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

# Identifizierung der CTCFL-Bindestellen in NIH3T3-Zellen und

# **Einfluss der CTCFL-Expression auf die globale Genexpression**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

> vorgelegt von Sven Dienstbach Gießen, Februar 2012

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz2. Gutachter: Prof. Dr.Reinhard Dammann

1	Zu	sammenfassung / Abstract	1 -
	1 1	7	1
	1.1	Abstract	- 1 -
2	Fir	Jaitung	
	1/11	nenung	····· J
	2.1	Chromatin	1
	2.1	Regulation der Genaktivität	44 6
	2.2	Der multifunktionale Faktor CTCF	
	2.4	Das cancer-testis-Gen CTCFL ein paraloger Faktor von CTCF	
	2.5	CTCFL ist aus einer Duplikation von CTCF entstanden	
	2.6	Konkurrenz zwischen CTCF und CTCFL um Bindestellen im Genom	
	2.7	Einfluss von CTCFL auf die Transkription	
	2.8	Könnte CTCFL an der Entstehung von Krebs beteiligt sein?	
	2.9	Zielsetzung der Arbeit	19
3	Ma	iterial	
-			
	31	Geräte	21
	3.2	Verbrauchsmaterialien	22
	3.3	Chemikalien	22
	3.3.	Laborchemikalien	
	3.3.2	2 Chemikalien für die eukaryotische Zellkultur	
	3.3.3	3 Enzyme	
	3.3.4	4 DNA-Längenstandards	24
	3.3.5	5 Protein-Molekulargewichtsmarker	25
	3.3.0	6 Komplettsysteme	25
	3.4	Antibiotika	
	3.5	Plasmide	
	3.6	Antikörper	
	3.7	Oligonukleotidprimer	
	3.8	Zelllinien	
	3.8.	Bakterien	
	3.8.2	2 Eukaryotische Zelllinien	
	3.9	xSoftware	
4	Me	ethoden	
	4.1	Arbeiten mit DNA	
	4.1.	Aufbewahrung von DNA	30
	4.1.2	2 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässriger Lösung	
	4.1.	B Plasmidpräparation aus bakteriellen Zellen	
	4.1.4	4 DNA-Fällung	
	4.1.	5 Sequenzierung, Sequenzanalyse und -darstellung	
	4.1.0	<ul> <li>Enzymatische Modifikationen</li> <li>Delemenen Kettennenlich (DCD)</li> </ul>	
	4.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCK, polymerase chain reaction)	
	4.1.8	5 Keal-time PCK	
	4.1. / 1	DINA-AUTOINIgung aus Wassingen Losungen	
	4 2	Gelelektrophorese	40 Δ1
	•••	Gererenter opniore de	

4.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	41
4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
4.3 Arb	beiten mit RNA	43
4.3.1	RNA-Isolierung	43
4.3.2	Spektralphotometrische Analyse	44
4.3.3	Qualitätsbeurteilung der RNA	45
4.3.4	DNase-Verdau	45
4.3.5	cDNA-Synthese und RT-PCR	46
4.4 Arb	beiten mit Proteinen	46
4.4.1	Isolierung von Proteinen	46
4.4.2	Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung	47
4.4.3	Western Blot	48
4.4.4	Immunodetektion von Proteinen auf einer Trägermembran	48
4.4.5	Erneute Immunodetektion von Proteinen (Strippen)	50
4.5 Arb	beiten mit Bakterien	50
4.5.1	Vermehrung und Lagerung	50
4.5.2	Transformation mit Plasmid-DNA	50
4.6 Arb	beiten mit eukaryotischen Zelllinien	51
4.6.1	Kultur der Zellen	51
4.6.2	Bestimmung der Zellzahl	53
4.6.3	Lagerung (Einfrieren) und Auftauen der Zellen	53
4.6.4	<i>Tet-off</i> -System	54
4.6.5	Transiente Transfektion und stabile Integration von Plasmid-DNA	55
4.6.6	Anchorage independent growth (colony formation assay)	58
4.7 Ger	nexpressionsanalyse (expression profiling)	59
4.7.1	Microarray-Analyse	60
4.8 Unt	ersuchung von DNA-Protein-Interaktionen mittels	60
Chromatin-	Immunopräzipitation (ChIP)	60
4.8.1	Isolierung des Chromatins	61
4.8.2	Chromatin-Immunopräzipitation	61
4.8.3	ChIP-seq	63
4.8.4	Analyse der ChIP-Seq-Profile	64
<u>5</u> <u>Ergeb</u>	nisse	<u>. 65</u>
5.1 Klo	nierung verschiedener Maus-CTCFL und Mensch-CTCFL Vektoren	65
5.2 Tes	t verschiedener Antikörper zur Detektion von mCTCFL in Western Blots	67
5.2.1	CTCFL-Protein ist nach Transfektion in NIH3T3 und HEK 293-T im West	ern
Blot nac	hweisbar	67
5.2.2	CTCFL nach in-vitro-Translation nachweisbar	69
5.3 Her	stellung und Charakterisierung stabiler tet-off-CTCFL-Zelllinien	70
5.3.1	Herstellung stabiler humaner Zelllinien	71
5.3.4	Herstellung stabiler Maus-Zelllinien	73
5.4 Ger	nexpressionsanalyse nach CTCFL-Induktion	82
5.4.1	CTCFL-Expression führt zur Deregulation von 453 Genen	84
5.4.2	Deregulierung wurde in individuellen Experimenten verifiziert	87
5.4.3	Überexpression von GPR56 korreliert mit der Menge an CTCFL	89
5.4.4	Deregulation konnte auch in anderen Klonen belegt werden	90
5.4.5	Die Deregulation korreliert mit der CTCFL-Expression	91
5.5 Sov	vohl CTCF als auch CTCFL binden im Promotorbereich deregulierter Gene .	93
5.5.1	Nachweis der CTCFL- und CTCF-Präzipitation mittels real-time-PCR	93

5.5 K3	2 Über ChIP-Sequenzierung wurden die CTCF- und CTCFL-Binde 4 und NIH3T3-Zellen ermittelt	estellen in 96
<u>6</u> <u>Di</u>	skussion	
6.1	Klonierung verschiedener CTCEL Vektoren	104
6.2	Expression von CTCEL in hömetengetischen Zellen nach transionter L	Expression 104
6.2	CTCEL mPNA aber kein Protein in HEK 203 T Klon 21	107
0.J 6.4	Induzierbare CTCEL Expression in NIH3T3 Zellen	
0. <del>4</del> 6.4	1 CTCEL hat keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen	100
6.4	<ul> <li>Zeitlicher Verlauf der CTCFI -Induktion in Klon 34</li> </ul>	
6.4	3 CTCFL führt zur Deregulation zahlreicher Gene	
6.4	4 Biologische Bedeutung der Deregulation	113
6.4	5 Identifikation von CTCFL-Bindestellen mittels ChIP	116
6.4	6 Genomweite Identifikation von CTCFL-Bindestellen	117
6.4	7 CTCFL-Bindestellen in der Nähe deregulierter Gene	
6.5	Ausblick	
7 Li	teraturverzeichnis	125
<u>/</u> <u>L</u> 1		
<b>a</b>		
<u>8</u> <u>A</u>	hang	<u>136</u>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	
8.2	Klonierungsschemata verschiedener erstellter Vektoren	
8.3	Optimierung von jetPEI-Transfektion von THP-1 und RMB-3	
8.4	Stabil transfizierte NIH3T3-Klone mit eGFP-Signal	
8.5	Auswertung colony formation assay	
8.6	Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer	
<u>9</u> <u>Ei</u>	desstattliche Erklärung	146
<u>10 Da</u>	anksagung	<u>147</u>

# 1 Zusammenfassung / Abstract

### 1.1 Zusammenfassung

Die beiden Proteine CTCF und CTCFL weisen eine nahezu identische zentrale 11-Zinkfinger-Domäne auf, mit welcher sie in der Lage sind, an spezifische DNA-Sequenzen zu binden. Während CTCF in allen somatischen Zellen exprimiert wird, ist die Expression von CTCFL auf wenige Zelltypen in Testis-Gewebe beschränkt und kann ansonsten nur noch in Tumorgeweben und einigen Zelllinien in höherer Kopienzahl nachgewiesen werden. Für CTCF sind mehrere Funktionen (transkriptionelle Aktivierung oder Repression, X-Inaktivierung, *Imprinting*) und auch Interaktionspartner (z.B. Cohesin) bekannt. Die Funktionen von CTCFL sind hingegen weniger gut untersucht. Aufgrund der normalerweise strikten Trennung der Expression von CTCF und CTCFL, sowie einer identischen DNA-bindenden Zinkfinger-Region wird vermutet, dass beide Proteine im Falle gemeinsamer Expression um dieselben Bindestellen konkurrieren. Im Hinblick darauf wird auch diskutiert, ob gerade diese Konkurrenz indirekt durch eine Behinderung der natürlichen Funktionen von CTCF zur Entstehung von Tumoren führt.

Um die Funktionen von CTCFL sowie die Auswirkungen der Konkurrenz mit CTCF zu untersuchen, wurden NIH3T3-Klone mit induzierbarer CTCFL-Expression (*Tet-off-System*) hergestellt. Bei einer genomweiten Untersuchung in einem der Klone zeigten über 400 Gene nach der Induktion von CTCFL eine signifikante Deregulierung ihrer Expression. Diese konnte über individuelle PCR-Experimente (RT-PCR und *real-time*-PCR) für alle untersuchten Gene verifiziert und auch in weiteren Klonen nachgewiesen werden. Einige der deregulierten Gene spielen dabei eine wichtige Rolle während der Spermatogenese.

Die Identifizierung der Bindestellen von CTCFL und CTCF in dem für die Genexpressionsanalyse verwendeten Klon zeigte, dass die Bindung von CTCFL und CTCF überlappt. Eine Motivanalyse ergab ein fast identisches Bindemotiv für beide Proteine. CTCF und CTCFL erkennen somit tatsächlich dieselben DNA-Sequenzen. An einigen Bindestellen wurde sogar eine Verminderung der CTCF-Bindung nach CTCFL-Induktion beobachtet. An diesen Stellen könnte es somit tatsächlich zu einer Konkurrenz zwischen CTCF und CTCFL kommen. Weiterhin konnte für mehr als die Hälfte der deregulierten Gene im Gen oder in gennahen Bereichen eine CTCFL-Bindestelle detektiert werden, so dass die Deregulation in diesen Fällen ein direkter Effekt der CTCFL-Bindung sein könnte.

## **1.2 Abstract**

The two proteins CTCF and CTCFL share a nearly identical central 11 zinc finger DNA binding domain. While CTCF is ubiquitously expressed in somatic cells, CTCFL is in general only transcribed in certain parts of the testes. However, expression outside of the testes was detected in various types of cancers. So far, several functions of CTCF, like transcriptional activation or repression, X chromosome inactivation and imprinting as well as interaction partners (e.g. Cohesin) are known. In contrast the functions of CTCFL are quite unclear and less well studied. Due to the mutually exclusive expression patterns of both proteins, together with the nearly identical 11 zinc finger DNA binding domain, it is thought, that if both proteins are expressed in the same cell, they may compete for the same binding sites. In this regard it is also questioned whether this competition might hinder the natural CTCF functions and thereby indirectly lead to the development of cancer.

To study the functions of CTCFL and the effects of its putative competition with CTCF, NIH3T3 clones with inducible CTCFL expression (Tet-off-system) were generated. In a genome wide study more than 400 genes showed a significant deregulation of their expression after induction of CTCFL in a selected clone. This effect was validated by individual experiments (RT-PCR and real-time PCR) for all genes which were tested. Additionally, the effect was detectable in other clones. Notably, some of the deregulated genes are known to play critical roles in spermatogenesis.

The identification of CTCF and CTCFL binding sites in the clone used for the gene expression study, showed a clear overlap between the binding sites of both proteins. Furthermore, the analysis of the binding motifs of CTCF and CTCFL revealed nearly identical DNA sequences both are therefore binding to the same sites. Some of the binding sites also showed a decrease of CTCF binding after induction and binding of CTCFL. At these sites it might be possible that a competition between the two proteins takes place. In Addition more than half of the deregulated genes possess a CTCFL binding site within the gene or in regions adjacent to the gene body. Hence, it is likely that the deregulation of these genes is a direct effect of the CTCFL binding.

## 2 Einleitung

Als vor gut 10 Jahren, im Februar 2001 in der Zeitschrift Nature der erste globale Überblick humanen Genomsequenz erschien (International Human Genome Sequencing zur Consortium, 2001), war dies ein großer Erfolg des Humangenomprojekts (HGP). Noch in derselben Woche veröffentlichte die Firma Celera Genomics ihre parallel zum HGP ermittelte humane Genomsequenz (Venter et al, 2001). Wenn auch die Qualität der ersten zugänglichen Genomsequenz noch zu wünschen übrigließ (nur 90% des Euchromatins abgedeckt, 250.000 Lücken und eine große Anzahl an Fehlern in der Nukleotidsequenz), so war dies im Jahre 2001 ein Meilenstein bezüglich der Sequenzierung ganzer Genome. Zu dieser Zeit waren bereits die Genome von 38 Bakterien, einem Pilz (Saccharomyces cerevisiae), zwei Invertebraten (Caenorhabditis elegans und Drosophila melanogaster) und einer Pflanze (Arabidopsis thaliana) bekannt. Alle diese Genome waren jedoch relativ klein, selbst zusammengenommen waren sie kleiner als das menschliche Genom (Lander, 2011). Schon kurze Zeit später wurde eine qualitativ deutlich bessere Genomsequenz (99,7% des Euchromatins, nur 300 Lücken und nur ein falsches Nukleotid pro 100.000 Basen) publiziert (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Die hohen Erwartungen bezüglich der Aufklärung von Erbkrankheiten und der Entwicklung neuer Medikamente erfüllten sich jedoch nur teilweise (Rivera and Bennett, 2010), da neben der Gensequenz vor allem die Regulation der Transkription eine entscheidende Rolle spielt (Felsenfeld and Groudine, 2003). Eine der interessantesten Erkenntnisse aus dem HGP war die Tatsache, dass eine (zumindest subjektiv) hohe Komplexität eines Organismus nicht automatisch auf eine hohe Anzahl an Genen schließen lässt (Rivera and Bennett, 2010). So sind aktuell knapp 21.000 Gene im humanen Genom bekannt (Clamp et al., 2007), frühere Schätzungen lagen dagegen bei 30.000 bis 100.000 Genen (Lander, 2011). Eines der überraschendsten Ergebnisse war, dass der größte Teil der konservierten und funktionellen Sequenzen (CNEs, conserved non-coding elements) nicht für Proteine kodieren. Bei einem Vergleich des Genoms von Mensch und Maus zeigte sich, dass etwa 6% des humanen Genoms über die letzten 100 Millionen Jahre stark konserviert wurden, Protein-kodierende Sequenzen machen aber nur etwa 1,5% des Genoms aus (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Die restlichen 4,5 % müssen somit eine wichtige Rolle außerhalb der Kodierung von Proteinen spielen. Zwar ist die Funktion der meisten CNEs noch immer ungeklärt, doch konnten verschiedene Klassen an funktionellen Elementen mit regulatorischen Funktionen identifiziert werden, darunter regulatorische Sequenzen in Promotoren, *enhancer*- und *silencer*-Elemente und Isolator-Sequenzen (Lander, 2011).

Die "Kontrolle über die Doppelhelix" (Felsenfeld and Groudine, 2003) rückt somit immer stärker in den Fokus der Genetik. Für die Differenzierung und die Entwicklung der Zellen vor allem höherer Organismen spielt die Regulation der Genaktivität eine große Rolle. Das Auftauchen komplexer, mehrzelliger Organismen ging einher mit einer deutlich höheren Komplexität der genregulatorischen Mechanismen (Levine and Tjian, 2003; Moore, 2005). Die Regulation der Genexpression findet dabei in eukaryotischen Zellen auf verschiedenen Ebenen statt, zu den am Besten untersuchten regulatorischen Mechanismen zählen dabei die transkriptionelle Regulation über Transkriptionsfaktoren und die post-transkriptionelle Regulation über microRNAs (Chen and Rajewsky, 2007).

Zusätzlich zu rein sequenzbasierten Regulationsmechanismen rückt die Analyse sogenannter epigenetischer Modifikationen zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Der Begriff Epigenetik wird bereits seit 1942 verwendet (Waddington, 1942), seitdem wurden zahlreiche teils stark abweichende Definitionen veröffentlicht. Generell bezieht sich Epigenetik auf chemische Veränderungen der DNA oder der assoziierten Histon-Proteine, welche die Struktur des Chromatins verändern und die Zugänglichkeit von DNA-Regionen beeinflussen, ohne die eigentliche DNA-Sequenz zu verändern. Zusätzlich sind diese Modifikationen stabil und können auch über Zellteilungen hinweg aufrechterhalten werden (Rivera and Bennett, 2010).

### 2.1 Chromatin

Nach der Identifizierung der DNA als die das Erbgut kodierende Substanz wurde lange Zeit die Theorie vertreten, dass die genetische Information ohne Proteine auskommt. Diese Sichtweise hat sich mittlerweile als zu einfach herausgestellt (Felsenfeld and Groudine, 2003). Zumindest in Organismen die einen Zellkern aufweisen, ist die DNA mit mindestens derselben Masse an Proteinen assoziiert (Kornberg, 1975). Der dabei geformte Komplex wird als Chromatin bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Genaktivität.

Die wichtigste strukturelle Proteinkomponente stellen die Histone dar. Diese kleinen, positiv geladenen und basischen Proteine bestehen aus einer globulären Domäne und einem N-terminalen *tail* ("Schwanz"). Sie lagern sich zu Oktameren zusammen, um welche anschließend die DNA (jeweils 165 bp) in zwei superhelikalen Windungen gewickelt wird, diese Struktur wird als Nukleosom bezeichnet (Abb. 1). Daraus resultiert eine 5 - 10 fache Kompaktierung der DNA (Kornberg, 1975). Jedes Nukleosom besteht aus je zwei der vier

Kern-Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Luger et al., 1997). Die um die Histone gewundene DNA ist zwar teilweise zugänglich, eine Verschiebung oder Entfernung des Nukleosoms erhöht die Zugänglichkeit jedoch deutlich. Neben der DNA sind außerdem die Amino-terminalen Schwänze der Histone gut zugänglich und können durch Enzyme chemisch modifiziert werden, wodurch beispielsweise die Verschiebung der Nukleosomen gefördert werden kann (Felsenfeld and Groudine, 2003). Die Art der jeweiligen Modifikation beeinflusst den Verpackungsgrad der DNA und zusätzlich auch die Bindung von Nicht-Histon-Proteinen. Letztere erkennen die Modifikationen der Histone, in diesem Zusammenhang wird daher auch vom Histon-Code gesprochen (Jenuwein and Allis, 2001). Nukleosomen können generell über drei verschiedene Arten verändert werden: Erstens durch speziell für diesen Zweck vorhandene Enzym-Komplexe (Becker and Horz, 2002), zweitens über kovalente Modifikationen der Histone (Zhang and Reinberg, 2001) und drittens durch Einbau spezieller Histon-Varianten anstelle der Kern-Histone (Ahmad and Henikoff, 2002; Redon et al., 2002; Smith, 2002). Die Verknüpfung der Nukleosomen erfolgt über die *Linker*-DNA, welche mit dem fünften bekannten Histon, H1, assoziiert ist (Abb. 1).



Abb. 1: Allgemeines Modell der Assoziation von Histonen und DNA in Nukleosomen. Links ist der generelle Aufbau der Histone aus je zwei der vier *Core*-Histon-Proteine gezeigt, welche sich zum Histon-Oktamer zusammenlagern. Aus diesem ragen die Schwänze der einzelnen Histone hervor und sind dadurch für Modifikationen leicht zugänglich. Verbunden werden die Nukleosomen untereinander durch das Histon H1. (Alberts et al., 2007).

Deutlich sichtbar wird das Chromatin nur während der Mitose in Form der Chromosomen, welche aus dicht spiralisierten Chromatinfasern bestehen. Bei Eintritt in die Interphase wird das Chromatin wieder entspiralisiert (Euchromatin). Einige Teile des Chromosoms bleiben aber verdichtet (Heterochromatin). Heterochromatische Regionen sind aufgrund ihres hohen Verpackungsgrades schwerer zugänglich und somit genetisch inaktiv (Weintraub and Groudine, 1976). Es wird dabei noch unterschieden zwischen konstitutivem Heterochromatin (Telomerbereiche, Centromere, hochrepetitive Sequenzen, praktisch nie exprimiert) und fakultativem Heterochromatin (inaktive Gene, inaktiviertes X-Chromosom, kann unter bestimmten Umständen exprimiert werden).

### 2.2 Regulation der Genaktivität

Wie bereits erwähnt spielt die Genregulation bei der Differenzierung und Entwicklung von Zellen höherer Organismen eine wichtige Rolle. Sie erfolgt in eukaryotischen Organismen auf verschiedenen Ebenen. Einige der wichtigsten Mechanismen werden im Folgenden detaillierter beschrieben.

#### Genregulation über Transkription

Am intensivsten wurde die Regulation auf Ebene der Transkription untersucht. Dabei ist die Initiation der Transkription zwar der notwendige erste Schritt in der Genexpression, jedoch bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass die transkriptionelle Regulation den größten Effekt auf die spätere Konzentration des aktiven Genprodukts aufweist (Chen and Rajewsky, 2007). In erster Linie werden auf dieser Ebene Häufigkeit und Effizienz der Transkription eines Gens kontrolliert. Dies geschieht durch die Bindung von generellen und spezifischen Transkriptionsfaktoren und der daran anschließenden Rekrutierung der RNA-Polymerase II. Dabei ist die Bindung der Transkriptionsfaktoren auch abhängig vom Chromatinstatus in der jeweiligen Genregion.

#### **Genregulation auf Chromatinebene**

Regulatorische Signale treffen im Zellkern streng genommen nicht auf die DNA, sondern auf Chromatin, und in den meisten Fällen ist die Stärke der resultierenden Genexpression abhängig von Veränderungen der Chromatinstruktur. Der bereits erwähnte, auf kovalenten Modifikationen der freien Aminosäurereste in den Amino-terminalen Schwänzen der Histone beruhende, Histon-Code wirkt dabei auf andere Faktoren ein, welche diesen erkennen und interpretieren. Inaktives Chromatin zum Beispiel ist gekennzeichnet durch Hypoacetylierung und Trimethylierung bestimmter Lysinreste (z.B. H3K9, H3K27) sowie Methylierung von Argininresten. Aktives Chromatin zeichnet sich hingegen durch Acetylierung (z.B. H3K9, H4K8) sowie Di- und Trimethylierung bestimmter Lysinreste (z.B. H3K4, H3K36) aus (Schneider and Grosschedl, 2007). Neben Acetylierung und Methylierung spielen aber auch noch Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen und der Austausch von Kern-Histonen durch Histonvarianten (z.B. H2A.Z, CENP-A) eine große Rolle. Vor kurzem wurde als weitere Histonmodifikation die Crotonylierung von Lysinresten beschrieben (Tan et al., 2011), die Auswirkungen dieser Modifikation an den jeweils veränderten Lysinresten sind jedoch noch nicht bekannt. Zusätzlich zu den Histonen kann auch die DNA selbst modifiziert werden. So kann die Methylierung von Cytosin in CpG-Inseln im Pomotorbereich zur Inaktivierung der Genexpression führen indem die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert wird. Vor zwei Jahren wurde außerdem eine weitere Modifikation von Cytosin wiederentdeckt, das 5-Hydroxymethylcytosin (Kriaucionis and Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009; Wyatt and Cohen, 1952), dessen genaue Funktion jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist.

#### Isolatoren

Zu den *cis*-regulatorischen Elementen gehören die *enhancer*, welche die Expression von Genen positiv beeinflussen. Zugrunde liegt dieser Aktivierung die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, welche letztlich in die Bildung des Transkriptionskomplexes mündet. *enhancer* zeichnen sich dadurch aus, dass sie auch auf weit entfernte Gene wirken können, wobei die Wirkung der *enhancer* zusätzlich Zelltyp-spezifisch erfolgt (Heintzman et al., 2009). Das Gegenstück sind die negativ auf die Genexpression wirkenden *silencer*.

Um sicherzustellen, dass bei der Wirkung auf weit entfernte Gene nicht auch andere Gene beeinflusst werden, ist eine Abschirmung letzterer nötig. Dies geschieht über sogenannte Isolatorelemente, welche auf diese Weise funktionelle Abschnitte im Genom errichten. Das Isolatorelement liegt dabei zwischen dem Promotor und dem *enhancer*. In Invertebraten ist eine Reihe von isolatorbindenden Proteinen bekannt, in Vertebraten ist jedoch in diesem Zusammenhang bisher nur das Protein CTCF identifiziert worden (Bell et al., 1999).

Zusätzlich können Isolatorelemente auch eine Barriere-Funktion haben. Sie dient dazu, die Ausbreitung von heterochromatischen Bereichen in transkriptionell aktive Bereiche zu verhindern. Diese kann zur Inaktivierung von Genen führen und liegt dem sogenannten Positionseffekt (*position effect variegation*) zugrunde, welcher darauf beruht, dass ein aktiver Genabschnitt durch Translokation am Rand eines heterochromatischen Bereichs lokalisiert und dadurch inaktiviert wird (Henikoff, 1992). Nach dem derzeit diskutierten Modell wird die Barriere durch aktives Einführen Euchromatin-spezifischer Histonmodifikationen errichtet (Gaszner and Felsenfeld, 2006), welche die ansonsten ungehindert verlaufende Ausbreitung des Heterochromatins verhindert (Bannister et al., 2001).

### 2.3 Der multifunktionale Faktor CTCF

1990 wurde der Faktor CTCF als Transkriptionsfaktor des *c-myc*-Gens (Lobanenkov et al., 1990) und des Lysozym-Gens in Hühnern (Baniahmad et al., 1990) entdeckt. Er besteht im Menschen aus 727 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 82 kDa (Li et al., 2004) und bindet unter anderem an die Sequenzen in welchen das Motiv CCCTC gehäuft zu finden ist, worauf die Bezeichnung CTCF (*CCCTC Binding Factor*) verweist. Die Bindung an DNA erfolgt über eine 11-Zinkfinger-Domäne, wobei durch die Verwendung unterschiedlicher Zinkfinger variierende DNA-Sequenzen erkannt werden (Ohlsson et al., 2001). Die zentrale Zinkfinger-Domäne wird von einer N- und einer C-terminalen Domäne flankiert (Klenova et al., 2002).



**Abb. 2:** Aminosäuresequenz von CTCF mit der zentralen 11-Zinkfinger-Domäne und den flankierenden N- und C-terminalen Sequenzen. Durch Verwendung unterschiedlicher Kombinationen der Zinkfinger (site 1, 2 und 3) können unterschiedliche DNA-Sequenzen gebunden werden. (Klenova et al., 2002).

Bei der Suche nach CTCF in anderen Organismen konnte CTCF bisher in allen untersuchten mehrzelligen Organismen von *Drosophila melanogaster* bis zum Menschen in hochkonservierter Form gefunden werden (Burke et al., 2002; Filippova et al., 1996; Hore et al., 2008; Klenova et al., 1993; Moon et al., 2005; Pugacheva et al., 2006). In Säugern beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz 90%, innerhalb der Zinkfingerregion beträgt sie darüberhinaus zwischen Fischen, Fröschen, Vögeln und Säugetieren sogar annähernd 100% (Hore et al., 2008). Auch in Nematoden scheint CTCF zumindest in bestimmten Arten vorhanden zu sein, wurde aber wohl im Zuge der Evolution in einigen Vertretern nicht konserviert und ging verloren (Heger et al., 2009). Diese starke Konservierung zeigt sich auch darin, dass Huhn-CTCF an alle bekannten CTCF-Bindestellen in *Drosophila* bindet (Moon et al., 2005). Exprimiert wird CTCF praktisch ubiquitär, lediglich in primären Spermatocyten

(Loukinov et al., 2002) sowie in Ganglien und amakrinen Zellen der Säugetierretina (Canto-Soler et al., 2008) fehlt es. Allerdings wird das Fehlen in primären Spermatocyten mittlerweile in Frage gestellt (Sleutels et al., 2012, submitted for publication).

Die hohe artübergreifende Konservierung deutet auf eine grundlegende Funktion von CTCF hin. Die mittlerweile bekannten Funktionen sind vielfältig. CTCF spielt beispielsweise eine Rolle bei der X-Inaktivierung (Chao et al., 2002). Weiterhin ist CTCF in der epigenetischen Regulation involviert (Bell and Felsenfeld, 2000; Wallace and Felsenfeld, 2007). Am besten untersucht ist dieser Effekt im IGF2 (*insulin-like growth factor 2*)/H19-Genlocus (Abb. 3). In diesem ist die *imprinting*-Kontrollregion (ICR, *imprinting control region*) allelabhängig methyliert (paternales Allel) oder unmethyliert (maternales Allel). Neben den beiden Genen für IGF2 und H19 befindet sich außerdem ein auf beide Gene wirkender, stromabwärts vom H19-Gen gelegener *enhancer*. CTCF bindet nur an der ICR des unmethylierten maternalen Allels (Bell and Felsenfeld, 2000) und blockiert dadurch die Wirkung des *enhancers* auf den IGF2-Promotor. IGF2 vom maternalen Allel wird somit nicht exprimiert, aber H19. Auf dem paternalen Allel liegt die ICR methyliert vor (Kanduri et al., 2000) und CTCF bindet nicht, wodurch der *enhancer* auf den IGF2-Promotor wirken und die Expression des Gens aktivieren kann. Aufgrund der Methylierung der ICR wird H19 hingegen nicht gebildet (Abb. 3).



Abb. 3: Epigenetische Regulation des Igf2/H19-Lokus. CTCF bindet an der unmethylierten ICR im maternalen Allel und blockiert die Wirkung des *enhancers* auf den Promotor von IGF2, welches in der Folge nicht exprimiert wird. Im paternalen Allel ist die ICR methyliert und CTCF kann nicht binden. Die Wirkung des *enhancers* auf den IGF2-Promotor wird nicht blockiert. Aufgrund der Methylierung im Promotorbereich von H19 wird dessen Expression blockiert. ICR = *imprinting*-Kontrollregion (*imprinting control region*), E = enhancer, Q = maternales Allel,  $\mathcal{J} =$  paternales Allel.

Eine weitere wichtige Rolle spielt CTCF in der Tumorsuppression. Beispielsweise sind für einige Krebsarten Mutationen der CTCF-Bindestellen (CTS, *CTCF target sites*) identifiziert worden, die eine Bindung von CTCF verhindern (Filippova et al., 2002). CTCF selbst ist

außerdem im langen Arm von Chromosom 16 im Bereich der Bande 22.1 kodiert. Die Deletion dieser Region kann in vielen Tumoren beobachtet werden (Filippova et al., 1998). Eine Mikrodeletion im IGF2/H19-Lokus, durch welche drei CTCF-Bindestellen entfernt werden, führt zu einer biallelischen Expression von IGF2 und zur Entwicklung des Beckwith-Wiedemann-Syndroms mit assoziiertem Wilms'-Tumor (Prawitt et al., 2005), auch in diesem Fall könnte CTCF eine Rolle als Tumorsuppressor ausüben. Generell scheint CTCF eine reprimierende Funktion bei der Genexpression zu haben, beispielsweise befinden sich *trans*-Repressor-Module in den Exons 1 und 10. Transkriptionsinhibierend wirkt in CTCF die Zinkfingerregion sowie Abschnitte in den N- und C-terminalen Sequenzen, wobei bekannt ist, dass die N-terminal vermittelte Repression Zelltyp-spezifisch erfolgt (Filippova et al., 1996; Lutz et al., 2000).

Derzeit wird im sogenannten looping model postuliert, dass CTCF durch Bildung von Chromatinschleifen und Anheftung von Isolatorelementen an nukleäre Strukturen seine Funktion als enhancer-blocker ausübt. Beispielsweise konnte für die IGF2/H19-Region mittels 3C-Analysen (chromosome conformation *capture*) die Bildung einer CTCF-vermittelten Schleife zwischen der ICR und der DMR1 (differentially methylated region 1) gezeigt werden, welche für die Repression der IGF2-Expression verantwortlich sein könnte (Kurukuti et al., 2006). Weiterhin konnte für CTCF gezeigt werden, dass es außerdem an den meisten Bindestellen von Cohesin ebenfalls zu finden ist (Wendt et al., 2008). Cohesin ist nicht nur bei der Paarung von Schwester-Chromatiden während der Zellteilung wichtig, sondern spielt vermutlich auch eine Rolle bei der Genregulation in postmitotischen Zellen. So konnte gezeigt werden, dass Cohesin für die enhancer-Blockade von CTCF im IGF2/H19-Bereich benötigt wird (Wendt et al., 2008). Da Cohesin bei der Paarung der Schwester-Chromatiden zwei DNA-Moleküle verbindet, wird entsprechend postuliert, dass es zur Stabilisierung von Chromatinschleifen beitragen könnte. Nachgewiesen wurde dies bereits für CTCF-Bindestellen im humanen INFG (Interferon-γ)-Locus (Hadjur et al., 2009) sowie im IGF2/H19-Locus (Nativio et al., 2009).

### 2.4 Das cancer-testis-Gen CTCFL, ein paraloger Faktor von CTCF

Bei der Suche nach CTCF-bindenden Proteinen in nukleären Extrakten von Testis-Gewebe zeigte sich in Gelretardierungs-Experimenten (EMSA) eine geringere Mobilität eines DNA-Protein-Komplexes, von dessen DNA-Sequenz bekannt war, dass sie von CTCF gebunden wird (Loukinov et al., 2002). Bei dem Protein handelte es sich aber nicht um CTCF. Dies führte zur Vermutung, dass ein CTCF-ähnliches Protein dafür verantwortlich

sein könnte. Über PCR mit CTCF-spezifischen Oligonukleotiden und cDNA aus Testis-Gewebe sowie anschließender Sequenzierung von 100 Proben konnte in einer einzigen eine von CTCF abweichende Sequenz ermittelt werden. Das so entdeckte Gen wurde in der Region 20q13.2 lokalisiert und wies ebenfalls eine zentrale 11-Zinkfinger-Region auf, welche mit der von CTCF praktisch übereinstimmt (Abb. 4), es wurde daher mit den Kürzeln BORIS (*brother of regulator of imprinted sites*, also Bruder von CTCF) oder auch CTCFL (CTCF-*like*) bezeichnet. Es zeigte sich, dass auch die Intron-Exon-Übergänge zwischen CTCFL und Säugetier-CTCF in diesem Bereich übereinstimmen (Loukinov et al., 2002). Nachdem gezeigt wurde, dass die Intron-Exon-Übergänge zwischen Säugetier- und Vogel-CTCF nicht, wie zuvor angenommen (Klenova et al., 1998), voneinander abweichen (Hore et al., 2008), konnte diese Aussage auch auf Vogel-CTCF ausgedehnt werden.



Abb. 4: Übereinstimmung der Genstruktur (Exon-Intron-Übergänge) zwischen CTCF und CTCFL in der Zinkfinger-Domäne. Die 11 Zinkfinger sind in verschiedenen Farben dargestellt und sind teilweise auf zwei Exons kodiert. Deutlich sind die Unterschiede im Bereich der flankierenden N- und C-terminalen Sequenzen und die konservierten Intron-Exon-Übergänge im Bereich der Zinkfinger zu erkennen. (Hore et al., 2008).

