre. Man kann nach knapp viereinhalb Jahren nicht allen persönlich die Hand schütteln, weil das den Rahmen der Arbeit endgültig sprengen würde.

Zuerst einmal danke ich natürlich meinem Chef und „Doktorvater“ Prof. Renkawitz, der mich nach meiner Diplomarbeit weiterhin an Bord des Instituts gelassen hat und auch in kritischen Situationen stets die Ruhe bewahrt hat.

Natürlich gilt auch Jörg ein persönlicher Dank. Wir haben so manche Höhe und Tiefe sowohl privat, als auch im Labor erlebt. Oft gestresst aber irgendwie doch immer Zeit. Auf den selbstgemachten Rotwein warte ich zwar noch, aber die Hoffnung habe ich noch nicht aufgegeben.

Laborkollegen hatte ich ja nun reichlich doch weil die Sache mit APP nicht ganz erfolgreich zu Ende gebracht werden konnte, fallen mir nur noch ein paar der jüngeren Vergangenheit ein. Unvergessen die Frau mit den Wuschelhaaren oder CPs Husten, der aber keinesfalls chronisch ist. Manchmal wär ich gern so gelassen wie der Kollege Dienstbach, manchmal aber auch nicht. Floh der alte Kamerad vom Praktikanten zum Postdoc und das in weniger als drei Jahren. Muss der einen guten Betreuer gehabt haben. Ich bin nach wie vor der Meinung, dass Marek mehr weiß als Google und Wikipedia zusammen und manchmal hat er mich zum Glück teilhaben lassen. Mein Lieblingschinese Gong war lange der einzige mit dem ich ausführlich über Fußball reden konnte. Zum Glück sind jetzt Philipp und Martin da. Der ganze Rest fühlt sich bitte geherzt und gedrückt.

Last but not least möchte ich Tine danken für die besten Pläne die es auf dieser Welt gibt. Sie musste in den letzten Monaten oftmals zurückstecken und es war für alle keine einfache Zeit. Aber ich denke wir haben es ganz gut gemeistert. Danke natürlich auch an meine Eltern und Schwiegereltern die mir des Öfteren unsere kleine Tochter Rosalia abgenommen haben und ich so etwas Zeit für meine Doktorarbeit hatte.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend aus anderen Arbeiten übernommen wurden, sind mit Quellenangabe als Zitat kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in dieser oder veränderter Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Gießen, den 9. April 2009

Oliver Weth