

Institut für Genetik
AG Prof. Dr. R. Renkawitz
Fachbereich 08 (Biologie)
Justus-Liebig-Universität, Gießen

**„Untersuchung des Einfluss von CP190-
Interaktionspartnern auf die CP190- und dCTCF-
vermittelte Chromatinisolation in *Drosophila
melanogaster*“**

Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Theresa Jox
(Gießen, Juli 2016)

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz, Gießen
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Brehm, Marburg

Publikationsliste

Maksimenko, O., Bartkuhn, M., Stakhov, V., Herold, M., Zolotarev, N., **Jox, T.**, Buxa, M.K., Kirsch, R., Bonchuk, A., Fedotova, A., et al. „*Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin.*” *Genome research* 25, 89

Jox, T., Bartkuhn M., Buxa M. K., Bohla D., et al., 2016: “*SUMOylation increases dCTCF and CP190 mediated chromatin insulation in Drosophila.*” (in Arbeit)

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen:

%	Prozent
α	Anti oder Alpha
β	Beta
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A	Adenosin oder Adenin
A	Ampere
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin oder Cytidin
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase (alkalische Kälberdarm-Phosphatase)
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton [g/Mol]
DBD	DNA-Bindedomäne
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	2', 3'-Didesoxynucleosid-5'Triphosphat
d.h.	Das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS	Fötales Kälberserum
FL	Full length (gesamte Länge eines Proteins)
FS	Full speed (höchste Geschwindigkeit)
g	Erdbeschleunigung [9,81 m/sec ²] bei Zentrifugationen

g	Gramm
G	Guanosin oder Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k	Kilo
kBp	Kilobasenpaare (1.000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
kd	<i>Knock down</i>
ko	<i>Knock out</i>
l	Liter
lacZ	Gen für β -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (Medium)
Lsg.	Lösung
Lys	Lysozym
M	Molar [mol/l]
m	milli [10 ⁻³]
Mbp	Megabasenpaare (10 ⁶ Basenpaare)
MCS	Multiple Cloning Site (Multiple Klonierungsstelle)
MeOH	Methanol
min	Minuten
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
μ	mikro [10 ⁻⁶]
n	nano [10 ⁻⁹]
NaAc	Natriumacetat
NP-40	Nonidet P40
N-Terminus	Amino Terminus
OD	Optische Dichte
Ori	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
p	pico [10 ⁻¹²]
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen	Penicillin
PIPES	Piperazin-N, N' bis-[2-ethansulfonsäure]
PNK	Polynucleotidkinase
PolyA	Polyadenylierungssignal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe

SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
s.o.	Siehe oben
Strep	Streptomycin
T	Thymidin oder Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TB	Teriffic Broth (Medium)
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Triton X-100	Oktylphenol-Ethelenglykolether
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Einheit)
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolettes Licht
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VT	Volumenteil
(v/v)	Volumenanteil
W	Watt (Leistung)
(w/v)	Masse pro Volumen
(w/w)	Massenanteil
z.B.	Zum Beispiel
ZF	Zinkfinger
z.T.	Zum Teil
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid

Den biologischen Kontext betreffende Abkürzungen:

abd-A	<i>abdominal A</i>
Abd-B	<i>Abdominal B</i>
ANT-C	Antennapedia-Komplex
Aos1	Activator of SUMO 1
BEAF-32	<i>Boundary Element Associated Factor 32</i>
BX-C	Bithorax-Komplex
cg	<i>Computed gene</i>
<i>Computed gene</i>	<i>Computed gene 30020</i>
CP190	<i>Centrosomal Protein 190 kDa</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding Factor</i>
CTS	<i>CTCF target site</i>
dCTCF	<i>Drosophila CTCF</i>
dCTS	<i>Drosophila CTCF target site</i>
dREAM	<i>dimerization partner, RB-like, E2F and Multi-vulval class B</i>
dSUMO	<i>Drosophila SUMO</i>
Fab	Isolator in Abdominal B
GAF	<i>GAGA-binding Factor</i>

HDAC	Histondeacetylase
HAT	Histonacetyltransferase
iab	<i>Boundary Element in Abdominal B</i>
Ibf1	<i>Insulator binding factor1</i>
Ibf2	<i>Insulator binding factor2</i>
lwr	<i>lesswright</i>
Mod(mdg4)	<i>modifier of mdg4</i>
NuRF	<i>Nucleosome Remodeling Factor</i>
PcG	<i>Polycomb Groupe</i>
PC	<i>Pilycomb</i>
Pita	<i>Spotted Dick</i>
Smt3 (in <i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>CG4494 gene product from transcript CG4494-RA</i>
Su(Hw)	<i>Supressor of Hairy wing</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
Su(var)2-10	<i>Supressor of varigation 2-10</i>
TF	<i>Transkriptionsfaktor</i>
Uba2	<i>Ubiquitin activator 2</i>
Ubx	<i>Ultrabithorax</i>
velo	<i>verloren</i>
ZIPIC	<i>Zinc-finger protein interacting with CP190</i>
Zw5	<i>Zwest withe 5</i>

Zusammenfassung

Isolatoren sind Sequenzen der DNA, die verhindern dass DNA-Abschnitte ungehindert miteinander interagieren können. Dabei haben Isolatoren zwei Funktionen, die Enhancer-Blockade und die Barriere-Funktion. Die Barriere-Funktion verhindert das Interagieren von Chromatinabschnitten unterschiedlicher Stadien, während die Enhancer-Blockade eine Interaktion von Enhancer und Promoter unterbindet (Herold et al. 2012). Isolator-bindende Proteine (IBP) vermitteln dabei die Funktionen des Isolators, indem sie an diese binden. In *Drosophila* gibt es insgesamt neun IBP, von denen sieben die Unterstützung von CP190 (Centrosomal Protein 190 kDa) benötigen, um die Isolatorfunktion zu vermitteln. CP190 ist in der Lage, Brücken zwischen Isolatoren und Promotoren zu bilden (Liang et al. 2014). In dieser Arbeit wurden Interaktionspartner von CP190 untersucht, die CP190 für seine Funktion bei der Isolation benötigt.

Massenspektrometriedaten, Immunpräzipitationen und ein „Yeast Two Hybrid Screen“ zeigten, dass die Zinkfinger-assoziierte Domäne (ZAD) -Proteine, Pita, ZIPIC und cg30020, mögliche Interaktionspartner für CP190 sind (Maksimenko et al. 2015). ZAD-Proteine machen etwa 10 % aller Transkriptionsfaktoren (TF) in Dipteren aus und haben dieselben Zinkfinger-Typen, wie sie auch Zinkfingerproteinen (ZFP) vorkommen (Benson et al. 2009, Chung et al. 2007, Chung et al. 2002). Um den Einfluss von Pita, ZIPIC und cg30020 auf die Chromatinbindung zu untersuchen, wurden ChIP-Seq- und ChIP-qPCR-Experimente durchgeführt. Die ChIP-Seq-Analyse von Pita und ZIPIC zeigte dabei, im Vergleich mit ChIP-Chip-Daten von CP190, dass diese Faktoren stark mit CP190 kolokalisieren. Die anschließenden ChIP-qPCR-Experimente nach *knock down* von CP190 bzw. Pita oder ZIPIC, konnten zeigen, dass die CP190-Bindung bedingt von ZIPIC und Pita abhängig ist. Dies deutete auf einen funktionellen Zusammenhang von CP190, Pita und ZIPIC bei der Bindung an Chromatin hin. Mit Pita und ZIPIC konnten zwei weitere Isolator-bindende Proteine zusätzlich zu den bisher bekannten IBPs in *Drosophila* gefunden werden, die wahrscheinlich durch ihre Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen weiter regulatorische Funktionen bei der Isolation übernehmen (Maksimenko et al. 2015).

Des Weiteren wurden alle Faktoren der SUMO-Kaskade, sowie eine SUMO-Protease, in einem RNAi-Screen in *Drosophila* S2-Zellen gefunden (Bohla et al. 2014). SUMOylierung ist eine Proteinmodifikation, mit vielfältigen Funktionen, deren Aufgabe bei der Isolation kontrovers diskutiert wird (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Auch weitere Isolatoren, die durch CP190 gebunden werden, zeigten in einem funktionalen Reporterassay ebenfalls eine Reduktion der Isolation nach dem *knock down* von SUMO-Faktoren. Nach

dem Nachweis der SUMOylierung von CP190 wurde eine ChIPseq-Analyse von diesem, dCTCF und FLAG-dSUMO nach vor und nach FLAG-dSUMO-Expression in S2-Zellen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass dSUMO mit CP190 und dCTCF kolokalisiert und einen Einfluss auf die Bindung von CP190 hatte, was auch durch eine unabhängige bioinformatischen GEO-Analyse von ChIP-Seq-Daten bestätigt wurde. Die Zugänglichkeit des Chromatins wurde dabei durch die Expression von FLAG-dSUMO kaum beeinflusst, wie sich in Histon H3-ChIP und FAIRE-Assay zeigte. Dennoch war das Chromatin tendenziell etwas stärker geöffnet, sobald FLAG-His-dSUMO exprimiert wurde. Diese Resultate deuten darauf hin, dass SUMOylierung keine eindeutige Funktion bei der Isolation, bei der Bindung an Chromatin und bei der Zugänglichkeit des Chromatins einnimmt, sondern zu einer Homöostase beiträgt, indem eine dynamische SUMOylierung und De-SUMOylierung von Faktoren stattfindet, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wie CP190 oder Polycomb-Proteinen (Gonzalez et al. 2014).

Abstract

Insulators are DNA regulatory sequences that preclude functionally distinct chromatin domains from improperly interacting with each other. They have two different functions: Enhancer blocking and barrier function. The barrier function prevents the interaction of chromatin domains with different activities, whereas the enhancer blocking insulates enhancers from promoters (Herold et al. 2012). Insulator-binding proteins (IBPs) mediate insulator function by binding these sequences. In *Drosophila*, nine IBPs are known and seven of them require CP190 (Centrosomal Protein 190 kDa) for mediating insulator function. CP190 bridges insulator, enhancer and promoter sequences (Liang et al. 2014). In this thesis new interacting partners of CP190, which assist in mediating insulator function, were analyzed.

Mass spectrometry, immune precipitation (IP) and yeast two hybrid screen identified ZAD (zinc-finger associated domain) proteins, Pita, ZIPIC and cg30020, as potential interacting partners of CP190 (Maksimenko et al. 2015). ZAD proteins provide 10 % of all transcription factors (TF) in Dipteres and feature the same type of zinc-finger which can be found in zinc-finger proteins (ZFP) (Benson et al. 2009, Chung et al. 2007, Chung et al. 2002). ChIP-Seq and ChIP-qPCR experiments were performed to analyze the binding of Pita, ZIPIC and cg30020. ChIP-Seq analysis of Pita and ZIPIC showed a strong co-localization of those factors with CP190, when compared to ChIP-Chip data of CP190. The following ChIP-qPCR experiments after knock down of CP190 or of ZIPIC or Pita showed that CP190 binding is partially connected to ZIPIC and Pita binding. These findings point to a functional connection between CP190 and the analyzed ZAD proteins in the context of chromatin binding. Pita and ZIPIC are two new IBPs in *Drosophila* which provide further regulatory functions for insulation (Maksimenko et al. 2015).

Other factors involved in CP190 function are proteins of the SUMO cascade, as well as a SUMO protease, which were found in an RNAi screen in *Drosophila* S2-cells (Bohla et al. 2014). SUMOylation is a protein modification which has various functions. The role in insulation is discussed controversially (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Further analyses of other insulators by functional reporter assay showed a reduced insulator function after knock down of SUMO factors. A ChIP-Seq experiment was performed for CP190, dCTCF and FLAG-dSUMO with and without FLAG-dSUMO expression in S2-cells. Those analyses showed that the investigated factors co-localize and that CP190 binding is increased after expression of FLAG-His-dSUMO. These results were also confirmed by GEO-analysis. The accessibility of chromatin was weakly influenced by FLAG-dSUMO

expression, which was shown by histon H3-ChIP and FAIRE assay. However the overall status of the chromatin indicated a tendency to an increased openness of the chromatin. These results indicate that SUMOylation has no clearly defined function during insulation, chromatin binding and chromatin state, but leads to homeostasis by dynamical SUMOylation and de-SUMOylation of factors involved in the corresponding processes, like CP190 and Polycomb proteins (Gonzalez et al. 2014).

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	7
Abstract	9
Inhaltsverzeichnis	11
1. Einleitung	14
1.1. Isolatoren	17
1.1.1. Barriere-Funktion	17
1.1.2. Enhancer-Blockade	18
1.1.3. Isolation in <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.2. CTCF (CCCTC-binding Factor)	20
1.2.1. Isolation durch CTCF.....	22
1.3. CP190 (Centrosomal Protein 190 kDa)	24
1.4. Potentielle Interaktionspartner von CP190	26
1.4.1. ZAD-Proteine als neue Isolator-bindende Proteine und Interaktionspartner von CP190	26
1.4.2. SUMOylierung als potentielle Modifikation von CP190 und anderen Isolator-bindenden Proteinen.....	28
1.5. Ziel dieser Arbeit	32
2. Material und Methoden	34
2.1. Material	34
2.1.1. Geräte	34
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	35
2.1.3. Chemikalien	36
2.1.4. Enzyme.....	38
2.1.5. Komplettsysteme	38
2.1.6. Größenstandards.....	39
2.1.7. Antibiotika.....	40
2.1.8. Bakterienstämme	40
2.1.9. Eukaryotische Zelllinien	41
2.1.10. Antikörper	42
2.1.11. Plasmide/Vektoren	43

2.1.12. Oligonucleotide (Primer).....	44
2.1.13. Software	49
2.2. Methoden	50
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)	50
2.2.2. Zellkultur	51
2.2.3. Arbeiten mit Proteinen	56
2.2.4. Arbeiten mit RNA/DNA	62
2.2.5. Assays zur experimentellen Erforschung von Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen.....	72
2.2.6. Bioinformatische Analysen	83
3. Ergebnisse	86
3.1. Die ZAD-Proteine Pita und ZIPIC kolokalisieren auf der DNA an gemeinsamen Bindestellen mit CP190	86
3.1.1. Pita- und ZIPIC- <i>knock down</i> und die jeweiligen Antikörper waren spezifisch für die zu untersuchenden Faktoren.....	87
3.1.2. Genomweite Untersuchung von CP190-, Pita- und ZIPIC-Bindung an Chromatin	91
3.1.3. CP190, Pita und ZIPIC wiesen deutliche Übereinstimmung bei der genomweiten Bindung auf	91
3.1.4. Die Bindemotive von CP190 und Pita stimmten miteinander überein, während ZIPIC ein eigenes Motiv besaß. Die Proteine banden unabhängig voneinander an Chromatin.	93
3.1.5. Pita und ZIPIC zeigten ein ähnliches Bindeverhalten wie Isolator-bindende Proteine, die von CP190 gebunden werden.....	96
3.1.6. Die Validierung der ChIP-Seq-Resultate mittels ChIP-qPCR zeigte eine Anreicherung der Proteine an den spezifischen Bindestellen	98
3.2. Untersuchung des durch SUMOylierung vermittelten Einflusses auf die CP190 und dCTCF vermittelte Isolation in <i>Drosophila melanogaster</i>	104
3.2.1. SUMOylierung hatte einen Einfluss auf die Fab8-Isolation in einem funktionellen Luziferase-Reporter-Assay in <i>Drosophila</i> S2-Zellen	104
3.2.2. Expression von FLAG-His-dSUMO in S2-Zellen als Werkzeug zur weiteren Analyse des Einflusses von SUMOylierung auf die Isolation in <i>Drosophila melanogaster</i>	108
3.2.3. CP190 zeigte eine potentielle SUMOylierung in der FLAG-IP SUMOylierter Proteinen nach FLAG-His-dSUMO-Expression	111
3.2.4. Untersuchung des Bindeverhalten von CP190 und dCTCF in Abhängigkeit von SUMOylierung in <i>Drosophila</i> S2-Zellen	113
3.2.5. Die allgemeine Zugänglichkeit des Chromatins wurde durch SUMOylierung nur leicht verändert.....	125

4. Diskussion	130
4.1. Pita und ZIPIC sind neue Isolator-bindende Proteine, die mit CP190 interagieren	130
4.1.1. Pita und ZIPIC kolokalisieren mit CP190 auf der DNA und beeinflussen dessen Bindung	130
4.1.2. Pita und ZIPIC weisen Konsensus-abhängige Bindung auf.....	132
4.1.3. ZIPIC und Pita binden auch zusammen mit anderen Isolator-bindenden Proteinen....	132
4.1.4. ZIPIC und Pita binden in Promotorbereichen aktiver Gene	133
4.1.5. Fazit.....	134
4.2. Einfluss von SUMOylierung auf die durch CP190- und dCTCF-vermittelte Isolation	135
4.2.1. Die Enhancer-Blockade dCTCF und CP190 gebundener Isolatoren wird durch SUMOylierung beeinflusst.....	135
4.2.2. SUMOylierung führt zu verstärkter CP190-Bindung an spezifischen Bindestellen....	137
4.2.3. Der Einfluss der SUMOylierung auf den Chromatinstatus.....	140
4.2.4. Fazit.....	142
5. Anhang	144
6. Literatur	159
Danksagung	171
Selbstständigkeitserklärung	173

1. Einleitung

In Eukaryonten findet sich eine Vielfalt an verschiedenen Zelltypen, deren Differenzierung in spezialisierte Zelltypen vor dem Hintergrund der identischen genetischen Ausstattung, vor allem auf eine komplexe Regulation der Genexpression zurückzuführen ist (Geyer and Clark 2002). Dabei spielt die direkte Regulation der Genexpression durch *cis*-regulatorische Sequenzen der DNA, wie Enhancer, Silencer und Promotoren, sowie deren Bindung durch allgemeine und zelltypspezifische Transkriptionsfaktoren und die Transkriptionsmaschinerie der RNA-Polymerase II eine Rolle, aber auch die epigenetische Regulation der Expression.

Epigenetik definiert alle meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind (Egger et al. 2004). Diese Regulation kann durch direkte Modifikationen an der DNA geschehen, wie z.B. durch Methylierung von CpGs, oder aber durch Proteine, wie Histon-modifizierende Proteine und Remodelling-Faktoren, die die DNA binden und dadurch die Expression von bestimmten Genen beeinflussen. Dies bedingt auch den Umstand, dass DNA im Zellkern nicht „nackt“, sondern mit Proteinen verpackt, in der Organisationsform des Chromatins zu finden ist, welches in unterschiedlich kompakter Form vorliegen kann. Die Regulation des Verpackungszustandes ist dabei wichtig für die differenzielle Genexpression in verschiedenen Zelltypen und Geweben. Hierbei nehmen neben DNA-Metylierung, aber auch Modifikationen der Histone und deren Dichte auf der DNA Einfluss auf die Zugänglichkeit der DNA für die Transkription (Bàrtovà et al. 2008).

Bei der Kompaktierung der DNA werden 145 bp der DNA um ein Oktamer aus verschiedenen Histonen gewickelt. Dabei unterscheidet man generell zwischen vier Histontypen, die dieses Oktamer bilden. Die Histone H3 und H4 bilden ein Tetramer, während die Histone H2A und H2B zwei Heterodimere bilden, die sich mit dem H3H4-Tetramer zum Oktamer verbinden. Diese Protein-DNA-Struktur nennt sich Nukleosom (Kamakaka and Biggins 2002) (Abbildung 1).

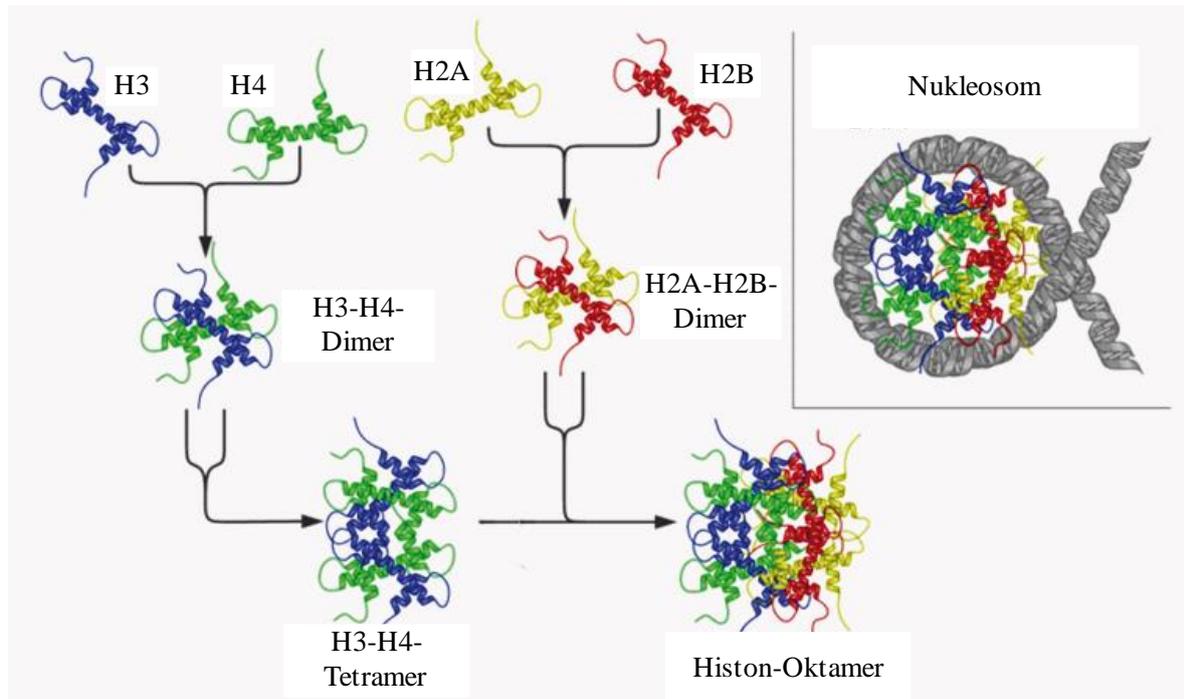


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Nukleosoms. Histone H3 (blau) und H4 (grün) bilden ein Tetramer, das sich mit zwei Dimeren aus H2A (gelb) und H2B (rot) zum Histon-Oktamer verbindet, um welches dann die DNA (grau) gewunden wird. Die N-Termini der Histone ragen aus dem Nukleosom heraus (Richard Wheeler 2005; Nucleosome_structure.png).

Diese sind durch die sogenannte Linker-DNA miteinander verbunden, welche wiederum durch ein weiteres Histone H1 gebunden werden kann. Histone sind positiv geladen und binden die negativ geladene DNA. Histone können post-transkriptionell modifiziert werden, was vielfältige Konsequenzen haben kann. Die Veränderung der Ladung der Histone, durch Histone Modifikationen kann die Bindung zur DNA verstärken oder abschwächen. Häufig beobachtete und funktional mittlerweile detailliert beschriebene Modifikationen sind Methylierungen, Acetylierungen, sowie Phosphorylierung, aber auch Modifikationen durch kleine Proteine, wie SUMOylierung und Ubiquitinierung, sind möglich. Diese Modifikationen finden vor allem an den frei liegenden N-Termini der Histone statt, die aus dem Nukleosom heraus ragen (Bàrtovà et al. 2008, Eberharter and Becker 2002, Mersfelder and Parthun 2006, Weake and Workman 2008, Zhang Y. 2003). Diese Modifikationen können die DNA für Remodeling-Komplexe, aber auch Transkriptionsfaktoren oder Chromatin bindende Faktoren zugänglich machen. Doch das Aufwickeln der DNA-Doppelhelix auf die Histone, ist nur der erste Schritt von vielen komplexen Kompaktierungsschritten, die die DNA durchläuft, bis hin zum Metaphase Chromosom, welches bei der Zellteilung entsteht. Über 10^9 Basenpaare liegen dabei als Chromosomen vor. Die Nukleosomen liegen dabei als sogenannte Perlenschnur vor, die man auch als 10 nm

Faser bezeichnet. Anschließend wird diese zur Chromatinfaser, auf Grund ihrer Breite auch 30 nm-Faser genannt, verdrillt. Nun findet eine immer stärkere Kompaktierung, wahrscheinlich entlang eines Proteingerüsts, das zum Teil auch durch die nukleare Lamina gestellt wird, statt. Am Ende dieses Prozesses liegt die DNA als Chromatin (700 nm Breite) und schließlich als Chromosom vor (Hansen 2012) (1400nm Breite; Abbildung 2).

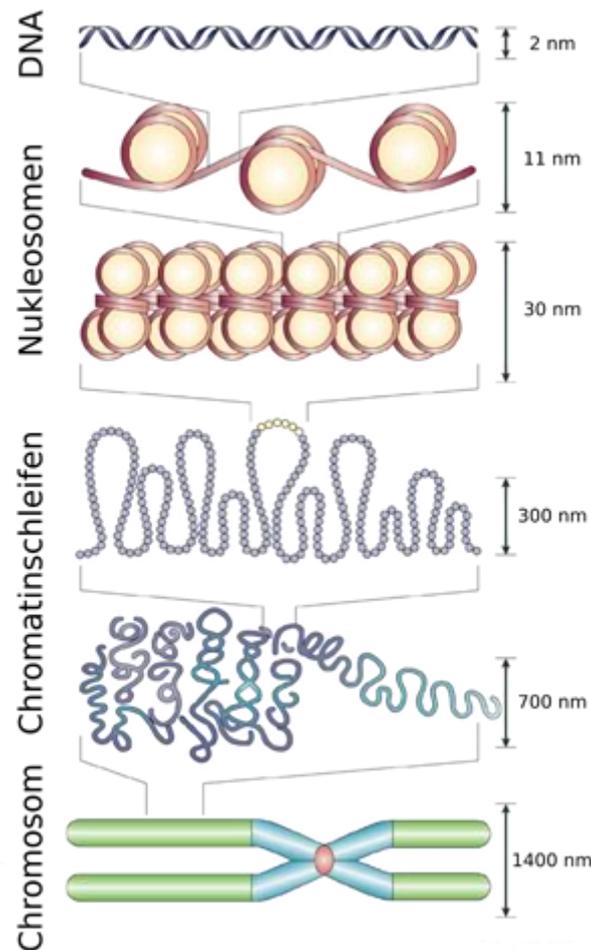


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kompaktierung der DNA, von der DNA-Doppelhelix (2 nm), über die Nukleosomenkette (11 nm) und Chromatinfaser/ 30 nm-Faser (30 nm), sowie des komplexer gefalteten Chromatins, in Form von Chromatinschleifen (300-700 nm), bis zum Chromosom (1400nm) (Schlüssel 2003).

Man kann prinzipiell zwei Chromatinzustände unterscheiden, wobei diese mittlerweile auf Grund ihrer jeweiligen Funktion, sowie dem regulatorischen und genetischen Inhalt noch weiter unterteilt werden können (Ernst and Kellis 2010, Ernst et al. 2011, Kharchenko et al. 2011). Das transkriptionell aktive Euchromatin, das eine weniger kompakte Verpackung der DNA und damit eine höhere Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie aufweist, steht dabei dem inaktiveren Heterochromatin, bei dem die DNA, durch die oben erwähnten Ladungsänderungen, stärker an die Histone gebunden ist und die Nukleosome dichter gepackt vorliegen, entgegen. In diesem Bereich des Chromatins findet keine Transkription statt. Auch

die Modifikationen der Nukleosome und der DNA-Kontext unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Chromatintypen. Das Euchromatin zeichnet sich durch Histon-Acetylierung und aktivierender Histon-Methylierung aus. Es besitzt im Wesentlichen aktive Gene, während das Heterochromatin generell hypoacetyliert ist und aus repetitiven Sequenzen besteht, wie sie auch am Zentrosom oder an den Telomeren des Chromosoms zu finden sind. Aber auch inaktiven Genen findet man innerhalb des Heterochromatin (Grewal and Elgin 2002). Man unterscheidet beim Heterochromatin außerdem fakultatives und konstitutives Heterochromatin, wobei ersteres die Möglichkeit hat, in Euchromatin umgewandelt zu werden und letzteres dauerhaft stillgelegt ist (Trojer and Reinberg 2007). Damit diese Organisation des Chromatins erhalten bleibt, werden Sequenzen auf der DNA, aber auch Proteine gebraucht, die diese aufrecht erhalten. Diese Elemente sind die Isolatoren, die im Weiteren besprochen werden.

1.1. Isolatoren

Um die straffe Organisation des Chromatins aufrecht zu erhalten und damit eine geregelte Transkription und Replikation zu ermöglichen, gibt es Elemente auf der DNA, die es ermöglichen gewisse Abschnitte des Chromatins funktional und strukturell zu isolieren. Diese Aufgabe übernehmen Isolatoren. Diese sind per Definition regulatorische Sequenzen, die verhindern, dass Chromatin- bzw. DNA-Abschnitte ungewollt miteinander interagieren.

Dabei unterscheidet man zwei Funktionen der Isolatoren, die Enhancer-Blockade so wie die Barriere-Funktion.

1.1.1. Barriere-Funktion

Damit Heterochromatin und Euchromatin stets getrennt bleiben, so dass das Heterochromatin nicht in das Euchromatin wandert und dieses somit auch still legt, oder wie seit kurzem bekannt, Euchromatin sich nicht zu weit ausbreitet, braucht man Isolatoren (Narendra et al. 2015). Diese Sequenzen befinden sich an den Grenzen des Heterochromatins, verhindern somit die Ausbreitung in das Euchromatin und grenzen dadurch funktional verschiedene Chromatinarten voneinander ab. Außerdem werden topologisch assoziierte Domänen (TADs) innerhalb des Nukleus durch diese Grenzelemente voneinander abgeschirmt (Dixon et al. 2012). Diese Funktion der Isolatoren nennt sich Barriere-Funktion. Wie wichtig die Aufrechterhaltung dieser funktionalen und topologischen Domänen ist, zeigt sich anhand der Positionseffekt-Variation (PEV) (Geyer and Clark 2002, Muller H. J. and Altenburg 1930). Dabei wird ein normalerweise aktives Gen in einen Heterochromatin-Kontext integriert, das dann durch das umliegende Heterochromatin-Milieu ebenfalls still gelegt wird.

Je enger die Gene in einem Genom beieinander liegen, desto wichtiger scheint die Erhaltung der Domänen zu sein, wie man anhand des kompakten Genoms von *Drosophila melanogaster* gut beobachten kann. Hier wurden die ersten Isolatoren *scs* und *scs'* des *hsp70*-Locus beschrieben, die in der Lage sind Genabschnitte zu isolieren und damit einen Positionseffekt verhindern können (Kellum and Schedl 1991).

1.1.2. Enhancer-Blockade

Auch innerhalb aktiven Chromatins spielen die Isolatoren eine wichtige Rolle bei der Genregulation, indem sie die Wirkung *cis*-regulatorischer Elemente, wie Enhancer und Silencer, beeinflussen. Enhancer können die Aktivität eines Promoters und damit die Transkription eines Gens verstärken, während Silencer negativ auf die Aktivität von Promotoren wirken. Sie wirken gerichtet auf Promotoren durch das Binden von verschiedenen Transkriptionfaktoren, wie zum Beispiel CTCF, an Promotor oder Enhancer. Isolatoren sind in der Lage die räumliche und zeitliche Interaktion zwischen Enhancer/Silencer und Promotoren zu regulieren. Sie können Enhancer bzw. Silencer von Promotoren abschirmen und stellen somit sicher, dass keine unspezifischen Enhancer-Promotor-Kontakte zustande kommen. Sie haben somit auch Einfluss auf die Genaktivität umliegender Gene. Bei dieser Funktion der Isolatoren spricht man von der Enhancer-Blockade (Geyer and Clark 2002, Sun and Elgin 1999) (Abbildung 3).

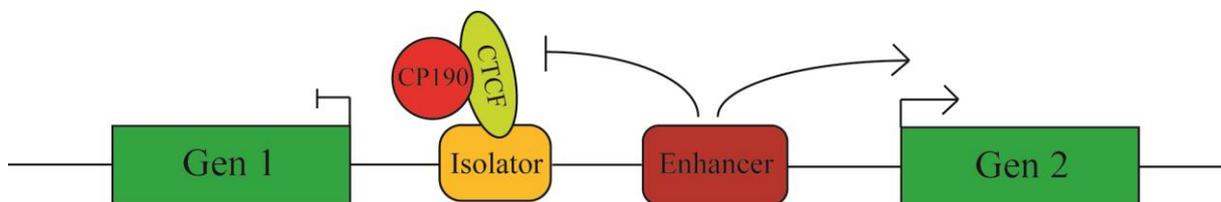


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Enhancer-Blockade. Gen 1 (grün) wird nicht durch den Enhancer (rot) aktiviert, da ein Isolator (gelb), mit den entsprechenden Isolatorbindeproteinen und Kofaktoren (CTCF und CP190), die Enhancer-Promoter-Interaktion blockiert. Gen 2 (grün) wird durch den Enhancer ungehindert aktiviert. Transkription wird durch einen schwarzen, eckigen Pfeil dargestellt. Interaktion durch einen gebogenen, schwarzen Pfeil dargestellt. Ein Strich an Stelle des Pfeils bedeutet keine Interaktion bzw. Transkription.

Dabei unterscheidet man zwei Modelle zur Enhancer-Blockade. Das erste Modell, auch *decoy-model* genannt, beruht auf dem Täuschungsprinzip. Hierbei geht man davon aus, dass der Isolator direkt mit dem Enhancer und/oder dem Promoter interagiert und diese damit von einer Interaktion mit dem jeweils anderen Element ab hält (Raab and Kamakaka 2010). Ein anderes Model bezieht sich auf die Interaktion zwischen Isolatoren, wobei sich Chromatin-Schleifen ausbilden. Dieser Vorgang wird auch als *Looping* bezeichnet und führt dazu, dass Promotoren und Enhancer/Silencer räumlich getrennt oder zusammen gebracht werden (Bell

et al. 1999, Yusufzai and Felsenfeld 2004, Yusufzai et al. 2004). Mittlerweile gibt es viele Studien, die das Modell des *Loopings* als Grundlage für die Enhancer-Blockade bestätigen (DeMare et al. 2013, Holwerda and de Laat 2013, Phillips-Cremins Jennifer E and Corces 2013, Phillips-Cremins J. E. et al. 2013, Wendt et al. 2008). Es wird diskutiert, dass das *Looping* sogar dazu führen könnte, dass mehrere Isolatoren sich in Gruppen zusammen finden und somit funktionale Zentren für Transkription und Replikation im Nukleus räumlich organisieren. Diese Ansammlungen von Isolatoren können mikroskopisch als *Nuclear-Speckles* detektiert werden und werden auch als *Insulator-Bodies* bezeichnet (Gdula and Corces 1996, Gerasimova and Corces 1998, Gerasimova et al. 2000). Allerdings wird die These der *Insulator-Bodies* in der Literatur kontrovers diskutiert (Golovnin et al. 2008, Schoborg et al. 2013).

Isolatoren werden durch so genannte Isolator-bindende Proteine (IBP) gebunden. Diese vermitteln die Funktion des jeweiligen Isolators und können auch weitere Proteine bzw. Kofaktoren, die für eine epigenetische Regulation von Nöten sind, rekrutieren, wie z.B. in *trans*-aktive Remodelling-Komplexe, die DNA- oder Histonmodifikationen übertragen, aber auch die Nukleosome auf der DNA verschieben können. Zu diesen Remodelling-Komplexen zählen zum Beispiel der NURF-Komplex in *Drosophila* oder der SWI/SNF-Komplex in Hefe und Säugern (Bohla et al. 2014, Nie Z. et al. 2003, Whitehouse et al. 1999).

In dieser Arbeit wurden vor allem die Einflüsse dieser Isolator bindenden Proteine in *Drosophila melanogaster* untersucht, weshalb im Folgenden näher auf die untersuchten Isolatoren und Isolator-bindenden Proteine und deren Kofaktoren eingegangen werden soll.

1.1.3. Isolation in *Drosophila melanogaster*

Im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* gibt es bereits einige gut untersuchte Isolator-Sequenzen und Isolator-bindende Proteine.

Zu den am besten untersuchten Isolatoren zählen, neben den oben erwähnten *scs* und *scs'* Segmenten, auch der *Gypsy*-Isolator des *Gypsy*-Retrotransposons, das SF1-Element aus dem Antennapedia-Komplex und die Isolatoren *Miscadastral pigmentation (Mcp)*, *Frontabdominal-7 (Fab-7)* und *Frontabdominal-8 (Fab-8)* aus dem Bithorax-Komplex (Belozarov et al. 2003, Gdula et al. 1996, Hagstrom et al. 1996, Kellum and Schedl 1991, Moon et al. 2005, Udvardy et al. 1985). Isolatorensequenzen sind nicht in der Lage ihre Funktion aus zu üben, wenn sie nicht durch Isolator-bindende Proteine gebunden werden. In *Drosophila* existieren mindestens fünf dieser Isolator-bindende Proteine: dCTCF (*CCCTC-binding Factor*) (Moon et al. 2005), BEAF-32 (*Boundary Element-associated Factor of*

32kDa) (Roy et al. 2007a, Roy et al. 2007b, Zhao et al. 1995), Zw5 (*Zeste-white 5*) (Gaszner et al. 1999), Su(Hw) (*Suppressor of Hairy wing*) (Geyer and Corces 1992) und GAF (*GAGA-binding Factor*) (Ohtsuki and Levine 1998). Allerdings sind mittlerweile auch weitere, neue Isolator-bindende Proteine in *Drosophila* entdeckt worden, wie zum Beispiel Ibf 1 und 2 (*Insulator-binding factor 1* und 2) (Cuartero et al. 2014). Zw5 und BEAF-32 sind mit der Isolation an den scs-Regionen des hsp70-Locus assoziiert, während Su(Hw) den *Gypsy*-Isolator bindet. Die Elemente Fab-7 und SF1 werden von GAF gebunden und führen so zur Isolation von Abschnitten innerhalb des Antennapedia- und des Bithorax-Komplexes. dCTCF dagegen bindet einige andere Isolator-Sequenzen innerhalb des Bithorax-Komplexes (Gaszner et al. 1999, Gerasimova et al. 1995, Hart et al. 1997, Holohan et al. 2007, Moon et al. 2005, Schweinsberg 2004).

Im Folgenden soll die Funktion von dCTCF und dessen Kofaktoren genauer beschrieben werde. Dabei liegt der Fokus vor allem auf CP190, da dieses Protein und seine Interaktionspartner in dieser Arbeit genauer betrachtet wurden.

1.2. CTCF (*CCCTC-binding Factor*)

Drosophila CTCF (dCTCF) ist ein 818 Aminosäuren großes Zinkfinger-Protein und migriert bei ca. 130 kDa im SDS-Gel, wobei die Migration im Gel je nach Modifikation an N- und C-Terminus variieren kann (Farrar et al. 2010, Kitchen and Schoenherr 2010, MacPherson et al. 2009, Torrano et al. 2006). Die insgesamt elf Zink-Finger kann es nutzen, um unterschiedliche Sequenzabschnitte des Konsensusmotives zu binden. Es ist somit in der Lage diverse Funktionen zu erfüllen. CTCF ist durch seine funktionale Vielfalt ein bedeutender Faktor für die Entwicklung und Diversität der Zellen und Organismen (Dubois-Chevalier et al. 2015, Franco et al. 2014, Gomez-Diaz and Corces 2014). Auch ist CTCF zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert. Es ist neben *Drosophila melanogaster*, auch in Vertebraten zu finden (Moon et al. 2005, Raab et al. 2012, Van Bortle and Corces 2012). Die Zinkfinger-Region unterscheidet sich kaum zwischen den verschiedenen Spezies und auch die über ChIP-Sequenzierung ermittelte Konsensussequenz von CTCF unterscheidet sich nur geringfügig zwischen *Drosophila* und Vertebraten (Abbildung 4). Zudem zeigten EMSA-Studien sehr ähnliches Bindeverhalten von dCTCF und hCTCF *in vitro* (Bartkuhn et al. 2009, Holohan et al. 2007).

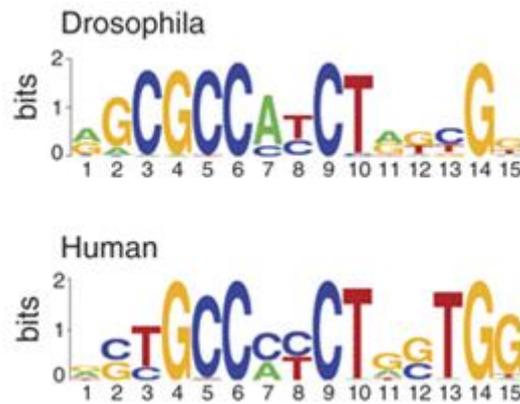


Abbildung 4: Vergleich der Konsensussequenz des Isolator-bindenden Proteins CTCF in *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* (human). Es werden die 15 Basen des Kern-Konsensus gezeigt. G = Guanin (gelb), C = Cytosin (blau), A = Adenin (grün), T = Thymin (rot). Stark konservierte Basen sind größer, als schwach konservierte Basen dargestellt. Das Weblogo des *Drosophila* CTCF-Konsensus wurde mittels MEME-Motievsuche der Top-500 ChIP-chip-Regionen im Vergleich zu denen des human CTCF-Konsensus ermittelt (Bartkuhn et al. 2009).

In Vertebraten gibt es neben CTCF nur einen weiteren Faktor, der erst kürzlich als Isolator-bindendes Protein identifiziert wurde: Znf143 (Zinkfingerprotein 143) (Heidari et al. 2014, Tommerup and Vissing 1995). In *Drosophila* gibt es, wie bereits erwähnt, wesentlich mehr IBPs. Dies könnte daran liegen, dass das Genom von *Drosophila* eine wesentlich höhere Gendichte aufweist, als das von Vertebraten. Daher ist es wahrscheinlich notwendig eine komplexere Regulation durch mehrere Isolatortypen und deren Bindeproteine zu erlangen.

Wie essentiell CTCF tatsächlich ist, kann man an seinen diversen Funktionen während der Entwicklung von Zellen, Geweben und Organismen erkennen. In *Drosophila melanogaster* ist dCTCF für eine korrekte pupale Entwicklung zum adulten Tier notwendig (Mohan et al. 2007). Aber auch in der Maus ist es essentiell für die Entwicklung des Embryos. Ein *knock out* von CTCF ist embryonal letal (Fedoriw et al. 2004, Herold et al. 2012, Splinter et al. 2006). Desweiteren ist CTCF als Tumorsuppressor für das Zellschicksal verantwortlich. Bindet es nicht korrekt, kann dieses zur Ausbildung von Krebs führen. Diese Beteiligung von CTCF an der Tumorentwicklung ist bereits für einige Krebsarten beschrieben, wie z.B. Nieren-, Brust- und Prostatakrebs (Filippova G. et al. 1998, Filippova G. et al. 2002).

Im Huhn wurde CTCF zunächst nur als repressiver Transkriptionsfaktor des Lysozymgenes entdeckt. Im humanen System wurde CTCF ebenfalls erst als Repressor der Transkription am Beispiel der c-Myc Gene beschrieben (Arnold et al. 2000, Awad et al. 1999, Baniahmad et al. 1990, Burcin et al. 1997, Lobanenkov et al. 1990, Lutz et al. 2000a, Lutz et al. 2000b, Pérez-Juste et al. 2000). Mittlerweile ist allerdings auch bekannt dass CTCF an der Aktivierung von Transkription beteiligt ist (Baniahmad et al. 1990, Klenova et al. 1993, Vostrov and Quitschke 1997, Yang et al. 1999). Außerdem ist mehrfach belegt, dass CTCF eine Funktion als

Isolatorprotein hat (Bell et al. 1999, Chao et al. 2002, Filippova G. N. et al. 2001, Hark et al. 2000, Kanduri et al. 2002).

CTCF ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das in allen Zelltypen, abgesehen von Ganglien und amakrinen Zellen der Säugetiertretina, zu finden ist (Boyle et al. 2011, Burcin et al. 1997). Auch in der Keimbahn beider Geschlechter konnte CTCF mittlerweile nachgewiesen werden (Sleutels et al. 2012). dCTCF ist in *Drosophila melanogaster* in allen Zelltypen exprimiert. Dabei ist es im Nukleus lokalisiert, wobei die Lokalisation im Kern je nach Zelltyp variiert (Ohlsson et al. 2001). Dies weist auf variable Funktionen von CTCF in den verschiedenen Zelltypen hin.

1.2.1. Isolation durch CTCF

CTCF ist auch an der Barriere-Funktion und der Enhancer-Blockade und dem damit verbundenen *Looping* beteiligt. In Vertebraten reguliert es durch das Binden an sogenannte *Boundary*-Elemente, die Ausbildung von funktionalen und topologischen Domänen und organisiert somit die Interaktionen des gesamten Genoms (Dixon et al. 2012). In *Drosophila* dagegen bindet dCTCF *Boundary*-Elemente, Interaktion zwischen Abschnitten des Genoms. Jedoch tut dCTCF dies in *Drosophila* nicht alleine, da noch andere Isolator-bindende Proteine vorhanden sind. Bei der Enhancer-Blockade ist CTCF in der Lage die Enhancer-Wirkung zellspezifisch zu steuern, indem es je nach Zelltyp andere Enhancer bzw. Silencer an der Interaktion mit Promotoren hindert. Im Zusammenhang mit dem *Looping* kann man sich vorstellen, dass in verschiedenen Zelltyp spezifische Schleifen ausgebildet werden, an denen immer andere Isolatoren beteiligt sind, die über CTCF interagieren. Dies ist in Vertebraten möglich, indem CTCF mit dem Cohesin-Komplex interagiert. Dieser ermöglicht es, dass Schleifen zwischen CTCF gebundenen Isolatoren ausgebildet werden (Hou et al. 2008, Phillips and Corces 2009, Wendt et al. 2008).

In *Drosophila melanogaster* befindet sich dCTCF häufig an Promotoren aktiver Gene in unmittelbarer Nähe der Transkriptionsstartstelle (TSS) (Bartkuhn et al. 2009). Oft flankiert es dabei Enhancer und Zielpromotoren, oder befindet sich zwischen diesen *cis*-regulatorischen Elementen, was ein deutlicher Hinweis auf CTCF als wichtigen Faktor für die Enhancer-Blockade ist. Im Vertebraten ist CTCF schon lange als Isolator bindendes Protein bekannt. Erste Hinweise auf seine Funktion in der Enhancer-Blockade lieferten Experimente am β -Globin-Lokus im Huhn. Dabei wurde fest gestellt, dass CTCF als Isolatorprotein an den Isolator-Sequenzen 5'HS4 und am 3'-Ende des Lokus bindet (Bell et al. 1999, Saitoh et al. 2000).

Aber auch bei der Regulation der Promoter-Enhancer-Interaktion innerhalb des Bithorax-Komplex, bei dem es sich um drei homeotisch Gene handelt (*Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abd-A*) und *abdominal B* (*Abd-B*)), die für die Ausbildung der Parasegmente des Abdomens und des posterioren Thorax verantwortlich sind, spielt dCTCF eine wichtige Rolle. Um eine zeitlich und räumlich korrekte Aktivierung der Gene zu erreichen, ist es notwendig, dass die Expression der Gene strikt reguliert wird. Dazu befinden sich acht Grenzelemente (*Boundary*) zwischen den *cis*-regulatorischen DNA-Sequenzen, wie Enhancer, Silencer und Promotoren, in diesem Bereich (Maeda and Karch 2007). ChIP-Sequenzierungs-Experimente haben gezeigt, dass sechs von insgesamt acht dieser Grenzelementen im Bithorax-Komplex von dCTCF gebunden werden (Bartkuhn et al. 2009) (Abbildung 5).

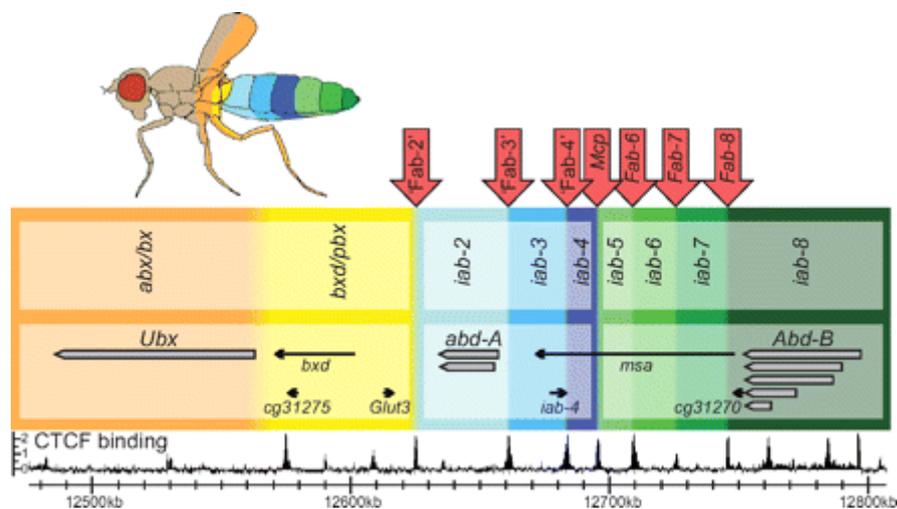


Abbildung 5: dCTCF bindet an Grenzen zwischen *cis*-regulatorischen Sequenzen des Bithorax-Komplex in *Drosophila melanogaster*. Abgebildet sind die Varianten der Strukturgene des Bithorax-Komplex *Ubx*, *abd-A* und *Abd-B* (graue Pfeile) und weitere Gene (*bxd*, *cg31275*, *Glut3*, *iab-4*, *msa* und *cg31270*), die zwischen diesen angeordnet sind (schwarze Pfeile). Farblich abgegrenzt sind die Bereiche des Hox-Gen-Clusters, die für die posterioren Thorakalsegmente (orange, gelb) und die Abdominalsegmente verantwortlich sind (blau, grün). Diese Einteilung kann in der schematischen Darstellung der adulten Form von *Drosophila* nachvollzogen werden. In schwarz dargestellt kann man die Bindung von CTCF innerhalb des Bithorax-Komplexes anhand von ChIP-Seq Daten sehen. Diese zeigen einen starken Überlapp mit den Grenzelementen (rote Pfeile) zwischen den *cis*-regulatorischen Sequenzen des Bithorax-Komplex (Herold et al. 2012).

Ein bekanntes Beispiel für die CTCF-vermittelte Enhancer-Blockade in Säugern findet an der *Imprinting Control Region* (*ICR*) des *H19/Igf2* Locus, die vier CTCF-Bindestellen besitzt (Bell and Felsenfeld 2000, Hark et al. 2000, Kanduri et al. 2000). Hierbei wurde auch festgestellt dass DNA-Methylierung, in diesem Fall im Zuge des *Imprinting*, das Binden von CTCF verhindern kann (Phillips and Corces 2009). Heute ist ebenfalls bekannt, dass der Cohesin-Komplex eine wichtige Rolle bei der CTCF vermittelten Enhancer-Blockade am *H19/Igf2* Locus, aber auch am oben beschriebenen β -Globin Locus spielt. Hier findet sich eine deutliche Überlappung auch bei der Bindung von CTCF und dem Cohesin-Komplex an die

DNA (Parelho et al. 2008, Rubio et al. 2008, Stedman et al. 2008, Wendt et al. 2008). Auch aktuellere Versuche belegen diese Cohesin-vermittelte Interaktion zwischen CTCF gebundenen Chromatinabschnitten (Guo et al. 2012).

Die Funktion, die Cohesin in Vertebraten übernimmt, könnte in *Drosophila* von CP190 übernommen, da es ähnlich wie Cohesin stets auch im Zusammenhang mit Isolator bindenden Proteinen, wie dCTCF, Su(Hw), BEAF, Pita, ZIPIC, sowie Ibf1 und 2 gefunden wird.

1.3. CP190 (*Centrosomal Protein 190kDa*)

CP190 ist einer von vielen Kofaktoren von Isolator-bindenden Proteinen. Solche Kofaktoren dienen dazu die Isolatorfunktion zu vermitteln. Die Isolatorproteine selbst sind dabei häufig nur die Plattform auf der die Kofaktoren binden können, um ihre Funktion aus zu üben. Kofaktoren können Remodelling-Komplexe oder Histon-modifizierende Faktoren sein, aber es kann sich auch Proteine handeln, die weitere Faktoren rekrutieren und binden, so wie auch CP190 oder Mod(mdg4), welcher oft im Zusammenhang mit CP190 gefunden wird (Capelson and Corces 2006, Gerasimova et al. 2007, Golovnin et al. 2012, Nègre et al. 2010, Pai et al. 2004).

CP190 ist ein 190 kDa großes Zinkfinger-Protein, das bei der Zellteilung, am Zentrosom der Chromosomen zu finden ist und dort eventuell eine ähnliche Funktion wie Cohesin übernimmt. Cohesin hält die Schwester-Chromatiden bis zur Zellteilung zusammen und bindet dabei entlang des Chromosoms. Es wäre möglich dass CP190 eine ähnliche Funktion inne hat.

Auch bei der Enhancer-Blockade spielt CP190 in *Drosophila melanogaster* eine essentielle Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass CP190 für die Brückenbildung und damit für die Interaktion von Isolator und Promotor verantwortlich ist (Liang et al. 2014). Diese Funktion von CP190 ähnelt auch der von Cohesin, welches durch Interaktion mit CTCF in Vertebraten, eine Brücke zwischen Isolatoren her stellt (Hou et al. 2008, Phillips and Corces 2009, Wendt et al. 2008). In ChIP-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass dCTCF-Bindestellen zu 2/3 mit denen von CP190 übereinstimmen (Bartkuhn et al. 2009, Bushey et al. 2009, Mohan et al. 2007) (Abbildung 6). Dies weist auf eine funktionelle Gemeinsamkeit von CP190 und dCTCF hin. Auch konnte gezeigt werden, dass CP190 nicht ohne dCTCF an die DNA binden kann (Mohan et al. 2007). Zudem haben Untersuchungen mittels FLAG-CoIP von FLAG-getagtem CP190 bzw. dCTCF in unserer Arbeitsgruppe ergeben, dass dCTCF und CP190 eine physische Interaktion aufweisen (Doktorarbeit Imke Panzer, 2011; Doktorarbeit Martin Herold, 2014) (Bohla et al. 2014). Aber auch an den Bindestellen der bereits

erwähnten anderen Isolator-bindenden Proteine ist CP190 zu finden. So zeigt es ein ähnliches Bindeverhalten wie Su(Hw) und BEAF-32. Ein konkretes Beispiel für den Einfluss von CP190 auf die Enhancer-Blockade ist die Su(Hw)-vermittelte Enhancer-Blockade am *Gypsy*-Isolator des zuvor schon erwähnten *Gypsy*-Retrotransposons (Pai et al. 2004). Hier ist CP190 neben Mod(mdg4) essentiell für die Vermittlung der Funktion des *Gypsy*-Isolators. Besonders interessant ist auch der *Fab8*-Isolator des Bithorax-Komplexes, der sich zwischen den regulatorischen Feldern *iab7* und *iab8* befindet und zur kontrollierten Expression des *Abd-B* Gens notwendig ist. Hier ist CP190 ebenfalls notwendig um Isolator-Funktion zu vermitteln. dCTCF alleine ist dazu nicht in der Lage (Gerasimova et al. 2007).

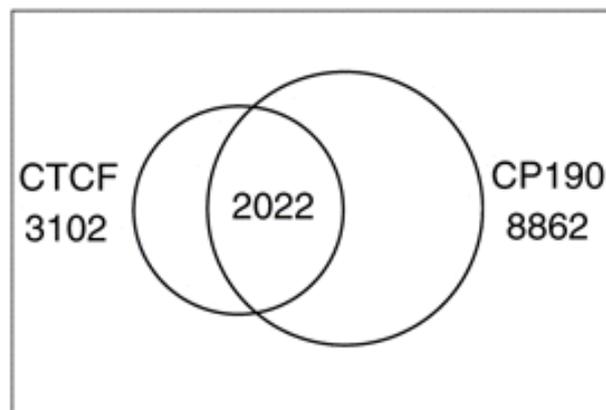


Abbildung 6: 2/3 der dCTCF-Bindestellen überlappen mit CP190-Bindestellen in *Drosophila melanogaster*. Venn-Diagramm der über ChIP-Seq für CP190 und dCTCF ermittelten Bindestellen in *Drosophila* S2-Zellen. Für dCTCF wurden 3102 Bindestellen genomweit ermittelt, für CP190 8862. Davon teilen CTCF und CP190 insgesamt 2022 Bindestellen (Bartkuhn et al. 2009).

In aktuellen Publikationen wurden, wie bereits oben erwähnt, weitere Isolatorproteine identifiziert, die zur Rekrutierung von CP190 führen und die dieses für ihre Funktion als Isolatorprotein benötigen. Diese sind Ibf 1 und 2 (*Insulator-binding factor 1* und 2) (Cuartero et al. 2014). Wahrscheinlich gibt es neben CP190 auch weitere Faktoren, die an der Ausprägung der dCTCF-vermittelten Isolation beteiligt sind, aber auch Proteine die mit CP190 interagieren um die Isolation zu vermitteln.

Diese Arbeit beruht im Wesentlichen auf einem RNAi-Screen in *Drosophila* S2-Zellen, der auf einem funktionellen Luziferase-Reporter-Assay basiert ist. Dieser Screen konnte weitere Faktoren identifizieren, die an der Isolation durch dCTCF und CP190 beteiligt sind. Dabei konnten bereits die beiden Remodelling- bzw. Transkriptions-Regulations-Komplexe NuRF (*Nucleosom Remodelling Factor*) und dREAM (*dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B*) identifiziert und verifiziert werden (Bohla et al. 2014). Proteine der

SUMOylierungs-Kaskade zeigten dabei auch einen Effekt auf die Enhancer-Blockade am Fab8 Isolator.

Außerdem wurden durch Yeast-Two-Hybrid-Screen und Massenspektrometrie identifizierte potentielle Co-Faktoren von dCTCF und CP190, in dieser Arbeit auf ihre Kolo-kalisation mit diesen untersucht. Bei den *in vitro* identifizierten Kofaktoren handelt es sich um die ZAD (*Zinkfinger-associated domain*)-Proteine Pita, cg7928 (jetzt ZIPIC) und cg30020 (Maksimenko et al. 2015).

1.4. Potentielle Interaktionspartner von CP190

1.4.1. ZAD-Proteine als neue Isolator-bindende Proteine und Interaktionspartner von CP190

CP190 hat, wie bereits oben erwähnt, eine wichtige Rolle in der Genregulation und ist an der Isolation beteiligt (Heseding et al. 2016, Korenjak et al. 2014). Auch aktuelle Forschungsergebnisse bestätigen die Rolle von CP190: Es wurde gezeigt das CP190 für die Brückenbildung und damit für die Interaktion von Isolator und Promotor verantwortlich ist (Liang et al. 2014). Diese und die Tatsache das CP190 mit drei von fünf beschriebenen Isolatorproteinen in *Drosophila* interagiert, deutet darauf hin das CP190 eine globale Rolle bei der Isolation und der Genregulation spielt. Wie bereits erwähnt, wurden erst vor kurzem zwei weitere Isolatorproteine entdeckt, die in der Lage sind CP190 zu rekrutieren. Bei diesen handelt es sich um Ibf1 und Ibf2 (*Insulator-binding Faktor 1 und 2*) (Cuartero et al. 2014). Aber es ist wahrscheinlich, dass es noch weitere Isolator-bindende Proteine mit dieser Eigenschaft gibt.

Hier sind zum Beispiel die Proteine der ZAD (Zinkfinger-assoziierte Domäne)-Familie zu nennen. Diese Proteine haben einige C2H2-Typ Zinkfinger, ebenso wie Zinkfinger Proteine (ZFP), zu denen auch dCTCF und CP190 gehören. Diese werden zur DNA-Bindung benötigt. Die ZAD-Proteine besitzen auch die für diese Protein-Familie übliche ZAD-Domäne, die wahrscheinlich dazu dient, die Bindung von Zinkionen zu koordinieren (Chung et al. 2007, Chung et al. 2002). ZAD-Proteine sind typisch für Dipteren, wie *Drosophila melanogaster* und machen dort etwa 10 % der Transkriptionsfaktoren aus (Benson et al. 2009). Die ZAD-Familie entspricht in Funktion und Vorkommen innerhalb des Genoms der KRAB-Familie in Mammaliern (Chung et al. 2007, Hamilton et al. 2003). Allerdings sind sie ZAD-Proteine nicht direkt mit diesen verwandt, sondern wahrscheinlich evolutive noch sehr jung, so dass man von einer Koevolution ausgehen kann. Wahrscheinlich sind die ZAD-Proteine eher aus den ZFPs entstanden. Zu den Mitgliedern der ZAD-Familie zählen auch Pita, cg7928 (jetzt

ZIPIC) und cg30020. Mittels Yeast-Two-Hybrid-Screen und durch Massenspektrometrie wurden diese als Interaktionspartner von CP190 und dCTCF identifiziert (Maksimenko et al. 2015).

Über die beiden ZAD-Proteine, ZIPIC und cg30020, ist weniger bekannt. Für ZIPIC wurde in einer allgemeinen Studie über ZADs jedoch bereits festgestellt, dass es an Prozessen der Chromatin-Bildung und -Dynamik beteiligt sein könnte, zu diesen zähen Nukleosomen-Assemblierung und -Remodelling (Krystel and Ayyanathan 2013).

Pita ist, von den drei erwähnten ZAD-Proteinen, der am besten beschriebene Faktor. Es wurde bereits gezeigt, dass es eine Rolle als TF übernimmt und wichtig für die Regulation von Entwicklungsprozessen ist, wie z.B. den der Keimbahnentwicklung (Laundrie et al. 2003). Auch ist bekannt das es für die Koordination des Zellzyklus von Bedeutung ist und damit an der Regulation der Replikation der DNA und am Wachstum der Zellen beteiligt ist (Page et al. 2005). Es wäre möglich, dass es eine Funktion bei der Isolation in *Drosophila* einnimmt, da es mit CP190 und dCTCF in der Immunpräzipitation kopräzipitiert und damit direkt mit diesen *in vivo* interagiert.

Es wäre vorstellbar, dass CP190, dass nicht ohne Unterstützung anderer Isolator-bindender Proteine an die DNA binden kann, durch Pita, aber auch ZIPIC (cg7928) und cg30020, zu Isolatoren rekrutiert wird, wie im Model dargestellt (Abbildung 7). Dabei könnten sie auch Einfluss auf die Isolation und damit die Genexpression haben.

In dieser Arbeit wurde die Bindung von Pita, ZIPIC und zum Teil auch von cg30020, genomweit analysiert und ihr Einfluss auf die Bindung von CP190 an Chromatin untersucht.