Es wurde außerdem festgestellt, dass die Expression von CTCFL im Menschen normalerweise nur in primären Spermatocyten detektiert werden kann (Abb. 5 und Abb. 6), wohingegen CTCF in diesen Zellen nicht zu finden ist (Loukinov et al., 2002). Dabei wurde auch ermittelt, dass zwischen 10% und 30% von CTCFL im Kern lokalisert sind, der Rest befindet sich im Cytoplasma. Im Gegensatz dazu wird für CTCF nur eine Lokalisierung im Zellkern angegeben (Loukinov et al., 2002). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass CTCFL in allen Geweben exprimiert wird, jedoch in diesen Fällen nicht mehr als 0,3% der in Testis-Gewebe detektierten Menge erreicht werden. Eine Expression unter diesem Schwellenwert wird als biologisch nicht relevant angesehen (Kholmanskikh et al., 2008). In Testis kann die Expression von CTCFL 10% bis 100% der Expression des Vergleichsgens GAPDH erreichen (Hore et al., 2008).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Expressionsmusters von CTCFL während der Spermatogenese.** CTCFL exprimierende und 5-Methylcytosin (5-mC) negative Zellen sind pink dargestellt, in grün sind Zellen ohne CTCFL-Expression aber mit 5-mC gezeigt. Im oberen Teil sind die Stadien der *de novo* Methylierung und der CTCFL-Expression angegeben. (Nach Loukinov *et al*, 2002)

## 2.5 CTCFL ist aus einer Duplikation von CTCF entstanden

Aufgrund des Fehlens von CTCFL in Vögeln (Loukinov et al., 2002), der fehlerhaften Annahme einer abweichenden Genstruktur von CTCF in Vögeln verglichen mit Säugetieren und der Übereinstimmung von CTCF und CTCFL im Zinkfingerbereich wurde bereits früh vermutet, dass CTCFL aus einer Duplikation von CTCF hervorgegangen ist. Als Zeitpunkt wurde ein frühes Stadium in der Säugetier-Evolution angenommen (Klenova et al., 2002) und es wurde daher vermutet, CTCFL sei in Plazentatieren (Eutheria) und Beutelsäugern (Metatheria), nicht aber in Kloakentieren (Protheria) zu finden. In späteren Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass CTCFL nicht nur in Kloakentieren detektiert werden kann, sondern auch in einigen (aber nicht allen) Reptilien. Zwar konnte keine Expression von CTCFL in Fischen und Vögeln nachgewiesen werden, jedoch zeigte dies, dass CTCFL deutlich früher entstanden sein musste, als bisher vermutet. Eine Datenbank-basierte Suche zeigte dann auch, dass CTCFL ursprünglich auch in Vögeln bzw. deren Vorfahren vorhanden war, jedoch heute nur noch Reste der Sequenz zu finden sind (Hore et al., 2008). In derselben Veröffentlichung erfolgte auch ein genereller Vergleich der CTCFL-Sequenzen untereinander. Dieser zeigte, dass zwar die Zinkfinger-Region im Durchschnitt zu 80% konserviert vorliegt, die flankierenden Sequenzen sich jedoch deutlich unterscheiden (im Durchschnitt zu 35% konserviert). Selbst zwischen Maus- und Mensch-CTCFL besteht bezüglich der flankierenden N- und C-terminalen Sequenzen nur eine geringe Übereinstimmung mit einigen wenigen hochkonservierten Bereichen.

zwischen CTCF Aufgrund der Gemeinsamkeiten und CTCFL bezüglich der Zinkfinger-Region und der Unterschiede der C- und N-terminalen Sequenzen wurde vermutet, dass eventuell nur eine Duplikation der Zinkfinger stattgefunden haben könnte. Mittlerweile sind jedoch einige Indizien bekannt, welche für eine vollständige Duplikation sprechen. So kann eine CTCFL-flankierende Sequenz nahe der 20q13-Region mit einer CTCF-flankierenden Sequenz in der CTCF-Region 16q22 in Verbindung gebracht werden (human genome palogy map) (Loukinov et al., 2002; Popovici et al., 2001). Außerdem liegen am Ende der N- und C-terminalen Sequenzen zwischen CTCF und CTCFL konservierte Bereiche vor (Hore et al., 2008).

CTCFL ist anscheinend nur in Metatheria und Eutheria Testis-spezifisch, in Kloakentieren und Reptilien ist eine CTCFL-Expression auch in anderen Geweben zu detektieren (Expression über dem erwähnten 0,3%-Schwellenwert). Es wird vermutet, dass aufgrund der Genduplikation CTCF und CTCFL zu Beginn ihrer gemeinsamen Evolution bezüglich ihrer Expression gleich waren. Das hochkonservierte Protein CTCF konnte nun über seine Duplikation eine evolutive Veränderung erfahren, in deren Verlauf CTCFL nicht nur eine Veränderung der N- und C-terminalen Sequenzen erfuhr, sondern auch unter den Einfluss eines Testis-spezifischen Promotors gelangte. Die Beschränkung von CTCFL auf die Keimbahn scheint außerdem mit der evolutiven Entwicklung des *imprinting* einherzugehen (Abb. 6, Hore et al., 2008).



**Abb. 6: Evolution von CTCFL im Zuge einer Duplikation von CTCF.** Wichtige Schritte sind mit Sternen markiert. Gewebe welche eine Expression von CTCFL beziehungsweise CTCF zeigen, sind in den Abbildungen schwarz eingezeichnet, Gewebe ohne eine solche Expression sind weiß dargestellt. MYA = Millionen Jahre (*million years ago*). Verändert nach Hore et al., 2008.

Im humanen System sind mittlerweile auch eine Reihe von Isoformen beschrieben worden, deren Funktion und biologische Relevanz bisher aber weitgehend unbekannt sind (Pugacheva et al., 2010). Zusätzlich sind drei Promotoren (A, B und C) bekannt, welche jeweils auf unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte wirken und zu variierenden 5'-UTRs führen. Alle drei Promotoren spielen dabei eine Rolle bei der Aktivierung der CTCFL-Expression während der Spermatogenese (Renaud et al., 2007).

# 2.6 Konkurrenz zwischen CTCF und CTCFL um Bindestellen im Genom

Aufgrund der gemeinsamen 11-Zinkfinger-Region, welche für die Bindung an die DNA verantwortlich ist, wurde bereits früh vermutet, dass CTCF und CTCFL an dieselben Sequenzen binden können und bei gleichzeitiger Expression um diese Bindestellen konkurrieren. Da gleichzeitig die flankierenden Sequenzen beider Proteine große Unterschiede zeigen, wurde jedoch erwartet, dass zwar die Bindestellen identisch, die Funktion der beiden Proteine aber unterschiedlich oder gar gegensätzlich ist (Jelinic et al., 2006; Klenova et al., 2002). So wird für CTCFL, im Gegensatz zu CTCF, eine aktivierende Funktion bei der Genexpression angegeben (Filippova et al., 1996; Hong et al., 2005; Lutz et al., 2000; Vatolin et al., 2005). Allerdings wird auch diskutiert, ob aufgrund der unterschiedlichen flankierenden Sequenzen spezifische Co-Faktoren gebunden werden und somit auch die Bindung an unterschiedliche DNA-Sequenzen möglich ist, oder ob die Unterschiede Zinkfingerbereich doch geringen im nicht einen bestimmten Schlüsselunterschied darstellen, über welchen die Bindung an völlig verschiedene DNA-Sequenzen ermöglicht wird (Nguyen et al., 2008b). Dass es beim Bindemechanismus der beiden Proteine Unterschiede geben muss zeigt sich daran, dass CTCF nur an unmethylierten CTS bindet, wohingegen CTCFL sowohl an unmethylierten als auch an methylierten Bindestellen zu finden ist al., 2008b). (Nguyen et In Gelretardierungs-Experimenten beispielsweise bindet CTCF nur an unmethylierten DNA-Sequenzen, CTCFL hingegen bindet stark an methylierte DNA und schwach auch an unmethylierter DNA. Die unterschiedliche Bindung ist auch im IGF2/H19-Lokus zu beobachten. CTCF bindet im unmethylierten maternalen Allel, CTCFL hingegen bindet im methylierten paternalen Allel und schwach im maternalen Allel. Daraus wurde abgeleitet, dass bei gleichzeitigem Vorhandensein beider Proteine eine Konkurrenz um unmethylierte Bindestellen herrscht, an welchen CTCFL jedoch durch das stärker an diese Sequenzen bindende CTCF verdrängt wird (Nguyen et al., 2008b). Zusätzlich ist aber auch bekannt, dass CTCF selbst im Promotorbereich von CTCFL bindet und die Expression hemmt (Renaud et al., 2007). Die wichtigsten Bindestellen für CTCFL dürften somit bei methylierten Promotorsequenzen vorliegen. Interessanterweise liegt CTCFL im Hodengewebe nur in dem Teil der Spermatocyten vor, in welchem eine Reprogrammierung der Methylierungsmuster erfolgt (Loukinov et al., 2002).

Unterschiedliche Effekte von CTCF und CTCFL bei Bindung der gleichen Bindestelle wurden beispielsweise für das Gen BAG1 beschrieben. Es konnte dabei gezeigt werden, dass CTCF im Promotorbereich des Gens bindet, wenn ein niedriges Verhältnis zwischen H3K4me2 und H3K9me2 vorlag, in diesem Falle konnte eine durch CTCF ausgelöste verringerte BAG1-Expression beobachtet werden. Bei einem hohen Verhältnis zwischen beiden Histonmodifikationen hingegen konnte CTCFL im Promotorbereich binden und die Expression von BAG1 war erhöht (Sun et al., 2008).

Aufgrund der evolutiven Entwicklung von CTCFL aus einer Duplikation von CTCF kann vermutet werden, dass die Konkurrenz zwischen CTCF und CTCFL zumindest anfänglich nicht bestand und sich erst im Laufe der Veränderung der CTCFL-Sequenz entwickelte. Daraus könnte resultieren, dass CTCFL und CTCF in höheren Säugetieren normalerweise nicht zusammen exprimiert werden (Hore et al., 2008).

Die Tatsache, dass Zellen ohne CTCF-Expression sterben, die Spermatocyten jedoch kein CTCF aufweisen und trotzdem überleben, hat zur Vermutung geführt, dass CTCFL in den Spermatocyten nötig sein könnte, um zumindest einige spezielle Funktionen von CTCF in diesen Zellen aufrechtzuerhalten. Es wäre auch möglich, dass dieser Wechsel von CTCF zu CTCFL einige spezielle Funktionen in diesen Zellen (z.B. die Neuorganisation der Methylierung in diesen Zellen) erlaubt, welche in Anwesenheit von CTCF nicht möglich wären (Loukinov et al., 2002). Allerdings muss auch hier wiederum bedacht werden, dass neue Ergebnisse die strikte Trennung von CTCF und CTCFL in Spermatocyten in Frage stellen (Sleutels et al., 2012, submitted for publication).

### 2.7 Einfluss von CTCFL auf die Transkription

Mittlerweile sind einige Interaktionspartner von CTCFL bekannt. Neben SP1 (Kang et al., 2007) sind dies PRMT7 (Jelinic et al., 2006), die H3K4 Methyltransferase SET1A und der Co-Chaperone-Rekrutierer BAT3. Letztere können durch Bindung von CTCFL in den Promotorbereichen von Genen rekrutiert werden und dann zur Aktivierung der entsprechenden Gene führen (Nguyen et al., 2008a).

Ein funktioneller Zusammenhang der CTCFL-Expression mit der Expression anderer Gene konnte in mehreren Fällen hergestellt werden, welche im Folgenden ausführlicher beschrieben werden:

**MAGE-A1:** Das Gen MAGE-A1 (*Melanoma antigen family A, member 1*) gehört zur Gruppe der cancer-testis-Gene (CTA, cancer testis Antigens) und ist somit in einigen Krebsarten exprimiert. Die Expression von CTCFL führt laut Literaturangaben zur Aktivierung des Gens (Vatolin et al., 2005), allerdings wurde in den zugrunde liegenden Versuchen eine Behandlung der Zellen mit 5-AzadC (5-aza-2'-deoxycytidin) durchgeführt, einem global wirkenden Inhibitor der DNA-Methylierung. Diese führte zur Expression von CTCFL (aufgrund der Demethylierung des Promotors, (Woloszynska-Read et al., 2007)), welche ursächlich jedoch nicht zwangsläufig mit der Aktivierung von MAGE-A1 verbunden sein muss. Es könnte sich dabei auch um einen pleiotropen Effekt von 5-AzadC handeln (Karpf and Jones, 2002; Karpf et al., 2001). Auch ohne 5-AzadC durchgeführte Versuche mit Überexpression von CTCFL sollen über die Verdrängung von CTCF durch CTCFL von der Bindestelle im Promotor von MAGE-A1 zu einer Demethylierung des Promotors und einer Aktivierung von MAGE-A1 führen (Vatolin et al., 2005), jedoch werden auch diese Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen in Frage gestellt (Kholmanskikh et al., 2008). Vor kurzem wurde über knock-down-Experimente gezeigt, dass die Expression von CTCFL selbst nicht der Grund für die Aktivierung anderer CTAs und einer Hypomethylierung von Promotorbereichen ist (Woloszynska-Read et al., 2010). Die Aktivierung von MAGE-A1 und anderer CTAs erfolgt somit wie bereits vermutet wohl durch einen pleiotropen Effekt von 5-AzadC.

**ESR1 und PGR:** Zwischen der Expression der Gene ESR1 (*estrogen receptor 1*) und PGR (*progesterone receptor*) und der Expression von CTCFL besteht ein positiver Zusammenhang (D'Arcy et al., 2008). Über Luciferase-Reportersysteme konnte dabei nachgewiesen werden, dass die Promotoren der beiden Gene durch die Expression von CTCFL aktiviert werden und zu einer erhöhten Expression der Luciferase führten.

**BAG1:** In DNMT1<sup>-/-</sup> (*DNA methyl transferase*) und DNMT3<sup>-/-</sup> *knock-out*-Linien tritt eine Repression von Genen der BAG-Familie (*BCL-2-associated athanogene*, anti-apoptotische Wirkung) auf, wohingegen sie im Falle einer Überexpression der beiden Methyltransferasen eine erhöhte Expression zeigen. Detailliertere Untersuchungen zeigten, dass im Falle des *knock-out* der Promotorbereich des Gens unmethyliert vorliegt und von CTCF gebunden wird, was mit einer niedrigeren Expression von BAG1 einhergeht. Bei einer Überexpression der beiden Methyltransferasen jedoch kommt es zu einer Methylierung des BAG1-Promotors, wodurch CTCF nicht mehr binden kann. CTCFL bindet nun im methylierten Promotor und es kommt zu einer Erhöhung der Genexpression, wobei der Effekt von CTCFL mittels Behandlung mit spezifischer shRNA bestätigt wurde (Sun et al., 2008).

**NY-ESO-1:** Ein weiteres CTA, für welches ein ähnlicher Zusammenhang der Aktivierung mit der Expression von CTCFL wie bei MAGE-A1 gezeigt werden konnte, ist das X-chromosomale Gen NY-ESO-1. Eine durch 5-AzadC-Behandlung hervorgerufene CTCFL-Expression führte zur Aktivierung von NY-ESO-1 (Vatolin et al., 2005), wobei auch hier die direkte Wirkungskette nicht belegt ist. Bei der Aktivierung von NY-ESO-1 in Lungenkrebs-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese mit einem Wechsel der Bindung im Promotorbereich einhergeht, die CTCF-Bindung geht verloren und CTCFL bindet dann in diesem Bereich (Hong et al., 2005). In diesem Zusammenhang wurde auch SP1 als Co-Faktor identifiziert, welcher zwar an CTCFL, nicht jedoch an CTCF bindet. CTCFL könnte somit über die Rekrutierung von SP1 an den NY-ESO-1-Promotor zur Aktivierung des Gens (Kang et al., 2007) führen. Allerdings weisen neuere Untersuchungen, wie bereits für MAGE-A1 beschrieben, darauf hin, dass die Expression von CTCFL nicht der Auslöser für die Aktivierung von NY-ESO-1 ist (Woloszynska-Read et al., 2010).

**OCT4** (**POU5F1**, **OCT3**/4): Dieses Gen ist an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen beteiligt und in diesen stark exprimiert, in differenziertem Gewebe hingegen ist es nicht nachweisbar (Kim et al., 2009). Neben der fraglichen Induktion der Genexpression durch eine Expression von CTCFL (Vatolin et al., 2005) gibt es weitere Hinweise auf einen Zusammenhang der beiden Gene. So wird über eine gleichzeitige Expression von CTCFL und OCT4 in Kulturen menschlicher embryonaler Stammzellen berichtet (Monk et al., 2008) und OCT4 ist, wie auch CTCFL, in einigen Krebsformen zu finden (Hoffmann et al., 2006; Xu et al., 2007).

**GAL3ST1** (**CST**) **und TSP50**: Nach dem *knock-out* von CTCFL in Mäusen wurde bei diesen ein Defekt der Spermatogenese beobachtet, welcher zwar nicht zur Unfruchtbarkeit, aber zu verkleinerten Hoden führte. Durch eine Genexpressionsanalyse wurde festgestellt, dass im Hoden dieser Mäuse eine verringerte Expression des Gens GAL3ST1 auftritt, wobei eine bis dahin unbekannte Testis-spezifische Isoform des Gens exprimiert wird. Von diesem Gen war bekannt, dass es eine wichtige Rolle während der Meiose hat und es konnte gezeigt werden, dass CTCFL am Promotor des Gens bindet und dieses aktiviert (Suzuki et al., 2010). Über die Aktivierung von GAL3ST1 beeinflusst CTCFL somit die Spermatogenese. Als weiteres dereguliertes Gen wurde TSP50 identifiziert, welches für eine Testis-spezifische Protease kodiert und zur Gruppe der CTAs gehört. CTCFL bindet auch im Promotor dieses Gens und führt zu dessen Aktivierung. Allerdings ist dazu nicht nur die Expression von CTCFL ausreichend, gleichzeitig muss die Nukleosomendichte im Promotor reduziert sein, um die Bindung von CTCFL zu ermöglichen (Kosaka-Suzuki et al., 2011).

### 2.8 Könnte CTCFL an der Entstehung von Krebs beteiligt sein?

CTCFL gehört aufgrund seines Expressionsmusters zur Gruppe der cancer-testis-Antigene (Simpson et al., 2005). Zu dieser Gruppe werden Gene zusammengefasst, welche normalerweise nur in Testis-Gewebe exprimiert werden, aber auch eine aberrante Expression in einigen Tumorzelllinien und primären Tumoren zeigen. Über die allgemeine Regulation von CTAs ist noch wenig bekannt (Scanlan et al., 2004). Außerhalb von Testis-Gewebe ist CTCFL in höheren Säugetieren nur in Tumorgewebe in biologisch relevanten Mengen exprimiert (Hong et al., 2005; Kholmanskikh et al., 2008; Renaud et al., 2007; Risinger et al., 2007; Vatolin et al., 2005; Woloszynska-Read et al., 2007). CTCFL konnte in mehr als 100 menschlichen Tumorzelllinien von praktisch allen Hauptformen von Krebs nachgewiesen werden (Klenova et al., 2002). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass diese Ergebnisse fehlerhaft sein könnten. So wurde in einer anderen Studie entgegen den bisherigen Resultaten den meisten Brustkrebs-Zelllinien und in primärem gezeigt, dass CTCFL in Brustkrebs-Gewebe nicht exprimiert wird (Hines et al., 2010). Vor kurzem wurden Ergebnisse publiziert, welche darauf hindeuten, dass CTCFL nicht nur in Tumorzellen sondern auch in normalem Gewebe exprimiert wird (Jones et al., 2011). Diese werden aktuell jedoch kontrovers diskutiert, da eine Expression in Geweben außerhalb von Testis-Gewebe in der publizierten Höhe in keiner vorherigen Untersuchung beobachtet wurde.

Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von CTCFL an der Entstehung von Krebs ergibt sich aus der Lokalisierung im menschlichen Genom in der Region 20q13.2. Diese stellt einen mit Krebs assoziierten "*hot spot*" dar, welcher bei Tumoren häufig amplifiziert vorliegt. Es wird vermutet, dass in dieser Region ein stark immortalisierender oder transformierender Faktor kodiert ist (Chen et al., 1998; Renkvist et al., 2001; Tanner et al., 1994), wobei allerdings nicht klar ist, ob es sich bei CTCFL um genau jenen Faktor handelt.

Da CTCF eine Rolle bei der epigenetischen Regulation spielt, könnte auch CTCFL in diesem Prozess involviert sein (Robertson, 2005). Es ist bekannt, dass die epigenetische Regulation eine Schlüsselrolle bei der Onkogenese spielt (Jones and Baylin, 2007). Selbst wenn CTCFL keine direkte Rolle bei der Regulation innehat, so kann CTCFL bei gleichzeitiger Expression mit CTCF mit diesem um Bindestellen konkurrieren und CTCF in manchen Fällen eventuell von den Bindestellen verdrängen. Die gleichzeitige Expression von CTCFL und CTCFL könnte

in Form der Konkurrenz um die Bindestellen und Verlust einiger CTCF-Funktionen somit ein Auslöser für Tumore darstellen. Dies wird vor allem vor dem Hintergrund deutlich, dass CTCF eher eine die Transkription reprimierende Funktion zugeschrieben wird und es als Tumorsuppressor gilt (Filippova et al., 2002), mit CTCFL hingegen eine eher aktivierende Funktion assoziiert wird (Vatolin et al., 2005).

Unterstützt wird die Theorie, dass CTCFL an der Entstehung von Krebs beteiligt ist, auch durch die bekannte und bereits beschriebene Deregulation von BAG1. CTCFL führt im Gegensatz zu CTCF zu einer stärkeren Expression von BAG1. Bei BAG1 handelt es sich um ein anti-apoptotisch wirkendes Gen (Sun et al., 2008). Die Aktivierung von BAG1 könnte somit einen wichtigen Schritt bei der Immortalisierung von Tumorzellen darstellen. Die Aktivierung anderer CTA durch CTCFL wurde mittlerweile zwar in Frage gestellt (Woloszynska-Read et al., 2011), jedoch wurde auch in dieser Publikation eine Korrelation zwischen der Expression von CTCFL und einem fortgeschrittenen Stadium in Brustkrebs und damit einhergehenden geringen Heilungchancen ermittelt.

Trotz aller Hinweise auf einen Einfluss von CTCFL auf die Entstehung von Tumoren kann bisher nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression von CTCFL nicht einer der Auslöser von Krebs, sondern nur die Folge von Krebs ist.

## 2.9 Zielsetzung der Arbeit

CTCF und CTCFL können aufgrund der hochkonservierten, DNA-bindenden 11-Zinkfinger-Domäne generell an dieselben DNA-Sequenzen binden, wobei CTCF nur an unmethylierte, CTCFL jedoch an methylierte und unmethylierte DNA binden kann. Aufgrund der Unterschiede beider Proteine im Bereich der N- und C-Termini wird angenommen, dass sie zwar gleiche Bindestellen im Genom aufweisen, an diesen jedoch zu unterschiedlichen, möglicherweise gegensätzlichen, Reaktionen führen. Die Konkurrenz beider Proteine um gemeinsame Bindestellen wird in Eu- und Metatheria durch die räumliche Trennung der Expression beider Proteine (CTCF in somatischem Gewebe, CTCFL in primären Spermatocyten) weitgehend vermieden. Bei einer gleichzeitigen Expression, wie sie in Tumoren und Tumorzelllinien häufig beobachtet werden kann, könnten hingegen unerwünschte Effekte durch Konkurrenz der beiden Proteine um die Bindestellen die Folge sein. Für CTCF sind mittlerweile eine Reihe von Funktionen, Interaktionspartnern und möglicher Regulationsmechanismen beschrieben, welche eindeutig die wichtige Rolle von CTCF bei der Genregulation und der Organisation der Chromatin-Architektur belegen (Phillips and Corces, 2009). Die gleichzeitige Expression von CTCF und CTCFL lässt vermuten, dass CTCFL entweder direkt (Interaktion mit anderen Proteinen und CTCFL-spezifische Funktionen) oder indirekt (durch Verdrängung von CTCF an den gemeinsamen Bindestellen und somit Unterdrückung der CTCF-Funktionen) zu eigentlich unerwünschten Effekten führt. Da zu den vielfältigen Funktionen von CTCF auch die Tumor-Suppression gehört, wäre es denkbar, dass CTCFL diese Eigenschaft aufhebt und somit zur Entstehung von Tumoren beitragen kann. Über die Funktionen von CTCFL ist bisher allerdings noch wenig bekannt.

Durch die Überexpression von CTCFL in Zellen, welche endogen keine CTCFL-Expression, wohl aber CTCF-Expression zeigen, sollte daher eine Konkurrenzsituation zwischen beiden Proteinen geschaffen werden. In diesen Zellen sollte dann die Veränderung der genomweiten Genexpression ermittelt werden, um mögliche Zielgene von CTCFL zu identifizieren. Gleichzeitig wurde über Ermittlung der Bindestellen von CTCFL und CTCF in diesen Zellen untersucht, ob tatsächlich eine Konkurrenz um gemeinsame Bindestellen vorliegt. Dabei stellt sich vor allem die Frage, was genau nach der Bindung von CTCFL an diesen Bindestellen passiert. Die Frage, ob CTCFL an der Entstehung von Tumoren beispielsweise durch einen Einfluss auf die Proliferationsrate beteiligt sein könnte, sollte mit verschiedenen Wachstumanalysen untersucht werden.

# 3 Material

# 3.1 Geräte

Analysewaage	Mettler PM3000
Autoklav	H + P Labortechnik Varioklav
Begasungsbrutschrank	Heraeus Hera Cell 240
Blotapparatur	BIO-RAD Mini Protean II
Einfrierbehälter	Nalgene Cryo 1°C freezing container
Eismaschine	Scotsman AF20
Elektrophoresekammern	AGS; Peqlab; Hoefer
Elektroporatoren	Amaxa Lonza Nucleofector Device II
	BioRad Gene Pulser x Cell
Entwicklermaschine	Kodak M35 x-omat processor
Feinwaage	MAGV Kern PRS 320-3
Filmkassetten	Rego
Gefrierschränke (-80°C)	Revco
Geldokumentation	BioRad Versadoc 4000MP
	BioDoc Analyse
Inkubator/Schüttler 37°C	Infors HT
Kühl- und Gefrierschränke (4°C / -20°C)	Bosch; Liebherr; Siemens
Magnetrührer	Ikamag RCT
Mikroliterpipetten	Gilson Pipetman
Mikroplatten-Lesegerät	Tecan infinite M200 Pro
Mikroskope	Zeiss Telaval 31
Mikrowellengerät	Privileg 8020
Nanoquant Infinite M200Pro	Tecan
pH-Meter	Inolab pH Level 1
Pipettierhilfe	Neolab 8-5010
	Integra Biosciences Pipetboy
Quarzküvette	Biochrom (50µl)
	Hellma (400 µl)
Real-time-PCR-Cycler	Corbett Research Rotor-Gene 3000
Reinstwasser-Filteranlage	Millipore Advantage A10
Schüttler	Heidolph Unimax 1010
Ultraschallgeräte	Diagenode Bioruptor
	Branson Sonifier 250
Spannungsgeber	Ibi Mbp300
Spektralphotometer	Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro
Sterilbank	Ceag SchirpReinraumtechnik Envirco
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600
	Eppendorf Mastercycler gradient
	Eppendorf Mastercycler
Tubesealer	Beckman TubeSealer
Ultrazentrifuge	Beckman XL70 ultracentrifuge
UV-Transilluminator	Ultra Violet Products Chromator vue c-61
	Bachofer IL200L
VersaDoc Imaging system	BioRad

Vortexer	Scientific Industries Vortex-Genie 2
Wasserbäder	Mgw lauda RM6
	Köttermann 3042
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal
Zellzählgerät	Invitrogen Countess
Zentrifugen	Biozym Sprout
	Hettich Mikroliter
	Beckman J2-MC
	Eppendorf 5417R
	Du Pont Sorvall MC 12V
	Heraeus Multifuge 3
	Heraeus Biofuge Pico
	Eppendorf 5430R

# 3.2 Verbrauchsmaterialien

Einfriergefäße	Nunc
Elektroporationsküvetten	Peqlab
	Lonza
Filtertips	Greiner Bio-One
PVDF-Membran	Millipore
PCR-Gefäße	Biozym Scientific
Photometerküvetten	ratiolab
Real-time-PCR-Gefäße	Corbett Research
Röntgenfilme	Kodak
Sterilfilter	Kobe
Whatman-Papier	Whatman
Zellkulturschalen, -flaschen	Greiner Bio-One
	Nunc
Zentrifugenröhrchen QuickSeal	Beckmann

# 3.3 Chemikalien

## 3.3.1 Laborchemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma
Acrylamid	Roth
Agar Kobe I	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Auftragspuffer 6x loading dye solution	MBI Fermentas
Bactotrypton	Roth
Bromphenolblau	Serva
Caesiumchlorid	Roth
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliantblau R-250	Sigma

Diethylpyrocarbonat (DMPC)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTP's (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Roche Diagnostics
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Formaldehyd	Calbiochem
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Roth
ImmobilonWestern HRP Substrat	Millipore
Isopropanol	Merck
jetPei <sup>1M</sup>	Polyplus Transfection
Lithiumchlorid	Sigma
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	MBI Fermentas
Methanol	Merck
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
NP-40	Fluka
PEG-4000	MBI Fermentas
Phenol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Propidiumiodid	Roth
Protein A-Agarose	Millipore
Protein A/G-Agarose	Calbiochem
Random-hexamer-Primer	Roche Diagnostics
Roti®-Quant	Roth
Salzsäure	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris-HCl	Serva
Triton X-100	Roth
Trizol	Invitrogen
Tween-20	Roth

# 3.3.2 Chemikalien für die eukaryotische Zellkultur

β-Mercaptoethanol, 50 mM	Gibco Life Technologies
Dulbeccos modified eagle serum (DMEM)	Gibco Life Technologies
Dimethylsulfoxid	Serva
Fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum)	Gibco Life Technologies

Iodonitrotetrazoliumchlorid	Applichem
MEM L-Glutamin	Biochrom
MEM Natriumpyruvat, 100 mM	Gibco Life Technologies
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco Life Technologies
(NEAA, non-essential amino acids), 100x	
MEM Vitamin-Lösung, 100x	Gibco Life Technologies
RPMI-1640	Gibco Life Technologies
Trypanblau	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Gibco Life Technologies

## 3.3.3 Enzyme

Alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	Promega
innuScript Reverse Transkriptase	Analytik Jena
Klenow-Fragment	MBI Fermentas
Lysozym	Sigma
<i>Pfu</i> -Polymerase	MBI Fermentas
Proteinase K	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
RNase A, DNase-frei	MBI Fermentas
RQ1 DNase, RNase-frei	Promega
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)	MBI Fermentas
Transcriptor Reverse Transkriptase	Roche

## 3.3.4 DNA-Längenstandards

Verwendet wurden DNA-Längenstandards von MBI-Fermentas, im Folgenden ist die Länge der enthaltenen DNA-Fragmente in bp in absteigender Reihenfolge angegeben.

Gene Ruler 100 bp DNA ladder plus
3.000
2.000
1.500
1.000
900
800
700
600
500
400
300
200
100

Lambda DNA/Eco130I (StyI), Marker 16
19.329
7.743
6.223
4.254
3.472
2.690
1.882
925
421

## 3.3.5 Protein-Molekulargewichtsmarker

Verwendet wurden Protein-Molekulargewichtsmarker der Firmen MBI-Fermentas und Sigma, im Folgenden ist die Größe der enthaltenen Markerproteine in kDa angegeben. Speziell beim Marker 7B traten jedoch zwischen den verschiedenen Chargen kleinere Abweichungen in den tatsächlichen Laufhöhen auf, welche vom Hersteller individuell angegeben und in der Auswertung berücksichtigt wurden. Im anderen Marker waren zwei Banden mit Farbstoffen markiert um eine leichtere Zuordnung während der Elektrophorese zu gewährleisten, diese sind in der folgenden Auflistung mit den entsprechenden Farben markiert.

7B, gefärbt (Sigma)	PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)
175	170
116	130
93	95
65	72
57	55
36	43
31	34
	26
	17
	10

## 3.3.6 Komplettsysteme

GeneAmp <sup>®</sup> RNA PCR Core-Kit	Applied Biosystems
GFX <sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase Kit	Promega
High-Purity-Plasmid-Midiprep-System	Marligen Biosciences
pGEM <sup>©</sup> -T-Easy Vector-System	Promega
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction-Kit	Qiagen
RNeasy <sup>®</sup> Mini-Kit	Qiagen
RQ1 RNase free DNase Kit	Promega
SYBR <sup>®</sup> Green JumpStart <sup>™</sup> Taq ReadyMix <sup>™</sup>	Sigma
TNT <i>in vitro</i> Transkription/Translation-Kit	Promega
Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit	Roche

# 3.4 Antibiotika

Antibiotikum	Firma	Anwendung
Ampicillin	Invitrogen	Flüssigkultur und
		Agarplatten: 100 µg/ml
Doxycyclin	Applichem	Zellkultur: 1µg/ml Medium
Kanamycin	Gibco Life Technologies	Flüssigkultur und
		Agarplatten: 50 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies	Zellkultur: 100 U/ml bzw.
(Pen/Strep)		100 µg/ml
Puromycin	PAA	Zellkultur: 1µg/ml Medium
Tetracyclin	Roth	Zellkultur: 1 µg/ml Medium

Tab. 1: Für eukaryotische Zellkultur und Bakterienkultur verwendete Antibiotika

## 3.5 Plasmide

pBI-eGFP	Clontech
pBI-eGFP-FLAGhCTCFL	P.Bergmaier, JLU Gießen
pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut	S. Dienstbach, diese Arbeit
pBK-CMV-HAmCTCFLmut	S. Dienstbach, diese Arbeit
pBK-CMV-HA-TIF2	Leers et al., 1998
pBluescript II SK+ (pBSK)	Stratagene
pCDNA3	Invitrogen
pCDNA3-FLAG-chCTCF	J. Leers, JLU Gießen
pCDNA3-FLAG-hBORIS	J. Leers, JLU Gießen
pCDNA3-FLAGmCTCFLmut	S. Dienstbach, diese Arbeit
pCDNA3-hCTCFL	S. Dienstbach, diese Arbeit
pCDNA3-mCTCFLmut	S. Dienstbach, diese Arbeit
peGFP-C2	Clontech
pGEM-T-easy	Promega
pGEM-T-mCTCFL	S. Dienstbach, diese Arbeit
pGEM-T-mCTCFL-Kpn2I	S. Dienstbach, diese Arbeit
pGEM-T-mCTCFLmut	S. Dienstbach, diese Arbeit
pMaxGFP	Lonza
pTA-N	J. Leers, JLU Gießen

# 3.6 Antikörper

Tab. 2: Kontroll-IgG's für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).

Spezies	Hersteller	Anwendung
Kaninchen	Abcam	5 μl pro ChIP
Maus	Santa Cruz Biotechnology	5 μl pro ChIP

Antikörper (Nr.)	Spezies	Hersteller	Verwendung
α -BORIS (ab18337)	Hase	Abcam	WB (0%)
α-FLAG M2	Maus	Sigma	WB (0,5 %), ChIP
α-GAPDH (sc-5916)	Hase	Santa Cruz Biotechnology	WB (5%)
CTCFL6 (α-mCTCFL)	Hase	F. Sleutels, Erasmus MC, Rotterdam	WB (5 %), ChIP
N2.2 (α-CTCF)	Hase	F. Sleutels, Erasmus MC, Rotterdam	ChIP

Tab. 3: Primärantikörper für Western Blot (WB) und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP). In Klammer ist bei den für Western Blots verwendeten Antikörpern die verwendete Milchpulverlösung (Angabe in % w/v, siehe 4.4.4) angegeben.

Antikörper	Hersteller	Anwendung
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:20.000 in 0,5% Milchlösung
Goat anti-rabbit IgG-HRP	GE Healthcare	1:35.000 in 5% Milchlösung

## 3.7 Oligonukleotidprimer

Generell wurden Oligonukleotidprimer der Firma Invitrogen verwendet. Bei der Auswahl der Sequenz wurde darauf geachtet, möglichst eine Länge von 20 bp, einen GC-Gehalt von 50% und eine *annealing*-Temperatur von 60°C zu erreichen. Teilweise wurde dazu das *open-source* Programm Primer3 verwendet. Außerdem wurde die Sequenz mit dem Programm OligoTech auf Sekundärstrukturen und die Bildung von Dimeren untersucht. Eine Liste mit allen in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimern ist in Tab. 14 (S. 144 im Anhang) zu finden.

## 3.8 Zelllinien

## 3.8.1 Bakterien

Die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien erfolgte unter Verwendung des chemisch-kompetenten *Escherichia coli* Labor-Sicherheitsstamms XL1-Blue MRF`. Dieser Stamm weist folgenden Genotyp auf:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1$  supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F` proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]. Er besitzt somit keine Endonuklease (endA) und enthält keines des bekannten Restriktionssysteme [ $\Delta(mcrA)183$ ,  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ ], weiterhin fehlt die Fähigkeit zur Rekombination (recA). Der Stamm besitzt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin und erlaubt außerdem eine Blau-Weiß-Selektion nach der Transformation.

#### 3.8.2 Eukaryotische Zelllinien

**NIH3T3** (ATCC-Nr. CRL-1658<sup>TM</sup>, (Todaro and Green, 1963)): Diese adhärenten Zellen wurden 1962 von George Todaro und Howard Geen aus Fibroblasten von Mausembryonen isoliert. Das dabei verwendete Protokoll (**3**-Tages-**T**ransfer, Inokulum **3** x  $10^5$  Zellen) ist verantwortlich für den zweiten Teil des Namens, NIH bezieht sich hingegen auf die Herkunft des verwendeten Mausstammes. Die Immortalisierung der Zelllinie erfolgte spontan nach etwa 30 Generationen. Die Zellen werden in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C unter 5% iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

**RMB-3** (de Both et al., 1981): Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Myelocyten (myeloide Vorläuferzellen), welche in einem frühen Stadium der Maus-Makrophagendifferenzierung arretiert sind. Die in Suspensionskultur wachsenden Zellen können durch Zugabe von Wachstumsfaktoren *in vitro* zur Differenzierung angeregt werden. Diese korreliert mit der Expression des Markerproteins Lysozym. Kultiviert wurden die Zellen in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

**FTC-133** (ICLC Katalog: HTL97015): Diese adhärent wachsende Zelllinie wurde etabliert aus einer Lymphknoten-Metastase eines 42 Jahre alten männlichen Patienten mit einem follikulären Schilddrüsenkarzinom (*follicular thyroid carcinoma*, FTC). Bekannt sind das Vorliegen komplexer chromosomaler Veränderungen und eine Mutation von p53. Die Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit nur als Positivkontrolle im *colony formation assay* (4.6.6) verwendet. Als Medium wurde bei der Erstellung des verwendeten Agars DMEM-Medium benutzt, die Inkubation erfolgte dann bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

**THP-1** (ATCC-Nr. TIB-202<sup>TM</sup>, (Tsuchiya et al., 1980)): Bei dieser aus peripherem Blut etablierten Zelllinie handelt es sich um Monozyten. Sie stammen von einem einjährigen männlichen Säugling mit akuter monozytischer Leukämie. Die Zellen sind nicht adhärent wachsend, bekannt ist außerdem die Bildung von Lysozym. Bei diesen Zellen wurde RPMI-1640-Medium mit speziellen Zusätzen (siehe 4.6.1) benutzt, kultiviert wurden sie dann bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

**HEK-293T** (ATCC-Nr. CRL-1573<sup>TM</sup>, (Graham et al., 1977)): Diese humane Zelllinie entstand 1973 im Labor von van der Eb an der Universität Leiden und ist das Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (**h**uman **e**mbryonic **k**idney, HEK) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5. Dabei erfolgte ein Einbau von 4,5 kb des viralen Genoms in das Erbgut der Nierenzelle. Die hypotriploiden Epithelzellen wachsen adhärent. HEK-293T-Zellen sind eine Variante der HEK-293-Zellen, welche zusätlich noch das *SV40 large T-antigen* exprimiert, was für die Replikation von episomalen Plasmiden mit *SV40 origin of replication* von Bedeutung ist. Kultiviert werden diese Zellen in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

## 3.9 Software

Tab 5.	Vanandata	Due en	I Datamban laan	a a mila daman	TTomatellon	handahara agamalaa	Ambiatan
1 ab. 5:	verwendele	Programme und	і Пятепрянкен	sowie deren	Hersteller	nezieniingsweise	Annieler.
I uni u	, er enacee	I I OSI ammie am	Dutenbulinen	bo me del en	<b>HICLOUCHE</b>	sellenangs webe	1111010001

Software	Hersteller / Anbieter
Adobe Photoshop	Adobe Systems
BLAST	NCBI & EBI
CLUSTAL X	EMBL
DAVID Bioinformatics Resources	Huang et al., 2009, http://david.abcc.ncifcrf.gov/
GATC-Viewer	GATCBiotech AG
GeneVenn	Pirooznia et al., 2007
GEO (gene expression omnibus)	Edgar et al., 2002, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
GraphPad Prism 3.03	GraphPad Software Incorporated
MEME	Bailey et al., 2009,
	http://meme.sdsc.edu/meme/meme-intro.html
MS Office 2003	Microsoft
OligoTech	Oligos etc.
Patser	http://stormo.wustl.edu/software.html
Primer3	Sourceforge.net
Rotor Gene 6.1	Corbett Research
UCSC genome browser	Kent et al., 2002, http://genome.ucsc.edu/
Vector NTI	Informax Inc.
Quantity One 4.6.7	BioRad Laboratories

## 4 Methoden

## 4.1 Arbeiten mit DNA

#### 4.1.1 Aufbewahrung von DNA

Die Lagerung von DNA erfolgte allgemein bei -20°C in TE-Puffer. Bei Proben welche für ChIP-Seq-Experimente vorgesehen waren, wurde die DNA hingegen in DNase-freiem Wasser, ebenfalls bei -20°C, aufbewahrt.

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA

#### 4.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässriger Lösung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ausubel, 1989; Ausubel et al., 1989). Hierzu wurden Quarzküvetten verwendet. Da bei einer doppelsträngigen DNA eine Extinktion (E) von 1 einer DNA-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml entspricht, konnte die vorliegende DNA-Konzentration (c) rechnerisch über folgende Formel ermittelt werden:

 $c[\mu g / ml] = E \times 50 \times Verdünnungsfaktor \div 1000$ 

Bei kleinen verfügbaren Volumina erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Infinite M200Pro. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit Quant-It<sup>TM</sup> Pico Green® dsDNA 5 min unter Lichtabschluss inkubiert. Dabei handelt es sich um ein ultrasensitives, fluoreszierendes und Nukleinsäuren-anfärbendes Reagenz, welches die Detektion und Quantifizierung kleiner Mengen von DNA erlaubt. Bei dieser Methode wird außerdem der Einfluss von RNA und Einzelstrang-DNA auf das Messergebnis im Vergleich zur herkömmlichen DNA-Quantifizierung bei 260 nm deutlich reduziert. (Invitrogen, 2008). Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Messung bei einer Exzitation von 480 nm und einer Emission von 520 nm in einem Microplatten-Lesegerät. Um anhand der Messwerte die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde gleichzeitig eine Verdünnungsreihe mit Lachssperma-DNA zur Erstellung einer Eichgeraden verwendet.

Wenn eine spektralphotometrische Bestimmung nicht möglich war, wurde eine grobe Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene Mengen der zu quantifizierenden DNA sowie drei unterschiedliche Mengen des DNA-Längenstandards aufgetragen. Da die Konzentration der den einzelnen Banden des Längenstandards zugrunde liegenden DNA bekannt war, konnte durch Vergleich der Intensität der Banden zwischen Längenstandard und aufgetragener Probe eine grobe Quantifizierung der DNA durchgeführt werden.

#### 4.1.3 Plasmidpräparation aus bakteriellen Zellen

Zur schnellen Vermehrung von Plasmiden wurden diese mittels Transformation (4.5.2) in Bakterien eingebracht, welche sich selbst und dabei auch die eingebrachten Plasmide vermehrten. Durch die Zugabe geeigneter Antibiotika (0) zum jeweiligen Kulturmedium (4.5.1) wurde sichergestellt, dass sich nur transformierte Bakterien mit der entsprechenden Plasmid-vermittelten Antibiotikaresistenz vermehrten. Die Plasmide konnten anschließend wieder aus diesen Bakterien isoliert werden. Je nach Verwendungszweck der Plasmide wurden unterschiedliche Mengen benötigt, beispielsweise genügten zum Testen einer Klonierung bereits kleinere Mengen an Plasmiden, wohingegen für zukünftige Transfektionen größere Mengen besonders reiner Plasmid-DNA nötig waren. Entsprechend der unterschiedlichen Zielsetzung wurden daher verschiedene Methoden zur Aufreinigung angewandt.

Im Anschluss an die Isolierung erfolgte eine Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA über einen Restriktionsverdau (4.1.6.1) und eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (4.2.1) der erhaltenen Produkte. Wenn die Plasmid-DNA für Klonierungen verwendet werden sollte oder es sich um ein neu hergestelltes Plasmid handelte, wurde außerdem eine Sequenzanalyse (4.1.5) durchgeführt. Für Klonierungen wurde außerdem auch unverdaute Plasmid-DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, um den Anteil von superspiralisierter (*supercoil*) DNA zu bestimmen.

### 4.1.3.1 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Zur Vermehrung wurden einzelne Klone von Agarplatten isoliert oder aus *Kryo-Stocks* (4.5.1) entnommen und in 3 ml LB-Medium, welches eine geeignete Konzentration des entsprechenden Antibiotikums (siehe Tab. 1) enthielt, über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Von dieser Übernachtkultur wurden anschließend 1,5 ml für die Plasmid-Isolation wie folgt verwendet. Sie wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Für die alkalische Lyse der Zellen wurde das Pellet mit 100 µl Lösung 1 sorgfältig resuspendiert, danach mit 200 µl Lösung 2 vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Neutralisierung der Lösung und Fällung der chromosomalen

DNA wurden 150 µl Lösung 3 zugegeben und nach gründlichem Vermischen erneut für 5 min auf Eis inkubiert.

Lösung 1	50 mM Glukose
_	25 mM Tris-HCl pH 8,0
	10 mM EDTA

Lösung 2	0,2 M NaOH
	1% SDS
	frisch angesetzt

Lösung 3	5 M Kaliumacetat pH 4,8
----------	-------------------------

Durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur wurde der Zelldebris pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die enthaltenen Plasmide durch Zugabe von 0,8 Volumenteile (VT) Isopropanol und Inkubation für 10 min bei -20°C ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur und anschließendem Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet an der Luft angetrocknet und zur Entfernung mitpräparierter RNA in 40 µl TE-Puffer mit RNase A aufgenommen und 45 min bei 37°C inkubiert.

TE-Puffer + RNase A	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA
	100 µg/ml

## 4.1.3.2 Plasmidpräparation in mittlerem Maßstab (Midipräparation)

Für die Isolierung mittlerer Mengen Plasmid-DNA wurde das *high purity plasmid midiprep*-System der Firma Marligen Biosciences verwendet, welches eine säulenbasierte, leicht abgewandelte Form der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) darstellt. Die Vermehrung der Bakterien erfolgte aus einer 3 ml LB-Medium Vorkultur, welche mit Bakterien-Klonen aus einem Kryo-Stock (4.5.1) oder von einer Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator kultiviert wurden. Diese Vorkultur wurde anschließend zum Beimpfen eines Erlenmayerkolbens verwendet, in welchem bereits 250 ml LB-Medium vorgelegt wurden. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Zellen über Zentrifugation bei 4°C mit 4.000 rpm geerntet. Sowohl für die Vorkultur als auch für die Vermehrungskultur wurde dem Medium ein geeignetes Antibiotikum zugegeben (0). Die anschließende Aufreinigung erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben (Marligen, 2005), lediglich die Zentrifugationsschritte wurden abweichend vom Protokoll mit 5.000 rpm durchgeführt.
# 4.1.3.3 Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxipräparation)

Zur Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Wenn die Plasmid-DNA für stabile Transfektionen verwendet werden sollte, erfolgte die Aufreinigung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation, was den Vorteil einer höheren Reinheit der Plasmid-DNA bot. Dazu wurde eine Bakterien-Vorkultur (wie bereits unter 4.1.3.2 beschrieben) in einen Erlenmayerkolben mit Schikane überführt, in welchem bereits 360 ml TB-Medium und 40 ml Phosphat-Puffer sowie ein geeignetes Antibiotikum vorgelegt wurden. Im Vergleich zu LB-Medium erreichen die Bakterien in diesem Medium eine deutlich höhere Zelldichte.

<b>TB-Medium</b>	12 g/l Bactotrypton	1
(terrific broth)	24 g/l Hefeextrakt	
-	0,4 % Glycerol	
	autoklaviert	

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

Die Vermehrung der Bakterien erfolgte dann über Nacht bei 37°C in einem Schüttel-Inkubator, anschließend wurden die Bakterien mittels Zentrifugation für 10 min bei 4°C mit 4.000 rpm geerntet. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 10 ml Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 20 ml Lösung 2 und gründlichem Vermischen sowie 5 min Inkubation auf Eis aufgeschlossen. Danach wurden 15 ml Lösung 3 zugegeben und nach gründlichem Vermischen erneut für 5 min auf Eis inkubiert, im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C mit 5.000 rpm.

Lösung 1	50 mM Glukose
_	25 mM Tris-HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
	50 mg Lysozym, frisch
	zugegeben

Lösung 2	0,2 M NaOH 1% SDS frisch ansetzen
Lösung 3	5 M Kaliumacetat nH 4 8

Der Überstand wurde durch drei Lagen Gaze gefiltert, auf zwei 50 ml Sarstedt-Gefäße aufgeteilt und mit je 12,5 ml Isopropanol für 20 min bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 20°C mit 5.000 rpm, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1,5 ml TE-Puffer (4.1.1) bei 37°C im Schüttel-Inkubator mit 150 rpm gelöst. Der Inhalt der beiden Sarstedt-Gefäße wurde vereinigt und 4,5 g Cäsiumchlorid zugegeben, es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C im Schüttelinkubator, um das Cäsiumchlorid zu lösen. Nun wurden 500 µl Ethidiumbromid zugegeben, kurz gevortext, und dann bei 20°C für 10 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Quickseal<sup>TM</sup>-Zentrifugenröhrchen (13 mm x 51 mm) der Firma Beckmann überführt und mit 50% iger

CsCl-Lösung (w/w) oder MilliQ auf ein Gewicht von 9,5-9,8 g austariert. Nach dem Zuschweißen der Zentrifugenröhrchen wurden diese in einem Vertikalrotor in einer Ultrazentrifuge bei 20°C und 70.000 rpm für 4 Stunden zentrifugiert. Mit einer Kanüle wurde nun die untere der erkennbaren Banden durch seitliches Einstechen abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, welches erneut mit 50% iger CsCl-Lösung aufgefüllt, austariert und zugeschweißt wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation im Vertikalrotor in der Ultrazentrifuge bei 20°C mit 50.000 rpm über Nacht. Erneut wurde die Plasmidbande wie beschrieben mit einer Kanüle abgenommen und in ein 15 ml Sarstedt-Gefäß überführt und wieder 2 ml CsCl-gesättigtes Isopropanol zugegeben, gevortext und die obere rötlich gefärbte Phase abgenommen und verworfen. Dieses Ausschütteln des Ethidiumbromids wurde, sobald die obere Phase keine Färbung mehr zeigte, noch zweimal wiederholt, anschließend wurden 2 Volumenteile (VT) H<sub>2</sub>O durch Schütteln mit der Lösung vermischt. Im Anschluss daran wurden 0,6 VT Isopropanol zum Ausfällen bei Raumtemperatur zugegeben. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 20°C für 20 min mit 5.000 rpm an, nach Abnahme des Überstandes wurde durch Zugabe von 5 ml 70% igem Ethanol und erneuter Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen das Pellet gewaschen. Dieses wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in 800 µl TE-Puffer (4.1.1) oder H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend die DNA-Konzentration ermittelt.

Für transiente Transfektionen oder Klonierungen wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des *high purity plasmid maxiprep*-Systems der Firma Marligen Biosciences isoliert. Die Durchführung erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben (Marligen, 2005), abweichend vom Protokoll wurden jedoch die Zentrifugationsschritte bei 5.000 rpm ausgeführt. Die Vermehrung der transformierten Bakterien erfolgte wie bereits für die Dichtegradienten-Zentrifugation beschrieben.

#### 4.1.4 DNA-Fällung

Für eine Aufkonzentrierung von DNA-Proben oder zum Umpuffern wurde die DNA mittels Ethanol-Fällung oder Isopropanol-Fällung (bei größeren Volumina) ausgefällt. Bei geringen DNA-Mengen oder sehr niedrigen Konzentrationen wurde der DNA-Lösung vor der jeweiligen Fällung noch 0,05% Glykogen zugesetzt.

Für die Ethanol-Fällung wurde das Volumen der DNA-Lösung bestimmt und anschließend 1/10 VT 3 M Natriumacetat zugegeben. Nach gründlichem Vermischen wurden weitere 2,5 VT 100% iger Ethanol zugegeben und erneut gemischt. Die Fällung erfolgte bei -20°C für mindestens 10 min. Nach Zentrifugation mit 14.000 rpm für 3 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 VT 70% igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter

oder in Wasser bei 4°C.

Die Isopropanol-Fällung verlief nahezu identisch. Es wurde jedoch zum Fällen 0,7 VT Isopropanol statt Ethanol verwendet. Die geringere Menge des Alkohols erlaubte in diesem Falle das Ausfällen auch aus großen Volumina in kleineren Reaktionsgefäßen.

# 4.1.5 Sequenzierung, Sequenzanalyse und -darstellung

Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab durchgeführt, der dazu versendete Sequenzierungsansatz setzte sich zusammen aus 600 ng Plasmid-DNA sowie 20 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 7  $\mu$ l, falls notwendig wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Ausgabe und Auswertung der Ergebnisse erfolgte im FASTA-Format sowie in Form von ABI-Elektropherogrammen.

Die Auswertung und Darstellung von Nukleotidsequenzen erfolgte computergestützt mit Hilfe der Programme CLUSTAL X, VectorNTI und dem GATC-Viewer auf Arbeitsplatzrechnern, sowie mit BLAST unter Verwendung der jeweiligen Zentralrechner der anbietenden Institutionen. Die in dieser Arbeit abgebildeten Plasmid- und Genkarten wurden mit VectorNTI erstellt, die den Genkarten zugrunde liegenden Daten wurden aus dem UCSC Genome Browser importiert.

# 4.1.6 Enzymatische Modifikationen

# 4.1.6.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind in der Lage eine spezifische DNA-Sequenz zu erkennen und den DNA-Doppelstrang in der Regel an dieser Stelle zu schneiden (Kessler and Manta, 1990; Roberts and Macelis, 1991). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen. Die jeweiligen Puffer- und Temperaturbedingungen wurden anhand der Herstellerangaben ermittelt (Fermentas, 2010). Allgemein erfolgte die Inkubation bei 37°C für 1 h mit 1 U (Enzym-Einheit, *unit*) pro µg DNA, sofern nicht anders angegeben. Bei einem Doppelverdau wurde entweder nach einem für beide Restriktionsendonukleasen passenden Puffer gesucht, oder nach Verdau mit dem ersten Restriktionsenzym eine Fällung und Umpufferung (4.1.4) durchgeführt mit anschließendem Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym. Die Auswertung erfolgte über Gelelektrophorese (4.1.10), bei Bedarf wurde eine Aufreinigung mittels Gelextraktion (4.1.9.1) durchgeführt.

# 4.1.6.2 Auffüllen von 5'-Überhängen

Durch den Verdau mit bestimmten Restriktionsendonukleasen entstehen überhängende Enden (*sticky ends*) an einer doppelsträngigen DNA (Ausubel, 1989). In manchen Fällen muss dieser Überhang aufgefüllt werden um glatte Enden (*blunt ends*) zu erhalten, damit das DNA-Fragment für Klonierungen verwendet werden kann (Bolivar and Backman, 1979). Dafür wurde das Enzym T4-DNA-Polymerase verwendet, welches in der Lage ist, durch Anbau von Desoxynukleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe der DNA 5'-Überhänge aufzufüllen. Der Reaktionsansatz setzte sich dabei aus 1 µg DNA, 1 µl T4-DNA-Polymerase ( $\leq 5$  U) sowie 3 µl dNTP-Mix (10 mM pro dNTP) zusammen, die Inkubation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (aufgefüllt mit H<sub>2</sub>O) bei 37°C für 1 h.

Alternativ wurde zum Auffüllen von 5'-Enden das Klenow-Fragment verwendet (Tabor and Richardson, 1987). Dazu wurde die DNA zusammen mit 0,5  $\mu$ l dNTP's (je 2 mM), 2  $\mu$ l 10x Puffer und 0,5  $\mu$ l Klenow-Fragment (10 U/ $\mu$ l) und H<sub>2</sub>O (zum Auffüllen auf 20  $\mu$ l Endvolumen) im Thermocycler für 60 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 75°C inkubiert und dann bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

# 4.1.6.3 Dephosphorylierung freier 5'-Enden

Um die Selbstligation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden mittels der alkalischen Kälberdarm-Phosphatase (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*) die 5'-terminalen Phosphatgruppen des Vektors hydrolytisch entfernt. Der Ansatz der Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben (Fermentas, 2010), die Inkubation wurde bei 37°C für 1 h durchgeführt.

# 4.1.6.4 Phosphorylierung von DNA am 5'-Ende

Nach der Dephosphorylierung eines Vektors wie unter 4.1.6.3 beschrieben, können PCR-Produkte nur zur Ligation mit dem Vektor verwendet werden, wenn sie ihrerseits zuvor am 5'-Ende phosphoryliert wurden. Das hierfür verwendete Enzym T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) ist in der Lage, das  $\gamma$ -Phosphat von ATP auf die 5'-OH-Gruppe doppelsträngiger DNA zu übertragen. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (Fermentas, 2010) angesetzt, die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h.

# 4.1.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Um einen linearisierten Vektor und ein entsprechendes Insert miteinander zu verbinden, wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Verknüpfung von 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen in Form von Phosphodiesterbindungen (Ausubel, 1989). Im Reaktionsansatz wurde ein molares Verhältnis zwischen Vektor und DNA von 1:5 bei einer Gesamtmenge von 50 - 100 ng Vektor verwendet und entsprechend den Herstellerangaben (Fermentas, 2010) ergänzt. Lagen kohäsive Enden (*sticky ends*) vor, erfolgte die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur. Zur Ligation glatter Enden (*blunt ends*) wurden dem Reaktionsansatz bei einem Gesamtvolumen von 20 µl noch 2 µl 50%ige PEG 4000-Lösung zugegeben (Endkonzentration 5% w/v) und bei 14°C über Nacht inkubiert.

## 4.1.6.6 T/A-Klonierung

Die T/A-Klonierung beruht auf der Fähigkeit vieler thermostabiler DNA-Polymerasen, an jedes 3'-Ende eines synthetisierten PCR-Fragmentes ein weiteres, überhängendes Nukleotid anzufügen., wobei es sich meist um ein Adenosin-Nukleotid (3'-Adenylierungsaktivität) handelt, es können aber auch andere Nukleotide angefügt werden (Hu, 1993). Diese PCR-Fragmente mit A-Überhang können mit einem linearisierten Vektor mit T-Überhängen ligiert werden, wobei sich deutliche Effizienzvorteile gegenüber einer *blunt-end*-Ligation ergeben.

PCR-Produkte oder Produkte aus Restriktionsendonuklease-Verdaus mit glatten Enden, welche über diese Methode kloniert werden sollten, wurden für 30 min mit einem dNTP-Mix, PCR-Puffer, *Taq*-Polymerase, Wasser und Magnesium (jeweils in PCR-üblichen Konzentrationen) bei 72°C inkubiert (sogenanntes *A-tailing*). Als Vektor wurde pGEM-T-easy verwendet, die Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase bei 14°C für 12 Stunden. Die Konzentrationen wurden anhand der Angaben im Handbuch des TA-Cloning® Kit, Version V der Firma Invitrogen ermittelt.

#### 4.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)

spezifischen Die Polymerase-Kettenreaktion dient Vervielfältigung der von Nukleinsäuremolekülen mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Neben der allgemein verwendeten Tag-Polymerase (ursprünglich isoliert aus Thermus aquaticus) wurde für einige Klonierungen die Pfu-Polymerase (ursprünglich isoliert aus *Pyrococcus furiosus*) verwendet, welche zusätzlich eine  $3' \rightarrow 5'$ Exonuklease-Aktivität (sogenannte Korrekturlese-Polymerase oder *proof* reading polymerase) aufweist und zu einer deutlich verringerten Anzahl falsch eingebauter Nukleotide während der PCR führt. Aufgrund dieser Eigenschaft der Pfu-Polymerase wurde für T/A-Klonierungen die Taq-Polymerase verwendet, da diese in der Lage ist, 3'-(A)-Überhänge am PCR-Produkt zu produzieren. Außerdem wurde die Taq-Polymerase auch in colony-PCR-Experimenten eingesetzt, um in einer Population von Bakterienkolonien nach einer Transformation die Klone zu finden, welche den gewünschten Vektor aufgenommen hatten. Zusammen mit zwei Oligonukleotidprimern, welche bezüglich ihrer Sequenz komplementär zu den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz sind, antiparallel mit ihnen hybridisieren und deren freies 3'-OH-Ende als Substrat zur Anheftung der Desoxynukleotide durch die DNA-Polymerase dient, sowie unter geeigneten Pufferbedingungen kann dadurch eine Matrizen-DNA oder ein Teil derselben spezifisch vervielfältigt werden. Die Durchführung der unterschiedlichen PCR-Reaktionen orientierte sich an Müller (Müller, 2001). Die verwendete Anlagerungstemperatur (annealing-Temperatur,  $T_{an}$ ) wurde nach der Formel  $T_{an} = T_m - 2$  berechnet, wobei die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) nach der Wallace-Regel (Wallace et al., 1979) über folgende Formel für jeden Oligonukleotidprimer gesondert ermittelt wurde:

# $T_m[^{\circ}C] = 4 \times (Anzahl \ G + Anzahl \ C) + 2 \times (Anzahl \ A + Anzahl \ T)$

Bei Primerpaaren mit unterschiedlichen  $T_m$  wurde der niedrigere Wert verwendet. Die Elongationszeit (E<sub>t</sub>) wurde auf die Länge des erwarteten Produkts angepasst, wobei pro 100 bp 10 s veranschlagt wurden. Für die DNA-Polymerasen wurden außerdem auch die Herstellerangaben zur Durchführung der PCR berücksichtigt. Bei der *Pfu*-Polymerase erfolgte die Zugabe der Polymerase erst nach der primären Denaturierung, um eine Degradation der Oligonukleotidprimer zu verhindern. Im Folgenden sind die Standardprotokolle für *Taq*-Polymerase-PCR, *Pfu*-Polymerase-PCR und *colony*-PCR angegeben:

	PCR mit Taq- colony-		PCR mit <i>Pfu</i> -Polymerase		
	Polymerase	PCR	-		
Template	200 pg – 20 ng	1 Kolonie	Template	200 pg–20 ng	
Puffer grün (5x)	4 µl	2 µl	Puffer + 20 mM	5 µl	
$MgCl_2(25 mM)$	1,5 µl	1,5 µl	$MgSO_4(10x)$		
dNTP's (je 10 mM)	0,2 µl	0,1 µl	dNTP's (je 10 mM)	1 µl	
Primer 1 (100 µM)	0,2 µl	0,1 µl	Primer 1 (100 µM)	0,5 µl	
Primer 2 (100 µM)	0,2 µl	0,1 µl	Primer 2 (100 µM)	0,5 µl	
Taq-Polymerase	0,25 µl	0,5 µl	Pfu-Polymerase	2 µl	
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl	ad 10 µl	H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	
Gesamt	20 µl	10 µl	Gesamt	50 µl	
	Therm	ocycler-Pro	gramm		
	Taq-PCF	ł 🛛	colony-PCR	<i>Pfu</i> -PCR	
Initiale Denaturierung	3 min bei 95	5°C	10 min bei 95°C	3 min bei 95°C	
Denaturierung	30 s bei 95	°C	30 s bei 95°C	30 s bei 95°C	
Anlagerung	30 s bei T <sub>an</sub>		30 s bei T <sub>an</sub>	30 s bei T <sub>an</sub>	
Elongation	E <sub>t</sub> bei 72°	С	Et bei 72°C	2 • E <sub>t</sub> bei 72°C	
Finale Elongation	5 min bei 72	2°C	5 min bei 72°C	10 min bei 72°C	

Die PCR wurde außerdem verwendet um gezielt Punktmutationen in DNA-Sequenzen einzufügen. Zu diesem Zweck wurden Oligonukleotidprimer verwendet, deren Sequenzen nicht zu 100% identisch mit der Sequenz des zu amplifizierenden Templates waren (Hemsley et al., 1989). Das entstehende PCR-Produkt wies dann im auf die Oligonukleotidprimer zurückgehenden Sequenzbereich eine Mutation im Vergleich zur Template-Sequenz auf.

#### 4.1.8 Real-time PCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR erlaubt die real-time-PCR eine direkte Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte nach jedem durchlaufenen PCR-Zyklus. Dies wird durch Zugabe eines in die DNA interkalierenden Farbstoffs zu dem Reaktionsansatz erreicht, welcher dann nach der Elongationsphase die doppelsträngige DNA anfärbt und über die Intensität der Färbung eine Aussage über die Menge der vorhandenen doppelsträngigen DNA erlaubt. Da Ethidiumbromid jedoch neben doppelsträngiger DNA auch einzelsträngige DNA bindet, ist es für den Nachweis von PCR-Amplifikaten nicht geeignet. Im für diese Arbeit verwendeten SYBR<sup>®</sup> green jumpstart<sup>™</sup> Taq readymix<sup>™</sup>-Kit enthielt der Reaktionsmix bereits alle für die PCR nötigen Reagenzien inklusive dem Farbstoff SYBR Green I, es mussten lediglich Template und Primer für die Reaktion zugesetzt werden. Das Anregungsmaximum dieses dsDNA-spezifischen Interkalators liegt bei 488 nm, Emissionsmaximum liegt bei 520 nm. Dies erlaubt zusätzlich auch eine das Schmelzpunktanalyse hinsichtlich der Bindungsaffinität der verwendeten Primer. Zusätzlich wird in diesem Kit ein Antikörper verwendet (jumpstart Taq-Antikörper), welcher durch Bindung an die Polymerase diese inhibiert bis der Antikörper im initialen Denaturierungsschritt abgebaut wird. Dadurch wird sichergestellt, dass die Aktivität des Enzyms erst nach dem ersten Denaturierungsschritt freigesetzt wird. Die Durchführung orientierte sich an (Müller, 2001) sowie den Angaben des Herstellers. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass das Amplifikat eine Größe von 250 bp möglichst nicht überschritt. Standardmäßig wurde folgendes Protokoll verwendet:

SYBR <sup>®</sup> green jumpstart <sup>™</sup> Taq readymix <sup>™</sup>	5 µl
Primer 1 (10 μM)	0,5 μl
Primer 2 (10 $\mu$ M)	0,5 μl
Template	1 μl cDNA oder 2 μl ChIP-Material
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

# 4.1.9 DNA-Aufreinigung aus wässrigen Lösungen

## 4.1.9.1 Gelextraktion

Die Produktbande, welche die gewünschte DNA enthielt, wurde mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA aus dem Agarose-Gel erfolgte mit Hilfe des QIAquick<sup>®</sup> *gel extraction* Kit nach Herstellerangaben (Qiagen, 2006). Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte über eine erneute Agarose-Gelelektrophorese. Für sensitive Verfahren (z.B. Sequenzierung) verwendete DNA wurde mit sterilem Wasser statt des mitgelieferten Puffers eluiert.

#### 4.1.9.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Proteine in einer wässrigen Lösung von DNA abzutrennen wurde eine Phenol-Cloroform-Extraktion durchgeführt (Ausubel, 1989). Dazu wurde die DNA-Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt und 0,5 VT Phenol zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden 0,5 VT Chloroform zugegeben und erneut kurz gevortext. Durch Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 14.000 rpm für 3 min erfolgte die Phasentrennung. Die obere Phase, welche die DNA enthielt, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Evaluierung des abgenommenen Volumens wurde erneut 1 VT Chloroform zugegeben, kurz gevortext und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Erneut wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA (4.1.4).

# 4.1.10 *In-vitro*-Transkription und -Translation

Die in-vitro Translation ist ein Verfahren mit dessen Hilfe mittels in-vitro-Transkription erzeugte mRNA-Moleküle in einem Reaktionsgefäß zur Proteinbiosynthese verwendet werden können. Dadurch ist es möglich, dass aus einer DNA-Sequenz hervorgehende Protein in-vitro herzustellen. Üblicherweise geschieht dies heute mit Hilfe von in-vitro-Translationssystemen, welche neben den nötigen Enzymen auch die entsprechenden tRNA-Moleküle und Aminosäuren enthalten. In dieser Arbeit wurde das TNT® T7/T3 coupled wheat germ extract System, entsprechend den Herstellervorgaben (Promega, 2006), verwendet. Der Reaktionsansatz wurde dann für 90 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Für eine Detektion des Proteins mittels Western-Blot wurde die Probe anschließend 1:2 mit Rotiload (SDS-Ladepuffer) verdünnt.

Reaktionsansatz in-vitro Translation				
Weizenkeim-Extrakt	6,25 μl			
TNT Reaktions-Puffer	0,5 μl			
Aminosäure-Mix ohne Leucin	0,125 μl			
Aminosäure-Mix ohne Methionin	0,125 μl			
RNasin	0,5 µl			
T7-Polymerase	0,25 µl			
DNA	1 μg			
H <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 12,5 µl			

# 4.2 Gelelektrophorese

# 4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die qualitative und quantitative Untersuchung von DNA-Fragmentierungen (über Restriktionsendonuklease-Verdau (4.1.6.1) oder Sonifizierung (Bioruptor, 4.8.1)), DNA-Extraktionen (4.1.9.1) und PCR-Produkten (4.1.6.6) sowie die Aufreinigung von DNA-Fragmenten (4.1.9) und die Analyse von RNA-Isolaten (4.3.1) erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Abhängig von der Größe der DNA- bzw. RNA-Moleküle wurde die Konzentration der Agarose zwischen 0,7 und 2% (w/v) gewählt, als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Die eingewogene Agarose wurde mit der entsprechenden Menge Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, nach kurzem Abkühlen wurden 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Puffer zugegeben sowie durch Zugabe von H<sub>2</sub>O das während des Aufkochens verdunstete Wasser ersetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und erlaubt über Anregung durch UV-Licht (254 – 366 nm) und anschließende Emission im sichtbaren Bereich (rot-orange) die Detektion der Nukleinsäuremoleküle und eine Dokumentation mittels CCD-Kamera. Die noch flüssige Agarose wurde dann in eine Flachbettapparatur gegossen und mittels eines eingesteckten Kammes entstanden nach Erkalten und Verfestigung der Agarose Vertiefungen, in welche die DNA- bzw. RNA-Lösung mit Hilfe eines beschwerenden Auftragspuffers geladen wurde. Der bei Taq-PCR-Reaktionen standardmäßig verwendete Puffer (4.1.6.6) diente direkt auch als Auftragspuffer, in allen anderen Fällen wurde zum Beschweren die 6x loading dye solution verwendet. Die Ermittlung der Fragmentgrößen und eine grobe Quantifizierung erfolgte durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen DNA-Marker (3.3.4).

Auftragspuffer 6x	0,03% Bromphenolblau
loading dye solution,	0,03% Xylencyanol
<b>MBI Fermentas</b>	60 mM EDTA pH 7,6
	10 mM Tris
	60% Glycerol

50x	2 M Tris/HCl pH 7,8
<b>TAE-Puffer</b>	150 mM Natriumacetat
	50 mM EDTA

## 4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden Polyacrylamid-Gele verwendet. Sie haben eine kleinere Porengröße als Agarose-Gele. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) denaturiert, wobei die Proteinmoleküle mit einer negativ geladenen Hülle umgeben werden. Durchschnittlich lagern sich dabei zwei Moleküle SDS pro Aminosäure an. Dadurch wird die natürliche Ladung des Proteins maskiert und ein konstantes Verhältnis zwischen Masse und Ladung erreicht, was eine Trennung der Proteine entsprechend ihrer Größe ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Weiterhin wird durch  $\beta$ -Mercaptoethanol, welches stark reduzierend wirkt, ein Aufbrechen von Disulfid-Bindungen erreicht.

Die verwendeten Gele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel, welche senkrecht aufeinander aufgebaut verwendet wurden. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, anschließend darauf aufsitzend das Sammelgel, in welchem sich auch die beim Auspolymerisieren durch eingesteckte Kämme entstandenen Taschen für die Proteinlösung befanden. Die beiden Gelbereiche unterschieden sich vor allem im pH-Wert. Das obere Sammelgel fokussierte dabei die Proteine der Lösung in einem schmalen Bereich, das darauf folgende Trenngel diente dann der eigentlichen Auftrennung der Proteine. Die Proteinlösungen waren mit einem Ladepuffer versetzt, wodurch die Proben beschwert wurden und in die Taschen gefüllt werden konnten. Außerdem wurden sie bei erstmaliger Verwendung für 10 min im Wasserbad mit kochendem Wasser erhitzt. Als Laufpuffer wurde 1x Lämmli-Puffer verwendet. Zusätzlich wurde ein standardisiertes Proteingemisch als Molekulargewichtsmarker verwendet.

10x Lämmli-Puffer (SDS-Laufpuffer)	30,2 g/l Tris
	144 g/l Glycin
	1 % SDS

Verwendet wurde ein Gelsystem der Firma Hoefer. In dieses wurden dann nacheinander die unpolymerisierten Gellösungen zum Auspolymerisieren eingefüllt. Die Zusammensetzung Lösungen ist Tab. 6 zu entnehmen. Verwendet wurde dieser dabei eine Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1 (w/v), Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30). Dabei handelt es sich um synthetische hydrophile Monomere, welche unter Anwesenheit von Ammoniumperoxosulfat (APS) und Tetramethylethylendiamid (TEMED) radikalisch polymerisieren. Die Konzentration des Trenngels wurde der erwarteten Größe der Proteinmoleküle, welche aufgetrennt werden sollten, angepasst.