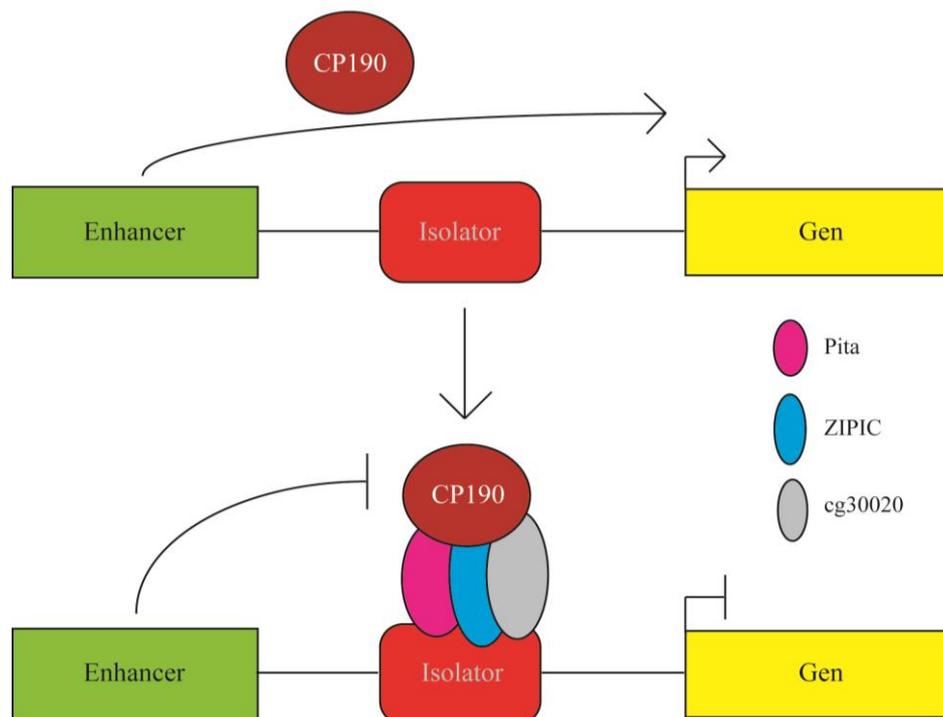


Abbildung 7: Modell der eventuellen Funktion der ZAD-Proteine Pita, ZIPIC (cg7928) und cg30020 bei der Interaktion mit CP190. CP190 bindet nicht ohne andere Isolator-bindende Proteine an die DNA und ist somit auch nicht in der Lage Isolation zu vermitteln (oben). Die ZAD-Proteine Pita, ZIPIC und cg30020 könnten die Funktion von Isolator-bindenden Proteinen übernehmen und CP190 durch physikalische Interaktion zur DNA rekrutieren (unten). Dies könnte, wie in diesem Model dargestellt, Einfluss auf die Enhancer Blockade, aber auch auf die Barriere Funktion von Isolatoren haben.

1.4.2. SUMOylierung als potentielle Modifikation von CP190 und anderen Isolator-bindenden Proteinen

SUMOylierung ist eine Protein-Modifikation, ähnlich der Ubiquitinierung, bei der das kleine Protein auf ein Zielprotein übertragen wird. Viele verschiedene Proteine in der Zelle können SUMOyliert werden. Dazu müssen die Proteine ein oder mehrere SUMO-Motive besitzen. Das übliche Konsensus-Motiv für SUMOylierung lautet Ψ -K-x-D/E, wobei Ψ einer hydrophoben Aminosäure entspricht. K bedeutet, entsprechend des genetischen Codes, Lysin. x entspricht einer beliebigen Aminosäure und D bzw. E sind Symbole für die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Allerdings gibt es auch untypische Motive, die dem eigentlichen Konsensus nur ähneln (Hay 2005, Ren et al. 2009, Teng et al. 2012). SUMO-Proteine sind knapp 20 kDa große Proteine, die über die sogenannte SUMOylierungs-Kaskade als Modifikation an andere Proteine, die ein oder mehrere SUMO-Motive besitzen, kovalent angehängt werden können. Dabei wird zunächst der C-Terminus von SUMO durch eine spezifische Protease entfernt und SUMO somit in seine aktive Form überführt. Das SUMO-aktivierende Enzym, ein Heterodimer (Aos1/Uba2), bindet das aktive SUMO und überträgt es mittels Veresterung auf das SUMO-konjugierende Enzym (Ubc9 bzw. Iwr), mit

dessen Hilfe die SUMO-Ligase (PIAS) SUMO auf das Zielprotein übertragen kann. Durch die SUMO-Proteasen (verloren) kann SUMO von diesen wieder entfernt werden (Gareau and Lima 2010, Hay 2005, Mukhopadhyay and Dasso 2007). In Vertebraten gibt es drei SUMO Varianten, SUMO1, SUMO2 und SUMO3. SUMO2 und 3 sind dabei in der Lage Ketten zu bilden. Je nachdem wie lange die Kette ist bzw. ob eine Mono-SUMOylierung vorliegt, kann dies unterschiedlichen Einfluss auf die Funktion von SUMO haben (Matic et al. 2008). Im humanen System ist mittlerweile ein viertes SUMO-Molekül entdeckt worden, SUMO4, das strukturell SUMO2 und 3 ähnelt, aber hauptsächlich bei der Stressbewältigung der Zelle eine Rolle spielt (Wei et al. 2008). In *Drosophila* gibt es nur eine Variante von SUMO, Smt3 oder dSUMO. Dieses entspricht dem SUMO1 aus Vertebraten und kann damit keine Ketten bilden (Abbildung 8).

SUMOylierung übernimmt viele verschiedene Funktionen in Organismen, da es die Funktion einiger Proteine modifiziert und damit in die biologischen Prozesse eingreift, an denen diese beteiligt sind. SUMO ist, ähnlich wie Ubiquitin, an der Degradierung von Proteinen beteiligt. Zudem spielt es eine Rolle bei der Mitose und der damit verbundenen Segregation der Schwesterchromatiden (Azuma et al. 2003, Zhang Y. 2003). Auch bei dem Kerntransport von Proteinen ist es beteiligt, bei dem das Kernporen-Komplex-zugehörige Protein RanBP2 SUMOyliert wird (Mahajan et al. 1997). Desweiteren weiß man, dass SUMOylierung auch an der Apoptose und der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt ist (Gareau and Lima 2010, Hay 2005, Jackson and Durocher 2013, Sarge and Park-Sarge 2009, Wan et al. 2012). Es hat zudem eine Rolle bei der Immunreaktion in *Drosophila* durch die SUMOylierung von Dorsal (Bhaskar et al. 2002). Außerdem spielt SUMOylierung eine wichtige Rolle bei der Stressverarbeitung innerhalb der Zelle zum Beispiel bei Hypoxie-Stress und Hitzestress. In *Drosophila melanogaster* wird SUMOylierung als Folge von Hypoxie-Stress und Hitzestress induziert (Stielow et al. 2008). Außerdem ist bekannt, dass einige wichtige Faktoren, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind SUMOyliert werden, wie z.B. die Kofaktoren von Isolator-bindenden Proteine, CP190 und Mod(Mdg4), aber auch Transkriptionsfaktoren, wie Bicoid, Vestigal und Croucho, sowie Teile von Remodeling-Komplexen, wie Mi-2 (Capelson and Corces 2006, Nie M. et al. 2009, Stielow et al. 2008).

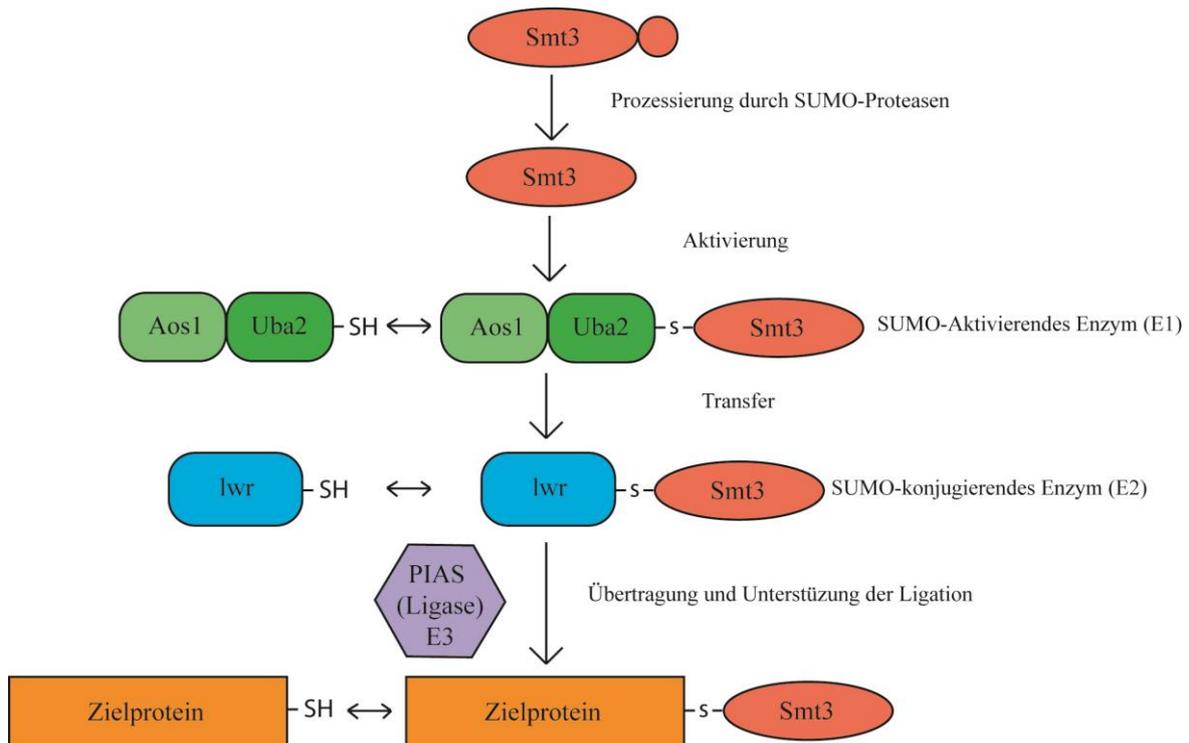


Abbildung 8: Modell der SUMOylierungs-Kaskade in *Drosophila melanogaster*. C-terminales Prozessieren von Smt3 (rot) durch SUMO-Proteasen. Aktivierung durch Transesterbindung an das Heterodimer (Aos1/Uba2) des SUMO-aktivierenden Enzyms (E1) (grün). Übertragung durch Transesterifizierung auf das SUMO-konjugierende Enzym (E2) (blau). E2 steuert Übertragung von SUMO auf das Zielprotein (gelb) und unterstützt die Ligation durch die SUMO-Ligase (violett) (PIAS, E3).

Die Funktion von SUMOylierung bei der Isolation in *Drosophila* wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen wurde postuliert, dass durch Hitzeshock induzierte SUMOylierung zur Reduktion von *Insulator-Bodies* in S2-Zellen, die hier mit *Speckles* gleich gesetzt werden, führt. Allerdings wurde hier auch beschrieben, dass der *knock down* von Smt3 zur De-Kondensation von *Insulator-Bodies*/CP190-*Speckles* führt, da Isolator-bindenden Proteinen bzw. ihrer Kofaktoren, wie zum Beispiel CP190 und Mod(mdg4) nicht mehr SUMOyliert werden. Zudem wurde auch beschrieben, dass die SUMOylierung keinerlei Effekt auf die Bindung der SUMOylierten Faktoren an Chromatin oder auf die Isolation bzw. Enhancer-Blockade habe (Golovin et al, 2012). Für den von Su(Hw)-gebundenen *Gypsy*-Isolator in *Drosophila* wurde beschrieben, dass SUMOylierung einen negativen Effekt auf die Enhancer-Blockade an diesem hat. Hierbei wirkte sich der *knock down* des SUMO-konjugierenden Enzyms (E2) Iwr in der Fliege positiv auf die Isolation am *Gypsy*-Isolator aus. Auch wurde in diesem Forschungsansatz beobachtet, dass CP190 und Mod(mdg4) *in vitro* und *in vivo* SUMOyliert werden. In Immunfärbungen von Polytän-Chromosomen wurde festgestellt, dass die SUMOylierung dieser Faktoren keinen Effekt auf deren Bindung hatte. Dabei wurde die These aufgestellt, dass sich die *Insulator-Bodies* durch SUMOylierung von,

an der Isolation beteiligten Proteinen, schlechter ausbilden können und es dadurch zu einer reduzierten Isolation kommt (Capelson and Corces 2006).

In weiteren Studien in *Drosophila* S2-Zellen konnte fest gestellt werden, dass SUMOylierung mit den Polycomb-Repressor-Komplexen kolokalisiert, der allgemein zur Repression durch die Kondensation von Chromatin führt. Die Proteine aus den Polycomb-Repressor-Komplexen, wie zum Beispiel E(z) und Polycomb, wurden dabei SUMOyliert. Dies führte zu einem Zerfall der Polycomb-Bodies. Die De-SUMOylierung durch die SUMO-Protease verloren (velo) hatte den gegenteiligen Effekt (Gonzalez et al. 2014).

In *Drosophila* wurde bisher nur beschrieben, dass Kofaktoren von Isolator-bindende Proteinen SUMOyliert werden, wie z.B. CP190 und Mod(Mdg4) (Capelson and Corces 2006). Bei Isolator-bindende Proteinen selbst konnte bisher keine SUMOylierung nachgewiesen werden. So existieren in *Drosophila* bisher keine Kenntnisse über die SUMOylierung von dCTCF und anderen Isolator-bindenden Proteinen, wie z.B. Su(Hw), welches in den beiden oben genannten Publikationen zur SUMOylierung im Zusammenhang mit Isolation, das untersuchte Isolator-bindenden Proteinen war (Capelson and Corces 2006).

Über CTCF ist aus dem Vertebraten-System bekannt, dass es durch SUMO1, SUMO2 und SUMO3, N- und C-terminal modifiziert wird und dass diese SUMOylierung zu Reduktion der Isolation durch dCTCF führt (Kitchen and Schoenherr 2010, MacPherson et al. 2009). In *Drosophila* könnte dies allerdings anderes aussehen, da es hier nur eine SUMO-Variante gibt. In dieser Arbeit lag der Fokus vor allem auf der Untersuchung der Folgen von SUMOylierung, auf die von dCTCF- und CP190-vermittelte Isolation in *Drosophila*. Dabei wäre es denkbar, dass SUMOylierung von Isolator-bindenden Proteinen die Isolation verringert, weil diese z.B. degradiert werden oder nicht mehr an die DNA binden können. Andererseits wäre es auch möglich, dass eine verstärkte SUMOylierung zu einer Verbesserung der Isolation führt, weil die Faktoren stabiler sind und/oder besser an die Zielsequenzen der DNA Binden (Abbildung 9, Modell).

Modell: Welche Rolle spielt SUMOylierung bei der Isolation?

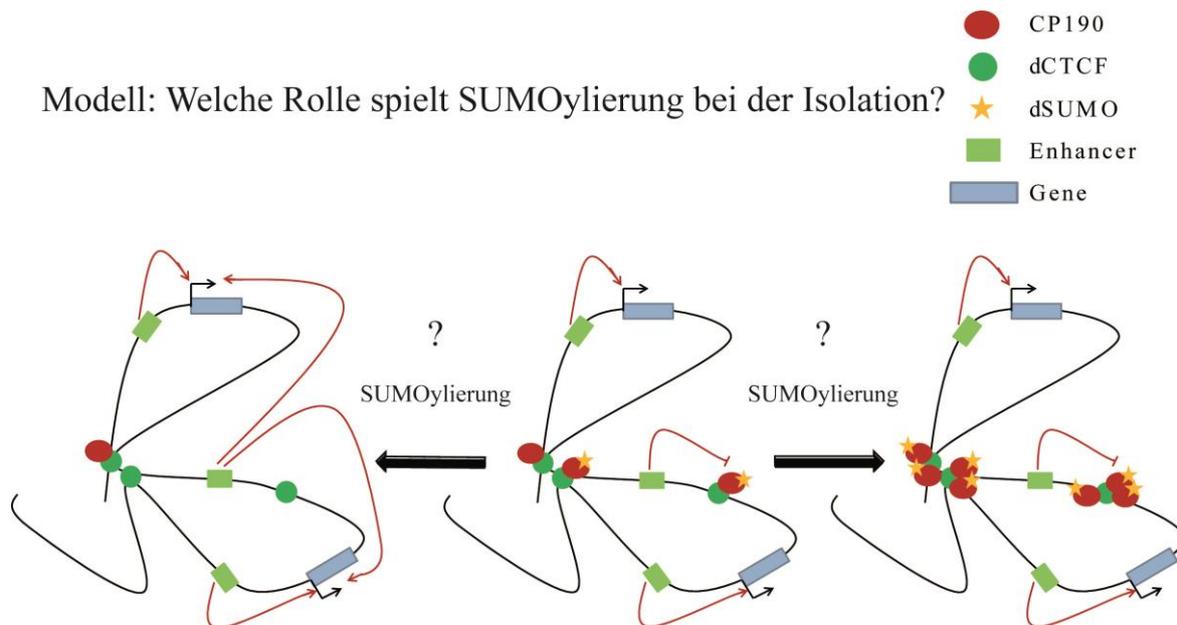


Abbildung 9: Modell zur Rolle der SUMOylierung (gelb) bei der Isolation in *Drosophila melanogaster* mit Fokus auf CP190 (rot) und dCTCF (grün). Die Isolation wird durch SUMOylierung von CP190 und evtl. dCTCF entweder verstärkt (rechts) oder abgeschwächt (links). Enhance bzw. Silencer (hellgrün) könnten dadurch verbesserten oder verschlechterten Zugang zu ihren Zielpromotoren haben und damit auch auf die Genexpression (Gene: blau). Dabei wäre es denkbar, dass SUMOylierung die Bindung der Isolation bindenden Proteine an die DNA beeinflusst.

1.5. Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, einen erweiterten Einblick in die Mechanismen der Isolation in *Drosophila melanogaster* zu erlangen, indem Faktoren die an der Isolation beteiligt sind, näher beleuchtet wurden. Dabei stand vor allem CP190 im Fokus der Untersuchungen. CP190 ist ein Isolationprotein, das an zahlreichen Isolationsprozessen zusammen mit verschiedensten IBPs beteiligt ist. Hier wurden vor allem Prozesse an Isolatoren, die es zusammen mit dCTCF bindet, untersucht. Um die dCTCF- und CP190-vermittelte Isolation besser zu verstehen, wurde nach potentiellen Interaktionspartnern von CP190 gesucht.

Eine Kategorie von Kandidaten für die Interaktion mit CP190 und dCTCF und damit auch potentielle Isolation-bindende Proteine bzw. Kofaktoren, sind die oben erwähnten ZAD-Proteine Pita, ZIPIC (früher cg7928) und cg30020. Diese wurden bereits in der Massenspektrometrie, über Co-Immunpräzipitation und über Yeast-Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von CP190 und teilweise auch von dCTCF identifiziert (Maksimenko et al. 2015). In dieser Arbeit konnte untersucht werden, ob CP190 mit den ZAD-Proteinen kolokalisiert und welchen Einfluss diese auf die Bindung von CP190 zu Chromatin haben. In einer genomweiten ChIP-Seq-Analyse von Pita, ZIPIC und cg30020 konnte die Kolokalisation mit CP190 und anderen Isolation-bindenden Proteinen untersucht werden, sowie eine Motiv-Analyse durchgeführt werden. Außerdem wurde der Einfluss der Bindung

auf die Expression umliegender Gene, durch CP190 und den ZAD-Proteinen betrachtet. Diese Resultate konnten durch *knock down*-Experimente von CP190, Pita und ZIPIC mittels ChIP-qPCR validiert werden (Maksimenko et al. 2015).

Außerdem diente der oben genannte funktionelle RNAi-Screen in S2-Zellen, als ein Anhaltspunkt für die Suche nach Interaktionspartnern für CP190. Der funktionelle Screen wurde zur Ermittlung der, an der Enhancer-Blockade des Fab8-Isolator, beteiligten Faktoren durchgeführt. Auch dCTCF und CP190 binden diesen Isolator. Neben einigen anderen Faktoren, waren vor allem die SUMO-assoziierten Faktoren auffällig (Bohla et al. 2014). Wie bereits erwähnt, wurde die Bedeutung der SUMOylierung für die Isolation in *Drosophila* bisher kontrovers diskutiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, welche Folgen die potentielle SUMOylierung von CP190 und dCTCF für die Isolation hat. Aber auch die Analyse der Auswirkungen von SUMOylierung auf die Eigenschaften, wie zum Beispiel die Bindung der Faktoren, konnte hier durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst das Fusionsprotein FLAG-His-dSUMO induzierbar und konstitutiv in S2-Zellen exprimiert. Mit diesen konnte ermittelt werden, ob dCTCF und CP190 in S2-Zellen potentiell SUMOyliert vorliegen. Hierfür wurden Immunpräzipitationen gegen FLAG-His-dSUMO durchgeführt. Außerdem war es möglich festzustellen, ob die SUMOylierung auch einen Einfluss auf die Chromatin-Bindung der Isolator-bindenden Faktoren und deren Kofaktoren hat. Dazu wurde ChIP-qPCR und ChIP-Seq für die FLAG-His-dSUMO überexprimierenden S2-Zellen durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde auch die generelle Zugänglichkeit vor und nach Expression von FLAG-His-dSUMO mittels FAIRE-Assay und H3-ChIP untersucht. Zudem wurden *knock down*-Experimente in konstitutiv FLAG-His-dSUMO überexprimierenden S2-Zellen genutzt, um den Einfluss von SUMOylierung auf die CP190-*Speckles (Insulator-Bodies)* zu untersuchen (Melanie Buxa, Doktorarbeit). Für die weitere funktionelle Analyse des Einflusses der SUMOylierung auf die Enhancer-Blockade, wurde das für den RNAi-Screen verwendete Luziferase-Reporter-System verwendet, wobei die zu untersuchenden Isolatoren zwischen den verwendeten Zelllinien variierten. Dies konnte Aufschluss darüber geben, ob die SUMOylierung auch zur Veränderung der Enhancer-Blockade anderer Isolatoren führt. Mittels RNAi von SUMOylierung-assoziierten Faktoren wurde der Einfluss von Faktoren der SUMO-Kaskade auf die Isolation in S2-Zellen, die das Luziferase-Reportersystem stabil integriert hatten, untersucht. Anschließend konnte ein Luziferase-Assay durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller/Produktname
Begasungsbrutschrank	Heracell 240, Heraeus
Computer	Acer, Fujitsu Siemens
Dokumentationssystem	VersaDoc (Bio-Rad)
Eismaschine	Scotsman
Elektrophorese-Apparatur	PeqLab, Bio Rad, Hoefer
Entwicklermaschine	Kodak M35 X-Omat Processor
Eisschrank	Bosch
Gefrierkühltruhe (-80°C)	Revco
Kühlschrank	Bosch
Luminometer	Bechthold
Magnetrührer	IKA-COMBIMAG-RCH,JK
Mikroskope	Telaval 31, Zeiss
	Axiophot, Zeiss
	Carl Zeis
Mikrowelle	Privileg
PCR-Cycler	GeneAmp 9600, Perkin Elmer
	Mastercycler Gradient, Eppendorf
Pipetten (2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Gillson, Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy, Integra Biosciences
<i>Real Time</i> PCR Cycler	CFX96 BioRad
Rotator	neoLab
Schüttler (Unimax 2010)	Heidolphe Instruments
Sonifier	250, Branson; Biorupter (Diagenode)
Spannungsgeräte	Consort, Shandon, Phase
Spektralphotometer	Ultraspec 3100 pro Amersham Biosciences
Tubesealer	Beckman
UV-Tisch	Bachofer (366nm), UVP (254nm)
Vakuumentrifuge (Speedvac)	Savant
Versa Doc™ Imaging System	BioRad
Videoanlage	Nikon N50 CCD Videokamera, Software Biometra
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
	IKA Vibrofix VF 1
Waage	PM3000, Mettler
	PRS 320-3, Kern
Wasserbad	Kötterman, Braun Melsungen AG

Wasserfilteranlage	Millipore
Western Blot-Apparatur	Bio Rad
Zellzähler (countess)	Invitrogen
Zentrifugen	Biofuge Pico, Heraeus
	Multifuge 3, Heraeus
	J2-MC, Beckman
	5417R; Eppendorf
	Sorvall@MC 12V, Du Pont

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgegenstand	Hersteller
6-Well Schalen	Greiner Bio One
24-Well Schalen	Nunc
96-Well Schale	Nunc
Deckgläser	AL
Einfriergefäße (2ml)	Nunc
Einmalküvetten	Sarstedt
Einwegkanülen (Ø 0,90 x 40mm)	Braun
Einwegspritzen (5ml, 50ml)	Greiner
Filme	BioMax VAR, Kodak
Filterspitzen	Ratiolab
Gewebekulturschalen (10ml, 20ml)	Greiner Bio One
Handschuhe (Nitril)	Roth
Immobilon™ P-Transfermembran	Millipore
Objektträger	Menzel-Gläser
Pasteurpipetten	Roth; Brand
Parafilm M®	American National Can
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Biozym Scientific
Petrischalen (10cm)	Greiner Bio One
Pipettenspitzen	Greiner Bio One
PVDF-Membran (Immobilon)	Millipore
Reaktionsgefäße (0,5ml)	PaqLab
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Real-Time-PCR Reaktionsgefäß (0,1ml)	Corbett Research
Röntgenfilme	Kodak BioMax XAR
Sterilfilter	Sartorius
Skalpelle	Braun
Whatman-3MM-Papier	Whatman-Papier
Zellkulturflaschen (groß und klein)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon; Beckmann

2.1.3. Chemikalien

Es wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (p.a.) verwendet.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck
Acetyl-CoA	Merck
Acetyl-CoA	Roth
Agar	Gibco
Agarose	IBI, Roth
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	Merck, SERVA
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bactopepton	Difco
Borsäure	Merck
Bradford Reagenz (Proteinbestimmung)	Roth
Bromphenolblau	Merck
BSA	Biomol, Fraktion V
Caesiumchlorid	Merck, Roth
Chloramphenicol	Roth
Chloroform	Merck
Coenzym A	PJK GmbH
Coomassie Brilliantblau	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Pharmacia
Drosophila Schneider-Medium	Gibco
dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	MBI Fermentas
EDTA-Natriumsalz	SERVA
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)	Roth
Ficoll™	Merck
Formaldehyd (37 %)	Calbiochem
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Glucose	Merck
Glycerol	Merck
Glycin	Merck
Hefeextrakt	Hefeextrakt Difco
HEPES (n-2-Hydroxyethylpiperazin)	Roth
IPTG	Appllichem
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck

Kalium-di-hydrogenphosphat-3-hydrat	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Leupeptin	Pharmacia, # US18413
Lithiumchlorid	Sigma
Manganchlorid	Merck
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	SERVA
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Merck
N'N'-Methylenbisacrylamid	Roth
Milchpulver, fettfrei	Super G Inc., USA
Natriumacetat	Merck
Natrium-Bicarbonat	SERVA
Natriumbutyrat	Sigma
Natriumcarbonat	Merck, Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natrium-di-hydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
NEM	Roth
Nicotinamid	Sigma
Nonidet P-40 (NP-40) substitute	SERVA
Pen/Strep-Lösung	Gibco
Phenol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
PIPES	Sigma, Roth
poly(dI-dC) – poly(dI-dC)	Amersham
Propidiumiodid	Sigma, #P-4170
Puromycin	Fluka
Saccharose	SERVA
Salzsäure	Merck
Sucrose	SERVA
SDS, ultra pure	Roth
Streptomycin	Sigma
Tetrazyklin	SERVA
Tris	Merck
Triton X-100	SERVA
Tween 20	Roth
X-Gal	Sigma
Xylencyanol	Sigma

2.1.4. Enzyme

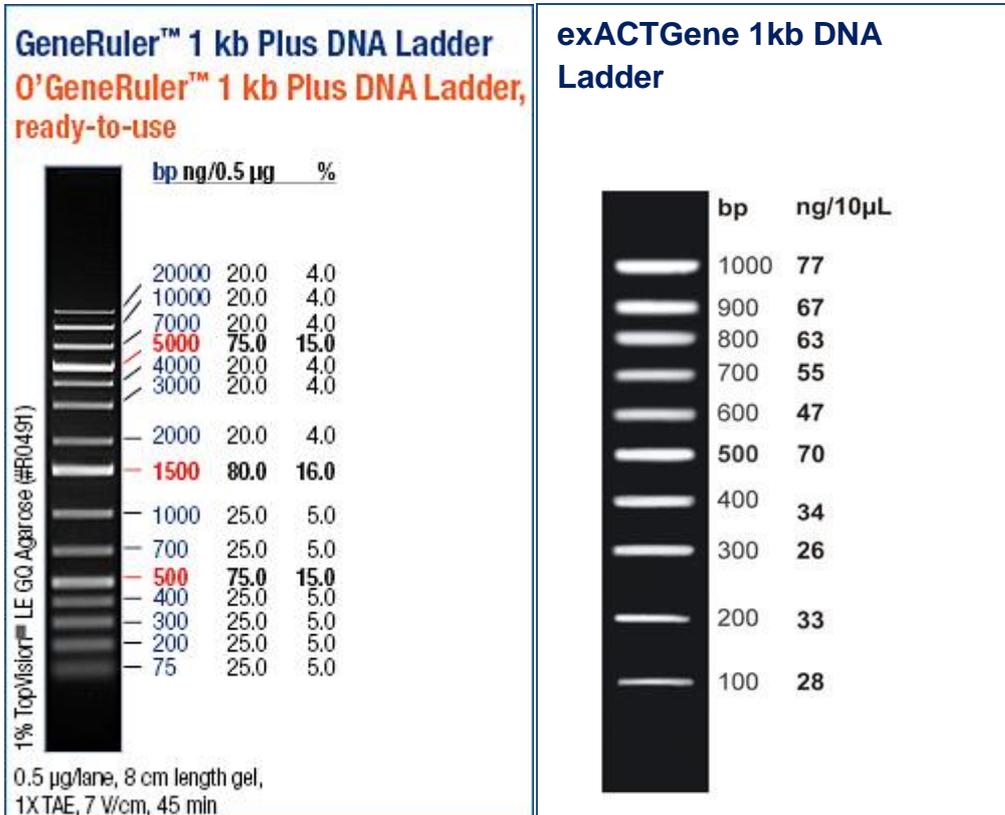
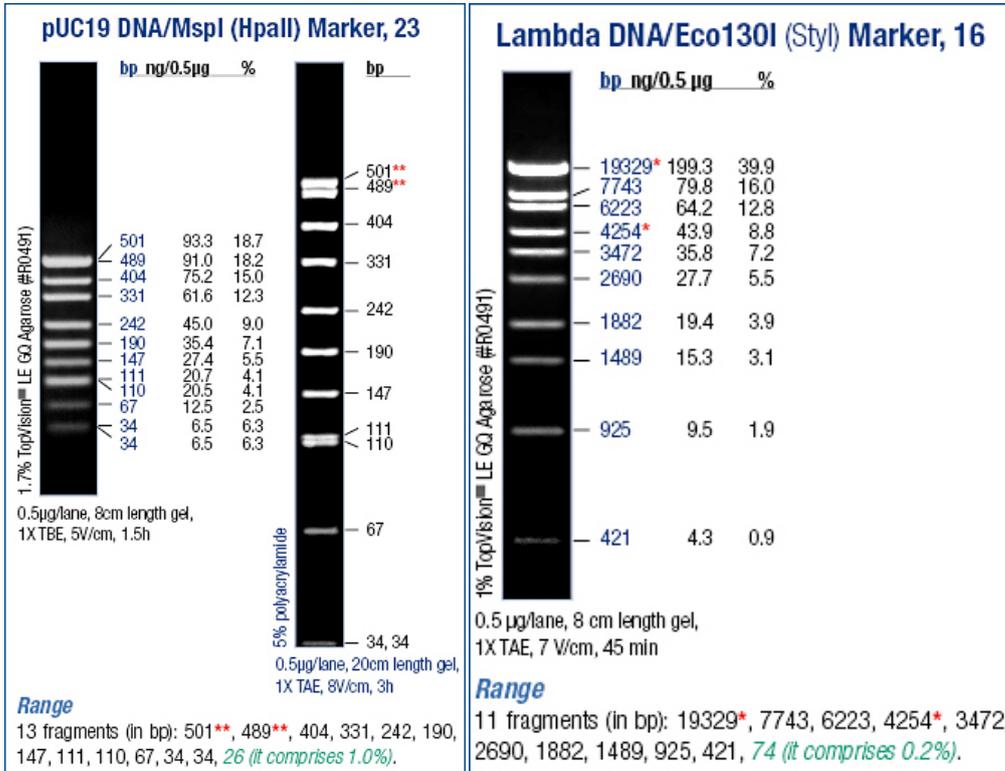
Enzym	Hersteller
Alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
DNaseI	Invitrogen, Sigma
Lysozym	Serva, Fluka
Micrococcal Nuclease	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -Polymerase	MBI Fermentas
Proteinase K	MBI Fermentas
Restriktionsendonuklease	Amersham, MBI Fermentas, New England Biolabs
RNase A (DNase-frei)	Sigma # 6513
T3-, T7-RNA Polymersase	Roche
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
4-PNK	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen
Trypsin	Merck

2.1.5. Komplettsysteme

Kit	Hersteller
GoTaq®Flexi DNA Polymerase	Promega
Megascript T7 IVT Kit	Ambion
Plasmid Midi Kit (100)	Quiagen
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen
Protein G Plus/Protein A Agarose	
Illustra GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
QIAquick® Gelextraction Kit	Quiagen

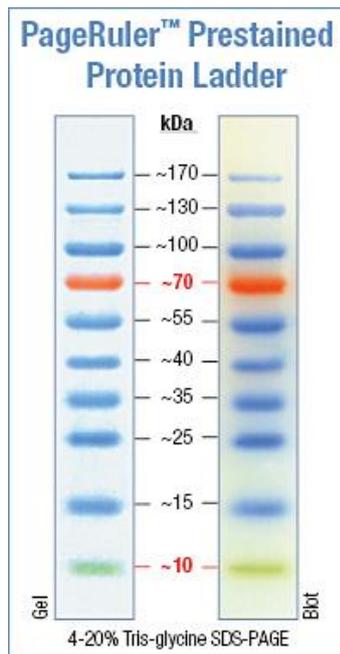
2.1.6. Größenstandards

DNA-Längenstandard



Produziert von Thermo Fisher.

Protein-Molekulargewichtsmarker



Produziert von Thermo Fisher.

2.1.7. Antibiotika

Antibiotika	Hersteller	Verwendete Konzentration
Ampicillin	Gibco	Stock: 100mg/ml in H ₂ O; End.: 100µg/ml
Doxycyclin	Gibco	Stock: 2µg/µl in H ₂ O; End.: 1µg/ml
Kanamycin	Invitrogen	Stock: 50mg/µl in H ₂ O; End.: 100µg/ml
Puromycin	Gibco	Stock: 2µg/µl in H ₂ O; End.: 0,2 bzw. 0,3µg/ml

2.1.8. Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich Labor-Sicherheitsstämme des Prokaryoten *Escherichia coli* K12 benutzt, die nicht zur Konjugation befähigt sind.

BL 21 (DE3) pLys s (Studier et al. 1990):

Dieser Stamm trägt den Genotyp F-*ompT gal(dmc)(lon)hdsSB(rB-mB-)* mit DE3, einem Prophagen, der das Isopropyl-D-thiogalactosid (IPTG) induzierbare T7-Polymerase-Gen trägt. Er besitzt weder lon- noch ompT-Proteasen. Weiterhin enthält er ein Plasmid, welches das T7-Lysozym und die Material 34 Chloramphenicol-Acetyltransferase codiert. Dieser Bakterienstamm wurde zur Amplifikation von Plasmiden verwendet.

DH5 α (Hanahan 1983):

Dieser Stamm besitzt den Genotyp F'/*endA1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*)U169 (*_80lacZAM15*). Dieser Bakterienstamm wurde zur Amplifikation von Plasmiden verwendet.

2.1.9. Eukaryotische Zelllinien

S2 Zellen (Schneider 1972) Embryonale *Drosophila melanogaster*-Zellen

Die Zellen werden in Schneiderzell-Medium mit 10 % FCS bei 23°C und ohne zusätzliche CO₂ Atmosphäre kultiviert.

S2 K6 HA-FLAG-CP190 (Diplomarbeit Benjamin Schmid, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pRM-HA-FLAG-CP190 unter Kontrolle eines CuSO₄ induzierbaren Promotors transfiziert. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2 K4 HA-FLAG-dCTCF (Doktorarbeit Imke Panzer, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pRM-HA-FLAG-dCTCF unter Kontrolle eines CuSO₄ induzierbaren Promotors transfiziert. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2F8OL Pool (Doktorarbeit Dorte Bohla, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pDC252-Fab8-OpIE-Luc stabil transfiziert und kann damit für Luciferase-Reporter-Assays verwendet werden. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2F8OF8L Pool (Doktorarbeit Dorte Bohla, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pDC254-Fab8-OpIE-Fab8-Luc stabil transfiziert und kann damit für Luciferase-Reporter-Assays verwendet werden. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2F8OF8bL Pool (Doktorarbeit Dorte Bohla, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pDC264-Fab8-OpIE-Fab8b-Luc stabil transfiziert und kann damit für Luciferase-Reporter-Assays verwendet werden. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2F8ObcdL Pool (Doktorarbeit Dorte Bohla, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pDC264-Fab8-OpIE-bcd-Luc stabil transfiziert und kann damit für Luciferase-Reporter-Assays verwendet werden. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2F8OF6L Pool (Doktorarbeit Dorte Bohla, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pDC264-Fab8-OpIE-Fab6-Luc stabil transfiziert und kann damit für Luciferase-Reporter-Assays verwendet werden. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2F8Ocg31472 Pool (Doktorarbeit Dorte Bohla, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pDC264-Fab8-OpIE-cg31472-Luc stabil transfiziert und kann damit für Luciferase-Reporter-Assays verwendet werden. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2 FLAG-His-dSUMO konstitutiv (Klone 15 und 17) (Masterarbeit Meike K. Abraham)

S2-Zellen wurden stabil mit pAW FLAG-His-dSUMO unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Aktin-Promotors transfiziert. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

S2 FLAG-His-dSUMO induzierbar (Klonpool) (Theresa Jox, diese Arbeit)

S2-Zellen wurden stabil mit pRM FLAG-His-dSUMO unter Kontrolle eines CuSO₄ induzierbaren Promotors transfiziert. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

2.1.10. Antikörper**Primärantikörper**

α -IgG (Polyclonal, verschiedene Spezies; verschiedene Anbieter):

ChIP: 2 μ g pro IP.

α -dCTCF N-terminal; α -dCTCF C-terminal (polyclonal-rabbit) (Moon et al., 2005):

Western: 1:6.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch; ChIP: 2 μ l pro IP.

α -CP190 (Monoclonal-mouse):

Zur Verfügung gestellt von H. Saumweber, Berlin (Überstände aus Hybridoma-Zellen).

Western: 1:2.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch; ChIP: 5 μ l pro IP.

α -CP190 (polyclonal-rat):

Zur Verfügung gestellt von P. Georgiev, Moskau, Russland (Maksimenko et al, 2014, Golovin et al, 2008). Western: 1:2.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch; ChIP: 2 μ l pro IP.

α -Pita (polyclonal-rabbit):

Zur Verfügung gestellt von P. Georgiev, Moskau, Russland.

Western: 1:500 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch; ChIP: 2 μ l pro IP.

α -cg7928 (polyclonal-rat):

Zur Verfügung gestellt von P. Georgiev, Moskau, Russland.

Western: 1:1.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch; ChIP: 10 μ l pro IP.

 α -Histon H3 (polyclonal-rabbit; Abcam, Ab-1791):

ChIP: 2 μ g pro ChIP.

 α -beta-Tubulin (mouse; DSHB Iowa, E7):

Western: 1:25.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch.

 α -FLAG M antibody (monoclonal-mouse) (Sigma, F1804)

Western: 1:2.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch; CoIP: 2 μ g pro IP; ChIP: 5 μ l pro IP.

Sekundärantikörper **α -mouse-IgG-HRP** (Santa Cruz, sc-2055)

Meerettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Maus-Immunglobuline.

Western: 1:25.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch.

 α -rabbit-IgG-HRP (GE Healthcare, NA934V):

Meerettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline.

Western: 1:25.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch.

 α -rat-IgG-HRP (GE Healthcare, NA935V):

Meerettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Ratten-Immunglobuline.

Western: 1:25.000 Verdünnung in PBS/0,1 % Tween/3 % Milch.

2.1.11. Plasmide/Vektoren

Konstrukte	(Bohla et al. 2014)	Hersteller
pDC252-Fab8-OpIE-Luc	pDC252-Luc/ F8OL	Dorte Bohla
pDC254-Fab8-OpIE-Fab8-Luc	pDC254-Luc/ F8OF8L	Dorte Bohla
pDC264-Fab8-OpIE-Fab8mut-Luc	F8OF8mutL	Dorte Bohla
pDC264-Fab8-OpIE-Fab8b-Luc	F8OF8bL	Dorte Bohla
pDC264-Fab8-OpIE-bcd-Luc	F8ObcdL	Dorte Bohla
pDC264-Fab8-OpIE-cg31472-Luc	F8Ocg31472L	Dorte Bohla
pDC264-Fab8-OpIE-Fab6 (1)-Luc	F8OF6(1)L	Dorte Bohla

Konstrukt		Hersteller
pRM- FLAG-His-dSUMO	FLAG-His-dSUMO ind.	Meike K. Abraham
pAW- FLAG-His-dSUMO	FLAG-His-dSUMO	Eugenia Wagner (Brehm)
pMT-Puromycin	pPuro	Clontech
pBluskript II SK+	pBSK II+	Stratagene
pEGFP	pEGFP	Jörg

2.1.12. Oligonucleotide (Primer)

Primer für RT-PCR

	Primer für Haushaltsgene (Vandesompele et al. 2002)	[Bp]
RPL13	forward → CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA reverse → TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	126
	RT-Primer	
CP190	forward → GTAAGACAATGCACGCCTTGATCG reverse → CATCAGATGGCCTCGGAAGCC	
dCTCF	forward → GCTAATTGCCTTGGGTTCTG reverse → AAGACTACGCCCAAGAAGCA	
Aos1	forward → TATGGACACCAGCGAGACAG reverse → TTGTCATCCAGCAGCTTCAC	204
Uba2	forward → GTCGTAGCAGATGCCTCACA reverse → CTGCTTGGTCTTCGTCTTCC	223
Su(var)2-10	forward → GGTGTCCGACTACACTCGT reverse → GCAGTCAGCATCCTCAGTCA	158
Pita	forward → GGAAGATTGGTGGAGTGGAC reverse → TCTGCGTGTACTGCGAGAAG	
ZIPIC	forward → GAGCAGACATCGCACTCGTA reverse → TCGTACTCCGGGTTGATAGG	
cg30020 (Exon 7/8)	forward → GACGACTTTGATGACGAGCA reverse → CTTGATCAGCAATCGCTTCA	
cg30020 (Exon 12/13)	forward → CCGTTTGCAATAAGGAGGAA reverse → CCAACTCTTCGGTGGTGAAG	

RNAi-Primer

Gen	DRSC Nr.	Gen Nr	[Bp]	Sequenzen
dCTCF			338	For →GCCCCGACATCAGTTCAAT Rev →GCACTTGAAGGATGGCTC
CP190	MRC014_E 10		510	For →TGCCGGGGACGATGATGACGATGAT Rev →CTCTTCTGGGCTGCGGCTGTATTTG
Aos1	DRSC29634	CG12276	255	For →TGGCAAAGTAGAACCCGAAG Rev →GTGAAGCTGCTGGATGACAA
Su(var) 2-10	DRSC07721	CG8068	255	For →CCATTTCCGTCTCTTCAGGA Rev →AGAAAGGCACCTCTTGGACG
lwr	DRSC27034	CG3018	255	For →CAGTCCTTCTCCTCGTCCAG Rev →GACTGCTAGCGGAAATCCAG
Uba2	DRSC11311	CG7528	255	For →TGCATTTGGTCTAAGTCGGG Rev →GGGCAAGCTGTTCAACAAGT
velo	DRSC27497	CG10107	255	For →CGGGGTTATGGTGGTGTAC Rev →GAGGACTTCGTCTGCCTCAC
smt3	DRSC03611	CG4494	255	For →GCCACCAGTCTGCTGCTG Rev →TGACGAAAAGAAGGGAGGTG
Pita	AMB19134	CG3941		For →TCTTGGTCGGATCATCTTGA Rev →GAGCATGCTGGAGGATATGG
ZIPIC	DRSC37499	CG7928	311	For →GTGCCTCCTCAATATTCCCA Rev →ACGTACCGAAGGACATTCACA
cg30020 (1)	DRSC06730	cg30020	382	For →GGGTCTTTCATACAACCTGCAAG Rev →AAGGACAAGGTAAGTCTCGGTGC
cg30020 (2)	BKN23181	cg30020	410	For →CGTGATAAATTCTGGCGCTT Rev →CATAGTTTCCGGCACAGGAT
cg30020 (3)	MRC017_A 05	cg30020	500	For →AAGCTATAAACTGCTGTCCACCACT Rev →TCAGATGCACATTGGACTTTTCCTC
cg30020 (4)	DRSC35059	cg30020	209	For →CTCTTCTATGCGGCAACCTC Rev →ATAAAGTCCTGCATGTGCC
T7 Seq				TAATACGACTCACTATAGGGAGA

ChIP-qPCR Primer (pita/cg7928 ChIP-Seq Validierung)

Pita only	[Bp]	Sequenz
cg31869	219	For →CATTGGTGTTGCTGTCGAGT Rev →ATTCCGACCAGAAAGCAGAG
cg34342 und Lkr	179	For → TTGAGCCTGTGGTGTCTCAG Rev →CAATCAAAAGCCCAAGATGG
ZIPIC only		
Rpl7	150	For →AGCAGGGTGTACCGATTTG Rev →CGGTTTCCTTTCACCTTGGA
scra	170	For →TTTCGTCGTGGTCAGTTGAG Rev →CACGTTGGCGATATTTGATG
CG30020 only		
cg17528 und cg14464	180	For →CGTGCTTCGATATCACCACA Rev →ATCGGCGTAAAATCATCGAC
Alle Faktoren		
cg1746	166	For →GAGCTGGGAAAAAGGACGAT Rev →CTATTGTGCAAGGGCAACCT
cg11905	249	For →GCTGTTCAAGTCCCCATACT Rev →CGGAGACCCACATCACTCTT
cg8776	163	For →TCCTCGAATGGGTTCACTTC Rev →TTCTGCTCGAAGCTTTCTGG
Negativ-Kontrollen		
cg12054	160	For →CAAATGCAGGGACACCTTTT Rev →GCAAACCCTTTTGACCTTGA

ChIP-qPCR Primer (Flag-SUMO ChIP-Seq Validierung)

site	[Bp]	Sequenz
CR43437	155	For →GGTCCTAATTTCCGTGCTGA Rev →CACACGACGCATTTTGACAT
cg1124	199	For →GGCGTTGAATTGAGTCTGGT Rev →TTCAATCCGCGATACTGTGA
snRNA:U5:38ABb	153	For →TCTGTCGGTTTTTGGTCTCC Rev →CACACGTCCTTTCCTGAAAAA
AbdB	183	For →GATTTAGACTCCGCCCTTT Rev →CGAGTGCACCCTCCTAGTCT
PNGase (Akt42)	169	For →TGAAGACTGGAGAGCGGACT Rev →GGTACAGCATTTGGCGGTAT
RpS9	170	For →CCACGGAAACTAAACGGTCA Rev →TCCGCAATGGGATTGTATTT
Sox102F (1)	214	For →TAAACTCAGCCCTGCATTCC Rev →AAATCAAAAAGAGCTTCCTAAAAA
Sox102F (2)	191	For →ATGCGCTACTCAAGCCTGTT Rev →GATTGCAGCGGTTTCGTAAAT
EcR	158	For →GCCTGAAACGGTTAAAGCAA Rev →CAACGGATGTGCGAGTAGAA
Negativ- Kontrollen		
sktl (insc)	163	For →GTGTTATCGTTTATCGCTTGC Rev →AACACTGCGCTTTGTTGCT
tej cg8589	160	For →CTGCCACCCACACTACACAC Rev →CGCCTAGGTAGCAATTCAAAA
Su(var)2-10	187	For →AGTCCGTGCAGGAACAAAAC Rev →ATGCTGTGTGTGTGGAGGAA
lwr	188	For →GATCATGCGCAGCTTGTAGA Rev →TGTCCGGCATTGCTATTACA

ChIP-qPCR Primer (Martin Herold)

site	[Bp]	Sequenz
Ubx14 new	183	For →CGAGTGCACCCTCCTAGTCT Rev →GATTTAGACTCCGCCCTTT
Fab8 new (UBX-65)	317	For →CGAACCATTGAAAGTTATCGAA Rev →CCTACGGCATT TTTCTGCTC
Fab8 5'ctrl	206	For →CGACGCTTTCAATTCGTTTGTTTT Rev →TTTGGATATCACGGTGCTTTGGAT
CG31472 2	141	For →CATCGCCACCTATTGAGGAT Rev →CGTGCGCAAGTAGCAATG
Sbr CTS	92	For →GCCATCTAGCGCCAGTACAT Rev →GTCGCCAACAGGAAACTGAC
Hml 7'Su(Hw)	225	For →ATTCGTGGCTTCTGCTGACT Rev →TGCGTGATTTAGGTGCTCTG
Hml 5'CTS	210	For →TGCACTGCTTGAACCGATAA Rev →TAGCCCCCTCTGCTGATATG
Hml 5'-6'ctrl	99	For →GTGCAGTTTGCCCATATCAA Rev →ATTTTGCATCTTTCGCCATC
cg17681 5'GAF	128	For →GTGGGACAGCTGACGAGAAT Rev →TGATCCATCCATCGCAAGTA

2.1.13. Software

Programm	Hersteller
Excel 2007	Microsoft
GATC Viewer	GATC Biotech
i-control	Tecan
KAPPA Image Base	
Oligotech	Oligo Ect. Inc.
Photoshop 7.0	Adobe
Power Point 2007	Microsoft
QuantityOne	BioRad
DocMedAnalys	BioRad
Rotor-Gene 6	Corbett-Research
Short Cut to Velocity	
VectorNTI 9	InforMax
Word 2007	Microsoft
<i>Online Software</i>	
NCBI	
Primer 3	
UCSC	
Web cutter 2	
Reverse compliment	

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien (*Escherichia coli*)

2.2.1.1. Vermehrung und Lagerung von *E. coli*

Die Vermehrung von Bakterien (*E. coli*) erfolgte bei 37°C in LB-Medium auf dem Schüttler oder auf der LB-Agarplatte. Zur Selektion von Plasmid-tragenden Bakterien wurden dem Medium jeweils Antibiotika zugefügt, die zu der entsprechenden vom Vektor-vermittelten Antibiotikaresistenz passen. Nach Anzucht der Bakterien auf Agarplatten konnten diese für etwa vier Wochen bei 4°C gelagert werden.

Der Agar für die LB-Agarplatten wurde stets autoklaviert und dann auf 50°C im Wasserbad abgekühlt. Nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikas konnte der LB-Agar in Petrischalen gegossen werden. Diese wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

LB-Agar		LB-Medium	
Bacto-Trypton	10 g/l	Bacto-Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l	Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l	NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l	pH 7,5	
autoklavieren		autoklavieren	

Für eine längere Lagerung wurden Glycerolstocks angelegt. Dabei wurden zu 200 µl einer Schüttelkultur von Bakterien 1 VT frischem LB-Medium gegeben und anschließend wurde 87 % Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % zugegeben. Die Bakterien wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Glycerinstock

10 % Bakteriensuspension

15 % Glycerin

75 % LB-Medium

2.2.1.2. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Plasmid-DNA in vorbereitete sogenannte kompetente Bakterien (Hanahan 1983). Durch Behandlung der Bakterien mit

Kalziumchlorid wurden diese chemisch kompetent gemacht. Dabei wurde die Zellmembran der Bakterien so verändert, dass die Aufnahme von DNA in die Bakterienzelle erleichtert wird. 10-20 ng Plasmid-DNA wurden dazu zu 50-100 µl kompetenten *E. coli* gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C für 2 Minuten, der die Aufnahme der DNA in die Bakterien vermittelt. Die Bakterien wurden in LB-Medium aufgenommen und für 45 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler vermehrt. Danach wurden die *E. coli* für 2 Minuten bei 3.000 rpm ab zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterien im Restmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten, die mit den entsprechenden Antibiotika versetzt waren, ausplattiert. Nach etwa 12-24 Stunden Inkubation bei 37°C konnten Einzelkolonien isoliert und weiter bearbeitet werden.

2.2.1.3. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien bzw. *E.coli* sind, auf Grund von Kalziumeinschlüssen in der Membran, besonders gut geeignet um Plasmid-DNA während einer Transformation auf zu nehmen. Durch diese kompetenten Bakterien kann eine Transformationseffizienz von 10^7 Transformanten pro 1 µg Plasmid-DNA erreicht werden.

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* wurden diese zunächst in 200 ml LB-Medium herangezogen. Dafür wurde das LB-Medium zunächst mit 1 ml einer Übernacht-Flüssigkultur, auch Vorkultur genannt, angeimpft und anschließend bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 hoch geschüttelt. Danach wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 3.000 rpm und 4°C pelletiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C im Kühlraum. Auch aller verwendeten Materialien und Lösungen wurden auf 4°C abgekühlt. Das Pellet wurde vorsichtig angeteigt und in 40 ml TB-Medium resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Es wurde erneut für 10 Minuten bei 3.200 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in 9,3 ml TB-Puffer resuspendiert, dem 0,7 ml DMSO zugefügt waren. Es wurde erneut für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden jeweils 150 µl der chemisch kompetenten Bakterien in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und diese danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien, wie Glaspipetten und Kulturschalen, waren entweder steril

verpackt, oder wurden vor Gebrauch durch Abflammen oder Ethanol desinfiziert. Die verwendeten Schneiderzellen (S2 Wildtyp) und deren Derivate (Zellklone und -pools) wurden in Schneider-Medium herangezogen, das zusätzlich noch FCS speziell für Insektenzellen und 200 mM Glutamin enthält. Auch war dem Medium eine Antibiotikallösung aus Penicillin und Streptavidin beigelegt, um bakterielles Wachstum im Medium zu verhindern. Die Medien wurden vor Gebrauch stets steril filtriert.

Die Zellen wurden stets bei konstanten 22°C im Inkubator aufbewahrt und brauchen keine zusätzliche CO₂-Begasung, was den physiologischen Bedingungen in Insekten entspricht.

Schneider's complete Medium	Stock
500 ml Schneider-Medium	
10 % FCS	100 %
1 % Glutamin	200 mM
1 % Pen/Strep.-Lösung	1 M

2.2.2.2. Aussäen und Splitten von Zellen

Damit Zellen längere Zeit in Kultur überleben, müssen sie regelmäßig gesplittet werden. Dazu wurden die S2-Zellen durch leichtes Klopfen mit der Handfläche an die Zellkulturflasche gelöst und durch auf- und abpipettieren mit einer 10 ml Glaspipette resuspendiert und vereinzelt. Die Zellen konnten nun in einem bestimmten Verhältnis zu vorgelegtem Medium gegeben werden. Das Verhältnis beim Splitten variierte von 1:2 bis 1:12 und richtete sich nach der Zelldichte auf der Schale und den Verwendungszweck.

Für manche Experimente war es nötig, Zellen in einer bestimmten Menge auszusäen. Beim Aussäen der Zellen wurden die abgelösten Zellen am Zellzähler, Countess der Firma Invitrogen, gezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt, um tote Zellen anzu färben. 10 µl der Lösung konnten auf Spezial-Objektträger von Invitrogen gegeben werden, die in den Zellzähler eingeführt wurden. Anhand der Zellzahl (Zellen/ml) konnte nun berechnet werden, wie viel Zellsuspension der gewünschten Zellzahl entspricht. Es wurden Zellenmengen zwischen 0,5x und 1x 10⁶ Zellen pro Well für *knock down* Experimente und Protein bzw. RNA-Gewinnung auf 6-Well-Schalen und 2x 10⁷ Zellen pro Flasche für Experimente wie ChIP und IP ausgesät.

2.2.2.3. Einfrieren und auftauen von Zellen

Das Einfrieren von Zellen diente dazu einen Vorrat an Zellen zu erlangen. Dazu wurde zunächst Einfriermedium hergestellt. Dieses bestand aus 40 % FCS, 45 % normalem Medium

und 15 % DMSO, das die Membran der Zellen löcherig macht und die Zellen somit beim Einfrieren am platzen hindert. Die Zellen wurden, wie beim Splitten durch abklopfen und vereinzeln der Zellen durch pipettieren abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 rpm abzentrifugiert. Danach erfolgte das Absaugen des Mediums mittels Wasserstrahlpumpe und die Zellen wurden in 1-2 ml Medium resuspendiert. 900 µl der Zellsuspension wurden zu 900 µl Einfriermedium gegeben, welches zuvor in spezielle zum einfrieren von Zellen geeignete Cryo-Gefäße vorgelegt wurde. Die Zellen mussten sofort in einen, mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter überführt und bei -80°C eingefroren werden. Die Einfrierbehälter ermöglichen das langsame Abkühlen von 1°C pro Minute, so dass die Zellen keinen Kälteschock erleiden. Nach 24 Stunden konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Schneider´s Frozen Medium	20 ml
45 % Schneider´s complete	9 ml
40 % FCS	8 ml
15 % DMSO	3 ml
sterilfiltrieren	

Um die Zellen wieder auf zu tauen, wurden die Zellen bei Raumtemperatur (RT) oder Handwärme aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Entfernen des DMSO erfolgte ein Waschschrift mit frischem Medium. Bei 800 rpm wurden die Zellen für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen vorsichtig in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.2.4. Transfektion von Zellen

Die *in-vitro* Transfektion von Zellen beinhaltet das Einbringen von fremder DNA in eine Zelllinie. Dabei unterscheidet man zwischen transienter (kurzfristig) und stabiler (langfristig) Transfektion, bei der die eingebrachte DNA ins Genom der Zellen aufgenommen wird. In Vorversuche wurden dazu zunächst transiente Transfektionen von S2-Zellen vorgenommen. Später wurden dann stabile S2-Zelllinien für die verwendeten Plasmide hergestellt. Dazu wurden jeweils die Plasmide pAW-FLAG-His-dSUMO (Eugenia Wagner) und pRM-FLAG-His-dSUMO (Meike K. Abraham) verwendet, um FLAG-His-dSUMO in der Zelle über zu exprimieren.

Für einen Transfer wurden, wie unter 2.2.2.2 erklärt, $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well auf 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der Transfer mittels CuSO_4 -Methode vorgenommen. Insgesamt wurden $5,4 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. Dazu wurden die Plasmide-DNAs in $200 \mu\text{l}$ ddH₂O ($183,6 \mu\text{l}$) aufgenommen. Anschließend wurden $21,6 \mu\text{l}$ 10x HEPS und $10,8 \mu\text{l}$ 2 M CaCl_2 zugegeben. Damit sich DNA-Salz-Komplexe ausbilden, die durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden konnten, wurde anschließend 10 Sekunden gevortext und dann 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Lösung wurde nun in das Medium der Zellen getropft. Um überschüssige DNA-Salzkristalle zu entfernen wurde nach 24 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen. Um die Transfereffizienz am Mikroskop zu überprüfen, wurde bei transienten transfers pEGFP kotransfiziert. Für das Herstellen stabiler Zelllinien wurde der Vektor pRM-Puromycin verwendet. Zum Auffüllen der DNA-Menge auf $5,4 \mu\text{g}$ wurde der unspezifische Vektor pBSKII+ genutzt, bei dem es sich um einen bakteriellen Vektor handelt. Transiente Transfers wurden nach 48 bis 72 Stunden geerntet und für RNA- oder Protein-Extraktion genutzt. Für den stabilen Transfer mit den Vektoren pAW-FLAG-His-dSUMO und pRM-FLAG-His-dSUMO wurde die Selektion von potentiell FLAG-His-dSUMO-positiven Klonen nach 24 Stunden, durch $2,5 \mu\text{g/ml}$ Puromycin vorgenommen. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers und der Puromycin-Selektion dienten unbehandelte Zellen und pBSKII+ transfizierte Zellen.

10x HEPS	
1 M HEPES	200 mM
Mit HCl auf pH 7,2 einstellen	
5 M NaCl	1,37 M
Glucose	60 mM
2 M KCl	50 mM
1 M Na_2HPO_4	7 mM

Verwendete Plasmid-DNA Mengen:

Plasmid	Menge [μg]
Entweder pAW-FLAG-His-dSUMO	1,5
Oder pRM-FLAG-His-dSUMO	1,5
pMT Puromycin (bei stabilen Transfers)	1,5
pBSKII+ (Füll-DNA)	2,4
pEGFP (Transfereffizienz bei transienten Transfers)	1,5

2.2.2.5. Isolieren von Zell-Klonen

Das Isolieren stabiler, potentiell FLAG-His-dSUMO-positiven Klone, diente der Vermehrung von diesen. Es wurden 96- und 24-Well-Platten mit Medium, welches 2,5 µg/ml Puromycin enthielt, vorbereitet. In jedes Well wurde ein Klon gegeben. Die Klone wurden mit der 200 µl-Pipette, unter Beobachtung am Mikroskop, von der Maxischale geschabt und aufgesaugt. Die Zellen konnten dann in ein Well pipettiert und resuspendiert werden, um diese so zu vereinzeln. Dabei bekam jedes Well bzw. jeder Klon eine Nummer.

Die Klone wurden immer wieder auf Wells bzw. Flaschen mit größeren Flächen umgesetzt, sobald der Klon für ein Kulturgefäß zu stark gewachsen war. Sobald der Klon genug expandiert war, konnte eine Einfrierkultur angefertigt werden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben.

2.2.2.6. RNAi Behandlung von Zellen

Die RNA-Interferenz (RNAi) dient dazu die Genexpression in Zellen vorübergehend einzuschränken. Dabei macht man sich einen zelleigenen Mechanismus zur Transkriptions- und Translationskontrolle zu Nutze. Die Behandlung der Zellen mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) führt dazu, dass diese in der Zelle zu einzelsträngigen Oligomeren prozessiert wird und in den RISC-Komplex eingebaut wird, der diesen Mechanismus zur Kontrolle der Expression steuert (Clemens et al. 2000).

Dazu wurden zunächst durch *in vitro* Transkription dsRNAs von DNA-Matrizen transkribiert, die mittels PCR aus genomischer DNA hergestellt worden waren (siehe 2.2.4.6 und 2.2.4.16).