	Trenngel Sammelgel				
Konzentration	15%	12%	10%	7,5%	6%
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (w/v) Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	5 ml	4 ml	3,3 ml	2,5 ml	1,3 ml
H <sub>2</sub> O	2,4 ml	3,4 ml	4,1 ml	4,9 ml	6,1 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	-	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
40% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Tab. 6 Herstellung des Sammelgels und der Trenngele für die SDS-PAGE

# 4.3 Arbeiten mit RNA

Generell wurden bei allen Arbeiten mit RNA nur Materialien verwendet, welche RNase-frei waren. Alle Arbeiten wurden außerdem möglichst steril und auf Eis durchgeführt, um einen Abbau der RNA durch die faktisch omnipräsenten RNasen zu verhindern. Zu diesem Zwecke wurde außerdem, wenn möglich, den Reaktionsansätzen ein RNase-Inhibitor zugegeben. Das verwendete Wasser wurde zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DMPC) behandelt, wodurch die Histidinreste der RNasen carboxymethyliert und letztere somit inhibiert werden. Die Lagerung der RNA erfolgte kurzfristig bei -20°C, für längere Zeiträume hingegen bei -80°C.

# 4.3.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA wurden je nach Verwendungszweck verschiedene Methoden angewendet. Sollten sehr viele Proben bearbeitet werden, ohne dass eine sehr gute Reinheit der RNA nötig war, so erfolgte die RNA-Extraktion mit TRIzol<sup>®</sup> aus Midi-Schalen. Bei adhärenten Zellen wurden diese dazu mit Hilfe eines Zellschabers in kaltem PBS geerntet und mittels Zentrifugation bei 2.000 rpm für 2 min bei Raumtemperatur pelletiert. Bei Verwendung von Suspensions-Zellen wurden die Zellen mittels Zentrifugation mit 2.000 rpm bei 4°C für 2 min gewonnen, mit PBS resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde in beiden Fällen das Pellet in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> resuspendiert und für 15 s gevortext. Nach der anschließenden Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde für 5 min mit 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und danach die obere Phase abgenommen. Es folgte eine Evaluierung des abgenommenen Volumens und die Zugabe von 0,7 VT Isopropanol. Nach kurzem Vortexen wurde bei 4°C für 15 min inkubiert und anschließend mit 14.000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet durch Zugabe von 300 µl 70% Ethanol (mit DMPC-H<sub>2</sub>O), kurzes vortexen, Zentrifugation mit obigen Bedingungen und erneuter Abnahme des Überstandes zweimal gewaschen. Nach kurzem Antrockenen des Pellets wurde dieses in RNase-freiem Wasser gelöst.

War eine höhere Reinheit der RNA nötig, erfolgte die Isolierung mit Hilfe des *RNeasy*<sup>®</sup> *mini*-Kits. Die Isolierung erfolgte dabei anhand der Angaben des Herstellers (Qiagen, 2010), wobei die Zellen wie bereits für die TRIzol<sup>®</sup>-Extraktion beschrieben, mittels Zellschaber oder direkter Zentrifugation geerntet wurden. Zur Homogenisierung wurde die Zelllösung 9-mal mit einer Spritze mit 0,9 mm Kanüle aufgezogen und wieder ausgeblasen. Das Pellet wurde im mitgelieferten RNase-freien Wasser resuspendiert.

Um größere Mengen sehr sauberer und qualitativ hochwertiger DNA zu gewinnen, wurde eine Kombination aus TRIzol®-Extraktion und Extraktion mittels RNeasy® mini-Kit durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie bereits zuvor beschrieben geerntet. Das Pellet wurde dann mit 1 ml TRIzol<sup>®</sup> gründlich resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben, für 15 s gevortext und erneut 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 12.000 rpm an. Die obere Phase wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 VT 70% Ethanol (DMPC-Wasser) zugegeben. Diese Lösung wurde dann auf eine Säule des verwendeten Kits gegeben, welche danach für 30 s mit 12.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl Puffer RW1 auf die Säule gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation wie zuvor, der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt. Auf die Säule wurden dann 500 µl Puffer RPE gegeben und erneut wie zuvor zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt und erneut zentrifugiert, jedoch diesmal für 2 min. Die Säule wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 50 µl DMPC-H<sub>2</sub>O zur Elution zugegeben. Dazu wurde dann für 1 min mit 14.000 rpm bei RT zentrifugiert.

Alle RNA-Lösungen wurden nach der Isolierung spektralphotometrisch analysiert (4.3.2) und bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert. Wenn die RNA für spezielle Experimente verwendet werden sollte, wie beispielsweise für Expressionsanalyse-Studien, wurde zusätzlich eine Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1) durchgeführt, um anhand der Banden der ribosomalen RNA die Qualität der RNA zu bestimmen.

#### 4.3.2 Spektralphotometrische Analyse

Zur Ermittlung der Konzentration von RNA in einer wässrigen Lösung wurde spektralphotometrisch die Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Aus diesem Messwert wurde dann mittels folgender Formel die Konzentration (c) berechnet:  $c[\mu g / \mu l] = E \times 40 \times Verdünnungsfaktor \div 1.000$ 

Zur qualitativen Beurteilung der RNA wurde außerdem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und anschließend das Verhältnis (Ratio) zwischen  $E_{260nm}$  und  $E_{280nm}$  berechnet. Dieses Verhältnis kann zeigen, inwieweit die Lösung noch mit Phenol- oder Proteinresten verunreinigt ist. Der Wert für reine RNA-Präparationen liegt laut Literaturangaben (Nicholl, 2002) bei 2,0.

#### 4.3.3 Qualitätsbeurteilung der RNA

Das Verhältnis zwischen  $E_{260nm}$  und  $E_{280nm}$  (4.3.2) gibt lediglich an, ob die RNA-Lösung frei von Kontaminationen ist, erlaubt jedoch keine Aussage über den strukturellen Zustand der RNA. Um diesen zu ermitteln, wurde die RNA auf einem Agarose-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.2.1). Die Qualitätsmessung der Gesamt-RNA erfolgte dann über die ribosomale RNA (rRNA), welche mit bis zu 90% die größte Fraktion bei einer RNA-Extraktion darstellt. Dazu wurde das Verhältnis von 28S-RNA zu 18S-RNA ermittelt, welches bei intakter RNA einen Wert von 2,0 ergeben sollte (Becker et al., 2009). Allerdings ist dieser Wert auch abhängig vom Gewebe, aus welchem die RNA isoliert wurde, und zeigt mitunter deutliche Schwankungen (Palmer and Prediger, 2004).

Neuere Methoden ermitteln weitere Faktoren und berechnen daraus den RIN-Wert (*RNA integrity number*). In dieser Arbeit wurde der RIN-Wert für RNA bestimmt, welche für Expressionsanalysen verwendet wurde, die Messungen erfolgten an einem Bioanalyzer (Agilent Technologies) und wurden in Bad Nauheim von Dr. T. Böttger durchgeführt. Dabei bedeutet ein Wert von 10, dass eine intakte, nicht fragmentierte und nicht degradierte RNA von sehr hoher Qualität vorliegt, wohingegen ein Wert von 1 auf eine vollständig degradierte und fragmentierte RNA niedrigster Qualität hinweist (Becker et al., 2009).

#### 4.3.4 DNase-Verdau

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass nach der RNA-Extraktion auch geringe Mengen an DNA in der Lösung vorhanden sind, muss diese vor weiteren Experimenten in den meisten Fällen entfernt werden. Dies geschieht durch enzymatischen Abbau mit dem Enzym DNase I. Dazu wurde die RNase-freie DNase RQ1 verwendet. Nach Quantifizierung der RNA (4.3.2) wurden 3 µg RNA zusammen mit 3 µl RQ1-Puffer (10x) und 3 µl DNase I gemischt und mit DMPC-H<sub>2</sub>O auf 30 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 3 µl RQ1-Stop-Puffer und Inkubation für 10 min bei 65°C gestoppt. Diese Lösung wurde anschließend ohne weitere Behandlung verwendet oder bei -20°C gelagert.

# 4.3.5 cDNA-Synthese und RT-PCR

Da RNA nicht direkt mittels PCR amplifiziert werden konnte, musste sie zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dies geschah durch Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase. Zur cDNA-Synthese wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene Kits unterschiedlicher Firmen verwendet:

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche
GeneAmp RNA PCR Core Kit	Applied Biosystems
innuScript Reverse Transcriptase Kit	analytikjena
Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit	Roche

Alle Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet (analytikjena, 2009; AppliedBiosystems, 2000; Roche, 2007; Roche, 2008), als Template diente RNA, welche zuvor einem DNase-Verdau unterzogen worden war (4.3.4). In allen Fällen wurden als Primer *random hexamers* des jeweiligen Herstellers verwendet.

Die auf diese Weise gewonnene cDNA wurde anschließend 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und dann für RT- und *real-time*-PCR (4.1.8) verwendet. Für die RT-PCR wurde das zuvor beschriebene Protokoll für PCR-Reaktionen mit *Taq*-Polymerase verwendet (4.1.6.6), als Template dienten dabei 2  $\mu$ l cDNA, die beiden verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden so gewählt, dass sie auf unterschiedlichen Exons des zu untersuchenden Gens liegen und das Amplifikat eine Größe von 300 bp möglichst nicht überschreitet.

# 4.4 Arbeiten mit Proteinen

Generell wurden bei allen Arbeiten mit Proteinen steril angesetzte Lösungen verwendet. Weiterhin wurden alle Arbeiten möglichst auf Eis ausgeführt, um einen Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern. Zu diesem Zwecke wurden außerdem, wenn möglich, einer oder mehrere Protease-Inhibitoren verwendet. Die Aufbewahrung erfolgte für kürzere Zeiträume bei -20°C, für eine längere Dauer jedoch bei -80°C.

# 4.4.1 Isolierung von Proteinen

Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Verwendung von Maxi-Schalen. Wenn die Extraktion aus geringeren Zellzahlen (6-*well*, Midi-Schalen) erfolgte, wurden die Volumina der verwendeten Reagenzien entsprechend angepasst. Bei Verwendung adhärenter Zellen wurde das Medium aus den Gewebekulturschalen abgesaugt und die Zellen mit 20 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden erneut 10 ml kaltes PBS auf die Zellen gegeben und diese dann mit einem Zellschaber von der Gewebekulturschale gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 min bei 4°C mit 2.000 rpm zentrifugiert.

Wurden Suspensionszellen verwendet, erfolgte die Ernte durch Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen, nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. In beiden Fällen wurde dann der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 100 µl 1x RIPA-Puffer (enthält *complete mix mini* zur Inhibierung von Proteasen) resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min bei 4°C folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C mit 14.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und 5 µl für die Quantifizierung aliquotiert. Der Rest wurde 1:1 mit 4x Rotiload-Ladepuffer versetzt und dann sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

RIPA-Grundlösung (2x)	280 mM NaCl 20 mM Tris/HCl pH 8 2 mM EDTA pH 8 2% (v/v) Triton-x-100 0,2% (v/v) SDS
	0,2% (v/v) Deoxycholicacid (DOC)
complete mix mini	1 Tablette
Protease-Inhibitor Cocktail	gelöst in 1,5 ml MilliQ
RIPA-Puffer (1x)	1 VT RIPA-Grundlösung (2x)
	0,1 VT complete mix mini
	0,9 VT MilliQ

# 4.4.2 Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Quantifizierung beruht auf der Blaufärbung eines Proteinfarbstoffs in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Bradford, 1976). Bei der Isolierung der Proteine (4.4.1) wurden 5  $\mu$ l Protein-Lösung zur Bestimmung der Konzentration aliquotiert. Diese wurden nun 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Dann wurden 800  $\mu$ l 250 mM Tris/HCl pH 6,8 mit 200  $\mu$ l Rotiquant gemischt und 5  $\mu$ l der verdünnten Protein-Lösung zugegeben. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde am Spektralphotometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm (A<sub>595</sub>) gemessen. Für den Nullwert wurden statt der Protein-Lösung 5  $\mu$ l RIPA-Puffer (4.4.1) verwendet. Die Konzentration (c) der Protein-Lösung wurde dann mit der folgenden Formel berechnet:

 $c[\mu g / \mu l] = ((19,89 \times A_{595}) \div x \mu l \ Lösung) \times Verdünnungsfaktor$ 

#### 4.4.3 Western Blot

Beim Western Blot wurden die zuvor mittels SDS-PAGE (4.2.2) aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Durchgeführt wurde dies als *wet*-Elektroblot (Transfer in einem mit Puffer gefüllten Tank mittels Anlegen einer Spannung) mit einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran), welche zuvor für 10 s in Methanol aktiviert wurde. Eine schematische Darstellung des Transfer-Aufbaus ist in Abb. 7 gezeigt. Die Membran wurde auf die Größe des zu übertragenden Gelbereichs angepasst, weiterhin wurden je Blot sechs Whatman-Papiere entsprechender Größe zugeschnitten. Der Zusammenbau erfolgte in eiskaltem 1x Transfer-Puffer, um Luftblasen zwischen Transfermembran und Gel zu vermeiden. Dennoch vorhandene Luftblasen wurden durch seitliches Ausdrücken entfernt. Zusätzlich wurde ein Kühlelement in den Tank gegeben, welches auf -20°C vorgekühlt worden war, sowie ein Magnet-Rührstab. Der Tank selbst wurde zusätzlich in eine mit Eiswasser gefüllte Schale gestellt, welche anschließend auf einem Magnetrührer platziert wurde. So wurde eine ausreichende Kühlung während des für 1 h andauernden Blot-Vorgangs sichergestellt.



Abb. 7: Schematischer Aufbau der Blotapparatur beim *wet*-Elektro-Western-Blot. Die aufgrund des enthaltenen SDS negativ geladenen Proteinmoleküle wandern im Spannungsfeld zur Anode und werden dabei auf die PVDF-Membran übertragen. Dabei wird die Blotapparatur in einem mit 1x Transfer-Puffer gefüllten Tank eingespannt, so dass sie vollständig mit Flüssigkeit bedeckt ist.

10x Transfer-Puffer	250 mM Tris
	1,92 M Glycin
	10% Methanol

#### 4.4.4 Immunodetektion von Proteinen auf einer Trägermembran

Nach der Übertragung der Proteine vom SDS-PAGE-Gel auf die PVDF-Trägermembran konnten diese mit Antikörpern detektiert werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der immunologischen Reaktion eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) mit dem Antigen (Protein). Durch Verwendung eines gegen den Primärantikörper gerichteten zweiten Antikörpers (Sekundärantikörper), welcher außerdem an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, wird eine Signalverstärkung bei der Detektion erreicht. Dies beruht zum Einen darauf, dass dieser Sekundärantikörper mehrfach an den Primärantikörper bindet, zum Anderen aber auch auf der enzymatischen Aktivität des mit dem Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms. Dadurch erreicht diese Methode eine sehr hohe Sensitivität. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Primärantikörper, welche aus verschiedenen Spezies isoliert wurden, verwendet (Tab. 3), die benutzten Sekundärantikörper (Tab. 4) waren spezifisch gegen Antikörper bestimmter Spezies, wodurch mehrere Primärantikörper mit demselben Sekundärantikörper detektiert werden konnten.

Im Anschluss an die Übertragung der Proteine auf die Trägermembran wurde diese über Nacht bei 4°C in einem *blocking*-Puffer auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran in einer Primärantikörper-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundenen Antikörpers wurde anschließend 3-mal für je 5 min in PBST-Puffer gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Membran mit der Sekundärantikörper-Lösung, erneut für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Dann wurde wie zuvor 3-mal gewaschen, um überschüssigen und unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen.

PBS-Puffer (10x)	60 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,4
	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 M NaCl
	20 mM KCl

PBST-Puffer	1x PBS-Puffer	blocking-Puffer	1x PBST-Puffer
( <b>1x</b> )	0,1% Tween-20	(1 <b>x</b> )	5% (w/v) fettfreies Milchpulver

Primärantikörper-Lösung	1x PBST-Puffer
	0 - 5% (w/v) fettfreies Milchpulver (siehe Tab. 3)
Sekundärantikörper-Lösung	1x PBST-Puffer
	0 - 5% (w/v) fettfreies Milchpulver (siehe
	Tab. 4)

Anschließend erfolgte die Nachweisreaktion mit dem Immobilon Western HRP-Substrat, einem Chemilumineszenz-Substrat bestehend aus einer Luminol- und einer Peroxid-Lösung. Das enthaltene Luminol diente dabei der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) als Substrat und wurde vom Enzym oxidiert. Das oxidierte Luminol emittierte Licht und zeigte so den Ort der Antikörper-Bindung an. Dazu wurden 500 µl der Luminol-Lösung mit 500 µl Peroxid-Lösung gemischt und anschließend auf die Membran gegeben. Die Dokumentation erfolgte anschließend mittels Röntgenfilmen oder dem Versadoc-Dokumentationssystem. Dabei wurden in beiden Fällen unterschiedliche Belichtungszeiten zwischen 2 s und 10 min verwendet.

# 4.4.5 Erneute Immunodetektion von Proteinen (Strippen)

Sollte eine Membran mit verschiedenen Antikörpern untersucht werden, so wurden nach der ersten Immunodetektion die Antikörper durch sogenanntes Strippen wieder entfernt. Dazu wurde die Membran für 30 min in *Strip*-Puffer bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3-mal mit PBST-Puffer (4.4.4) gewaschen und konnte dann für eine erneute Immunodetektion verwendet werden.

1x Strip-Puffer	25 mM Glycin
	1 % SDS
	pH 2,0, mit HCl einstellen

# 4.5 Arbeiten mit Bakterien

# 4.5.1 Vermehrung und Lagerung

Die Vermehrung des verwendeten Bakterienstammes *Escherichia coli* XL1Blue erfolgte bei 37°C als Schüttelkultur in LB-Medium, oder auf LB-Agarplatten. Wurde eine höhere Bakteriendichte angestrebt, erfolgte die Vermehrung in TB-Medium (4.1.3.3). In allen Fällen wurden die entsprechenden Selektionsantibiotika (0) zugegeben.

LB-Medium (lysogeny broth)	10 g/l Bactotrypton 5 g/l Hefeevtrakt
	$10 \text{ g/l N}_2\text{Cl}$
LB-Agarplatten	10 g/l Bactotrypton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	15 g/l Agar
	Autoklavieren
	Zugabe des Antibiotikums und Gießen in Petrischalen

Zur längerfristigen Lagerung wurden Glycerol-*Stocks* angelegt. Dazu wurde eine LB-Bakteriensuspension mit Glycerol (87%) versetzt bis zu einer Endkonzentration von 15%. Anschließend wurde die Suspension dann bei -80°C eingelagert (Miller, 1987).

# 4.5.2 Transformation mit Plasmid-DNA

100  $\mu$ l kompetente Bakterien (aus einem Glycerol-*stock*, auf Eis aufgetaut) wurden mit 8  $\mu$ l eines Ligationsansatzes 4.1.6.5) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der für Transformation der Bakterien nötige Hitzeschock wurde durch 45 s Inkubation im auf 42°C aufgewärmten Wasserbad erreicht. Es folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis, danach wurden 100  $\mu$ l LB-Medium zugegeben und die Zellsuspension anschließend auf LB-Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum, 4.5.1) ausgestrichen. Dabei wurde der

Ansatz auf je zwei Agarplatten aufgeteilt. Für die Erste wurden 90% des Ansatzes verwendet, auf der Zweiten wurden die restlichen 10% des Ansatzes ausgestrichen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte einerseits durch das dem Agar zugegebene Antibiotikum, wodurch nicht transformierte Bakterien absterben sollten. In manchen Fällen wurde jedoch zusätzlich mittels Blau-Weiß-Selektion eine weitere Charakterisierung der Bakterienkolonien erreicht. In diesen Fällen wurden dem Agar zusätzlich das Laktose-Analogon IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) und der Farbstoff X-Gal [(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-β-D-galactosid] zugegeben. Für das Blau-Weiß-Screening wurden spezielle Plasmide verwendet, bei welchen das LacZ-Gen in der Polylinker-Region (MCS, multiple cloning site) vorlag. Kam es nicht zu einer DNA-Insertion, so lag das Gen intakt vor und es wurde das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase gebildet. Dieses Enzym spaltete X-Gal, wobei aus dem zuvor farblosen X-Gal ein blauer Farbstoff (5-Brom-4-Chlor-indigo) entstandt. Kolonien, welche blau gefärbt waren, haben somit ein Plasmid ohne die gewünschte DNA-Insertion aufgenommen. Bei erfolgreicher Ligation von Plasmid und DNA-Insert und erfolgreicher Aufnahme durch das Bakterium hingegen erschienen die Kolonien weiß. Das dem Agar zugesetzte IPTG diente zur Induktion der Bildung der β-Galactosidase, diente diesem Enzym aber nicht als Substrat. Eine abschließende Analyse der erhaltenen Kolonien erfolgte entweder mittels Plasmid-Mini-Prep (4.1.3.1) und anschließendem Restriktionsverdau (4.1.6.1), oder über colony-PCR (4.1.6.6).

#### 4.6 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien wurden in Sterilbänken durchgeführt. Die verwendeten Puffer, Medien und Glasmaterialien wurden autoklaviert oder steril filtriert, bei Plastikwaren wurde auf bereits vom Hersteller sterilisierte Produkte zurückgegriffen.

#### 4.6.1 Kultur der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in allen Fällen in einem begasten Brutschrank (5%ige CO<sub>2</sub>-Beimischung) bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre. Die Grundzusammensetzung aller verwendeten Zellkulturmedien bestand aus 10% (v/v) FCS , 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung und einem Basismedium (DMEM- oder RPMI 1640-Medium). Im Falle von RPMI 1640-Medium wurden außerdem noch folgende Zusätze verwendet (Angaben beziehen sich auf 500 ml fertiges Medium): 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml 100x NEAA-Lösung, 5 ml 100 mM Natriumpyruvat, 2 ml 100x Vitamine-Lösung und 0,5 ml 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol. Für die Haltung von adhärenten Zellen wurden beschichtete

Gewebekulturschalen benutzt, auf welchen die Zellen als Monolayer kultiviert wurden. Vor Erreichen der Konfluenz wurde das verwendete Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS-Puffer (4.4.4) gewaschen. Nach Absaugen des Puffers wurden die Zellen für 5 - 10 min mit Trypsin/EDTA-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch sich die Zellen aufgrund der proteolytischen Reaktion des Trypsins von den Kulturschalen ablösten. Um die Reaktion abzustoppen wurde frisches Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen in diesem mit Hilfe einer Glaspipette resuspendiert. Die Aufteilung auf neue Schalen erfolgte je nach Dichte und Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen im Verhältnis von 1:5 bis 1:12.

Trypsin/EDTA-Lösung			
Grundlösu	ngA	Gru	undlösung B
$Na_2HPO_4 \bullet 2 H_2O$	6 mM	CaCl <sub>2</sub>	0,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	MgSO <sub>4</sub>	0,4 mM
NaCl	137 mM	in 1/5 des	Endvolumens lösen
KCl	2,6 mM		
EDTA	3 mM		
Trypsin aus Rinderpankreas	0,125% (w/v)		
in 3/4 des Endvolumens lösen, pH 7,0 einstellen			
Lösungen A und B vereinen, auf Endvolumen auffüllen, steril filtrieren. Lagerung bei -20°C			

Bei Suspensionszellen war eine Ablösung mittels Enzym nicht nötig. Diese Zellen wurden in unbeschichteten Gewebekulturschalen kultiviert, bei zu hoher Dichte wurde das die Zellen enthaltende Medium abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm wurden die Zellen pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturschalen aufgeteilt, erneut unter Berücksichtigung der Zelldichte und der Wachstumsgeschwindigkeit. Die verwendeten Volumina an Zellkulturmedium, PBS-Puffer und Trypsin/EDTA-Lösung wurde an die jeweils verwendeten Kulturschalen angepasst und sind in Tab. 7 aufgelistet.

Pen/Strep-Lösung		Р	enicillin	10.000 units / ml
		S	treptomycin	10.000 units /ml
		1		
DMEM			RPMI-1640	
(Dulbecco's modified eagl	e medium)			
DMEM	13,38 g / l		RPMI	10,43 g / l
Na-Bicarbonat	3,7 g / l		Na-Bicarbonat	2 g / l
HEPES	25 mM		HEPES	25 mM

Kulturschale	Zellkulturmedium	1x PBS-Puffer	Trypsin/EDTA-Lösung
Maxi-Schale	20 ml	10 ml	2,5 ml
Midi-Schale	10 ml	5 ml	1 ml
6-well Platte	2 ml	1 ml	500 μl
24-well Platte	1 ml	500 μl	250 μl
48-well Platte	500 µl	250 µl	100 µl
96-well Platte	100 µl	50 µl	50 µl

**Tab. 7:** Verwendete Volumina an Zellkulturmedium, PBS-Puffer und Trypsin/EDTA-Lösung in Abhängigkeit der verwendeten Zellkulturschalen.

#### 4.6.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde entweder eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer (Tiefe 0,2 mm; Fläche 0,0625 mm<sup>2</sup>; Umrechnungsfaktor 8•10<sup>4</sup>) verwendet, oder das Countess<sup>TM</sup>-Zellzählgerät. Bei Verwendung der Zählkammer wurden adhärente Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkulturschalen wie unter 4.6.1 beschrieben abgelöst und durch Zentrifugation mit anschließender Abnahme eines Teils des Überstandes aufkonzentriert. Suspensionszellen wurden direkt zur Zentrifugation verwendet. Von der Zellsuspension wurden dann in beiden Fällen 20 µl in die Zählkammer gegeben und anschließend der Mittelwert der Zellzahl von 16 Kleinstquadraten ermittelt. Unter Berücksichtigung des Umrechnungsfaktors konnte damit die Zellzahl pro ml Zellsuspension ermittelt werden.

Wurden die Zellen mittels Countess<sup>TM</sup>-Zellzählgerät gezählt, erfolgte die Vorbereitung der Zellen wie für die Zählkammer beschrieben, jedoch wurden die Zellen zuvor mit Trypanblau angefärbt. Vor den eigentlichen Messungen wurde das Gerät mittels eines mitgelieferten Standards kalibriert. Für die Messung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt und danach in die zum Gerät passenden Objektträger gegeben. Das Gerät ermittelte dann neben der Zellzahl auch die Zellgröße sowie anhand der Trypanblau-Färbung die Zahl lebender und toter Zellen.

# 4.6.3 Lagerung (Einfrieren) und Auftauen der Zellen

Die längerfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA (bei adhärenten Zellen) wie zuvor beschrieben abgelöst und mit 10 ml Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt, bei Suspensionszellen wurden diese direkt mit dem gesamten Kulturmedium in Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte dann in beiden Fällen durch Zentrifugation für 5 min mit 500 rpm bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein spezielles 2 ml Einfriergefäß (*Kryotube*) überführt.

Danach wurde 1 ml Einfriermedium zugegeben und gut gemischt. Die verschlossenen Einfriergefäße wurden in speziellen Einfrierbehältern bei -80°C eingefroren, welche eine konstante Abkühlung von etwa 1°C pro Minute erlaubten. Nach 24 Stunden wurden die Einfriergefäße dann in Behältern mit flüssigem Stickstoff gelagert. Für eine kurzfristigere Aufbewahrung (einige Monate) verblieben die Zellen bei -80°C.

Einfriermedium (10 ml)	4,5 ml Zellkulturmedium
	4 ml FCS
	0,5 ml DMSO

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, mussten diese wieder aufgetaut und das enthaltene DMSO entfernt werden. Dazu wurden die Einfriergefäße bei Raumtemperatur aufgetaut und die Zellsuspension zusammen mit 8 ml Zellkulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und gemischt. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min mit 500 rpm bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in die entsprechende Zellkulturschale gegeben.

#### 4.6.4 Tet-off-System

Um gezielt die Expression eines in eukaryotische Zellen eingebrachten Gens aktivieren beziehungsweise reprimieren zu können, wurde für diese Arbeit ein tet-off-System verwendet. Bei diesem System wird die Expression des entsprechenden Gens durch Zugabe von Tetracyclin bzw. Doxycyclin (ein Tetracyclin-Derivat mit längerer Halbwertszeit) zum Zellkulturmedium blockiert. Durch Entfernen des Tetracyclins wird die Expression aktiviert. Das zugrunde liegende Prinzip wurde erstmals im Jahr 1992 beschrieben (Gossen and Bujard, 1992). Die maximalen Expressionslevel sind vergleichbar mit den Expressionsleveln die mit starken Säugetier-Promotoren (z.B. CMV) erreicht werden (Yin et al., 1996). Im Unterschied zu anderen induzierbaren Systemen weist das Tet-System eine hohe Spezifität auf, wodurch pleiotrope Effekte und eine unspezifische Induktion vermieden werden (Clontech, 2003). Das System besteht aus zwei Komponenten, dem Regulator-Protein und einem Response-Plasmid. Das Regulatorprotein basiert dabei auf dem Tet-Repressor, im Falle des tet-off-Systems besteht dieses 37 kDa Protein aus einer Fusion der ersten 207 Aminosäuren des Tet-Repressor-Proteins aus E. coli und den 127 C-terminalen Aminosäuren der VP16 Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus. Durch diese Fusion wird aus dem transkriptionellen Repressor ein transkriptioneller Aktivator. Dieser wird auch als Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (tTA) bezeichnet, er befindet sich auf dem sogenannten Regulator-Plasmid, welches zusätzlich eine Antibiotikaresistenz beinhaltet.

Aufgrund der durch das Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz können stabil transfizierte Zellklone selektiert werden. Für diese Arbeit wurde dazu das Plasmid pT-AN verwendet, welches ein Puromycin-Resistenzgen aufwies.

Die zweite Komponente, das Response-Plasmid, trägt das gewünschte Gen unter Kontrolle *tetracyclin-response*-Elements (TRE). Alle für diese eines Arbeit verwendeten response-Plasmide sind Derivate des Plasmids pBI-eGFP. Dieses enthält das TRE, welches aus sieben direkten Wiederholungen des 42 bp langen Tet-Operators (tetO) besteht und direkt und downstream von zwei CMV-Minimal-Promotoren (PminCMV) liegt. Dem up-Minimalpromotor fehlen die starken enhancer-Elemente welche normalerweise mit dem CMV-Promotor assoziiert sind. Dadurch wird ein niedriges Level an Hintergrund-Expression erreicht. Einer der Promotoren ist für die Expression von eGFP verantwortlich, der Zweite für die Expression des jeweils einklonierten Gens.

# 4.6.5 Transiente Transfektion und stabile Integration von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurden je nach Zelllinie verschiedene Transfektionsmethoden und -reagenzien verwendet. Bei transienten Transfektionen wurden die Zellen ohne weitere Selektion nach 48 h für weitere Versuche verwendet. Eine Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Dazu wurde eine Kontroll-Zellkulturplatte mit einem GFP-Vektor transfiziert und der Anteil der Zellen mit GFP-Signal bezogen auf die Gesamtzellzahl nach 48 h ermittelt.

Um DNA stabil ins Genom der Zelllinien zu integrieren, erfolgte nach der Transfektion der Zellen eine Selektion mittels eines geeigneten Selektionsmarkers. Dazu wurden bei der Transfektion Vektoren verwendet, welche neben der einzubringenden DNA auch noch eine Antibiotikum-Resistenz kodierten. Die transfizierten Zellen wurden dann diesem Antibiotikum ausgesetzt, so dass Zellen, welche die DNA nicht oder nicht dauerhaft aufgenommen hatten, nach kurzer Zeit abstarben. Dann konnten die aus den überlebenden Zellen entstandenen Zellklone entnommen und eingehend charakterisiert werden. Die Konzentration des Antibiotikums musste in allen Fällen zuvor durch Erstellung einer sogenannten *death curve* individuell für jede Zelllinie ermittelt werden. Dazu wurden die untransfizierten Zellen auf 6-*wells* ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums kultiviert. So konnte die Konzentration bestimmt werden, bei welcher nach einer Woche alle untransfizierten Zellen abgestorben waren.

Um tatsächlich einzelne Zellklone statt eines Pools an transfizierten Zellen zu erhalten, wurden verschiedene Methoden verwendet. Bei adhärenten Zellen wurden die Zellen nach der Transfektion dünn ausgesät und anschließend mit dem Antibiotikum selektiert. Aus den stabil transfizierten Zellen gehen in dieser Zeit rundliche Zellkolonien hervor, welche dann mittels Pipette abgenommen und in separate Zellkulturschalen überführt wurden. Im Falle von Suspensionszellen war dies nicht möglich, hier wurden die Zellen nach der Transfektion auf 96-*wells* sehr dünn ausgesät, so dass rechnerisch nur 0,5 Zellen pro *well* enthalten waren. Dadurch wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit erreicht, dass nur eine stabil transfizierte Zelle pro *well* vorhanden war. Bei sehr niedrigen Transfer-Effizienzen wurde die Zahl der Zellen pro *well* erhöht.

#### **4.6.5.1 Jet-Pei**<sup>™</sup>

In den meisten Fällen erfolgten Transfektionen mit dem Polymer-basierten (lineares Polyethylenimin) DNA Transfektionsreagenz jetPEI<sup>™</sup>. Es verbindet eine in vielen Zelllinien hohe Transfektionseffizienz mit einer geringen Toxizität und einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Neben dem Transferreagenz wurde außerdem noch eine sterile 150 mM NaCl-Lösung benötigt, welche durch Sterilfiltration selbst hergestellt wurde.

Die Zahl der Zellen pro *well*, die eingesetzten Mengen an DNA und jetPEI<sup>TM</sup>-Lösung sowie die benötigte Menge 150 mM NaCl-Lösung wurden aus Tabellen aus dem Herstellerprotokoll entnommen (Polyplus, 2011). Je nach Zelllinie musste das Verhältnis von DNA (in µg) zur Menge an jetPEI<sup>TM</sup>-Lösung (in µl) sowie das Volumen des Transfektionsansatzes angepasst werden. Die entsprechenden Werte wurden zum Teil ebenfalls aus dem Herstellerprotokoll oder einer speziellen Datenbank (www.polyplus-transfection.com) des Herstellers entnommen.

Zur Transfektion wurde die entsprechende DNA-Menge in 150 mM NaCl-Lösung gegeben, kurz gevortext und durch kurzes zentrifugieren am Reaktionsgefäß-Boden gesammelt. Dann wurde die entsprechende Menge jetPEI<sup>TM</sup>-Lösung ebenfalls in 150 mM NaCl-Lösung gegeben, kurz gevortext und am Boden des Reaktionsgefäßes durch kurzes zentrifugieren gesammelt. Beide Lösungen wurden anschließend vereinigt, wobei immer die jetPEI<sup>TM</sup>-Lösung zur DNA-Lösung gegeben wurde. Nach kurzem Vortexen und kurzer Zentrifugation wie zuvor, erfolgte eine Inkubation für 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellkulturschale mit den zu transfizierenden Zellen gegeben und durch sanftes Schwenken der Schale anschließend mit dem Zellkulturmedium vermischt. Die Auswertung erfolgte dann nach 24 h bis 48 h, bei empfindlich reagierenden Zellen wurde zur weiteren Verminderung der Toxizität das Zellkulturmedium nach 8 h ausgetauscht.

## 4.6.5.2 Calcium-Phosphat-Präzipitation

Bei dieser Transfektionsmethode bindet die zu übertragende DNA an ausfallendes Calciumphosphat, welches sich in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat bildet. Die gebildeten Kristalle sinken mitsamt der DNA auf die zu transfizierenden Zellen und werden von diesen durch Endocytose aufgenommen. Der gesamte Vorgang ist von einer Vielzahl an Paramtern abhängig (z.B. Menge und Reinheit der Plasmid-DNA, pH-Wert, etc.) und bedeutet Stress für die Zellen, weswegen nach 24 h ein Austausch des Zellkulturmediums durchgeführt wurde. Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion in einer 6-well Schale. Dazu wurden 5,4 µg DNA mit ddH<sub>2</sub>O auf 183,6 µl aufgefüllt. Meist wurde jedoch nur 1 µg des zu transfizierenden Vektors verwendet und die fehlende Menge mit einem Leervektor, im Falle dieser Arbeit pBSK, aufgefüllt, da sonst oft negative Effekte beobachtet werden konnten. Im Anschluss wurden 21,6 µl 10x HEBS-Puffer zugegeben und kurz gevortext. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 10,8 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> woraufhin sofort gevortext und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach 11 min wurde erneut kurz gevortext und dann je well 216 µl Transfektionsansatz zum Zellkulturmedium gegeben und die Schalen zum Verteilen der Kristalle kurz geschwenkt. Nach 24 h erfolgte ein Austausch des Zellkulturmediums, die Zellen wurden außerdem mit 1x PBS gewaschen.

10 x HEBS-Puffer	1,37 M NaCl
	0,2 M HEPES
	7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,2, sterilfiltrieren

#### 4.6.5.3 Elektroporation und Nukleofektion

Das Prinzip der Elektroporation beruht darauf, dass in der Zellmembran durch Spannungspulse reversible Poren erzeugt werden, wodurch die Zellmembran für DNA permeabel wird (Neumann et al., 1982; Wong and Neumann, 1982; Zimmermann, 1982). Da die Zellen nicht adhärent vorliegen müssen wie beispielsweise bei der Calciumphosphat-Methode, bietet sich die Elektroporation speziell für Suspensionszellen an. Nachteilig ist, das nennenswerte Transfektionsraten nur unter Bedingungen erreicht werden können, welche gleichzeitig auch einen großen Teil der Zellen abtöten. Bei der Elektroporation sind eine Reihe von Parametern zu beachten, darunter beispielsweise die kritische Feldstärke (KF), welche erforderlich ist, um den elektrischen Durchbruch der Membran herbeizuführen. Diese wurde anhand der Zellgröße, welche zuvor im Mikroskop

bestimmt wurde, nach folgender Formel näherungsweise für die jeweilige Zelllinie berechnet. Dabei beträgt die Durchbruchspannung der Membran bei 20°C etwa 1 V. Die einzustellende Spannung ergibt sich dann durch Multiplikation der kritischen Feldstärke mit dem Elektrodenabstand der Elektroporations-Küvette.

#### KF[V/cm] = Durchbruchspannung Membran[V]/(0,75\*Zelldurchmesser[cm])

Sofern die entsprechenden Bedingungen nicht bereits in der Literatur zu finden waren, wurde versucht, die geeigneten Elektroporationsbedingungen über ein Optimierungs-Protokoll individuell zu ermitteln. Die Vorgehensweise dabei richtete sich nach den Angaben einer entsprechenden Hersteller-Anleitung (Eppendorf, 2006). Die Elektroporation wurde mit dem BioRad Gene Pulser x Cell durchgeführt.

Bei der Nukleofektion handelt es sich prinzipiell um eine Elektroporation, bei welcher jedoch spezielle Lösungen dafür sorgen, dass die DNA vom Cytoplasma in den Zellkern gelangt. Für die Nukleofektion wurde der Nucleofector II verwendet. Da für eine der verwendeten Zelllinien keine Erfahrungswerte bekannt waren, mussten die entsprechenden Parameter mittels eines Optimierungsprotokolls (Amaxa, 2005) ermittelt werden. Danach folgten die Versuche den Angaben der spezifischen Herstellerprotokolle (Amaxa, 2007; Amaxa, 2008; Amaxa, 2009).

#### 4.6.6 Anchorage independent growth (colony formation assay)

Bei diesem *in-vitro* Assay wird die morphologische Transformation von Zellkolonien semi-quantitativ ermittelt. Eine solche Transformation ist assoziiert mit einigen phänotypischen Veränderungen, beispielsweise dem Verlust der Kontaktinhibition und der Möglichkeit der Zellteilung ohne feste Verankerung an einer Oberfläche. Letzteres kann über einen *anchorage independent growth assay* ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde dazu ein Softagar-Assay verwendet.

Für den Assay wurden ein sogenannter *base agar* und ein *top agar* benötigt. Mit dem *base agar* wurde zuerst eine dünne Schicht Agar auf den Zellkulturplatten aufgebracht. Dazu wurde 1% Agar in der Mikrowelle aufgeschmolzen und anschließend in einem Wasserbad auf 40°C abgekühlt. Gleichzeitig wurde 2x DMEM-Medium im Wasserbad auf 40°C erwärmt. Nachdem beide Lösungen die gewünschte Temperatur erreicht hatten, wurden sie im Verhältnis 1:1 vereinigt und anschließend 1,5 ml dieser Lösung pro *well* auf 6-*wells* gegeben. Nach dem Aushärten des Agars konnten die Platten bei 4°C für 1 Woche gelagert werden.

Auf den *base agar* wurde der *top agar* gegeben, welcher eine niedrigere Agar-Konzentration aufwies. Dazu wurde 0,7% Agar in der Mikrowelle aufgeschmolzen und im Wasserbad auf 40°C abgekühlt. Ebenso wurde erneut 2x DMEM-Medium im Wasserbad auf 40°C erwärmt. Die Platten mit dem *base agar* wurden außerdem für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung geerntet und die Zellzahl bestimmt. Pro *well* wurden 5.000 Zellen benötigt. Die Zellsuspension wurde auf 200.000 Zellen pro ml eingestellt. Dann wurden 0,1 ml der Zellsuspension in ein 15 ml Gefäß überführt. Zum Ausplattieren wurden 3 ml 2x DMEM mit 3 ml 0,7% Agar in dem 15 ml Gefäß mit den Zellen vermischt und sofort 1,5 ml der Lösung pro *well* auf den *base agar* gegeben. Eventuell entstandene Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Die Inkubation der Zellen erfolgte dann wie üblich bei 37°C im Inkubator. Für das *tet-off*-System wurde in diesem Experiment Doxycyclin aufgrund der deutlich höheren Halbwertszeit verwendet. Zur Nachlieferung wurde die nötige Menge Doxycyclin in 50 µl DMEM alle 2 Tage auf die Zellen gegeben, um über Diffusion eine konstante Nachlieferung von Doxycyclin zu gewährleisten.

Um die Kolonien anzufärben wurde Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT) verwendet. Die Stocklösung bestand aus 5 mg INT gelöst in 50% Methanol. Davon wurden 0,2 ml pro *well* auf die Kolonien gegeben und über Nacht im Inkubator gefärbt. Die anschließende Auszählung erfolgte automatisch am VersaDoc (Option *colony counting*).

# 4.7 Genexpressionsanalyse (expression profiling)

Für globale Analysen der Genexpression wurde ein DNA-Microarray verwendet. Dieser diente dazu, die Menge der mRNA der einzelnen Gene in isolierter Gesamt-RNA zu ermitteln. Dadurch konnten Veränderungen der Genexpression beispielsweise aufgrund der Überexpression eines Gens ermittelt werden. Im Rahmen der Arbeit wurde dafür der Gesamt-Transkript-basierte *Affymetrix genechip mouse gene 1.0 ST array* verwendet. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus (Pradervand et al., 2008). Im Gegensatz zu vielen anderen Arrays erfolgt beim Gene 1.0 ST eine DNA-DNA-Hybridisierung (statt der üblichen DNA-RNA-Hybridiserung), wodurch die Zahl der falsch positiven Ergebnisse reduziert wird (Eklund et al., 2006). In Vergleichsstudien mit anderen DNA-Microarrays hat sich gezeigt, dass der verwendete Array für die Durchführung von Genexpressionsanalysen hervorragend geeignet ist (Pradervand et al., 2008). Auf dem Array sind 28.853 Gene über durchschnittlich 27 Sonden repräsentiert, welche die gesamte Länge des Gens abdecken, wodurch eine vollständigere und genauere Ermittlung der

Genexpression erfolgt, als dies in 3'-basierten Arrays möglich ist. Für den Array wurden nur sicher annotierte Gene und Exon-Sequenzen verwendet (Affymetrix, 2007; Pradervand et al., 2008).

Nach der Isolierung und qualitativen sowie quantitativen Analyse der RNA erfolgte die eigentliche Durchführung des *expression profilings* als Auftragsarbeit durch T. Böttger am MPI in Bad Nauheim, die anschließende bioinformatorische Aufbereitung der Rohdaten wurde weitgehend von M. Bartkuhn (JLU Gießen) übernommen. Die Proben wurden mit Biotin gelabelt, *labeling* und Hybridisierung folgten den Herstellerangaben im *genechip WT terminal labeling and hybridization user manual* in Kombination mit dem *Ambion WT expression* Kit.

#### 4.7.1 Microarray-Analyse

Die Expressionsarrays wurden mittels AltAnalyze analysiert (Emig et al., 2010). Dabei wurde der RMA-Algorithmus zur Normalisierung verwendet. Als Schwellenwerte für die Identifikation signifikant deregulierter Gene wurden ein p-Wert<0.05 und ein differentieller Regulationseffekt größer 2-fach (in mindestens einem der Kontraste) gewählt. Die mittels Altanalzye berechneten Expressionswerte wurden anschließend in die statistische R/BioConductor-Umgebung für die statistische und grafische Weiterverarbeitung geladen (R Development Core Team, 2009), welche mittels eigens dafür konzipierter Skripte durchgeführt wurden.

# 4.8 Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation wird verwendet, um in-vivo festzustellen, ob ein Protein an bestimmte Stellen im Chromatin gebunden ist. Das zugrunde liegende besteht darin, dass die zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Prinzip DNA-Protein-Assoziationen mittels Formaldehyd fixiert werden (crosslink). Dabei reagieren die Amino- und Imino-Gruppen bestimmter Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin) und der DNA (hauptsächlich Adenin und Cytosin) mit dem hochreaktiven bipolaren Formaldehyd unter Bildung einer Schiffschen Base (McGee and von Hippel, 1975a; McGee and von Hippel, 1975b). Nach der Isolierung und Fragmentierung des Chromatins werden die Fragmente, welche an das Protein gebunden sind, durch einen für das Protein spezifischen Antikörper präzipitiert und dadurch isoliert. Die an die DNA gebundenen Proteine werden anschließend mittels Proteinase K-Behandlung und Hitzeinwirkung wieder entfernt (Solomon and Varshavsky, 1985). Anschließend kann die Identität der jeweiligen DNA-Sequenzen ermittelt werden und durch Abgleich mit der Genomsequenz somit die Bindestellen des Proteins im Genom bestimmt werden.

# 4.8.1 Isolierung des Chromatins

Zu Beginn wurden die Zellen in Maxi-Schalen kultiviert, bis sie eine Dichte von 10<sup>7</sup> Zellen pro Zellkulturschale erreicht hatten. Nach Erreichen der gewünschten Dichte wurde das Medium abgesaugt und durch 20 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Der *crosslink* erfolgte durch Inkubation der Zellen für 10 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit 555,5 µl 37% Formaldehyd (Endkonzentration: 1%). Durch Zugabe von 2 ml 1,25 M Glycin und Inkubation auf einem Schüttler für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Vernetzungsreaktion abgestoppt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimalig mit eiskaltem 1x PBS-Puffer gewaschen. Zur Ernte der Zellen wurde 1 ml 1x PBS-Puffer, welcher zuvor mit 1 mM PMSF versetzt wurde, zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst. Mittels Zentrifugation für 5 min mit 2.000 rpm bei 4°C wurden die Zellen pelletiert, anschließend in 1x SDS-Lysepuffer (1,5 ml je 10<sup>7</sup> Zellen) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert.

1x SDS-Lysepuffer	1% SDS
	10 mM EDTA
	50 mM Tris/HCl pH8,1
	10% (v/v) complete mix mini (siehe4.4.1)
	1 mM PMSF

Die Fragmentierung (Sonifizierung) des Chromatins erfolgte in 15 ml Hartplastikgefäßen im Bioruptor (15x *high energy*, 30 s Impuls, 30 s Pause), wodurch Chromatinfragmente mit einer Größe von 200 - 700 bp entstanden. Durch Zentrifugation für 10 min mit 14.000 rpm bei 4°C erfolgte die Abtrennung von Zellbruchstücken. Das so gewonnene Chromatin wurde entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

# 4.8.2 Chromatin-Immunopräzipitation

12,5 ml des isolierten Chromatins wurden als *input* bei 4°C auf bewahrt. Für die eigentliche Immunopräzipitation wurden 30  $\mu$ l Agarose-A-*beads* zur Äquilibrierung in 50 ml Dilutionspuffer gegeben und bei 4°C für 3 min mit 2.500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um unspezifisch an die *beads* bindende Protein-DNA-Moleküle aus dem Chromatin zu entfernen (*preclearing*) wurden 125  $\mu$ l der Chromatinlösung mit 1.125  $\mu$ l Dilutionspuffer vermischt, zu den äquilibrierten *beads* gegeben und rotierend für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min mit 2.000 rpm bei 4°C wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und die *beads* verworfen.

1x Dilutionspuffer	0.01% SDS
<b>F</b>	1,1% Triton-X-100
	1,2 mM EDTA
	16,7 mM Tris/HCl pH 8,1
	167 mM NaCl
	1 mM PMSF

Dann wurden die jeweiligen Antikörper zugegeben und die Ansätze über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde eine Probe mit Hase-IgG-Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden 40 µl Agarose-A-*beads* wie bereits beschrieben mit 500 µl Dilutionspuffer äquilibriert, zu der Chromatin-Antikörper-Lösung gegeben und für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert, wodurch die gebildeten Immunkomplexe gebunden werden sollten. Die *beads* wurden durch Zentrifugation für 2 min mit 2.000 rpm bei 4°C präzipitiert und anschließend nacheinander mit je 1 ml Niedrigsalzpuffer, Hochsalzpuffer, LiCl-Puffer und zweimal mit TE-Puffer gewaschen. Dabei bestand ein Waschvorgang stets aus einer 5 minütigen rotierenden Inkubation bei 4°C, anschließender Zentrifugation für 3 min bei 2.000 rpm und Abnehmen und Verwerfen des jeweiligen Waschpuffers.

Niedrigsalzpuffer	0,1% SDS		Hochsalzpuffer	0,1% SDS
	1% Triton-X-100			1% Triton-X-100
	2 mM EDTA			2 mM EDTA
	20 mM Tris/HCl pH 8,1			20 mM Tris/HCl pH 8,1
	150 mM NaCl			500 mM NaCl
	1 mM PMSF			1 mM PMSF
		1		
LiCl-Puffer	0,25 M LiCl		<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris
	1% NP40			1 mM EDTA
	1% Deoxycholat			pH 8
	1 mM EDTA			1 mM PMSF
	10 mM Tris/HCl pH 8,1			
	1 mM PMSF			

Die *beads* und der aufbewahrte *input* wurden mit 100  $\mu$ l TE-Puffer versetzt, dann wurde jeweils 1  $\mu$ l RNase A (Stammlösung 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5  $\mu$ l 10% SDS und 2,5  $\mu$ l Proteinase K zugegeben und bei 37°C für 4 h inkubiert. Die Auflösung des *crosslinks* erfolgte dann durch Inkubation im Wasserbad bei 65°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Proben für 5 min mit 2.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, 100  $\mu$ l des Überstandes abgenommen und die

63

DNA mit dem *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and gel band purification* Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Auswertung der ChIP-Proben erfolgte über individuelle PCR, *real-time*-PCR oder ChIP-Seq.

### 4.8.3 ChIP-seq

Das ChIP-Sequenzierung Verfahren relativ neue der verbindet die Chromatin-Immunopräzipitation mit einer Hochdurchsatz-Sequenzierung (Barski et al., 2007; Johnson et al., 2007; Mikkelsen et al., 2007; Robertson et al., 2007). Dazu erfolgt nach dem ChIP eine massive parallele Sequenzierung der präzipitierten DNA-Fragmente, wobei zwar die theoretische Länge der zu sequenzierenden Fragmente in der Regel etwa zwischen 200 bp und 1 kbp liegt, jedoch meist nur die ersten 25 bis 50 Nukleotide dieser Fragmente sequenziert werden (Jothi et al., 2008). Anschließend werden die so ermittelten Sequenzen mit der Genomsequenz abgeglichen. Die Bindestellen des im ChIP untersuchten Proteins weisen dann nach der Sequenzierung gegenüber anderen genomischen Regionen eine erhöhte Anzahl gemappter Sequenzierung-reads auf. Bei einer punktuellen Bindung des Proteins ergeben sich dann definierte peaks nach dem Abgleich der ermittelten Sequenzen mit der Genomsequenz, welche den Ort der Bindung mit einer hohen Auflösung definieren. Die eigentliche Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von W. van Ijcken im center for biomics an der Erasmus MC Universität in Rotterdam durchgeführt, die Auswertung der Rohdaten erfolgte durch M. Bartkuhn (JLU Gießen).

Die zusammengeführten und aufkonzentrierten Chromatin-Immunopräzipitate wurden mittels eines Illumina HiSeq am BIOMICS-Zentrum des Erasmus MC in Rotterdam massiv parallel sequenziert. Die Herstellung der zu sequenzierenden Bibliotheken wurde mittels Standardmethoden durchgeführt. Diese Bibliotheken wurden entsprechend der Herstellerangaben in Form von "36-bp single reads" sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit BOWTIE gegen einen prä-assemblierten Index des murinen Genoms mm9 aligniert (Langmead et al., 2009). Dabei wurden nur diejenigen Sequenzen weiterhin verwendet, die eindeutig nur ein einziges mal im Genom aligniert werden konnten.

Um innerhalb der jeweiligen Datensätze diejenigen genomischen Bereiche zu identifizieren, welche mit den untersuchten Faktoren spezifisch interagieren, wurden verschiedene Algorithmen angewendet, wobei MACS die robustesten Daten lieferte (Zhang et al., 2008). Dabei wurden signifikant gebundene Regionen im Vergleich zur Sequenzierung der CTCFL-ChIP aus Zellen, die kein CTCFL-Transgen beinhalteten, betrachtet. Dabei wurden im Weiteren Binderegionen mit einem Poisson-P-Wert  $< 10^{-5}$  und einer FDR (*false discovery rate*) < 0.05 betrachtet.

#### 4.8.4 Analyse der ChIP-Seq-Profile

Es wurden von RefSeq stammende Genom-Annotationen für das Maus Genom mm9 verwendet (bezogen von der UCSC Genome Browser Homepage: http://genome.ucsc.edu/cgibin/hgGateway?db=mm9). Die relative Assoziation von CTCF/CTCFL-Binderegionen mit den Annotationen Exon, Intron, intergenisch, TSS (Transkriptions-Start-Stelle), TES (Transkriptions-End-Stelle), TSS upstream wurde durch Überlapp-Analyse bestimmt, wobei der Vergleich zur relativen Häufigkeit der verschiedenen Annotationen ein Maß dafür darstellt, ob bestimmte Annotationen gehäuft im Bereich der Binderegionen vorkommen. Für die gleichzeitige Darstellung der ChiPseq-Daten in Form einer heatmap wurden die Intervall +/- 3kb alle Bindedaten in einem von um ungefähr 60000 CTCF/CTCFL-Bindestellen herum mittels des in der Software SegMiner enthaltenen k-means Algorithmus sortiert und grafisch dargestellt. Die H3K4me3-Daten aus NIH3T3-L1-Zellen (Mikkelsen et al., 2010) stammen aus der öffentlich zugänglichen GEO-Datenbank (GSM535755) und wurden als FASTQ-Dateien geladen und wie oben beschrieben prozessiert.

Sequenzmotive wurden mittels der MEME-Suite, insbesondere mittels MEME-ChIP identifiziert (Machanick and Bailey, 2011) und deren signifikante Anreicherung innerhalb von CTCF/CTCFL-Binderegionen geprüft, indem nach Identifikation aller im Genom vorkommenden Instanzen des jeweiligen Motivs der Überlapp mit den Binderegionen oder 30.000 randomisierten Binderegionen berechnet und miteinander verglichen wurde um einen empirischen P-Wert berechnen zu können. Die Darstellung der Motive erfolgte als WebLogo (Crooks et al., 2004).

# 5 Ergebnisse

# 5.1 Klonierung verschiedener Maus-CTCFL und Mensch-CTCFL Vektoren

Um CTCFL sowohl in humanen Zelllininen als auch in Maus-Zelllinien exprimieren und auch nachweisen zu können, wurde eine Vielzahl unterschiedlicher CTCFL-Vektoren benötigt. Neben der einfachen Expression sollte durch diese Vektoren auch die Möglichkeit gegeben sein, endogenes von exogenem CTCFL unterscheiden zu können. Da zu Beginn der Arbeit die Zahl der CTCFL-Antikörper beschränkt war und speziell für murines CTCFL keine kommerziellen funktionierenden Antikörper zur Verfügung standen, ergab sich außerdem die Notwendigkeit, für einen Nachweis auf Proteinebene zusätzlich eine markierende DNA-Sequenz (tag) zu verwenden. Nicht zuletzt sollte eine einfache Detektion stabil transfizierter Zellen sowie eine regulierbare Induktion der CTCFL-Expression über ein sogenanntes *tet-off* System ermöglicht werden. Eine schematische Darstellung der jeweiligen Klonierung ist im Anhang hinterlegt.

Aus dem Vektor pCI-Neo-BORIS (F. Sleutels, Erasmus MC, Rotterdam) wurde mit den Oligonukleotidprimern S025 (header mit EcoRI-Schnittstelle; bindet am Start-Codon von mCTCFL) und S026 (header mit XhoI-Schnittstelle, bindet am Stop-Codon von mCTCFL) CTCFL amplifiziert, in pGEM-T-easy kloniert und mit pGEM-T-mCTCFL bezeichnet. Für die spätere Unterscheidung zwischen endogenem und exogenem CTCFL wurde eine zusätzliche Schnittstelle im Vergleich zur Ausgangssequenz eingefügt, ohne dabei die Aminosäuresequenz zu ändern. Durch PCR mit den Oligonukleotidprimern S025 und S027 wurde ein Teil der CTCFL-Sequenz amplifiziert, aufgrund der zwei mismatches des Primers S027 entstand im PCR-Produkt eine Kpn2I-Schnittstelle. Durch Einfügen in den Vektor pGEM-T-easy entstand der Vektor pGEM-T-mCTCFL-Kpn2I. Die Ursprungssequenz im Vektor pGEM-T-mCTCFL wurde durch Verdau entfernt und durch die veränderte Sequenz pGEM-T-mCTCFL-Kpn2I aus dem Vektor ersetzt, woraus der Vektor pGEM-T-mCTCFLmut hervorging (Abb. 40, S. 139 im Anhang).

Zur besseren Detektierbarkeit in Western Blots wurde ein FLAG-tag angefügt. Durch Verdau des Vektors pCDN3-FLAG-chCTCF (J. Leers, JLU Gießen) wurde die chCTCF-Sequenz (*chicken*-CTCF, Hühner-CTCF) entfernt und in den geöffneten Vektor die durch Verdau von pGEM-T-mCTCFLmut gewonnene mutierte mCTCFL-Sequenz eingefügt. Daraus ging der Vektor pCDNA3-FLAGmCTCFLmut hervor (Abb. 8 sowie Abb. 41 auf S. 140 im Anhang).

Um eine regulierbare Expression von CTCFL zu ermöglichen, wurde das *tet-off-*System der Firma Clontech verwendet. Das entsprechende *response-*Plasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pBI-eGFP hergestellt. Dieses wurde durch Verdau geöffnet und das durch Verdau aus pCDNA3-FLAGmCTCFLmut gewonnene FLAG-mCTCFLmut eingefügt, wodurch der Vektor pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut entstand (Abb. 8 sowie Abb. 42 auf S. 140 im Anhang). Als Regulator-Plasmid wurde pTA-N verwendet. Zusammen erlaubten diese eine Tetracyclin- beziehungsweise Doxycyclin-abhängige Expression der mutierten und mit einem FLAG-tag versehenen mCTCFL-Sequenz sowie aufgrund des bidirektionalen Promotors des Ausgangsplasmids die Expression von eGFP (*enhanced green fluorescent protein*, verbessertes grün fluoreszierendes Protein).

Zur Erstellung von Kontrollvektoren wurde das FLAG-tag aus den Vektoren pCDNA3-FLAGmCTCFLmut und pCDNA3-FLAG-hBORIS durch Verdau entfernt. Die religierten Vektoren wurden mit pCDNA3-mCTCFLmut (murines CTCFL) und pCDNA3-hCTCFL (humanes CTCFL) bezeichnet (Abb. 8, sowie Abb. 43 auf S. 141 im Anhang).



Abb. 8: Klonierte und verwendete Expressionsvektoren für murines (m) und humanes (h) CTCFL in eukaryotischen Zelllinien. Zur besseren Übersicht wurde eine lineare Darstellung der Vektoren mit den wichtigsten Eigenschaften gewählt, wobei alle in der gleichen Länge skaliert wurden. Die tatsächliche Größe ist unter dem Vektornamen angegeben. Verwendete Abkürzungen: Amp = Ampicillin-Resistenz, Neo = Neomycin-Resistenz, P = Promotor,  $P_{min}$  = Minimalpromotor, TRE = Tetracyclin-*response-element*, CMV = Cytomegalovirus, eGFP = *enhanced green fluorescent protein* (verbessertes grün fluoreszierendes Protein), SV 40 = Simian virus 40 (Affenvirus 40).

Als Alternative zum FLAG-tag wurde außerdem ein mCTCFL-Vektor mit einem N-terminalen HA-tag erstellt. Dazu wurde TIF2 durch Verdau aus dem Ausgangsvektor pBK-CMV-HA-TIF2 entfernt und das aus pCDNA3-FLAGmCTCFLmut durch Verdau gewonnene mCTCFLmut-Insert eingefügt, wodurch der Vektor pBK-CMV-HAmCTCFLmut entstand (Abb. 44, S. 141 im Anhang).

# 5.2 Test verschiedener Antikörper zur Detektion von mCTCFL in Western Blots

Kommerziell erhältliche CTCFL-Antikörper wurden von den Herstellern bisher nur auf ihre Spezifität in Bezug auf humanes CTCFL getestet. Ob sie auch murines CTCFL im Western Blot detektieren, musste daher zuerst untersucht werden. Weiterhin wurden von F. Sleutels (Erasmus MC, Rotterdam) vier Antikörper zur Verfügung gestellt, welche spezifisch gegen mCTCFL gerichtet waren. Außerdem wurde ein FLAG-Antikörper getestet.

# 5.2.1 CTCFL-Protein ist nach Transfektion in NIH3T3 und HEK 293-T im Western Blot nachweisbar

Da keine Maus-Zelllinie bekannt war, welche CTCFL exprimiert, wurden für die Versuche transient mit pCDNA3-FLAGmCTCFLmut transfizierte NIH3T3-Zellen verwendet. Um den Erfolg der Transfektion zu überprüfen, wurde außerdem mit peGFP-C2 cotransfiziert. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz nach 48 Stunden Inkubation der Zellen erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie und zeigte, dass etwa 10% der Zellen transfiziert wurden und ein auf die Expression von eGFP zurückzuführendes grünes Fluoreszenz-Signal zeigten (Abb. 9). Eine Kontrolle, bei welcher NIH3T3-Zellen nur mit dem peGFP-C2-Vektor und pCDNA3 transfiziert wurde, um einen möglichen toxischen Effekt von CTCFL zu untersuchen, zeigte etwa die gleiche Transfektionseffizienz.





Abb. 9: NIH3T3 können mit GFP exprimierender DNA transfiziert werden und zeigen deutliche eGFP-Signale. Für die transiente Transfektion mit Hilfe von jetPEI wurden die Vektoren pCDNA3-FLAGmCTCFLmut und peGFP-C2 (linke Seite) verwendet. Zur Kontrolle toxischer Effekte wurden auch NIH3T3-Zellen mit den Vektoren pCDNA3 und peGFP-C2 (rechte Seite) transfiziert.

pcDNA3 + peGFP-C2

Aus den Zellen der beiden Transfektionen wurde Protein aufgereinigt und damit anschließend die verschiedenen CTCFL-Antikörper in Western-Blots getestet. Sowohl mit dem Antikörper CTCFL6 als auch mit dem FLAG-Antikörper konnte in der Proteinaufreinigung der Transfektion mit pCDNA3-FLAGmCTCFLmut und peGFP-C2 in der erwarteten Höhe ein Signal detektiert werden, welches in der Kontroll-Probe (pCDNA3 + peGFP-C2) nicht detektiert wurde (Abb. 10). Beide Antikörper waren somit zum Nachweis von mCTCFL in Western Blots geeignet.



Abb. 10: FLAG-CTCFL kann in transfizierten NIH3T3 in Western Blots mit dem anti-CTCFL Antikörper CTCFL6 (A) und einem FLAG-Antikörper (B) spezifisch nachgewiesen werden. Zum Test der Antikörper wurden die Zellen mit pCDNA3-FLAGmCTCFLmut und peGFP-C2 transfiziert, als Kontrolle erfolgte eine Transfektion mit den Vektoren pCDNA3 und peGFP-C2. Aus diesen Zellen wurde nach 48 Stunden Inkubation Protein aufgereinigt und je 20 µg davon in einem 10 % SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der Proteine mit den beiden verwendeten Antikörper (schwarze Pfeile).

Zum Nachweis der Spezifität des gegen hCTCFL gerichteten Antikörpers ab18337 und des *tet-off*-Systems wurden HEK 293-T transient mit pBI-eGFP-FLAG-hBORIS und pTA-N transfiziert und aufgereinigtes Protein für einen Western Blot verwendet. Eine Schale der Zellen wurde mit, eine weitere Schale ohne Tetracyclin kultiviert. Damit sollte die generelle Funktionalität des *tet-off*-Systems untersucht werden. Ein spezifisches Signal für hCTCFL-Protein wurde nur ohne Tetracyclin beobachtet (Abb. 11). Als Ladekontrolle diente GAPDH. Der Antikörper ist somit zum Einen spezifisch, zum Anderen wurde deutlich gezeigt, dass das *tet-off*-System generell funktioniert, da unter Kulturbedingungen mit Tetracyclin kein CTCFL auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte.


Abb. 11: hCTCFL kann nach Induktion in HEK 293-T-Zellen im Western Blot nachgewiesen werden. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit den Vektoren pBI-eGFP-FLAGhCTCFL und pTA-N für zwei Tage mit (+) und ohne (-) Tetracyclin im Medium kultiviert. Nach der Proteinaufreinigung und gelelektrophoretischen Auftrennung im SDS-PAGE-Gel erfolgte die Immunodetektion von hCTCFL mit dem Antikörper ab18337 (schwarzer Pfeil). Als Ladekontrolle diente GAPDH (roter Pfeil).

#### 5.2.2 CTCFL nach *in-vitro*-Translation nachweisbar

Um die Spezifität des FLAG-Antikörpers und des Antikörpers CTCFL6 zu untersuchen, wurden in-vitro Translationen mit verschiedenen Vektoren durchgeführt und diese dann für Western Blots verwendet. Dabei wurden sowohl mCTCFL als auch hCTCFL verwendet, jeweils mit und ohne FLAG-tag. Als Kontrolle wurde außerdem FLAG-CTCF benutzt, sowie ein Ansatz der *in-vitro* Translation ohne zugegebenen Vektor. Der Antikörper CTCFL6 zeigte in den Western Blots in allen Fällen zwei Signale zwischen 58 kDa und 90 kDa, welche jedoch auch ohne Verwendung von Vektor-DNA auftraten (Abb. 12A). Zusätzlich wurde bei Verwendung der Vektoren pCDNA3-FLAGmCTCFLmut und pCDNA3-mCTCFLmut ein weiteres Signal bei etwa 90 kDa detektiert. Die Höhe der Bande entspricht der Laufhöhe der vermeintlichen CTCFL-Banden im Western Blot der transienten Transfektion von NIH3T3-Zellen mit pCDNA3-FLAGmCTCFLmut (5.2.1). Humanes CTCFL als auch chCTCF werden nicht detektiert. Mit diesem Antikörper konnte somit spezifisch mCTCFL nachgewiesen werden, ein negativer Einfluss des FLAG-tags konnte nicht beobachtet werden. Auch bei Verwendung des FLAG-Antikörpers konnten im Western Blot unspezifische Nebenbanden beobachtet werden (Abb. 12B). Spezifische Signale ergaben sich bei Verwendung der Vektoren pCDNA3-FLAGmCTCFLmut und pCDNA3-FLAG-hBORIS auf Höhe von etwa 90 kDa, sowie des Kontroll-Vektors pCDNA3-FLAG-chCTCF bei etwa 130 kDa. Die Höhe des FLAG-chCTCF-Signals entsprach dabei den bereits zuvor in der Arbeitsgruppe mit spezifischen CTCF-Antikörpern beobachteten Signalen. Die im Falle von pCDNA3-FLAGmCTCFLmut zu beobachtende CTCFL-Bande lag auf gleicher Höhe wie das zuvor mit dem Antikörper CTCFL6 detektierte Signal.



Abb. 12: Verschiedene CTCFL-Varianten konnten nach *in-vitro*-Translation im Western Blot detektiert werden. Aus *in-vitro*-Translationen hervorgegangenes Protein wurde in einem 10% SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels *wet*-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die bei der *in-vitro*-Translation verwendeten Vektoren sind in der Abbildung angegeben. A: Immundetektion von CTCFL mit dem Antikörper CTCFL6. B: Immundetektion von FLAG-CTCFL (schwarzer Pfeil) und FLAG-CTCF (roter Pfeil) mit Anti-FLAG-Antikörper.

Humanes CTCFL konnte außerdem mit dem Antikörper ab18337 detektiert werden (nicht gezeigt). Weiterhin wurden verschiedene Bedingungen für die Verwendung der Antikörper im Western Blot getestet, um die optimalen Bedingungen für spätere Experimente zu ermitteln. Für den Antikörper CTCFL6 erwies sich eine Verdünnung von 1:10.000 in PBST-Puffer mit 5% Milchpulver (w/v) als optimal, der FLAG-Antikörper lieferte die besten Ergebnisse in einer 1:1.000 Verdünnung, ebenfalls in PBST-Puffer mit 5% Milchpulver.

## 5.3 Herstellung und Charakterisierung stabiler *tet-off*-CTCFL-Zelllinien

Durch Transfektion und anschließende Selektion über Fluoreszenzmarker und Antibiotikaresistenzen wurden sowohl humane als auch murin Zelllinien stabil mit der CTCFL-cDNA jeweiligen einem *tet-off*-Hintergrund in verändert. Die weitere Charakterisierung erfolgte dann mittels Fluoreszenzmikroskopie, RT-PCR und Western Blot. In allen verwendeten Zelllinien wurde zuvor über RT-PCR eine endogene CTCFL-Expression ausgeschlossen. Die Selektion erfolgte zuerst über die durch pTA-N vermittelte Puromycin-Resistenz.

#### 5.3.1 Herstellung stabiler humaner Zelllinien

Als humane Zelllinien wurden HEK 293-T und THP-1 ausgewählt. Beide zeigten keine endogene CTCFL-Expression in der RT-PCR. THP-1-Zellen wurde außerdem verwendet, um einen möglichen Einfluss einer CTCFL-Expression auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen zu untersuchen.

## 5.3.2 Ein HEK 293-T-Klon zeigt induzierbare CTCFL-Expression auf RNA-Ebene

Nach Transfektion mit pBI-eGFP-FLAG-hBORIS und pTA-N und daran anschließender Inkubation mit Puromycin wurden stabil transfizierte HEK 293-T-Klone selektiert und mittels Mikroskopie weiter charakterisiert. Klone welche ein eGFP-Signal zeigten wurden mittels RT-PCR auf die Expression von hCTCFL getestet. Bei Klon 21 wurde in der RT-PCR eine spezifische Bande für hCTCFL beobachtet (Abb. 13A). Eine schwächere Bande war zu erkennen, wenn die Zellen mit Doxycyclin kultiviert wurden, dieser basale Level an CTCFL-Expression wurde aufgrund der Herstellerangaben erwartet. Eine erfolgreiche cDNA-Synthese wurde über den Nachweis von  $\beta$ -Actin sichergestellt. Im anschließenden Western Blot konnte in diesem Klon kein hCTCFL-Protein detektiert werden, wohingegen für die Positivkontrolle (Protein aus transient transfizierten HEK 293-T-Zellen, 5.2.1) ein eindeutiges Signal beobachtet werden konnte (Abb. 13B).



Abb. 13: hCTCFL ist als RNA, jedoch nicht als Protein nachweisbar. HEK 293-T-Zellen wurden mit pBI-eGFP-FLAGhBORIS und pTA-N transfiziert und mit Puromycin selektiert. Klon 21 wurde 48 h mit (+Dox) oder ohne (-Dox) Doxycyclin inkubiert. Anschließend wurden RNA und Protein isoliert. A. RT-PCR mit Oligonukleotidprimern für β-Actin sowie hCTCFL. Als Template diente die cDNA von Klon 21, im Falle der Positivkontrolle wurde pBI-eGFP-FLAGhBORIS benutzt. B. Western Blot mit Klon 21 vor (+Dox) und nach (-Dox) Induzierung der CTCFL-Expression. Das aufgereinigte Protein wurde in einem 10% SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immundetektion von CTCFL (schwarzer Pfeil) erfolgte mit dem Antikörper CTCFL6, für die Ladekontrolle (roter Pfeil) wurde ein Als Positivkontrolle GAPDH-Antikörper verwendet. wurde Proteinextrakt aus transient mit pBI-eGFP-FLAGhBORIS transfizierten HEK 293-T verwendet, als Negativkontrolle dienten untransfizierte HEK 293-T.