Diese dsRNAs wurden für den sogenannten *knock down* eines Genproduktes bzw. der mRNA in Konzentrationen von 5 bis 8 µg bei *knock downs* auf 6-Well-Platten und 50 µg bei solchen in Flaschen eingesetzt. Damit die Zellen die dsRNA aufnehmen, wurden die Zellen in 1 ml Hungermedium (enthält kein FCS), dem so genannten Schneider's basic Medium, ausgesät, dem dann die dsRNAs zugesetzt wurden. Nach 45 Minuten Inkubation im Brutschrank werden 2 ml normales Schneider Medium zugegeben. Nun nehmen die Zellen die dsRNA zusammen mit den Nährstoffen auf.

Schneider's basic Medium	
500 ml Schneider-Medium	
1 % Glutamin	200 mM
1 % Pen/Strep.-Lösung	1 M

Diese Methode wurde zur Validierung des RNAi-Screens zur Erforschung der Auswirkungen auf das Enhancer-Blockade am Fab8-Isolator verwendet (Bohla et al. 2014). Außerdem wurden RNAi-Experimente zur Erforschung der CP190-Speckles in Anhängigkeit von SUMOylierung genutzt (Doktorarbeit, Melanie K. Buxa), sowie bei der Erforschung der Chromatin-Bindung von CP190, Pita, ZIPIC und cg30020 verwendet.

2.2.2.7. Ernten von S2-Zellen

Für verschiedene Methoden, wie Proteingewinnung, RNA-Extraktion aber auch ChIP, FAIRE-Assay und Luciferase-Assay, mussten Zellen aus Zellkulturflaschen oder 6-Well-Platten geerntet werden.

Aus Zellkulturflaschen wurden die Zellen geerntet, indem sie abgeklopft und mit dem Zellschaber vom Boden der Flasche gekratzt wurden. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren vereinzelt und in ein 50 ml Zentrifugengefäß überführt und für 3 Minuten bei 2.500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen und die Zellen wurden einmal mit kaltem 1x PBS gewaschen um Mediumreste zu entfernen.

Die Ernte aus 6-Well erfolgte nur durch abschaben mit dem Zellschaber. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml Zentrifugengefäß, wenn mehrere Wells vereinigt wurden, oder in ein 2 ml Reaktionsgefäß bei der Ernte von einzelnen Wells, gegeben. Danach konnten die Zellen wie bei der Ernte aus der Zellkulturflasche behandelt werden. Nun waren die Zellen bereit zur weiteren experimentellen Behandlung.

10x PBS	
Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	1,7 mM
KCl	2,7 mM

2.2.3. Arbeiten mit Proteinen

Proteine wurden bei -20°C in Roti-Load®-Ladepuffer gelagert.

2.2.3.1. Proteingewinnung durch SDS-Lyse und mittels RIPA-Puffer

Zur Untersuchung von Protein im Western Blot musste das Gesamtprotein aus den zu untersuchenden Zellen gewonnen werden. Dazu wurden zunächst 1×10^6 Zellen/Well auf 6-Well-Platten ausgesät und 48 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden konnte die FLAG-His-dSUMO- und auch die CP190-FLAG-HA-Expression (Klon 6) mittels CuSO₄ induziert

werden. Anschließend wurden die Zellen geerntet (siehe 2.2.2.7). Zur Untersuchung von Pita, ZIPIC und cg30020 wurden Proteinextrakte aus S2-Wildtypzellen hergestellt, die genau so ausgesät wurden wie die FLAG-His-dSUMO exprimierenden Zellen.

Zur Extraktion des Gesamtproteins, für die Untersuchung von Pita, ZIPIC und cg30020, sowie endogenem CP190 und dCTCF, wurde das Zellpellet in 1x RIPA-Puffer aufgenommen, welches frisch durch Zugabe von 0,1 VT 7x *Complete-Mini-Mix* der Firma Roche, 0,9 VT ddH₂O. und 1 VT 2x RIPA-Puffer angesetzt wurde. Zur Lyse der Zellen wurde die Suspension 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 10 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert, wobei der gesamte Zellinhalt austrat. Der Proteinextrakt konnte im Verhältnis 1:1 in 4x Roti-Load-Ladepuffer aufgenommen werden.

2x RIPA-Puffer	
5 M NaCl	280 mM
1 M Tris/HCl pH 8,0	20 mM
1 M EDTA pH 8,0	2 mM
10 % Triton	2 %
10 % SDS	0,2 %
10 % DOC	0,2 %

SUMOylierung ist eine empfindliche Modifikation und wird schnell durch entsprechende Proteasen von den Zielproteinen abgedaut. Aus diesem Grund konnte zur Untersuchung SUMOylierter Proteine kein RIPA-Puffer verwendet werden. Stattdessen wurde das Gesamtprotein der Zellen gewonnen indem die Zellen durch SDS-Lyse aufgeschlossen wurden, da SDS die Proteasen denaturiert und so am arbeiten hindert. Dabei wurden die Zellen nach der Ernte gezählt und auf dieselbe Zellzahl eingestellt und dann direkt in 4x Roti-Load-Ladepuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit 7x PIC 1:1 verdünnt. Die Proben wurden daraufhin für 15 Minuten im Wasserbad gekocht. Falls die Lösung danach immer noch zu viele intakte Zellen enthielt, wurden die Proben 3x 1 Sekunden bei voller Stärke am Branson-Sonifizierer bearbeitet. Die Proben wurden vor dem Auftragen SDS-Polyacrylamidgel 1 Minute bei 13.000 rpm abzenrifugiert, um Zelltrümmer zu beseitigen.

2.2.3.2. Quantifizieren des Proteinextrakts mittels Bradford-Assay

Die Quantifizierung von Protein nach Bradford, stellt eine genaue Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration dar (Bradford 1976). Proteine binden dabei den Farbstoff Coomassi Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung. Wenn eine Bindung eintritt, ändert sich mit der

Konformation des Farbstoffs, dessen Farbe von rot-braun nach blau. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 von 470 nm nach 595 nm. 0,2 VT Bradford-Reagenz wurden mit 0,8 VT Wasser gemischt. 2 µl des Proteinextraktes wurde zu 1 ml Coomassie Brilliant Blue-Lösung gegeben. Die Messung der Optischendichte erfolgte nach 10 Minuten bei 595 nm am Spektralphotometer. Als Nullwert wurde 1x RIPA-Puffer bzw. ChIP-Lysepuffer oder FAIRE-Lysepuffer in Bradford-Reagenz verwendet. Proteinproben die durch SDS-Lyse gewonnen wurden können auf Grund der hohen SDS-Konzentration und des Farbstoffes im 4x Ladepuffer nicht für die Proteinbestimmung nach Bradford genutzt werden. Aus den aus dem Bradford-Assay hervorgehenden Extinktionswerten, konnte man mit folgender Gleichung die Konzentration an Protein im Proteinextrakt berechnen.

$$\frac{19,89 \cdot E \text{ (Extinktion)}}{x \mu\text{l (Menge an eingesetztem Extrakt)}} \cdot 2 \text{ (1:1 Verdünnung in RotiLoad)} = \text{Protein}/\mu\text{l}$$

2.2.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit SDS-Gelen kann man Proteine nach ihrer Größe auftrennen, ohne dass die spezifische Ladung der Proteine dabei berücksichtigt werden muss. Das SDS in Gel und Laufpuffer (1x Laemmli-Puffer) sorgt dafür, dass die Proteine alle eine negative Ladung erhalten, indem es die Proteine umschließt. Außerdem löst SDS die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine auf. Zusätzlich wurden die Proteine vor dem Auftragen auf das Gel, im 90-100°C heißen Wasserbad denaturiert. Das Erhitzen und die Behandlung mit SDS führen dazu, dass die Proteine ohne zu verklumpen von Kathode zur Anode wandern.

Es wurden stets SDS-Gele mit 5 % Sammelgel und 10 % Trenngel hergestellt (Sambrook et al. 1989). Allerdings können je nach Größe des zu untersuchenden Proteins auch andere Trenngel-Zusammensetzungen verwendet werden. Am Ende des grobporigen Sammelgels bildet sich eine dünne Lauffront. Im feinporigen Trenngel findet die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe statt.

10x SDS

10 % SDS w/v [g] in H₂O (bei 65°C lösen)

Zusammensetzung des 5 % Trenngels		Zusammensetzung des 10 % Sammelgels	
Substanz	Menge	Substanz	Menge
Acrylamid	5 ml	Acrylamid	1,7 ml
Aqua dest.	6 ml	Aqua dest.	5,7 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	3,7 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	10 % SDS	50 µl
40 % APS	50 µl	40 % APS	35 µl
TEMED	20 µl	TEMED	15 µl

Die Gele wurden in einem speziellen Gelgießstand von Bio Rad gegossen. Das Trenngel wurde zuerst hergestellt. Es wurde mit 70 % Ethanol überschichtet, um Blasen zwischen Sammel- und Trenngel zu vermeiden. Nach abgießen des Ethanol, wurde das Sammelgel gegossen. Der Kamm für die Kammern in die das Protein aufgetragen wurde, musste vor dem Polymerisieren in das Sammelgel gesteckt werden. Nach dem Polymerisieren wurde der Kamm unter Wasser gezogen und das Gel in die SDS-Gelelektrophorese-Apparatur eingebaut. Die Apparatur wurde mit 1x Laemmli-Puffer (Laemmli 1970) aufgefüllt. 20-25 µg RIPA-Proteinextrakt oder 30 µl SDS-Lysat bzw. CHIP- oder FAIRE-Lysat in 4x Roti-Load-Ladepuffer wurden pro Spur auf das Gel geladen. Zur späteren Analyse der Proteinbanden, wurde der Page Ruler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas eingesetzt. Die Gele wurden für 1,5 bis 2,5 Stunden bei 100 V gefahren. Dabei sollte die Lauffront zum Schluss, das untere Ende des Gels erreichen.

10x Laemmli-Puffer	
Tris	250 mM
Glycin	1920 mM
SDS	1 %

2.2.3.4. Western-Blot-Methode

Wet Blot

Die Proteine wurden von dem SDS-Gel auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran transferiert, indem die Proteine auch hier von Kathode zu Anode wandern und dabei vom Gel auf die Membran übergehen. Dabei sind die Proteine nach wie vor durch SDS negativ geladen (Towbin et al. 1979, Towbin et al. 1989). Zum Aufbau der *Wet-Blot*-Apparatur wurden je zwei Whatman-Papiere und je ein Schwamm, hinter das Gel bzw. die Membran gelegt. Das

Konstrukt wurde durch Plastikplatten fest zusammen gepresst und in die Blotting-Apparatur eingespannt, die wiederum in 1x Blotting-Puffer getaucht war (Abbildung 10). Das Blotting erfolgte unter Eiskühlung. Nach 1 Stunden, bei einer der Größe der Proteine angepassten Spannung, war das Übertragen der Proteine auf die Membran abgeschlossen.



Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus der Western-Blot-Apparatur. + Stellt die Anode da, - stellt die Kathode da (hell-blau), Schwämme (grau), Whatman-Papier (schwarze Linie), SDS-Gel (dunkel-blau), Membran (rot).

Nach dem Blotting wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpuffer inkubiert, um mit den Milcheiweißen unspezifische Bindungen auf der Membran zu blocken.

1x Blotting-Puffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol (optional)	10 %

Immundetektion

Nach dem Blocken der Membran folgte eine Immundetektion des zu untersuchenden Proteins durch spezifische Antikörper (Burnette 1981, Towbin et al. 1979, Towbin et al. 1989). Es wurde eine indirekte Antikörperdetektion durchgeführt, bei der der Primär-Antikörper durch einen markierten Sekundär-Antikörper erkannt wird.

Die Membran wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primär-Antikörper, auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x kurz und 1x für 10 Minuten mit 1x PBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, der sich gegen den Primär-Antikörper richtet, dauerte 1 Stunde und erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur.

Danach wurde erneut 3x kurz und 1x für 10 Minute mit 1x PBS-Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion durch Zugabe von frisch angesetzter ECL-Lösung von Millipore. Die Lösung besteht aus zwei Komponenten die 1:1 gemischt wurden. Das Substrat wurde über die Membran getropft. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dabei entstand Chemolumineszenz, die durch das Umsetzen des Substrates Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP), die an den Sekundär-Antikörper gekoppelt ist, hervorgerufen wurde. Die Detektion der Signale erfolgte nach 10 bis 240 Sekunden Belichtung an einem speziellen Gerät, dem Versa Doc. Dieses ist in der Lage die Chemilumineszenz zu detektieren. Mit Hilfe des Programmes QuantityOne der Firma BioRad wurde die Signale dokumentiert und ausgewertet.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Antikörper gegen FLAG zur Detektion des FLAG-His-dSUMO Fusionsprotein verwendet. Außerdem wurden Antikörper gegen das Haushaltsgen β -Tubulin verwendet, sowie Antikörper gegen dCTCF und CP190. Aber auch Pita, ZIPIC (cg7928) und cg30020 wurden mittels Immundetektion sichtbar gemacht. Die Verdünnung der Primär- und Sekundär-Antikörper in Milchpuffer sind unter 2.1.10 zu finden.

1xPBS-Tween	
1x PBS	1:10 verdünnt 10x PBS (in ddH ₂ O)
Tween®20	0,1 %

Strippen von Western-Blot-Membranen

Gelegentlich war es nötig Membranen mehrfach mit Antikörpern zu behandeln, wenn nochmals mit einem anderen Antikörper detektiert werden sollte. Die Membran wurde dazu 45 Minuten in Strip-Puffer inkubiert. Dabei lösen sich die Antikörper, aber auch die zum Blocken genutzten Milcheiweiße von der Membran, weshalb diese erneut in 5 % Magermilchpuffer geblockt werden musste.

Strip-Puffer	
Glycin	25 mM
SDS	1 %
HCl	auf pH 2 einstellen

2.2.4. Arbeiten mit RNA/DNA

RNA und DNA wurden bei -20°C aufbewahrt, wenn sie täglich verwendet wurden. Bei längerer Lagerung wurden die Nukleinsäuren bei -80°C eingefroren.

2.2.4.1. Isolation genomischer DNA aus S2-Zellen

Die genomische DNA aus S2-Zellen wurde genutzt, um DNA-Matrizen für die PCR zu gewinnen. Diese Matrizen wurden für die Herstellung von dsRNA benötigt.

Eine voll bewachsene Flasche mit S2-Wildtyp-Zellen wurde geerntet. Dazu wurden die Zellen abgeklopft und in ein 50 ml Zentrifugengefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 2.500 rpm und 4°C für 3 Minuten pelletiert. Das Pellet musste dann mit kaltem 1x PBS gewaschen werden. Die Zellen konnten nun mit dem Extraktionspuffer behandelt werden. Dazu wurden sie darin resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Lysat wurde für 4 Stunden bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun konnte eine Phenol-Chloroform-Extraktion aus wässriger Lösung, mit anschließender Isopropanolfällung durchgeführt werden (siehe 2.2.4.16).

Das entstandene DNA-Pellet wurde in TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen. Die Menge an TE-Puffer richtete sich nach der DNA-Pelletgröße.

Extraktionspuffer

1 M Tris/HCl pH 9	100 mM
0,5 M EDTA	100 mM
10 % SDS	1 %
3 M KAc (pH mit Essigsäure auf pH 5)	8 mol/l
Add ddH ₂ O	

TE-Puffer

1 M Tris/HCl pH 7,5	10 mM
0,5 M EDTA	1 mM
Add ddH ₂ O	

2.2.4.2. RNA-Isolation aus S2-Zellen

Aufgereinigte Zellen wurden in 1ml TRIzol von Roche resuspendiert und anschließend für 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. 950 μl wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß

überführt, danach wurden 0,2 VT Chloroform zugegeben. Die Suspension wurde 15 Sekunden gevortext und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde bei 13.000 rpm zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen bilden. Die obere, klare Phase enthält die RNA, die dünne, milchige Phase enthält die DNA und die rosa Phase enthält alle Proteine. Maximal 400 µl wurden von der wässrigen Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Fällern der RNA wurden 0,7 VT Isopropanol verwendet. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis, wurde 10 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Danach sollte ein RNA-Pellet sichtbar werden. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Dabei variierte die Menge an Wasser entsprechend der Pelletgröße von 10 µl bis 50 µl. Durch abwechselndes Vortexen und Erhitzen der Proben im Wasserbad bei 65°C wurde die RNA gelöst.

2.2.4.3. Quantifizieren der DNA und RNA

Auch die Konzentration der DNA, oder RNA wurde bestimmt, nachdem sich das Pellet gelöst hatte. Dazu wurde eine 1:100 bis 1:200 Verdünnung der DNA/RNA in TE-Puffer bzw. ddH₂O hergestellt und am Infinite M200 pro Nano-Quant einem speziellen Gerät der Firma Tecan zur Quantifizierung von Nukleinsäure-Konzentrationen und zur Messung von Fluoreszenz, gemessen. Dazu wurde zunächst die Quarzplatte, die zur Messung der Konzentration genutzt wurde, mit TE-Puffer oder ddH₂O genullt.

Anschließend wurden 2 µl der RNA-/DNA-Lösung, deren Konzentration bestimmt werden sollte, auf die Quarzplatte pipettiert und die Konzentration (ng/µl) bei 260 nm gemessen. Neben der Konzentration konnte außerdem die Ratio von Nukleinsäure zu Protein bestimmt werden, indem die Absorption der Proteine bei 280 nm gemessen und mit der Absorption bei 260 nm verrechnet wurde. Die Ratio gibt Aufschluss über die Reinheit der genomischen RNA bzw. DNA. Saubere DNA weist dabei eine Ratio von etwa 1,8 auf. Saubere RNA hat eine Ratio von etwa 1,8 bis 2,0. Mit dem Programm i-control von Tecan, konnte das Nanoquant-Gerät gesteuert und die Daten ausgewertet werden.

2.2.4.4. DNase-Verdau

Anhand der gemessenen RNA-Konzentration, die wie unter 2.2.4.3 beschrieben gemessen wurde, konnte die einzusetzende Menge an RNA für den Verdau berechnet werden. Der Verdau wurde wie im Herstellerprotokoll des RQ1 RNase-free DNase Kit der Firma Promega beschrieben, durchgeführt. Dabei sollten etwa 5,5 µg RNA pro 11 µl DNase-Verdau-Ansatz eingesetzt werden, sodass 1µl der RNA-Lösung 0,5 µg/µl RNA entsprechen. Der DNase-Verdau dauerte etwa eine Stunde und wurde durch Inkubation des Verdau bei 65°C mit einer

zum Kit gehörenden Stopp-Lösung (mit EDTA) beendet. Dieser Verdau diene dazu, die RNA von genomischer DNA befreien, die in der PCR amplifiziert werden könnte.

2.2.4.5. Reverse Transkription

Um die genetische Information der mRNA für die PCR zugänglich zu machen, ist es nötig diese in stabilere cDNA umzuwandeln. Dafür wurde eine reverse Transkription mit dem Roche *first-strand-transcription* Kit durchgeführt. Es wurden *Random-Hexamer-Primer* verwendet, da diese an sehr viele verschiedene Stellen der RNA binden können und somit die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die komplette mRNA in cDNA übersetzt wird. Die Reverse Transkriptase braucht die Primer als Ansatzpunkt zur Verlängerung des cDNA-Strangs in 5'-3'-Richtung. Es wurden 2 µl bzw. 1 µg RNA in der reversen Transkription eingesetzt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Phase	Dauer	Temperatur
Anlagerung der Primer	10 Minuten	25°C
Verlängerung	30 Minuten	55°C
Denaturierung	5 Minuten	85°C

2.2.4.6. Konventionelle (semiquantitative) PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR stellt ein molekulares Verfahren zur exponentiellen Amplifikation eines spezifischen Fragmentes aus genomischer DNA, cDNA oder auch von Plasmid-DNA dar. Für diese Methode braucht man die hitzestabile *Taq (thermus aquaticus)* -Polymerase, die auch bei hohen Temperaturen effektiv arbeitet. Diese kann eine Matrize (z.B. cDNA) mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotid-Primern und freier Deoxynukleotide vermehren. Auch hier findet eine Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung statt.

Die PCR-Reaktion hat stets drei Schritte, die in 25-35 Zyklen wiederholt werden. Dabei wird die doppelsträngige DNA zunächst für 30 Sekunden bei 95°C denaturiert. Anschließend findet das Anlagern der spezifischen Primer für 30 Sekunden statt. Dabei richtet sich die verwendete Temperatur nach der Länge der eingesetzten Primer und deren G/C- und A/T-Gehalt. Die Verlängerung der Primer durch die *Taq*-Polymerase findet bei 72°C statt. Die Dauer dieses Schrittes richtet sich dabei nach der Länge des Fragmentes, das amplifiziert werden soll. Man geht dabei davon aus, dass die *Taq*-Polymerase 1.000 Nukleotide pro Minute verlängert.

Initial fand in den durchgeführten PCRs eine 4-minütige Denaturierung statt, um die DNA vollständig zu denaturieren. Am Ende der PCR wurde außerdem ein 10-minütiger Elongationsschritt ausgeführt, der zur vollständigen Verlängerung des PCR-Produktes und der Auffüllung abgebrochener unvollständiger Fragmente diente.

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	4 Minuten	95°C
Denaturierung	30 Sekunden	95°C
Anlagerung der Primer	30 Sekunden	$T[°C] = (\text{Anzahl A/T} * 2) + (\text{Anzahl G/C} * 4)$
Verlängerung	$T[\text{min}] = (\text{länge PCR-Produkt} / 1000)$	72°C
Finale Elongation	10 Minuten	72°C

Die in diesen Experimenten genutzten Oligonukleotide sind alle unter 2.1.12 zu finden und wurden zum Großteil mit Hilfe des Online-Werkzeuges Primer 3 designt (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Sie haben alle eine Anlagerungstemperatur von etwa 60°C, da sie alle für die *real time* PCR oder die gleichzeitige Anwendung in einem PCR-Cycler optimiert wurden.

Die konventionelle PCR wurde mit dem GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit von Promega, nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

PCR Ansatz	20 µl für RT PCR	400 µl für dsRNA Matrizen
25 mM MgCl	2 µl	
5x Reaktions-Puffer	4 µl	
25 mM dNTP Mix (1:4)	2 µl	
50 µM Primer Mix (1:1)	2 µl	
Go Taq Polymerase	1 µl	
1 µg Template DNA	1 µl cDNA	0,5 ngDNA
Add ddH ₂ O	8 µl	

Diese Methode wurde vor allem zur Erstellung von dsRNA Matrizen aus genomischer DNA verwendet.

2.2.4.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die hochreine Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gelöst. Dabei bestimmt der Anteil an Agarose die Porengröße des Gels, die eine Auftrennung der DNA-Fragmente der aufgetragenen Proben nach ihrer Größe erlaubt. Ethidiumbromid wurde 1:20.000 verdünnt

zugegeben. Dieses interkaliert in die auf das Gel aufgetragene DNA und macht diese unter UV-Licht sichtbar. Das Gel wurde, in einen dafür vorgesehenen Schlitten der Gelapparatur gegossen und ein Kamm für das Auftragen der Proben gesetzt. Nach dem das Gel ausgehärtet war, wurde 1x TAE-Puffer in die Gelkammer gegossen und der Kamm gezogen. Anschließend konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. PCR-Produkte, bei denen für den PCR-Ansatz der Green-Buffer des Kits genutzt wurde, können direkt auf das Gel geladen werden. DNAs bzw. RNAs die nicht aus der PCR stammen wurden mit 6x Ladepuffer (orange Dye, von Leni) versetzt, bevor sie auf das Gel geladen wurden. Als Längenstandart wurden die Marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder, exACTGene 1kb DNA Ladder, pUK19/ MspI (HpaII) Marker 23 und Lambda Eco 130I (Styl) Marker 16 von Thermo Fisher verwendet (siehe 2.1.6). Das Gel lief je nach Fragmentgröße, Porengröße und Größe des Gels 30 Minuten bis 1,5 Stunden. Hierbei wurde die angelegte Spannung durch die Größe des Gels bestimmt (70-120 V). Für Chromatin wurden Gele mit 1,5 % Agarose eingesetzt. Für Gele auf denen PCR-Produkte untersucht werden sollten, wurden 2 % Agarose eingesetzt. Bei großen DNAs, wie Plasmiden und RNA wurden 0,8 % oder 1 % Agarosegele verwendet.

50x TAE-Puffer	
Tris	2 M
Eisessig	bis pH 7,8
EDTA	50 mM
Natriumacetat	150 mM
Aqua dest.	auf 1l auffüllen

2.2.4.8. Quantitative *Real-Time*-PCR

Die *Real-Time*-PCR erlaubt eine Quantifizierung der PCR-Produkte. Während der PCR lagert sich hier der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green in die kleine Furche der DNA ein. SYBR-Green kann im gebundenen Zustand durch Anregung durch Licht detektiert werden. Je mehr PCR-Produkt vorhanden ist, desto mehr Fluoreszenz kann der *Real-Time*-PCR-Apparat messen. Diese Bindung von SYBR-Green kann allerdings nur an doppelsträngiger DNA erfolgen, weshalb nur diese erkannt wird.

Bei dieser Methode wurde der iTaq Sybr Green Mix von BioRad nach Angaben des Herstellerhandbuches verwendet. Ausgewertet wurden die Daten der *Real-Time*-PCR mit den Programmen DocMedAnalys von Bio Rad und Excel 2007 von Microsoft.

Es wurden stets Primer verwendet die möglichst kleine PCR-Produkte (ca. 200 bp) erzeugen, da diese für den *Real-Time-Cycler* besser zu detektieren sind. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.12 zu finden.

Diese Methode wurde zur Analyse der Pita, ZIPIC, cg30020, CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-Bindung im ChIP, sowie der Auswertung des FAIRE-Assays, aber auch zur quantitativen RT-PCR verwendet.

qPCR-Mix	15 µl Ansatz
iTaq Sybr Green Mix	7 µl
5 µM Primer Mix	2 µl
Template DNA	1 µl
Add ddH ₂ O	5 µl

2.2.4.9. DNA-Extraktion aus Agarosegel

Für manche Experimente, z.B. Klonierungen, musste DNA aus dem Agarosegel wieder gewonnen werden, um diese für weitere Versuche verwenden zu können. Dazu wurde die gewünschte Bande mit einem sauberen Skalpell bei niedriger UV-Strahlung (365 nm) aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gelextraktion wurde mit dem illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit von GE health care, nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde allerdings mit ddH₂O, statt mit dem Elutionspuffer aus dem Kit, eluiert.

2.2.4.10. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA ist ein Hilfsmittel, um eine DNA wie z.B. ein Plasmid oder ein präzipitierte Sequenz aus ChIP, zu identifizieren. Die zu sequenzierenden Proben wurden dabei, wie auf der Internet-*homepage* der mit der Sequenzierung beauftragten Firma SeqLab beschrieben, vorbereitet. Hierbei wurden 700-600 ng DNA zusammen mit 20 pmol eines spezifischen Primers und einer Füllmenge an ddH₂O angesetzt. Anschließend wurden die Proben an die Firma SeqLab verschickt. Die Auswertung des entstehenden Elektropherogrammes erfolgte am PC mit Hilfe der Programme GATC-Viewers der Firma GATC-Biotech und VektorNTI der Firma InfoMax.

2.2.4.11. Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen

Enzymatische Verdau ist ein wertvolles verfahren zur Identifizierung von DNA-Abschnitten. Durch das Schneiden an oftmals palindromischer Schnittstellen, entstehen Schnittmuster an Hand derer man auf Ethidium-Bromid-Agarosegel identifizieren kann, um welche DNA es

sich handelt. Außerdem sind Restriktionsenzyme wichtige Werkzeuge zur Klonierung von DNA-Fragmenten. Die Verdauung mit den eingesetzten Restriktionsenzymen wurden nach den Vorgaben des Enzym-Kataloges der Firma Fermentas angesetzt. Dabei wurden 500 ng bis 30 µg DNA zum Verdau eingesetzt. Das verwendete Enzym wurde hier stets mit dem entsprechenden Puffer verwendet. Ein Verdau konnte je nach eingesetzter DNA- und Enzym-Menge 1 bis 3 Stunden dauern.

2.2.4.12. Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). Diese Methode ermöglicht eine schnelle Isolation von kleinen Mengen Plasmid aus Bakterien/ *E. coli*. Somit lassen sich in kurzer Zeit mehrere Klone untersuchen, um heraus zu finden, ob es sich um das korrekte Plasmid handelt. Zunächst mussten Einzelklone aus einer Transformation mit autoklavierten Pipettenspitzen von Agarplatten gepickt werden und in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt werden. Es erfolgte eine 8- bis 12-stündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler, um die Bakterien und damit das Plasmid zu vermehren. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden entnommen und bei 8.000 rpm für 2 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgekippt und 100 µl Sol 1 zugegeben und anschließend gründlich gemischt. Dies führt zum Andauen des *Murinsacculus* (Zellwand) der Bakterien. Für die alkalische Lyse der Zellen, wurden 200 µl Sol 2 zugegeben und erneut gemischt. Die Lösung wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Um das Gemisch wieder zu neutralisieren, wurden 150 µl Sol 3 zugegeben, gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 13.000 rpm für 15 Minuten pelletiert. Der Überstand enthält die Plasmide und wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA konnten durch Zugabe von 0,8 VT Isopropanol und 10-minütiger Inkubation auf Eis gefällt werden. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet nochmals für 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und in TE+RNase A (10 µg/µl) gelöst.

Alternativ konnten auch Mini-Präparationen mit Hilfe des Qiaprep® Miniprep von Qiagen durchgeführt werden. Das Kit wurde nach Herstellerangaben angewendet. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgte durch Aqua dest.

Sol 1		Sol 2		Sol 3 (pH4,8)	
Glucose	50 mM	NaOH	0,2 N	KaAc	24,5 g
Tris/HCl pH8	25 mM	SDS	1 %	Eisessig	35 ml (pH4)
EDTA	10 mM	immer frisch		MilliQ H2O	ad. 100 ml

Durch Mini-Präparation gewonnene DNA ist nicht sehr sauber, da Salzreste und Proteine in der Lösung enthalten sind. Daher kann sie nur schwer quantifiziert werden.

2.2.4.13. Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Midi-Präparation, oder Plasmidpräparation im mittleren Maßstab, eignet sich zur schnellen Gewinnung mittlerer Plasmidmengen (1-7 µg/µl). Diese Plasmide können zu Transfektionen von eukaryotischen Zellen oder Klonierungsexperimenten verwendet werden, da es sich um relativ reine DNA handelt. Es wurde das Midi-Präparation Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Die Quantifizierung der DNA fand, wie unter 2.2.4.3 beschrieben, am Infinite M200 pro NanoQuant der Firma Tecan statt.

2.2.4.14. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA mit Cäsium-Chlorid (CsCl) -Gradient

Diese Form der Plasmidpräparation dient dazu große Mengen hochreiner Plasmid-DNA zu gewinnen. Diese Plasmide sind besonders für Transfektionen von eukaryotischen Zellen geeignet, da diese DNA sehr wenige Verunreinigungen enthält. Für die Plasmidpräparation wurden zunächst mit einer sterilen Pipettenspitze Klone gepickt und in 3 ml LB-Medium überführt. Diese Vorkultur wurde für 8 Stunden bei 37°C herangezogen und anschließend in 500 ml TB-Medium überführt. Diese Übernachtskultur wurde für mindestens 12 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension musste dann in ein großes Zentrifugengefäß überführt und bei 4.000 rpm für 20 Minuten ab zentrifugiert werden. Das Medium wurde abgekippt und die Bakterien im Restmedium angeteigt und anschließend in 9 ml Sol 1 resuspendiert. Dann wurde 1 ml Sol 1 mit Lysozym zugegeben. Nach dem kurzen Schwenken der Lösung wurde diese für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20 ml frisch angesetzte Sol 2 unter schwenken zugegeben. Die Lösung wurde für 7 Minuten auf Eis inkubiert. Nun konnten ebenfalls unter schwenken 15 ml Sol 3 zugegeben werden. Nach Mischen durch Schütteln, wurde die Lösung erneut 7 Minuten auf Eis inkubiert und die Zellreste für 20 Minuten bei 7.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand konnte in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt werden und wurde dabei durch eine Gase gefiltert, um Zellbestandteile und gefällte Proteine aus der Lösung zu entfernen. Die DNA-

Fällung fand für 15 Minuten bei Raumtemperatur mittels 0,6 VT (25 ml) Isopropanol statt. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei 5.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C auf dem Schüttler in 3 ml TE-Puffer pH 7,6 gelöst und anschließend 4,8 g CsCl zugegeben, um das Pellet dann bei 37°C auf dem Schüttler zu lösen. 10 mg/ml (500 µl) Ethidiumbromid (EtBr) wurden zugegeben und die Lösung anschließend bei 5.000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Quickseal™-Ultrazentrifugengefäß überführt und mit 50%iger CsCl-Lösung aufgefüllt. Das Angleichen des Gewichts der Gefäße fand mit Hilfe von ddH₂O statt, so dass alle Proben ein Gewicht von etwa 9,5 bis 9,8 g hatten. Die Proben wurden über Nacht bei 55-70.000 rpm in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Es entstehen im Idealfall zwei unterscheidbare Banden. Die obere Bande stellt die chromosomale DNA da, die untere Bande enthält die Plasmid DNA, die im Gradienten auf Grund ihrer geringeren Größe besser migriert. Diese wurde mit Hilfe einer Spritze abgesaugt und in ein neues Quickseal™ überführt. Auch hier wurde mit 50%iger CsCl-Lösung aufgefüllt und mit ddH₂O das Gewicht angeglichen. Es wurde erneut bei 55-70.000 rpm für mindestens 3,5 Stunden zentrifugiert. Nach diesem Schritt sollte sich nur eine klar definierte Bande mit Plasmid-DNA bilden. Diese wurde abgesaugt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Ethidiumbromid musste nun aus der Lösung entfernt werden. Dazu wurde CsCl-gesättigtes Isopropanol zugegeben und gevortext. Dabei entstehen zwei Phasen, wobei die obere Ethidiumbromid-haltige Phase verworfen wurde. Dieser Schritt wurde bis zu zehn Mal wiederholt. Nun wurden 3 ml ddH₂O zugegeben und gemischt. Anschließend konnte die Plasmid-haltige Lösung für 15 Minuten bei RT mit 0,7 VT Isopropanol gefällt werden und dann für 20 Minuten bei 6.000 rpm abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Als das Pellet getrocknet war, wurde eine der Pelletgröße entsprechende Menge TE-Puffer auf das Pellet gegeben und dieses über mehrere Tage bei 4°C gelöst.

TB-Medium	
Casein	12 g/l
Hefe-Extrakt	24 g/l
KH ₂ PO	0,17 M
K ₂ HPO ₄	0,72 M
autoklavieren	

Die Quantifizierung der DNA fand, wie unter 2.2.4.3 beschrieben, am Infinite M200 pro NanoQuant der Firma Tecan statt (siehe 2.2.4.3).

2.2.4.15. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung

Die Phenol-Chloroform-Extraktion eignet sich um DNA aus einer RNA und Protein haltigen Lösung auf zu reinigen. Hierzu wurde die Lösung nach Zugabe von 0,5 bis 1 VT phenolhaltige Lösung und 0,5 bis 1 VT Chloroform oder Chloroform-Isoamylalkohol gevortext und bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Phase enthält die DNA. Optional konnte an dieser Stelle die Ausbeute an DNA noch erhöht werden, indem nach der ersten Abnahme der wässrigen Phase der Rest mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 versehen wurde. Anschließend wurde gevortext und erneut zentrifugiert. Die dabei entstehende wässrige Phase wurde mit der zuvor abgenommenen wässrigen Phase vereinigt. Durch erneute Zugabe von 2 VT Chloroform konnte das Phenol aus der DNA-Lösung entfernt werden. Die DNA-haltige, obere Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Ethanol-fällung weiter verwendet. Optional konnte hier eine zweite Phenol-Chloroform-Aufreinigung stattfinden, um die Reinheit der DNA zu erhöhen.

Um die DNA aus der wässrigen Phase zu gewinnen, wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Die DNA konnte durch Zugabe von 2 VT 100 % Ethanol gefällt werden. Die Lösung wurde für 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Zusätzlich kann die Fällung durch Verwenden von NaAc verbessert werden, jedoch steigt auch der Salzgehalt. Auch die Zugabe von 1-2 µl 5 % Glycogen verbessert die Fällung der DNA und das DNA-Pellet wird nach dem Fällen milchig und ist besser sichtbar. Die DNA wurde durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol bei 13.000 rpm für 5 Minuten gewaschen. Überstand wurde qualitativ entfernt und das Pellet getrocknet. Die DNA konnten dann in der einer der Pelletgröße entsprechenden Menge TE-Puffer gelöst werden. Die Konzentration der DNA konnte am Infinite M200 pro NanoQuant der Firma Tecan bestimmt werden (siehe 2.2.4.3).

2.2.4.16. *In vitro* Transkription zur Herstellung von dsRNA

Zur Analyse des *loss-of-function*-Phänotyps von Genen und deren Genprodukten in Zellkultur, stellt der RNAi-Mechanismus ein leicht anwendbares Werkzeug dar. Dabei führt die Transfektion doppelsträngige RNA (dsRNA), die homolog zum Transkript des zu untersuchenden Gen ist, zu einer spezifischen Degradierung von dieser mRNA (Clemens et al. 2000). Die dsRNA wurde benötigt um gezielt Faktoren der SUMO-Kaskade, Pita und ZIPIC, oder CP190 und dCTCF mittels RNAi in S2-Zellen aus zu schalten, um anschließend

die Effekte in ChIP oder Luciferase-Reporter-Assay untersuchen zu können. Hier wurde in Anlehnung an das DRSC-Protokoll (*Drosophila RNAi Screening Center*, Harvard) gearbeitet. Zur Produktion der dsRNA wurde das Komplettsystem MegaScript T7 *in vitro* Transkription-Kit der Firma Ambion verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Als Matrize für die *in vitro* Transkription wurden PCR-Produkte genomischer DNA für spezifische Gene (SUMO-Faktoren, CP190, dCTCF, Pita, ZIPIC und cg30020) verwendet. Die RNA wurde anschließend an die Inkubation der Reaktionen über Nacht bei 37°C mit dem RNeasy-Kit zur DNA-Extraktion aus wässrigen Lösungen von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA konnte am Infinite M200 pro NanoQuant der Firma Tecan bestimmt werden (siehe 2.2.4.3).

Reaktionsansatz	20 µl Ansatz
Ribonucleotid-Mix	8 µl
Reaktionspuffer	2 µl
T7-Enzym-Mix	2 µl
PCR-Fragment/ dsRNA Matrize	1 µg
Add ddH ₂ O	

2.2.5. Assays zur experimentellen Erforschung von Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen

2.2.5.1. Luziferase-Reporter-Assay

Der Luziferase-Reporter-Assay dient der Bestimmung von Effekten bestimmter Faktoren auf eine zu untersuchende DNA-Sequenz, z.B. Enhancer und Silencer, Promotoren oder Isolatoren. Dieser Einfluss zeigt sich dann an der Expression eines Reportergens, in diesem Fall die des Luziferase Gens. Die Luziferase ist ein Enzym dessen katalytische Aktivität Luziferin mit Sauerstoff, unter Verbrauch von ATP, zu energiereichen, instabilen Dioxetanen oder *Dioxetanonen* reagieren (Oxidation). Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz. Diese kann gemessen werden und gibt Aufschluss über die Luziferase-Aktivität bzw. Expression. (Siebring-van Olst et al. 2013, Yun and Dasgupta 2014).

Dieser Assay wurde verwendet, um die Effekte von SUMO-Faktoren auf die Isolator-Funktion verschiedener Isolatoren zu bestimmen.

Dazu wurden 1×10^6 Zellen pro Well auf 6-Well-Platten in *basic* Schneider Medium ausgesät und anschließend wurden die Zellen mit 8 μg dsRNA behandelt (siehe 2.2.2.6). Bei den Zellen handelte es sich um stabil mit einem Luziferase-Reporter-System transfizierte S2-Zellen (Bohla et al. 2014). Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet und anschließend mit 250 μl Luziferase-Lysepuffer behandelt. Dabei wurden die Proben bei RT für 15 Minuten unter permanentem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 1 Minute bei 13.000 rpm abzentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. 25 μl des Lysats wurden auf leere 96-Well-Platten, speziell für den Luziferase-Assay, überführt und danach 25 μl Luziferin/ATP-Lösung zugegeben. Am Luminometer der Firma Bechthold wurde nun die Biolumineszenz gemessen, die auf die Luciferase-Aktivität und damit auf den Einfluss der SUMO-Faktoren auf die Isolation schließen ließ.

Luziferase-Lysepuffer	
1 M Tris/HCl pH 7,5	25 mM
1 M MgCl ₂	8 mM
0,5 M EDTA	1 mM
10 % Triton X-100	1 %
100 % Glycerin	15 %
Add ddH ₂ O	

Luziferin-ATP-Lösung	
90 mg/l	D-Luziferin
0,8 mM	ATP
pH7 einstellen	500 mM NaOH
Add ddH ₂ O	

2.2.5.2. Immunpräzipitation für SUMOylierte Proteine

Die Immunpräzipitation (IP) ist eine wertvolle Methode, um bestimmte Zielproteine aus Zellen oder Geweben zu extrahieren. (Sarge and Park-Sarge 2009). Dazu werden spezifische Antikörper verwendet, die gegen die Zielproteine gerichtet sind. In diesem Fall wurde eine FLAG-IP zur Aufreinigung FLAG-His-dSUMO-modifizierter Proteine verwendet.

Auch bei der Immunpräzipitation von SUMOylierten Proteinen musste verhindert werden, dass die Proteasen die SUMOylierung abbauen. Daher wurde auch hier ein Protokoll mit denaturierenden Bedingungen genutzt, um eine De-SUMOylierung zu vermeiden. Außerdem

wurde mit Enzym-inhibierenden Chemikalien wie 1 M DDT und 1 M NEM gearbeitet um die Aktivität der Proteasen herab zu setzen.

Zellysat herstellen

Für die Immunpräzipitation wurden jeweils 2×10^7 Zellen pro Flasche ausgesät und diese für 48 Stunden im Inkubator gehalten. Bei induzierbaren Konstrukten wurde nach 24 Stunden die Induktion der FLAG-His-dSUMO-Überexpression, mittels CuSO_4 , gestartet. Die Zellen wurden dann, wie unter 2.2.2.8 beschrieben, geerntet.

Die Zellen wurden erneut in kaltem 1x PBS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und dann für 1 Minute bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 150 μl Lysepuffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 350 μl IP-Puffer zugegeben. Die Zellen mussten nun für 3x für 1 Sekunden, bei konstanter Stärke am Branson Sonifizierer vollständig aufgeschlossen werden. Danach wurden nochmals 1ml IP-Puffer zum Lysat gegeben, sodass eine 1:10 Verdünnung des Ursprünglichen Lysats erreicht wurde. Nun wurden die Zelltrümer für 20 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden.

SDS-Lyse-Puffer

1 M Tris/HCl pH 7,5	50 mM
10 % SDS	1 %
1 M NEM	10-20 mM
1 Tablette PIC auf 10 ml	
Add ddH ₂ O	

IP-Puffer

1 M Tris/HCl pH 7,4	20 mM
5 M NaCl	150 mM
100 % Glycerin	10 %
10 % NP40	0,1 %
1 M DDT	1 mM
1 Tablette PIC auf 10ml	
Add ddH ₂ O	

Pre-Clearing und IP

Damit unspezifische Bindungen von Protein an die Protein-A/G-Agarosebeads vermieden werden konnte, mussten die Lysate zuvor 1 Stunde bei 4°C auf zuvor mit IP-Puffer äquillibrierten Agarosebeads auf dem Rad inkubieren. Die Protein-A/G-Agarosebeads wurden anschließend bei 2.500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Für die IP wurden gleiche Konzentrationen an FLAG-Antikörper, für die Präzipitation von FLAG-SUMOyliertem Protein, bzw. unspezifischem Maus-IgG eingesetzt.

Das Lysat-Antikörper-Gemisch wurde nun für 2,5 Stunden bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Anschließend wurde es über Nacht bei 4°C mit äquillibrierten Protein-A/G-Agarosebeads auf dem Rad inkubiert.

Anschließend wurden die Protein-A/G-Agarosebeads 2 Minuten, bei 2.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und dann der Überstand verworfen. Die Beads konnten nun 4x mit IP-Puffer gewaschen werden. Dazu wurden die Protein-A/G-Agarosebeads für 5 Minuten bei 4°C auf dem Rad in IP-Puffer inkubiert. Anschließend wurde erneut für 2 Minuten, bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Am Ende des letzten Waschschrilles wird der Überstand qualitativ abgenommen und 4x Roti-Load-Ladepuffer zu den Protein-A/G-Agarosebeads gegeben. Die Proben wurden danach für 15 Minuten bei 100°C gekocht. Die Proben konnten nun bei -20°C eingefroren werden, oder gleich im Western Blot weiter verarbeitet werden.

2.2.5.3. Chromatin-Immunpräzipitation

Die Technik der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ermöglicht den Nachweis der Interaktion von Chromatin-assoziierten Faktoren mit spezifischen DNA-Sequenzen *in vivo* (Gould et al. 1990, Orlando et al. 1997, Solomon and Varshavsky 1987). So lassen sich ganze Proteinkomplexe an bestimmten DNA-Abschnitten feststellen. Dies kann Aufschluss über die Funktion der Proteine, aber auch der DNA-Abschnitte geben. Dieser Assay wurde verwendet um die Kollokalisierung von SUMOylierung und CP190, sowie dCTCF fest zu stellen, aber auch um die Kollokalisierung von CP190, Pita, ZIPIC und cg30020 fest zu stellen.

Chromatin herstellen

Zunächst wurden hierfür 2×10^7 Zellen/Flasche ausgesät. Die Zellen wurden je nach transfiziertem Vektor-Konstrukt nach 24 Stunden mit 100 mM CuSO₄ induziert und nach 48 Stunden geerntet. Aufgrund unterschiedlichen Wachstumsverhaltens wurden die Zellen am Zellzähler gezählt und auf die Zellmenge auf die niedrigste, bestimmte Zellzahl eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 % Fomaldehyd für 12 Minuten, bei 18°C, auf dem

Schüttler fixiert. Dabei werden auch die Proteine, die direkt oder indirekt auf der DNA sitzen, an die DNA gebunden. Um die Fixierung ab zu stoppen wurden 125 mM Glycin zugegeben und erneut für 10 Minuten bei 18°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen konnte nun 3 Minuten bei 2.500 rpm und 4°C abzentrifugiert werden, um Medium und Formaldehyd zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen nochmal mit kaltem 1x PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte nun für 10 Minuten, bei 4°C. Die Zellen wurden dafür in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und in 15 ml Hartplastik-Zentrifugengefäße überführt, die für das Sonifizieren geeignet sind. An dieser Stelle wurden 30µl der Zelllysate in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, die für eine Expressionsanalyse im Western Blot (siehe 2.2.3.4) verwendet wurden. Danach erfolgte das Sonifizieren der Zellen am Bioruptor von BioRad unter Eiskühlung, bei hoher Frequenz, für insgesamt 20 Zyklen, wobei ein Zyklus aus 30 Sekunden Sonifizieren und 30 Sekunden Pause bestand. Nach 10 Zyklen wurde das Eis im Bioruptor erneuert. Im Anschluss wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten, bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert, um Zelltrümmer aus der Lösung zu entfernen. Das Zelllysate wurde nun 1:10 mit Dilution-Puffer verdünnt, der mit Glycerol versehen wurde, um das Chromatin länger haltbar zu machen. Das Chromatin wurde bei -20°C gelagert.

Um die Qualität des Chromatins zu überprüfen, wurde ein RNaseA und Proteinase K Verdau durchgeführt und die DNA anschließend mit Phenol-Chloroform (siehe 2.2.4.15) aus der Lösung extrahiert. Die Fällung der DNA erfolgte mittels Isopropanol. Die in ddH₂O gelöste DNA wurde anschließend auf einem 1,5 % EtBr-Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die DNA-Fragmente sollte dabei eine Basenpaarlänge zwischen 100 bp und 500 bp haben, um für den ChIP weiter verwendet werden zu können. Außerdem sollten die unterschiedlichen Proben etwa gleiche Qualität und Menge an DNA enthalten.

ChIP-Lysepuffer

10 % SDS	1 %
0,5 M EDTA	10 mM
1 M Tris/HCl pH 8	50 mM
1 Tablette PIC	
Add ddH ₂ O	

Dilution-Puffer

10 % SDS	0,01 %
10 % Triton X-100	1,1 %
0,5 M EDTA	1,2 mM
1 M Tris/HCl pH 8	16,7 mM
5 M NaCl	167 mM
Add ddH ₂ O	

Pre-Clearing, IP mit spezifischen Antikörpern und Waschen

Hatte das Chromatin eine gute Qualität und waren die Expression und die Induzierbarkeit von FLAG-His-dSUMO vorhanden, konnte das Chromatin für die Immunpräzipitation (IP) mit spezifischen Antikörpern verwendet werden. Bei den Experimenten mit Pita, ZIPIC und cg30020 wurde vor dem Verwenden des Chromatins für die IP der *knock down* der Faktoren überprüft.

100 µl Chromatin werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und als 10 % Input bei -20°C bis zur weiteren Behandlung weggefroren.

Für die Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern musste zunächst ein Pre-Clearing des Chromatins vorgenommen werden. Hierbei wurden jeweils 1 ml des Chromatins auf, zuvor in Dilution-Puffer äquilibrierte, Protein-A/G-Agarosebeads gegeben und eine Stunde bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Anschließend wurden die Agarosebeads bei 2.500 rpm, bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Für die IP wurden dem Chromatin spezifische Antikörper gegen Pita, ZIPIC oder cg30020 sowie CP190, dCTCF und FLAG-His-dSUMO zugegeben. Als Negativ-Kontrolle wurde Maus-IgG verwendet.

Eingesetzte Antikörper:

Antikörper	Menge
IgG (Maus)	2 µl
α-CP190 (Ratte)	2 µl
α-dCTCF (Hase)	2 µl
α-FLAG (Maus)	5 µl
α-Pita	2 µl
α-ZIPIC	2 µl
α-cg30020	10 µl

Da weder von α -Pita, α -ZIPIC, oder α -dCTCF, noch von α -CP190 die Konzentration an Antikörper in der Lösung bekannt war, wurden sie in derselben Menge wie der IgG eingesetzt. α -cg30020 ist ein eher schwach bindender Antikörper und wurde daher in größerer Menge eingesetzt. α -FLAG wurde äquimolar zum IgG eingesetzt.

Das Chromatin-Antikörper-Gemisch wurde für 3 Stunden bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch erneut auf, zuvor in Dilution-Puffer äquilibrierte Protein-A/G-Agarosebeads gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Agarosebeads wurden dann bei 2.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit ungebundenem Chromatin verworfen. Um unspezifische Bindungen der DNA an die Beads zu reduzieren, wurden diese mit verschiedenen Wasch-Puffern gewaschen. Dabei erfolgte jeweils eine 10-minütige Inkubation bei 4°C auf dem Rad. Anschließend wurden die Beads bei 2.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Verwendete Waschpuffer:

Low Salt Puffer	
10 % SDS	0,1 %
10 % Triton X-100	1 %
0,5 M EDTA	2 mM
1 M Tris/HCl pH 8	20 mM
5 M NaCl	150 mM
Add ddH ₂ O	

High Salt Puffer	
10 % SDS	0,1 %
10 % Triton X-100	1 %
0,5 M EDTA	2 mM
1 M Tris/HCl pH 8	20 mM
5 M NaCl	500 mM
Add ddH ₂ O	

LiCl-Puffer	
2,5 M LiCl	0,25 %
10 % NP40	1 %
0,5 M EDTA	1 mM
1 M Tris/HCl pH 8	10 mM
10 % DOC	1 %
Add ddH ₂ O	

TE-Puffer (2x)	
1 M Tris/HCl pH 8	10 mM
0,5 M EDTA	1 mM
Add ddH ₂ O	

Am Ende des letzten Waschschrilles wird der Überstand qualitative abgenommen.

Chelex- und Säulen-Aufreinigung der ChIP-DNA

100 µl Chelex wurden zu den Immunpräzipitationen und den entsprechenden Inputs gegeben. Anschließend wurden für 10 Sekunden gevortext und die Proben wurden bei 100°C, für 10 Minuten gekocht. Danach konnte ein ProteinaseK-Verdau durchgeführt werden. Dafür wurden 10 µg/ml ProteinaseK (Stock: 20 µg/µl) zugegeben, erneut gevortext und für 1 Stunden, bei 55°C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren wurden die Proben für 30 Minuten, bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die A/G-Agarosebeads und das Chelex bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden erneut 120 µl bzw. 60 µl ddH₂O auf das Chelex-Agarosebeads-Gemisch gegeben und erneut 10 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 100°C gekocht. Danach wurden Chelex und Agarosebeads erneut für 1 Minute, bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit dem bereits abgenommenen Anteil vereinigt, um die Ausbeute an spezifisch gebundener ChIP-DNA zu erhöhen. Input und IP-Proben sollten am Ende dasselbe Volumen haben.

Allternativ zur Aufreinigung über Chelex, wurde das Illustra Kit für PCR DNA- und Gelbanden-Aufreinigung von GE Healthcare verwendet. Dazu wurden nach dem Waschen 100 µl TE-Puffer auf die Protein-A/G-Agarosebeads gegeben. Danach wurde ein RNase- und ProteinaseK-Verdau durchgeführt. Anschließend folgte das De-crosslinken über Nacht, bei 65°C. Nun konnte die Aufreinigung über Säulen nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Diese Methode erzeugt sehr gleichmäßige Ergebnisse und führt zu sehr sauberer

DNA. Die Chelex-Methode ermöglicht allerdings eine höhere DNA-Ausbeute, weshalb diese auch für die ChIP-Sequenzierung verwendet wurde.

Die Proben konnten nach der Aufreinigung zur Analyse mittels qPCR verwendet werden (siehe 2.2.4.6 und 2.2.4.8). Eine Verdünnungsreihe vom Input für eine Standardkurve wurde erstellt (20 %, 2 %, 0,2 %). Primer für spezifische Bindestellen von dCTCF/CP190, sowie CP190, Pita, ZIPIC und cg30020 und Kontrollprimer für Negativ-Bindestellen wurden verwendet (siehe 2.1.12).

2.2.5.4. ChIP-Sequenzierung

Die genomweite Untersuchung der Bindung eines Proteins an das Chromatin konnte mittels Sequenzierung des Materials aus dem ChIP erreicht werden. Dazu wurden 10 ng der Immunepräzipitationen aus dem ChIP und des Input gesammelt und in dem Vakuumverdampfer, Speed Vac, auf ein Volumen von 30 µl eingedampft. Dabei ist es wichtig dass die DNA in ddH₂O eingedampft wird. Die DNA wurde dafür bei der Aufreinigung stets in Wasser eluiert.

Qubit-Messung

Die Konzentration wurde nach dem Eindampfen mit Hilfe des Qubit gemessen, der sich zur Bestimmung sehr geringer Nukleinsäure-Konzentrationen eignet. Dazu wurde zunächst eine Standardkurve mittels vorgegebener Nukleinsäuren festgelegt. Anschließend wurden dann die Proben gemessen. Die Proben und die Standards werden auf dieselbe Weise vorbereitet. Dazu werden 2 µl des Inputs, 5 µl der ChIP-Proben und 2 µl der Standards zu 200 µl einer Lösung gegeben, die aus einem spezifischem Puffer und einer durch diesen verdünnten Fluoreszenzfarbstoff besteht. Die Verdünnung der Proben, um den Faktor 200, musste bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden. Diese Methode wurde für die Quantifizierung der Proben des FLAG-dSUMO-, sowie für die des dCTCF- und des CP190-ChIP verwendet.

Pico-Green-Messung

Alternativ wurde auch die *Pico-Green*-Methode zur Quantifizierung der DNA-Menge in den ChIP-Proben verwendet. Diese ist weniger genau als die Quantifizierung am Qubit. Dabei wird ebenfalls eine Standardkurve (1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng, 15,7 ng, 7,9 ng, 3,9 ng, 1,95 ng, 0,97 ng und 0 ng) mittels Lachssperma-DNA angefertigt. Genau wie die ChIP-Proben werden diese in 100 µl eine Lösung gegeben, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (*Pico-Green*) versehen sind. Anschließend wurden 2 µl der Standardlösungen und 2 µl der jeweiligen ChIP-Proben-Lösungen am am Infinite M200 pro NanoQuant der Firma Tecan gemessen. Dabei wurde wieder die Quarzplatte verwendet, aber

ein anderes Protokoll zur Messung der Konzentration, als es bei der Standard Konzentrationsbestimmung verwendet wurde. Diese Methode wurde für die Quantifizierung der Proben des Pita-, ZIPIC- und cg30020-ChIP genutzt.

Library-Präparation und Sequenzierung

Die ChIP-Proben wurden nach Braunschweig zur Sequenzierung verschickt. Dort wurde eine Library-Präparation der Proben mit dem Illumina ChIPSeq DNA Sample Prep Kit nach Herstellerangaben von Illuminas vorgenommen. Anschließend wurden mit der Illustra Cluster Station DNA-Cluster generiert und worauf eine standardisierte Sequenzierung am Genome Analyzer IIx folgte.

Um genug Material aus dem ChIP für die Sequenzierung zu erlangen mussten drei biologische Replikate von CP190-, dCTCF-, und FLAG-His-dSUMO-IP vereinigt werden. Zur späteren Validierung des ChIP-Seq-Experiments mittels qPCR wurden jeweils 30 µl jeder Probe vor dem Eindampfen abgenommen.

2.2.5.5. FAIRE-Assay (Formaldehyd assisted isolation of regulatory elements)

Der FAIRE-Assay eignet sich um den Chromatinstatus der Zelle fest zu stellen. Dabei kann man mit dieser Methode feststellen ob und wie sich der Chromatinstatus durch eine bestimmte Behandlung, z.B. RNAi oder Hormon, verändert (Giresi et al. 2007, Simon et al. 2012). In dieser Arbeit wurde der FAIRE-Assay zur Analyse des Chromatinstatus mit und ohne FLAG-His-dSUMO Expression genutzt.

FAIRE-Chromatin herstellen

2x 10⁷ Zellen pro Flasche wurden ausgesät und nach 48 Stunden, wie unter 2.2.2.8 beschrieben, geerntet. Die Zellen konnten bereits nach 24 Stunden für die Expression von FLAG-His-dSUMO induziert werden. Die abgeernteten Zellen wurden in 50 ml Zentrifugengefäße überführt. Anschließend wurde der Chromatinstatus mit 1 % Formaldehyd für 4 Minuten bei 18°C auf dem Schüttler fixiert. Die Fixierung wurde mit 125 mM Glycin abgestoppt. Die Inkubation hierfür erfolgte für 10 Minuten, bei 18°C, auf dem Schüttler. Anschließend wurden 3 Minuten, bei 2.500 rpm und 4°C zentrifugiert, um das Medium und das Formaldehyd zu entfernen. Daraufhin mussten die Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen werden, um das Formaldehyd vollständig zu entfernen.

Die Zellen wurden nun erneut in 1x PBS aufgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und dann bei 14.000 rpm für 1 Minute bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml FAIRE-Lyse-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (siehe oben). Der Überstand konnte wieder verworfen werden und das

Pellet wurde erneut in 1,5 ml FAIRE-Lysepuffer resuspendiert. Das Lysat wurde nun in ein 15 ml Hartplastik Zentrifugengefäß überführt, das für das Sonifizieren der Proben geeignet ist. Das Sonifizieren der Zellen erfolgt unter denselben Bedingungen, die auch für den ChIP genutzt wurden (siehe 2.2.5.3). Im Anschluss an das Sonifizieren wurden die Proben in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer aus der Lösung zu entfernen. Der Überstand wurde Anschließend in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach konnte das Chromatin bei -20°C eingefroren oder direkt weiter bearbeitet werden.

FAIRE-Lysepuffer	Stock
10 mM Tris/HCl pH 8,0	1 M
2 % Triton X-100	100 %
1 % SDS	10%
100 mM NaCl	5 M
1 mM EDTA	100 mM
Bei 4°C 6-12 Monate haltbar	

FAIRE-Proben

500 µl des FAIRE-Chromatin wurden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine doppelte Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA aus der Lösung vorgenommen. Außerdem erfolgte eine Fällung mit 100%igem Ethanol bei -80°C für 2 Stunden (siehe 2.2.4.15). Das DNA-Pellet wurde in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,4 gelöst. Danach wurde ein 10 µg/ml RNaseA (Stock: 10 mg/ml) und ein 10 µg/ml ProteinaseK (Stock: 20 mg/ml) -Verdau vorgenommen. Es erfolgte ein De-Crosslinken und ein Inaktivieren der Enzyme über Nacht bei 65°C. Die Proben wurden mit dem Illustra Kit für PCR DNA- und Gelbanden-Aufreinigung von GE Healthcare aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde mit 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,4 eluiert.

20 % Input

100 µl FAIRE-Chromatin (20 % Input) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden ein RNaseA- und ein ProteineaseK-Verdau durchgeführt (siehe oben). Daraufhin erfolgte ein De-Crosslinken bei 65°C über Nacht. Die Proben wurden nun mit 200 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,4 auf 300 µl aufgefüllt und anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA aus der Lösung vorgenommen, die dann in einer Ethanol-fällung bei -80°C für 2 Stunden präzipitiert wurde (siehe 2.2.4.15). Das Pellet wurde in 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,4 gelöst. 5 µl des Inputs werden zur Untersuchung der

Chromatinqualität auf einem 1,5 % EtBr-Agarosegel abgenommen und mit 6x Ladepuffer (Orange-Dye) versetzt. Die Größe der Fragmente des FAIRE-Chromatins sollte ca. 300 bp betragen.

Für Analyse mittels qPCR (siehe 2.2.4.6 und 2.2.4.8) wurden die Proben (FAIRE und Input) 1:10 verdünnt. Eine Verdünnungsreihe vom Input für eine Standardkurve wurde erstellt (20 %, 2 %, 0,2 %). Primer für spezifische Bindestellen und Kontrollprimer für offenes Chromatin (z.B. aktiver Promotor) und geschlossene Stellen im Chromatin (Heterochromatin) wurden verwendet (2.1.12).

2.2.6. Bioinformatische Analysen

Die bioinformatischen Analysen wurden von Dr. Marek Bartkuhn (JLU Gießen) durchgeführt.

2.2.6.1. GEO-Analyse von RNAi-Daten

Die GEO-Analyse eignet sich um Faktoren einer oder mehreren biologischen Eigenschaften oder Funktionen zu zuordnen. Hier wurde die Faktoren, die mit einem Z-Wert > 2 im Screen indentifiziert wurden, in einer GO-Term-Analyse näher untersucht, wobei der Fokus auf die molekulare Funktion der untersuchten Faktoren gelegt wurde. Dazu wurden diese Faktoren bzw. ihre Gennamen in das online GO-Term-Analyse-Werkzeug GeneCoDis3 eingegeben (Tabas-Madrid et al. 2012). Alle Faktoren, die signifikant (p -Wert $< 0,05$) einer molekularen Eigenschaft zugeordnet werden konnten, wurden in einem Diagramm in Microsoft Excel dargestellt.