## 5.3.3 THP-1-Zellen zeigen nach transienter Transfektion eine Expression von CTCFL auf RNA-Ebene

Im Unterschied zu den bisher verwendeten Zelllinien handelte es sich bei THP-1 um Suspensionszellen. Für die Transfektion wurden verschiedene Bedingungen mit jetPEI getestet (Tab. 11, S. 142 im Anhang), jedoch konnten mit diesem Reagenz keine zufriedenstellenden Ergebnisse bezüglich der Transfektionseffizienz erzielt werden. Daher wurde die Transfektion mittels Elektroporation und Nukleofektion durchgeführt. Speziell die Nukleofektion wurde aufgrund der Angaben des Herstellers zu den erreichbaren Transfektionseffizienzen intensiv verwendet. Neben dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll wurden zahlreiche weitere Einstellungen untersucht. In allen Fällen blieb die Zahl der transfizierten Zellen sehr gering bei gleichzeitig hoher Zahl an abgestorbenen Zellen (über Propidiumiodid-Färbung ermittelt). Die besten Ergebnisse wurden letztendlich mit dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll erreicht (Abb. 14) Transfizierte Zellen zeigten aufgrund der Transfektion mit dem Vektor pMAXGFP eine grüne Fluoreszenz. Aufgrund der Färbung mit Propidiumiodid erschienen tote Zellen rötlich. Bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen war die Transfektionseffizienz niedrig, berücksichtigt man die Zahl der toten und lebenden Zellen, dann zeigt sich, dass fast alle lebenden Zellen ein GFP-Signal zeigten und somit erfolgreich transfiziert wurden.



Abb. 14: Die höchste Transfereffizienz für THP-1 konnte nach Nukleofektion mit dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll V001 beobachtet werden, bei gleichzeitig hoher Zahl abgestorbener Zellen. THP-1-Zellen wurden mittels Nukleofektion mit der Einstellung V001 und dem Vektor pMAXGFP transfiziert. Nach 2 Tagen Inkubation erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung, dabei wurden tote Zellen zusätzlich durch Zugabe von Propidiumiodid rot angefärbt.

Auch die Elektroporation unter verschiedenen Bedingungen war für die Transfektion von THP-1 nicht besser geeignet. Daher wurde als nächstes eine transiente Transfektion mittels Nukleofektion durchgeführt, um zu untersuchen, ob CTCFL auf RNA- und Protein-Ebene nachweisbar ist und nicht bereits zum Absterben der Zellen führt. Neben der Transfektion der Zellen mit hCTCFL (pBI-eGFP-FLAG-hBORIS) wurde auch mit GFP (pMAXGFP) transfiziert, als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde dabei durch die Transfektion mit dem Vektor pMAXGFP ermittelt. Nach Isolierung

der RNA wurde cDNA hergestellt und diese mit CTCFL-spezifischen Oligonukleotidprimern in einer RT-PCR verwendet. Über β-Actin-spezifische Oligonukleotidprimer konnte dabei nachgewiesen werden, dass in allen drei Fällen cDNA vorlag, jedoch nur nach Transfektion mit hCTCFL eine deutliche Bande nach Verwendung der CTCFL-spezifischen Oligonukleotidprimer zu beobachten war (Abb. 15A). Aus den Zellen wurde außerdem auch Protein aufgereinigt und nach Auftrennung in einem SDS-PAGE-Gel für einen Western Blot verwendet. Zwar zeigte die GAPDH-Kontrolle, dass in allen Fällen Protein vorhanden war, es konnte jedoch mit Ausnahme der Positivkontrolle (Protein aus transient mit hCTCFL-transfizierten HEK 293-T-Zellen) kein Signal für CTCFL detektiert werden (Abb. 15B).



Abb. 15: Humanes CTCFL kann nach transienter Transfektion in THP-1 auf RNA-Ebene, aber nicht auf Protein-Ebene, nachgewiesen werden. THP-1-Zellen wurden mittels Nukleofektion transient mit GFP (pMAXGFP) oder hCTCFL (pBI-eGFP-FLAGhCTCFL) transfiziert, nach zwei Tagen Inkubation wurden RNA und Protein isoliert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte THP-1 verwendet. Zur Ermittlung der Transfektioneffizienz erfolgte die Transfektion mit dem Vektor pMAXGFP. utr = untransfiziert A. RT-PCR mit cDNA der transfizierten Zellen zum Nachweis von hCTCFL. Für zusätzliche Negativkontrollen wurde als *template* Wasser verwendet (H<sub>2</sub>O) sowie außerdem die RNA der transfizierten Zellen nach DNase-Verdau. Für die Positivkontrolle wurde der Vektor pBI-eGFP-FLAGhCTCFL verwendet. B. Western Blot mit den Proteinextrakten aus den transfizierten und untransfizierten THP-1-Zellen sowie Proteinextrakt von transient mit hCTCFL transfizierten HEK 293-T-Zellen (5.3.2). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von je 20  $\mu$ g Protein in einem 10% SDS-PAGE-Gel erfolgte die Übertragung auf eine PVDF-Membran mittels *Wet*-Blot und die anschließende Immundetektion von FLAG-CTCFL (schwarzer Pfeil) mit dem Anti-FLAG-Antikörper. Als Ladekontrolle diente GAPDH (roter Pfeil).

#### 5.3.4 Herstellung stabiler Maus-Zelllinien

Wie bereits bei den humanen Zelllinien wurden auch bei den Maus-Zelllinien sowohl eine adhärente und leicht zu transfizierende Zellinie (NIH3T3) als auch eine hämatopoetische Zelllinie (RMB-3) verwendet, um stabile mCTCFLmut exprimierende Zellen herzustellen, bei welchen die Expression reguliert werden kann.

# 5.3.5 In RMB-3-Zellen konnte nur eine niedrige Transfektionseffizienz erreicht werden

Bei RMB-3 handelt es sich wie auch bei THP-1 um Suspensionszellen. Da keine Literaturangaben zur Transfektion dieser Zellen mittels jetPEI vorlagen wurden verschiedene Bedingungen getestet (Tab. 11, S. 142 im Anhang), jedoch konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse mit diesem Reagenz erzielt werden. Wie bereits bei THP-1 wurde versucht, die Zellen mittels Elektroporation beziehungsweise Nukleofektion zu transfizieren. Es lagen allerdings keine optimierten Protokolle für die Elektroporation oder die Nukleofektion vor. Die optimalen Transfektionsbedingungen für die Nukleofektion sollten daher mittels eines speziellen Optimierungsprotokolls des Herstellers und dem Vektor pMAXGFP ermittelt werden. Abgestorbene Zellen wurden durch Färbung mit Propidiumiodid ermittelt. Auch im besten Falle war die Transfereffizienz sehr niedrig bei gleichzeitig hoher Zahl an abgestorbenen Zellen (Abb. 16B). Ähnlich verhielt es sich mit dem Versuch der Optimierung der Elektroporationsbedingungen (Abb. 16A). Es waren nur wenige transfizierte Zellen zu finden. Bei den gezeigten Aufnahmen handelt es um ausgewählte Bildausschnitte, bei einer zufälligen Auswahl der Bildausschnitte war nur selten ein GFP-Signal zu sehen.

A
Elektroporation

Durchlicht
GFP

Propidiumiodid

Image: State of the state of

Abb. 16: RMB-3 Zellen können mit niedriger Effizienz transient mittels Elektroporation (A) und Nukleofektion (B) transfiziert werden. Nach der Transfektion mit dem Vektor pMAXGFP wurden die Zellen zwei Tage inkubiert. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurden die toten Zellen zusätzlich durch Propidiumiodid sichtbar gemacht. Die jeweils angefärbten Zellen befinden sich bei den unterschiedlichen Aufnahmen an leicht verschobenen Positionen, da es sich bei RMB-3 um Suspensionszellen handelt. Für die Aufnahmen wurden Bildauschnitte mit Zellen ausgewählt, welche ein GFP-Signal zeigten.

Transfektions-Methoden Mit allen drei wurde versucht. stabile Zellklone mit pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut und pTA-N herzustellen. Dabei konnten einige Puromycin-resistente Klone selektiert werden, jedoch zeigte keiner der Klone ein GFP-Signal in der Fluoreszenzmikroskopie oder eine Bande für mCTCFLmut in RT-PCRs.

#### 5.3.6 Stabil CTCFL exprimierende Klone aus NIH3T3-Zellen

Bei NIH3T3 handelt es sich um eine mittels jetPEI leicht zu transfizierende, adhärent transienten wachsende Zelllinie. Nach Transfektionen mit dem Vektor pCDNA3-FLAGmCTCFLmut konnte außerdem FLAG-mCTCFL mittels RT-PCR und Western Blot nachgewiesen werden. Die Transfektion zur Herstellung stabiler Zellklone erfolgte daher mittels jetPEI mit den Vektoren pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut und pTA-N. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach fünf Tagen wurde dem Medium zur Selektion stabiler Klone das Antibiotikum Puromycin zugesetzt. Nach der Selektion über Puromycin wurden nach weiteren 7 Tagen 100 resistente Klone selektiert und weiter vermehrt.

#### 5.3.6.1 Mehrere Puromycin-resistente Klone zeigen GFP-Expression

Die nähere Charakterisierung der Klone erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie. Bei einem Teil der resistenten Klone konnte nach Induktion ein eGFP-Signal beobachtet werden (Abb. 17). Insgesamt zeigten von 100 Puromycin-resistenten Klonen 25 Klone eine induzierbare eGFP-Expression (Tab. 12, S. 142 im Anhang).



+ Tetracyclin

- Tetracyclin

**Abb. 17: Stabile Klone exprimieren nach Induktion (-Tetracyclin) eGFP.** Die nach Transfektion mit pTA-N und pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut selektierten Puromycin-resistenten NIH3T3-Klone 5 und 95 wurden für zwei Tage mit (+) und ohne (-) Tetracyclin kultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, wobei das Vorhandensein eines eGFP-Signals aufgrund des bidirektionalen Promotors in pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut zusätzlich auf eine FLAG-mCTCFL-Expression hinweist.

#### 5.3.6.2 Klone zeigen induzierbare mRNA-Expression von FLAG-CTCFL

Die weitere Charakterisierung der Klone mit eGFP-Signal erfolgte über RT-PCR. Dabei zeigte sich, dass nicht alle Klone welche eine eGFP-Expression aufwiesen, tatsächlich auch FLAG-mCTCFL exprimierten (Tab. 12, S. 142 im Anhang). Bereits in der RT-PCR konnte beobachtet werden, dass bei den Klonen oft auch ohne Induktion eine Expression von CTCFL nachweisbar war, was über *real-time*-PCR bestätigt werden konnte. Im Vergleich zu untransfizierten Zellen war bei den Klonen auch im uninduzierten Zustand ein niedriges Level von CTCFL nachzuweisen (Abb. 18C). Auf diese klonspezifische Basalexpression (*leakyness*) wird bereits vom Hersteller hingewiesen, sie war je nach Klon unterschiedlich stark ausgeprägt und wurde bei der Auswahl der Klone für spätere Experimente berücksichtigt.

Für spätere Experimente wurden verschiedene Normalisierungsgene (GAPDH, B2M, TBP, GUSB, HPRT, β-Actin und RPL13A) auf ihre Expression in NIH3T3-Zellen getestet. Die stärksten Signale ergaben sich dabei für GAPDH und β-Actin, welche dann in den weiteren Experimenten verwendet wurden (Abb. 18B). Zusätzlich wurden auch Oligonukleotidprimer für CTCF getestet, welche ebenfalls eine deutliche Bande ergaben, welche etwas schwächer ausfiel als die CTCFL-spezifische Bande. Da die Effizienz der jeweiligen Primerpaare jedoch unterschiedlich war, konnte daraus nicht abgeleitet werden, ob CTCFL stärker exprimiert war als CTCF.

Für eine quantitative Beurteilung der Induktion wurden *real-time*-PCRs durchgeführt (Abb. 18C). Die höchste relative Expression zeigte dabei Klon 60 in induziertem Zustand. Etwas mehr als die Hälfte der Expression von Klon 60 konnte in den Klonen 34 und 39, und etwa ein Viertel in den Klonen 11, 17 und 90 beobachtet werden. In untransfizierten Zellen wurde CTCFL nicht detektiert. In allen Klonen ist aufgrund der *leakyness* in uninduziertem Zustand CTCFL auf niedrigem Niveau nachweisbar. Um die Größenordnung der CTCFL-Induktion zu untersuchen, wurde die Änderung der CTCFL-Expression zwischen induzierten und uninduzierten Zellen der Klone ermittelt (Abb. 18D). Dabei zeigte sich, dass Klon 60 zwar die höchste CTCFL-Expression aufwies, jedoch im Vergleich zum uninduzierten Zustand nicht die stärkste Induktion. Diese wurde in Klon 34 beobachtet, in welchem die CTCFL-Expression nach der Induktion knapp 15-fach stärker ist als im uninduzierten Zustand. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Experimente meist Klon 34 verwendet, da in diesem eine hohe Gesamtexpression, eine niedrige *leakyness* und die daraus resultierende stärkste Induktion der CTCFL-Expression kombiniert vorlagen.



Abb. 18: Eine induzierbare Expression von CTCFL konnte in mehreren Klonen beobachtet werden. Es wurde cDNA der Klone 11, 17, 34, 39, 60 und 90 sowie von untransfizierten NIH3T3 (utr) hergestellt, jeweils von uninduzierten und induzierten Zellen bzw. im Falle der untransfizierten NIH3T3 von Zellen, welche mit oder ohne Doxycyclin (Dox) kultiviert wurden. Die untersuchten Klone (K) sind in den Abbildungen angegeben. A. RT-PCR mit Oligonukleotidprimern für CTCFL sowie  $\beta$ -2-Microglobulin (B2M). B. Vergleich der FLAG-mCTCFLmut-Expression mit der Expression einiger Normalisierungsgene sowie mit CTCF über RT-PCR. Verwendet wurden Oligonukleotidprimer für CTCFL, GUSB, GAPDH, TBP, RPL13A, HPRT, B2M und CTCF, für die Wasserkontrolle (H<sub>2</sub>O) wurde statt cDNA Wasser in den Reaktionsansatz gegeben. C. *Real-time*-PCR mit Oligonukleotidprimern für CTCFL. Ermittelt wurde die relative CTCFL-Expression, zur Normalisierung wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Der CTCFL-Wert von uninduziertem Klon 90 wurde gleich 1 gesetzt. D. *Real-time*-PCR zur Ermittlung der Stärke der CTCFL-Induktion. Die Werte wurden gegen  $\beta$ -Actin normalisiert und die Werte der uninduzierten Klone gleich 1 gesetzt.

#### 5.3.6.3 In den Klonen ist CTCFL auch auf Protein-Ebene vorhanden

Der Nachweis von FLAG-mCTCFL-Protein mittels Western Blot in ausgewählten Klonen erfolgte mit einem gegen das FLAG-tag gerichteten Antikörper (Abb. 19). Neben den für FLAG-mCTCFL erwarteten Banden mit einer Laufhöhe von etwa 90 kDa konnten spezifische Signale auch bei geringeren Laufhöhen beobachtet werden (blaue Pfeile in der Abbildung) zwischen 69 kDa und 90 kDa sowie zwischen 58 kDa und 42 kDa. Diese Banden konnten auch mit dem Antikörper CTCFL6 detektiert werden (nicht gezeigt). Ob es sich dabei um Abbauprodukte oder unvollständig in die DNA eingebaute CTCFL-Fragmente handelt, wurde nicht verifiziert. Anhand der mit einem GAPDH-Antikörper durchgeführten Ladekontrolle wurde deutlich, dass die Menge an FLAG-mCTCFL-Protein innerhalb der Klone stark variierte und nicht direkt korreliert mit der Menge an RNA im jeweiligen Klon (Abb. 18). So zeigte Klon 60 die höchste relative Expression auf RNA-Ebene, jedoch deutlich weniger Protein als Klon 11.



Abb. 19: FLAG-mCTCFL-Protein (schwarzer Pfeil) konnte im Western Blot in allen untersuchten Klonen nachgewiesen werden, in einigen Fällen werden zusätzliche spezifische Banden detektiert (blaue Pfeile). Die Zellen der verwendeten Klone wurden für zwei Tage mit (uninduziert) und ohne (induziert) Tetracyclin inkubiert und anschließend Protein extrahiert. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt aus untransfizierten NIH3T3-Zellen verwendet. Je 20 µg Protein wurden elektrophoretisch in einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels *Wet*-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immundetektion von FLAG-CTCFL erfolgte mit dem Antikörper CTCFL6. Für die Ladekontrolle wurde ein GAPDH-Antikörper verwendet (roter Pfeil). Der Western Blot wurde von T. Jox (Gießen) im Rahmen einer Bachelorarbeit angefertigt.

## 5.3.6.4 Ein Maximum der CTCFL-Expression ist zwei Tage nach Induktion feststellbar

Um die Kinetik der Induktion zu ermitteln, wurden mehrere Schalen mit Zellen von Klon 34 kultiviert. Nach der Induktion der FLAG-mCTCFL-Expression wurden RNA und Protein nach verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Anschließend wurde mittels RT-PCR, real-time-PCR und Western Blot die Veränderung der FLAG-mCTCFL-Expression ermittelt (Abb. 20). Zur Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet, zusätzlich wurde zur Ermittlung der *leakyness* in diesem Klon direkt nach Austausch des Mediums (Tag 0) sowohl Protein als auch RNA gewonnen. Beim Vergleich der Expression zwischen untransfizierten NIH3T3-Zellen und RNA des Klons 34 an Tag 0 ist erneut die leakyness des tet-off-Systems zu beobachten. Auf Proteinebene ist für den Proteinextrakt von Tag 0 keine CTCFL-Bande detektierbar. Das erste spezifische Signal für FLAG-mCTCFL ist im Western Blot nach einem Tag Induktion zu erkennen. Sowohl bezogen auf die Menge an RNA als auch an Protein war nach zwei Tagen ohne Doxycyclin der höchste Wert zu sehen. Nach diesem Zeitpunkt sank in beiden Fällen die Menge wieder ab und stabilisierte sich dann nach Tag 4. Auch nach sieben Tagen waren sowohl RNA als auch Protein noch auf hohem Niveau nachweisbar. In weiteren Experimenten wurde auch nach acht Wochen ohne Doxycyclin noch Protein und RNA nachgewiesen (nicht gezeigt). Aufgrund der Ergebnisse wurde die CTCFL-Expression für nachfolgende Experimente mindestens für zwei Tage induziert.



Abb. 20: Die Expression von FLAG-mCTCFL erreicht in Klon 34 zwei Tage nach Induktion einen Höhepunkt sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Von induzierten Zellen von Klon 34 wurden RNA und Protein nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 2, 3, 4 und 7 Tage nach Induktion) aufgereinigt, als Negativkontrolle diente Proteinextrakt aus untransfizierten NIH3T3-Zellen. A. RT-PCR mit Oligonukleotidprimern für FLAG-mCTCFL sowie β-2-Microglobulin (B2M) mit cDNA des Klons 34 nach verschiedenen Zeitpunkten der CTCFL-Induktion sowie untransfizierten NIH3T3-Zellen. B. Western Blot zum Nachweis von FLAG-mCTCFL (schwarzer Pfeil) auf Proteinebene. Es wurden je 20 µg Protein elektrophoretisch in einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen, die Immundetektion von FLAG-CTCFL erfolgte mit einem FLAG-Antikörper, für die Ladekontrolle wurde ein GAPDH-Antikörper (roter Pfeil) verwendet. Als Positivkontrollen wurden Proteinextrakte von transient mit FLAG-mCTCFL bzw. FLAG-CTCF (blauer Pfeil) transfizierten NIH3T3 geladen, für die Negativkontrolle wurde Proteinextrakt untransfizierter NIH3T3-Zellen benutzt. C. Real-time PCR mit CTCFL-spezifischen Oligonukleotidprimern, als Template diente die cDNA aus A. Für die relative Expression wurde gegen β-2-Microglobulin normalisiert und der Wert für FLAG-CTCFL der cDNA von Tag 0 gleich 1 gesetzt.

## 5.3.6.5 Die Expression von CTCFL hat keinen signifikanten Einfluss auf die Teilungsrate der Zellen

Zwar waren auch nach acht Wochen Induktion verschiedener Klone sowohl RNA als auch Protein von FLAG-mCTCFL nachweisbar, jedoch ergab sich daraus nicht, ob ein nicht-letaler toxischer Effekt vorliegt. Aufgrund einer möglichen Verbindung von CTCFL und der Entstehung von Tumoren, sollte außerdem geklärt werden, ob die Expression von CTCFL zu einer höheren Proliferationsrate führt. Beide Fragestellungen wurden mittels Erstellung von Wachstumskurven (Abb. 21) für die verschiedenen Klone in induziertem und uninduziertem Zustand untersucht. In keinem Falle wurde jedoch ein signifikanter Unterschied im Wachstum induzierter und uninduzierter Zellen der jeweiligen Klone nach acht Tagen beobachtet. Sofern toxische Effekte vorliegen, sind sie somit zu schwach um einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben. Eine Erhöhung der Proliferationsrate zu nach CTCFL-Expression konnte in diesem Experiment nicht beobachtet werden. Auch im direkten

Vergleich mit untransfizierten NIH3T3-Zellen (nicht gezeigt) konnte kein signifikanter Effekt der CTCFL-Expression beobachtet werden.



Abb. 21: Die Expression von CTCFL hat keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der untersuchten Klone. Zu Begin wurden jeweils 10.000 Zellen der Klone 11, 17, 34, 39, 60 und 90 ausgesät und inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit einem automatischen Zählgerät nach 2, 3, 4, 6, 7 und 8 Tagen ermittelt. Für die Induktion wurden die Klone von Doxycyclin-enthaltendem Medium in Doxycyclin-freies Medium (schwarze Linie) überführt und in diesem parallel zu den uninduzierten Zellen (rote Linie) kultiviert.

#### 5.3.6.6 CTCFL-Expression hat keinen eindeutigen Effekt auf Anheftungs-

#### unabhängiges Wachstum (Anchorage independent growth)

Mit einem *colony-formation-assay* wurde überprüft, ob die CTCFL-Induktion in den Klonen einen Einfluss auf die Fähigkeit zu anheftungsunabhängigem Wachstum hat, was eine transformierende Wirkung von CTCFL belegen könnte.

Es wurden alle Klone in dem *assay* verwendet, von welchen eine CTCFL-Expression bekannt war. Jeder Klon wurde dabei in Triplikaten getestet, sowohl in induziertem als auch in nicht induziertem Zustand. Als Positivkontrolle wurde pro 6-*well* eines der *wells* mit FTC133-Zellen angeimpft, da von dieser Zelllinie bekannt war, dass sie deutliche Kolonien ausbildet. Die für die Negativkontrollen verwendeten *wells* wurden mit Agar befüllt, der keine Zellen enthielt, um für die Auszählung einen Nullwert definieren zu können. Nach dem Anfärben der Kolonien wurden Aufnahmen mit dem VersaDoc *imaging* System gemacht und diese nach Invertierung mittels der Option *colony-counting* ausgewertet (Abb. 22 und Tab. 13, S. 143 im Anhang). Zwar ist diese Funktion ursprünglich zum Auszählen von Bakterienkolonien nach Blau-Weiß-Selektion konzipiert, ein manuelles Nachzählen zeigte aber, dass sie auch zur Auswertung des *assays* verwendet werden konnte. Mit einer Ausnahme konnten bei allen Positivkontrollen deutliche und große Kolonien beobachtet werden. Die Zahl der gebildeten Kolonien schwankte zwischen den verschiedenen Klonen teilweise stark (Abb. 22). Für einige Klone konnte allerdings keine aussagekräftige Auszählung erfolgen, da in einigen Fällen die Zellen auf den *base agar* abgesunken und dann auf diesem flächig gewachsen sind. In manchen Fällen betraf dies alle drei *wells* eines Klons. Trat dies in geringerem Ausmaß auf (gelber Pfeil, Abb. 22), erfolgte eine manuelle Auszählung.



Abb. 22: Stabile NIH3T3-Klone bilden Kolonien in unterschiedlicher Anzahl im colony formation assay aus. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Klone 53 und 95. Als Positivkontrolle dienten Zellen der Zelllinie FTC133, für Negativkontrollen wurde Agar ohne Zellen auf das *well* gegeben. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt, es sind jedoch nur Duplikate gezeigt. In einigen Fällen wuchsen die Zellen flächig auf dem *base agar* (gelber Pfeil) wodurch eine quantitative Auswertung in vielen Fällen unmöglich wurde. Die Ergebnisse für die beiden gezeigten Klone sind repräsentativ für die Ergebnisse mit allen anderen Klonen.

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ausschließlich für eindeutig auszählbare Ergebnisse berechnet (Tab. 13, S. 143 im Anhang). Insgesamt wurde bei vier Klonen eine Erhöhung der Zahl der Kolonien nach Induktion der CTCFL-Expression beobachtet. Bei zwei Klonen konnte kein Unterschied aufgrund der Induktion festgestellt werden, in fünf Klonen führte die Induktion von CTCFL zu einer Abnahme der ermittelten Kolonienzahl. Die Zahl der Kolonien korrelierte nicht mit der in den Klonen ermittelten relativen Expression von CTCFL (Abb. 23). Die mit drei verschiedenen Analyse-Einstellungen mit dem Programm GraphPad Prism 3.03 durchgeführte nichtlineare Regressionsanalyse ergab in keinem Fall einen auf eine Korrelation hinweisenden R<sup>2</sup>-Wert. Neben den drei gezeigten Ergebnissen der nichtlinearen Regression wurden weitere Einstellungen verwendet, jedoch konnte auch mit diesen nie ein R<sup>2</sup>-Wert ermittelt werden, der auf eine Korrelation hindeutet. Ein Einfluss der CTCFL-Expression auf ein anheftungsunabhängiges Wachstum konnte somit nicht beobachtet werden.



Abb. 23: Die Anzahl der Kolonien im *colony formation assay* ist nicht mit der Stärke der Expression von CTCFL korreliert. Die Stärke der CTCFL-Expression in den verschiedenen NIH3T3-Klonen wurde mittels *real-time*-PCR ermittelt, gegen  $\beta$ -Actin normalisiert und logarithmisch transformiert. Mit der Software GraphPad Prism 3.03 wurde mit drei verschiedenen Einstellungen ("*sigmoidal curve*" = rote Linie; "*exponential growth*" = schwarze Linie und "*one-site-binding hyperbola*" = grüne Linie) eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt, die entsprechenden Korrelationskoeffizienten (R<sup>2</sup>) sind in den Graphen angegeben.

#### 5.4 Genexpressionsanalyse nach CTCFL-Induktion

Aufgrund der zweithöchsten FLAG-mCTCFL-Expression sowie der höchsten Induktion wurde Klon 34 ausgewählt um die Änderung der Genexpression infolge der CTCFL-Expression zu ermitteln. Zusätzlich wurde die Genexpression in untransfizierten NIH3T3-Zellen untersucht, um im Vergleich den Effekt der *leakyness* zu ermitteln. Die untransfizierten Zellen wurden ebenfalls in Medium mit und ohne Doxycyclin kultiviert, damit ein Einfluss von Doxycyclin ausgeschlossen werden kann.

Für die Genexpressionsanalyse wurde qualitativ hochwertige RNA benötigt, die isolierte RNA wurde daher zuvor in verschiedenen Experimenten getestet. Die isolierte RNA wurde dazu in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 24A). Hochwertige RNA zeichnete sich dabei durch scharf abgetrennte Banden der 18S und der 28S RNA, sowie einer gleichmäßigen Verteilung der mRNA aus. Beide Banden konnten für die isolierte RNA beobachtet werden. Zusätzlich wurde das Verhältnis von 28S RNA zu 18S RNA ermittelt, welches laut Literaturangaben etwa 2:1 bei intakter RNA betragen sollte, wobei je nach Gewebe abweichende Werte auftreten können (Palmer and Prediger, 2004). Die ermittelten Werte lagen für Klon 34 zwischen 1:1,37 und 1:1,42. Sofern es zu einer geringen Degradierung der RNA im Zuge der Aufreinigung gekommen war, erfolgte sie gleichmäßig in allen Proben und ist damit unproblematisch in Bezug auf die Genexpressionsanalye. Zusätzlich wurde noch der aussagekräftigere RIN-Wert (RNA integrity number) ermittelt, daher wurde für die restlichen RNA-Proben nur ein Agarose-Gel durchgeführt, eine Berechnung des Verhältnisses erfolgte nicht mehr. Die RIN-Werte wurden von T. Böttger (Bad Nauheim) gemessen und lagen zwischen 9,8 und 10, es handelte sich also um hochwertige, praktisch undegradierte RNA (höchster möglicher RIN-Wert: 10).



Abb. 24: Die für die Genexpressionsanalyse aufgereinigte RNA erfüllt alle qualitativen Anforderungen. Beispielhaft sind die Ergebnisse der Qualitätsuntersuchung für den Klon 34 gezeigt. Die RNA von induzierten und uninduzierten Zellen wurde in Duplikaten präpariert. A. Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA in einem 1% Agarose-Gel. Aus den Banden wurde nach einer kürzeren Beichtung das Verhältnis der 28S rRNA zur 18S rRNA ermittelt (Tabelle rechts), wobei die relativen Messwerte addiert einen Wert von 100 ergeben. B. RT-PCR mit Oligonukleotidprimern für FLAG-mCTCFL sowie  $\beta$ -2-Microglobulin mit cDNA der induzierten und uninduzierten Zellen von Klon 34, sowie cDNA von untransfizierten NIH3T3-Zellen, welche zur Kontrolle ebenfalls mit und ohne Doxycyclin kultiviert wurden. B2M =  $\beta$ -2-Microglobulin. C. *Real-time* PCR mit der cDNA des Klons 34 und Oligonukleotidprimern für FLAG-CTCFL. Die Werte wurden normalisiert gegen  $\beta$ -Actin. Angegeben ist die x-fache Induktion der CTCFL-Expression, die Expression von Probe 1 der uninduzierten Klone wurde gleich 1 gesetzt.

Vor Genexpressiosanalyse überprüft, Induktion der wurde ob eine der FLAG-mCTCFL-Expression im Material aus Klon 34 vorlag. Zu diesem Zweck wurde eine RT-PCR mit der hergestellten cDNA sowie zur Kontrolle mit RNA von untransfizierten NIH3T3-Zellen durchgeführt (Abb. 24B). Die untransfizierten Zellen wurden wie auch der Klon mit und ohne Doxycyclin kultiviert. Die Umwandlung der RNA zu cDNA konnte Signale für β-2-Microglobulin bestätigt werden. In untransfizierten anhand der NIH3T3-Zellen konnte weder mit noch ohne Doxycyclin eine CTCFL-Expression detektiert werden. Im uninduzierten Klon konnte aufgrund der *leakyness* bereits eine schwache Bande für CTCFL beobachtet werden, bei den induzierten Zellen wurden deutlich stärkere Banden detektiert. Um die Stärke der Induktion zu ermitteln, wurde eine real-time-PCR durchgeführt (Abb. 24C). Diese bestätigte die leakyness in den uninduzierten Klonen und zeigte eine 10-fach höhere Expression von FLAG-mCTCFL in den Proben der induzierten Zellen.

Neben der RNA-Integrität war somit auch die erforderliche Induktion der CTCFL-Expression in den Proben gegeben, diese wurden daher für die Genexpressionsanalyse genutzt. Letztere wurde von T. Böttger (MPI Bad Nauheim) durchgeführt, als *array*-Plattform wurde der Affymetrix Gene 1.0 ST verwendet. Die anschließende bioinformatorische Aufbereitung und Auswertung der Daten wurde weitgehend von M. Bartkuhn (JLU Gießen) übernommen.

#### 5.4.1 CTCFL-Expression führt zur Deregulation von 453 Genen

Insgesamt ergab die Genexpressions-Analyse 453 deregulierte Gene (mindestens zweifach dereguliert und mit einem p-Wert unter 0,05) bei einem Vergleich der Genexpression zwischen induzierten Zellen von Klon 34 und untransfizierten, ohne Doxycyclin kultivierten NIH3T3-Zellen. Die Zahl der deregulierten Gene sowie das Ausmaß der Deregulierung war geringer, wenn statt der induzierten Zellen von Klon 34 und untransfizierter NIH3T3-Zellen die uninduzierten mit den induzierten Zellen von K34 verglichen wurden (Abb. 25). Allerdings handelte es sich nicht um vollständig andere Gene, sondern der Effekt der bei einem Vergleich der induzierten mit uninduzierten Zellen auftrat, war bei einem Vergleich mit den NIH3T3-Zellen ausgeprägter und es kamen weitere Gene hinzu.



Abb. 25: Die Zahl signifikant deregulierter Gene bei einem Vergleich der untransfizierten NIH3T3-Zellen mit induzierten Zellen von Klon 34 ist größer als bei einem Vergleich der induzierten mit den uninduzierten Zellen von Klon 34. Links ist der Vergleich der im *expression profiling* ermittelten Genexpression zwischen induzierten und uninduzierten Zellen von Klon 34 gezeigt, auf der rechten Seite wurden hingegen untransfizierte NIH3T3-Zellen mit den induzierten Zellen von Klon 34 verglichen. Angegeben ist jeweils das Ausmaß der Deregulierung. Auf der linken Seite ist zusätzlich der Wert von CTCFL markiert. Mit roten Punkten sind alle Gene dargestellt, welche eine mehr als zweifache Deregulierung und gleichzeitig einen p-Wert unter 0,05 aufwiesen, alle anderen Gene sind mit grauen Punkten dargestellt.

Von den 453 deregulierten Genen waren 219 (Top 20 in Tab. 9) hochreguliert und 234 herunterreguliert (Top 20 in Tab. 8) Die stärkeren Effekte waren bei den hochregulierten Genen zu beobachten.

**Tab. 8: Die 20 am stärksten herunterregulierten Gene nach Induktion der CTCFL-Expression in Klon 34.** Die Deregulierung wurde aufgrund des Vergleichs von induziertem Klon 34 und nicht mit Doxycyclin behandelten untransfizierten NIH3T3-Zellen ermittelt. Neben dem Gen-Symbol ist der vollständige Name (nach UCSC Genome Browser), das Ausmaß der Deregulierung und der zugehörige p-Wert angegeben. Werte wurden gerundet.

Gen	Vollständiger Name	fache	p-Wert
		Deregulierung	1
Dlk1	Delta-like 1 homolog	-17,2	0,0003
Ccl11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-16,6	0,0101
Prl2c3	Prolactin family 2, subfamily c, member 4	-13,7	0,0151
Dio2	Deiodinase, iodothyronine, type II	-13	0,0008
Prl7d1	Prolactin family 7, subfamily d, member 1	-12,5	0,0151
Tmem45a	Transmembrane protein 45a	-11,8	0,0031
Slc14a1	Solute carrier family 14, member 1	-11,2	0,0027
Nlrp2	NLR family, pyrin domain containing 2	-10,6	0,0140
5S rRNA	5S ribosomal RNA	-8,8	0,0030
Dcn	Decorin	-8,7	0,0005
Gria1	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA1	-8,4	0,0016
Prl2c1	Prolactin family 2, subfamily c, member 1	-8,4	0,0170
Lama4	Laminin, alpha 4	-7,8	0,0084
Prl2c5	Prolactin family 2, subfamily c, member 5	-7,8	0,0080
Sgcd	Sarcoglycan, delta	-7,5	0,0048
Col12a1	Collagen, type XII, alpha 1	-7,2	0,0017
Ptpru	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	-6,8	0,0165
Gpr149	G protein-coupled receptor 149	-6,5	0,0004
Akr1c18	Aldo-keto reductase family 1, member c18	-6,3	0,0016
Glrb	Glycine receptor, beta subunit	-6,3	0,0011

**Tab. 9: Die 20 am stärksten hochregulierten Gene nach Induktion der CTCFL-Expression in Klon 34.** Die Deregulierung wurde aufgrund des Vergleichs von induziertem Klon 34 und nicht mit Doxycyclin behandelten untransfizierten NIH3T3-Zellen ermittelt. Neben dem Gen-Symbol ist der vollständige Name (nach UCSC Genome Browser), das Ausmaß der Deregulierung und der zugehörige p-Wert angegeben. Werte wurden gerundet.