2.2.6.2. ChIP-Seq-Analyse und Peak-Calling

Die ChIP-Seq-Reads wurden in des fastq-Format konvertiert und anschließend über den dm3 Referenzindex über BOWTIE (Langmead 2010) aligniert. Die Sequenzierungsdaten wurden über FastQC auf ihre Qualität überprüft. Eindeutig zuordenbare Read und einzigartige Reads wurden für die nachfolgende Erstellung der Bindeprofile und für das Peak-Calling über MACS (Zhang X. D. et al. 2008) und PeakRanger (Feng et al. 2011) genutzt. Dabei wurden die Reads des sequenzierten Input als Kontrolle genutzt. Die Peak-Calling-Bedingungen waren dabei p -Wert $< 10^{-5}$ und FDR < 5 %. Alle weiteren Analysen wurden im R/BioConductor (<http://www.bioconductor.org>) vorgenommen. Peaks wurden als überlappend determiniert, wenn sie in mindestens 1 bp Intervall überlagerten.

2.2.6.3. Visualisierung der Bindprofile

Nach Erweitern der Reads wurden fortlaufende Deckungsvektoren kalkuliert. Diese wurden pro Millionen Reads im Bereich der Größe der entsprechenden DNA-Bibliotheken normalisiert. Diese Daten wurden genutzt, um Daten verschiedenen Größenverhältnissen (zum Beispiel von Transkriptionsfaktor-Peaks) zusammen zu fassen. Dabei wurde die Anwendung sitepro (Shin et al. 2009) verwendet. Die Bindedaten wurden mit Bindestellen in einem 50 bp Fenster überlagert. Dabei wurde der Mittelwert jeder Position berechnet um Kumulative Bindeprofile zu generieren.

2.2.6.4. Motivsuche und -analyse

Sequenzen in einem Bereich von +/- 50 bp um ein Peak-Maximum wurden extrahiert. Dies wurde für 500 Peaks durchgeführt. Diese Sequenzen wurden mit MEME-ChIP (<http://meme.ebi.edu.au/>) (Machanic and Bailey 2011) bearbeitet, um de novo Motive und bekannte Motive zu identifizieren, die innerhalb der Region des Peaks des zu untersuchten Faktors zu finden waren. Um die Beziehung zwischen den auftauchenden Motiven und der Stärke der Bindung des jeweiligen Faktors zu ermitteln, wurde die matchPWM-Funktion des Biostrings Packages innerhalb von R/BioConductor genutzt. Dabei wurden die gefundenen Motive innerhalb eines Intervalls über ihre jeweilige Motiv-Qualität eingestuft.

2.2.6.5. Vergleich mit publizierten Datensätzen

Um die ChIP-seq Bindedaten mit Genexpression vergleichen zu können, wurden Affymetrix Microarray Daten genutzt, die eine Abschätzung der Expression aller in *Drosophila* S2-Zellen exprimierter Gene erlaubte (Page et al. 2005). Zum Vergleich mit der Bindung anderer TF bzw. IBPs wurden ChIP-Chip-Daten, die von der online-Plattform modENCODE Consortium zur Verfügung gestellt wurden (The modENCODE Consortium et al. 2010) (www.modencode.org) und ChIP-Seq-Daten anderer Arbeitsgruppen (Cuartero et al. 2014, Gonzalez et al. 2014, Maksimenko et al. 2015, Ong et al. 2013), genutzt. Um den Vergleich der Daten möglich zu machen, wurden die Daten in 100 bp Bins umgelagert und mittels Z-Normalisierung transformiert. Für die Korrelationsanalyse wurde entweder Pearson's R geonomweiter Gesamt-Bins kalkuliert, oder es wurden Bins die mit Regionen signifikanter Bindung zweier Faktoren assoziiert sind, kalkuliert. Alternativ wurden Peak-Intervalle von modENCODE heruntergeladen und die Überlagerung mit den vorhandenen Peaks dieser Arbeit determiniert. Zwei Peaks wurden als überlappend bezeichnet, wenn sie mindestens in einem Intervall von 1 bp überlappen. Für den Vergleich von zwei Peaks-Sets wurde die erwartete Überschneidung, basierend auf einer zufälligen Verteilung der Peaks, berechnet.

Die Ration zwischen beobachteter/tatsächlicher und erwarteter Überschneidung wurde als Wert genutzt um den Grad der Überlagerung für multiple Vergleiche ein zu ordnen.

2.2.6.6. Vergleich mit genomischen Annotationen

RefSeq Genannotationen für *Drosophila* wurden von der UCSC Homepage (version dm3) herunter geladen. Danach wurde das Genom in folgende Intervalle aufgeteilt: Transkriptionlle Startstelle (TSS; +/- 1 kb um RefSeq Startstelle), TSS upstream (-10 kb bis -1 kb), Transkriptionelle Endstelle (TES; +/- 1 kb um Transcriptional end sites), Exons, Introns und alles was nicht in diese Klassen passte wurde als intergenisch betrachtet. Die Peaks der untersuchten Faktoren wurden mit den Annotationsintervallen überkreuzt und die relative Assoziation wurde berechnet (als Funktion des kompletten Genoms). Außerdem wurde die ermittelte relative Assoziation mit der Verteilung des genomischen Hintergrundrauschens verglichen.

3. Ergebnisse

CP190 hat eine wichtige Funktion bei der Isolation von Chromatin und damit verbunden auch bei der Genregulation in *Drosophila melanogaster* (Heseding et al. 2016, Korenjak et al. 2014). Außerdem ist CP190 an der Brückenbildung und Interaktion zwischen Isolator und Promotor verantwortlich (Liang et al. 2014). CP190 interagiert zudem mit fünf von sieben bisher bekannten Isolator-bindenden Proteinen. Dazu zählen dCTCF (*CCCTC-binding Factor*) (Moon et al. 2005), BEAF-32 (*Boundary Element-associated Factor of 32kDa*) (Roy et al. 2007a, Roy et al. 2007b, Zhao et al. 1995), Su(Hw) (*Suppressor of Hairy wing*) (Geyer and Corces 1992), sowie Ibf1 und Ibf2 (*Insulator-binding Factor 1 und 2*) (Cuartero et al. 2014). Da CP190 nicht selbst an die DNA binden kann wird vermutet, dass es durch diese Isolator-bindende Proteine rekrutiert wird. Es ist zu vermuten, dass CP190 noch weitere Interaktionspartner hat, die entweder ebenfalls Isolator-bindende Proteine sind, oder aber zur Funktion von CP190 beitragen. Im Folgenden wurden potentielle Interaktionspartner von CP190 analysiert.

3.1. Die ZAD-Proteine Pita und ZIPIC kolokalisieren auf der DNA an gemeinsamen Bindestellen mit CP190

Die Mitglieder der ZAD (Zinkfinger-assoziierte Domäne) -Familie sind potentielle Kandidaten für die Interaktion mit CP190. Sie machen 10 % aller Transkriptionsfaktoren in Dipteren aus (Benson et al. 2009). Sie haben genau wie die Zinkfingerproteine, zu denen CP190 und dCTCF zählen, C2H2-Typ Zinkfinger, die sie zur Bindung von DNA verwenden (Chung et al. 2007, Chung et al. 2002). Zu den Mitgliedern der ZAD-Familie zählen auch Pita, ZIPIC und cg30020. Mittels Yeast-Two-Hybrid-Screen und auch durch Massenspektrometrie und Co-IPs wurden, diese als Interaktionspartner von CP190 und dCTCF identifiziert (Maksimenko et al. 2015).

Hier wurde die Bindung dieser Faktoren an Chromatin und ihre Kolokalisation mit CP190 untersucht, um zu analysieren, ob CP190 durch diese ZAD-Proteine rekrutiert wird und ob dies zu einer gemeinsamen Funktion der Faktoren bei der Isolation führt. Dafür konnten genomweite Untersuchungen der Pita-, ZIPIC- und cg30020-Bindung, mittels Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-Seq), durchgeführt werden. Anschließend wurden die Daten mit ChIP-Chip-Daten von CP190 verglichen. Die dabei gefundenen Resultate wurden mittels *knock down* von Pita, ZIPIC und CP190 in ChIP-qPCR-Experimenten validiert.

3.1.1. Pita- und ZIPIC-knock down und die jeweiligen Antikörper waren spezifisch für die zu untersuchenden Faktoren

Um das Bindeverhalten Pita, ZIPIC und cg30020 im Zusammenhang mit CP190 zu untersuchen, sollte CHIP-qPCR- und CHIP-Seq-Experimente durchgeführt werden. Damit dies für diese Proteine vorgenommen werden konnte, war es nötig zunächst die Spezifität der Antikörper, die für den CHIP zur Verfügung standen, durch spezifischen *knock down* von Pita, ZIPIC und cg30020 überprüft. Wildtypische S2-Zellen wurden dafür ausgesät und ein *knock down* für CP190, dCTCF, Pita, ZIPIC und cg30020 mit der entsprechenden dsRNA durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Kontroll-*knock down* gegen Luziferase (*luci*) durchgeführt. Die Zellen wurden nach vier Tagen geerntet. Nun wurden die Zellen auf den mRNA-Level, so wie den Proteinlevel, für die zuuntersuchenden Faktoren, analysiert.

Es wurde eine RNA-Extraktion, mit anschließender reversen Transkription und darauf folgender semiquantitativer-PCR durchgeführt. Als Kontrolle für genomische DNA dienten die RNA-Kontrollen (RNA), die statt cDNA mRNA enthielt. Die Reinheit der semiquantitative PCR wurde mittels Wasserkontrolle überprüft. Die -RT-Kontrolle (ohne reverse Transkriptase) diente der Untersuchung möglicher Kontaminationen des RT-Kits mit genomischer DNA. Das Genprodukt von RPL32, einem Haushaltgen, dienten als Ladekontrolle (Abbildung 11).

Bei der Untersuchung des *knock downs* auf RNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der dsRNAs von Pita und ZIPIC eine spezifische Reduktion der mRNA bzw. der cDNA dieser Faktoren zur Folge hatte, wenn man diese Proben mit der des unspezifischen Luziferase (*luci*) *knock downs* verglich (Abbildung 1, (i)). Zudem zeigten zwei von fünf (dsRNA cg30020: 1 und 3) der getesteten dsRNAs, die gegen die mRNA von cg30020 gerichtet waren, eine Reduktion des cDNA-Signales im Vergleich zum Luziferase-*knock down* (Abbildung 11, (ii)). Auch die als Positiv-Kontrolle für den *knock down* genutzte dsRNA gegen das dCTCF-Transkript, hatte eine Reduktion der mRNA bzw. der entsprechenden cDNA zur Folge. CP190, die zweite Positiv-Kontrolle, zeigte keine spezifische Reduktion der mRNA/cDNA, im Vergleich zum unspezifischen *knock down* (*luci*) (Abbildung 11, (i)). Wahrscheinlich war der *knock down* in diesem Experiment nicht erfolgreich, oder die CP190-Expression war zu stark um, die gesamte mRNA zu reduzieren. Das Haushaltgen RPL32 zeigte identische Level des Genprodukts in allen Proben. Dies zeigte, dass die Proben gleiche Mengen an mRNA bzw. cDNA enthielten und damit vergleichbar waren. Die Negativ-Kontrollen zeigten keinerlei Kontamination des Experimentes mit genomische DNA oder cDNA, was die Spezifität der Ergebnisse dieses

Experimentes unstreicht. Dieses Experiment zeigte, dass die dsRNAs gegen Pita, ZIPIC und cg30020, einen spezifischen *knock down* der Transkripte dieser Gene zur Folge hatten (Abbildung 11).

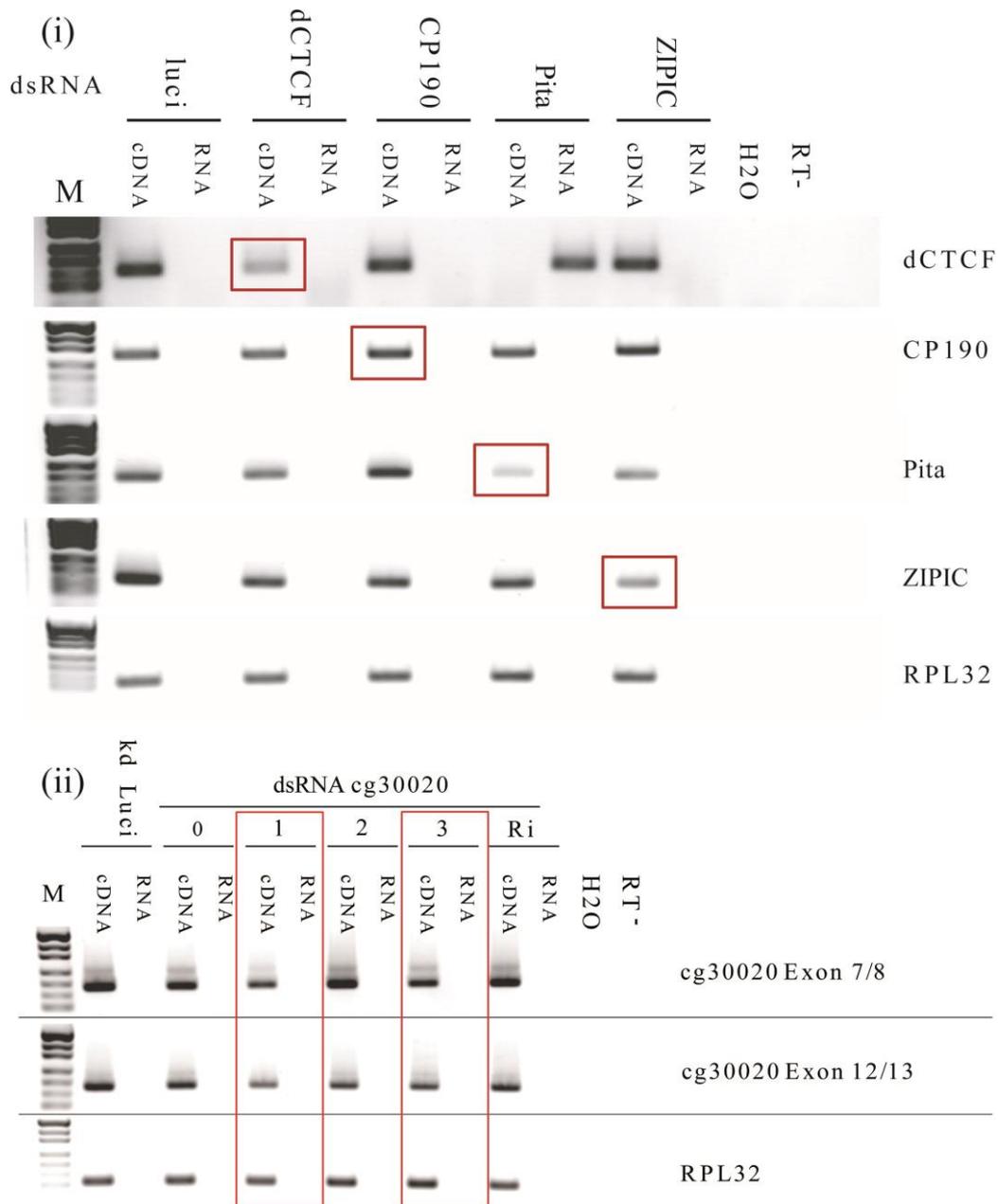


Abbildung 11: Die dsRNAs für dCTCF, CP190, Pita, ZIPIC und cg30020 waren spezifisch und führten zum *knock down* der mRNA. RT-PCR auf EtBr-Agarosegel der Extrakte von S2-Zellen, die einem *knock down* für (i) CP190, dCTCF, Pita, ZIPIC oder (ii) cg30020 (verschiedene dsRNAs: 0, 1, 2, 3, Ri) unterzogen wurden. Die Zellen wurden ausgesät und ein *knock down* durchgeführt. Die RNA wurde extrahiert und diese mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in der semi-quantitativen RT-PCR eingesetzt. Dabei wurden Intron überspannende Primer für Genprodukte von CP190, dCTCF, Pita, ZIPIC oder cg30020 eingesetzt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf einem 2,5 % EtBr-Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard (M=Marker) diente der Gene Ruler 1 kb von Thermo Scientific. Als Kontrolle der RNA auf genomische DNA diente die RNA-Kontrollen (RNA). Die -RT-Kontrolle (ohne Reverse-Transkriptase) diente als Kontrolle der reversen Transkription. Die Wasserkontrolle diente der Kontrolle der PCR (H2O).

Die Extraktion des Gesamtproteins erfolgte mittels RIPA-Puffer-Methode. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Danach wurde eine Immundetektion von CP190, dCTCF, Pita, ZIPIC und cg30020 vorgenommen. Als Ladekontrolle wurde das Haushaltsgen, β -Tubulin, detektiert (Abbildung 12).

Der jeweilige *knock down*, der zu untersuchenden Transkripte, führte jeweils zur spezifischen Reduktion des Signales für Pita bei 100 kDa und ZIPIC bei 45 kDa. Der *knock down* führte nicht zur Reduktion von Signalen der jeweils anderen Proteine, was ebenfalls für die Spezifität des *knock downs*, aber auch für die der Antikörper spricht. Die Spezifität des *knock down* konnte auch auf RNA-Ebene in einer *semi*-quantitativen RT-PCR gezeigt werden (Abbildung 11, (i)). Dies zeigte, dass die dsRNAs einen spezifischen *knock down* der Proteine hervorrufen, aber auch dass die Antikörper für Pita und ZIPIC spezifisch sind. Als Positiv-Kontrolle für den *knock down* wurden dsRNAs gegen dCTCF und CP190 eingesetzt. Diese führten, wie zu erwarten war, zur spezifischen Reduktion der jeweiligen Proteine. Das Haushaltsgen β -Tubulin blieb durch den jeweiligen *knock down* unbeeinflusst und wies relativ gleichmäßige Mengen an Protein auf (Abbildung 12, (i)). Der *knock down* von cg30020 hatte keine spezifische Reduktion des Proteins im Western Blot zur Folge, obwohl der *knock down* der mRNA eine spezifische Reduktion der cDNA in der RT-PCR als Ergebnis hatte (Abbildung 12, (ii); Abbildung 11, (ii)). Auch nach Einsatz verschiedener dsRNAs, die gegen cg30020 gerichtet waren, konnte keine spezifische Reduktion des Proteins beobachtet werden. Das Signal, das durch den Antikörper für cg30020 bei 130kDa detektiert wurde, könnte also nicht spezifisch sein. Es wäre aber auch denkbar, dass das Protein sehr stabil ist und sich durch einen *knock down* mit spezifischer dsRNA nicht reduzieren lässt (Abbildung 12, (ii)).

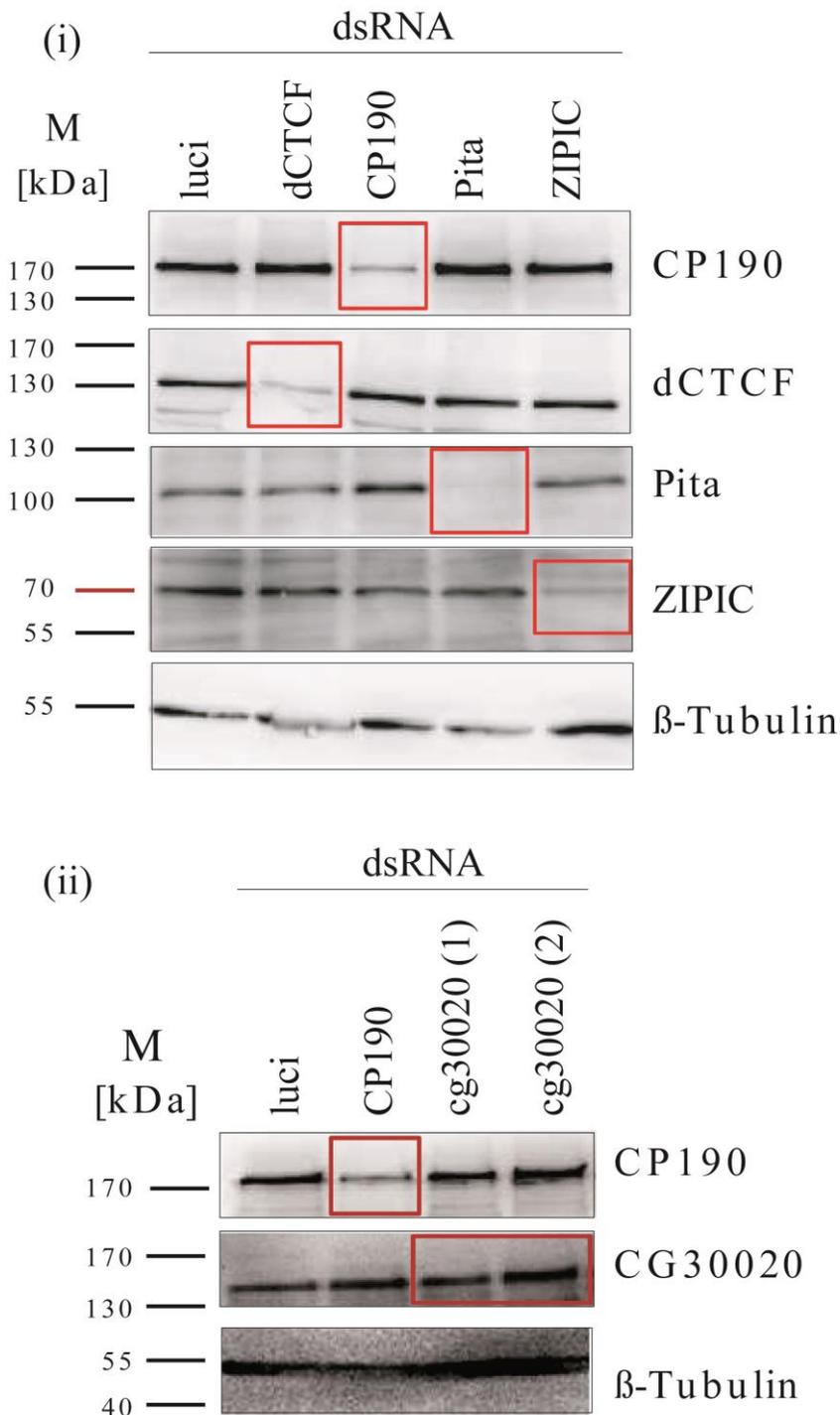


Abbildung 12: Die Antikörper für CP190, Pita und ZIPIC erkannten spezifisch das jeweilige Zielprotein. Western Blot der Extrakten von S2-Zellen, die einem *knock down* für (i) CP190, dCTCF, Pita, ZIPIC und (ii) cg30020 unterzogen wurden. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific (M). Eine indirekte Immundetektion der zu untersuchenden Proteine, CP190, dCTCF, Pita und ZIPIC, fand statt. β -Tubulin, ein Haushaltgen, diente als Ladekontrolle. Primär-Antikörper: α -CP190 (Ratte) 1:1000, α -dCTCF (Hase) 1: 1000, α -beta-Tubulin (Maus) 1:1000, α -Pita (Ratte) 1:1000, α -ZIPIC (Ratte) 1:200 und α -cg30020 (Ratte) 1:200 jeweils in 3 % Milch. Sekundär-Antikörper mit HRP: α -Ratte 1:25.000, α -Maus 1:25.000, α -Hase 1:25.000 jeweils in 0,5 % Milch. Alle Antikörper wurden 1 Stunde bei RT auf der Membran inkubiert. Zur Detektion der Signale wurde die Membran mit dem HRP-Substrat-Komplettsystem von MilliQ benetzt und zwischen 100 und 240 Sekunden am VersaDoc von BioRad belichtet und die Chemilumineszenz detektiert. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms Quantity One von BioRad ausgewertet.

Die Antikörper für Pita und ZIPIC konnten, nach diesen Experimenten, für die ChIP-qPCR- und ChIP-Seq-Analyse eingesetzt werden. Cg30020 wurde unter Vorbehalt ebenfalls in einem ChIP-Seq-Experiment untersucht. Allerdings wurde es auf Grund der geringen Anzahl identifizierbarer Bindestellen, sowie einer geringen Anzahl von Reads, von der bioinformatischen Analyse der genomweiten Daten ausgeschlossen.

3.1.2. Genomweite Untersuchung von CP190-, Pita- und ZIPIC-Bindung an Chromatin

Zur näheren Beleuchtung der Interaktion und den damit evtl. verbundenen funktionellen Zusammenhängen von CP190, Pita und ZIPIC, wurde ein ChIP-Seq-Experiment zur genomweiten Untersuchung der Bindung der Faktoren Pita und ZIPIC durchgeführt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob sich aus dem Bindeverhalten der Faktoren Rückschlüsse auf die Funktion von Pita und ZIPIC ziehen lassen. Dabei könnten sich Gesetzmäßigkeiten zu der Bindung der Faktoren finden lassen. Voruntersuchungen der Antikörper für Pita und ZIPIC in ChIP-Experimenten wurden dabei in der Masterarbeit von Ramona-Kirsch (JLU, Gießen) beschrieben. Auch wurden bereits Anteile der ChIP-DNA für ChIP-Seq bei den dabei durchgeführten ChIP-Experimente erzeugt.

Insgesamt wurden 10 ng der jeweiligen ChIP-DNAs, der IPs der Faktoren Pita und ZIPIC, sowie des Inputs für die Normalisierung, in 30µl ddH₂O gesammelt und dann zur Präparation einer DNA-Bibliothek und der anschließenden Sequenzierung mit einem Illumina Sequenzer, nach Braunschweig in ein Sequenzierungslabor verschickt. Die dabei entstandenen Rohdaten zur Bindung der Faktoren, wurden anschließend bioinformatisch ausgewertet. Dabei wurde auf ChIP-Chip-Daten der Datenbank modENCODE zurück gegriffen, um Vergleiche für die Bindung von CP190 und anderen Isolator-bindenden Proteinen anzustellen.

3.1.3. CP190, Pita und ZIPIC wiesen deutliche Übereinstimmung bei der genomweiten Bindung auf

Insgesamt konnten 2750 Bindestellen/Peaks für Pita und 3061 für ZIPIC in den genomweiten Datensätzen des Pita- bzw. des ZIPIC-ChIP gefunden werden. Dabei konnten bei dem Vergleich mit ChIP-Chip-Daten von CP190, der Datenbank modENCODE, eine Überlagerung der Bindestellen mit beiden Faktoren gefunden werden (The modENCODE Consortium et al. 2010). CP190 kolokalisierte zu 74 % mit Pita und zu 55 % mit ZIPIC. Außerde überschneiden sich etwa 50 % der Pita- und ZIPIC-Bindestellen. 57 % der CP190-Bindungen an Chromatin überlagerten nicht mit Pita- oder ZIPIC-Bindestellen. Das heißt, dass diese Bindung von CP190 an die DNA nicht durch diese beiden ZADs erklärt

werden konnte. Allerdings wäre es möglich, dass Pita und ZIPIC für 43 % der CP190-Bindungen an Chromatin zuständig sein könnten (Abbildung 13, (ii) Venn-Diagramm).

Diese starke Kolo-kalisation spiegelte sich auch im Vergleich der genomischen Bereiche wieder, die durch die jeweiligen Proteine gebunden wurden. Im Vergleich zum gesamten Genom, banden Pita und ZIPIC in diesem ChIP-Seq-Experiment, vorallem in der Nähe von TSSs (*Transcription start sites* bzw. Transkriptions-Start-Stellen) bzw. Promotoren (TSS, grün), aber kaum in inter- oder intragenischen Bereichen. Dies konnte auch bei der Analyse der CP190-ChIP-Chip-Daten beobachtet werden (Abbildung 13, (i)).

Die Bindestellen für Pita bzw. ZIPIC, sowie die CP190-Bindestellen wurden anhand ihrer Bindungsstärke zur TSS in vier Gruppen unterteilt, von schwach (1, schwarz) bis stark (4, blau). Dabei wurde das Gruppenmittel für die Profile in einem Fenster von 3.000 bp up und down stream des Peaks berechnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Bindung von CP190 proportional zu der von Pita bzw. ZIPIC war. CP190 band also genau dort stark, wo auch Pita und ZIPIC stark gebunden haben. Die Bindungsstärke war im Vergleich dazu genau dort schwächer für CP190, wenn sie für Pita und ZIPIC ebenso schwächer war (Abbildung 13, (iii); Pita/CP190 unten links; ZIPIC/CP190 unten rechts).

Diese Ergebnisse liesen die Vermutung zu, dass die CP190-Bindung zumindest teilweise durch die ZAD-Proteine, Pita und ZIPIC, an den gemeinsamen Bindestellen, vermittelt wird.

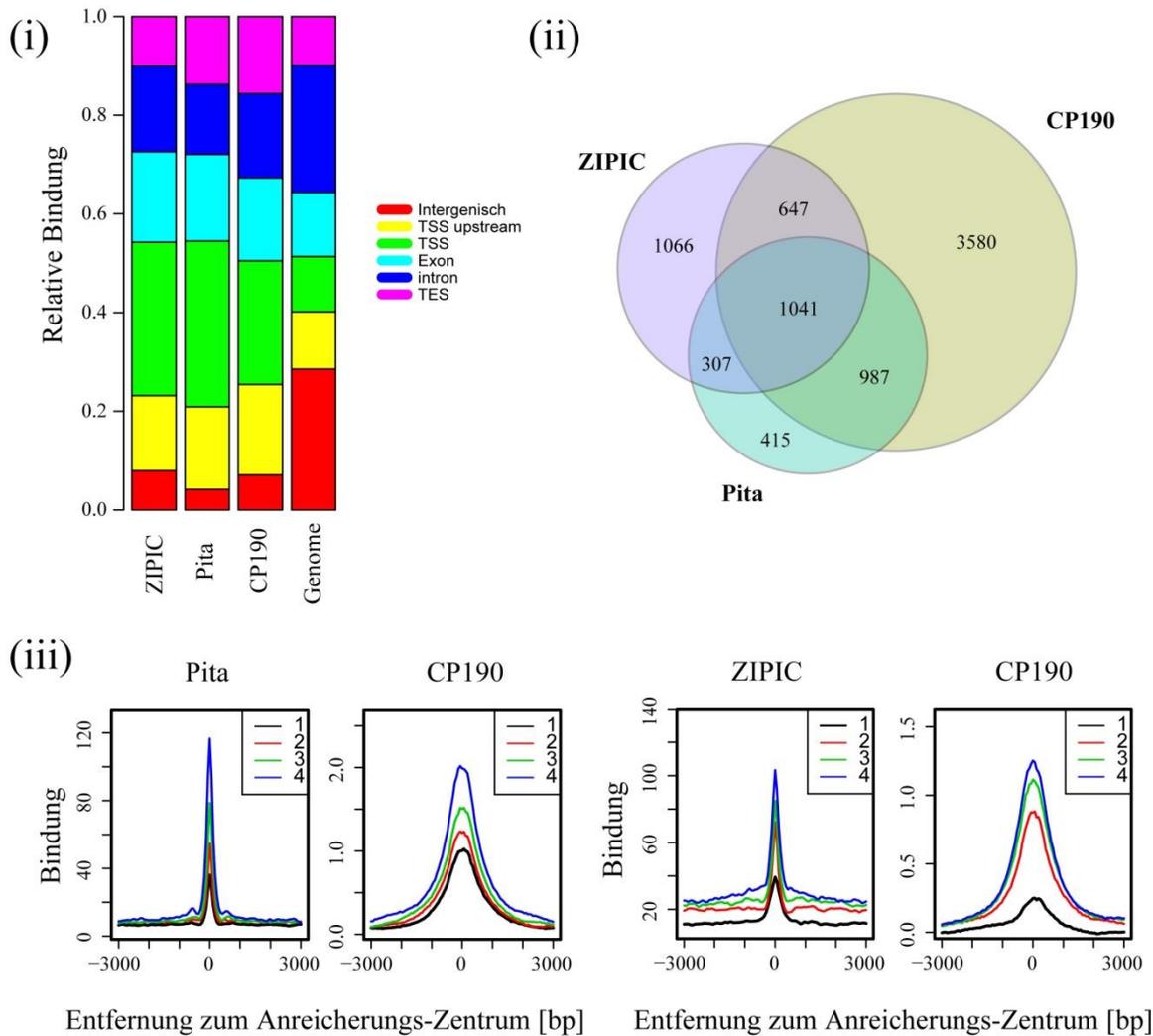


Abbildung 13: Kolokalisation von CP190 mit Pita und ZIPIC in einer genomweiten Analyse der Bindung. ChIP-Seq für die Faktoren Pita und ZIPIC wurde durchgeführt. Zur Analyse der Kolokalisation mit CP190 wurden ChIP-Chip-Daten von modENCODE verwendet. **(i)** Die Verteilung der genomischen Elemente über die Regionen, die Pita, ZIPIC und CP190, im Vergleich zur Hintergrundbindung, angereichert haben: TSS (grün), TSS upstream (gelb), Exons (hellblau), Introns (dunkelblau), TES (pink); intergenisch (rot). **(ii)** Venn Diagram der Überlagerung von Pita (blau), ZIPIC (lila) und CP190 (braun) Anreicherungen/Peaks. **(iii)** Pita- (links) oder ZIPIC- (rechts) Bindestellen wurden anhand der Stärke der Bindung in vier Gruppen unterteilt: Niedrig (1, schwarz) bis hoch (4, blau). Dabei wurden die durchschnittlichen Bindeprofile mit denen von CP190 an diesen Stellen verglichen. Die Bindungsstärke ist auf der y-Achse und die Entfernung zum Anreicherungs-zentrum/Peak-Center auf der x-Achse dargestellt (Maksimenko et al. 2015) (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

3.1.4. Die Bindemotive von CP190 und Pita stimmten miteinander überein, während ZIPIC ein eigenes Motiv besaß. Die Proteine banden unabhängig voneinander an Chromatin.

Zur weiteren Beleuchtung der Zusammenhänge zwischen der CP190-Bindung und der Anreicherung von Pita und ZIPIC an dessen Bindestellen, wurde eine Motivanalyse durchgeführt. Dabei wurden die durchschnittlichen Bindemotive für Pita und ZIPIC mit Hilfe

des Programmes MEME für Motiv-Analysen ermittelt (Machanick and Bailey 2011) (Abbildung 14, (i)). Für Pita konnte hierbei festgestellt werden, dass dieses eine sehr ähnliche Konsensussequenz wie CP190 hat (Schwartz et al. 2012b). Das Motiv das für ZIPIC gefunden wurde, unterschied sich dagegen deutlich vom Pita- und vom CP190-Konsensusmotiv.

Desweiteren wurde analysiert, in welchem Zusammenhang die Motivstärke eines Faktors zu dessen Anreicherung steht. Dabei wurden die ermittelten Motive für jeden Faktor in vier Gruppen, entsprechend ihrer Konservierung bzw. Ähnlichkeit unterteilt, von schwache Ähnlichkeit (1) bis starke Ähnlichkeit (4). Hier konnte beobachtet werden, dass die Motiv-Konservierung einen positiven Einfluss auf die Bindung der jeweiligen Faktoren hatte. Es konnte also gezeigt werden, dass je nach Stärke der Konservierung des Motives war, eine entsprechende Bindung durch Pita bzw. ZIPIC zu finden war (Abbildung 14, (ii)).

Beim Vergleich der Bindung von ZIPIC und Pita an Bindestellen, an denen diese überlappend bzw. nicht zusammen vorkamen, konnte beobachtet werden, dass Pita vor allem an Sequenzen band, an denen das Pita- und das ZIPIC-Motiv gemeinsam zu finden waren und die beiden Faktoren damit eine überlappende Bindung zeigten. Aber Pita war auch an Bindestellen angereichert, an denen das Pita Konsensusmotiv alleine vorlag, aber kein ZIPIC zu finden war. Dies deutet darauf hin, dass Pita ZIPIC nicht braucht um zu binden. ZIPIC schien somit, bei Kolo-kalisation mit Pita, nur eine leichte Verbesserung der Pita-Bindung hervorzurufen (Abbildung 14, Balkendiagramm, links unten). Ähnliches war für die ZIPIC-Bindung zu beobachten. Allerdings schien Pita hier einen etwas stärkeren Einfluss auf die Bindung von ZIPIC zu haben, als es umgekehrt zu beobachten war. ZIPIC band besser, wenn das Pita-Motiv und eine Überlagerung mit Pita zu finden war. Es war allerdings auch in der Lage alleine an Chromatin bzw. sein Konsensusmotiv zu binden, ohne das Pita zu finden war (Abbildung 14, (iii), rechts unten).

Diese Resultate zeigten, dass Pita und ZIPIC zwei autarke Faktoren sind, die jeweils ein eigenes Konsensusmotiv besitzen und auch in der Lage sind, dieses ohne die Hilfe bzw. Interaktion des jeweils anderen Faktors, zu binden. Damit haben sie teilweise unabhängige Bindungsfunktionen. Die Faktoren scheinen sich allerdings bei der Bindung unterstützen zu können, da ihre Bindung erhöht war, wenn sie zusammen banden.

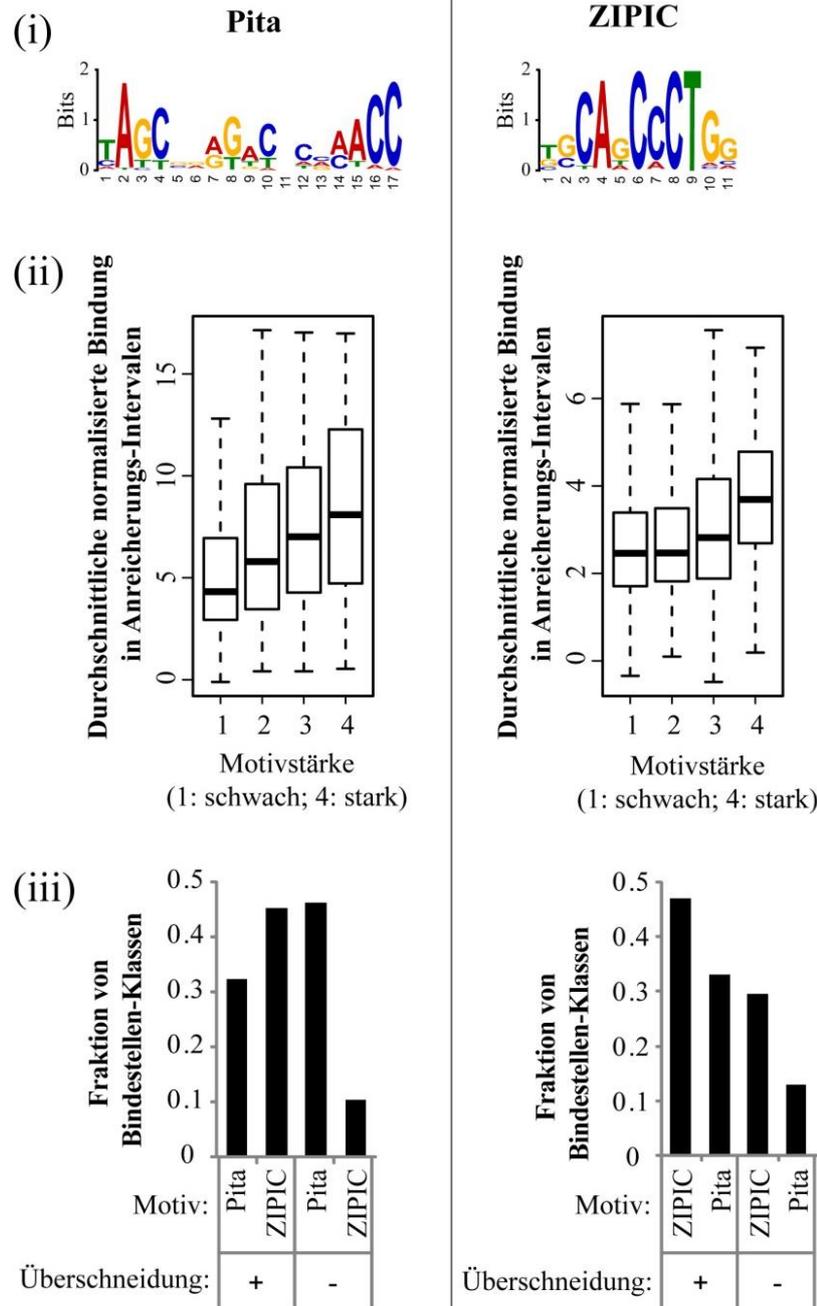


Abbildung 14: Motiv-Spezifität der Faktoren Pita und ZIPIC. (i) Die top Anreicherungen/Peaks der Faktoren Pita und ZIPIC wurden zur Motiv-Suche verwendet. Dabei wurde aus den Anreicherungen unterliegenden Sequenzen eine Konsensussequenz mit Hilfe des Programmes MEME erstellt. A: Arginin (rot), T: Thymin (grün), G: Guanin (Gelb), C: Cytosin (blau). Die Wahrscheinlichkeit für eine Base innerhalb der Bindesequenz war durch die Größe des jeweiligen Buchstaben dargestellt. Als Maß für dies sind die Bits auf der y-Achse gezeigt. Die Positionen der Basen wurden auf der x-Achse dargestellt. (ii) Je konservierter das Motiv ist, desto stärker binden auch ZIPIC und Pita an diese. Dafür wurden die Anreicherungen der Faktoren nach Konsensus-Ähnlichkeit festgestellt und in vier Gruppen unterteilt. Dabei wurden die Sequenzen von geringer (1) bis hoher (4) Ähnlichkeit unterschieden. (iii) Auch wurde fest gestellt, ob die Motive von Pita oder ZIPIC auch innerhalb der Anreicherung des jeweils anderen Proteins zu finden waren. Dabei wurden die Bindestellen in überlappend (+) und nicht-überlappend (-) unterteilt und dann nach dem entsprechenden Motiv für Pita oder ZIPIC gesucht. Der Anteil aller Peaks (0-1; 1 = alle Peaks) an gefundenen Bindemotiven ist auf der y-Achse dargestellt (Maksimenko et al. 2015) (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

3.1.5. Pita und ZIPIC zeigten ein ähnliches Bindevverhalten wie Isolator-bindende Proteine, die von CP190 gebunden werden

Zur Untersuchung des Einfluss von Pita und ZIPIC auf die Bindung anderer, an der Isolation beteiligter Faktoren, wurde die Kolokalisation mit diesen Faktoren untersucht. Dazu wurde die Bindung von Pita und ZIPIC mit dem Bindevverhalten von CP190 und der Isolator-bindenden Proteine dCTCF, BEAF-32 und Su(Hw) verglichen (The modENCODE Consortium et al. 2010). Diese IBPs zeigen bekanntlich eine starke Kolokalisation mit CP190 auf dem Chromatin und vermitteln dort mit CP190 zusammen Isolation (Bushey et al. 2009, Nègre et al. 2010, Schwartz et al. 2012b). Wie zu erwarten war, zeigte sich hier erneut, dass Pita und auch ZIPIC am stärksten in ihrem Bindevverhalten mit CP190 überlappen. Aber auch BEAF-32 und dCTCF zeigten eine relativ starke Kolokalisation mit Pita (i) und ZIPIC (iii), wenn man die Gesamtheit der Bindestellen betrachtete. Nur Su(Hw) zeigte eine eher geringe Kolokalisation mit Pita und ZIPIC (Abbildung 15, (i und iii)). Die Kolokalisation von ZIPIC- und Pita-Bindestellen mit CP190 war größer als die mit den bisher bekannten Kofaktoren von CP190 (Su(Hw), dCTCF und BEAF-32). Dies wies ebenfalls darauf hin, dass CP190 zum Teil von Pita und ZIPIC zur Zielsequenzen auf der DNA rekrutiert werden könnte (Abbildung 15 (ii und iv), Anhang: Abbildung 36 und Abbildung 37).

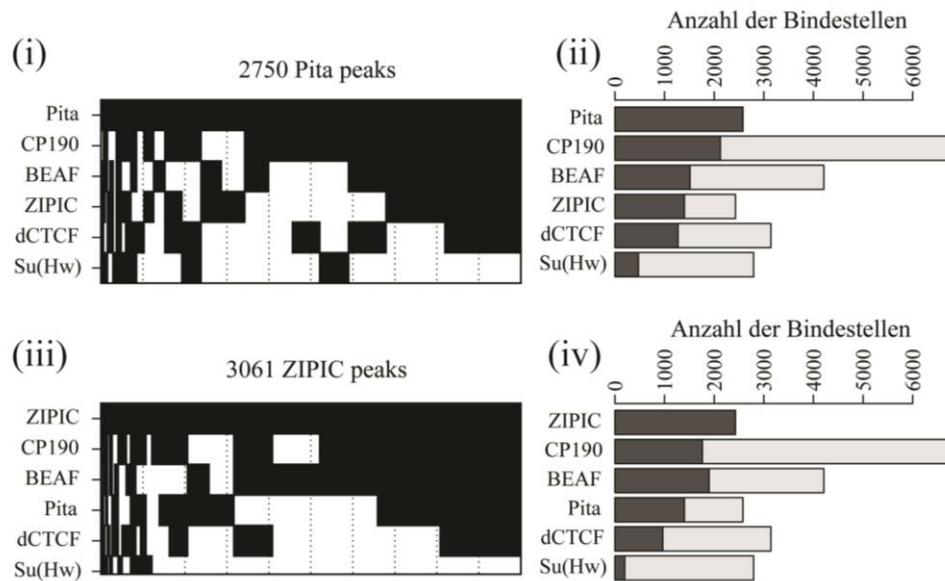


Abbildung 15: Pita- and ZIPIC-Bindestellen waren an denen von Isolator-bindenden Proteinen angereichert. Binäre Heatmaps von Pita (i) und ZIPIC (iii) -Bindestellen, die anhand ihrer Überlagerung mit der Bindung von CP190, BEAF-32, dCTCF und Su(Hw) klassifiziert wurden. Alle angereicherten Bindestellen, die von wenigstens einem der Faktoren gebunden wurden, wurden dargestellt (2579 Bindestellen für Pita und 2428 Bindestellen für ZIPIC). Jede Gruppe von Bindungsanreicherung wurde als schwarzer Balken dargestellt und kann einer genomischen Region zugeordnet werden. Weiße Balken zeigen, dass keine Bindung an diesen Regionen stattfand. Die Bindestellen wurden nach der Frequenz bzw. Häufigkeit sortiert, in der ein bestimmter Bindemuster beobachtet wurde. Das zugehörige Balkendiagramm beschreibt die Gesamtheit der Bindestellen der jeweiligen Faktoren zusammen mit Pita (ii) oder ZIPIC (iv) (dunkelgrau). Die Fraktion an Bindestellen die nicht mit ZIPIC oder Pita überlappten, ist ebenfalls dargestellt (hellgrau). Die Anzahl der Bindestellen ist auf der x-Achse dargestellt (Maksimenko et al. 2015) (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

Die Bereiche an denen Pita, ZIPIC, CP190, dCTCF und BEAF-32 kolokalisieren, waren zum Teil auch TSSs (*Transcription start sites* bzw. Transkriptions-Start-Stellen). Deshalb wurde im Folgenden der Einfluss der Pita- und ZIPIC-Bindung auf die Expression näher beleuchtet. Für diese Analyse wurden die Bindungen an TSSs nach ihrer Stärke eingeteilt, von schwach (1) nach stark (4), und diese dann mit der Expression der umliegenden Gene an diesen TSSs verglichen. Dabei konnte beobachtet werden, dass je stärker die Bindung von Pita und ZIPIC an die TSS war, desto höher war auch die Expression der Gene, die mit diesen TSS assoziiert waren. Dies deutete darauf hin, dass Pita und ZIPIC auch an der Aktivierung der Expression umliegender Gene beteiligt sein könnten (Abbildung 16).

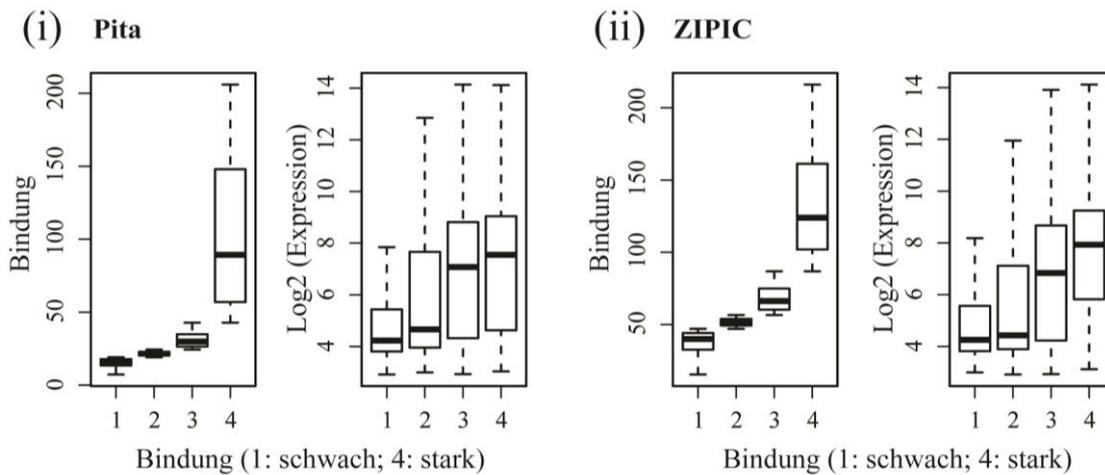


Abbildung 16: Pita- und ZIPIC-Bindung an TSS hatte einen Effekt auf die Expression der gebundenen Gene. Für alle RefGene Transkriptions Einheiten, wurde die maximale Abdeckung von Pita und ZIPIC, innerhalb eines +/- 1kb Intervalls um alle TSS, berechnet. Diese Einheiten wurden anschließend nach ihrer Bindungsstärke (x-Achse) sortiert, von schwach (1) nach stark (2) (linker Box-Blot). Die Bindung an die TSS ist auf der y-Achse gezeigt. Die entsprechende Genexpression der umliegenden Gene wurde ebenfalls den entsprechenden Bindestärken (x-Achse) zu geordnet (rechter Box-Blot). Die Log2-transformierte Genexpression ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Expressionsdaten stammen aus der modENCODE-Datenbank (Maksimenko et al. 2015) (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

3.1.6. Die Validierung der ChIP-Seq-Resultate mittels ChIP-qPCR zeigte eine Anreicherung der Proteine an den spezifischen Bindestellen

Zur Validierung der ChIP-Seq Experimente wurden Oligonukleotide für spezifische Bindestellen/Peaks von Pita, ZIPIC erstellt. Dabei wurden Bindestellen unterschieden, die von allen Faktoren gleichzeitig oder von einzelnen Faktoren spezifisch gebunden wurden, die über die ChIP-Seq-Analyse ermittelt werden konnten. Bei dieser Analyse wurde auch cg30020 wieder mit einbezogen. Auch hier wurden die ChIP-Seq-Daten von diesem als Anhaltspunkt für das Design von Oligonukleotiden, für die Untersuchung von cg30020-Bindestellen, genutzt.

Zunächst wurden für das ChIP-qPCR-Experiment S2-Zellen ausgesät und nach zwei Tagen geerntet. Die geernteten Zellen wurden fixiert und einer Chromatinextraktion unterzogen. Das Chromatin konnte, nach der Kontrolle der Fragmente auf EtBr-Agarosegel, für die IP von CP190, Pita, ZIPIC und cg30020 eingesetzt werden. Die aufgereinigte ChIP-DNA wurde durch qPCR mittels spezifischen Oligonukleotiden, für in der ChIP-Seq-Analyse gefundene Bindestellen der Faktoren, untersucht.

Die Validierung der genomweiten Experimente zeigte eine überzeugende Übereinstimmung mit den Resultaten der ChIP-Seq Experimente. Die gemeinsamen Bindestellen (cg1746, cg11905, cg17681 und cg8776) von Pita (gelb), ZIPIC (blau) und cg30020 (violett) wurden im Experiment von allen drei Faktoren gebunden. Auch CP190 (rot) kolokalisiert mit den drei

Proteinen an diesen Sequenzen. Pita band an die identifizierten Bindestellen für diesen Faktor (cg31869, cg34342) nicht völlig alleine. An allen untersuchten Pita Bindestellen war immer auch CP190 zu finden. Dies war nicht überraschend, da auch in der genomweiten Analyse vor allen Pita eine starke Überschneidung mit CP190 bei der Chromatinbindung zeigte und der Konsensus beider Proteine sich kaum unterschied (Abbildung 17, (i); Abbildung 13, Abbildung 14). Aber auch geringe Mengen ZIPIC waren zu finden, was bei der starken Übereinstimmung der Peaks in der genomweiten Analyse von Pita und ZIPIC nicht verwundert (Abbildung 17 (i und ii); Abbildung 13). ZIPIC band, wenn auch schwach, alleine an die spezifischen Bindestellen (Rpl7 und scar), wobei sich auch geringe Mengen CP190 feststellen ließen. Cg30020 zeigte eine deutliche Bindung an die im ChIP-Seq identifizierten Bindestellen für dieses. Aber auch geringe Mengen ZIPIC waren an diesen Bindestellen angereichert. Die Negativ-Kontrolle (cg12054) zeigte, wie zu erwarten war, keine Anreicherung der jeweiligen Faktoren. Und die IgG-Kontrolle verdeutlichte, dass die IPs für CP190, Pita, ZIPIC und cg30020 spezifisch waren, da sie an keiner der untersuchten Bindestellen angereichert war (Abbildung 17).

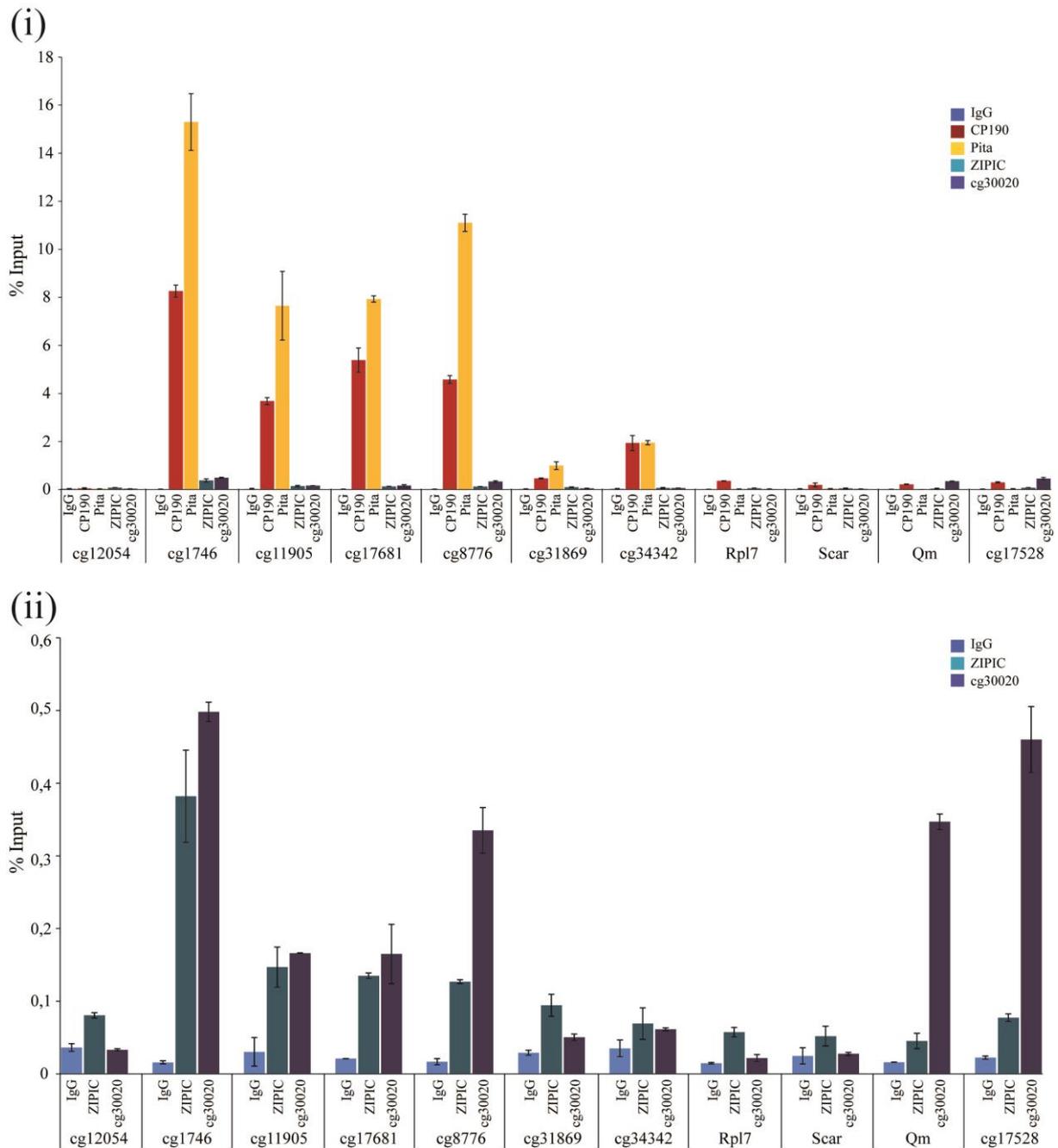


Abbildung 17: Die Validierung der spezifischen Bindestellen für CP190, Pita und ZIPIC belegte die Resultate der genomweiten Experimente. Ein ChIP-qPCR-Experiment wurde für die Ermittlung der CP190 (rot), Pita (gelb), ZIPIC (blau) und cg30020 (violett) -Anreicherung an spezifischen Bindestellen durchgeführt. Die ChIP-DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden für spezifische Bindestellen der untersuchten Faktoren analysiert. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet. (i) Zeigt den ChIP aller Faktoren; (ii) Zeigt den ChIP von IgG, ZIPIC und cg30020, die eine schwächere Bindung aufweisen.

Auffällig war bei der Validierung, wie bereits erwähnt, dass CP190 und Pita nahezu immer zusammen auf der DNA zu finden waren. Im Gegensatz dazu zeigten ZIPIC und cg30020 auch Anreicherung ohne CP190, an den untersuchten Bindestellen. Dies spiegelte auch die ChIP-Seq Ergebnisse wieder. Wie sich bei der genaueren Betrachtung der Bindemotive

zeigte, war das Pita-Motiv nahezu identisch mit dem von CP190 (Maksimenko et al. 2015, Schwartz et al. 2012b) (Abbildung 17).

Um die spezifische Bindung der Faktoren und ihren Einfluss auf die Bindung der jeweils anderen Faktoren näher zu betrachten, wurden ein *knock down* für CP190 bzw. Pita in S2-Wildtyp-Zellen durchgeführt. Das Chromatin wurde vorbereitet und dessen Qualität auf EtBr-Agarosegel überprüft. Auch der *knock down* auf Proteinlevel von Pita und CP190 wurde im Western Blot kontrolliert. Diese waren für alle präparierten Replikate deutlich reduziert im Vergleich zum Kontroll-*knock down* gegen Luziferase (*luciferase*) (Anhang: Abbildung 40). Anschließend wurde ein ChIP für CP190 (rot), dCTCF (grün), Pita (gelb) und ZIPIC (blau) durchgeführt. Für die Analyse durch qPCR wurden Oligonukleotide spezifisch für die Bindestellen verwendet, die durch alle Faktoren gebunden wurden.

Der *knock down* von CP190 war erfolgreich und zeigte eine Reduktion des Proteins an den entsprechenden Bindestellen. Die Bindung von CP190 scheint keinen eindeutigen Effekt auf die Bindung von Pita oder auch die von ZIPIC zu haben. Beide Faktoren zeigten sich in ihrer Bindung an die untersuchten Bindestellen gar nicht (ZIPIC) oder kaum (Pita) verändert (Abbildung 18, (i)). Dies stimmt mit EMSA-Ergebnissen über ein, bei denen CP190 mittels dsRNA depletiert wurden und die spezifischen Bindestellen nach wie vor durch Pita und ZIPIC gebunden wurden (Maksimenko et al. 2015). Der *knock down* von Pita dagegen hatte einen leichten Effekt auf die ZIPIC-Bindung an die untersuchten Bindestellen im ChIP. ZIPIC zeigte eine etwa Halbierung seiner Bindung. CP190 zeigte, zumindest an einer der untersuchten Bindestellen, eine deutliche, drei bis vierfache, Reduktion nach dem *knock down* von Pita (Abbildung 18 (ii), cg11905; Anhang: Abbildung 41). Auch diese Resultate stimmen zum Teil mit den EMSA-Resultaten überein, wobei die Bindung von CP190 und ZIPIC nach dsRNA Depletion von Pita untersucht wurde. Dabei war zu sehen, dass der *knock down* von Pita zur Verringerung von CP190-Bindung und zum Teil auch eine Verringerung der ZIPIC-Bindung an Zielsequenzen zur Folge hatte (Maksimenko et al. 2015). Aber auch dCTCF schien durch den *knock down* von Pita leicht beeinflusst zu werden. An zwei der vier untersuchten Bindestellen war eine einfache (cg8776) bis vierfache (cg11905) Reduktion zu erkennen (Abbildung 18, (ii); Anhang: Abbildung 41). Auch dies ist nach den Resultaten der ChIP-Seq-Analyse durchaus möglich, da Pita auch an einigen Stellen mit dCTCF kolokalisierte (Abbildung 15, Anhang: Abbildung 36 und Abbildung 37).

Die Validierung der Resultate der genomweiten Analyse der Bindung von Pita und ZIPIC, an spezifische Bindestellen der ChIP-Seq-Analyse, war weitestgehend erfolgreich und bestätigt die dort gefundenen Erkenntnisse. Die Faktoren Pita und ZIPIC kolokalisierten mit CP190.

Sie legen außerdem die Vermutung nahe, dass CP190 eventuell durch ZIPIC und vor allem durch Pita rekrutiert wird, da ein *knock down* von Pita oder ZIPIC eine Reduktion von CP190 an spezifischen Bindestellen der Faktoren zur Folge hatte. Dies könnte bedeuten, dass beiden Faktoren damit potentiell zur Vermittlung der Funktion von CP190 beitragen.

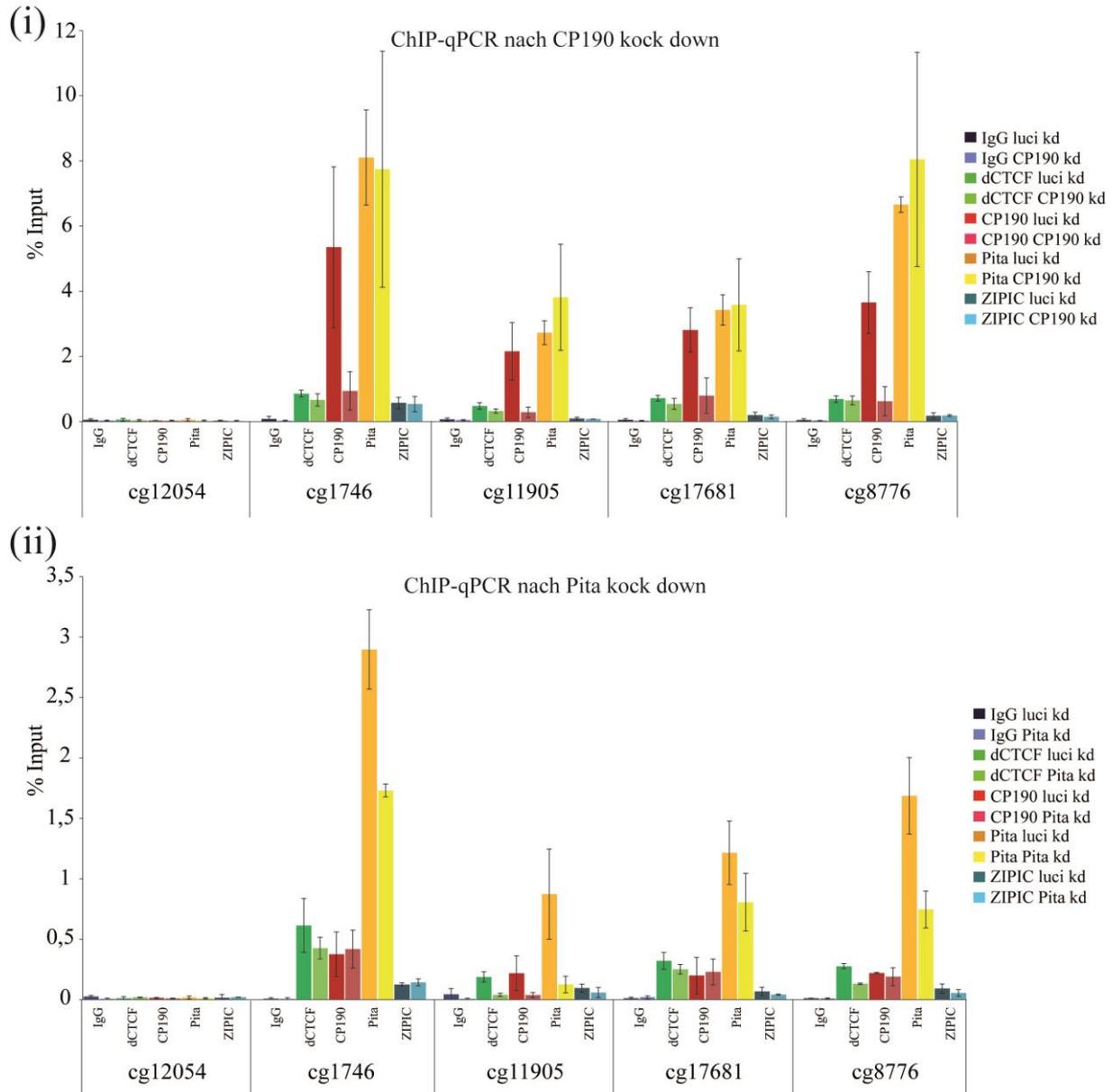


Abbildung 18: CP190 und Pita schienen sich nur geringfügig in ihrer Bindung zu beeinflussen. Ein ChIP-qPCR-Experiment wurde für die Ermittlung der CP190 (rot), dCTCF (grün) und Pita (gelb) und ZIPIC (blau) -Anreicherung an spezifischen Bindestellen durchgeführt. Die Zellen wurden ausgesät und der *knock down* von (i) CP190 bzw. (ii) Pita durchgeführt (Triplikate). Die ChIP-DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden für spezifische Bindestellen der untersuchten Faktoren analysiert. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet.

Untermuert wurde die Vermutung, dass Pita und ZIPIC an der CP190-vermittelten Isolation beteiligt sind, durch einen funktionellen Reporterassay in *Drosophila melanogaster*. Hier wurde untersucht wie sich Pita und ZIPIC auf die Enhancer Blockade und auf die Barriere

Funktion der untersuchten Isolatoren auswirken, indem Pita bzw. ZIPIC Bindestellen zwischen Enhancer/Silencer und dem *yellow* Reporter gen eingefügt wurden (Maksimenko et al. 2015). Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass Pita und ZIPIC in der Lage sind Enhancer und Silencer des Bithorax-Komplexes zu blockieren. Zusätzlich konnte für Pita eine gemeinsame Bindung, zusammen mit dCTCF, an den MCP Isolator festgestellt werden (Anhang: Abbildung 36), die auch eine funktionelle Komponente hat, wie sich ebenfalls anhand eines funktionellen Reporterassay zeigte (Maksimenko et al. 2015).

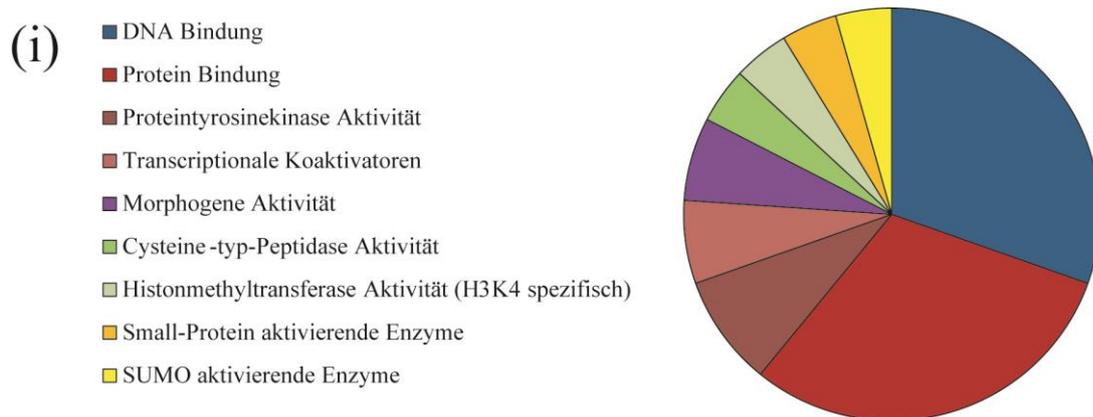
Abschließend konnte festgestellt werden, dass Pita und ZIPIC mit CP190 auf der DNA kolokalisierten und dass diese Kolokalisation zum Teil notwendig für das Binden von CP190 an die DNA war. Dabei fand wohl auch eine physikalische Interaktion zwischen den Faktoren statt (Doktorarbeit, Melanie Buxa). Außerdem resultierte diese Kolokalisation von CP190, Pita und ZIPIC, sowie mit dCTCF, zu einer Verbesserung der Isolation von Chromatin (Maksimenko et al. 2015). Aufgrund dieser Resultate konnte man Pita und ZIPIC zu den Isolator-bindenden Proteinen zählen, die CP190 und wahrscheinlich auch dCTCF und BEAF-32 helfen ihre Funktion auf der DNA zu vermitteln.

3.2. Untersuchung des durch SUMOylierung vermittelten Einflusses auf die CP190 und dCTCF vermittelte Isolation in *Drosophila melanogaster*

Ein funktioneller RNAi-Screen in *Drosophila* S2-Zellen zeigte, dass knapp 100 Faktoren unterschiedlicher molekularer Funktionen, einen Einfluss auf die Fab8-Isolation haben. Unter anderem hatten einige dsRNAs gegen Genprodukte der Faktoren, die an der SUMOylierung beteiligt sind, einen deutlichen Effekt auf die Enhancer-Blockade am Fab8-Isolator (Doktorarbeit, Dorte Bohla) (Bohla et al. 2014). Der Einfluss der SUMOylierung auf die Isolation wurde in der Literatur bisher sehr kontrovers diskutiert (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012), weshalb im Folgenden beleuchtet wurde, welchen Einfluss SUMOylierung auf die Isolation an durch dCTCF und CP190 gebundenen Isolatoren hat.

3.2.1. SUMOylierung hatte einen Einfluss auf die Fab8-Isolation in einem funktionellen Luziferase-Reporter-Assay in *Drosophila* S2-Zellen

Um beurteilen zu können, welche Faktoren, in oben beschriebenen RNAi-Screen, einen Einfluss auf die Fab8-Isolation haben, wurden zunächst alle Faktoren die nach statistischer Auswertung einen Z-Wert > 2 hatten, als potentiell für die Fab8-Isolation relevante Faktoren bewertet. Dabei konnten neben Faktoren des Remodelling-Komplexes NuRF (*nucleosome remodeling factor*) und des Transkription-aktivierenden Komplexes dREAM (*dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B*) (Bohla et al. 2014), auch Faktoren der SUMOylierungs-Kaskade gefunden werden (Abbildung 19, Tabelle). Die Faktoren, die mit einem Z-Wert > 2 im Screen indentifiziert wurden, wurden außerdem noch in einer GO-Term-Analyse näher untersucht (Tabas-Madrid et al. 2012) (Abbildung 19, Torten-Diagramm). Faktoren die eindeutig der molekularen Funktion der SUMO-Aktivierung zu zuordnen waren, sind Aos1 und Uba2. Diese wurden auch eindeutig dem Gebiet der kleinen Proteine-aktivierenden Enzyme zugeordnet. Diese beiden Proteine sind also in *Drosophila* eindeutig auf ihre Funktion als SUMO-aktivierendes Enzym zuzuordnen. Aber auch die SUMO-Protease velo wurde deutlich den Cystein-Typ-Peptidasen zugeordnet. Dieses Protein greift an Cystein-haltigen Proteinsequenzen an, wie sie auch in SUMOylierten Proteinen zu finden sind. Das SUMO-konjugierende Enzym lwr und die SUMO-Ligase Su(var)2-10 haben auch andere Funktionen, weshalb sie zusätzlich anderen molekularen Funktionen, oder keiner molekularen Funktion eindeutig zugeordnet werden konnten (Abbildung 19).



(ii)

Symbol	CG-Nr.	Genname	Funktion
Aos1/SEA 1	CG12276	Activator of SUMO 1	Smt3 aktivierendes Enzym (E1)
Uba2	CG7528	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	Smt3 aktivierendes Enzym (E1)
lwr / Ubc9	CG3018	lesswright	Smt3 konjugierendes Enzym (E2)
Su(var)2-10/PIAS	CG8068	Suppressor of variegation 2-10	Smt3 Ligase (E3)
velo	CG10107	verloren	Smt3 Protease

Abbildung 19: SUMOylierung verstärkte die Enhancer-Blockade am Fab8-Isolator in *Drosophila* S2-Zellen. Der funktionale RNAi-Screen zeigte eine Reduktion der Enhancer-Blockade nach *knock down* von Faktoren der SUMOylierungs-Kaskade (gelb), von DNA-bindenden (blau) und von Protein-bindenden Faktoren (rot), von Proteintyrosinkinasen und von transkriptionalen Kofaktoren (braun), von Proteinen mit morphogenen Eigenschaften und von Proteinen mit modifizierenden Eigenschaften, wie Cystein-typ-Peptidasen und Histonmethyltransferasen (grün). (i) Die Graphik bezieht sich auf die molekularen Funktionen der Faktoren, die einen Einfluss auf die Enhancer-Blockade am Fab8-Isolator hatten. Faktoren mit signifikanter (p -Wert $< 0,05$) Anreicherung in einer molekularen Kategorie wurden in die Graphik mit einbezogen. Die Graphik wurde mit Hilfe des Web-Programm GeneCoDis3 für GO-Term-Analysen erstellt. (ii) Die Tabelle zeigt alle im RNAi-Screen identifizierten Faktoren der SUMOylierungs-Kaskade, die einen Z-Wert > 2 hatten. Farblich markiert sind die in der GO-Term-Analyse als signifikant für eine molekulare Funktion eingestufte Faktoren.

Um diesen Effekt der SUMOylierung auf die Isolation weiter zu erforschen, wurde einer Validierung des funktionellen RNAi-Screens vorgenommen. Dafür wurden S2-Zellen verwendet, die über ein stabil integriertes Luziferase-Reporterkonstrukt verfügen, welches einen Fab8-Isolator zwischen einem Enhancer und dem Luziferase-Reportergen positioniert hat. Als Kontrolle dienten Zellen mit einem Reporter-Konstrukt ohne Fab8-Isolator zwischen Enhancer und Promotor des Luziferasegens. Dieses Konstrukt hat eine konstante Luziferase-Aktivität und hilft Faktoren zu identifizieren, deren *knock down* allgemein einen Einfluss auf das Wachstum und die Proliferation der Zelle hat. Aber auch Faktoren, die den Enhancer oder auch den Promotor bzw. die Transkription des Luziferasegens kompromittieren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, RNA-Polymerase II, oder ribosomale Proteine, wurden durch diese Kontrolle identifiziert. Außerdem wurden noch drei weitere Isolatoren untersucht, die ebenfalls von dCTCF und CP190 gebunden werden (*bicoid*, *cg31472*, *Fab6*) (Bohla et al. 2014, Herold et al. 2012) (Abbildung 20, Schematische Darstellung der Reporter-Konstrukte).

Dadurch wurde analysiert, inwiefern der Effekt nach dem *knock down* von SUMO-Faktoren, Fab8-spezifisch war, oder eventuell generellerer Natur sein könnte, und damit allgemein die dCTCF/CP190-abhängige Isolatoren betreffen könnten.

Ein *knock down* der SUMO-Faktoren wurde vorgenommen. Dabei wurden die entsprechenden dsRNA auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach vier Tagen geerntet, lysiert und nach Zugabe von Luziferin, die entstandene Chemielumineszenz am Luminometer gemessen. Die Werte wurden mit Hilfe des unspezifischen GFP-Kontroll-*knock downs* normalisiert und somit die relative Luziferase-Aktivität ermittelt. Als weitere Kontrollen dienten die *knock downs* von CP190 und dCTCF, die erwiesenermaßen einen Einfluss auf die Fab8-vermittelte Isolation haben (Bartkuhn et al. 2009, Herold et al. 2012, Mohan et al. 2007).

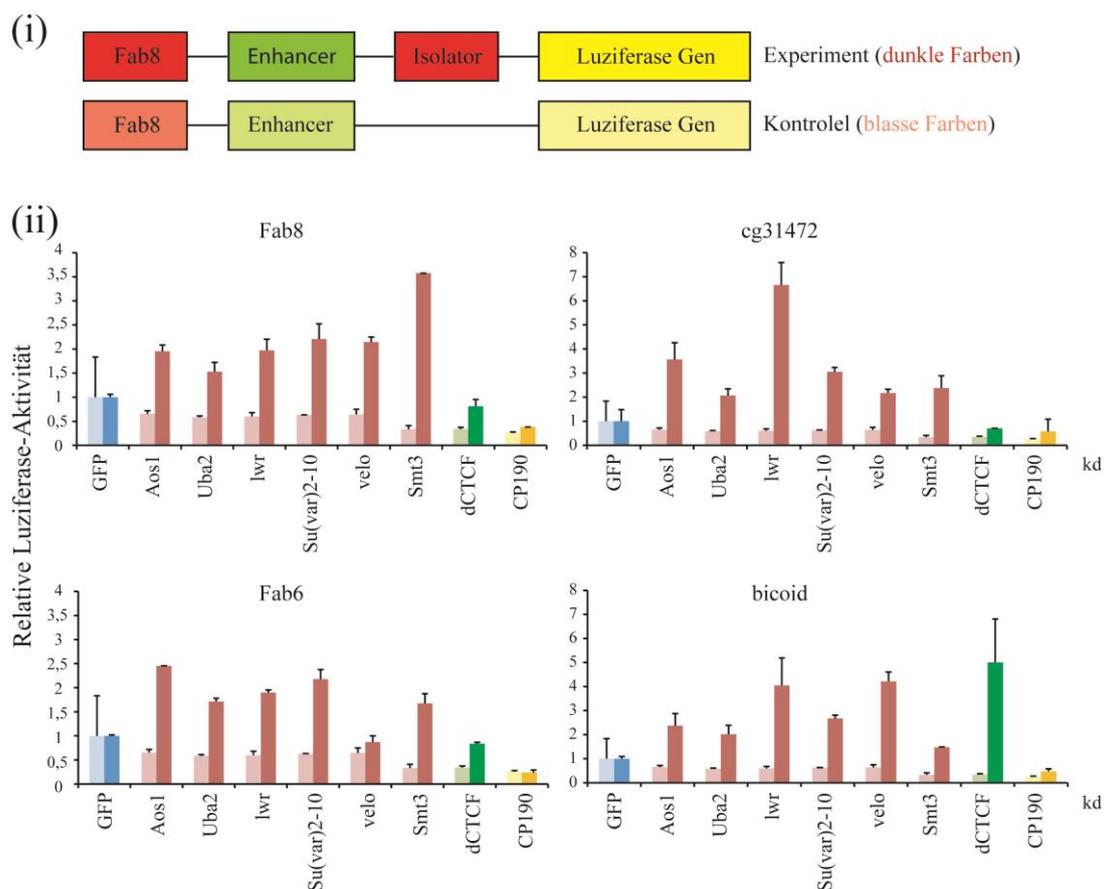


Abbildung 20: SUMOylierung verbesserte die Enhancer-Blockade an verschiedenen, CP190- und dCTCF-gebundenen Isolatoren in *Drosophila* S2-Zellen. (i) Schematische Darstellung der Luziferase-Reporter-Konstrukte, die für die Validierung des RNAi-Screens verwendet wurden. Experimente mit variierenden Isolatoren (Fab8, Fab6, bicoid und cg31472) zwischen Luziferase-Reporter-Genen und Enhancer (dunkle Farben) und Kontrolle, ohne Isolator zwischen Enhancer und Luziferase-Reporter-Genen (blasse Farben). (ii) Relative Luziferase-Aktivität nach *knock down* von SUMO-Faktoren (rot), dCTCF (grün) und CP190 (gelb) als Kontrolle, so wie unspezifische *knock down* von GFP als Negativ-Kontrolle (blau). Die Luziferase-Aktivität wurde mittels GFP *knock down* normalisiert. Der *knock down* wurde in S2-Zellen, die den jeweiligen Reporter stabil integriert hatten, durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde am Luminometer gemessen.

Der *knock down* der verschiedenen SUMO-Faktoren (Aos1, Uba2, lwr, Su(var)2-10, velo und Smt3; rot) hatte einen deutlich verstärkenden Einfluss auf die Luziferase-Aktivität, sowohl am Fab8-Isolator, als auch an den anderen untersuchten Isolatoren (bicoid, Fab6 und cg31472). Dies bedeutet, dass die Isolation durch den *knock down* der Faktoren scheinbar herabgesetzt wurde und der Enhancer des Konstrukts das Luziferasegens ungehindert aktivieren konnte. Der Kontroll-*knock down* von dCTCF (grün) zeigte auch eine deutliche Verstärkung der Luziferase-Aktivität, was darauf hin deutet dass der *knock down* der Faktoren funktioniert hatte, ebenso wie die Kontrolle der *knock downs* in der qPCR (Anhang: Abbildung 43). Der CP190-*knock down* (gelb) hatte nicht den erwarteten Effekt auf die Luziferase-Aktivität. Man würde erwarten, dass die Luziferase-Aktivität steigt. Dies könnte daran liegen, dass der *knock down* von CP190 einen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zelle hatte. Dies zeigte sich auch an der Wirkung des CP190 *knock down* auf das Kontroll-Konstrukt. Der *knock down* von CP190 hatte dort ebenfalls eine verringerte Luziferase-Aktivität zur Folge. Jedoch hatte der *knock down* aller untersuchten Faktoren einen leicht negativen Effekt auf das Zellwachstum, wie sich an der Luziferase-Aktivität der Kontrollen erkennen ließ. Im Vergleich zum GFP-*knock down*, zeigten alle anderen *knock downs* eine Verringerung der Luziferase-Aktivität in der Kontrolle (Abbildung 20, Balkendiagramme). Aus diesen Ergebnissen konnte man folgern, dass die untersuchten Isolatoren auf SUMOylierung reagieren. SUMOylierung hat dabei scheinbar die Funktion, die Enhancer-Blockade zu erhöhen und damit die Promotor-Aktivierung durch den Enhancer herabzusetzen. Allerdings hatte die SUMO-Protease die für die De-SUMOylierung zuständig ist, den selben Effekt auf die Enhancer-Blockade, wie die Faktoren der SUMO-Kaskade.

Diese Ergebnisse widersprechen denen von Capelson und Corces, welche anhand von Fliegenmodellen zeigten, dass die Enhancer-Blockade nach *knock down* von lwr, dem SUMO-konjugierenden Protein, herab gesetzt wird (Capelson and Corces 2006). In einer weiteren Publikation wurde gezeigt, dass SUMOylierung scheinbar keinen Einfluss auf die Enhancer-Blockade zu haben schein, sobald SUMO-sites in Zielproteinen (Mod(mdg4)) mutiert werden (Golovnin et al. 2012).

Zur weiteren Betrachtung der Funktion der SUMOylierung bei der Isolation in *Drosophila* S2-Zellen, wurde zunächst ermittelt, welche Faktoren, die an der CP190/dCTCF-vermittelten Isolation beteiligt sind, SUMOyliert vorliegen.

3.2.2. Expression von FLAG-His-dSUMO in S2-Zellen als Werkzeug zur weiteren

Analyse des Einflusses von SUMOylierung auf die Isolation in *Drosophila melanogaster*

Zur weiteren Untersuchung der Frage welche Proteine, die an Isolation beteiligt sind, SUMOyliert werden und dadurch möglicherweise ihre Eigenschaften verändern, war es nötig ein Werkzeug für folgende Experimente zu schaffen. Dazu wurden stabile S2-Zelllinien für die Expression von FLAG-His-dSUMO erzeugt, um zum Beispiel zu untersuchen wie die SUMOylierung die Proteineigenschaften bei der Isolation, aber auch bei der Interaktion mit anderen Proteinen und mit der DNA verändern. Zum einen wurde die Expression von getagtem Smt3/dSUMO genutzt, weil keine brauchbaren und kommerziell verfügbaren dSUMO-Antikörper für *Drosophila* Smt3/dSUMO existieren, die sich für Western Blot und Immunpräzipitation in Co-IP und ChIP eignen würden. Zum anderen wurde die Expression von dem Fusionsprotein genutzt, um zu studieren, wie sich eine Erhöhung der Menge an SUMOylierten Protein auf die Isolation, aber auch die Interaktion mit Chromatin auswirkt. Die natürlich vorkommende Menge an SUMOyliertem Protein entspricht nur in etwa 10 % des jeweils gesamten Proteins einer Art (z.B.: 10 % von 100 % Mod(mdg4) ist SUMOyliert), was die Detektion zusätzlich erschwerte (Benson et al. 2009). Die Konstrukte hierfür waren aus vorhergehenden Arbeiten bereits vorhanden (Masterarbeit, Meike K. Abraham; Eugenia Wagner, AG Brehm). Zwei verschiedene Vektortypen wurden zur Expression von FLAG-His-dSUMO verwendet. Zum einen wurden Plasmide mit einem konstitutiv-aktiven Aktin-Promotor zu Expression von FLAG-His-SUMO genutzt (Eugenia Wagner, AG Brehm). Dieses System hat den Vorteil, dass die Expression des Fusionsproteins moderat ist. Bei der Verwendung dieses Systems konnte man einen *knock down* von Smt3/dSUMO, oder anderen Proteinen der SUMO-Kaskade durchführen und einen Effekt der jeweiligen Proteine auf die Isolation, aber auch auf die Eigenschaften von IBPs, studieren. Dieses System wurde für IPs und zur Untersuchung von CP190-Speckles bzw. *Insulator-Bodies* verwendet (Doktorarbeit, Melanie Buxa). Außerdem wurde ein induzierbares Vektorsystem verwendet, das einen durch Kupfersulfat (CuSO_4) induzierbaren Metallothionein-Promotor besitzt. Hier kann die Expression von FLAG-His-dSUMO durch Zugabe von CuSO_4 angeregt werden (Maïke K. Abraham, Masterarbeit). Diese Expression war deutlich stärker als die durch den Aktin-Promotor vermittelte Expression des Fusionsproteins. Dieses System wurde zur Analyse der genomweiten Bindung von Isolator-bindenden Proteinen und Kofaktoren (CP190 und dCTCF) in der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) verwendet (Anhang: Abbildung 42).

In Vorversuchen wurde bereits überprüft, ob die Expression von FLAG-His-dSUMO funktioniert. Dabei wurde die Expression des Fusionsproteins sowohl in transient

transfizierten, als auch in stabil transfizierten Zellen kontrolliert. Hierfür wurden Immunfluoreszenz- und auch Western Blot-Experimente durchgeführt (Masterarbeit, Meike K. Abraham).

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

S2-Zelllinien	Verwendete Vektoren	Eigenschaften
Wildtyp (wt)	-	Negativ-Kontrolle/ keine Expression
Klon 6	pRM-FLAG-HA-CP190	Induzierbare FLAG-HA-CP190 Expr.
Klon 15	pAW-FLAG-His-dSUMO	konstitutive FLAG-His-dSUMO Expr.
Klon 17	pAW-FLAG-His-dSUMO	konstitutive FLAG-His-dSUMO Expr.
Klonpool (Pool)	pRM-FLAG-His-dSUMO	Induzierbare FLAG-His-dSUMO Expr.

Die Expression von FLAG-His-dSUMO der stabilen Ziellinien wurde erneut kontrolliert. Außerdem wurden die Expressionslevel von CP190 und dCTCF überprüft, um aus zu schließen, dass diese durch die Expression von Flag-His-dSUMO beeinflusst werden. Dafür wurden SDS-Proteinextrakte der stabil transfizierten Zellen hergestellt (Klon 15, Klon 17, Pool + CuSO₄; Tabelle 1). Als Negativ-Kontrolle für die FLAG-His-dSUMO-Expression dienten wildtypische S2-Zellen (S2 wt) und der uninduzierte Klonpool (Pool -). Ein Western Blot mit anschließender indirekter Immundetektion für FLAG-SUMOylierte Proteine, CP190 und dCTCF wurde durchgeführt. Das Haushaltsgen β -Tubulin diente als Ladekontrolle (Abbildung 21).

Die Expression von FLAG-His-dSUMO in S2-Zellen war erfolgreich. Die Extrakte aller FLAG-His-dSUMO-exprimierender Zellen zeigten den typischen Proteinschmier für SUMOylierter Proteine, über die gesamte Länge des Gels. Dies konnte man erwarten, wenn man die SUMOylierung des Gesamtproteins der Zelle im Western Blot betrachtet (Abbildung 21; Klon 15, Klon 17 und Pool +, Tabelle 1). Im Wildtyp-Extrakt (S2 wt) war erwartungsgemäß keine Expression des Fusionsproteins zu detektieren. Der nicht-induzierte Klonpool (Pool -, Tabelle 1) zeigte eine schwach-durchlässige Expression von FLAG-His-dSUMO, die aber im Vergleich zum induzierten Pool sehr gering ausfiel.

Außerdem war zu erkennen, dass die Expression des Fusionsproteins keinen Einfluss auf die Menge an CP190 und dCTCF hatte. Dies konnte man beim Vergleich der Proteinlevel von CP190 und dCTCF zwischen S2 wt und überexprimierenden Zellen (Klon 15 und 17, Tabelle 1), bzw. induziertem (Pool +, Tabelle 1) und nicht-induziertem Klonpool (Pool -, Tabelle 1) erkennen. Der β -Tubulin-Level zeigte, dass die Proteinmenge bei allen Proben gleich mäßig

war, mit Ausnahme von Klon 15. Wobei davon auszugehen war, dass die Probe weniger Protein enthielt, als die anderen. Die geringere Proteinmenge in dieser Probe zeigte sich auch bei FLAG-SUMOylierten Proteinen, CP190 und dCTCF, deshalb ließ sich auch hier die Expression des Fusionsproteins bestätigen und es war zu vermuten, dass sie keine Auswirkungen auf die Expression von dCTCF und CP190 hat (Abbildung 21).

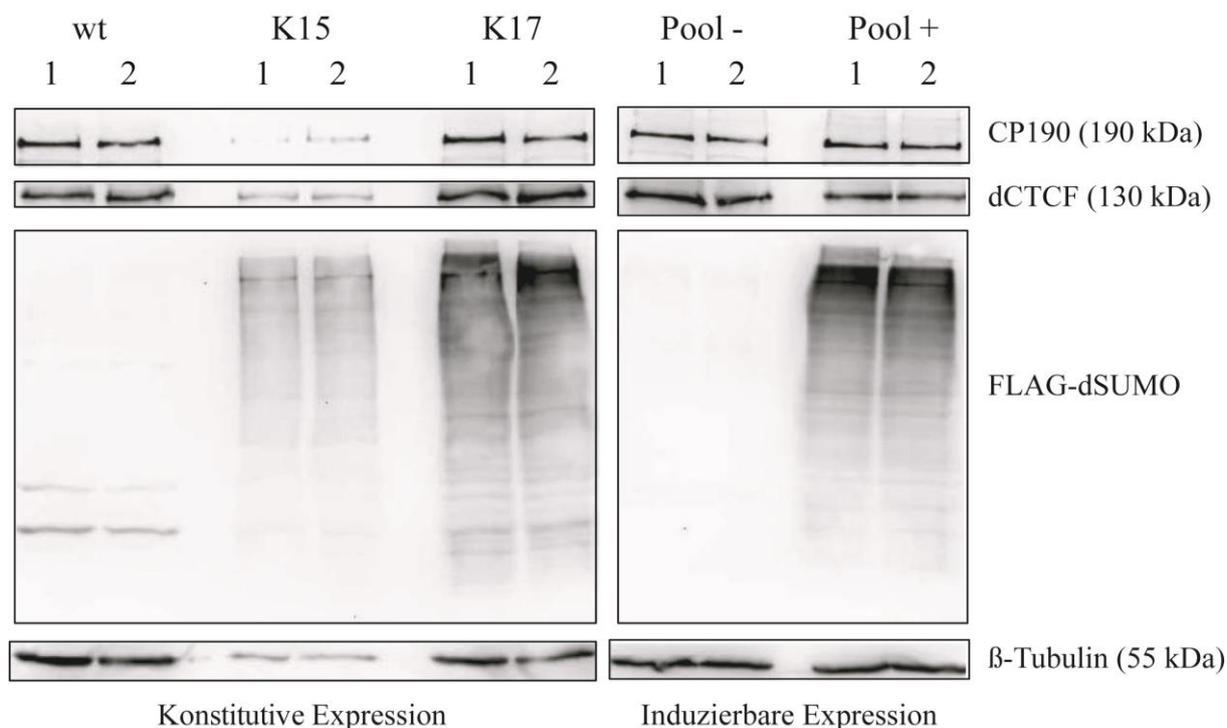


Abbildung 21: Die erfolgreiche Expression von FLAG-His-dSUMO in S2-Zellen, hatte keinen Einfluss auf die endogene Expression von CP190 und dCTCF. Western Blot von Extrakten FLAG-His-dSUMO überexprimierender S2-Zellen (Pool +/induziert mit CuSO_4) zeigten SUMOylierte Proteine in der Detektion mit FLAG-Antikörper. Die Expression von CP190 und dCTCF wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Expressionslevel dieser Proteine variierten nicht zwischen uninduzierten (pool -) und induzierten Zellen (pool +). β -Tubulin, ein Haushaltgen, diente als Ladekontrolle. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific. Primär-Antikörper: α -CP190 (Ratte) 1:1000, α -dCTCF (Hase) 1: 1000, α -beta-Tubulin (Maus) 1:1000 und α -FLAG (Maus) 1:1000 jeweils in 3 % Milch. Sekundär-Antikörper: α -Ratte 1:25.000, α -Maus 1:25.000, α -Hase 1:25.000 jeweils in 0,5 % Milch. Zur Detektion der Signale wurde die Membran mit dem HRP-Substrat-Komplettsystem von MilliQ benetzt, zwischen 100 und 240 Sekunden, am VersaDoc von BioRad belichtet und die Chemilumineszenz detektiert. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms Quantity One von BioRad ausgewertet.

Die Expression von FLAG-His-dSUMO war funktional, da der Schmier zeigte, dass verschiedene SUMOylierte Proteine sich durch FLAG-Detektion nachweisen ließen. Auch hatte die Expression des Fusionsproteins keinen Einfluss auf die Expression anderer, relevanter Proteine, wie dCTCF und CP190. Somit konnten die stabilen Zelllinien für weitere Experimente verwendet werden.

3.2.3. CP190 zeigte eine potentielle SUMOylierung in der FLAG-IP SUMOylierter Proteinen nach FLAG-His-dSUMO-Expression

Da die SUMOylierung einen deutlichen Einfluss auf die Isolation in *Drosophila* S2-Zellen hatte, wie in RNAi-Screen und Luziferease-Reporter Assay festgestellt werden konnte (Abbildung 19 und Abbildung 20), drängte sich nun die Frage auf, welche der an der Isolation beteiligten Proteine SUMOyliert vorliegen könnte. Die interessantesten Faktoren, die an der Enhancer-Blockade der untersuchten Isolatoren beteiligt waren und somit potentiell SUMOyliert sein könnten, sind dCTCF und CP190. Diese sollten zunächst auf ihre SUMOylierung untersucht werden. Für CP190 war bereits aus diversen Veröffentlichungen bekannt, dass es SUMOylierung in *Drosophila* aufweist (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Für CTCF ist nur bekannt, dass es in Vertebraten SUMOyliert vorliegen kann (Kitchen and Schoenherr 2010, MacPherson et al. 2009).

Zur Untersuchung der beiden Faktoren auf SUMOylierung, wurde eine SUMOylierungsspezifische FLAG-Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dafür wurden Extrakte von wildtypischen S2-Zellen als Negativ-Kontrolle und Extrakte von dem FLAG-HA-CP190 überexprimierenden S2 Klon 6 (Diplomarbeit Benjamin Schmid, Gießen) als Positiv-Kontrolle verwendet. Extrakte des FLAG-His-dSUMO-exprimierenden Klon 15, sowie des induzierten Klonpools, sollten auf SUMOyliertes CP190 bzw. dCTCF untersucht werden. Eine IP wurde mittels FLAG-Antikörper für die Präzipitation von FLAG-SUMOylierten Proteinen durchgeführt. Als Kontrolle der Spezifität der IP wurde eine IgG-IP mit einer Fraktion der Lysate durchgeführt. Nach der FLAG-IP konnte ein Western Blot mit anschließender indirekter Immundetektion von dCTCF und CP190 vorgenommen werden.

Nach der Detektion von CP190 war ein schwaches Signal, etwa 20 kDa oberhalb des CP190-Signals bei 190 kDa, zuerkennen. Dies galt für den konstitutiv FLAG-His-dSUMO exprimierenden Klon 15, sowie dem induzierten Klonpool. Dieses Signal war nicht im Wildtyp oder in der unspezifischen IP mit dem IgG zu finden. Die Positiv-Kontrolle des FLAG-HA-CP190-exprimierenden Klons 6 zeigte eine deutliche Anreicherung des CP190-Fusionsproteins, was auf eine erfolgreiche FLAG-IP hinwies (Abbildung 22). Aus diesen Resultaten konnte man folgern, dass CP190 auch in unseren S2-Zellen potentiell SUMOyliert vorliegen könnte.

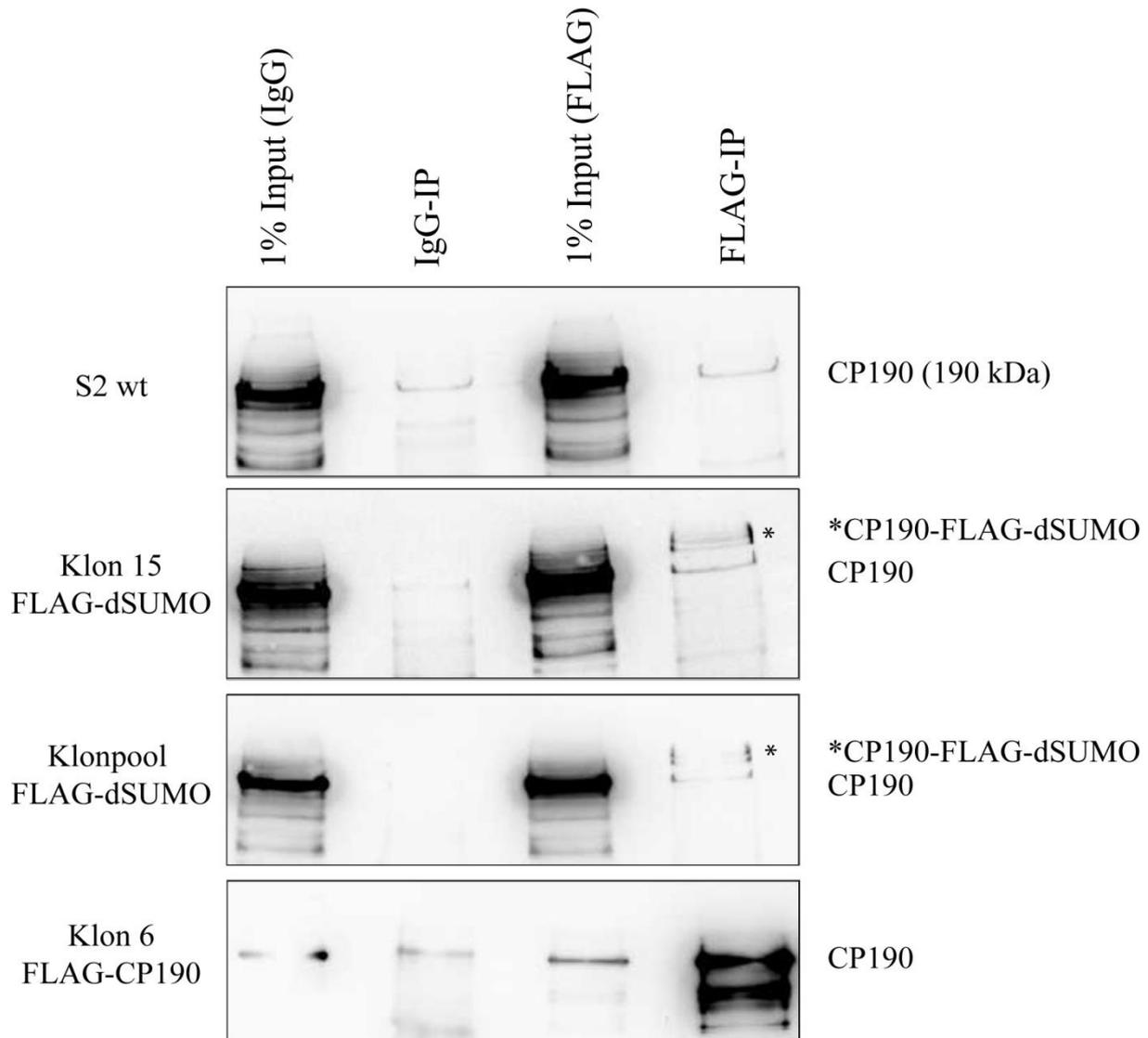


Abbildung 22: Die FLAG-IP in FLAG-His-dSUMO-exprimierenden S2-Zellen resultierte in der Anreicherung von SUMOyliertem CP190. Eine FLAG-Immünpräzipitation wurde durchgeführt. Dafür wurden die Zellen ausgesät, induziert und geerntet. Wildtypische S2-Zellen (S2-wt) dienten als Negativ-Kontrolle und IgG-IP wurde als Kontrolle für die Spezifität der IP genutzt. Als Positiv-Kontrolle für die IP diente der FLAG-HA-CP190 überexprimierende Klon 6 (Diplomarbeit Benjamin Schmid, Gießen). Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific. Primär-Antikörper: α -CP190 (Ratte) 1:1000 in 3 % Milch. Sekundär-Antikörper: α -Ratte 1:25.000 in 0,5 % Milch. Zur Detektion der Signale wurde die Membran mit dem HRP-Substrat-Komplettsystem von MilliQ benetzt und zwischen 100 und 240 Sekunden am VersaDoc von BioRad belichtet und die Chemilumineszenz detektiert. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms Quantity One von BioRad ausgewertet.

Für die FLAG-IPs der FLAG-His-dSUMO-exprimierenden Zellen war ein schwaches Signal oberhalb des dCTCF-Signals zu detektieren, aber insgesamt war viel Hintergrundsignal und eine große Menge unspezifischen Bindung von dCTCF an die Protein-A/G-Agarosebeads zu verzeichnen. Bei den zusätzlichen Signalen innerhalb der Proben FLAG-His-dSUMO-exprimierender Zellen, könnten auch auf Interaktionen mit anderen SUMOylierten Proteinen, wie zum Beispiel CP190, zurück zu führen sein. Die detektierten Signale waren daher nicht

eindeutig SUMOyliertem dCTCF zu zuordnen, auch wenn es nicht in den Wildtyp-Proben oder der IgG-IP zu detektieren war (Abbildung 23).

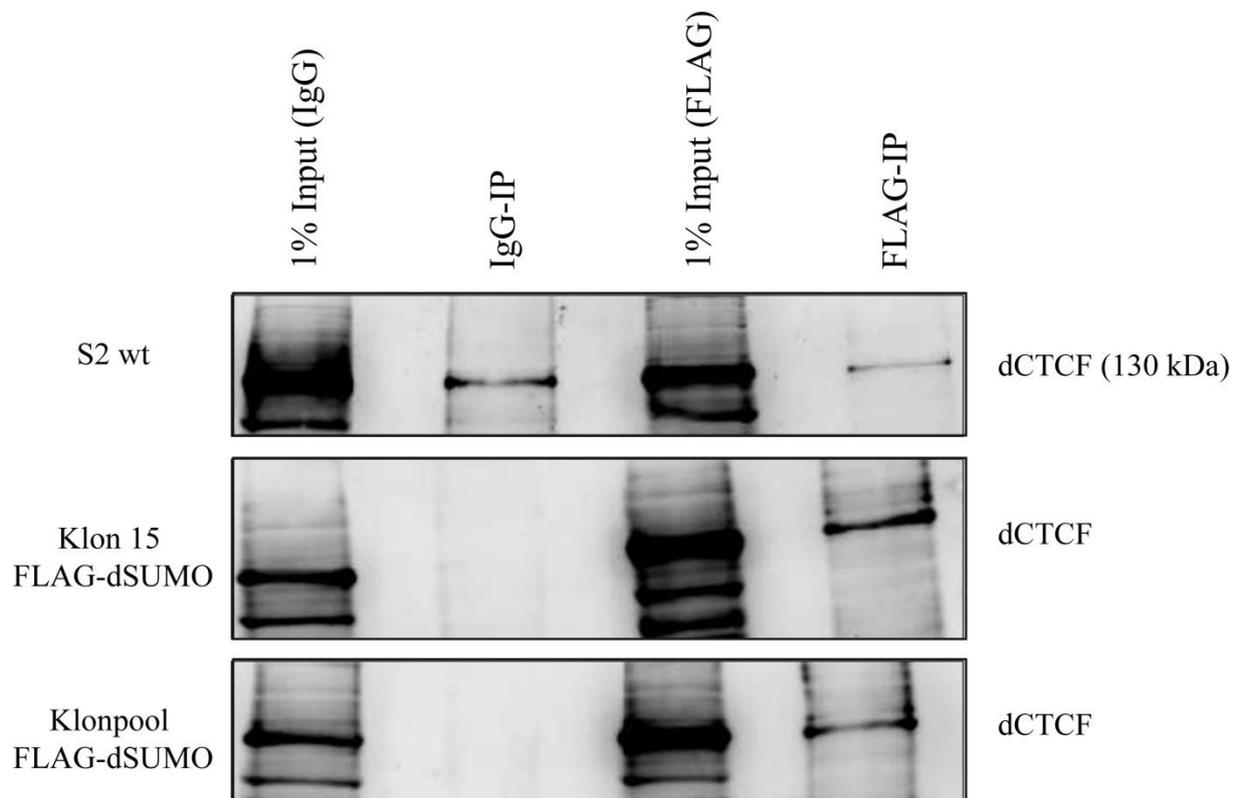


Abbildung 23: Die SUMOylierung von dCTCF konnte nicht durch FLAG-IP nachgewiesen werden. Eine FLAG-Immunpräzipitation wurde durchgeführt. Dafür wurden die Zellen ausgesät, induziert und geerntet. Wildtypische S2-Zellen (S2 wt) dienen als Negativ-Kontrolle und IgG-IP wurde als Kontrolle für die Spezifität der IP genutzt. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific. Primär-Antikörper: α -dCTCF (Hase) 1:1000 in 3 % Milch. Sekundär-Antikörper: α -Hase 1:25.000 in 0,5 % Milch. Zur Detektion der Signale wurde die Membran mit dem HRP-Substrat-Komplettsystem von MilliQ benetzt und zwischen 100 und 240 Sekunden am VersaDoc von BioRad belichtet und die Chemilumineszenz detektiert. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms Quantity One von BioRad ausgewertet.

Die FLAG-IPs bestätigten die aus der Literatur bekannten Erkenntnisse, dass CP190 in *Drosophila* SUMOyliert vorliegt (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Dabei wurde CP190 SUMOylierung in S2-Zellen (Golovnin et al. 2012), aber auch in *D. melanogaster* Larven und *in vitro* (Capelson and Corces 2006) untersucht. Für dCTCF konnte nicht eindeutig festgestellt werden, dass es SUMOyliert vorlag.

3.2.4. Untersuchung des Bindeverhalten von CP190 und dCTCF in Abhängigkeit von SUMOylierung in *Drosophila* S2-Zellen

Im Weiteren wurde analysiert welche Folgen die potentielle SUMOylierung von CP190 haben könnte. Außerdem konnte der allgemeine Einfluss von SUMOylierung auf Isolator-bindenden Faktoren untersucht werden. Dazu lag der Fokus auf der Bindung von CP190, dCTCF und

anderen Isolator-bindenden Proteinen an die DNA. Die Bindung der Faktoren wurde, vor und nach Expression des FLAG-His-dSUMO-Fusionsproteins, auf genomweiter Ebene mittels ChIP-Seq, aber auch an individuellen Genomabschnitten mittels ChIP-qPCR-Experimenten betrachtet.

3.2.4.1. Genomweite Untersuchung der Bindung von SUMOylierung und Isolator-bindenden Proteinen

Zur Untersuchung der Faktoren, welche mit dSUMO auf der DNA kolokalisieren, wurde zunächst die genomweite Bindung von dSUMO, die bereits publiziert wurde (Gonzales et al, 2014), und die diverser Isolator-bindender Proteine bioinformatisch untersucht. Dabei wurden neben CP190 und dCTCF, auch BEAF-32, Su(Hw), Pita und ZIPIC, sowie Ibf1 und Polycomb (PC) analysiert. Dabei ist nur von CP190 bekannt, dass dieses SUMOyliert vorliegt, was auch in den FLAG-IP-Experimenten gezeigt werden konnte (Abbildung 22) (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Die anderen untersuchten Proteine sind zwar Kofaktoren von CP190, aber es ist nicht bekannt, dass diese in *Drosophila* SUMOyliert werden.

In den folgenden bioinformatischen Analysen wurden zunächst Daten der Literatur verwendet um einen Eindruck des Vorkommens von SUMOylierung und Isolator-bindenden Proteinen auf dem Chromatin zu gewinnen. Dabei wurden zum einen die Pita- und ZIPIC-Daten der oben beschriebenen ChIP-Seq-Analyse verwendet (Maksimenko et al. 2015), aber auch Daten von ChIP-Seq-Experimenten für dSUMO (Gonzalez et al. 2014), BEAF-32 (Liang et al. 2014), Su(Hw), dCTCF (Ong et al. 2013), Polycomb (PC) (Gonzalez et al. 2014) und Ibf1 (Cuartero et al. 2014) die bekanntlich mit CP190 interagieren und auf dem Chromatin kolokalisieren (Abbildung 24). Beim Vergleich der Bindestellen bzw. Peaks für die Bindung von dSUMO und einiger Isolator-bindender Proteine (Pita, BEAF-32, Su(Hw), ZIPIC und dCTCF) war deutlich zu erkennen, dass eine große Überschneidung vorlag. CP190 (rot) und Pita (gelb) waren an etwa 2/3 der Bindestellen von dSUMO zu finden. dCTCF (grün) war an knapp der Hälfte der Bindestellen von dSUMO zu finden, ebenso wie BEAF-32 (violett). ZIPIC (dunkelblau) band an etwa 1/3 der Bindestellen von dSUMO und Su(Hw) (hellblau) an circa 1/4 der Bindestellen von dSUMO (Abbildung 24). Diese starke Übereinstimmung in der Bindung dieser Faktoren wies, genau wie der funktionelle Assay (Abbildung 19, Abbildung 20), auf eine mögliche Notwendigkeit von dSUMO für die Isolation hin.

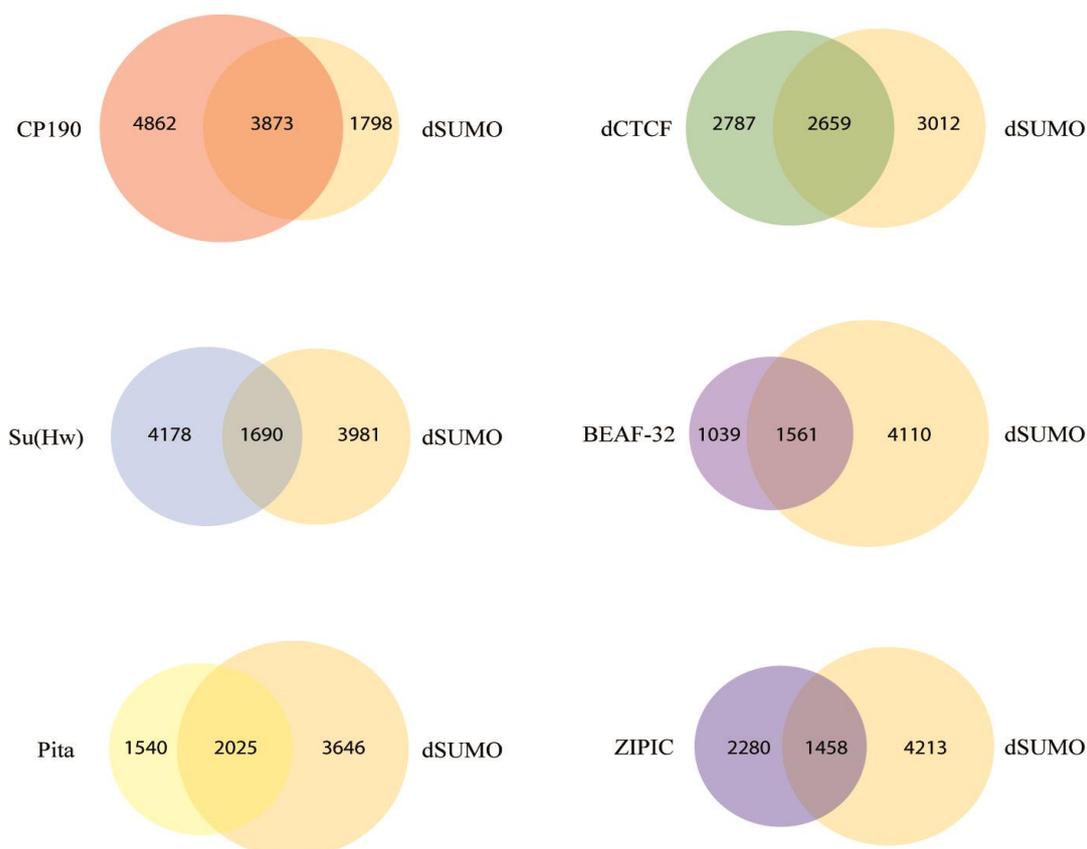


Abbildung 24: Überschneidung der Bindestellen von dSUMO und Isolator-bindenden Proteinen. Venn-Diagramme der Überschneidung von dSUMO (gelb) und CP190 (rot), dCTCF (grün), Su(Hw) (hellblau), BEAF-32 (violett), Pita (gelb) und ZIPIC (dunkelblau). Dazu wurden die bei GEO hinterlegten Daten von ChIP-Chip und ChIP-Seq für CP190, dCTCF, Su(Hw) und BEAF-32 und die in dieser Arbeit erstellten ChIP-Seq-Daten für Pita und ZIPIC verwendet (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

Bei einer genaueren und vergleichenden Betrachtung der Bindung der verschiedenen Isolator-bindenden Proteine und dSUMO konnte gezeigt werden, dass die Hälfte aller CP190 Bindestellen mit dSUMO überlappt. Ähnliches war für dCTCF zu beobachten. Pita teilt 2/3 der Bindestellen mit dSUMO, genauso wie BEAF-32. Polycomb (PC) hat eine nahezu vollständige Überschneidung mit dSUMO bei dem Vergleich der zugrunde liegenden ChIP-Seq-Daten, ebenso wie Ibf1. Su(Hw) dagegen zeigte eine vergleichsweise geringe Überschneidung mit dSUMO (Abbildung 25). Diese Untersuchungen zeigten deutlich, dass CP190 und seine Interaktionspartner, auch solche die vorrangig mit CP190 auf dem Chromatin interagieren, wie dCTCF, Pita, Ibf1 und BEAF-32, eine deutliche Überschneidung mit dSUMO-Bindestellen aufwiesen. Diese Resultate deuteten ebenfalls darauf hin, dass SUMOylierung ein Aspekt sein könnte, der Einfluss auf die Isolation nimmt, da es an vielen Isolatoren bzw. im Kontext mit einigen Isolatorproteinen zu finden war. Es könnte sein, dass dies durch die potentielle SUMOylierung von CP190 hervorgerufen wird, da dieses von den

Untersuchten Isolator-bindende Proteinen das einzige ist, das nachweisbar SUMOyliert vorliegt (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012).

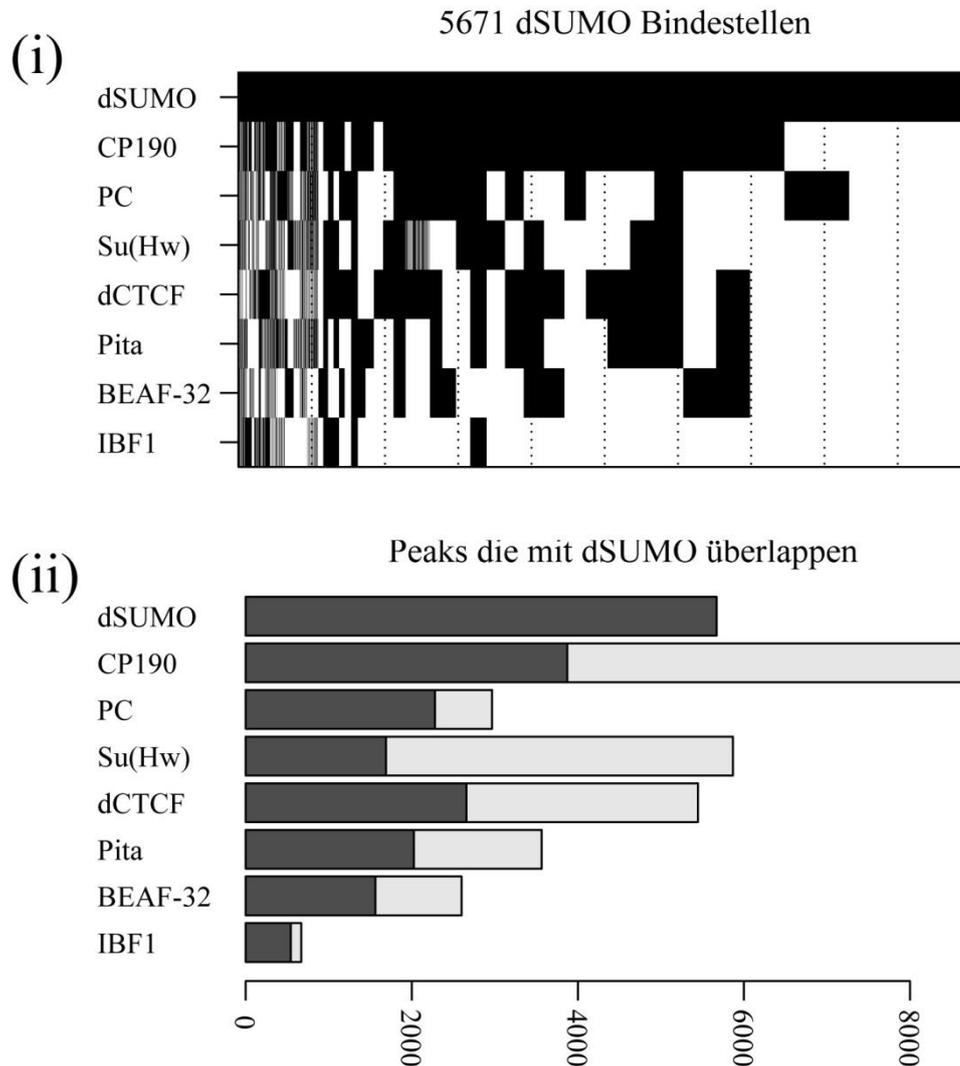


Abbildung 25: dSUMO war an den Bindestellen von Isolator-bindenden Proteinen angereichert. (i) Binäre Heatmaps von dSUMO Bindestellen, die anhand ihrer Überlagerung mit der Bindung von CP190, PC, Su(Hw), BEAF-32, dCTCF, Pita und Ibf1 klassifiziert wurden. Alle angereicherten Bindestellen wurden dargestellt (alle 5671 Bindestellen/Peaks für dSUMO). Jede Gruppe von Bindungsanreicherung wurde als schwarzer Balken dargestellt und konnte einer genomischen Region zugeordnet werden. Weiße Balken zeigen, dass keine Bindung an diesen Regionen stattfand. Die Bindestellen wurden nach der Frequenz bzw. Häufigkeit sortiert, in der ein bestimmtes Bindemuster beobachtet wurde. (ii) Das zugehörige Balkendiagramm beschreibt die Gesamtheit der Bindestellen der jeweiligen Faktoren, die zusammen mit dSUMO banden(dunkelgrau). Die Fraktion an Bindestellen, die nicht mit dSUMO überlappten, ist ebenfalls dargestellt (hellgrau). Die Anzahl der Bindestellen ist auf der y-Achse dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

Die bioinformatischen Analysen, sowie die FLAG-IPs gaben Hinweise darauf, dass CP190 das Ziel der SUMOylierung sein könnte und dadurch eventuell die Funktionalität, aber auch andere Eigenschaften von CP190 beeinflusst. Aber es wäre auch möglich, dass andere IBPs dem entsprechend von SUMOylierung beeinflusst werden. Im Weiteren wurde deshalb untersucht, welche Folgen die SUMOylierung auf das DNA-Bindevverhalten von CP190 und

dCTCF hat. Dabei wurde der induzierbare Klonpool verwendet, um einen direkten Vergleich zwischen FLAG-His-dSUMO-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen zu bekommen, die denselben Ursprung haben. Um zu verstehen, ob die Bindung dieser Faktoren über das gesamte Genom verändert ist und ob sich dabei Gesetzmäßigkeiten zur Bindung von CP190 nach FLAG-His-dSUMO-Expression feststellen lassen, wurde eine genomweite Analyse der Bindung von CP190, dCTCF und FLAG-His-dSUMO vorgenommen. Mittels ChIP-Methode konnte analysiert werden, wie sich CP190 und dCTCF nach der Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression verhalten.

3.2.4.2. Genomweite Untersuchungen der CP190-Bindung zeigten eine deutliche Zunahme der CP190-Bindung nach Expression von FLAG-His-dSUMO

Für die genomweite Analyse der Bindung von dCTCF und CP190, vor und nach Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression, wurde eine ChIP-Seq-Analyse von FLAG-His-dSUMO, CP190 und dCTCF vorgenommen. Zunächst wurde dazu ein normales ChIP-Experiment durchgeführt und die DNA mittels Chelex-Methode aufgereinigt. 10 ng der jeweiligen ChIP-DNA wurden nach Braunschweig zu einem Sequenzierungslabor verschickt und dort für die Sequenzierung präpariert. Die dabei entstandenen ChIP-Seq-Daten wurden einer bioinformatischen Analyse unterzogen.

Nach der Ermittlung der Bindestellen/Peaks konnte deutlich festgestellt werden, dass eine Bindung von CP190, aber auch dCTCF häufig an Stellen im Genom zu finden war, die auch FLAG-dSUMO-Anreicherung aufwiesen (Abbildung 26, Abbildung 27; Anhang: Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 48 und Abbildung 49), was die obige Analyse bestätigt. Zudem war an einigen der untersuchten Bindestellen eine Anreicherung von CP190, nach Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression, zu beobachten, zum Beispiel innerhalb des EcR-Gens und des cg8776-Gens (Abbildung 26, Abbildung 27; Anhang: Abbildung 48 und Abbildung 49). An manchen Bindestellen war allerdings auch eine Anreicherung von CP190 zu erkennen, ohne dass die SUMOylierung eine Veränderung zeigte (Anhang: Abbildung 46, Abbildung 47). Wahrscheinlich war dabei nicht nur die SUMOylierung an der direkten Bindestelle von CP190 ausschlaggebend, sondern eventuell auch die SUMOylierung umliegenden Chromatins. Es ist bekannt, dass Histone auch von SUMOylierung betroffen sein können (Dhall et al. 2014, Stielow et al. 2008). Die Bindung von dCTCF scheint weniger stark durch die SUMOylierung beeinflusst, als CP190. Die Bindung von dCTCF variiert nur minimal (Abbildung 26, Abbildung 27; Anhang: Abbildung 46, Abbildung 47 und Abbildung 48,) bzw. gar nicht (Anhang: Abbildung 49).