<u> </u>	X 7 11 1' X 7	0 1	
Gen	Vollständiger Name	fache	p-Wert
		Deregulation	
CTCFL	CCCTC-binding factor-like	142,3	0,0007
Tgm4	Transglutaminase 4	15,6	0,0223
Gpr56	G protein-coupled receptor 56	13,7	0,0044
Tfpi	Tissue factor pathway inhibitor	5,7	0,0092
Slc22a15	Solute carrier family 22 member 15	5,5	7,2*10 <sup>-6</sup>
Gstm5	Glutathione S-transferase, mu 5	5,3	0,0011
Sult4a1	Sulfotransferase family 4A, member 1	5,1	0,0083
Actg2	Actin, gamma 2	4,8	0,0118
Ccdc78	Coiled-coil domain containing 78	4,6	0,0003
Tex14	Testis expressed gene 14	4,5	0,0303
Magi2	Membrane associated guanylate kinase, WW and	4,3	0,0457
	PDZ domain containing 2		
Lpcat2	Lysophosphatidylchline acyltransferase 2	3,8	3,7*10 <sup>-5</sup>
Bicd1	Bicaudal D homolog 1	3,7	0,0129
Hyal4	Hyaluronoglucosaminidase 4	3,7	0,0315
Greb11	Growth regulation by estrogen in breast cancer-like	3.6	0.0007

Fortsetzung Tabelle 9					
Gen	Vollständiger Name	fache	p-Wert		
		Deregulation			
Pde11a	Phosphodiesterase11A	3,5	0,0078		
Cyfip2	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	3,4	0,0094		
Fam129a	Family with sequence similarity 129, member A	3,3	0,0279		
Slc35f4	Solute carrier family 35, member F4	3,3	0,0170		
March5	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 5	3,3	0,0333		

Im Anschluss wurde eine GO-*term*-Analyse (*gene ontology* Analyse) mittels DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Gruppen deregulierter Gene gebildet und analysiert (Tab. 10). Als signifikant überrepräsentiert wurden in den Gruppen 7, 8 und 9, in welchen verschiedene Kombinationen herunterregulierter Gene enthalten waren, Gene ermittelt, welche mit dem Sterol-Biosynthese-Prozess assoziiert sind. In der Gruppe 7 waren dies 15 Gene, der ermittelte Benjamini-Wert betrug  $3,2 \times 10^{-13}$ , bei Gruppe 9 erhöhte sich die Zahl der Gene aufgrund der Nichtbeachtung des p-Werts auf 16 Gene, wobei der Benjamini-Wert sich geringfügig auf  $3,6 \times 10^{-13}$  verbesserte. Die meisten mit dem Sterol-Biosynthese-Prozess assoziierten Gruppe 8 ermittelt, in dieser Gruppe wurde die Stärke der Deregulierung nicht berücksichtigt sondern nur der p-Wert. Es wurden für diese Gruppe 18 Gene mit dem entsprechenden GO-*term* ermittelt und der Benjamini-Wert betrug  $2,1 \times 10^{-14}$ . In allen anderen untersuchten Gruppen konnten keine signifikanten Anreicherungen von Genen mit bestimmten Funktionen ermittelt werden.

Gruppe	Deregulation	p-Wert
1	> 1,5-fach hoch- bzw. herunterreguliert	< 0,05
2	> 1-fach hoch bzw. herunterreguliert	< 0,05
3	> 1,5-fach hoch bzw. herunterreguliert	-
4	> 1,5-fach hochreguliert	< 0,05
5	> 1-fach hochreguliert	< 0,05
6	> 1,5-fach hochreguliert	-
7	> 1,5-fach herunterreguliert	< 0,05
8	> 1-fach herunterreguliert	< 0,05
9	> 1,5-fach herunterreguliert	-

Tab. 10: Verschiedene über GO-term-Analyse untersuchte Gruppen deregulierter Gene.

#### 5.4.2 Deregulierung wurde in individuellen Experimenten verifiziert

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden einige hoch- bzw. herunterregulierte Gene ausgewählt (stark, mittel und schwach deregulierte) und mittels RT-PCR die Expression dieser Gene in cDNA von induzierten und uninduzierten K34-Zellen semi-quantitativ untersucht (Abb. 26). Die Gene GSTM5, GPR56, FZD4, ITFG3 und RAB7L1 zeigten in der Genexpressionsanalyse eine erhöhte Expression nach Induktion der CTCFL-Expression, diese Tendenz wurde für diese Gene auch in der RT-PCR belegt, die Banden sind bei Verwendung von cDNA der induzierten Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei cDNA aus den uninduzierten Zellen. Der umgekehrte Fall liegt bei den laut Genexpressionsanalyse herunterregulierten Genen AKR1C18 und IGFPB4 vor, bei beiden Genen sind die Banden bei Verwendung der cDNA induzierter Zellen schwächer ausgeprägt. Das Vorliegen gleicher Ausgangsmengen an cDNA wurde durch Verwendung gleicher Mengen an isolierter RNA bei der cDNA-Synthese sowie durch eine Kontroll-PCR mit  $\beta$ -Actin-spezifischen Oligonukleotidprimern (nicht gezeigt) sichergestellt, alle beobachteten Effekte wurden außerdem in *real-time*-PCRs näher untersucht.



**Abb. 26: Die Deregulierung mehrerer Gene konnte mittels RT-PCRs bestätigt werden.** Aus der Liste der deregulierten Gene wurden einige Gene zur Verifizierung der Genexpressionsanalyse ausgewählt und cDNA von induzierten und uninduzierten Zellen von Klon 34 auf die Expression der Gene untersucht. Verwendet wurden Oligonukleotidprimer für CTCFL, AKR1C18, GSTM5, GPR56, FZD4, ITFG3, IGFBP4 und RAB7L1. Deregulierung (x-fach) in der Genexpressionsanalyse: CTCFL: +5,9; AKR1C18: -2,0; GSTM5: +6,9; GPR56: +10,5; FZD4: +1,6; ITFG3: +1,7, IGFBP4: -1,7; RAB7L1: +2,1.

In den anschließenden *real-time*-PCRs wurde die Expression der Gene untersucht, welche bereits in der semi-quantitativen RT-PCR einen Effekt zeigten. Um die Qualität der Ergebnisse des *expression profiling* bewerten zu können, wurden neben stark deregulierten Genen auch schwach deregulierte Gene untersucht. Für eine statistische Absicherung wurde die zur Herstellung der cDNA verwendete RNA jeweils von vier biologischen Replikaten gewonnen und anschließend der Mittelwert gebildet. Normalisiert wurde gegen  $\beta$ -Actin. Für CTCFL, welches als Positivkontrolle untersucht wurde, konnte eine etwa 12-fach höhere

Expression in induzierten Zellen nachgewiesen werden als in den uninduzierten Zellen (Abb. 27). Für untransfizierte NIH3T3-Zellen konnte praktisch keine CTCFL-Expression beobachtet werden, die ermittelten Werte liegen um mehr als 900-fache unter dem Wert der induzierten Zellen in einem Bereich, in dem spezifische Signale und Hintergrundsignale nicht mehr eindeutig aufgelöst werden konnten. Die höchste Deregulation wurde für GPR56 ermittelt, welches im Mittel in den induzierten Zellen 115-fach höher als in den uninduzierten und 144-fach höher als in den NIH3T3-Zellen (-Dox) exprimiert wird. Ähnlich deutlich ist der Effekt auf die Expression von GSTM5, welches in K34 nach Induktion der CTCFL-Expression 13-fach höher exprimiert wird. Für die anderen untersuchten Gene wurden deutlich schwächere Effekte beobachtet. Eine Hochregulation zwischen induzierten und uninduzierten Zellen von K34 konnte dennoch für die Gene FZD4 (2,3-fach) und ITFG3 (1,6-fach) detektiert werden, wobei diese Werte nahe an den in der Genexpressionsanalyse ermittelten Werten (FZD4: 1,6-fach; ITFG3: 1,7-fach) lagen. Für RAB7L1 konnte zwar eine Hochregulation der Genexpression ermittelt werden, allerdings könnte in diesem Fall der Effekt durch die Entfernung von Doxycyclin aus dem Medium bedingt sein, da auch bei untransfizierten NIH3T3-Zellen ein Anstieg der Expression bei Kultivierung ohne Doxycyclin beobachten war. Deutliche Effekte waren auch für die zu laut Genexpressionsanalyse herunterregulierten Gene HGF, ASS1, IGFBP4, AKR1C18 und MT2 zu erkennen. Der Unterschied zwischen der Expression in induzierten und uninduzierten Zellen von K34 war in den meisten Fällen gering (HGF: 1,47-fach, IGFBP4: 1,13-fach, AKR1C18: 1,31-fach, MT2: 2,32-fach) und für ASS1 wurde sogar ein Anstieg (1,34-fach) beobachtet. Bei einem Vergleich der Expression dieser Gene in den Zellen von K34 mit der Expression in untransfizierten NIH3T3-Zellen waren die Effekte der Deregulation in allen Fällen deutlich ausgeprägt, in den untransfizierten NIH3T3 ist die Expression deutlich höher. Keine eindeutige Aussage konnte im Falle des Gens CCK getroffen werden, da die ermittelten Effekte zu gering waren bei gleichzeitig hohen Standardabweichungen und bereits großen Unterschieden zwischen den biologischen Replikaten der untransfizierten NIH3T3-Zellen.



**Abb. 27: Die Deregulation zahlreicher Gene konnte mittels** *real-time*-**PCR bestätigt werden.** Anhand der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und der RT-PCR zur Verifizierung wurden mehrere Gene ausgewählt, welche eine Deregulierung in diesen Experimenten zeigten. Als Kontrolle wurde CTCFL verwendet. Die Genexpression von vier biologischen Replikaten induzierter und uninduzierter Zellen von K34 sowie von untransfizierten NIH3T3-Zellen, welche sowohl mit als auch ohne Doxycyclin kultiviert wurden, wurde für folgende Gene ermittelt: CTCFL, GSTM5, GPR56, ASS1, FZD4, ITFG3, IGFBP4, AKR1C18, RAB7L1, MT2 und CCK. Alle Werte wurden gegen β-Actin normalisiert und die Expression in uninduzierten K34-Zellen gleich 1 gesetzt. Für eine höhere Auflösung schwach deregulierter Gene wurde die Abbildung auf drei verschieden skalierte Koordinatensysteme aufgeteilt.

#### 5.4.3 Überexpression von GPR56 korreliert mit der Menge an CTCFL

Um die Abhängigkeit der Deregulation in Bezug auf die Expression von CTCFL zu untersuchen, wurde die bereits für die Zeitkinetik der CTCFL-Expression (5.3.6.4) benutzte cDNA von Klon 34 zur Ermittlung der Genexpression von GPR56 verwendet. Dazu wurde eine RT-PCR durchgeführt und die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 28). Es zeigte sich dabei, dass GPR56 bereits in untransfizierten NIH3T3-Zellen exprimiert wird, im Gegensatz zu CTCFL, welches in diesen Zellen bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expression von GPR56 in Zellen von Klon 34 direkt nach der Induktion (Tag 0 in der Abbildung) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Expression in untransfizierten NIH3T3-Zellen, obwohl aufgrund der *leakyness* des *tet-off*-Systems bereits eine geringe Menge an CTCFL zu diesem Zeitpunkt exprimiert wurde. Mit zunehmender Wachstumsdauer ohne Doxycyclin zeigt sich ein Anstieg der Expression von CTCFL war in Klon 34 ein Anstieg der Expression von GPR56 zu beobachten, welche ebenfalls nach zwei Tagen am höchsten war. Es bestand eine deutliche Korrelation zwischen der Induktion von K34 und dem Anstieg der Expression von GPR56.



Abb. 28: Die Stärke der Deregulation von GPR56 in Klon 34 korreliert mit der Induktion der CTCFL-Expression. Zur Ermittlung der basalen Expression von GPR56 wurde cDNA von untransfizierten NIH3T3-Zellen verwendet. Die cDNA von Klon 34 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion präpariert (nach 0, 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen). Die verschiedenen cDNA-Proben sowie eine -RT-Kontrolle und eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle wurden in RT-PCR-Reaktionen mit Oligonukleotidprimern für CTCFL (schwarzer Pfeil), GPR56 (roter Pfeil) und  $\beta$ -Actin (blauer Pfeil) verwendet und in einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt.

#### 5.4.4 Deregulation konnte auch in anderen Klonen belegt werden

Sowohl die Genexpressionsanalyse als auch die Verifizierung der darin ermittelten deregulierten Gene erfolgte mit cDNA aus Klon 34. Um eine klonspezifische Deregulierung auszuschließen, wurde die Expression der stark deregulierten Gene GPR56 und GSTM5 in anderen NIH3T3-Klonen untersucht, in welchen zuvor eine Induktion der CTCFL-Expression gezeigt werden konnte (Abb. 29) gezeigt. Bereits in der RT-PCR war deutlich die Induktion von CTCFL in den Klonen zu erkennen. In allen Klonen sind GPR56 und GSTM5 in den induzierten Klonen stärker exprimiert als in den uninduzierten (Abb. 29A). Mit demselben Material wurden *real-time*-PCRs durchgeführt. Auch diese zeigten eine starke Deregulierung von GPR56 und GSTM5 in allen Klonen nach Induktion der CTCFL-Expression (Abb. 29B).



Abb. 29: GPR56 und GSTM5 sind auch in anderen CTCFL-exprimierenden Klonen dereguliert. Verwendet wurde cDNA der jeweils induzierten und uninduzierten Klone (K) 11, 17, 34, 39 und 60, sowie von untransfizierten NIH3T3-Zellen, welche ohne Doxycyclin (Dox) kultiviert wurden. A. RT-PCR mit Oligonukleotidprimern für CTCFL, GPR56, GSTM5 und  $\beta$ -2-Microglobulin (B2M). B. *Real-time*-PCR zur Ermittlung der relativen Expression von GPR56 und GSTM5. Die Normalisierung erfolgte gegen  $\beta$ -Actin. Der Messwert für ohne Doxycyclin kultivierte, untransfizierte NIH3T3-Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

#### 5.4.5 Die Deregulation korreliert mit der CTCFL-Expression

Ein Vergleich der Stärke der Deregulation zwischen uninduzierten und induzierten Zellen von Klon 34 mit der Deregulation zwischen induzierten Zellen von Klon 34 und untransfizierten NIH3T3-Zellen zeigte, dass mit zunehmender CTCFL-Expression in den meisten Fällen eine Verstärkung der Deregulation auftrat (Abb. 30). So zeigte sich zwar beim Vergleich der induzierten mit den uninduzierten Zellen von Klon 34 (linke Säule in Abb. 30) bereits für viele Gene eine Deregulation, diese war jedoch deutlich stärker ausgeprägt wenn die induzierten Zellen von Klon 34 mit NIH3T3-Zellen verglichen wurden. Aufgrund der leakyness war in den uninduzierten Zellen von Klon 34 bereits CTCFL enthalten, die Steigerung der Expression durch Induktion der Zellen erhöht diese Expression zwar deutlich, die Differenz ist jedoch geringer, als bei einem Vergleich mit den NIH3T3-Zellen, welche keine messbare CTCFL-Expression aufwiesen. Diese größere Differenz spiegelt sich in dem stärkeren Ausmaß der Deregulation beim Vergleich der induzierten Zellen mit NIH3T3-Zellen wieder. Analog dazu zeigte auch ein Vergleich der uniduzierten Zellen von Klon 34 mit NIH3T3-Zellen bereits eine Deregulation zahlreicher Gene, welche jedoch schwächer ausfiel als beim Vergleich der NIH3T3-Zellen mit den induzierten Zellen von Klon 34 (nicht gezeigt). Der Effekt auf die Genexpression war somit deutlich stärker ausgeprägt, je mehr CTCFL exprimiert wurde. Dies zeigte auch, dass die aufgrund der *leakyness* vorhandene CTCFL-Expression bereits zu Effekten auf die Genexpression anderer Gene führte. Eine weitere Steigerung der CTCFL-Expression hatte in den meisten Fällen verstärkte Effekte zur Folge und zeigte somit, dass die CTCFL-Expression noch nicht in einem Sättigungsbereich vorlag, bei welchem eine weitere Erhöhung nicht mehr zu gesteigerten Reaktionen führen würde.



Abb. 30: Die Menge von CTCFL korreliert mit der Stärke der Deregulation anderer Gene. In der gezeigten *heatmap* ist in der linken Spalte die Deregulation von Genen bei einem Vergleich uninduzierter Zellen von Klon 34 mit induzierten Zellen des Klons dargestellt. Die Deregulation in der rechten Spalte wurde durch einen Vergleich der Genexpression in induzierten Zellen von Klon 34 mit untransfizierten NIH3T3-Zellen ermittelt. Verwendet wurden die Daten der deregulierten Gene laut Genexpressionsanalyse.

Für eine eingehendere Untersuchung der Korrelation für individuelle Gene wurde die relative Expression von CTCFL vor und nach Induktion in unterschiedlichen Klonen ermittelt. Mit diesen Daten wurde eine nichtlineare Regression mit dem Programm GraphPad Prism 3.03 für die Gene GPR56, LPCAT2, GSTM5, DLK1, AKR1C18, ITFG3, DIO2, HGF und IGF2 durchgeführt (Abb. 31). Am stärksten korrelierte die CTCFL-Expression mit der Veränderung der Genexpression von ITFG3 ( $R^2 = 0.8$ ), GPR56 ( $R^2 = 0.77$ ), AKR1C18 ( $R^2 = 0.76$ ), LPCAT2 ( $R^2 = 0.72$ ) und GSTM5 ( $R^2 = 0.71$ ). Für die hochregulierten Gene GPR56, GSTM5 und LPCAT2 ergeben sich dabei ansteigende sigmoidale Kurven, beim herunterregulierten Gene AKR1C18 ergab sich eine fallende sigmoidale Kurve. Bei ITFG3 war eine exponentiell ansteigende Kurve zu beobachten. Bei allen anderen untersuchten Genen ergaben sich fallende Kurven, welche außer bei IGF2, ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf aufwiesen.



Abb. 31: Die Expression von CTCFL korreliert mit der Deregulierung der untersuchten Gene. Die Korrelationsanalyse wurde mit der Software GraphPad Prism 3.03 durchgeführt mit der Einstellung "sigmoidale Kurve" im Menü "nichtlineare Regression", angegebene R<sup>2</sup>-Werte geben das Ausmaß der Korrelation an (1,0 entspricht einer perfekten Korrelation). Zusätzlich zu den Datenpunkten wurde die auf der Korrelationsanalyse beruhende Trendlinie eingezeichnet. Auf der x-Achse wurde die relative Expression des jeweiligen Gens aufgetragen, diese wurde gegen die log-transformierte relative Expression von CTCFL geplottet. Die Daten stammen aus *real-time*-PCR-Experimenten (siehe Abb. 18C, Seite 77) und wurden jeweils gegen  $\beta$ -Actin normalisiert, anschließend wurde der von untransfizierten und ohne Doxycyclin kultivierten NIH3T3-Zellen ermittelte Wert gleich 1 gesetzt.

# 5.5 Sowohl CTCF als auch CTCFL binden im Promotorbereich deregulierter Gene

Für ausgewählte deregulierte Gene sollte mittels Chromatin-Immunoprecipitation untersucht werden, ob in der Gensequenz oder im Promotorbereich die Bindung von CTCFL und CTCF nachgewiesen werden kann. Dazu wurden unterschiedliche Antikörper in verschiedenen Bedingungen getestet, letztendlich ergaben sich für CTCFL die besten Ergebnisse mit dem Antikörper CTCFL6 und für CTCF mit dem Antikörper N2.2.

#### 5.5.1 Nachweis der CTCFL- und CTCF-Präzipitation mittels *real-time*-PCR

Da über die Bindung von CTCFL in NIH3T3 keine Daten existierten, fehlte für die Etablierung der ChIP-Experimente eine geeignete Positivkontrolle. Daher wurden Daten zur

Bindung von CTCFL in embryonalen Maus-Stammzellen, in welchen CTCFL überexprimiert wurde, verwendet. Diese wurden von F. Sleutels (Erasmus MC, Rotterdam) zur Verfügung gestellt. Anhand des Vergleichs der deregulierten Gene des expression profilings mit den CTCFL-Bindedaten der embryonalen Stammzellen wurden deregulierte Gene ausgewählt, in deren Nähe in embryonalen Stammzellen eine CTCFL-Bindung vorlag. In einigen Fällen in der Nähe deregulierter Gene keine CTCFL-Bindung in embryonalen konnte Maus-Stammzellen detektiert werden. Unter anderem zählte GPR56 dazu, welches in der Genexpressionsanalyse eine starke Deregulation zeigte. Für diese Gene wurden zusätzlich Daten zur Bindung von CTCF in embryonalen Maus-Stammzellen (Chen et al., 2008) hinzugezogen. In der Region des Gens GPR56 beispielsweise war zwar keine CTCFL-Bindestelle (BTS, BORIS-target site, zur besseren Unterscheidung von den CTCF-Bindestellen wird hier die alte Bezeichnung von CTCFL verwendet), jedoch eine CTCF-Bindestelle (CTS) bekannt (Abb. 32). Aufgrund der konservierten Zinkfingerregion bestand die Möglichkeit, dass CTCFL in der Lage ist, diese CTS zu erkennen und dort ebenfalls zu binden. Im Falle von GPR56 ergab sich dabei zusätzlich die Frage, welche der vier in der UCSC-Datenbank vorhandenen Versionen tatsächlich in Klon 34 exprimiert und nach Induktion dereguliert wird, da nur im Falle der kurzen Variante die CTS im Promotorbereich des Gens lokalisiert wäre. Mittels Temperaturgradienten-RT-PCR und spezifischen Oligonukleotidprimern konnte gezeigt werden, dass die beiden langen Versionen in Klon 34 nicht exprimiert werden (Abb. 32), hingegen die mittellange Version vorhanden ist. Auf diese Weise konnte jedoch nicht ermittelt werden, ob auch die kurze Version hergestellt wird, da diese keine spezifische Sequenz aufweist, mit der eine Unterscheidung von der mittellangen Version möglich wäre.



Abb. 32: Von GPR56 wurden in Klon 34 nur die mittellange und eventuell die kurze Version der vier in den UCSC-Datenbanken hinterlegten Versionen exprimiert, wobei im Promotorbereich der kurzen Variante auch eine aus murinen embryonalen Stammzellen bekannte CTCF-Bindestelle lokalisiert ist. A. Gezeigt ist ein 37 kb großer Abschnitt von Chromosom 8, in welchem das Gen GPR56 lokalisiert ist. Alle vier derzeit in den Datenbanken hinterlegten Versionen des Gens sind im unteren Teil eingezeichnet (blau), zusätzlich sind bekannte humane Proteinvarianten (grau) angegeben. Im mittleren Teil sind die Daten des CTCF-ChIP-seq (Chen et al., 2008) in murinen embryonalen Stammzellen zu sehen, mit einer CTCF-Bindestelle (Score: 64) im Promotorbereich der kurzen GPR56-Variante. B. Mittels Gradienten-RT-PCR wurde mit cDNA von Klon 34 untersucht, welche Versionen von GPR56 exprimiert wurden. Verwendet wurden Oligonukleotidprimer für die lange und die mittlere Version von GPR56. Abbildung teilweise erstellt mit UCSC Genome Browser.

Für die Bindestellen wurden spezifische Oligonukleotidprimer eingesetzt, um zu überprüfen, ob auch in NIH3T3-Zellen an dieser Stelle eine CTCFL-Bindung vorlag. Durch Verwendung mehrerer potentieller Bindestellen konnten auf diese Weise einige CTCFL-Bindestellen in NIH3T3-Zellen ermittelt werden, mit deren Hilfe dann das ChIP-Protokoll optimiert werden konnte. Die stärkste Bindung wurde dabei in der Region des Gens THOC1 beobachtet. Für alle diese potentiellen Bindestellen wurde zusätzlich die Bindung von CTCF untersucht (Abb. 33). Neben der THOC-BTS konnte eine erhöhte CTCFL-Präzipitation in induzierten Zellen von Klon 34 im Vergleich zu untransfizierten NIH3T3 auch an den BTS in der Nähe der Gene STRA8, GPR56, IFITM3, ABHD6, COL12A1 und DLK1 ermittelt werden. Eine CTCF-Bindung konnte hingegen für die CTS der Gene STRA8, ABHD6, COL12A1, IFITM3 und GPR56 detektiert werden, wobei die höchste Präzipitation an der jeweiligen CTS zwischen untransfizierten NIH3T3-Zellen und induzierten Zellen von Klon 34 zu erkennen.

Ein Einfluss der CTCFL-Bindung auf die Bindung von CTCF an derselben Stelle konnte mit diesen Experimenten nicht belegt werden. Allerdings zeigte die CTCFL-Bindung in der GPR56-Region, dass CTCFL an der bekannten CTS bindet, obwohl in embryonalen Maus-Stammzellen an dieser Stelle keine CTCFL-Bindung gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht alle CTCFL-Bindestellen in Klon 34 auch in embryonalen Maus-Stammzellen zu finden sind, und umgekehrt auch nicht alle CTCFL-Bindestellen aus embryonalen Maus-Stammzellen eine CTCFL-Bindung in Klon 34 aufwiesen. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit IgGs anstelle der spezifischen Antikörper durchgeführt.



Abb. 33: An einigen CTCFL-Bindestellen in embryonalen Maus-Stammzellen bindet CTCFL auch in induzierten Zellen von Klon 34. Anhand der ChIP-seq-Daten von F. Sleutels (CTCFL in murinen embryonalen Stammzellen) und der Liste der laut Genexpressionsanalyse in Klon 34 deregulierten Gene wurden einige potentielle CTCFL-Bindestellen (BTS) ausgewählt. Mittels Immunopräzipitation wurde neben der CTCFL-Bindung an diesen Stellen auch eine Bindung von CTCF (CTS) untersucht. Die Bindestellen sind mit den Abkürzungen der nächstliegenden Gene bezeichnet. Das verwendete Chromatin wurde von untransfizierten NIH3T3-Zellen (utr) und induzierten Zellen von Klon 34 (K34) gewonnen. Als Negativkontrollen dienten eine Region im Amylase-Gen sowie eine 5,5 kb downstream der THOC1-BTS gelegene Region (THOC1 ctrl). Die Auswertung der Bindung erfolgte mittels real-time-PCR mit Oligonukleotidprimern für die Bindestellen/Kontrollregionen: Amylase, THOC ctrl, CYFIP2, COL12A1, THOC1, DLK1, ABHD6, STRA8, IFITM3 und GPR56. A. ChIP mit dem CTCF-Antikörper N2.2, zur Kontrolle ist die Präzipitation mit IgGs gezeigt. Die Reihenfolge der gezeigten CTS/BTS orientiert sich an der Stärke der detektierten Bindung von CTCF. B. ChIP mit dem CTCFL-Antikörper CTCFL6, zur Kontrolle ist die Präzipitation mit IgGs gezeigt. Die Reihenfolge orientiert sich an der Stärke der detektierten CTCFL-Bindung.

## 5.5.2 Über ChIP-Sequenzierung wurden die CTCF- und CTCFL-Bindestellen in K34 und NIH3T3-Zellen ermittelt

Anhand der CTCFL-Bindungsdaten aus murinen embryonalen Stammzellen konnte nur bedingt auf die Bindung von CTCFL in Klon 34 geschlossen werden. Somit war ein Vergleich der deregulierten Gene in Klon 34 nach Induktion mit den BTS aus embryonalen Maus-Stammzellen nicht geeignet, die Deregulation der Gene mit einer Bindung von CTCFL zu korrelieren. Um die Bindestellen von CTCF als auch CTCFL in untransfizierten NIH3T3-Zellen und in induzierten Zellen von Klon 34 zu ermitteln, wurde daher eine Sequenzierung mit dem Material der jeweiligen Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-seq) durchgeführt. Das dazu benutzte Chromatin wurde dazu in ChIP-Experimenten mit den Antikörpern N2.2 und CTCFL6 verwendet. Anschließend erfolgten verschiedene Experimente zur qualitativen und quantitativen Analyse des präzipitierten Materials. Dabei wurde sichergestellt, dass mindestens eine etwa 10-fache Anreicherung an spezifischen CTS bzw. BTS gegenüber Kontrollregionen vorlag. Im Anschluss daran erfolgte die Quantifizierung der präzipitierten DNA. Dabei wurden pro ChIP-seq 10 ng DNA benötigt. In allen Fällen musste dazu das Material mehrerer Präzipitationen vereinigt und anschließend durch Erhitzen auf 65°C eingedampft werden, was erneute Tests der ChIP-Pools notwendig machte. Es wurden dazu jeweils zwei Bindestellen und zwei Kontrollregionen untersucht (Abb. 34). Im Falle des CTCF-ChIPs wurden die Bindestellen in den Regionen der Gene SORCS2 und GPR56 verwendet, an beiden Stellen konnte sowohl bei untransfizierten NIH3T3 als auch bei Klon 34 eine deutliche Anreicherung gegenüber den Kontrollregionen beobachtet werden. Für NIH3T3 ergab sich eine 29-fache Anreicherung bei Vergleich der GPR56-CTS mit der Amylase-Kontrolle und eine 23-fache Anreicherung gegenüber der THOC1-Kontrolle. Im Falle des induzierten Klons 34 lag eine 26-fache (GPR56 gegen Amylase) bzw. eine 16-fache (GPR56 gegen THOC1-Kontrolle) Anreicherung vor. Die CTCFL-ChIP zeigte im Falle von NIH3T3-Zellen zwar eine geringe Anreicherung gegenüber den Kontrollregionen, die ermittelten Werte waren jedoch sehr niedrig. Für Klon 34 wurde eine 12,4-fache Anreicherung der THOC1-BTS gegenüber der THOC1-Kontrollregion beobachtet. Gegenüber der Amylase-Kontrollregion war die Anreicherung nicht messbar, da auch nach 50 Zyklen in der real-time-PCR keine Präzipitation dieser Region detektiert werden konnte. Somit genügte das Material in allen Fällen den qualitativen und quantitativen Anforderungen und wurde zur Sequenzierung verwendet, welche am center for biomics (Erasmus MC, Rotterdam) von W. van Ijcken durchgeführt wurde. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe von M. Bartkuhn (JLU, Gießen).



Abb. 34: Das für die ChIP-Sequenzierung verwendete Material erfüllte alle qualitativen und quantitativen Anforderungen. Nach Vereinigung und Eindampfen mehrerer ChIP-Proben wurde die Qualität des Materials durch Vergleich je zweier Bindestellen mit zwei Kontrollregionen (Amylase und THOC ctrl) überprüft. Im Falle der CTCF-ChIPs wurden die CTS in der Region der Gene SORCS2 und GPR56 verwendet, für den CTCFL-ChIP diente in beiden Fällen die BTS in der THOC1-Region als Positivkontrolle. Für NIH3T3 wurde zusätzlich die BTS der STRA8-Region und für Klon 34 die BTS in der Region des Gens KLHL24 verwendet. Die Auswertung erfolgte über *real-time*-PCR, verwendet wurden Oligonukleotidprimer für die Bindestellen / Kontrollregionen: GPR56, Amylase, THOC1 ctrl; THOC1, STRA8, KLHL und SORCS2.

Durch die Sequenzierung der ChIP-Proben konnten knapp 17.000 BTS und knapp 41.000 CTS in Klon 34 ermittelt werden, in den untransfizierten NIH3T3 wurden knapp 46.000 CTS detektiert. Anhand der stärksten Bindestellen wurde mit MEME (Bailey et al., 2009) für beide Proteine eine *ab initio* Motivanalyse durchgeführt, diese identifizierte ein prominentes Interaktionsmodul (Abb. 35). Zwischen beiden Sequenzen bestehen nur minimale Unterschiede.



Abb. 35: Die Konsensussequenzen der Bindestellen von CTCF und CTCFL in Klon 34 sind einander sehr ähnlich. Ermittelt wurden die Sequenzen anhand der stärksten Bindestellen, welche im ChIP-Seq für das jeweilige Protein detektiert wurden. Anhand eines vorgegebenen Schwellenwertes wurden dazu für CTCF 473 und für CTCFL 964 Bindestellen ausgewertet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Sequenz von CTCFL etwas eingerückt. Die maximal mögliche Konservierung pro Base beträgt 2 bits (Crooks et al., 2004).

Eine das CTCF-Motiv repräsentierende PSSM (Positionsspezifische scoring-Matrix) wurde benutzt um genomweit alle Vorkommnisse des Motivs für das Mausgenom (mm9) mittels des Patser-Tools (Hertz and Stormo, 1999) vorherzusagen. Diese Analyse lieferte 463.000 Fälle. 28.000 von knapp 41.000 CTCF-Binderegionen überlappten mit einem solchen Motiv (mit 67.466 Motiven innerhalb der 40.000 CTCF-Binderegionen, multiple Bindestellen in vielen 17.000 CTCFL-Bindestellen zeigten Von den knapp fast 11.000 die peaks). CTCFL-Konsensussequenz. Um zu überprüfen, ob diese Überlappung signifikant ist, wurden Verteilungen der CTCF- und CTCFL-Binderegionen in je randomisierte 30.000 Wiederholungen bezüglich ihres Überlapps mit Motiv-Vorkommnissen analysiert. Dabei wurde in keiner der Verteilungen ein Grad an Überlappung gefunden, der so extrem gewesen wäre, wie das tatsächliche Verhältnis (Abb. 36). Der empirische p-Wert war gleich 0.



Abb. 36: Die Überlappung zwischen den CTCF- und CTCFL-Binderegionen mit dem jeweiligen Bindemotiv ist signifikant. Simuliert wurden 30.000 randomisierte Verteilungen der CTCF- und CTCFL-Binderegionen, welche auf ihre Überlappung mit dem jeweiligen Bindemotiv untersucht wurden. A. Links. Mittelwert der Anzahl der Überlappungen der simulierten CTCF-Binderegionen mit Motiv-Vorkommnissen (blau), Fehlerbalken in den die Simulationen wiederspiegelnden blauen Balken geben die Standardabweichung an (aufgrund der niedrigen Standardabweichung nur schwer erkennbar). Rot dargestellt ist die tatsächlich gefundene Anzahl der Überlappungen. Rechts: Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse der Simulation (blaue Punkte). Der rote Balken gibt die tatsächlich gefundene Anzahl der Überlappungen an. B. Mittelwert der Anzahl der Überlappungen der simulierten CTCFL-Binderegionen Links: mit Motiv-Vorkommnissen (blau), Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (aufgrund der niedrigen Standardabweichung nur schwer erkennbar). Rot dargestellt ist die tatsächlich gefundene Anzahl der Überlappungen. Rechts: Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse der Simulation (blaue Punkte). Der rote Balken gibt die tatsächlich gefundene Anzahl der Überlappungen an.

Die genomweite Verteilung der ermittelten CTCF- und CTCFL-Bindestellen in Klon 34 und in untransfizierten NIH3T3-Zellen wurde darauf untersucht, ob in bestimmten Regionen (Introns, Exons, intergenische Bereiche, TES (*transcriptional end sites*), TSS (*transcriptional start sites*) und *upstream*-Bereiche der TSS (TSS +/- 1.000 bp)) eine Anreicherung der Bindestellen zu beobachten ist (Abb. 37A). Im Vergleich zur allgemeinen Häufigkeit bestimmter Regionen im Maus-Genom konnte beobachtet werden, dass die Bindestellen der beiden Proteine eine starke Anreicherung in Exons, TESs, TSSs und in *upstream*-Bereichen der TSSs zeigen. Die Verteilung der CTCF-Bindestellen auf diese Bereiche zeigte kaum Unterschiede zwischen Klon 34 und untransfizierten NIH3T3-Zellen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Anreicherung in den genannten Regionen im Falle von CTCFL stärker ausgeprägt war als bei CTCF. Deutlich unterrepräsentiert waren Bindestellen in intergenischen Bereichen.



**Abb. 37: CTCF und CTCFL Bindestellen sind stark angereichert in Gen-assoziierten Bereichen und überlappen deutlich untereinander und mit H3K4me3.** A. Verteilung der Bindestellen von CTCF und CTCFL im Genom. Der Anteil der unterschiedlichen Bereiche am Genom sind in der rechten Säule angegeben. Links von dieser Säule ist die tatsächliche Verteilung der detektierten Bindestellen für CTCF (CTS) und CTCFL (BTS) in den drei für die ChIP-Sequenzierung verwendeten Proben in den unterschiedlichen Bereichen dargestellt. TSS = *transcriptional start site*; TSS *upstream* = TSS - 1.000 bp, TES = *transcriptional end site*. **B.** *Clustering (K-means-clustering)* der 68.000 Bindestellen von CTCF mit den Bindestellen von CTCFL in Klon 34 und untransfizierten NIH3T3-Zellen sowie mit Daten zur Trimethylierung von H3K4 in NIH3T3L1-Zellen (Mikkelsen et al., 2007) anhand der Stärke der Bindung. Die Spalten wurden zentriert auf das peak-Zentrum (PZ), berücksichtigt wurden je 3 kb *up*- und *downstream* des PC.