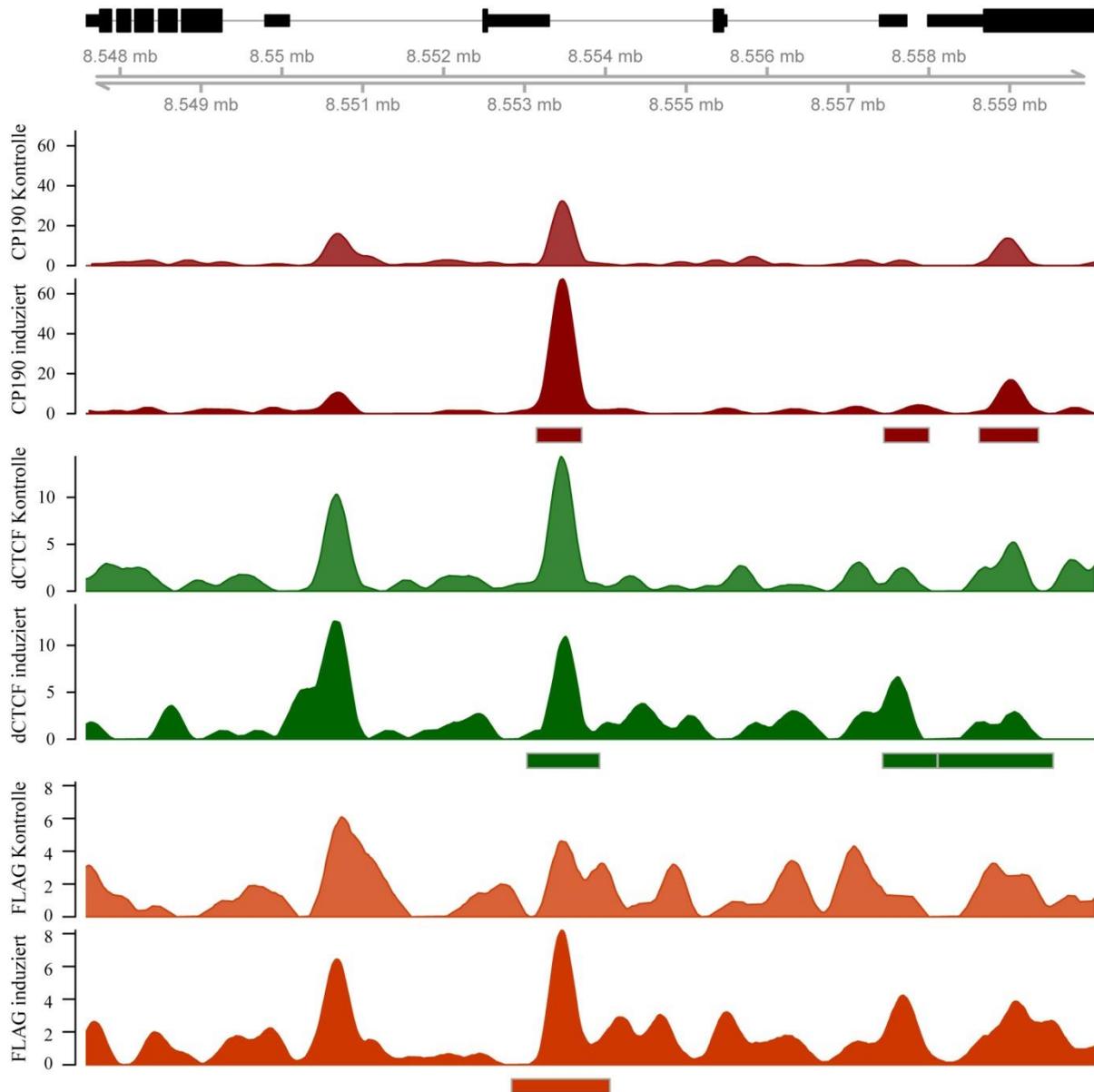


Abbildung 26: Überschneidung von CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-Bindung am *cg8776*-Gen vor und nach Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von CP190 (rot), dCTCF (grün) und FLAG-His-dSUMO (gelb,) vor (Kontrolle, blass) und nach Induktion (induziert, dunkel). Die Deckung der CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. Peaks der ChIP-Seq-Daten der GEO-Datenbank für CP190-, dCTCF- (Ong et al. 2013) und dSUMO-Bindestellen (Gonzalez et al. 2014) wurden als Balken dargestellt. Die genomische Region bzw. der Ausschnitt des *cg8776*-Gens wurde in schwarz dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

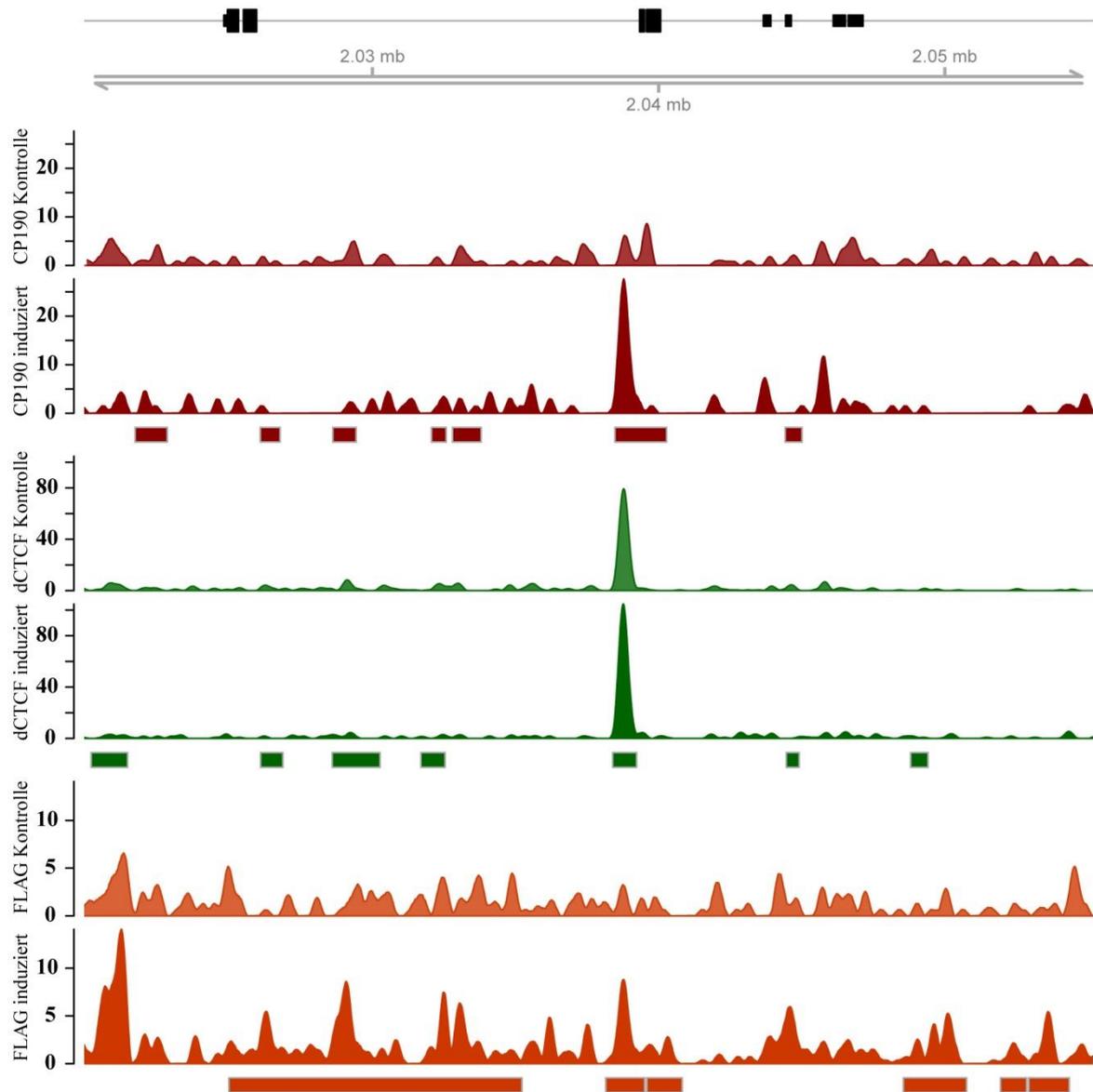


Abbildung 27: Überschneidung von CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-Bindung am EcR-Gen vor und nach Induktion der -His-dSUMO-Expression. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von CP190 (rot), dCTCF (grün) und FLAG-His-dSUMO (gelb,) vor (Kontrolle, blass) und nach Induktion (induziert, dunkel). Die Deckung der CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. Peaks der ChIP-Seq-Daten der GEO-Datenbank für CP190-, dCTCF- (Ong et al. 2013) und dSUMO-Bindestellen (Gonzalez et al. 2014) wurden als Balken dargestellt. Die genomische Region bzw. der Ausschnitt des EcR-Gens wurde in schwarz dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

Weil insgesamt eher weniger Bindestellen für CP190 innerhalb der ChIP-Seq-Daten von diesem ermittelt werden konnten, wurden bereits publizierte ChIP-Seq-Daten für CP190 und dCTCF aus S2-Zellen zum Vergleich herangezogen (Ong et al. 2013). Bei der Betrachtung einer vergleichenden *Heatmap* der Bindungsdaten zeigte sich, dass die gefundenen Anreicherungen für CP190 auch in den ChIP-Seq-Daten zu finden waren. Für dCTCF

dagegen konnte beobachtet werden, dass keine Anreicherung von dCTCF nach der Induktion der Expression zu finden war (Abbildung 28).

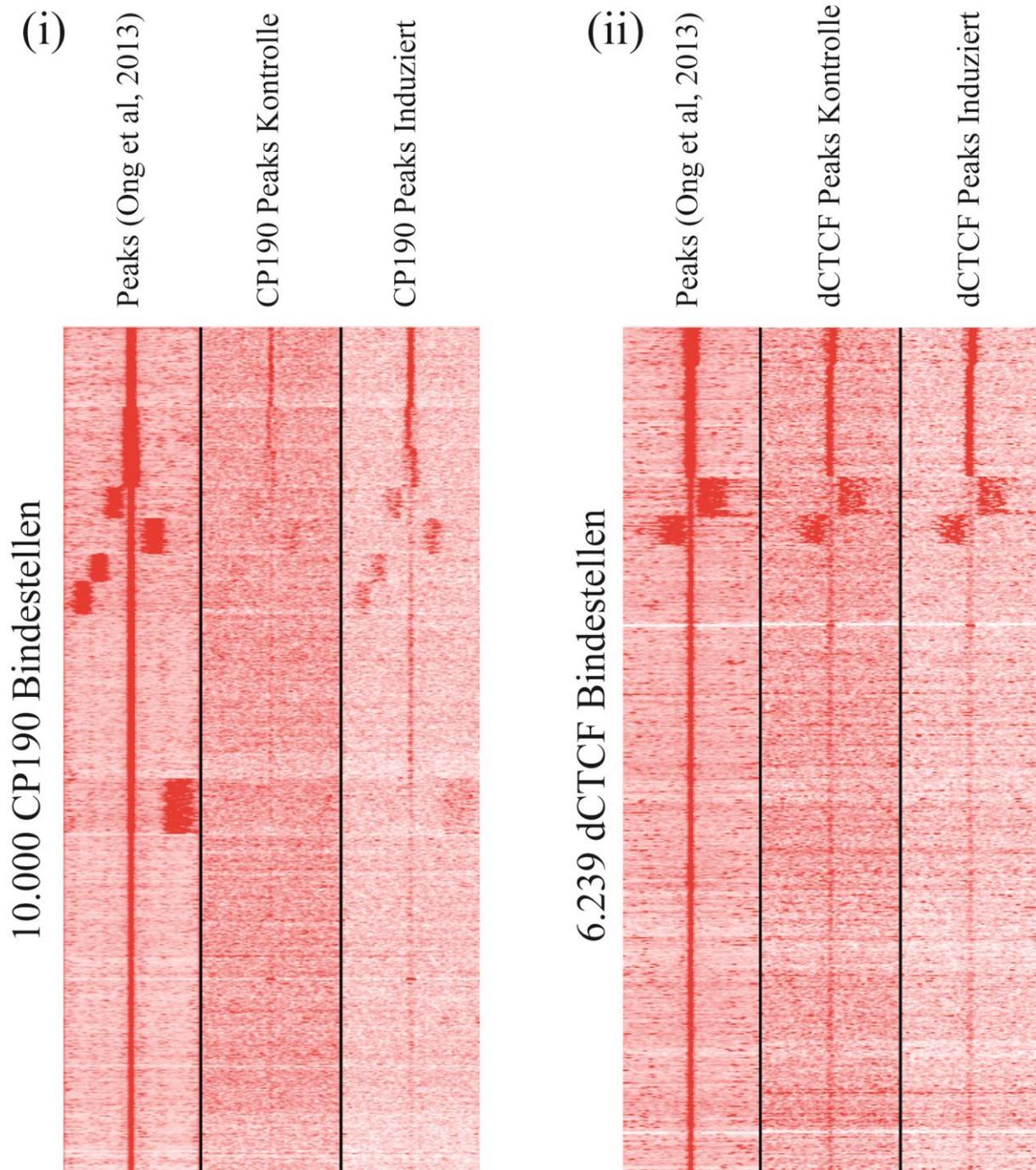


Abbildung 28: Vergleich der CP190- und dCTCF-Anreicherungen von publizierten ChIP-Seq-Daten und den Daten dieser Arbeit. Heatmaps zeigen ähnliche Gruppen von CP190- bzw. dCTCF-Anreicherungen für publizierte ChIP-Seq-Daten (Ong et al. 2013) und ChIP-Seq-Daten dieser Arbeit. Allerdings waren die Profile dieser Arbeit deutlich schwächer und zeigten insgesamt weniger spezifische Bindungen. Heatmaps der 10.000 Top-Peaks von CP190 bzw. alle 6.239 dCTCF-Peaks. Abgebildet sind die CP190- und dCTCF-Bindungen in dunkelrot. Dabei sind jeweils 1000 bp *up-* und *down-stream* der Bindestellen dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

Bei der Betrachtung aller CP190-Bindestellen konnte man sehen, dass die Bindung von CP190 mit der Änderung der FLAG-dSUMO-Bindung korreliert. Dabei konnte man bei allen detektierten Anreicherungen, eine Änderung der CP190-Bindung in beide Richtungen erkennen (Abbildung 29; links). Beim Vergleich von publizierten Daten für CP190-ChIP-Seq (Ong et al. 2013) und den Daten der ChIP-Seq-Analysen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Bindeverhalten von CP190 tatsächlich eher durch die Bindung von FLAG-dSUMO verstärkte wurde (Abbildung 29, Mitte). Auch beim Vergleich der Bindungszunahme von CP190, bei dem der induzierten Klonpool mit der Kontrolle (nicht induzierter Klonpool) ins Verhältnis gesetzt wurden, war zu beobachten, dass die CP190-Bindung insgesamt zunimmt. Die Zunahme der CP190-Bindung wurde an allen Stellen verglichen die mit FLAG-dSUMO-Peaks überlappen (linker Boxplot), oder dies nicht tun (rechter Boxplot) (Abbildung 29, rechts).

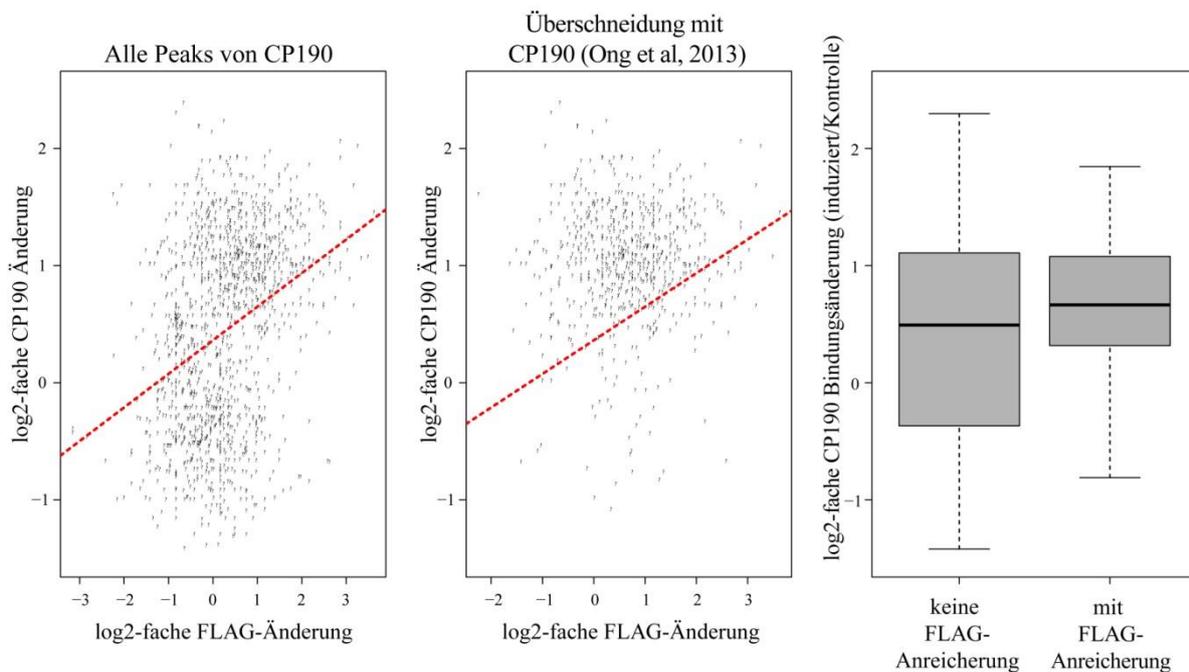


Abbildung 29: Die CP190-Bindung nahm zu sobald FLAG-dSUMO exprimiert wurde. Korrelation der log₂-fachen CP190-Bindungsveränderung mit der log₂-fachen FLAG-dSUMO-Bindungsveränderung. Links: Alle Anreicherungsspitzen, die im ChIP-Seq für CP190 in S2-Zellen festgestellt wurden, wurden in die Berechnung einbezogen. Mitte: Nur Bindestellen für CP190, die auch in ChIP-Seq-Daten der Literatur zu finden waren (Ong et al. 2013), wurden in die Berechnung einbezogen. Rechts: log₂-fache CP190-Bindungszunahme, bei dem der induzierten Klonpool mit der Kontrolle (nicht induzierter Klonpool) ins Verhältnis gesetzt wurden, an Stellen mit (rechter Boxplot) und ohne (linker Boxplot) FLAG-dSUMO-Überschneidung (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

Dieselbe genomweite Analyse zeigte für dCTCF, dass dieses keine auffällige Veränderungen in seiner Bindung zum Chromatin, im Zusammenhang mit Änderungen des FLAG-dSUMO-Vorkommens, aufwies (links). Beim Vergleich der genomweiten Bindung von dCTCF in dieser Arbeit mit den publizierten Daten für dCTCF-ChIP-Seq (Ong et al. 2013), zeigte sich

sogar noch eine Verringerung der Änderung der dCTCF-Bindung, im Zusammenhang mit Änderungen des FLAG-dSUMO-Vorkommens (Mitte). Beim Vergleich der dCTCF-Bindungsänderung, zwischen induziertem Klonpool und Kontrolle, konnte ebenfalls beobachtet werden, dass es keine Zunahme von dCTCF an Stellen im Genom mit FLAG-dSUMO-Anreicherung nach Induktion zu verzeichnen war, wenn man diese mit den Bindestellen ohne FLAG-dSUMO-Anreicherung verglich (Abbildung 30, rechts).

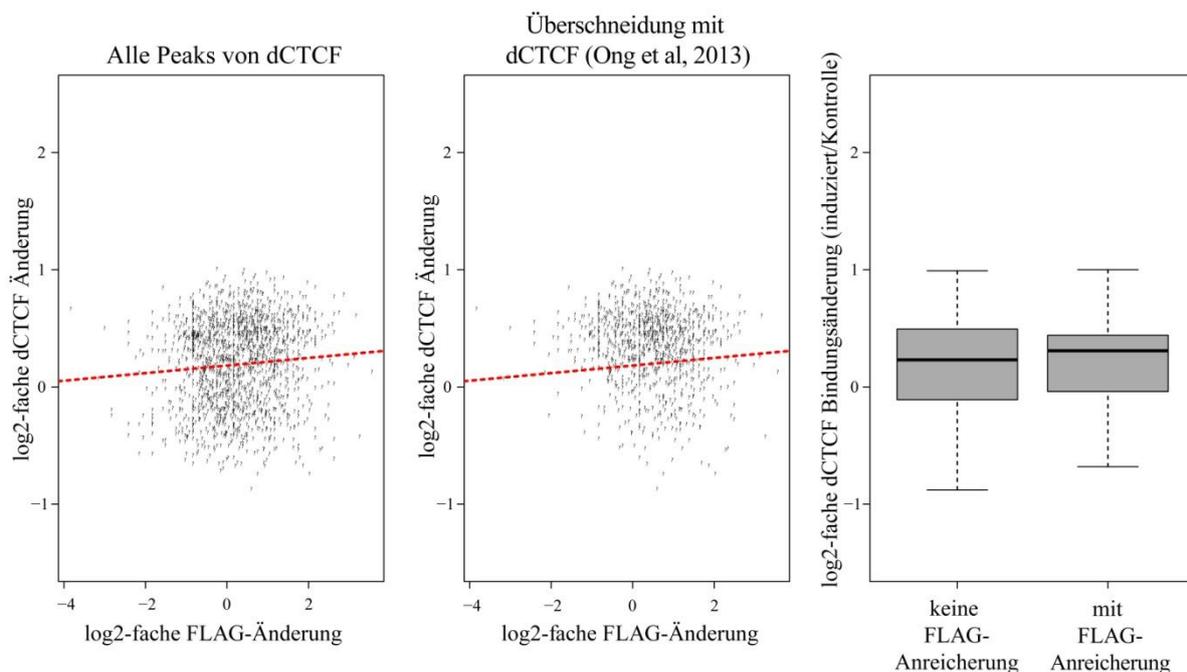


Abbildung 30: Die dCTCF-Bindung veränderte sich nicht wenn FLAG-dSUMO exprimiert wurde. Korrelation der log2-fachen dCTCF Bindungsveränderung mit der log2-fachen FLAG-dSUMO Bindungsveränderung. Links: Nur Bindestellen für dCTCF, die auch in ChIP-Seq-Daten der Literatur zu finden waren (Ong et al. 2013), wurden in die Berechnung einbezogen. Mitte: Nur Bindestellen für dCTCF, die auch in ChIP-Seq-Daten der Literatur zu finden waren (Ong et al. 2013), wurden in die Berechnung einbezogen. Rechts: log2-fache dCTCF-Bindungszunahme, bei dem der induzierten Klonpool mit der Kontrolle (nicht induzierter Klonpool) ins Verhältnis gesetzt wurden, an Stellen mit (rechter Boxplot) und ohne (linker Boxplot) FLAG-dSUMO-Überschneidung (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

Die Zunahme von FLAG-dSUMO konnte an Sequenzen gefunden werden, an denen die CP190 und dCTCF auch banden. Allerdings reagierte nur CP190 mit einer erhöhten Bindung an die DNA auf die Expression von FLAG-His-dSUMO. Daraus konnte man folgern, dass entweder die SUMOylierung von CP190 diese Anreicherung bewirkte, oder aber die SUMOylierung eines anderen Faktors, der an dieselben Stellen im Genom bindet, durch die Expression des Fusionsproteins beeinflusst wurde. Allerdings wäre auch ein allgemeiner Effekt, durch die FLAG-His-dSUMO-Expression, auf den Chromatinstatus möglich.

3.2.4.3. CP190 war an individuellen CP190- und dCTCF/CP190-Bindestellen nach FLAG-His-dSUMO-Expression angereichert.

Zur Validierung der genomweiten Experimente, wurden ChIP-qPCR Analysen des ChIP-Seq-Chromatins durchgeführt (Abbildung 31 und Abbildung 32). Zudem wurden unabhängige Chromatinpräparationen untersucht (Anhang: Abbildung 54 und Abbildung 55). Dafür wurde der induzierbare Klonpool verwendet und erneut der induzierte mit dem nicht-induzierten Zustand verglichen. Das Chromatin wurde präpariert und dieses wurde auf Agarosegel analysiert, um die korrekte Scherung der DNA zu kontrollieren, die bei einer durchschnittlichen Fragmentlänge von ca. 300 bp lag und damit den Ansprüchen für ChIP-qPCR entsprach (Anhang: Abbildung 44). Außerdem wurde auch eine Proteinprobe genommen, um die Expression von FLAG-His-dSUMO im Western Blot zu kontrollieren. Die Expression des Fusionsproteins war ebenfalls zufriedenstellend (Anhang: Abbildung 45). Nun konnte der ChIP mit spezifischen Antikörpern für CP190 und dCTCF, so wie für FLAG-His-dSUMO (FLAG-AK) durchgeführt werden. Als Negativ-Kontrolle diente die IgG-IP. Die ChIP-DNA wurde mittels qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden, für dCTCF/CP190-Bindestellen und CP190-Bindestellen, untersucht. Diese überlappen mit dSUMO und konnten auch durch das ChIP-Seq-Experiment ermittelt werden (Abbildung 26, Abbildung 27 Anhang: Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 48). Primer für Nicht-Bindestellen dienten als Negativ-Kontrolle.

FLAG-His-dSUMO (gelb) war an nahezu allen untersuchten Bindestellen für CP190 und dCTCF, nach der Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression (+), angereichert. Die Expression des Fusionsproteins hatte eine Verdopplung bis Verdreifachung der Detektion von FLAG-His-dSUMO zur Folge und war meist signifikant (p -Wert $< 0,05$). Diese Zunahme der Bindung von FLAG-His-dSUMO war zum Teil auch an Nicht-Bindestellen für CP190 und dCTCF, wie zum Beispiel cg12054 oder Ubx neg., zu finden (Abbildung 31 und Abbildung 32). dCTCF (grün) zeigte nahezu keine signifikante Zunahme der Bindung, aber auch keine deutliche Abnahme der Bindung an den untersuchten dCTCF/CP190-Bindestellen im Vergleich zum nicht-induzierten Klonpool (-). Lediglich Fab8 zeigte eine erhöhte Bindung von dCTCF nach FLAG-His-dSUMO-Expression (Abbildung 31). An zwei weiteren Stellen, RpS9 und sklt, war eine signifikante Abnahme der dCTCF-Bindung zu verzeichnen (Abbildung 32). Die Bindung von CP190 (rot) dagegen war an dCTCF/CP190- und CP190-Bindestellen deutlich verändert. Nach der Expression von FLAG-His-dSUMO nahm die Bindung von CP190, um die etwa drei- bis vierfache Menge (% Input) zu. Diese Anreicherung war für viele Bindestellen signifikant, wie zum Beispiel für Ubx14 und Fab8

(Abbildung 31), aber auch für cg1746 und cg11905 (Abbildung 32). Dies konnte nicht an den Nicht-Bindestellen für CP190 und dCTCF beobachtet werden. Der IgG-Level (blau) blieb nach der Expression (+) von FLAG-His-dSUMO unverändert im Vergleich zu den Proben des nicht-induzierten Pools (-) (Abbildung 31 und Abbildung 32). Diese Resultate konnten in weiteren ChIP-qPCR-Experimenten bestätigt werden (Anhang: Abbildung 54 und Abbildung 55).

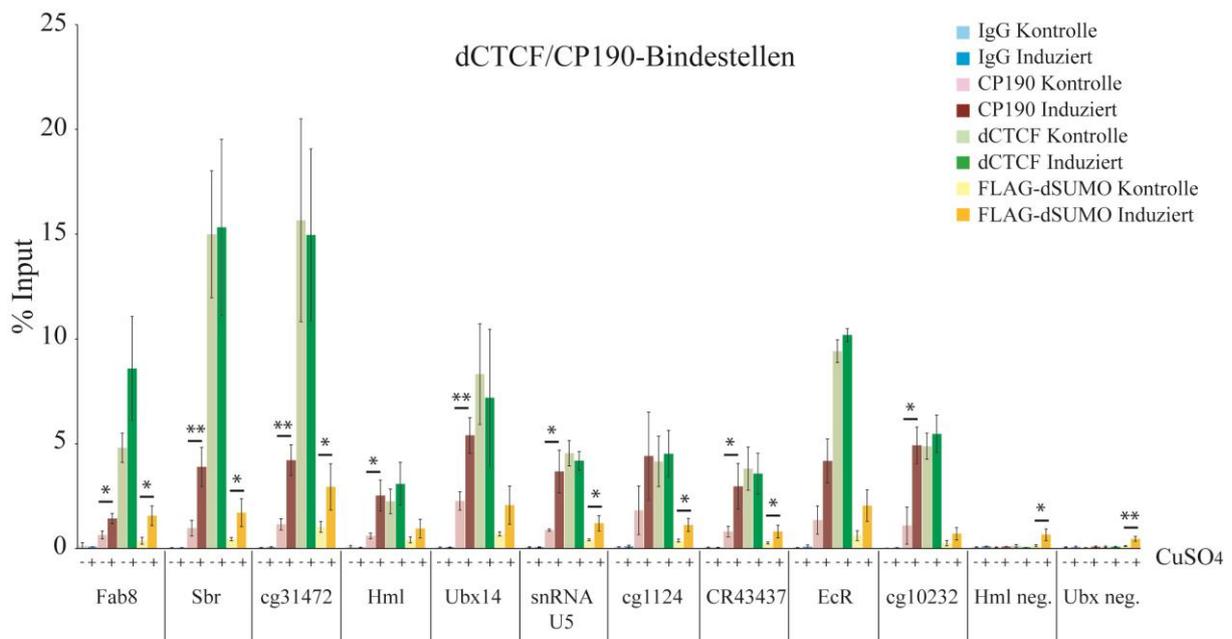


Abbildung 31: Die CP190-Bindung war signifikant an dCTCF/CP190 Bindestellen erhöht, sobald FLAG-His-dSUMO exprimiert wurde. Ein ChIP wurde für die Ermittlung der CP190- (rot), dCTCF- (grün) und FLAG-His-dSUMO- (gelb) Anreicherung an spezifischen Bindestellen vor (- CuSO₄; Kontrolle) und nach (+ CuSO₄) Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression durchgeführt. Die ChIP-DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden für dCTCF/CP190-Bindestellen untersucht. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet. Die Signifikanz der Bindungsänderung wurde bestimmt: 0,05 (*) signifikant und 0,005 (**) sehr signifikant.

Die Validierung bestätigen, die Ergebnisse der genomweiten Untersuchung (Abbildung 29 und Abbildung 30) und bestätigen auch die vorläufigen bioinformatischen Analysen (Abbildung 24 und Abbildung 25). Man konnte sehen, dass die Bindung von dCTCF und CP190 stark mit der Anreicherung von dSUMO auf dem Chromatin überlappten (Abbildung 24 und Abbildung 25). Außerdem konnte man erkennen, dass die Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression einen deutlichen Effekt auf die Bindung von CP190, aber nicht von dCTCF hatte (Abbildung 29 und Abbildung 30).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von CP190, wahrscheinlich durch SUMOylierung beeinflusst wurde, da dieses nach der Expression von FLAG-His-dSUMO an seinen Bindestellen stärker angereichert vorlag. Wie genau dies erreicht wurde, steht hierbei noch

offen. Zum einen könnte die SUMOylierung von CP190 dazu führen, dass dieses stärker bindet. Aber auch die SUMOylierung anderer Faktoren, die das Chromatin öffnen, könnte dazu führen, dass CP190 besser an das Chromatin binden konnte. Um zu untersuchen ob die SUMOylierung CP190 direkt beeinflusst, oder es doch einen generellen Effekt auf das Genom gibt, wurden im Folgenden Untersuchungen zur Zugänglichkeit des Chromatins angestrebt.

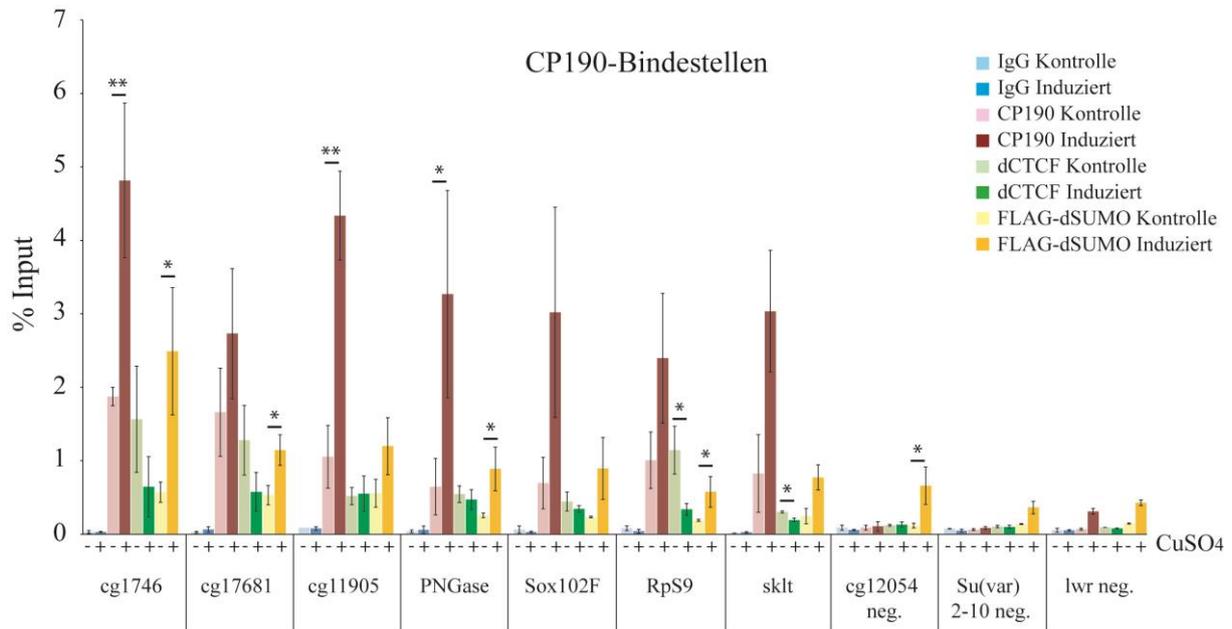


Abbildung 32: CP190 war signifikant an CP190-Bindestellen angereichert, sobald FLAG-His-dSUMO exprimiert wurde. Ein ChIP wurde für die Ermittlung der CP190- (rot), dCTCF- (grün) und FLAG-SUMO- (gelb) Anreicherung nach an spezifischen Bindestellen vor (- CuSO₄; Kontrolle) und nach (+ CuSO₄) Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression durchgeführt. Die ChIP-DNA wurde durch qPCR mit Oligonukleotiden für CP190-Bindestellen untersucht. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet. Die Signifikanz der Bindungsänderung wurde bestimmt: 0,05 (*) signifikant und 0,005 (**) sehr signifikant.

3.2.5. Die allgemeine Zugänglichkeit des Chromatins wurde durch SUMOylierung nur leicht verändert

Damit untersucht werden konnte, ob das verstärkte Binden von CP190 spezifisch auf SUMOylierung und nicht auf eine erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins zurück zu führen war, die durch die SUMOylierung hervor gerufen wurde, konnte der Chromatinstatus mit Hilfe von H3-spezifischem ChIP und FAIRE-Assay analysiert werden. Der H3-ChIP gibt einen Hinweis auf die Nukleosomendichte an den untersuchten Bindestellen und damit auch Rückschluss auf die Zugänglichkeit des Chromatins. Der FAIRE-Assay dagegen erlaubt die Anreicherung offenen Chromatins. Dabei kann man geschlossene und offene Chromatinabschnitte anhand der Anreicherung der Sequenzen in der FAIRE-Probe unterscheiden. Der nicht-induzierte (Kontrolle) und der induzierte Klonpool, der FLAG-His-

dSUMO exprimiert, wurden dabei einander gegenüber gestellt. Außerdem wurden dieselben Bindestellen für dCTCF/CP190 und CP190 analysiert, wie zuvor schon im ChIP für CP190, dCTCF und FLAG.

Für den H3-ChIP wurden die Zellen ausgesät und die Hälfte nach 24 Stunden induziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet. Daraufhin konnte das ChIP-Chromatin präpariert werden. Eine Probe des Chromatins auf die Fragmentgröße untersucht, wobei die durchschnittliche Länge der Fragmente bei etwa 300 bp lag und das Chromatin damit geeignet für den ChIP war (Anhang: Abbildung 44). Auch wurde die Expression von FLAG-His-dSUMO in Extrakten des Klonpools, vor und nach der Induktion der Expression, festgestellt (Anhang: Abbildung 45). Anschließend wurde eine IP mit spezifischen Antikörpern für Histone H3 vorgenommen. Zur Analyse der präzipitierten DNA wurden eine qPCRs mit spezifischen Oligonukleotiden für dCTCF/CP190- (grau), CP190- (blau) und Nicht-Bindestellen (violett) durchgeführt (Abbildung 33).

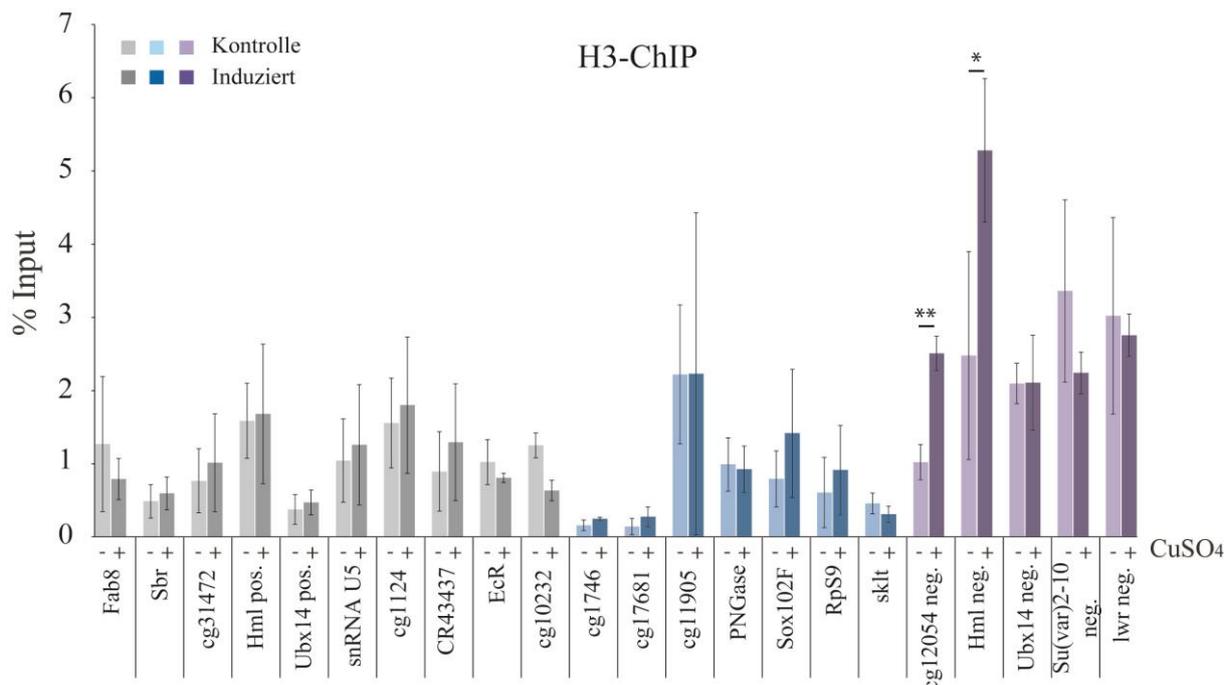


Abbildung 33: Histon H3 zeigte nahezu keine Veränderung in der Bindung an dCTCF/CP190-Bindestellen nach Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression. Ein ChIP wurde, für die Ermittlung der Histon H3-Anreicherung nach an spezifischen Bindestellen vor (-CuSO₄; Kontrolle) und nach (+CuSO₄) Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression durchgeführt. Die ChIP-DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden, für dCTCF/CP190- (grau), CP190-Bindestellen (blau), sowie Nicht-Bindestellen (violett), untersucht. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet. Die Signifikanz der Bindungsänderung wurde bestimmt: 0,05 (*) signifikant und 0,005 (**) sehr signifikant.

Im H3-ChIP konnte keine spezifische Anreicherung, oder Verringerung nach der Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression verzeichnet werden. Lediglich für zwei Negativ-Kontrollen, cg12054 und Hml neg., konnte ein signifikanter (p-Wert < 0,05) Anstieg der

Bindung nach der Induktion mit Kupfersulfat detektiert werden. Dabei handelt es sich um eine Verdopplung der H3-Bindung. Der H3-ChIP zeigte die typische Anreicherung von Histon H3 an geschlossenem Chromatin. Histon H3 war somit vor allem an den Nicht-Bindestellen (violett), und anderen Stellen, wie zum Beispiel cg11905 (blau) oder Hml (grau), die eine geringere Zugänglichkeit des Chromatins aufweisen, stärker angereichert. Sequenzen aus Promotorregionen, die frei von H3 waren, wiesen dagegen eine sehr geringe Bindung von H3 auf, wie zum Beispiel Sbr (grau), cg1746 und cg17681 (blau) (Abbildung 33).

Um die Resultate des H3-ChIPs zu validieren wurde ein FAIRE-Assay durchgeführt, welcher es erlaubt, offenes Chromatin und eventuelle Änderungen in dessen Zugänglichkeit, zu identifizieren. Dabei nutzt man die Abtrennung von Proteinen durch Phenol-Chloroform aus dem Gesamtzellextrakt, um Proteingebundene, also durch Histone gebundene DNA, aus der Lösung zu entfernen. Zurück bleibt die ungebundene, also freie DNA, wie sie zum Beispiel am Promotor oder am Enhancer zu finden ist.

Zunächst wurden die Zellen, wie beim H3-ChIP, ausgesät, induziert und geerntet. Anschließend wurde das FAIRE-Chromatin hergestellt und ein FAIRE-Assay mit diesem durchgeführt. Zur Untersuchung der Qualität des Chromatins wurde eine Probe vom Input abgenommen und auf Agarosegel analysiert. Die Fragmentlänge entsprach etwa 300 bp und entsprach damit den Anforderungen (Anhang: Abbildung 50). Außerdem wurde die Expression von FLAG-His-dSUMO getestet, indem eine Proteinprobe der lysierten Zellen im Western Blot analysiert wurde. Auch diese war zufriedenstellend (Anhang: Abbildung 51). Zur Analyse der präzipitierten DNA wurden qPCRs mit spezifischen Oligonukleotiden für dCTCF/CP190- (grau), CP190- (blau) und Nicht-Bindestellen (violett) durchgeführt (Abbildung 34).

Auch im FAIRE-Assay ließ sich keine eindeutige Veränderung der Offenheit des Chromatins nach Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression erkennen. Wobei man erwähnen kann, dass eine Tendenz zu stärker geöffnetem Chromatin innerhalb des induzierten, FLAG-His-dSUMO-exprimierenden Pools (+), im Vergleich zum uninduzierten Pool (-), zu finden war. Allerdings war diese Beobachtung für keine der untersuchten Regionen signifikant. Der FAIRE-Assay zeigte die erwarteten Resultate. Nicht-Bindestellen (violett) und eher geschlossenes Chromatin, wie zum Beispiel Hml (grau) und cg11905 (blau), zeigten eine geringe Anreicherung für freie DNA. Offenes Chromatin dagegen, welches zum Beispiel in der Nähe von Promotoren wie Sbr (grau), cg1746 und cg17681 (blau) zu finden ist, wies eine starke Anreicherung für freie DNA auf (Abbildung 34).

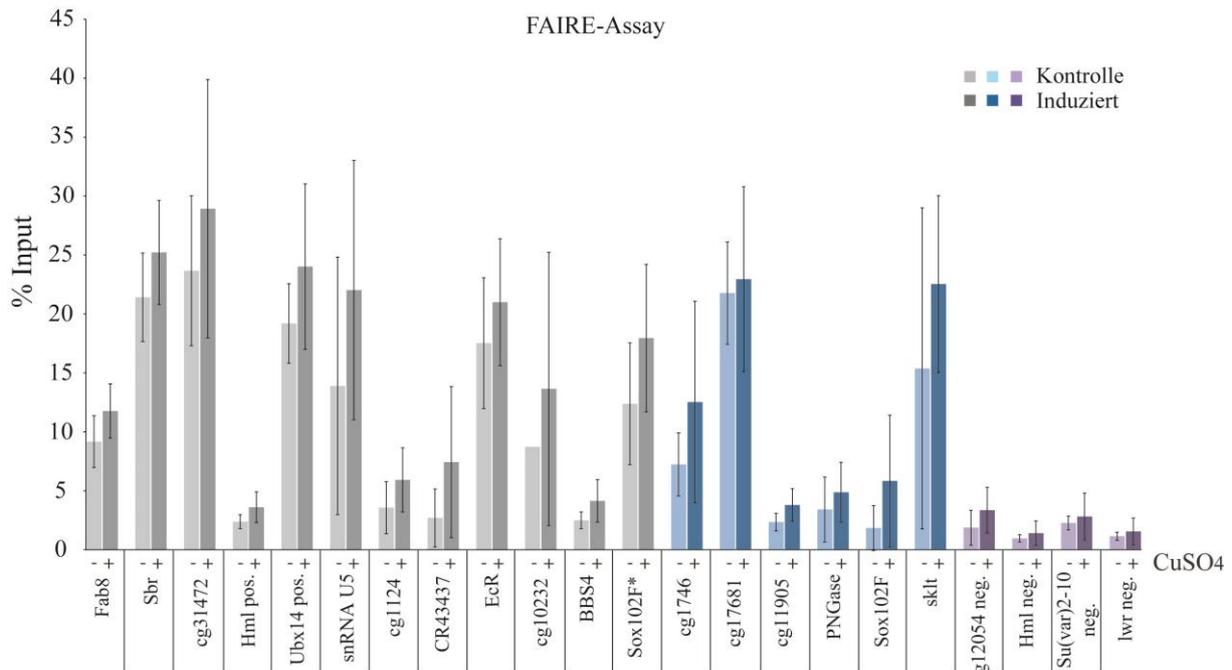


Abbildung 34: Die Zugänglichkeit des Chromatins veränderte sich tendenziell zu offenerem Chromatin nach FLAG-His-dSUMO-Expression. Ein FAIRE-Assay wurde für die Ermittlung der Zugänglichkeit des Chromatins vor (- CuSO₄; Kontrolle) und nach (+ CuSO₄) Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression durchgeführt. Die FAIRE-DNA wurde durch qPCR mit Oligonukleotiden für dCTCF/CP190- (grau), CP190-Bindestellen (blau), sowie Nicht-Bindestellen (violett), untersucht. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet.

Allgemein konnten kaum eindeutigen Hinweise darauf gefunden werden, dass die SUMOylierung einen Einfluss auf den Chromatinstatus, bzw. auf die Zugänglichkeit des Chromatins hat. Das Chromatin zeigte sich lediglich im FAIRE-Assay etwas zugänglicher nach der FLAG-His-dSUMO-Expression.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass SUMOylierung einen deutlichen Einfluss auf die Enhancer-Blockade an Isolatoren hat, die auch durch dCTCF und CP190 gebunden werden (Abbildung 19 und Abbildung 20). Die Untersuchung dieser beiden Faktoren auf die SUMOylierung mittel FLAG-Immünpräzipitation konnte bestätigen, dass CP190 in S2-Zellen wahrscheinlich SUMOyliert vorliegt. Wobei für dCTCF nichts dergleichen gezeigt werden konnte (Abbildung 22 und Abbildung 23). In genomweiten Untersuchungen der CP190- und dCTCF-Bindung, nach FLAG-His-dSUMO-Expression, mittels ChIP-Seq und in der anschließenden Validierung mittels ChIP-qPCR, konnte beobachtet werden, dass die Bindung von CP190 ebenfalls verstärkt wurde, sobald das Fusionsprotein exprimiert wurde. Dies galt allerdings nicht für dCTCF (Abbildung 26, Abbildung 27, Abbildung 29, Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32). Dabei wurde die Anreicherung der Bindung von CP190 wahrscheinlich auch schwach durch einen genomweiten Effekt der FLAG-His-dSUMO-

Expression beeinflusst. Dies konnte mittels H3-ChIP und FAIRE-Assay deutlich gemacht werden (Abbildung 33 und Abbildung 34). Diese Resultate legten die Vermutung nahe, dass die potentielle SUMOylierung von CP190, oder anderen Isolator-bindenden Proteinen dazu führt, dass die Isolation bzw. Enhancer-Blockade verstärkt werden kann. Dabei scheint eine potentielle SUMOylierung zur verbesserten Bindung von CP190 an Chromatin, bzw. an die von CP190 gebundenen Isolator-bindenden Proteine (dCTCF, BEAF-32, Pita, ZIPIC, usw.), zu haben. Diese zeigten ebenfalls eine genomweite Kollokalisierung mit der SUMOylierung (Abbildung 24 und Abbildung 25).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Interaktionspartner von CP190 auf ihre Bindung an DNA und ihre Funktion bei der dCTCF- und CP190-vermittelten Isolation untersucht. Dabei wurden die beiden neue Isolator-bindenden Proteine (IBP) Pita und ZIPIC genauer auf ihre Bindung an Chromatin und den Einfluss auf die CP190-Bindung untersucht. Außerdem wurde der Einfluss von SUMOylierung auf die CP190- und dCTCF-vermittelte Isolation, so wie auf deren Chromatinbindung, analysiert. Diese Aspekte der Wirkung von SUMOylierung auf die Isolation wurden bisher nur geringfügig untersucht. Im Folgenden wurden die Resultate dieser Arbeit nochmal betrachtet und diskutiert.

4.1. Pita und ZIPIC sind neue Isolator-bindende Proteine, die mit CP190 interagieren

CP190 ist ein Zinkfinger- und Isolator-bindendes Protein, das sowohl an Promotoren als auch an Isolatoren zu finden ist (Schwartz et al. 2012b). Es trägt zusammen mit anderen Isolator-bindenden Proteinen (IBPs), wie dCTCF, BEAF-32 und Su(Hw), zur Isolation von Chromatin bei, indem es die Brückenbildung zwischen Isolatoren und Promotoren vermittelt (Liang et al. 2014).

In dieser Arbeit wurden weitere Interaktionspartner für CP190 charakterisiert. Dabei wurde die Familie der Zinkfinger-assoziierte Domäne (ZAD) -Proteine näher betrachtet. Diese haben einen ähnlichen Zinkfingertypus wie CP190 und dCTCF (Chung et al. 2007, Chung et al. 2002) und machen etwa 10 % aller Transkriptionsfaktoren (TF) in *Drosophila* aus. Allerdings beschränkt sich ihr Vorkommen auf Dipteren (Benson et al. 2009). Drei dieser ZAD-Proteine wurden bezüglich ihrer Chromatin-Bindung und damit auch Überlappung mit CP190 auf der DNA näher untersucht, da sie in Massenspektrometrie, Co-Immunpräzipitation (Co-IP) und *Yeast two hybrid* Experimenten, eine physikalische Interaktion mit CP190 gezeigt haben (Maksimenko et al. 2015).

4.1.1. Pita und ZIPIC kolokalisieren mit CP190 auf der DNA und beeinflussen dessen Bindung

In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die Bindung der ZAD-Proteine Pita, ZIPIC und cg30020 an die DNA in ChIP-qPCR-Experimenten, sowie genomweit, mittels ChIP-Seq, untersucht. Der Fokus lag dabei auch auf der Kolokalisation mit CP190 und anderen IBP.

Dabei konnte fest gestellt werden, dass alle drei Faktoren mit CP190 in ChIP-qPCR-Experimenten eine deutliche Überlagerung zeigten (Abbildung 17). In der genomweiten

Analyse konnte ebenfalls eine starke Übereinstimmung der Bindung von CP190, Pita, ZIPIC und cg30020 beobachtet werden (Abbildung 13). Allerdings musste cg30020 bei der genomweiten Analyse auf Grund der geringen Menge an Bindestellen/Peaks und der potentiell unspezifischen Wirkung des Antikörpers, der für die IP eingesetzt wurde, aus der bioinformatischen Analyse ausgeschlossen werden. Der spezifische *knock down* durch Einsatz spezifischer dsRNAs führte zwar zur Reduktion der mRNA, was in der RT-PCR nachgewiesen werden konnte, allerdings führte der *knock down* nicht zur Reduktion des Proteins von cge30020 im Western Blot, was an der Spezifität des Antikörpers zweifeln ließ (Abbildung 11 (ii), Abbildung 12 (ii)). Der *knock down* von Pita und ZIPIC, mittels spezifischer dsRNAs, zeigte allerdings die gewünschte Reduktion auf mRNA- und Protein-Ebene, weshalb hier keine Zweifel an der Spezifität der jeweiligen Antikörper vorlagen und eine genomweite Analyse somit möglich war (Abbildung 11 (i), Abbildung 12 (i)). ZIPIC und Pita zeigten in der genomweiten Untersuchung eine deutliche Anreicherung an Bindestellen, die auch nach Analyse der modENCODE ChIP-Chip-Daten von CP190, eine starke Übereinstimmung mit denen von CP190 haben. Eine starke Kolo-kalisation der Faktoren war zu erkennen (Abbildung 13). Dies war ein weiteres Indiz für die direkte Interaktion der Faktoren (Maksimenko et al. 2015) da es zeigte, dass Pita und ZIPIC CP190 (Schwartz et al 2012; Van Bortel et al 2012), welches nicht alleine an die DNA bindet, rekrutieren könnten. Die *knock down* ChIP-qPCR-Experimente, die zur Validierung der genomweiten Analyse durchgeführt wurden, bestätigten dass der *knock down* von Pita und von ZIPIC, einen negativen Einfluss auf die Bindung von CP190 haben (Abbildung 18 (ii), Anhang: Abbildung 41). Der *knock down* von CP190 hatte in den durchgeführten ChIP-qPCR-Experimenten keinen Einfluss, bzw. eher einen geringen Einfluss auf die Bindung von Pita und ZIPIC (Abbildung 18 (i), Anhang: Abbildung 41). Da sich der *knock down* von Pita bzw. ZIPIC vor allem an Bindestellen negativ auswirkte, die durch alle drei Faktoren, aber nicht durch dCTCF, BEAF-32, oder andere Interaktionspartner von CP190, gebunden wurden, wäre es möglich, dass für die Bindung von CP190 an die DNA zwei IBPs benötigt werden (Abbildung 41). Dies wird durch Co-IP-Experimente mit Deletions-Mutanten für CP190, Pita und ZIPIC untermauert. Diese zeigten, dass die Interaktion zwischen Pita und CP190 nur dann möglich war, wenn bei CP190 die BTB und bei Pita die sogenannte Pita-Domäne, zwischen ZAD und Zinkfinger-Domäne, vorhanden war. ZIPIC interagiert über die zentrosomale Bindedomäne von CP190, mit diesem (Maksimenko et al. 2015). Außerdem werden diese Resultate durch die funktionale Interaktion von Pita und dCTCF am MCP-Isolator bzw. -Boundary-Element bestätigt. Das Mutieren der Pita-Bindestelle führte hier

nicht nur zur dazu, dass Pita nicht mehr binden konnte, sondern auch dCTCF war nicht mehr in der Lage den MCP-Isolator zu binden. Hier werden dCTCF und Pita gemeinsam benötigt, um die Barriere Funktion des Isolators aufrecht zu erhalten, da sie wahrscheinlich alleine nicht effektiv binden können (Maksimenko et al. 2015). Alleine sind dCTCF bzw. Pita somit auch nicht in der Lage CP190 zu rekrutieren und damit die Funktion des Isolators zu vermitteln. Hierbei könnte man auch vermuten, dass die beiden unterschiedlichen Isolator-bindenden Proteine, die durch CP190 gebunden werden, einen Einfluss auf die Orientierung der Wirkung des Isolators haben. Solche Beobachtungen wurden bereits zu *long-rang* Chromatininteraktionen von Isolatoren, wie MCP oder Fab7, und anderen regulatorischen Sequenzen, wie Enhancer und Silencer, beschrieben (Kyrchanova et al. 2007, Kyrchanova et al. 2011, Muller M. et al. 1999, Vazquez et al. 2006).

4.1.2. Pita und ZIPIC weisen Konsensus-abhängige Bindung auf

Ein weiteres Indiz für die Abhängigkeit der Faktoren voneinander, um an die DNA zu binden, war die Konsensusabhängigkeit. Zum einen waren die Konsensusmotive von Pita und CP190 nahezu identisch, was die hohe Überschneidung der Bindung von CP190 und Pita erklären könnte (Abbildung 13 (iii)). ZIPIC wies auch eine starke Kolo-kalisation mit CP190 und Pita auf, wobei es allerdings ein anderes Konsensusmotiv aufweist als CP190 und Pita (Abbildung 14 (i)). Die Bindung der beiden Faktoren, Pita und ZIPIC, zur DNA ist deutlich stärker, wenn eine starke Konservierung des Konsensus vorhanden war (Abbildung 14 (ii)). Allerdings war auch eine Bindung der beiden Proteine an die jeweiligen Motive zu finden, wenn das jeweils andere Protein nicht kolo-kalisiert. Dies zeigte, dass Pita und ZIPIC zwar in Abhängigkeit von ihren jeweiligen Konsensusmotiven banden, aber diese Bindung schien nicht zwangsläufig abhängig von der Bindung des jeweils anderen Faktors (Abbildung 14 (iii)). Wahrscheinlich ist davon aus zu gehen, dass stark konservierte Konsensussequenzen der jeweiligen Faktoren eine Überlagerung mit den stark gebundenen Bindestellen von Pita und ZIPIC aufwiesen, an denen dann auch eine deutliche Überlagerung mit CP190 zu finden war. Dies könnte darauf hin deuten, dass ein stark konservierter Konsensus zu einer verstärkten Bindung und damit auch zu einer erhöhten Kolo-kalisation mit CP190 führt. Um dies näher zu beleuchten, könnte man die Bindungsmotive innerhalb der Gruppen von stark bzw. schwach gebundenen Bindestellen näher betrachten.

4.1.3. ZIPIC und Pita binden auch zusammen mit anderen Isolator-bindenden Proteinen

Pita und ZIPIC waren beim Vergleich mit Daten von modENCODE auch im Zusammenhang mit anderen Isolator-bindenden Proteinen zu finden (Abbildung 15). Dabei war eine

Kolokalisation mit BEAF-32 und dCTCF zu erkennen, die ebenfalls zu den Interaktionspartnern von CP190 zählen (Bushey et al. 2009, Nègre et al. 2010, Schwartz et al. 2012b). Su(Hw) dagegen kolokalisierte kaum mit Pita und ZIPIC, obwohl dieses Protein ein Interaktionspartner von CP190 ist. Diese Art der Anhäufung von Isolator-bindenden Proteinen wurde bereits häufiger beobachtet. Dabei war Su(Hw) oft nicht innerhalb dieser Ansammlungen zu finden (Schwartz et al. 2012a, Van Bortle and Corces 2012, Van Bortle et al. 2014). In diesem Zusammenhang war auch zu sehen, dass CP190, Pita und ZIPIC sich gemeinsame Bindestellen teilen, an welchen die Faktoren mit hoher Affinität binden. An diesen Bindestellen kann häufig auch nach Wegfall eines der beiden ZAD-Proteine, Pita und ZIPIC, CP190-Bindung statt finden. Es wäre möglich, dass zum Beispiel BEAF-32 oder dCTCF an dieser Stelle einspringen, um für ZIPIC oder Pita zu kompensieren (Lim et al. 2013, Schwartz et al. 2012b). Dies könnte auch den relativ geringen Effekt des *knock down* von Pita (Abbildung 18 (ii), Anhang: Abbildung 41) bzw. ZIPIC (Anhang: Abbildung 41) auf die Bindung von CP190 in den CHIP-qPCR-Experimenten erklären. Nur an einer von vier der getesteten Bindestellen konnte eine verminderte CP190-Bindung nach *knock down* von Pita beobachtet werden (Abbildung 18 (ii)). Ähnliches war auch in EMSA-Experimenten zu beobachten, durch die bestätigt werden konnte, dass die Pita- und ZIPIC-Bindung für die CP190-Bindung gebraucht wird (Maksimenko et al. 2015). Anders könnte dies für Bindestellen mit geringer Affinität von CP190, Pita und ZIPIC zur Bindung aussehen, die auch in der bioinformatischen Analyse beschrieben wurden (Abbildung 13 (iii), schwache Bindung, 4 schwarz). Dort wäre es möglich, dass durch den Verlust von CP190 durch *knock down* auch die schwache Bindung der anderen Isolator-bindende Proteine zu erklären wäre. Allerdings wurden keine Bindestellen mit schwacher Bindung von CP190, Pita und ZIPIC in der qPCR analysiert. Auch Umgekehrt, also beim *knock down* von Pita und ZIPIC, könnte es zu einem deutlicheren Verlust von CP190 kommen. Ähnliches wurde in der Literatur schon für Su(Hw) und CP190 beschrieben. Auch hier wurden Bindestellen für verschiedene Isolatorproteine verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass das Bindeverhalten von CP190 und Su(Hw) weitestgehend unabhängig voneinander sind (Schwartz et al. 2012a). Dabei könnte man sich vorstellen, dass die Kooperation der Isolator-bindenden Proteine durch den Wegfall eines einzelnen IBP verloren geht und dies zur Dissoziation der Isolatorprotein-Clusters, bzw. der Ansammlung von miteinander funktional interagierender IBP, führt.

4.1.4. ZIPIC und Pita binden in Promotorbereichen aktiver Gene

Eine weitere Auffälligkeit bei der Analyse der Bindestellen von ZIPIC und Pita stellte die Häufigkeit der beobachteten Peaks an Promotoren bzw. Transkriptionsstartstellen (TSS) dar

(Abbildung 13 (iii)). Dies ist nicht selten für Isolator-bindende Proteine in *Drosophila*. Auch CP190, BEAF-32 und dCTCF haben eine Vielzahl an Bindestellen in Promotorbereichen (Bushey et al. 2009, Nègre et al. 2010). Die Expression der umliegenden Gene war dabei erhöht, je stärker die Bindung der Faktoren, ZIPIC und Pita, zu den TSSs war (Abbildung 16). Um dies genauer zu überprüfen, könnte man eine Expressionsanalyse der gebundenen Gene, vor und nach *knock down* von Pita und/oder ZIPIC, vornehmen. Die Bindung von ZIPIC und Pita an Promotoren könnte darauf zurück zu führen sein, dass Isolatoren und Promotoren funktional und evolutionär miteinander verwandt sind (Geyer 1997, Raab and Kamakaka 2010). Es wäre auch möglich, dass manche Promotoren, die von Pita, ZIPIC und anderen IBP gebunden werden, ebenfalls eine Isolatorfunktion haben.

4.1.5. Fazit

Abschließend kann man feststellen, dass die Bindung von Isolator-bindenden Proteinen (IBPs) und die damit verbundene Isolation durchaus nicht von einzelnen Isolator-bindenden Proteinen abhängt, sondern einem komplexen Zusammenspiel von Isolator-bindenden Proteinen unterliegt. Dabei scheint die Kombination der Proteine eine wichtige Rolle bei der Bindung von IBPs zu übernehmen. So könnte zum Beispiel die Orientierung des Isolators im Genom bestimmt werden. Auch die Stärke der Bindung der Proteine zur Bindestelle, sowie die Konservierung des Konsensusmotives, haben eine Wirkung auf die mögliche Wirkung der neuen IBPs, ZIPIC und Pita. Dabei kann man sich vorstellen, dass die Isolatoren, die eher schwach gebunden werden, bzw. eine wenig konservierte Konsensussequenz besitzen, einer wesentlich größeren Dynamik unterliegen und damit wahrscheinlich eher zelltypspezifisch sind. Die stark gebundenen Isolatoren, mit hoher Konservierung des Motives dagegen, haben wesentlich weniger Dynamik bei der Bindung und haben daher wahrscheinlich eher eine Funktion bei der Erhaltung des *Status Quo* auf dem Chromatin und in der Zelle.

Durch Pita und ZIPIC konnten zwei neue Isolator-bindende Proteine zu dem bereits bekannten, im Vergleich zum humanen System großen Angebot von Isolator-bindenden Proteinen in *Drosophila*, hinzugefügt werden. Denkbar wäre dabei, dass die geringe Größe des *Drosophila* Genoms, die mit einer hohen Gendichte einhergeht, eine wichtige Rolle für den Umfang an verschiedenen Isolator-bindenden Proteinen spielt. Diese müssen wahrscheinlich durch gezielten Einsatz auf einem kleinen Raum sehr viele, zum Teil richtungsorientierte, Isolationsvorgänge koordinieren, um eine geregelte Genexpression zu ermöglichen, die wahrscheinlich auch zelltypabhängig ist.

4.2. Einfluss von SUMOylierung auf die durch CP190- und dCTCF-vermittelte Isolation

SUMOylierung ist eine Protein-Modifikation, die vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle vermittelt oder beeinflusst. Die Funktion, die diese Modifikation bei der Isolation von Chromatin in *Drosophila melanogaster* einnimmt, ist bisher nur unzureichend untersucht worden. Die bisher bekannten Resultate, die in der Literatur diskutiert wurden, sind zudem auch sehr widersprüchlich. Einerseits wurde festgestellt, dass SUMOylierung keinen Einfluss auf die Isolation des *Gypsy*-Isolators hatte und auch die Bindung der beteiligten Proteine nicht beeinflusst wurde, dagegen aber die Formation von CP190-*Speckles*, sowie *Insulator-Bodys* durch die dSUMO-Modifikation positiv beeinflusst wird (Golovnin et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe jedoch postulierte, dass die Enhancer-Blockade am *Gypsy*-Isolator durch SUMOylierung negativ beeinflusst wurde, genauso wie die Bildung von *Insulator-Bodys*. Jedoch wurde auch hier beschrieben, dass die Bindung der beteiligten Isolatorproteine nicht beeinflusst wird (Capelson and Corces 2006). In dieser Arbeit wurde ein völlig anderer Ansatz eines funktionellen Luziferase-Reporter-Assays genutzt, um den Einfluss der SUMOylierung auf die dCTCF und CP190 vermittelte Isolation zu betrachten. Außerdem wurde eine ChIP-Seq-Analyse der Bindung von dCTCF und CP190 nach Expression eines FLAG-His-dSUMO-Fusionsproteins untersucht.

4.2.1. Die Enhancer-Blockade dCTCF und CP190 gebundener Isolatoren wird durch SUMOylierung beeinflusst

In einem funktionellem RNAi-Screen zur Isolation am Fab8-Isolator, tauchten alle Faktoren der SUMO-Kaskade mit einem Z-Wert > 2 auf (Abbildung 19). Durch die Validierung des RNAi-Screens mittels funktionellem Luziferase-Reporter-Assay, konnte gezeigt werden, dass die Isolation an verschiedenen dCTCF gebundenen Isolatoren, Fab8, Fab6, bicoid und cg31472, durch den *knock down* der SUMO-Faktoren, herab gesetzt wurde. Dies zeigte, dass SUMOylierung einen positiven Effekt auf die Enhancer-Blockade an den untersuchten Isolatoren hatte (Abbildung 20). Wie bereits erwähnt wurden bisher keine, bzw. negative Effekte durch SUMOylierung auf die Enhancer-Blockade des *Gypsy*-Isolators beobachtet. Jedoch handelt es sich beim *Gypsy*-Isolator um einen Su(Hw) gebundenen Isolator und nicht um einen dCTCF gebundenen Isolator. Da Isolatoren die durch Su(Hw) häufig im Vergleich zu dCTCF gebundenen Isolatoren verschieden reagieren, konnte bereits in *knock down* Experimenten, mit anschließender ChIP-qPCR gezeigt werden (Schwartz et al. 2012a). Die Enhancer-Blockade an unterschiedlichen Isolatoren könnte also durch SUMOylierung

verschieden beeinflusst werden, aber es könnte auch sein, dass die SUMOylierung sowohl positive, als auch negative Effekte auf die Enhancer-Blockade am selben Isolator hat. Dies konnte auch durch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigt werden. Die Enhancer-Blockade der untersuchten Isolatoren wurde, in dem verwendeten Luziferase-Reporter-Assay, nicht nur durch an der SUMOylierung beteiligte Faktoren, wie Aosl, Uba2, lwr und Su(var)2-10 positiv beeinflusst, sondern auch durch Faktoren, die an der De-SUMOylierung beteiligt sind. Die dSUMO-Protease verloren (velo), die dSUMO von Zielproteinen abtrennt, wirkte sich ebenfalls fördernd auf die Enhancer-Blockade aller untersuchten Isolatoren aus (Gareau and Lima 2010, Hay 2005, Mukhopadhyay and Dasso 2007). Dies lässt die Vermutung zu, dass SUMOylierung nicht zu einer gerichteten Verstärkung oder Abschwächung der Enhancer-Blockade führt, sondern dass durch SUMOylierung der zellspezifische *Status Quo* der Isolation erhalten bleibt. Eine dynamische SUMOylierung und De-SUMOylierung könnte dabei zu einer Art Homöostase an den Isolatoren führen. Unterstützt wird diese Vermutung auch von der These, dass Polycomb-*Bodies* durch SUMOylierung und De-SUMOylierung beeinflusst werden. SUMOylierung führte demnach zu einer Dekondensation der Polycomb-*Bodies*, während die De-SUMOylierung durch die dSUMO-Protease velo zu einer stärkeren Aggregation von diesen führte (Gonzalez et al. 2014). Hier wirkte SUMOylierung bei der Bildung von Polycomb-*Bodies* eher dynamisch, als starr in eine Richtung. Dies könnte auch für *Insulator-Bodies* bzw. CP190/dCTCF-*Speckles* der Fall sein (Gdula and Corces 1996, Gerasimova and Corces 1998, Gerasimova et al. 2000). In diesem Zusammenhang wurde bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt, ob Isolation und die Formation von *Insulator-Bodies* in einem funktionell Zusammenhang stehen (Golovnin et al. 2008, Schoborg et al. 2013). Deshalb kann man nur mutmaßen, dass die Isolation, genau wie die *Insulator-Body*- und Polycomb-*Body*-Bildung, durch SUMOylierung beeinflusst werden.

Ähnlich widersprüchliche Resultate findet man häufig im Zusammenhang mit der Rolle von SUMOylierung bei der Regulation der Transkription. Die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren führt, dabei oft zu Repression der Transkription, aber in manchen Fällen führt SUMOylierung auch zur Aktivierung der Genexpression (Capelson and Corces 2006, Nie M. et al. 2009, Stielow et al. 2008). Ebenso kontrovers sind die Befunde zum durch SUMOylierung bewirkten Abbau von Proteinen im Proteasom, ähnlich wie bei der Ubiquitinierung. In manchen Fällen stabilisiert SUMOylierung, in anderen Fällen destabilisiert es die Zielproteine (Gareau and Lima 2010, Hay 2005, Jackson and Durocher 2013, Sarge and Park-Sarge 2009, Wan et al. 2012). Eventuell könnte auch die Menge an SUMOylierten Stellen innerhalb eines Proteins, bzw. innerhalb von CP190, einen Einfluss

darauf haben, wie SUMOylierung wirkt. In dem Western Blot zur FLAG-IP konnte man zwei Signale für potentiell SUMOyliertes CP190 erkennen, was darauf hindeutet, dass CP190 wahrscheinlich an zwei Stellen SUMOyliert sein könnte. Um diese genauer zu beschreiben müsste man jedoch die SUMOylierungs-Motive innerhalb von CP190 mutieren und überprüfen, ob das Signal im Western Blot nach der FLAG-IP verschwindet. Erst dann kann man mit Sicherheit sagen, dass CP190 tatsächlich SUMOyliert vorliegt. Diese Mutationen wären zum Beispiel über die CRISPR-Cas9-Methode möglich (Barrangou et al, 2015). Die Signale im Western Blot für potentiell SUMOyliertes CP190, könnten eventuell von SUMOylierten Interaktionspartnern von CP190 herrühren.

In *Drosophila* liegen keine Ketten von SUMOylierung vor, wie es in Vertebraten der Fall ist (Matic et al. 2008), aber es ist durchaus möglich, dass die Proteine, wenn sie mehrere SUMOylierungs-Motive besitzen, an diesen auch SUMOyliert werden können (Hay 2005, Ren et al. 2009, Teng et al. 2012). Hierbei wurde für CP190 bisher nur Mono-SUMOylierung beobachtet (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Zudem liegt CP190 häufig als Dimer vor (Schwartz et al. 2012a). Die SUMOylierung könnte auch hier einen Einfluss auf die Eigenschaften von CP190 als Isolatorprotein haben, je nachdem ob eines der beiden Proteine, oder beide CP190-Moleküle SUMOyliert vorliegen.

Um zu erforschen welche der Proteine, die an der Isolation beteiligt sind, SUMOyliert werden, wäre es notwendig weitere IPs mit anschließendem spezifischen Western Blot für SUMOylierte Isolatorproteine durchzuführen. Eine weitere Methode hierfür könnte auch der Nickel-Pull-Down sein, der in anderen Publikationen zur SUMOylierung bereits Verwendung fand (Stielow et al. 2008). Auch wäre es möglich die dSUMO-Motive innerhalb dieser Isolatorproteine, wie zum Beispiel Mod(mdg4) und CP190, zu mutieren und anschließend in S2-Zellen zu exprimieren, in denen das entsprechende endogene Protein depletiert bzw. überschrieben wurde, zum Beispiel durch die Verwendung eines Cre-Lox-Systems (Sauer 1987). Es wäre außerdem möglich die SUMO-Motive innerhalb der endogenen Proteine mit der CRISPR-Cas9-Methode zu mutieren (Barrangou et al, 2015). Dabei könnte man sich die Expression der Mutante sparen. Diese modifizierten Zellen könnten anschließend, mit dem in dieser Arbeit verwendeten Luziferase-Reportersystem, transfiziert werden. Danach könnte man mittels Luziferase-Reporter-Assay untersuchen, welche Unterschiede in der Isolation zwischen wildtypischen und dem mutierten Proteine vorliegen.

4.2.2. SUMOylierung führt zu verstärkter CP190-Bindung an spezifischen Bindestellen

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass CP190 *in vivo* potentiell (siehe oben, 4.2.1) SUMOyliert vorliegt (Abbildung 22). Die SUMOylierung von CP190 wurde in

der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Für dCTCF konnte keine eindeutige SUMOylierung gezeigt werden (Abbildung 23). Auch in der Literatur findet man bisher keine Resultate zur SUMOylierung von dCTCF, aber auch nicht von anderen Isolator-bindenden Proteinen, wie Su(Hw) (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012), BEAF-32, Zw5, GAF, Pita, ZIPIC oder Ibf1 und 2. Dies könnte zum einen daran liegen, dass nur ein geringer Teil der Proteine (ca. 10 %) überhaupt SUMOyliert wird und zum anderen ist der Nachweis von SUMOylierung im allgemeinen schwierig, da SUMOylierung eine sehr instabile Modifikation ist, die schnell durch die entsprechenden SUMO-Proteasen entfernt wird. Allerdings fand sich in einer bioinformatischen Analyse von publizierten ChIP-Seq-Daten eine deutliche, genomweite Überschneidung der Bindung von dSUMO und Isolator-bindenden Proteinen, die mit CP190 interagieren (dCTCF, BEAF-32, Su(Hw), Pita, ZIPIC und Ibf1) (Abbildung 24, Abbildung 25). Dies könnte eventuell auf die potentielle SUMOylierung von CP190 zurück zu führen sein, das auch an den untersuchten spezifischen Bindestellen auch zu finden ist. Allerdings wäre es auch möglich, dass andere Faktoren an diesen Stellen SUMOyliert sind. So werden zum Beispiel auch Polycomb Proteine SUMOyliert, die häufig mit CP190 kolokalisieren (Gonzalez et al. 2014).

CTCF liegt in humanen Zellen SUMOyliert vor (Kitchen and Schoenherr 2010, MacPherson et al. 2009). Dies könnte zum einen darauf zurück zu führen sein, dass CTCF, neben Znf143, das einzige Isolator-bindende Protein in Vertebraten ist. Damit muss CTCF wahrscheinlich in seiner Bindung genauer reguliert werden. CTCF ist hier nahezu alleine für die Aufrechterhaltung der topologisch assoziierte Domänen (TADs) verantwortlich und damit für alle Interaktionen von regulatorischen Sequenzen in Vertebraten-Zellen (Dixon et al. 2012). Durch Modifikationen, wie SUMOylierung, wäre dies wahrscheinlich. Es ermöglicht eventuell eine Art Feinregulation der Bindung von CTCF und damit der Isolation. In *Drosophila* dagegen, brauchen viele Isolator-bindende Proteine die Hilfe von CP190 und Mod(mdg4), um eine funktionale Enhancer-Blockade zu vermitteln. Deshalb könnte es sein, dass es in *Drosophila* ausreicht, wenn CP190 bzw. Mod(mdg4) durch SUMOylierung reguliert werden. Auch hier würde es sich anbieten wieder mit Mutanten für die SUMO-Motive innerhalb von CP190 und Mod(mdg4) zu arbeiten, um zu überprüfen, ob die Enhancer-Blockade in Untersuchungen mit dem, in dieser Arbeit genutzten, Luziferase-Reporter-Assay durch den Wegfall der SUMOylierung beeinflusst wird.

Zudem konnte in ChIP-Seq- und ChIP-qPCR-Experimenten festgestellt werden, dass die CP190-Bindung an dessen Zielsequenzen, nach der Überexpression von FLAG-His-dSUMO, deutlich erhöht war. Davon war die CP190-Bindung an einigen der analysierten Sequenzen

auch signifikant (p-Wert < 0,05) erhöht bzw. sehr signifikant (p-Wert < 0,005) erhöht (Abbildung 29, Abbildung 31 und Abbildung 32). Dies konnte weder für dCTCF (Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32) noch für Histon H3 (Abbildung 33) nachgewiesen werden. Diese Resultate konnten bisher nicht in der Literatur gezeigt werden. Die in einer der bisherigen Veröffentlichungen verwendete Hitzeschockbehandlung von Zellen und Fliegen, erhöht die SUMOylierung innerhalb der Zelle und sollte somit theoretisch auch die von CP190 verstärken (Chan et al. 2002, Kiss et al. 2005, Stielow et al. 2008). Dies hat, wie in der Literatur beschrieben, allerdings keinen Effekt auf die Bindung von CP190 im ChIP (Golovnin et al. 2012). Auch bei der Untersuchung der Bindung von CP190 auf Polytän-Chromosomen konnte keine Veränderung der Bindung von CP190 nach *lwr knock out* festgestellt werden (Capelson and Corces 2006). Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen den bisherigen Befunden, da dort keine Veränderung der Bindung von CP190 nach Veränderung der SUMOylierung zu sehen war. Dies könnte zum einen auf die unterschiedlichen verwendeten Methoden zur Veränderung des SUMOylierungsstatus zurückzuführen sein. In dieser Arbeit wurde ein induzierbares Expressionssystem für FLAG-His-dSUMO in S2-Zellen verwendet. Dieses System wurde bisher noch nicht zur Untersuchung des Einflusses von SUMOylierung auf die CP190 und dCTCF vermittelte Isolation verwendet. Für die bisher bekannten Experimente die in der Literatur beschrieben wurden, wurden *lwr knock out* Fliegen genutzt bzw. ein Hitzeschock an Fliegen durchgeführt (Capelson and Corces 2006, Golovnin et al. 2012). Es könnte sein, dass die Expression des Fusionsproteins einen deutlicheren Effekt auf die gesamte SUMOylierung der Zelle hat als der Hitzeschock, oder der *lwr knock out*. Zudem wurden die hier durchgeführten Experimente in Zellen und nicht in Fliegen durchgeführt. Dies könnte ebenfalls die unterschiedlichen Beobachtungen erklären. Auch die Methoden zur Detektion waren deutlich verschieden. In dieser Arbeit wurde zur Detektion der CP190-Bindung ChIP-qPCR und ChIP-Seq verwendet. In anderen Studien wurden Immunfärbungen von Polytän-Chromosomen genutzt, um Bindungsunterschiede sichtbar zu machen. Jedoch ist diese Methode wesentlich weniger sensitiv, als der in dieser Arbeit verwendete ChIP. Daher war es durch Polytän-Färbungen wahrscheinlich nicht möglich 2- bis 4-fache Veränderungen der Bindung zu detektieren. Andere Studien dagegen verwendeten ChIP zur Analyse des Einflusses von SUMOylierung auf die CP190-Bindung. Die in dieser Arbeit genutzte Verwendung von ChIP-Seq machen die Daten valider. Sie zeigten, dass der Effekt auf die genomweite CP190-Bindung dieselben waren, wie die der ChIP-qPCR-Analysen.

Die Erhöhung der Bindung von CP190 an dessen Bindestellen könnte also vielleicht auf die SUMOylierung von CP190 zurück zu führen sein. Die Modifikation könnte dabei stabilisierend auf CP190 wirken, sodass mehr CP190 in der Zelle vorhanden ist, welches an die Bindestellen anlagern kann. Ähnliches wurde zum Beispiel schon für den TF Dorsal beobachtet, dessen Aktivität und Stabilität während der Immunantwort durch Smt3/dSUMO verbessert wird (Bhaskar et al. 2002). Dem stehen allerdings die Untersuchungen der Proteinmenge entgegen, die im Western Blot analysiert wurden. Dabei konnte man sehen, dass sich die Menge an CP190 nach FLAG-His-dSUMO-Expression nicht verändert (Abbildung 21). Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass die Eigenschaften von CP190 durch die SUMOylierung verändert werden, was auch die Bindeeigenschaften von CP190 zu anderen Isolator-bindenden Proteinen beinhalten könnte. Außerdem könnte auch bei der Bindung von CP190, die Art und Weise der SUMOylierung von diesem, für dessen Bindeverhalten eine Rolle spielen. Liegt CP190 einfach oder mehrfach SUMOyliert vor, könnte dies durchaus destabilisierend oder stabilisierend auf dieses wirken. Außerdem könnte auch die Tatsache, dass CP190 als Dimer an Chromatin bindet, Einfluss auf dessen Bindeverhalten haben. Dabei könnte SUMOylierung von einem der beiden Proteine die Richtung bzw. Orientierung, in der es bindet und eventuell auch wirkt vorgeben (Kyrchanova et al. 2007, Kyrchanova et al. 2011, Muller M. et al. 1999, Vazquez et al. 2006). Um zu untersuchen welche Eigenschaften von CP190 durch potentielle SUMOylierung tatsächlich verändert werden, wäre es notwendig CP190 innerhalb der potentiellen SUMO-Motive zu mutieren. Anschließend könnte ein zum Beispiel ein ChIP durchgeführt werden, um das Bindeverhalten von nicht-SUMOyliertem CP190 zu untersuchen. Aber auch die Untersuchung der Enhancer-Blockade, im Reporter-Assay und der SUMOylierung selbst, in der FLAG-IP, wären denkbar (siehe oben, 4.2.2).

4.2.3. Der Einfluss der SUMOylierung auf den Chromatinstatus

Zur Untersuchung des Einflusses des Chromatinstatus wurden sowohl ein H3-ChIP, als auch ein FAIRE-Assay durchgeführt. Dadurch konnte festgestellt werden, welchen Einfluss SUMOylierung auf die allgemeine Chromatin-Konformation hat. Dabei konnte auch ein Hinweis darauf gefunden werden, ob die Bindung von CP190 und die Isolation an der dieses beteiligt ist, eventuell durch eine allgemeine Zugänglichkeitsänderung des Chromatins beeinflusst werden. Beim H3-ChIP konnte keine eindeutige Veränderung der Bindung von Histon H3 beobachtet werden (Abbildung 33). Dies deutet darauf hin, dass SUMOylierung keinen Einfluss auf den Chromatinstatus hat. Der FAIRE-Assay jedoch zeigte eine Tendenz zu eher offenem Chromatin, nach der FLAG-His-dSUMO-Expression im Vergleich zum Chromatin uninduzierter Zellen (Abbildung 34). Über die SUMOylierung von Histon H3 ist

bisher nichts bekannt, was die unveränderte Bindung von diesem erklären könnte. Wenn Histon H3 nicht SUMOyliert wurde, wurde die Bindung von diesem wahrscheinlich auch nicht direkt durch die Expression von FLAG-His-SUMO beeinflusst. Dies bedeutet, dass es wohl nicht dessen Bindung zur DNA oder andere Eigenschaften von Histon H3 beeinflusst. Über Histon H4 ist allerdings bekannt, dass dieses in Vertebraten, aber auch in *Drosophila* SUMOyliert vorliegt und im Fall des humanen Histon H4 auch zur Destabilisierung von diesem führen kann (Dhall et al. 2014, Stielow et al. 2008). Dies könnte den Trend zu geöffnetem Chromatin im FAIRE-Assay erklären. Aber auch die in dieser Arbeit beobachtete Zunahme der CP190-Bindung, die durch die Expression von FLAG-His-dSUMO bewirkt wurde, könnte die erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins im FAIRE-Assay bestätigen, da CP190-Bindung auch an eine Zunahme von offenerem Chromatin gekoppelt ist (Bartkuhn et al. 2009, Nègre et al. 2010, Schwartz et al. 2012a). Zudem wurde bereits beschrieben, dass die SUMOylierung von Komponenten des Polycomb-Komplexes dazu führt, dass dieser ebenfalls destabilisiert wird und zur Auflösung von Polycomb-*Bodies* führt (Gonzalez et al. 2014). Dies könnte auch auf dekontensiertes Chromatin hinweisen. Auch dies bestätigt die Ergebnisse des FAIRE-Assays, da ein Wegfall des Polycomb-Komplexes sehr wahrscheinlich zum Öffnen des Chromatins führen würde (Van Bortle and Corces 2012). Auch Studien zur Ausbildung von CP190-*Speckles* geben ähnliche Anhaltspunkte. Dabei bewirkt der *knock down* von Smt3/dSUMO, bzw. der doppelte-*knock down* von Aos1 und Uba2 (SUMO-aktivierende Enzyme), eine Erhöhung der Anzahl der CP190-*Speckles* (Doktorarbeit Melanie K. Buxa). Diese könnte auch bedeuten, dass große *Speckles* zu mehreren, kleineren CP190-*Speckles* zerfallen, ähnlich wie es bei der SUMOylierung der Komponenten des Polycomb-Komplexes der Fall ist. Die SUMOylierung von diesen führte zum Zerfall von großen Polycomb-*Bodies* zu kleineren Strukturen (Gonzalez et al. 2014). Dies würde bedeuten, dass die Interaktion zwischen den CP190-gebundenen Isolatoren und Promotoren verringert würde, sobald SUMOylierung vorhanden ist. Dadurch könnte auch eine verringerte Isolation zu erklären sein, wie sie in der Literatur für den *Gypsy*-Isolator beschrieben wurde (Capelson and Corces 2006).

Um definitive Aussagen zur Zugänglichkeit des Chromatins machen zu können, würde es sich anbieten das FAIRE-Chromatin zu sequenzieren und dabei Chromatin des uninduzierten Klonpools mit dem des FLAG-His-dSUMO überexprimierenden Pools zu vergleichen. Dies könnte Aufschluss zu den tatsächlichen Veränderungen im Chromatinstatus geben, da in der qPCR bisher nur Bindestellen von CP190 und dCTCF untersucht wurden. Diese könnten auch durch die verstärkte Bindung von CP190 eine verbesserte Zugänglichkeit aufweisen. Hierbei

zeigten aber auch einige der untersuchten Negativ-Kontrollstellen eine ähnliche Tendenz im FAIRE-Assay, was darauf hin deutet, dass die erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins durch einen generellen Effekt, durch die SUMO-Überexpression erzeugt werden könnte. Eine genomweite Untersuchung des FAIRE-Chromatin könnte also zur Lösung der Frage, ob die Zunahme der Offenheit des Chromatins an den untersuchten Bindestellen auf die SUMOylierung von CP190, oder auf eine generelle SUMOylierung, auch von Polycomb-Komponenten und/oder Histon H4, zurück zu führen ist. Aber auch einige weitere qPCRs für andere, nicht CP190 und dCTCF gebundene Stellen im Genom, könnten bereits mehr Erkenntnisse zum Einfluss der SUMOylierung auf den generellen Chromatinstatus bieten.

4.2.4. Fazit

Abschließend kann man feststellen, dass die SUMOylierung einen Einfluss auf die Isolation, bzw. auf die Enhancer-Blockade hat. Jedoch scheint in diesem Zusammenhang auch die De-SUMOylierung wichtig zu sein. Zudem beeinflusst SUMOylierung die Bindung von CP190 positiv, welches auch potentiell SUMOyliert in S2-Zellen vorliegt. Im Gegensatz dazu ist über die SUMOylierung anderer Isolator-bindender Proteinen, wie dCTCF und Su(Hw), nichts bekannt. Außerdem hat die SUMOylierung einen tendenziell positiven Effekt auf die Offenheit des Chromatins. Dabei könnte auch die stärkere Bindung von CP190 durch die erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins erklärt werden. Aber es wäre auch möglich die verbesserte Zugänglichkeit durch die verstärkte Bindung von CP190 zu erklären, da dessen Bindung auch zur offenerem Chromatin führen kann. Hierbei bleiben allerdings noch viele Fragen ungeklärt. Es ist nicht vollständig geklärt, ob die SUMOylierung von CP190 einen Einfluss auf die Isolation hat. Außerdem könnten noch weitere Isolator-bindende Proteine, die an der Isolation beteiligt sind, durch die SUMOylierung beeinflusst werden.

Es ist wahrscheinlich, dass die SUMOylierung generell keinen gerichteten Effekt auf Isolation und den Chromatinstatus hat. Das bedeutet, dass SUMOylierung diese nicht etwa positiv oder negativ beeinflusst. Es ist viel mehr möglich, dass die SUMOylierung eine regulatorische Funktion hat, um die Homöostase des Chromatins und an den Isolatoren zu erhalten. SUMOylierung verringert das Binden des Polycomb-Komplexes, was die Kondensation des Chromatins verringert. CP190 könnte dadurch einen verbesserten Zugang zu den Zielsequenzen haben und somit die Isolation verbessern. Nun könnte CP190 wieder den Polycomb-Komplex rekrutieren, was wiederum zur Kondensation des Chromatins führen würde (Abbildung 35, (i)). An den Isolatoren findet möglicherweise eine konstante, dynamische SUMOylierung und De-SUMOylierung von Zielproteinen, wie Mod(mbg4) und CP190, statt. Dadurch könnte eine Art „Fine Tuning“ der Enhancer-Blockade vorgenommen

werden (Abbildung 35, (ii)). Um diese Modell zu bestätigen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

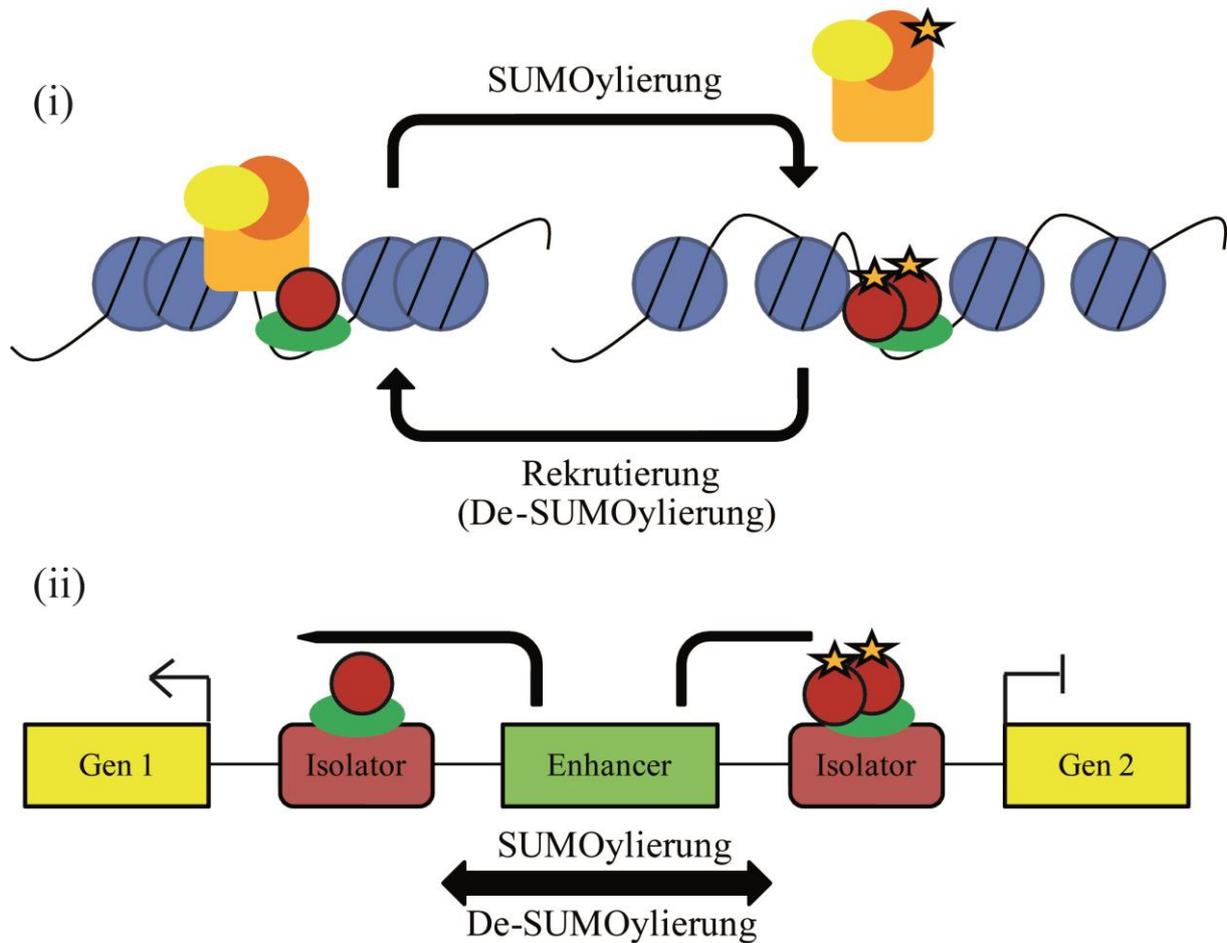


Abbildung 35: Modell zur Funktion von SUMOylierung im Chromatin-Kontext und bei der Isolation. (i) Homöostase des Chromatinstatus wird durch SUMOylierung beeinflusst. Der Polycomb-Komplex (gelb) wird durch SUMOylierung (Stern) von dessen Komponenten destabilisiert. Dadurch wird das Chromatin (blau) besser zugänglich und CP190 (rot; mit dCTCF, grün) kann besser binden. Die potentielle SUMOylierung (Stern) von CP190 verbessert dessen Bindung. CP190 wiederum kann den PC rekrutieren, was wieder zu geschlossenerem Chromatin führt. (ii) „Fine Tuning“ der Isolation durch SUMOylierung und De-SUMOylierung von Isolationproteinen. Gen 1 (gelb) wird nicht so stark vom Enhancer (hell grün) blockiert wie Gen 2 (gelb). Dies könnte auf die SUMOylierung zurück zu führen sein. Wahrscheinlich ist für eine funktionierende Isolation auch die De-SUMOylierung notwendig.

5. Anhang

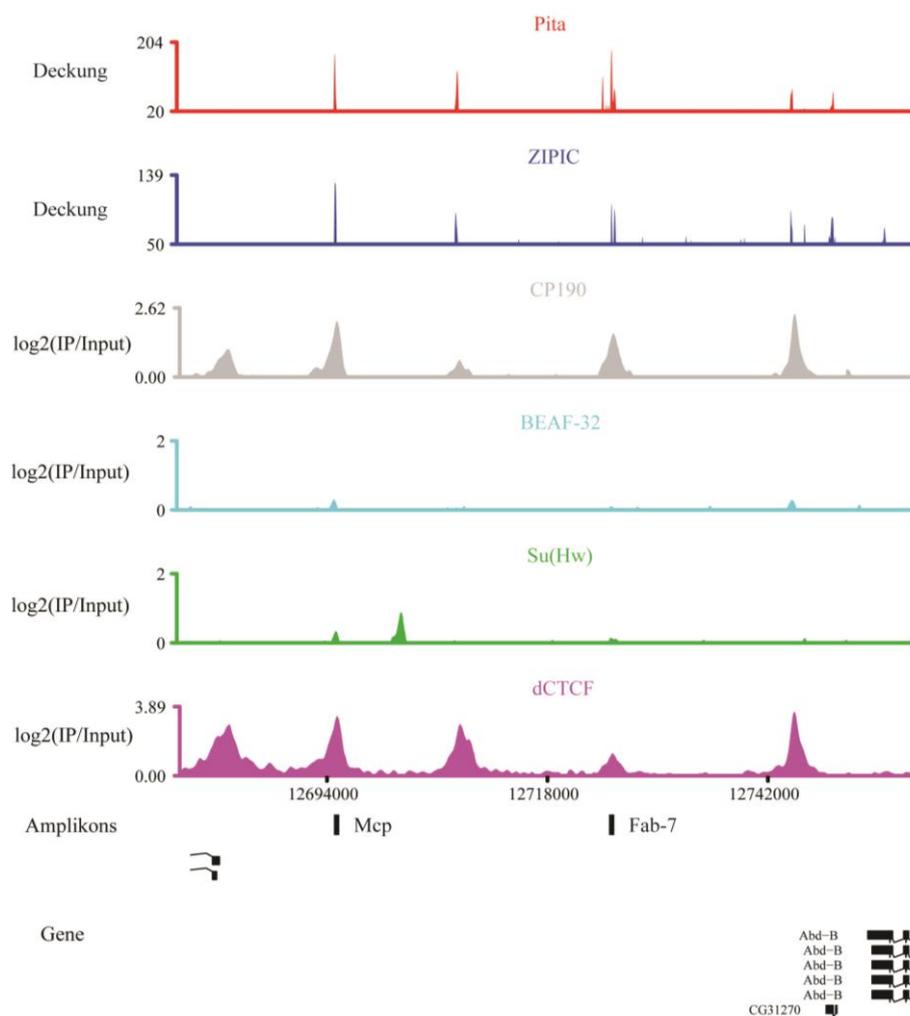


Abbildung 36: Überschneidung von Pita-, ZIPIC-, CP190-, BEAF-32-, Su(Hw)- und dCTCF-Bindung an Mcp- und Fab7-Isolator des Bizhorax-Komplex. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von Pita (rot), ZIPIC (dunkelblau), CP190 (grau), BEAF-32 (hellblau), Su(Hw) (grün) und dCTCF. Die Deckung der Pita- und ZIPIC-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. Chip-ChIP-Daten der Datenbank modENCODE für CP190, BEAF-32, Su(Hw) und dCTCF wurden als \log_2 Ration von IP zu Input dargestellt. Die PCR-Amplifikons (Fab7 und Mcp) und die umliegenden Gene (cg31270 und Abd-B) sind in schwarz dargestellt (Maksimenko et al. 2015).

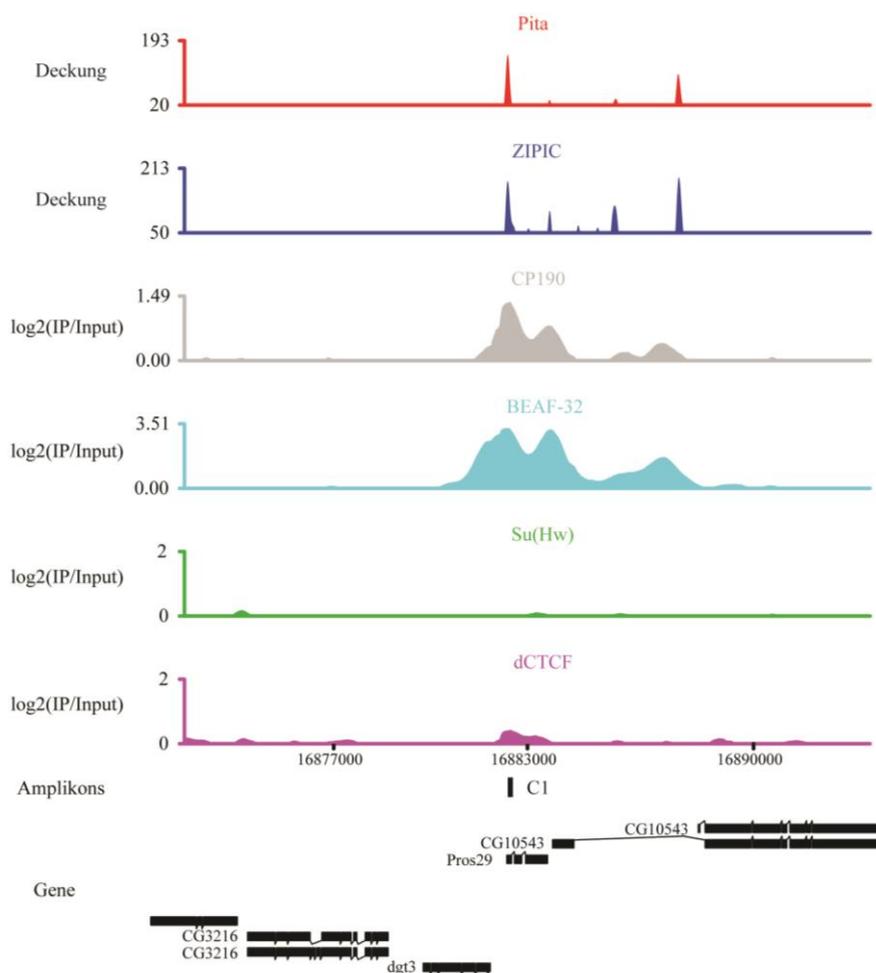


Abbildung 37: Überschneidung von Pita-, ZIPIC-, CP190-, BEAF-32- und dCTCF-Bindung im Promotobereich (TSS) des *cg10543*-Gens. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von Pita (rot), ZIPIC (dunkelblau), CP190 (grau), BEAF-32 (hellblau), Su(Hw) (grün) und dCTCF. Die Deckung der Pita- und ZIPIC-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. Chip-ChIP-Daten der Datenbank modENCODE für CP190, BEAF-32, Su(Hw) und dCTCF wurden als log₂ Ration von IP zu Input dargestellt. Die PCR-Amplikons (C1) und die umliegenden Gene sind in schwarz dargestellt. Dabei sind Gene des Leit- (Pros29, *cg10543*) und des Folgestrangs (*cg3216*, *dgt3*) dargestellt (Maksimenko et al. 2015).

(i) Pita Überschneidung

Faktor	ID	Nr. der Peaks	tats. Überschn.	erwartete Überschn.	Ratio
CTCF	2639	2697	1176	193	6.09
CTCF	2638	4957	1859	320	5.81
CP190	3748	2532	1088	204	5.33
BEAF-32	922	1163	411	82	5.01
CP190	925	4377	1699	360	4.72
JHDM1	3708	1770	609	132	4.61
Psc	3797	1480	439	119	3.69
MBD-R2	3787	2274	643	179	3.59
Pho	3894	1902	531	151	3.52
MLE	3040	3284	949	276	3.44
BEAF-32	3745	3246	1022	307	3.33
JHDM1	3033	3270	926	284	3.26
CTCF	3749	1024	341	109	3.13
PR-Set7	3054	4266	1197	385	3.11
BRE1	923	6756	2099	715	2.94
CP190	280	6611	2038	699	2.92
CTCF	3281	1820	611	210	2.91
CTCF	283	1969	730	252	2.90
MLE	3788	2406	533	189	2.82
BEAF-32	274	4800	1458	519	2.81

(ii) ZIPIC Überschneidung

Faktor	ID	Nr. der Peaks	tats. Überschn.	erwartete Überschn.	Ratio
BEAF-32	922	1163	525	96	5.47
JHDM1	3708	1770	811	153	5.30
Pho	3894	1902	898	175	5.13
CTCF	2638	4957	1676	373	4.49
Psc	3797	1480	599	138	4.34
MBD-R2	3787	2274	892	207	4.31
CTCF	2639	2697	915	224	4.08
MLE	3040	3284	1207	318	3.80
CP190	925	4377	1546	415	3.73
JHDM1	3033	3270	1207	327	3.69
BEAF-32	3745	3246	1289	352	3.66
MLE	3788	2406	750	218	3.44
CP190	3748	2532	789	235	3.36
PR-Set7	3054	4266	1482	442	3.35
BRE1	2985	4048	1370	418	3.28
BEAF-32	274	4800	1821	591	3.08
POF	3294	1019	289	95	3.04
RPD3	3057	4209	1170	390	3.00
HP1b	941	3473	984	345	2.85
WDS	953	5829	1897	675	2.81

Abbildung 38: Tabellarische Darstellung der Anreicherungen von verschiedenen Faktoren mit Pita und ZIPIC. Die Faktoren, die eine Überschneidung der Bindung mit (i) Pita bzw. (ii) ZIPIC zeigten, wurden entsprechend ihrer Ration von tatsächlichen Überschneidungen zu erwarteten Überschneidungen sortiert. Je höher die Ratio, desto glaubwürdiger die Überschneidung mit Pita bzw. ZIPIC. Außerdem wurde die Anzahl der Anreicherungen/Peaks gezeigt. Bei den rot markierten Proteinen handelt es sich um Isolator-bindende Proteine. Es wurden ChIP- Chip-Daten von modENCODE mit den vorhandenen ChIP-Seq-Daten von Pita bzw. ZIPIC verglichen (Maksimenko et al. 2015).

(i) Pita

Rang	Faktoren	Korrelation
1	Pita	1.00
2	ZFPIC	0.44
3	CP190_280	0.44
4	CP190_925	0.44
5	CP190_3748	0.43
6	JIL-1_945	0.40
7	Suvar3-7_2672	0.40
8	NURF301_3790	0.40
9	ISWI_3032	0.40
10	MLE_3040	0.40
11	POF_3294	0.39
12	Chriz_278	0.38
13	PR-Set7_3054	0.38
14	Chriz_279	0.37
15	MOF_3044	0.37
16	JMJD2A_KDM4A_3783	0.36
17	NURF301_947	0.36
18	MLE_3788	0.36
19	JMJD2A_KDM4A_3784	0.35
20	CTCF_283	0.35
21	CTCF_3281	0.35
22	JIL-1_3038	0.35
23	NURF301_3048	0.35
24	HP1b_3020	0.34
25	MBD-R2_946	0.34
26	WDS_953	0.34
27	BEAF-32_274	0.33
28	POF_3710	0.33
29	POF_3897	0.32
30	RPD3_3057	0.32
31	Psc_3797	0.32
32	MBD-R2_3787	0.31
33	HP1b_941	0.31
34	BEAF-32_3745	0.31

(ii) ZIPIC

Rang	Faktoren	Korrelation
1	ZFPIC	1.00
2	Pita	0.57
3	MLE_3040	0.49
4	WDS_953	0.46
5	NURF301_947	0.46
6	ISWI_3032	0.45
7	MLE_3788	0.43
8	Chriz_278	0.43
9	PR-Set7_3054	0.43
10	MBD-R2_3039	0.42
11	NURF301_3048	0.42
12	MBD-R2_946	0.42
13	Chriz_279	0.41
14	NURF301_3790	0.41
15	RPD3_3057	0.40
16	MOF_3044	0.40
17	CP190_925	0.40
18	JMJD2A_KDM4A_3784	0.39
19	MBD-R2_3787	0.37
20	JHDM1_3708	0.36
21	dMi-2_3676	0.36
22	POF_3710	0.36
23	BEAF-32_274	0.36
24	CP190_3748	0.35
25	CP190_280	0.35
26	JMJD2A_KDM4A_3783	0.35
27	MRG15_3047	0.35
28	HP1b_3020	0.35
29	H3K4me3_3761	0.34
30	Pho_3894	0.33
31	Psc_3797	0.33
32	H4acTetra_201	0.32
33	dMi-2_926	0.32
34	H3K9ac_309	0.32

Abbildung 39: Tabellarische Darstellung der Korrelation der Bindung von Pita (links) bzw. ZIPIC (rechts) zu der Bindung anderen Faktoren. Pita korrelierte am besten mit sich selbst und mit anderen Isolator-bindenden Proteinen wie ZIPIC, CP190, dCTCF und BEAF-32 (rot), aber auch mit anderen Faktoren (schwarz). Dies traf auch auf ZIPIC zu. Es wurden Chip-ChIP-Daten von modENCODE mit den vorhandenen ChIP-Seq-Daten von Pita bzw. ZIPIC korreliert (Maksimenko et al. 2015).

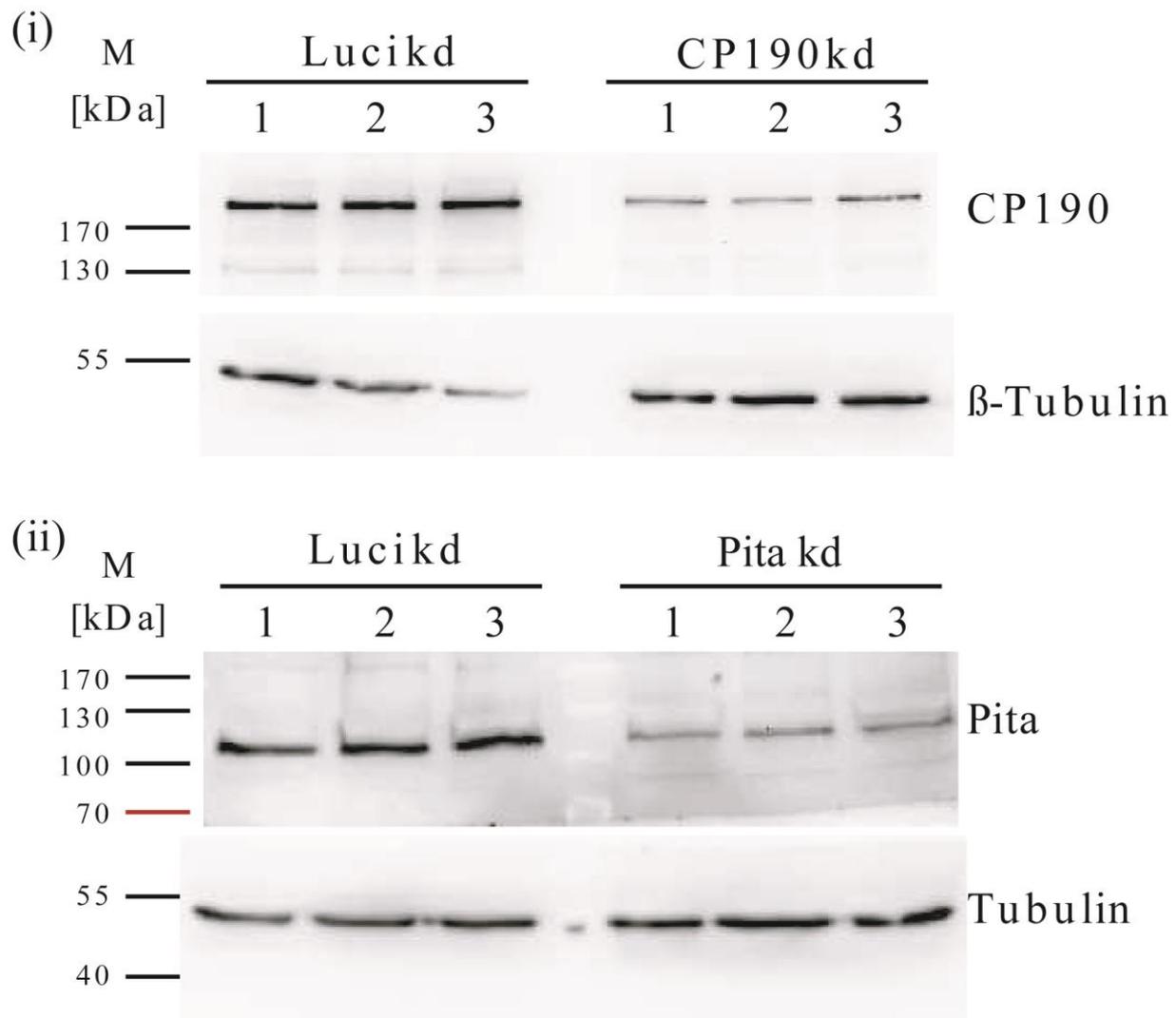


Abbildung 40: Kontrolle des *knock down* für CP190 und Pita für ChIP in Triplikaten. Western Blot von Extrakten von S2-Zellen, die einem *knock down* für (i) CP190 bzw. (ii) Pita unterzogen wurden. Die Zellen wurden ausgesät und ein *knock down* für Luziferase (Mock, Luci), CP190 und Pita durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Gesamtprotein extrahiert, sowie ein Western Blot durchgeführt. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific (M). β -Tubulin, ein Haushaltgen, diente als Ladekontrolle. Primär-Antikörper: α -CP190 (Ratte) 1:1000 in 3% Milch, α - β -Tubulin (Maus) 1:1000 in 3% Milch, α -Pita (Ratte) 1:1000 in 3% Milch. Sekundär-Antikörper mit HRP: α -Ratte 1:25.000 in 0,5% Milch, α -Maus 1:25.000 in 0,5% Milch. Alle Antikörper wurden 1 Std. bei RT auf der Membran inkubiert. Zur Detektion der Signale wurde die Membran mit dem HRP-Substrat-Komplettsystem von MilliQ benetzt und zwischen 100 und 240 Sek. am VersaDoc von BioRad belichtet und die Chemilumineszenz detektiert. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms Quantity One von BioRad ausgewertet.

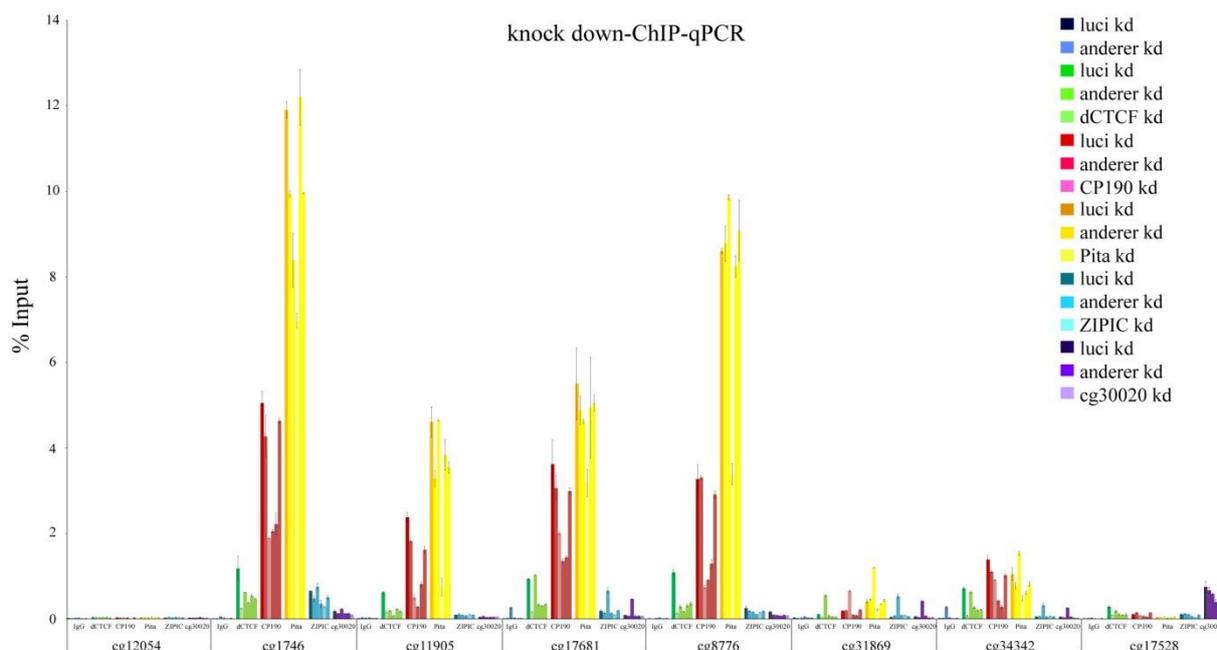


Abbildung 41: Der knock down von CP190, Pita und ZIPIC könnten einen Einfluss auf die jeweilig anderen Faktoren haben. Ein ChIP-qPCR Experiment wurde für die Ermittlung der CP190 (rot), CTCF (grün) und Pita (gelb), ZIPIC (blau), cg30020 (violett) -Anreicherung an spezifischen Bindestellen durchgeführt. Die Zellen wurden ausgesät und der *knock down* von CP190, dCTCF, Pita, ZIPIC oder cg30020 durchgeführt. Die Zellen wurden nach vier Tagen geerntet und ein ChIP, sowie eine DNA-Aufreinigung durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden für spezifische Bindestellen der untersuchten Faktoren analysiert. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet.

Expressions-Vektorsysteme für FLAG-His-dSUMO:

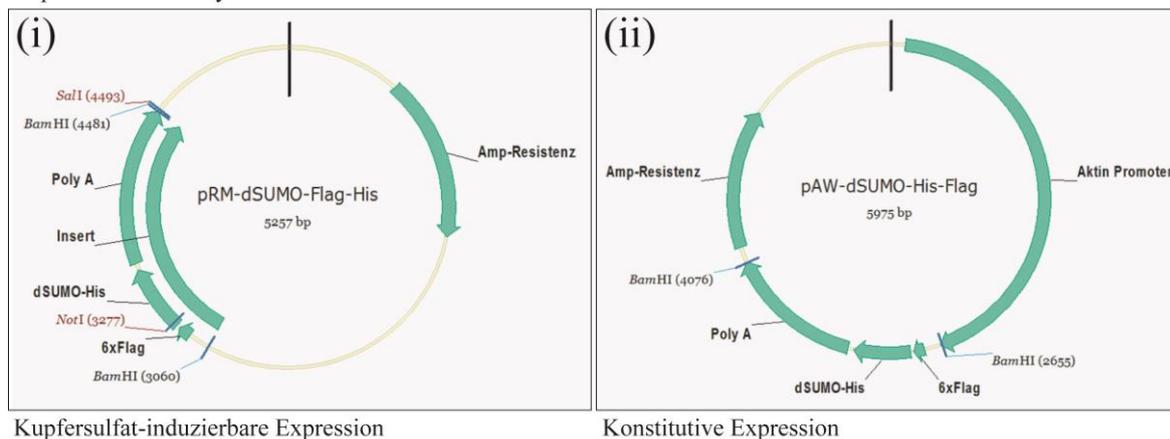


Abbildung 42: Vektorkarten der verwendeten Überexpressions-Vektorsysteme zur Untersuchung des Einflusses von SUMOylierung auf die Isolation in *Drosophila melanogaster*. (i) Kupfersulfat induzierbares Expressions-Vektorsystem. Vektorkarte von pRM-FLAG-His-dSUMO mit dSUMO-Fusionsprotein und PolyA-Sequenz, Ampicilin-Resistenzgen für die Selektion auf Amp-LB-Agar und Restriktionsenzym (RE) -Schnittstellen für Testverdau (BamHI, SalI, NotI) (Masterarbeit Meike K. Abraham); (ii) Expressions-Vektorsystem mit konstitutiv aktivem Aktin-Promotor. Vektorkarte von pAW- FLAG-His-dSUMO mit SUMO-Fusionsprotein und PolyA-Sequenz, Ampicilin-Resistenzgen für die Selektion auf Amp-LB-Agar und Restriktionsenzym (RE) -Schnittstellen für Testverdau (BamHI) (Eigenia Wagner, AG Brehm).

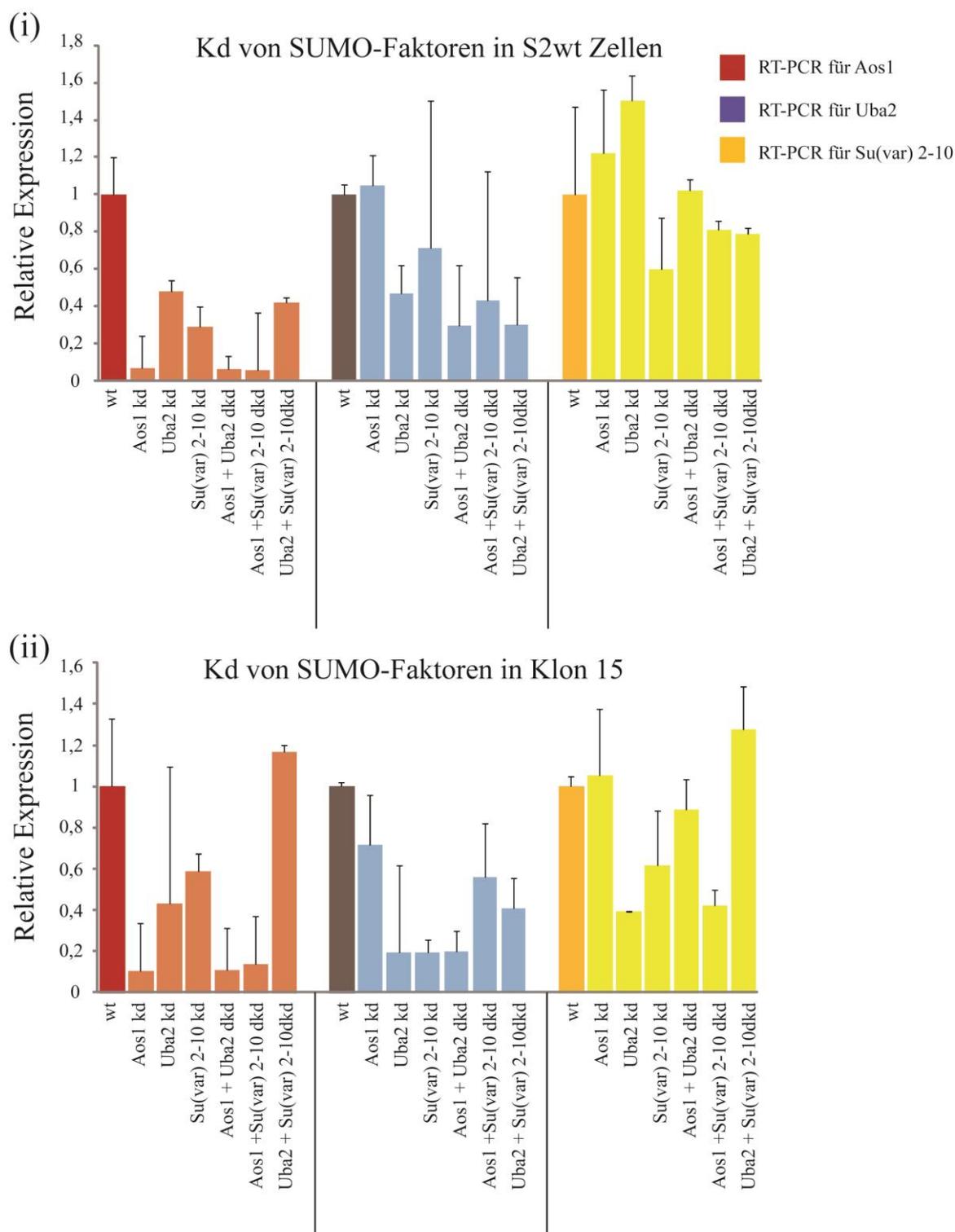


Abbildung 43: Der *knock down* von SUMO-Faktoren in S2-Wildtyp-Zellen und FLAG-His-dSUMO-exprimierenden Zellen (Klon 15) ist spezifisch. Untersuchung der Spezifität des *knock downs* durch die entsprechenden dsRNAs, gegen Aos1, Uba2 und Su(var)2-10 mRNA mittels RT-qPCR, in wildtypischen Zellen und Klon 15 (FLAG-His-dSUMO-Expression) zeigte, dass die diese eine spezifische Reduzierung des Genproduktes auf RNA-Ebene zur Folge haben.

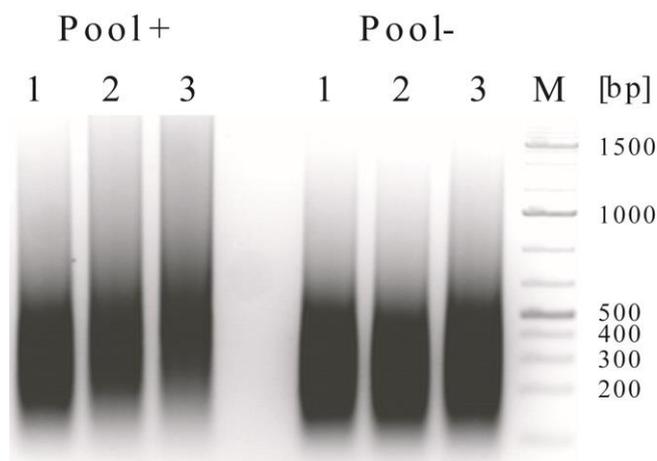


Abbildung 44: Die Chromatinisolation aus dem induzierten (Pool +) und nicht-induzierten (Pool -) Klonpool war erfolgreich und die Fragmente zeigen die gewünschte Größe von 100-500 bp. Dieses Chromatin war geeignet für ChIP-qPCR und ChIP-Seq. Zum Überprüfen der Qualität des Chromatins für den ChIP, wurden 800 µl des 1:10 Verdünnten ChIP-Extraktes aufgereinigt und auf einem 1,5 % EtBr-Agarosegel überprüft. Dieses wurde am UV-Tisch analysiert, sowie mit der Software DocMedAnalysis von BioRad dokumentiert. Es wurden jeweils drei Replikate (1, 2, 3) für den induzierten (Pool +) und den nicht-induzierten (Pool -) Klonpool präpariert. Als Längenstandard (M=Marker) diente der Gene Ruler 1kb von Thermo Scientific.

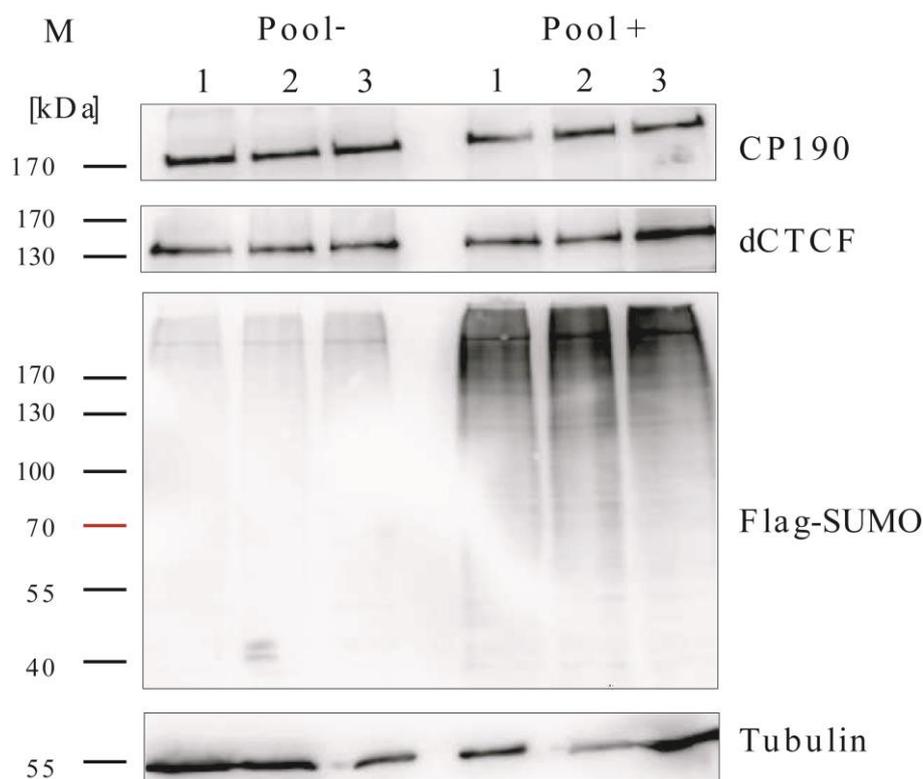


Abbildung 45: Western Blot zeigte erfolgreiche FLAG-His-dSUMO-Expression nach Induktion des Klone Pools mit CuSO_4 . Western Blot von Extrakten FLAG-His-dSUMO-exprimierender S2-Zellen (Pool +/induziert mit CuSO_4) zeigten SUMOylierte Proteine in der Detektion mit FLAG-Antikörper. Die Expression von CP190 und dCTCF wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Expressionslevel dieser Proteine variierten nicht zwischen uninduzierten (pool -) und induzierten Zellen (pool +). β -Tubulin, ein Haushaltgen, diente als Ladekontrolle. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific.

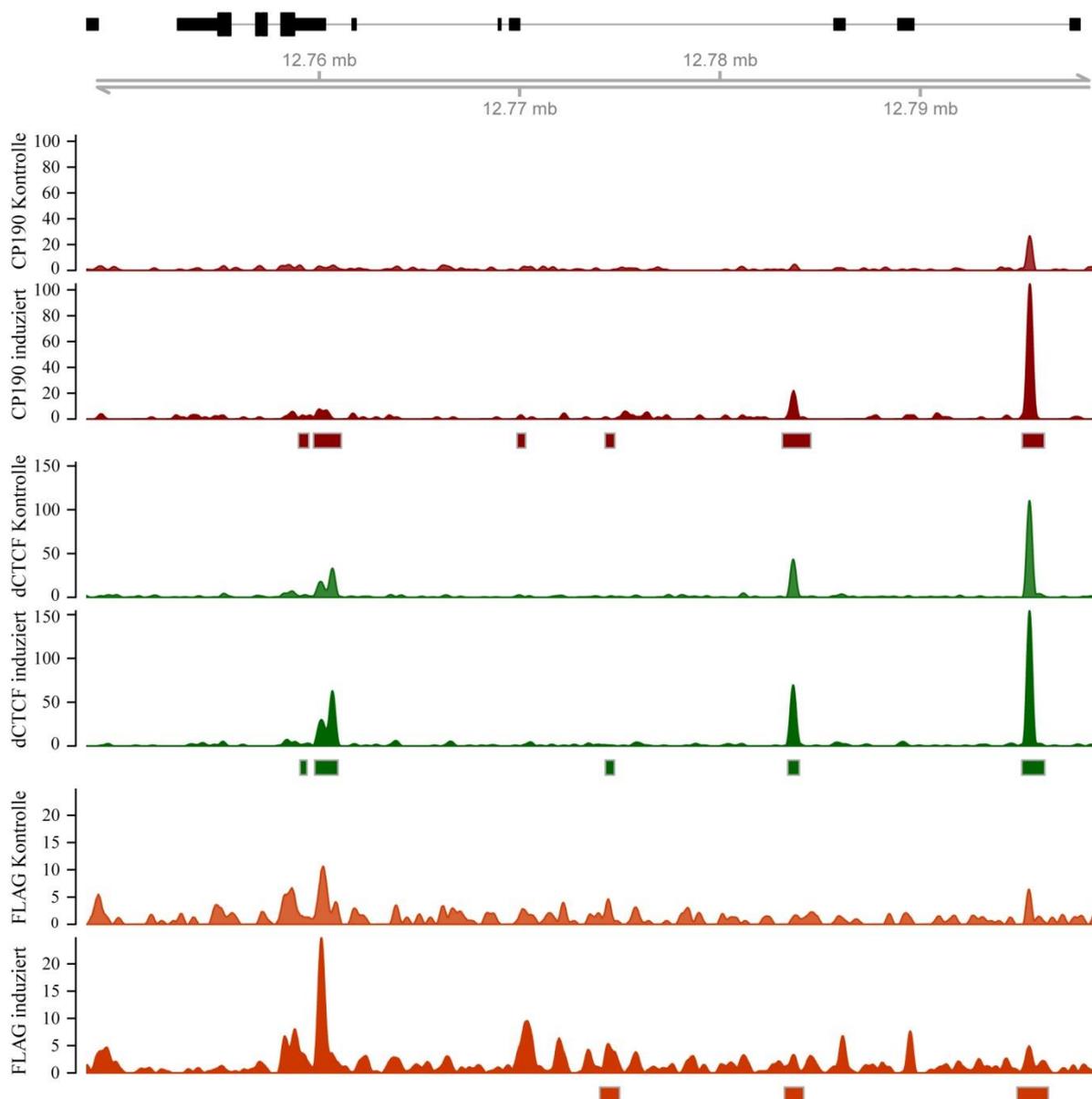


Abbildung 46: Überschneidung von CP190, dCTCF und FLAG-His-dSUMO-Bindung am Abd-B-Gen vor und nach Induktion der Expression. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von CP190 (rot), dCTCF (grün) und FLAG-His-dSUMO (gelb,) vor (Kontrolle, blass) und nach Induktion (induziert, dunkel). Die Deckung der CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. ChIP-Seq-Daten der GEO-Datenbank für CP190-, dCTCF- (Ong et al, 2013) und dSUMO-Bindestellen (Gonzales et al, 2014) wurden als Balken dargestellt. Die genomische Region bzw. das Abd-B-Gen wurde in schwarz dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

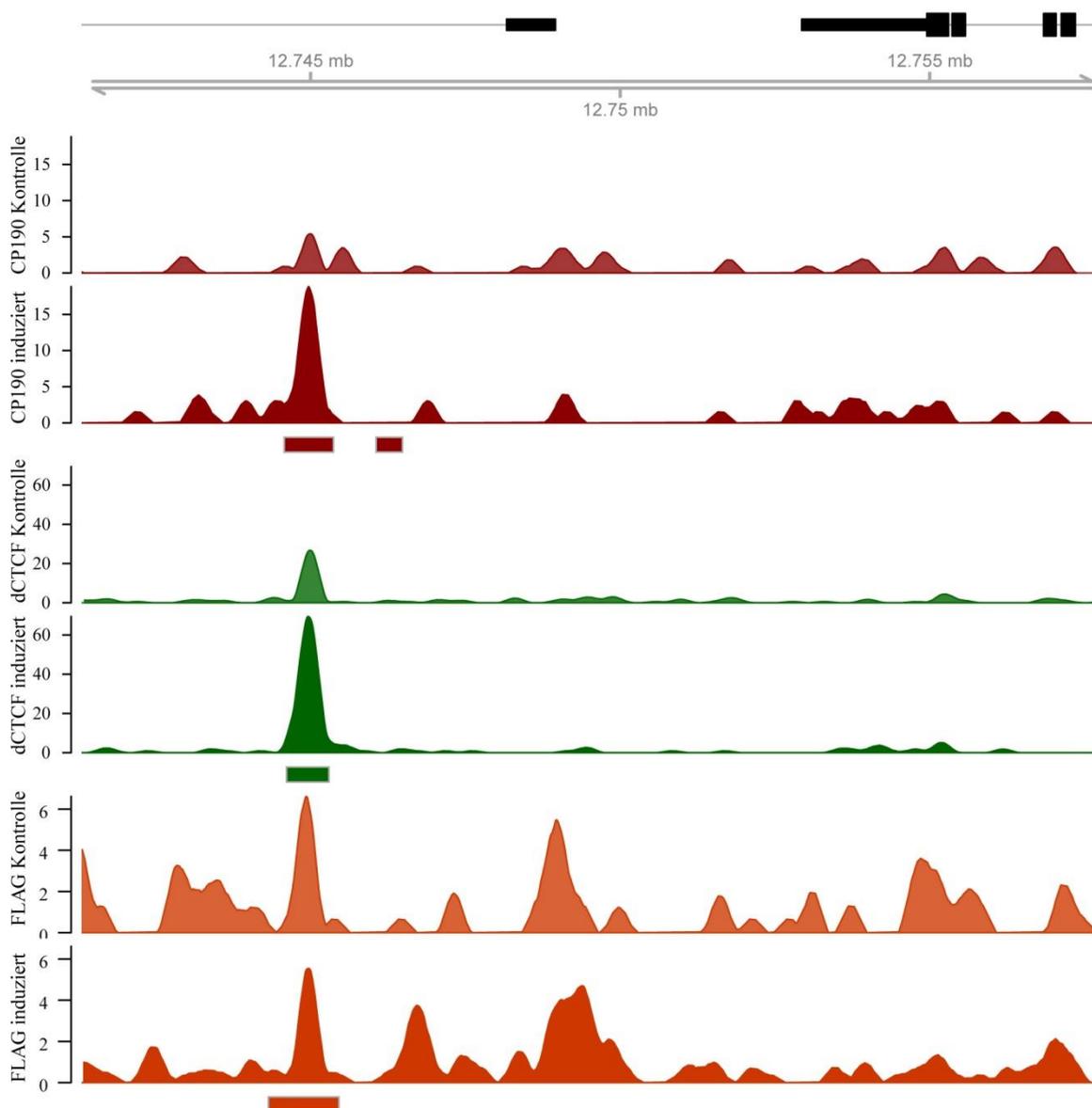


Abbildung 47: Überschneidung von CP190, dCTCF und FLAG-His-dSUMO-Bindung am Fab8-Isolator des Abd-B Gen vor und nach Induktion der Expression. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von CP190 (rot), dCTCF (grün) und FLAG-His-dSUMO (gelb,) vor (Kontrolle, hell) und nach Induktion (induziert, dunkel). Die Deckung der CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. ChIP-Seq-Daten der GEO-Datenbank für CP190-, dCTCF- (Ong et al, 2013) und dSUMO-Bindestellen (Gonzales et al, 2014) wurden als Balken dargestellt. Die genomische Region bzw. der Fab8-Isolator wurde in schwarz dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

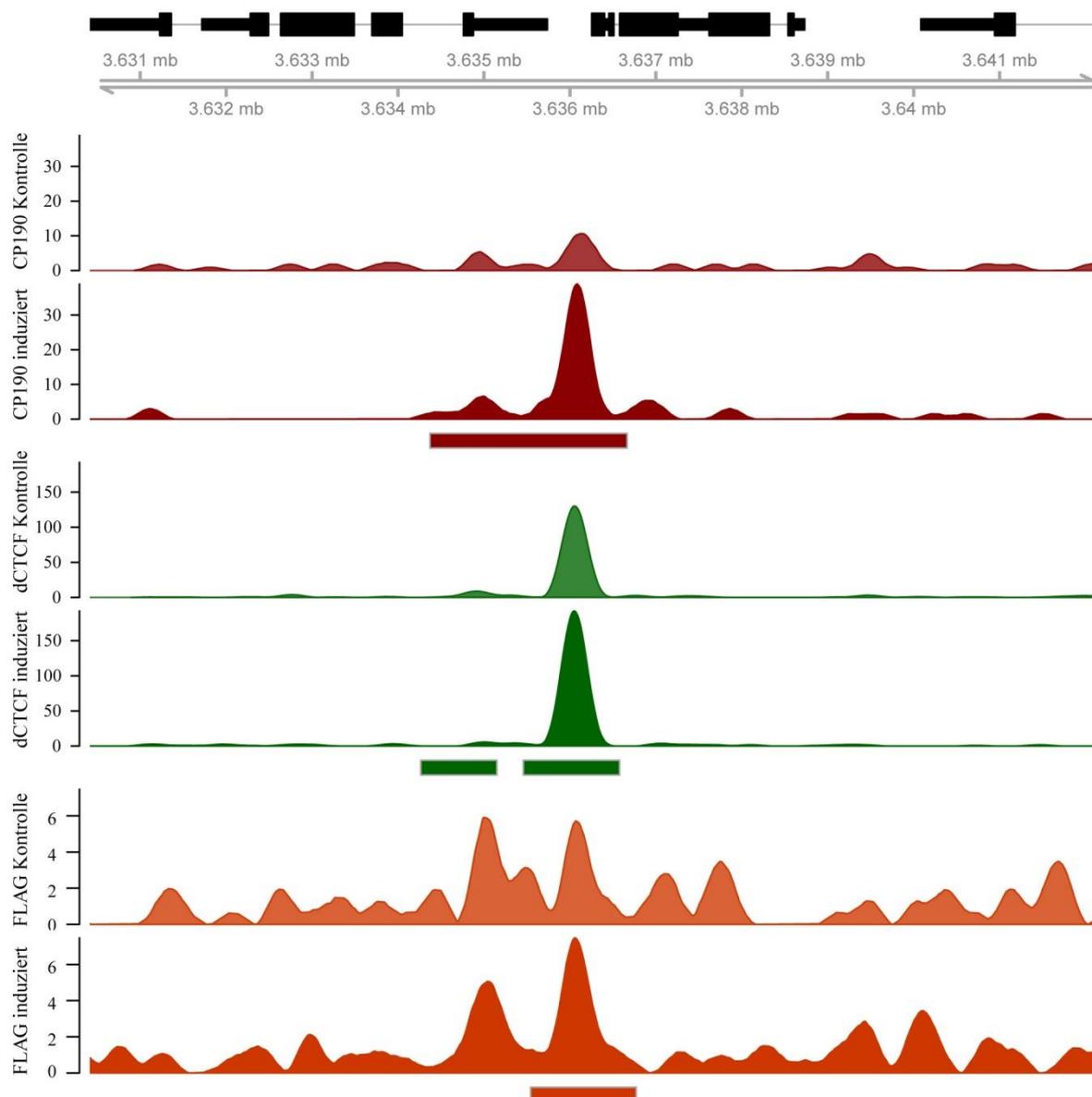


Abbildung 48: Überschneidung von CP190, dCTCF und FLAG-His-dSUMO-Bindung am cg31472-Gen vor und nach Induktion der Expression. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von CP190 (rot), dCTCF (grün) und FLAG-His-dSUMO (gelb) vor (Kontrolle, blass) und nach Induktion (induziert, dunkel). Die Deckung der CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. ChIP-Seq-Daten der GEO-Datenbank für CP190-, dCTCF- (Ong et al, 2013) und dSUMO-Bindestellen (Gonzales et al, 2014) wurden als Balken dargestellt. Die genomische Region bzw. das cg31472-Gen wurde in schwarz dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

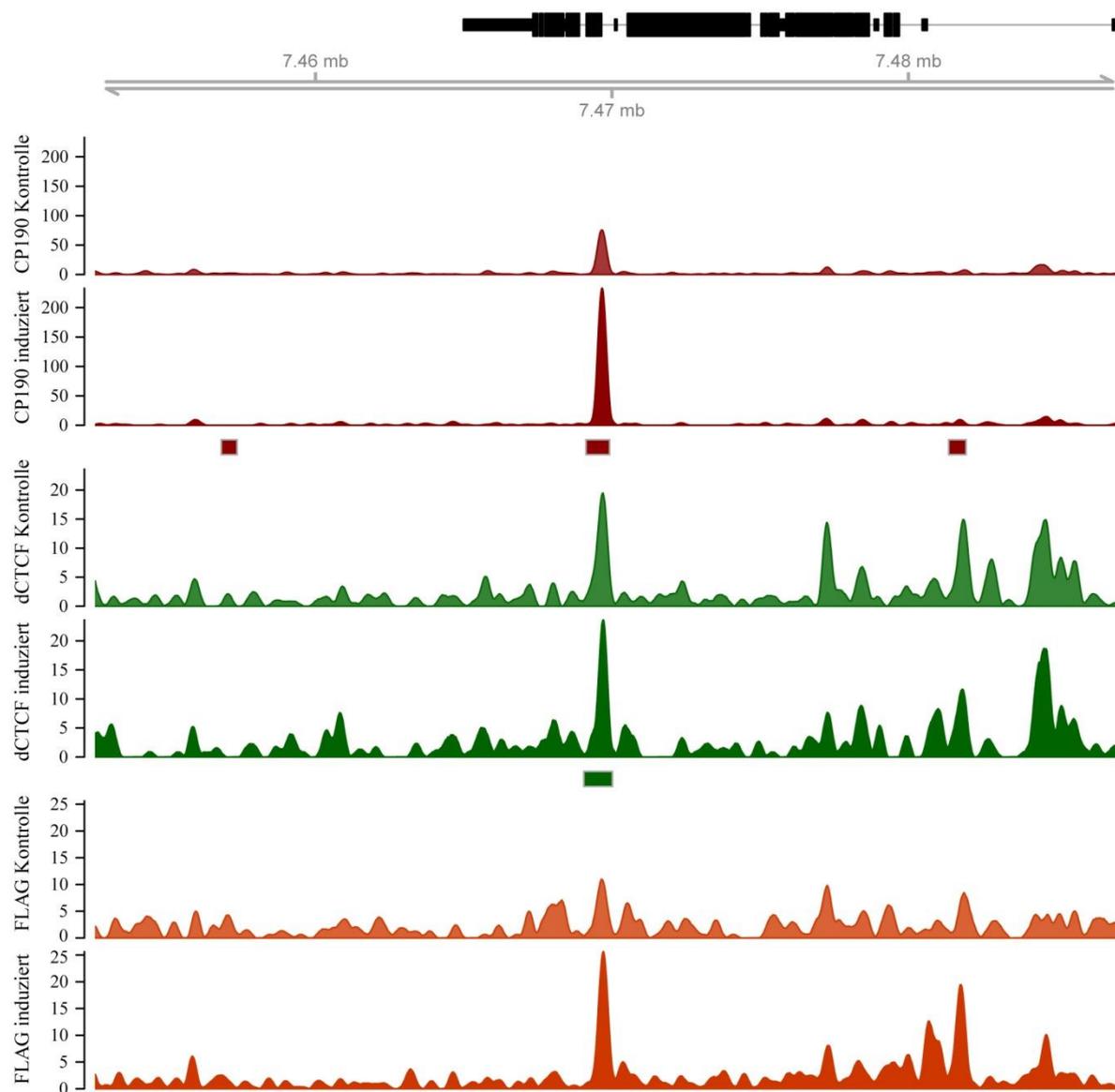


Abbildung 49: Überschneidung von CP190, dCTCF und FLAG-His-dSUMO-Bindung am *tou*-Gen vor und nach Induktion der Expression. Genombrowser-Schnappschüsse für Bindestellen von CP190 (rot), dCTCF (grün) und FLAG-His-dSUMO (gelb.) vor (Kontrolle, blass) und nach Induktion (induziert, dunkel). Die Deckung der CP190-, dCTCF- und FLAG-His-dSUMO-ChIP-Seq-Anreicherungen wurde dargestellt. ChIP-Seq-Daten der GEO-Datenbank für CP190-, dCTCF- (Ong et al, 2013) und dSUMO-Bindestellen (Gonzales et al, 2014) wurden als Balken dargestellt. Die genomische Region bzw. das *Tou*-Gen wurde in schwarz dargestellt (in Kooperation mit Marek Bartkuhn).

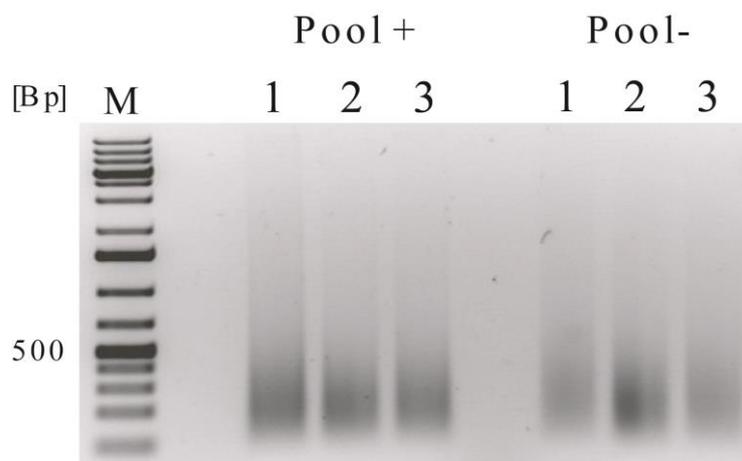


Abbildung 50: Die FAIRE-Chromatinisolation war erfolgreich und die Fragmente haben die korrekte Größe von 100 bis 500 bp. Das Chromatin konnte für den FAIRE-Assay verwendet werden. Zur Quantifizierung des FAIRE-Chromatins wurden 5 µl des fertig Preparierten Inputs abgenommen und mit 2 µl 6x Orange-Dye versehen. Die Proben wurden auf ein 1,5 % EtBr-Agarosegel geladen und am UV-Tisch analysiert, sowie mit der Software DocMedAnalys von BioRad dokumentiert. Es wurden jeweils drei Replikate (1, 2, 3) für den induzierten (Pool +) und den nicht-induzierten (Pool -) Klonpool präpariert. Als Längenstandard (M=Marker) diente der Gene Ruler 1kb von Thermo Scientific.

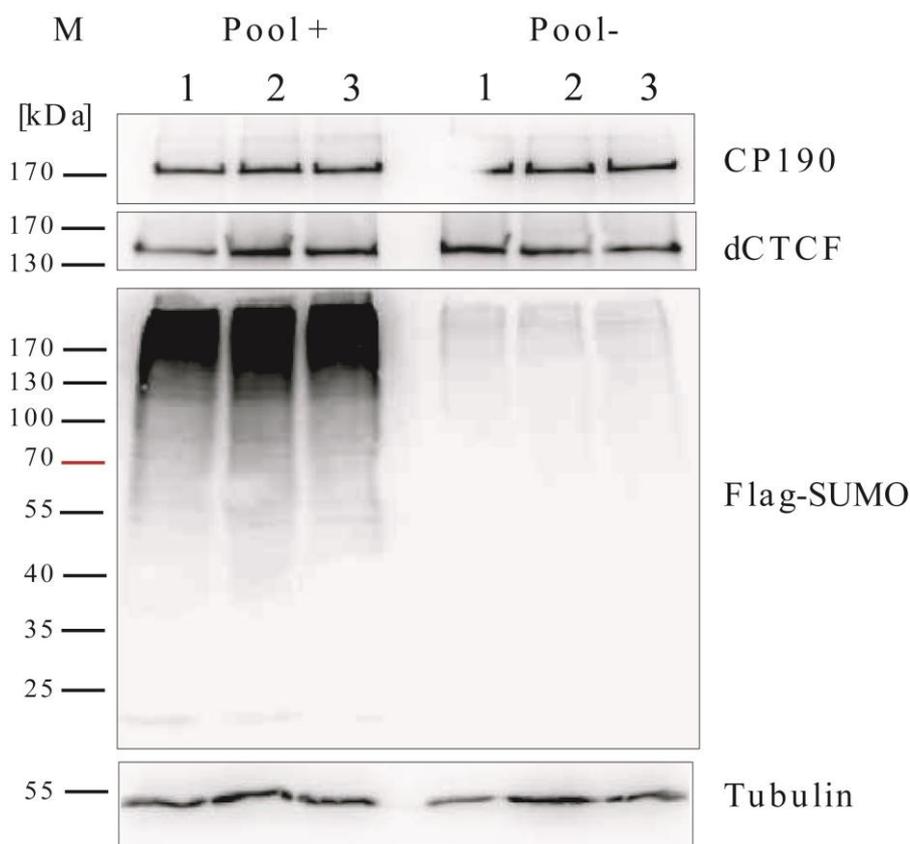


Abbildung 51: Western Blot zeigte erfolgreiche FLAG-His-dSUMO-Expression nach Induktion des Klon Pools mit CuSO_4 . Western Blot von Extrakten FLAG-His-dSUMO-exprimierender S2-Zellen (Pool +/induziert mit CuSO_4) zeigten SUMOylierte Proteine in der Detektion mit FLAG-Antikörper. Die Expression von CP190 und dCTCF wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Expressionslevel dieser Proteine variierten nicht zwischen uninduzierten (pool -) und induzierten Zellen (pool +). β -Tubulin, ein Haushaltgen, diente als Ladekontrolle. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific.

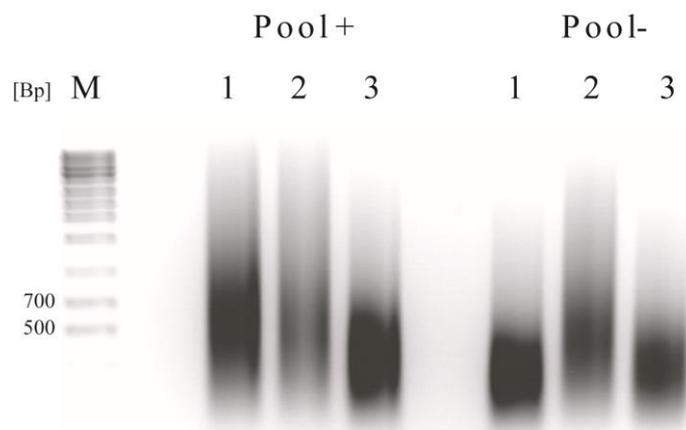


Abbildung 52: Die Chromatinisolation aus dem induzierten (Pool +) und nicht-induzierten (Pool -) Klonpool war erfolgreich und die Fragmente zeigten die gewünschte Größe von 100-500 bp. Dieses Chromatin war geeignet für ChIP-qPCR und ChIP-Seq. Zum Überprüfen der Qualität des Chromatins für den ChIP, wurden 800 μ l des 1:10 Verdünnten ChIP-Extraktes aufgereinigt und auf einem 1,5 % EtBr-Agarosegel überprüft. Dieses wurde am UV-Tisch analysiert, sowie mit der Software DocMedAnalysis von BioRad dokumentiert. Es wurden jeweils drei Replikate (1, 2, 3) für den induzierten (Pool +) und den nicht-induzierten (Pool -) Klonpool präpariert. Als Längenstandard (M=Marker) diente der exACTGene 1kb DNA Ladder von Fisher Scientific International Inc.

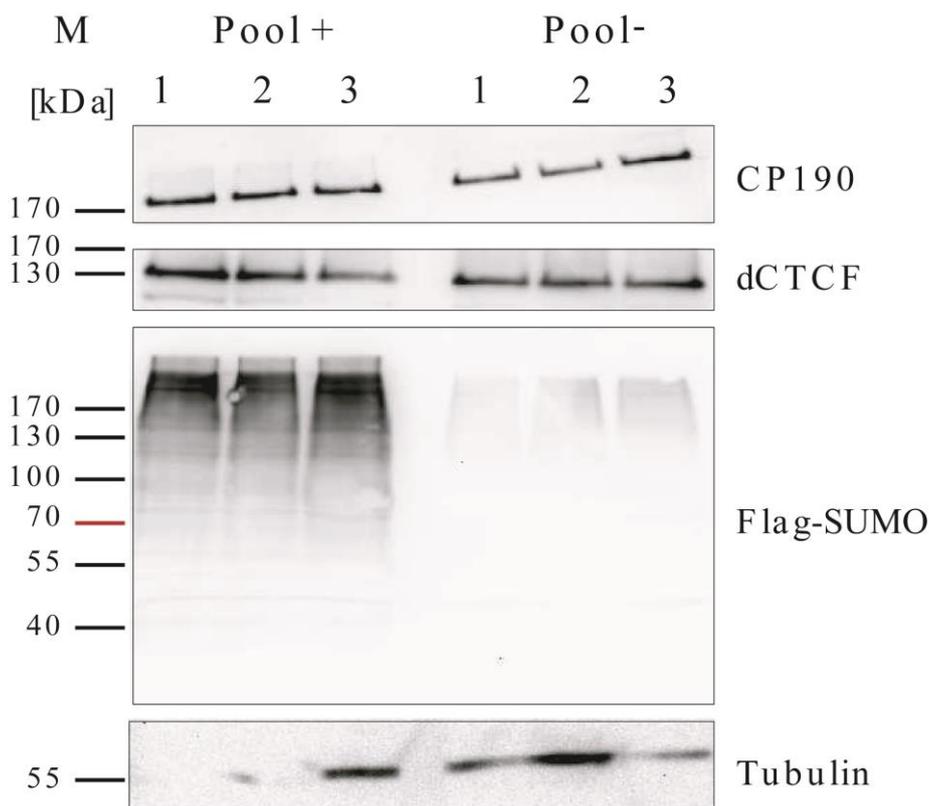


Abbildung 53: Western Blot zeigte erfolgreiche FLAG-His-dSUMO-Expression nach Induktion des Klone Pools mit CuSO_4 . Western Blot von Extrakten FLAG-His-dSUMO-exprimierender S2-Zellen (Pool +/induziert mit CuSO_4) zeigten SUMOylierte Proteine in der Detektion mit FLAG-Antikörper. Die Expression von CP190 und dCTCF wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Expressionslevel dieser Proteine variierten nicht zwischen uninduzierten (pool -) und induzierten Zellen (pool +). β -Tubulin, ein Haushaltgen, diente als Ladekontrolle. Als Längenstandart diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific.

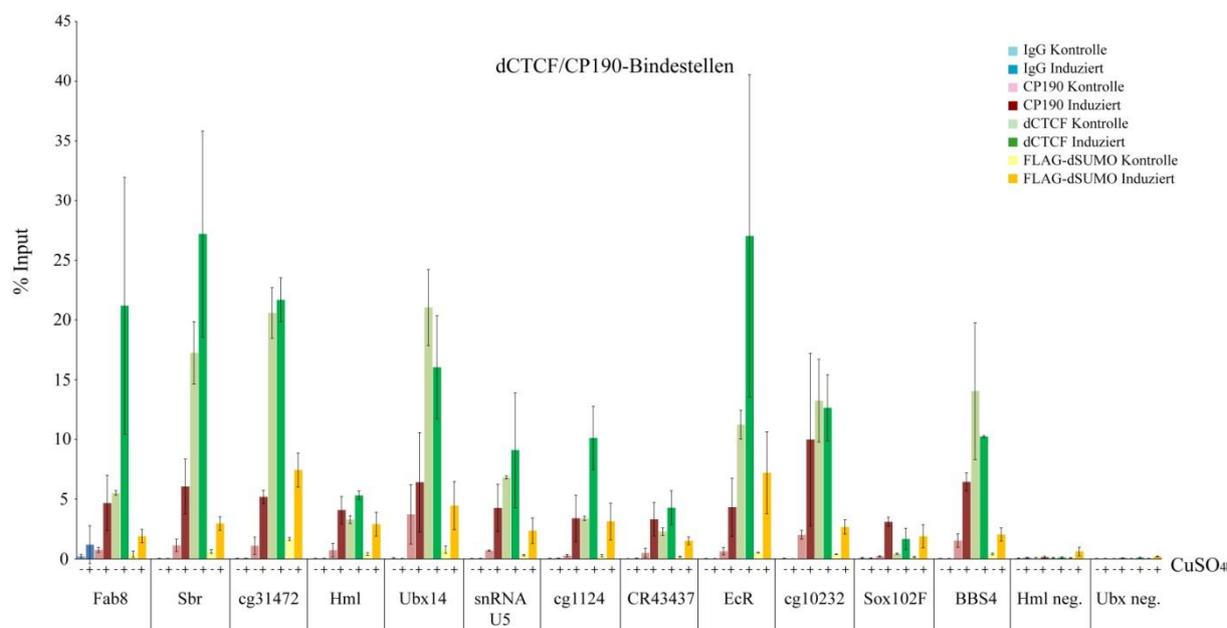


Abbildung 54: CP190 war signifikant an CTCF/CP190-Bindestellen angereichert, sobald FLAG-His-dSUMO exprimiert wurde. Ein ChIP wurde für die Ermittlung der CP190- (rot), dCTCF- (grün) und FLAG-His-dSUMO- (gelb) Anreicherung nach an spezifischen Bindestellen vor (- CuSO₄; Kontrolle) und nach (+ CuSO₄) Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden für dCTCF/CP190-Bindestellen untersucht. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet.

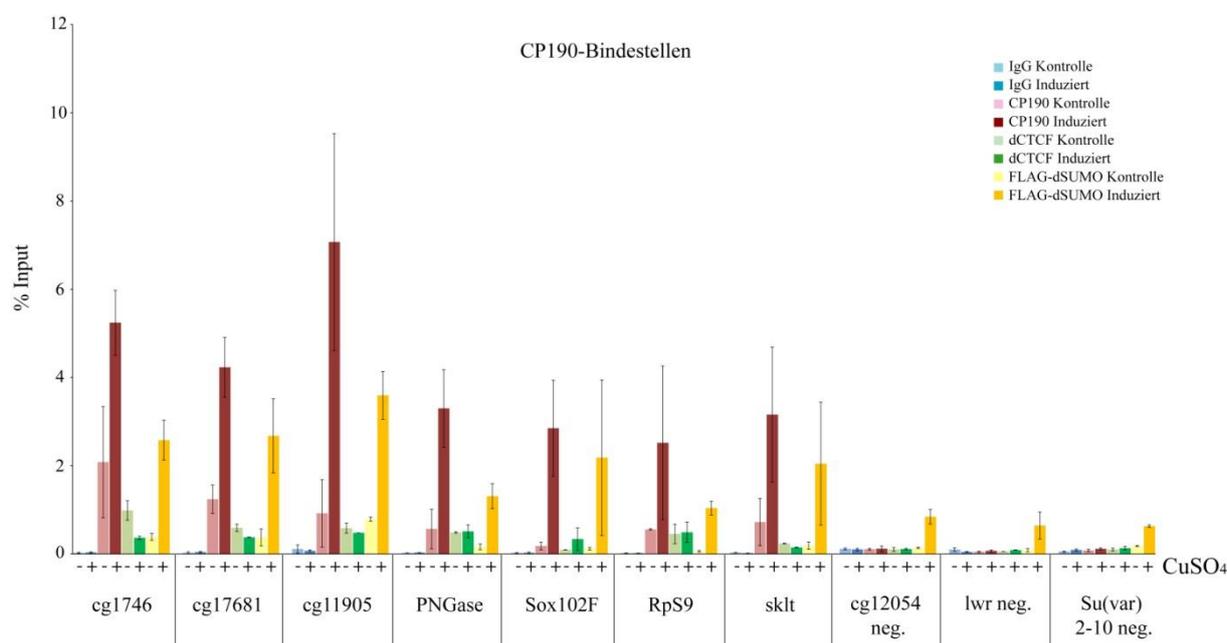


Abbildung 55: CP190 war signifikant an CP190 Bindestellen angereichert, sobald FLAG-His-dSUMO exprimiert wurde. Ein ChIP wurde für die Ermittlung der CP190- (rot), dCTCF- (grün) und FLAG-His-dSUMO- (gelb) Anreicherung nach an spezifischen Bindestellen vor (- CuSO₄; Kontrolle) und nach (+ CuSO₄) Induktion der FLAG-His-dSUMO-Expression durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Oligonukleotide für CP190-Bindestellen untersucht. Die Auswertung erfolgte im Bio-Rad CFX Manager und in Microsoft Excel. Die Anreicherung der Faktoren wurde anhand einer Standardkurve für den Input in % berechnet.

6. Literatur

1. Arnold R, Mäuseler W, Bassili G, Lutz M, Burke LJ, Epplen TJ, Renkawitz R. 2000. The insulator protein CTCF represses transcription on binding to the (gt)(22)(ga)(15) microsatellite in intron 2 of the HLA-DRB1(*):0401 gene. *Gene* 253: 209-214.
2. Awad TA, et al. 1999. Negative transcriptional regulation mediated by thyroid hormone response element 144 requires binding of the multivalent factor CTCF to a novel target DNA sequence. *J Biol Chem* 274: 27092-27098.
3. Azuma Y, Arnautov A, Dasso M. 2003. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* 163: 477-487.
4. Baniahmad A, Steiner C, Köhne AC, Renkawitz R. 1990. Modular Structure of a Chicken Lysozyme Silencer: Involvement of an Unusual Thyroid Hormon Receptor binding site. *Cell* 61: 505-514.
5. Bartkuhn M, Straub T, Herold M, Herrmann M, Rathke C, Saumweber H, Gilfillan GD, Becker PB, Renkawitz R. 2009. Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EMBO J* 28: 877-888.
6. Bártová E, Krejci J, Harnicarova A, Galiova G, Kozubek S. 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56: 711-721.
7. Bell AC, Felsenfeld G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405: 482-485.
8. Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 1999. The Protein CTCF Is Required for the Enhancer Blocking Activity of Vertebrate Insulators. *Cell* 98: 387-396.
9. Belozerov VE, Majumder P, Shen P, Cai HN. 2003. A novel boundary element may facilitate independent gene regulation in the Antennapedia complex of *Drosophila*. *EMBO J* 22: 3113-3121.
10. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2009. GenBank. *Nucleic Acids Res* 37: D26-31.
11. Bhaskar V, Smith M, Courey AJ. 2002. Conjugation of Smt3 to Dorsal May Potentiate the *Drosophila* Immune Response. *Mol Cell Biol* 22: 492-504.
12. Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*: 1513-1523.
13. Bohla D, et al. 2014. A functional insulator screen identifies NURF and dREAM components to be required for enhancer-blocking. *PLoS One* 9: e107765.
14. Boyle AP, Song L, Lee BK, London D, Keefe D, Birney E, Iyer VR, Crawford GE, Furey TS. 2011. High-resolution genome-wide in vivo footprinting of diverse transcription factors in human cells. *Genome Res* 21: 456-464.

15. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*: 248-254.
16. Burcin M, Arnold R, Lutz M, Kaiser B, Runge D, Lottspeich F, Filippova G, Lobanenko V, Renkawitz R. 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. *Molecular and Cellular Biology* 17: 1281-1288.
17. Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112: 195-203.
18. Bushey AM, Ramos E, Corces VG. 2009. Three subclasses of a *Drosophila* insulator show distinct and cell type-specific genomic distributions. *Genes Dev* 23: 1338-1350.
19. Capelson M, Corces VG. 2006. SUMO conjugation attenuates the activity of the gypsy chromatin insulator. *The EMBO Journal* 25: 1906-1914.
20. Chan HYE, Warrick JM, Andriola I, Merry D, N.M. B. 2002. Genetic modulation of polyglutamine toxicity by protein conjugation pathways in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics* 23: 2895-2904.
21. Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee J. 2002. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science* 295: 345-347.
22. Chung HR, Lohr U, Jackle H. 2007. Lineage-specific expansion of the zinc finger associated domain ZAD. *Mol Biol Evol* 24: 1934-1943.
23. Chung HR, Schäfer U, Jäckle H, Böhm S. 2002. Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C2H2 zinc-finger genes in *Drosophila*. *EMBO Rep* 3: 1158-1162.
24. Clemens JC, Worby CA, Simonson-Leff N, Muda M, Maehama T, Hemmings BA, Dixon JE. 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6499-6503.
25. Cuartero S, Fresan U, Reina O, Planet E, Espinas ML. 2014. Ibf1 and Ibf2 are novel CP190-interacting proteins required for insulator function. *EMBO J* 33: 637-647.
26. DeMare LE, Leng J, Cotney J, Reilly SK, Yin J, Sarro R, Noonan JP. 2013. The genomic landscape of cohesin-associated chromatin interactions. *Genome Res* 23: 1224-1234.
27. Dhall A, Wei S, Fierz B, Woodcock CL, Lee TH, Chatterjee C. 2014. Sumoylated human histone H4 prevents chromatin compaction by inhibiting long-range internucleosomal interactions. *J Biol Chem* 289: 33827-33837.
28. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485: 376-380.

29. Dubois-Chevalier J, Staels B, Lefebvre P, Eeckhoutte J. 2015. The ubiquitous transcription factor CTCF promotes lineage-specific epigenomic remodeling and establishment of transcriptional networks driving cell differentiation. *Nucleus* 6: 15-18.
30. Eberharter A, Becker PB. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3: 224-229.
31. Egger G, Liang G, Asparicio A, Jones PA. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457-463.
32. Ernst J, Kellis M. 2010. Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol* 28: 817-825.
33. Ernst J, et al. 2011. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 473: 43-49.
34. Farrar D, Rai S, Chernukhin I, Jagodic M, Ito Y, Yamine S, Ohlsson R, Murrell A, Klenova E. 2010. Mutational analysis of the poly(ADP-ribosylation) sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosylation). *Mol Cell Biol* 30: 1199-1216.
35. Feng X, Grossman R, Stein L. 2011. PeakRanger: A cloud-enabled peak caller for ChIP-seq data.pdf. *BMC Bioinformatics* 12: 1471-2105.
36. Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS. 2004. Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Nature* 303: 238-241.
37. Filippova G, Lindblom A, Meincke LJ, Klenova E, Neiman PE, Collins SJ, Doggett NA, Lobanekov V. 1998. A Widely Expressed Transcription Factor With Multiple DNA Sequence Specificity, CTCF, Is Localized at Chromosome Segment 16q22.1 Within One of the Smallest Regions of Overlap for Common Deletions in Breast and Prostate Cancers. *Genes, Chromosomes & Cancer* 22: 26-36.
38. Filippova G, et al. 2002. Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Research* 62.
39. Filippova GN, Thienes CP, Penn BH, Cho DH, Hu YJ, Moore JM, Klesert TR, Lobanekov VV, Tapscott SJ. 2001. CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet* 28: 335-343.
40. Franco MM, Prickett AR, Oakey RJ. 2014. The role of CCCTC-binding factor (CTCF) in genomic imprinting, development, and reproduction. *Biol Reprod* 91: 125.
41. Gareau JR, Lima CD. 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861-871.
42. Gaszner M, Vazquez J, Schedl P. 1999. The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes & Development* 13: 2098-2107.

43. Gdula DA, Corces VG. 1996. Characterization of functional domains of the su(Hw) protein that mediate the silencing effect of mod(mdg4) mutations. *Genetics Society of America* 145: 153-161.
44. Gdula DA, Gerasimova TI, Corces VG. 1996. Genetic and molecular analysis of the gypsy chromatin insulator of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9378-9383.
45. Gerasimova TI, Corces VG. 1998. Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* 92: 511-521.
46. Gerasimova TI, Byrd K, Corces VG. 2000. A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Molecular Cell* 6: 1025-1035.
47. Gerasimova TI, Lei EP, Bushey AM, Corces VG. 2007. Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *Mol Cell* 28: 761-772.
48. Gerasimova TI, Gdula DA, Gerasimov DV, Simonova O, Corces VG. 1995. A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell* 82: 587-597.
49. Geyer PK. 1997. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 242-248.
50. Geyer PK, Corces VG. 1992. DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes & Development* 6: 1865-1873.
51. Geyer PK, Clark I. 2002. Protecting against promiscuity the regulatory role of insulators. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 2112-2127.
52. Giresi PG, Kim J, McDaniel RM, Iyer VR, Lieb JD. 2007. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res* 17: 877-885.
53. Golovnin A, Volkov I, Georgiev P. 2012. SUMO conjugation is required for the assembly of *Drosophila* Su(Hw) and Mod(mdg4) into insulator bodies that facilitate insulator complex formation. *J Cell Sci* 125: 2064-2074.
54. Golovnin A, Melnikova L, Volkov I, Kostuchenko M, Galkin AV, Georgiev P. 2008. 'Insulator bodies' are aggregates of proteins but not of insulators. *EMBO Rep* 9: 440-445.
55. Gomez-Diaz E, Corces VG. 2014. Architectural proteins: regulators of 3D genome organization in cell fate. *Trends Cell Biol* 24: 703-711.
56. Gonzalez I, Mateos-Langerak J, Thomas A, Cheutin T, Cavalli G. 2014. Identification of regulators of the three-dimensional polycomb organization by a microscopy-based genome-wide RNAi screen. *Mol Cell* 54: 485-499.
57. Gould AP, Brookman JJ, Strutt DI, White RA. 1990. Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *Nature* 348: 308-312.
58. Grewal SIS, Elgin SCR. 2002. Heterochromatin new possibilities for the inheritance of structure. *Current Opinion in Genetics and Development* 12: 178-187.

59. Guo Y, Monahan K, Wu H, Gertz J, Varley KE, Li W, Myers RM, Maniatis T, Wu Q. 2012. CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin alpha promoter choice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 21081-21086.
60. Hagstrom K, Muller M, Schedl P. 1996. Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. *Genes & Development* 10: 3202-3215.
61. Hamilton AT, Huntley S, Kim J, Branscomb E, Stubbs L. 2003. Lineage-specific Expansion of KRAB Zinc-finger Transcription Factor Genes: Implications for the Evolution of Vertebrate Regulatory Networks *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 68: 131-140.
62. Hanahan D. 1983. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
63. Hansen JC. 2012. Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *EMBO J* 31: 1621-1623.
64. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405: 486-489.
65. Hart CM, Zhao K, Laemmli UK. 1997. The scs' boundary element characterization of boundary element-associated factors. *Molecular and Cellular Biology* 17: 999-1009.
66. Hay RT. 2005. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18: 1-12.
67. Heidari N, Phanstiel DH, He C, Grubert F, Jahanbani F, Kasowski M, Zhang MQ, Snyder MP. 2014. Genome-wide map of regulatory interactions in the human genome. *Genome Res* 24: 1905-1917.
68. Herold M, Bartkuhn M, Renkawitz R. 2012. CTCF: insights into insulator function during development. *Development* 139: 1045-1057.
69. Heseding C, Saumweber H, Rathke C, Ehrenhofer-Murray AE. 2016. Widespread colocalization of the *Drosophila* histone acetyltransferase homolog MYST5 with DREF and insulator proteins at active genes. *Chromosoma*.
70. Holohan EE, Kwong C, Adryan B, Bartkuhn M, Herold M, Renkawitz R, Russell S, White R. 2007. CTCF genomic binding sites in *Drosophila* and the organisation of the bithorax complex. *PLoS Genet* 3: e112.
71. Holwerda SJ, de Laat W. 2013. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20120369.
72. Hou C, Zhao H, Tanimoto K, Dean A. 2008. CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20398-20403.
73. Jackson SP, Durocher D. 2013. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell* 49: 795-807.

74. Kamakaka RT, Biggins S. 2002. Histon variants: deviants? *Genes & Development* 19: 295-301.
75. Kanduri C, Kanduri M, Liu L, Thakur N, Pfeifer S, Ohlsson R. 2002. The kinetics of deregulation of expression by de novo methylation of the h19 imprinting control region in cancer cells. *Cancer Research* 62: 4545-4548.
76. Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, Ohlsson R, Lobanenkov V. 2000. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Current Biology* 10: 853-856.
77. Kellum R, Schedl P. 1991. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64: 941-950.
78. Kharchenko PV, et al. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471: 480-485.
79. Kiss P, Szabo A, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradzsky KF, Lipinszki Z, Pal M, Udvardy A. 2005. Zn²⁺-induced reversible dissociation of subunit Rpn10/p54 of the *Drosophila* 26 S proteasome. *Biochem J* 391: 301-310.
80. Kitchen NS, Schoenherr CJ. 2010. Sumoylation modulates a domain in CTCF that activates transcription and decondenses chromatin. *J Cell Biochem* 111: 665-675.
81. Klenova E, Nicolas RH, Paterson H, Carne AF, Heath CM, Goodwin GH, Neiman PE, Lobanenkov V. 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: 7612-7624.
82. Korenjak M, Kwon E, Morris RT, Anderssen E, Amzallag A, Ramaswamy S, Dyson NJ. 2014. dREAM co-operates with insulator-binding proteins and regulates expression at divergently paired genes. *Nucleic Acids Res* 42: 8939-8953.
83. Krystel J, Ayyanathan K. 2013. Global analysis of target genes of 21 members of the ZAD transcription factor family in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 512: 373-382.
84. Kyrchanova O, Toshchakov S, Parshikov A, Georgiev P. 2007. Study of the functional interaction between Mcp insulators from the *Drosophila* bithorax complex: effects of insulator pairing on enhancer-promoter communication. *Mol Cell Biol* 27: 3035-3043.
85. Kyrchanova O, Ivlieva T, Toshchakov S, Parshikov A, Maksimenko O, Georgiev P. 2011. Selective interactions of boundaries with upstream region of Abd-B promoter in *Drosophila* bithorax complex and role of dCTCF in this process. *Nucleic Acids Res* 39: 3042-3052.
86. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
87. Langmead B. 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 11: Unit 11 17.

88. Laundrie B, Peterson JS, Baum JS, Chang JC, Fileppo D, Thompson SR, McCall K. 2003. Germline cell death is inhibited by P-element insertions disrupting the *dcp-1/pita* nested gene pair in *Drosophila*. *Genetics Society of America* 165: 1881-1888.
89. Liang J, et al. 2014. Chromatin immunoprecipitation indirect peaks highlight long-range interactions of insulator proteins and Pol II pausing. *Mol Cell* 53: 672-681.
90. Lim SJ, Boyle PJ, Chinen M, Dale RK, Lei EP. 2013. Genome-wide localization of exosome components to active promoters and chromatin insulators in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 41: 2963-2980.
91. Lobanenkov V, Nicolas RH, Adler VV, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja AV, Goodwin GH. 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: 1743-1753.
92. Lutz M, Baniahmad A, Renkawitz R. 2000a. Modulation of thyroid hormone receptor silencing function by co-repressors and a synergizing transcription factor. *Biochemical Society Transactions* 28: 386-390.
93. Lutz M, et al. 2000b. Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 28: 1707-1713.
94. Machanick P, Bailey TL. 2011. MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27: 1696-1697.
95. MacPherson MJ, Beatty LG, Zhou W, Du M, Sadowski PD. 2009. The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO. *Mol Cell Biol* 29: 714-725.
96. Maeda RK, Karch F. 2007. Making connections: boundaries and insulators in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 17: 394-399.
97. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. 1997. A Small Ubiquitin-Related Polypeptide Involved in Targeting RanGAP1 to Nuclear Pore Complex Protein RanBP2. *Cell* 88: 97-107.
98. Maksimenko O, et al. 2015. Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome Res* 25: 89-99.
99. Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, Tatham MH, Hay RT, Lamond AI, Mann M, Vertegaal AC. 2008. In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* 7: 132-144.
100. Mersfelder EL, Parthun MR. 2006. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res* 34: 2653-2662.
101. Mohan M, et al. 2007. The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *The EMBO Journal* 26: 4203-4214.
102. Moon H, et al. 2005. CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep* 6: 165-170.

103. Mukhopadhyay D, Dasso M. 2007. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* 32: 286-295.
104. Muller HJ, Altenburg E. 1930. The Frequency of Translocations produced by x-Ray in *Drosophila*. *Genetics* 15: 283-311.
105. Muller M, Hagstrom K, Gyurkovics H, Pirrotta V, Schedl P. 1999. The mcp element from the *Drosophila melanogaster* bithorax complex mediates long-distance regulatory interactions. *Genetics Society of America* 153: 1333-1356.
106. Narendra V, Rocha PP, An D, Raviram R, Skok JA, Mazzoni EO, Reinberg D. 2015. CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation. *Science* 347: 1017-1021.
107. Nègre N, et al. 2010. A Comprehensive Map of Insulator Elements for the *Drosophila* Genome. *PLoS Genetics* 6: 1-13.
108. Nie M, Xie Y, Loo JA, Courey AJ. 2009. Genetic and proteomic evidence for roles of *Drosophila* SUMO in cell cycle control, Ras signaling, and early pattern formation. *PLoS One* 4: e5905.
109. Nie Z, et al. 2003. Novel SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes Contain a Mixed-Lineage Leukemia Chromosomal Translocation Partner. *Mol Cell Biol* 23: 2942-2952.
110. Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanikov V. 2001. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genetics* 17: 520-527.
111. Ohtsuki S, Levine M. 1998. GAGA mediates the enhancer blocking activity of the eve promoter in the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* 12: 3325-3330.
112. Ong CT, Van Bortle K, Ramos E, Corces VG. 2013. Poly(ADP-ribosyl)ation regulates insulator function and intrachromosomal interactions in *Drosophila*. *Cell* 155: 148-159.
113. Orlando V, Strutt H, Paro R. 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* 11: 205 – 221.
114. Page AR, et al. 2005. Spotted-dick, a zinc-finger protein of *Drosophila* required for expression of Orc4 and S phase. *The EMBO Journal* 24: 4304-4315.
115. Pai CY, Lei EP, Ghosh D, Corces VG. 2004. The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Mol Cell* 16: 737-748.
116. Parelho V, et al. 2008. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132: 422-433.
117. Pérez-Juste G, García-Silva S, Aranda A. 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: 1307-1314.
118. Phillips-Cremins Jennifer E, Corces Victor G. 2013. Chromatin Insulators: Linking Genome Organization to Cellular Function. *Mol Cell* 50: 461-474.

119. Phillips-Cremins JE, et al. 2013. Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment. *Cell* 153: 1281-1295.
120. Phillips JE, Corces VG. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137: 1194-1211.
121. Raab JR, Kamakaka RT. 2010. Insulators and promoters: closer than we think. *Nat Rev Genet* 11: 439-446.
122. Raab JR, Chiu J, Zhu J, Katzman S, Kurukuti S, Wade PA, Haussler D, Kamakaka RT. 2012. Human tRNA genes function as chromatin insulators. *EMBO J* 31: 330-350.
123. Ren J, Gao X, Jin C, Zhu M, Wang X, Shaw A, Wen L, Yao X, Xue Y. 2009. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics* 9: 3409-3412.
124. Roy S, Tan YY, Hart CM. 2007a. A genetic screen supports a broad role for the *Drosophila* insulator proteins BEAF-32A and BEAF-32B in maintaining patterns of gene expression. *Mol Genet Genomics* 277: 273-286.
125. Roy S, Gilbert MK, Hart CM. 2007b. Characterization of BEAF mutations isolated by homologous recombination in *Drosophila*. *Genetics* 176: 801-813.
126. Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, Distèche CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A. 2008. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8309-8314.
127. Saitoh N, Bell AC, Recillas-Targa F, West AG, Simpson M, Pikaart M, Felsenfeld G. 2000. Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken β -globin domain. *EMBO J* 19: 2315-2322.
128. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. . Pages 17–18 in Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds. New York: Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.
129. Sarge KD, Park-Sarge OK. 2009. Detection of proteins sumoylated in vivo and in vitro. *Methods Mol Biol* 590: 265-277.
130. Schlissel MS. 2003. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol* 3: 890-899.
131. Schneider I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 27: 353-365.
132. Schoborg T, Rickels R, Barrios J, Labrador M. 2013. Chromatin insulator bodies are nuclear structures that form in response to osmotic stress and cell death. *J Cell Biol* 202: 261-276.
133. Schwartz YB, et al. 2012a. Nature and function of insulator protein binding sites in the *Drosophila* genome. *Genome Res* 22: 2188-2198.
134. Schweinsberg S. 2004. The Enhancer-Blocking Activity of the Fab-7 Boundary From the *Drosophila* Bithorax Complex Requires GAGA-Factor-Binding Sites. *Genetics* 168: 1371-1384.

135. Siebring-van Olst E, Vermeulen C, de Menezes RX, Howell M, Smit EF, van Beusechem VW. 2013. Affordable luciferase reporter assay for cell-based high-throughput screening. *J Biomol Screen* 18: 453-461.
136. Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, Lieb JD. 2012. Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc* 7: 256-267.
137. Shin H, Liu T, Manrai AK, Liu XS. 2009. CEAS: cis-regulatory element annotation system. *Bioinformatics* 25: 2605-2606.
138. Sleutels F, et al. 2012. The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner. *Epigenetics Chromatin* 5: 8.
139. Solomon MJ, Varshavsky A. 1987. A nuclease-hypersensitive region forms de novo after chromosome replication. *Mol Cell Biol* 7: 3822-3825.
140. Splinter E, Heath H, Kooren J, Palstra RJ, Klous P, Grosveld F, Galjart N, de Laat W. 2006. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev* 20: 2349-2354.
141. Stedman W, Kang H, Lin S, Kissil JL, Bartolomei MS, Lieberman PM. 2008. Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19_Igf2 insulators. *The EMBO Journal* 27: 654-666.
142. Stielow B, Sapetschnig A, Kruger I, Kunert N, Brehm A, Boutros M, Suske G. 2008. Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Mol Cell* 29: 742-754.
143. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60-89.
144. Sun FL, Elgin SCR. 1999. Putting boundaries on silence. *Cell* 99: 459-462.
145. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. 2012. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 40: W478-483.
146. Teng S, Luo H, Wang L. 2012. Predicting protein sumoylation sites from sequence features. *Amino Acids* 43: 447-455.
147. The modENCODE Consortium , et al. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science* 330: 1787-1797.
148. Tommerup N, Vissing H. 1995. Isolation and Fine Mapping of 16 Novel Human Zinc Finger-Encoding cDNAs Identify Putative Candidate Genes for Developmental and Malignant Disorders. *Genomics* 27: 259-264.
149. Torrano V, et al. 2006. Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism. *J Cell Sci* 119: 1746-1759.

150. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24: 145-149.
151. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1989. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27: 495-501.
152. Trojer P, Reinberg D. 2007. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28: 1-13.
153. Udvardy A, Maine E, Schedl P. 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: 341-358.
154. Van Bortle K, Corces VG. 2012. Nuclear organization and genome function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 163-187.
155. Van Bortle K, Nichols MH, Li L, Ong CT, Takenaka N, Qin ZS, Corces VG. 2014. Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome Biol* 15: R82.
156. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3.
157. Vazquez J, Muller M, Pirrotta V, Sedat JW. 2006. The Mcp element mediates stable long-range chromosome-chromosome interactions in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 17: 2158-2165.
158. Vostrov AA, Quitschke WW. 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: 33353-33359.
159. Wan J, Subramonian D, Zhang XD. 2012. SUMOylation in control of accurate chromosome segregation during mitosis. *Current Protein and Peptide Science* 13: 467-481.
160. Weake VM, Workman JL. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29: 653-663.
161. Wei W, Yang P, Pang J, Zhang S, Wang Y, Wang MH, Dong Z, She JX, Wang CY. 2008. A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 454-459.
162. Wendt KS, et al. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451: 796-801.
163. Whitehouse I, Flaus A, Cairns BR, White MF, Workman JL, Owen-Hughes T. 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400: 784-787.

-
164. Yang Y, Quitschke WW, Vostrov AA, Brewer GJ. 1999. CTCF is essential for up-regulating expression from the amyloid precursor protein promoter during differentiation of primary hippocampal neurons. *J Neurochem* 73: 2286-2298.
 165. Yun C, Dasgupta R. 2014. Luciferase reporter assay in *Drosophila* and mammalian tissue culture cells. *Curr Protoc Chem Biol* 6: 7-23.
 166. Yusufzai TM, Felsenfeld G. 2004. The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8620-8624.
 167. Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G. 2004. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *mol Cell* 13: 291-298.
 168. Zhang Y. 2003. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & Development* 17: 2733-2740.
 169. Zhao K, Hart CM, Laemmli UK. 1995. Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell* 81: 879-889.

Danksagung

Nach einer so langen Zeit in der AG Renkawitz gibt es viele Menschen denen ich für ihre jahrelange Unterstützung Danken möchte! Dabei möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Arbeit im Labor und privat unterstützt haben und hoffe, dass ich keinen vergesse.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. R. Renkawitz, der mir die Anfertigung meiner Doktorarbeit in seinem Labor bzw. seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Auch danke ich für den wertvollen wissenschaftlichen Input während Seminaren und Besprechungen.

Prof. Dr. A. Brehm danke ich für die Zweitkorrektur meiner Doktorarbeit.

Außerdem danke ich besonders Dr. Marek Bardkuhn für seine Unterstützung im Bereich Bioinformatik, für das Lesen und Korrigieren meiner Arbeit und für die vielen, nützlichen Ratschläge und Gespräche zum Thema meiner Arbeit, während Seminaren und auch zwischendurch.

Zudem möchte ich Dr. Jörg Leers und Dr. Oliver „Ölle“ Weth für ihre Unterstützung während den Seminaren danken. Dr. Philipp Bergmaier danke ich vor allem für seine Hilfe mit dem FAIRE-Assay.

Den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern meines Labors 306 möchte ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Dr. Melanie Buxa und Nadine Müller bin ich außerdem sehr dankbar für ihre zuverlässige Unterstützung bei der Analyse der *Speckles* nach Smt3 *knock down*.

Dr. Martin Herold danke ich für die wertvollen Gespräche zu Methoden und Hilfe bei fachlichen Problemchen.

Leni Schäfer-Pfeifer gilt mein besonderer Dank. Meine „Labormutti“ hat mich immer tatkräftig bei der Arbeit in der Zellkultur, mit Puffern und bei der Plasmidpräparation unterstützt. Außerdem hatte sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte und ein paar Kekse für mich.

Den ehemaligen Doktorandinnen Dr. Dorte Bohla und Dr. Katharina Günter möchte ich auch für ihre Hilfe mit der Arbeit und schöne Kaffeepausen danken.

Zudem gilt mein Dank auch allen Mitgliedern des Labors von Prof. Dr. Reinhard Dammann (Dr. Antje Richter, Michelle Woods, Adriana Jimenez, Dr. Steffen Kiel, Sara Walesch,

Daniela Reif und Steffi Teschler) für nette Mittagspausen, gemeinsame Unternehmungen und fachliche Gespräche.

Anna Hergott und Angelika Kopka, unseren Sekretärinnen, danke ich für die Organisation von Meetings und dem Laboralltag. Genau so möchte ich mich bei Andreas Brück und Sonja Sahner für ihre Arbeit im Labor bedanken.

Außerdem danke ich Ramona Kirsch für ihre wertvolle Vorarbeit zum Thema Pita und ZIPIC. Hierbei möchte ich auch unseren russischen Kooperationspartnern der AG Georgiev danken. Eugenia Wagner, der AG Brehm aus Marburg, möchte ich für ihre Plasmid-Spende für die konstitutive Expression von FLAG-His-dSUMO danken.

Meiner Masterstudentin Meike K. Abraham danke ich für die Klonierung der induzierbaren Vektoren zur Expression von FLAG-His-dSUMO.

Ich danke euch allen für eine lustige Zeit mit vielen schönen Feiern im und außerhalb des Labors. Außerdem danke ich einigen, ganz besonders Adri, Steffen, MelB, Nadine, Dorte und Martin, für ihre wertvolle Freundschaft und Unterstützung, auch wenn ich manchmal echt nervig war.

Zuletzt danke ich meiner Familie, besonders Mama und Becci. Ihr musstet viel mit mir durch machen und habt immer zu mir gehalten, auch wenn ich manchmal zum kotzen war.

DANKE!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Gießen, Juli 2016