Nach Gruppen-Bildung (*clustering*) der Bindestellen mit Daten zur Trimethylierung von H3K4 in NIH3T3L1-Zellen (Mikkelsen et al., 2007) konnte beobachtet werden, dass der Großteil starker BTS auch eine starke Bindung von CTCF aufwies (Abb. 37B). Umgekehrt zeigten aber nicht alle starken CTCF-Bindestellen eine Bindung von CTCFL. Zusätzlich konnten an starken CTCFL-Bindestellen, an denen auch CTCF bindet, starke Signale für trimethyliertes H3K4 beobachtet werden. Solche Signale waren jedoch an starken CTCF-Bindestellen, welche keine CTCFL-Bindung zeigten, nicht zu sehen. Der Vergleich der CTCF-Bindestellen in Klon 34 und untransfizierten NIH3T3-Zellen zeigte nur geringe Unterschiede. Lag in Klon 34 eine starke CTCFL-Bindestelle vor, welche zusätzlich Signale für H3K4me3 aufwies (oberstes *cluster* Abb. 37B) konnte eine geringe Abnahme der CTCF-Bindung detektiert werden.



**Abb. 38: Die Bindung von CTCFL im Promotorbereich des Gens DIEXF führt zu einer verringerten Bindung von CTCF.** Gezeigt ist der Genbereich von DIEXF, Exons sind in blau angegeben, der translatierte Bereich ist in dunkelblau, untranslatierte Bereiche in hellblau eingezeichnet. Darunter sind die Bindeprofile von CTCF und CTCFL in Klon 34 und in untransfizierten NIH3T3-Zellen angegeben. Gezeigt sind außerdem die Bindeprofile von CTCF (Chen et al., 2008) in murinen embryonalen Stammzellen sowie ein H3K4me3-Profil aus NIH3T3L1-Zellen (Mikkelsen et al., 2007). mES = murine embryonale Stammzellen.

Ein Beispiel für ein Gen, in dessen Promotorbereich eine Verringerung der CTCF-Bindung nach Induktion der CTCFL-Expression zu beobachten war, ist DIEXF (Abb. 38). In NIH3T3-Zellen war aufgrund der fehlenden Expression keine Bindung von CTCFL zu beobachten, in Material aus induziertem Klon 34 hingegen schon. Dies wies erneut auf die Spezifität der erhaltenen Signale und auf die Verwendbarkeit des Antikörpers CTCFL6 für ChIP-Experimente hin. An der CTCFL-Bindestelle konnte in untransfizierten NIH3T3-Zellen eine CTCF-Bindung beobachtet werden. Im induzierten Klon 34 fällt das Signal für die CTCF-Bindung jedoch schwächer aus. Die Qualität der in der ChIP-Sequenzierung erhaltenen Profile wurde durch Vergleich mit bekannten Bindedaten von CTCF in murinen embryonalen Stammzellen (Chen et al., 2008), belegt. In dem Datensatz erfolgte die Bindung des Proteins an der in NIH3T3-Zellen beobachteten Bindestelle. Der zusätzliche Vergleich mit den H3K4me3-Daten (Mikkelsen et al., 2007) zeigte, dass die Bindestelle tatsächlich im Promotorbereich des Gens vorlag und es sich um einen aktiven Promotor handelt.

Ein Vergleich der unter 5.4.1 identifizierten deregulierten Gene mit den CTCFL-Bindestellen zeigte, dass die Hälfte der deregulierten Gene als nächstgelegenes Gen einer CTCFL-Bindestelle identifiziert wurden (Abb. 39). Für die Analyse wurden Gene verwendet, welche bei der Genexpressionsanalyse eine mehr als 1,5 fache Deregulierung und gleichzeitig einen p-Wert unter 0,05 zeigten. Die detektierten Bindestellen wurden dem nächstgelegenen Gen zugeordnet und mit der Liste der deregulierten Gene verglichen, wobei multiple Bindestellen (unterschiedliche Bindestellen, jedoch demselben Gen zugeordnet), nur einmalig berücksichtigt wurden.



Abb. 39: Knapp die Hälfte der deregulierten Gene wurden als nächstgelegenes Gen zu einer CTCFL-Bindestelle identifiziert. Für die Gruppe der CTCFL-Bindestellen (BTS) wurden 9.905 *sites* verwendet, wobei multiple *peaks* in der gleichen Region unberücksichtigt blieben. Deregulierte Gene wurden definiert als Gene mit mehr als 1,5 facher Deregulierung und einem p-Wert unter 0,05 (laut Genexpressionsanalyse). Diagramm erstellt mit der Software GeneVenn.

Für mehr als die Hälfte der deregulierten Gene erscheint es somit möglich, dass die nach der CTCFL-Induktion beobachtete und in verschiedenen individuellen Experimenten belegte Veränderung der Genexpression direkt durch die Bindung von CTCFL im Gen oder in gennahen Bereichen ausgelöst wurde, entweder als direkte Folge von CTCFL oder indirekt durch Verdrängung von CTCF an diesen Bindestellen.

### 6 Diskussion

CTCFL hat sich aus einer Duplikation des Gens CTCF entwickelt und beide weisen eine nahezu identische zentrale 11-Zinkfinger-Region auf, welche für die Bindung beider Faktoren an DNA verantwortlich ist. Aufgrund abweichender N- und C-Termini zwischen beiden Proteinen wird daher vermutet, dass sie zwar an dieselben DNA-Sequenzen binden, jedoch dort, beispielsweise durch Rekrutierung unterschiedlicher Co-Faktoren, unterschiedliche und eventuell sogar gegensätzliche Funktionen ausüben (Sun et al., 2008). Anfänglich trat aufgrund der Sequenzgleichheit direkt nach der Duplikation keine Kompetition der beiden Proteine um die Bindestellen auf und somit auch keine negativen Auswirkungen. Die evolutive Veränderung der CTCFL-Sequenz und damit vermutlich auch der Funktionen von CTCFL dürfte jedoch zunehmend zur Notwendigkeit geführt haben, die Bindung von CTCF und CTCFL an dieselben Bindestellen zu verhindern oder zu regulieren. Die räumliche Trennung der Expression von CTCF und CTCFL könnte eine Konsequenz aus der Konkurrenz der beiden Proteine sein. CTCF wird in praktisch allen somatischen Zellen exprimiert, jedoch nicht in primären Spermatocyten, wohingegen eine Expression von CTCFL nur in diesen Zellen zu finden ist und nicht in somatischen Geweben. Diese Trennung ging evolutiv einher mit der zunehmenden Veränderung der CTCFL-Sequenz (Hore et al., 2008). Zusätzlich kann CTCFL an methylierte und unmethylierte DNA-Sequenzen binden, CTCF jedoch nur an unmethylierte. Da die Bindung von CTCFL an unmethylierte DNA weniger stark ist als an methylierte, wird vermutet, CTCF verdränge CTCFL von den unmethylierten Bindestellen, wodurch die wichtigsten Bindestellen im Falle von CTCFL die methylierten Bindestellen darstellen sollten (Nguyen et al., 2008b). Damit würden ungewollte Auswirkungen einer Konkurrenz zwischen CTCF und CTCFL weiter verringert.

Trotz der räumlichen Trennung der Expression beider Proteine treten in Form von Tumoren Fälle auf, in denen beide gleichzeitig im selben Zelltyp / Gewebe exprimiert werden. In diesen kommt es zu einer in somatischem Gewebe normalerweise nicht stattfindenden Konkurrenz der beiden Proteine um die Bindestellen. Es gibt einige Hinweise darauf, dass die Expression von CTCFL einen wichtigen Schritt bei der Entstehung von Tumoren darstellen könnte. CTCF wird eine eher reprimierende Funktion bezogen auf die Expression von Ziel-Genen sowie zusätzlich eine Rolle als Tumor-Suppressor zugeschrieben, wohingegen CTCFL als aktivierend z.B. auf das anti-apoptische Gen BAG1 beschrieben wird und eine Amplifikation der CTCFL-kodierenden Region 20q13.2 häufig mit Tumoren assoziiert ist (Chen et al., 1998; Renkvist et al., 2001). CTCFL wird somit als mögliches Onkogen gesehen,

wobei speziell die Kompetition mit CTCF an bestimmten Bindestellen als möglicher Auslöser von Krebs angesehen wird. So könnte CTCFL beispielsweise durch Verdrängung von CTCF und Unterbindung seiner Funktionen zu einer Derepression anderer Onkogene wie beispielsweise C-MYC führen (Klenova et al., 2002; Recillas-Targa et al., 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, CTCFL in Zelllinien zu exprimieren, welche keine endogene CTCFL-Expression aufweisen, wobei die Expression von exogenem CTCFL über ein *tet-off*-System regulierbar sein sollte. Der Einfluss der CTCFL-Expression auf die globale Genexpression sollte zeigen, welche Gene durch CTCFL dereguliert werden. Über verschiedene Wachstumsanalysen (Wachstumskurven, *colony formation assay*) wurde überprüft, ob die Expression von CTCFL bzw. die daraus resultierende Deregulierung anderer Gene einen Hinweis auf eine transformierende Wirkung von CTCFL ergibt. Weiterhin sollte die Identifizierung von CTCFL- und CTCF-Bindestellen in den Zelllinien zeigen, ob beide Proteine tatsächlich an denselben Sequenzen um eine Bindung konkurrieren und ob es Bindestellen gibt, welche nur von CTCF bzw. nur von CTCFL besetzt werden. Letztendlich steht über all dem die Frage, welche Folgen durch eine gleichzeitige Expression von CTCFL und CTCFL auftreten und welche Auswirkungen die Bindung von CTCFL auf molekularbiologischer Ebene an den entsprechenden Bindestellen hat.

#### 6.1 Klonierung verschiedener CTCFL-Vektoren

Zwar sind eine Reihe kommerziell erhältlicher CTCFL-Antikörper verfügbar, diese sind jedoch alle gegen humanes CTCFL gerichtet. Eine Detektion von Maus-CTCFL wird zwar vom jeweiligen Hersteller nicht ausgeschlossen, wurde jedoch in keinem Falle belegt. Aufgrund der Unterschiede zwischen den N- und C-Termini des Proteins in beiden Spezies (Hore et al., 2008) erschien ein Nachweis von mCTCFL mit diesen Antikörpern unwahrscheinlich. Zusätzlich scheinen zumindest die gegen Anfang der vorliegenden Arbeit verfügbaren gegen CTCFL gerichteten Antikörper generell schwierig in der Handhabung zu sein (Woloszynska-Read et al., 2007). So gelingt es selbst in humanen Zelllinien, in denen eine Expression von CTCFL bekannt ist (z.B. K562), nicht immer, CTCFL-Protein mit diesen Antikörpern nachzuweisen. Um in den stabil transfizierten Zellen dennoch einen sicheren Nachweis von überexprimiertem CTCFL zu ermöglichen, wurde N-terminal ein FLAG-tag bzw. HA-tag angefügt. Zusätzlich wurden von F. Sleutels (Erasmus MC, Rotterdam) freundlicherweise vier Antikörper zur Verfügung gestellt, welche spezifisch gegen Maus-CTCFL ausgerichtet sein sollten. Von diesen konnte mit dem Antikörper CTCFL6 nach transienten Transfektionen in Western Blot Experimenten sowie nach *in-vitro*-Translation
CTCFL spezifisch nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass bei Verwendung von Proteinextrakt aus NIH3T3-Zellen mit diesem Antikörper auch eine unspezifische Bande detektiert wurde, welche im Polyacrylamid-Gel eine ähnliche Wanderungsgeschwindigkeit aufweist. Eine eindeutige Trennung der Nebenbande und der CTCFL-Bande gelang dabei nicht immer und erforderte lange Laufzeiten. Für Western Blots wurde daher der gegen den FLAG-tag gerichtete Antikörper verwendet. Mit diesem war ein eindeutiger Nachweis von CTCFL-Protein möglich.

Um auch einen zeitlichen Aspekt der möglichen Deregulation von Genen untersuchen zu können, wurde ein tet-off-System für die Überexpression von CTCFL verwendet. Gegenüber einem tet-on-System liegt ein großer Vorteil darin, dass das für die Zellkultur verwendete FCS teilweise Spuren von Tetracyclin oder Doxycyclin enthalten kann und somit zu einer unerwünschten Aktivierung der CTCFL-Expression führen würde (Clontech, 2003). Zusätzlich wurde ein Vektor mit einem bidirektionalen Promotor verwendet, welcher gleichzeitig zur Expression von FLAG-CTCFL und eGFP führen sollte. Dadurch sollte die Identifizierung FLAG-CTCFL exprimierender Klone indirekt über einen mikroskopischen Nachweis von eGFP erleichtert werden. Es zeigte sich dabei allerdings, dass nicht alle Klone, in denen eGFP nachgewiesen werden konnte, tatsächlich auch FLAG-CTCFL exprimierten (Tab. 11, S. 142). Spätere Versuche mit dem gleichen System, jedoch in humanen Zelllinien, welche von P. Bergmaier (JLU Gießen) durchgeführt wurden, zeigten Ähnliches. Zusätzlich wurde dabei auch beobachtet, dass FLAG-CTCFL exprimierende Klone in einigen Fällen keine Expression von eGFP zeigten. Dies lässt vermuten, dass eine Reihe stabiler Klone aufgrund fehlender eGFP-Expression aussortiert wurden, welche möglicherweise eine FLAG-CTCFL Expression gezeigt hätten. Das könnte teilweise die geringe Zahl von 14 FLAG-CTCFL exprimierenden Klonen erklären, welche nach Charakterisierung von 100 stabilen Zellklonen von NIH3T3 identifiziert werden konnten. Ebenso trifft dies wohl auf den einzelnen Klon in HEK293-T-Zellen zu. Bei der Selektion von stabilen Klonen hämatopoetischer Zelllinien wurde dieses Problem dann berücksichtigt und alle stabilen Klone wurden neben der mikroskopischen Untersuchung auch über RT-PCR charakterisiert.

Es wird beschrieben, dass CTCF die Expression von CTCFL hemmt, wohingegen CTCFL zu einer Aktivierung des eigenen Promotors führen kann (Renaud et al., 2007; Vatolin et al., 2005; Woloszynska-Read et al., 2007). Daher erschien es sinnvoll, in späteren Experimenten eine Unterscheidung zwischen endogenem und exogenem CTCFL zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde eine zusätzliche Schnittstelle in die DNA-Sequenz von endogenem CTCFL eingefügt, welche jedoch die Aminosäuresequenz und somit die Funktionalität des Proteins nicht beeinflusst. Über entsprechende Restriktionsendonuklease-Verdau-Ansätze (nicht gezeigt) konnte nachgewiesen werden, dass die Schnittstelle vorhanden ist und auch geschnitten wird. Zusätzlich ist aufgrund der abweichenden Basen auch eine direkte Detektion mit Oligonukleotidprimern möglich (nicht gezeigt), deren letzte Base an den veränderten Stellen der CTCFL-Sequenz hybridisiert.

# 6.2 Expression von CTCFL in hämatopoetischen Zellen nach transienter Expression

Bisher ist über eine Expression von CTCFL in an Leukämie erkrankten Patienten noch nichts bekannt (Martin-Kleiner, 2011). Allerdings kann in leukämischen Zelllinien eine schwache bis starke Expression von CTCFL beobachtet werden, wobei eine hohe Expression in unmethylierten Zelllinien detektiert wurde (Renaud et al., 2007). Um den Einfluss von CTCFL auf hämatopoetische Zellen zu untersuchen, sollten daher entsprechende Zelllinien von Maus und Mensch stabil mit CTCFL transfiziert werden. Dazu wurden die Zelllinien RMB-3 (Maus) und THP-1 (Mensch) verwendet, wobei für beide Zelllinien zuvor nachgewiesen wurde, dass CTCFL nicht endogen exprimiert wird. In beiden Fällen handelt es sich um Suspensionszellen, welche mit den meisten Transfektionsmethoden nicht oder nur sehr schlecht zu transfizieren sind. Als beste Methode gilt in beiden Fällen der Transfer mittels Elektroporation bzw. Nukleofektion. Da RMB-3 nur selten in publizierten Arbeiten verwendet wurde, waren keine Literaturangaben zu geeigneten Bedingungen verfügbar. Im Falle von THP-1 hingegen existieren beispielsweise bezüglich der Nukleofektion detaillierte, zelltypspezifische Protokolle (Amaxa, 2009). Für RMB-3 wurde daher nach Angaben des Herstellers versucht, die geeigneten Nukleofektionsbedingungen zu ermitteln (Lonza Cologne AG, 2009). Zusätzlich wurde für beide Zelllinien versucht, anhand einer Basis-Anleitung die geeigneten Bedingungen für eine Elektropoartion zu ermitteln (Eppendorf, 2006). In allen Fällen zeigte sich jedoch, dass ein Großteil der Zellen durch Propidiumiodid angefärbt wurde und demnach die Transfektion nicht überlebte. Die überlebenden Zellen zeigten zwar fast alle ein eGFP-Signal, jedoch konnte selbst mit konditioniertem Medium kein stabil transfizierter Klon etabliert werden, welcher eine CTCFL-Expression zeigt. Allerdings konnte für THP-1 gezeigt werden, dass in transient transfizierten Zellen CTCFL-mRNA nachzuweisen ist. Weiterhin sind zumindest für THP-1 eine Reihe stabil transfizierter Klone publiziert worden, es besteht somit kein generelles Problem bei der Etablierung stabiler Klone. Daher wurde versucht, unter Mithilfe der Arbeitsgruppe von M. Rehli (Universitätsklinikum Regensburg), welche über Erfahrungen bei der Transfektion von THP-1 mittels Nukleofektion verfügt,

THP-1 Klone mit regulierbarer CTCFL-Expression zu selektieren. Auch daraus gingen keine CTCFL-exprimierenden Klone hervor. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass das Fehlen stabiler Klone auf einer fehlerhaften Durchführung der Transfektion beruht. Möglicherweise führt die Expression von CTCFL in den verwendeten Zelllinien nach kurzer Zeit zum Absterben der Zellen. So konnte nach transienten Transfektionen CTCFL zwar nachgewiesen werden, jedoch in keinem der wenigen Puromycin-resistenten Klone, welche aus der Selektion hervorgingen. Letztere beweisen, dass die verwendeten Zellen durchaus stabil transfiziert werden können, in diesem Falle musste zumindest die auf pTA-N kodierte Puromycin-Resistenz aufgenommen worden sein. Ein eindeutiger Nachweis einer toxischen Wirkung von CTCFL auf RMB-3- und THP-1-Zellen liegt jedoch nicht vor.

#### 6.3 CTCFL mRNA aber kein Protein in HEK 293-T Klon 21

Im Gegensatz zu THP-1 konnte nach transienten Transfektionen in HEK 293-T-Zellen nicht nur CTCFL-mRNA, sondern auch CTCFL-Protein nachgewiesen werden. Nach der Selektion mit Puromycin konnten einige Puromycin-resistente Klone etabliert werden, jedoch zeigten nur wenige dieser Klone eine mikroskopisch nachweisbare Expression von eGFP, wie sie aufgrund des bidirektionalen Promotors des Vektors pBI-eGFP-FLAG-hCTCFL erwartet wurde. Da zu dieser Zeit noch nicht bekannt war, dass ein großer Teil CTCFL-exprimierender Klone trotz des bidirektionalen Promotors keine eGFP-Expression zeigt (siehe 6.1), wurden diese Klone nicht weiter verwendet. Somit blieb nur ein Klon, welcher neben einem eGFP-Signal auch eine Expression von CTCFL zeigte. In diesem konnte CTCFL jedoch nur auf Ebene der mRNA detektiert werden, der Nachweis von CTCFL-Protein mittels Western Blot gelang nicht. Eine weitere Charakterisierung, beispielsweise über Wachstumskurven, wurde deshalb nicht durchgeführt. Da jedoch nach transienten Transfektionen Protein detektiert wurde, sollte prinzipiell auch der Nachweis in stabilen Klonen möglich sein. Da die verwendeten Antikörper, wie bereits erwähnt, nur unzureichend zur Detektion von CTCFL geeignet sind, könnte durchaus CTCFL-Protein in diesem Klon vorhanden sein, jedoch in niedrigen Konzentrationen, welche nicht mehr nachgewiesen werden können. Eine Verdopplung der für den Western Blot verwendeten Proteinmenge führte allerdings auch nicht zur Detektion einer spezifischen Bande. Nachdem durch P. Bergmaier der Nachweis von CTCFL-Protein in K562-Zellen gelang (persönliche Mitteilung), in welchen in zahlreichen früheren Versuchen ebenfalls keine Detektion möglich war, könnte ein erneuter Test mit den entsprechenden geänderten Western Blot Bedingungen doch noch zu einem Nachweis von CTCFL-Protein in diesem Klon führen. Diese Versuche sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen, so dass davon auszugehen ist, dass die im Klon gebildete CTCFL-mRNA nicht zur Bildung des entsprechenden Proteins führt oder dieses abgebaut wird bevor messbare Konzentrationen erreicht werden. Weiterhin ist zu erwähnen, dass eventuell nur eine degradierte Form von CTCFL in die Zellen eingebaut wurde, da bei Verwendung des Vektors in HeLa-Zellen in allen daraus hervorgehenden Klonen CTCFL ebenfalls nur als mRNA nachgewiesen werden konnte (P. Bergmaier, persönliche Mitteilung). In diesen Fällen führte eine genauere Untersuchung zu dem Ergebnis, dass in beiden Fällen die vorliegende mRNA nur einen Teil der CTCFL-Sequenz darstellte. Eine verkürzte mRNA-Sequenz könnte auch im HEK 293-T-Klon 21 vorliegen, dies wurde bisher nicht untersucht. Da neben THP-1-Zellen bisher weder in HEK 293-T-Zellen noch in HeLa-Zellen Klone etabliert werden konnten, welche eine Expression von CTCFL in voller Länge auf Proteinebene aufweisen, muss zumindest die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass eine solche Expression zum Absterben der Zellen führt. Der Einbau verkürzter CTCFL-Sequenzen hingegen könnte zu funktionell unwirksamen CTCFL-Varianten führen, welche nicht das Absterben der Zellen zur Folge haben.

### 6.4 Induzierbare CTCFL-Expression in NIH3T3-Zellen

Im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Zelllinien konnte in aus NIH3T3-Zellen hervorgehenden Klonen neben CTCFL-mRNA auch CTCFL-Protein nachgewiesen werden. Die aus der Selektion hervorgegangen Klone zeigten in allen Fällen eine Induzierbarkeit der Expression durch Entnahme von Doxycyclin aus dem Zellkulturmedium. Da zum Zeitpunkt der Selektion der Klone noch nicht bekannt war, dass in vielen Fällen eine fehlende eGFP-Expression nicht zwangsläufig mit einer fehlenden CTCFL-Expression einhergeht, wurden nur eGFP-exprimierende Klone weiter charakterisiert. Dadurch wurde vermutlich nur eine geringe Zahl der tatsächlichen CTCFL-exprimierenden Klone weiter kultiviert. Die selektierten Klone zeigen allerdings aufgrund dieser Tatsache auch alle eine gleichzeitige eGFP-Expression, welche Western-Blot-Kontrollen mit einem GFP-Antikörper sowie vor wichtigen Experimenten eine direkte Kontrolle der Induktion über Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte. Wie bereits vom Hersteller beschrieben zeigten die verschiedenen Klone jedoch Unterschiede sowohl bei der Stärke der Induktion, als auch bei der *leakyness* und der relativen Stärke der CTCFL-Expression. In Klon 60 wurde beispielsweise eine relativ hohe Expression beobachtet, jedoch auch eine hohe leakyness des tet-off-Systems. Dies bot jedoch auch die Möglichkeit, unterschiedliche Expressionslevel von CTCFL zu untersuchen und die Effekte der Induktion mit der Menge an CTCFL zu korrelieren. Für die meisten weitergehenden Untersuchungen wurde Klon 34 verwendet. Dieser zeichnete sich durch eine Kombination aus relativ hoher CTCFL-Expression bei gleichzeitig starker Induktion (und damit zusammenhängender geringer *leakyness*) aus.

#### 6.4.1 CTCFL hat keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen

Aufgrund der Vermutung, dass CTCFL im Gegensatz zu CTCF ein potentielles Onkogen darstellt (Martin-Kleiner, 2011), wurde untersucht, ob die Expression von CTCFL in NIH3T3-Zellen zu einer Veränderung des Wachstums der Zellen führt. In Experimenten zur Ermittlung der Teilungsrate (einfache Wachstumskurven) konnte bei keinem der untersuchten Klone ein Unterschied zwischen induzierten und uninduzierten Zellen beobachtet werden. Die Expression von CTCFL führte somit nicht zu einer gesteigerten Teilungsrate, eine transformierende Wirkung von CTCFL konnte nicht gezeigt werden. Die verschiedenen Klone zeigten allerdings unterschiedliche Teilungsraten, welche teilweise über, teilweise unter der Teilungsrate von untransfizierten NIH3T3-Zellen lagen. Da es sich dabei jedoch um klonale Effekte handelt, könnte der Ort der Integration von CTCFL im Genom dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Eine weitere Eigenschaft von transformierten Zellen ist das Anheftungs-unabhängige Wachstum (anchorage independent growth). Daher wurden die NIH3T3-Klone in einem sogenannten colony formation assay darauf untersucht, ob die Induktion der CTCFL-Expression zu einer erhöhten Zahl an Kolonien im Assay führt. Die Bildung von Kolonien ist dabei nur möglich, wenn sich die Zellen auch ohne die Anheftung an die Zellkulturplatte teilen können. Wie die Ergebnisse zeigen, wurde auch bei untransfizierten Zellen eine große Anzahl an Kolonien beobachtet. Eine morphologische Begutachtung der Zellen weist jedoch nicht darauf hin, dass es sich nicht um NIH3T3-Zellen handelt. Denkbar wäre allerdings, dass aufgrund der langfristigen Verwendung der Zellen weitere, von den ursprünglich etablierten NIH3T3-Zellen abweichende Mutationen entstanden sind, welche die Zellen zum Anheftungs-unabhängigen Wachstum befähigen. Zur eindeutigen Beurteilung des Assays müssten daher NIH3T3-Vergleichszellen anderer Labore oder direkt von ATCC verwendet werden. Da die etablierten Klone jedoch aus den im Labor verwendeten Zellen hervorgingen, kann die Bildung von Kolonien im Assay nicht direkt auf die Expression von CTCFL zurückgeführt werden. Diese Eigenschaft könnte durchaus auf den bereits in den Ausgangszellen bestehenden Eigenschaften beruhen. Dennoch sollte eine Induktion der CTCFL-Expression, sofern sie einen Effekt auf diese Eigenschaft hat, innerhalb eines Klons zu einer Veränderung der Kolonienzahl führen. Betrachtet man die Zahl der Kolonien in den verschiedenen Klonen, kann jedoch keine klare Aussage getroffen werden, ob CTCFL zu mehr oder zu weniger Kolonien führt. So ist in einigen Klonen (Klone 39 und 53) sowie in untransfizierten NIH3T3-Zellen keine signifikante Änderung der Kolonienzahl zu beobachten. In vier Klonen (11, 51, 60 und 95) ist eine deutliche Erhöhung der Kolonienzahl nach Induktion der CTCFL-Expression zu beobachten, aber in praktisch der gleichen Zahl von Klonen (Klone 17, 34, 48, 57 und 62) ist eine Verringerung zu sehen. Auch bei dieser Wachstums-Analyse fällt auf, dass die Unterschiede zwischen den Klonen sehr groß sind. So wurden bei Klon 34 sowohl induziert als auch uninduziert nur sehr wenige (teilweise weniger als 10) Kolonien gezählt, wohingegen in untransfizierten NIH3T3 über 500 Kolonien und in Klon 95 über 800 Kolonien beobachtet werden konnten.

#### 6.4.2 Zeitlicher Verlauf der CTCFL-Induktion in Klon 34

Für weitergehende Experimente war es erforderlich, die Kinetik der Induktion zu ermitteln. Dazu wurden sowohl RNA- als auch Proteinextrakte auf die Induktion der CTCFL-Expression untersucht. Dabei zeigte sich neben der bereits erwähnten *leakyness*, dass bereits nach 24 h ohne Doxycyclin ein Anstieg der CTCFL-mRNA als auch von CTCFL-Protein zu beobachten war. Bereits nach zwei Tagen konnte das Maximum der Expression beobachtet werden. In den darauf folgenden Tagen nahm die Expression wieder ab und schien sich auf ein etwas niedrigeres Niveau einzupendeln.

Es wird deutlich, dass die Menge an CTCFL-Protein sich zeitlich ähnlich verhält wie die Menge der mRNA. Dies lässt vermuten, dass die Bildung des Proteins nach Entstehung der mRNA sehr rasch erfolgt, jedoch auch der Abbau des Proteins. Die gleichzeitige Abnahme von mRNA und Protein lässt einen raschen Abbau des Proteins vermuten und somit eine sehr enge Regulierung von CTCFL.

Für die folgenden Experimente wurde meist RNA oder Protein nach vier Tagen Induktion gewonnen. Zu dieser Zeit pendelte sich die Expression von CTCFL ein und auch die durch CTCFL ausgelösten Effekte sollten nach dieser Zeit bereits sichtbar sein. Mit der Ermittlung der Zeitkinetik der Induktion konnte außerdem gezeigt werden, dass fehlende Effekte bei den Wachstumskurvenanalysen nicht auf eine fehlende CTCFL-Expression zurückzuführen sind. Die Dauer aller durchgeführten Wachstumsanalysen überstieg deutlich die Dauer der Induktion, welche für eine maximale CTCFL-Expression nötig war. Zusätzlich zeigte die Zeitkinetik, dass auch nach längerer Dauer der Induktion (sieben Tage) noch eine Expression von CTCFL auf hohem Niveau vorhanden ist. Über zusätzliche Langzeitexperimente konnte außerdem gezeigt werden, dass auch nach acht Wochen ohne Doxycyclin noch immer eine CTCFL-Expression nachweisbar ist. Letzteres war speziell für den *colony formation assay*  von Bedeutung, da bei diesem die Zellen über einen Zeitraum von mehreren Wochen kultiviert werden mussten.

## 6.4.3 CTCFL führt zur Deregulation zahlreicher Gene

Da phänologisch keine Effekte der CTCFL-Expression auf die Zellgröße oder -form beobachtet wurden und auch in den Wachstumsanalysen keine Unterschiede zwischen induzierten und uninduzierten Zellen zu erkennen waren, wurde eine genomweite Genexpressionsanalyse mit RNA von induzierten und uninduzierten Zellen des Klons 34 sowie von untransfizierten NIH3T3-Zellen durchgeführt. Dabei konnten eine Reihe von Genen ermittelt werden, welche bei Klon 34 nach Induktion der CTCFL-Expression im Vergleich zu uninduzierten Zellen eine signifikante Veränderung der Genexpression zeigten (Abb. 30, S. 92). Die Zahl der deregulierten Gene erhöhte sich zusätzlich bei einem Vergleich induzierter Zellen von Klon 34 mit untransfizierten NIH3T3-Zellen. Eine genauere Analyse zeigte dann, dass einige deregulierte Gene nur eine signifikante Änderung im Vergleich zu den NIH3T3-Zellen zeigten. Dies könnte auf der leakyness des tet-off-Systems beruhen. Gene, welche zwischen uninduzierten und induzierten Zellen keinen Unterschied zeigen, wohl aber zu NIH3T3-Zellen, könnten bereits durch die geringen Mengen von CTCFL, welches durch die leakyness in uninduzierten Zellen bereits vorhanden ist, dereguliert werden. Liegt für diese Gene bereits ein gesättigter Zustand vor, so führt eine weitere Erhöhung der CTCFL-Menge durch Induktion der Zellen zu keinem zusätzlichen Effekt mehr. Für andere deregulierte Gene liegt der nötige CTCFL-Schwellenwert möglicherweise über der durch die leakyness hervorgerufenen Menge, so dass eine signifikante Deregulation erst nach der Induktion beobachtet werden kann. In den meisten Fällen jedoch zeigten die Gene bereits beim Vergleich der uninduzierten Zellen von Klon 34 mit den NIH3T3-Zellen eine signifikante Veränderung der Expression, welche durch Induktion der CTCFL-Expression verstärkt wurde. Dies zeigt, dass für die meisten Effekte von CTCFL auf die Expression anderer Gene die in den Klonen vorhandene Menge von CTCFL noch nicht im Sättigungsbereich vorliegt.

Ob es sich bei den Effekten um direkte Regulation durch CTCFL oder indirekte Regulation handelt, konnte mit diesem Experiment nicht ermittelt werden. Die Veränderung der Genexpression nach Induktion der CTCFL-Expression ließe sich nicht nur durch eine aktive Deregulation der jeweiligen Gene durch CTCFL beziehungsweise gebundene Co-Faktoren erklären. Da bereits nach zwei Tagen Induktion sehr hohe Konzentrationen von CTCFL-mRNA als auch Protein vorliegen, dürften einige der deregulierten Gene nicht direkt durch CTCFL reguliert sein, sondern indirekt durch andere deregulierte Gene. In diesen

Fällen würde ein sekundärer Effekt der CTCFL-Induktion vorliegen. Denkbar wäre auch, dass normalerweise CTCF für die Regulation zumindest einiger der deregulierten Gene verantwortlich ist. Analog zum derzeit diskutierten Modell einer Kompetition von CTCF und CTCFL um Bindestellen im Genom, könnte die Induktion der CTCFL-Expression zu einer immer stärkeren Verdrängung von CTCF an den jeweiligen Bindestellen führen. Selbst wenn CTCFL keinen direkten Effekt auf die Expression des entsprechenden Gens hat, könnte diese Kompetition zu einem Verlust der CTCF-Regulation und damit zur Deregulation führen. Beispielsweise könnte eine Behinderung der Bindung von CTCF an Cohesin außerdem in einer Veränderung der dreidimensionalen Chromatinstruktur resultieren, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielt.

Da aufgrund der großen Zahl nicht alle deregulierten Gene in individuellen RT-PCRs verifiziert werden konnten, wurden einige repräsentative Gene ausgewählt, um die Qualität der Genexpressionsanalyse zu untersuchen. Dazu wurden neben stark deregulierten Genen (z.B. GPR56 und AKR1C18) auch schwächer deregulierte Gene untersucht (z.B. FZD4 und ITFG3). Für alle untersuchten Gene konnte die im *expression profiling* ermittelte Deregulation bestätigt werden, wenn auch die Stärke der Deregulation zwischen beiden Experimenten teilweise nicht identisch war. Dies könnte beispielsweise darauf beruhen, dass für die Berechnung der Deregulation bei der Genexpressionsanalyse die Expression mehrerer Exons verrechnet wird, wohingegen die Verifizierung in Einzelexperimenten nur einen bestimmten Bereich (meist nur zwei Exons) des Gens abdeckt. Unterschiedliche Spleiß-Varianten könnten somit zu abweichenden Ergebnisse beitragen. Um diesen Effekt gering zu halten, wurden nur Oligonukleotidprimer verwendet, deren *template*-Sequenz in den Ergebnissen des *expression profilings* als dereguliert identifiziert wurden. Sofern mehrere verschiedene Spleiß-Varianten vorliegen, ergeben sich zwangsläufig dennoch Unterschiede zwischen beiden Experimenten.

Speziell im Falle von Genen, die zwischen uninduzierten und induzierten Zellen von Klon 34 keinen signifikanten Unterschied in der Expression zeigen, wohl aber zu den NIH3T3-Zellen, muss auch die Möglichkeit von klonalen Effekten berücksichtigt werden. Klonale Effekte können aber prinzipiell bei allen deregulierten Genen vorliegen. Um diese auszuschließen, wurde die Deregulation der Gene auch in anderen Klonen untersucht. In allen untersuchten Klonen konnte derselbe Effekt auf die Genexpression wie in Klon 34 beobachtet werden, ein klonaler Effekt als Auslöser der Deregulation kann daher ausgeschlossen werden. Der Großteil der deregulierten Gene wird die veränderte Expression daher nicht aufgrund klonaler

Effekte zeigen. Tatsächlich konnte bisher ein solcher Effekt bei keinem untersuchten Gen beobachtet werden.

Neben dem Nachweis der Deregulation in anderen Klonen spricht auch die Kinetik der Deregulation für einen Einfluss der CTCFL-Expression. So konnte für GPR56 (Abb. 28, S. 90) und GSTM5 (nicht gezeigt) beobachtet werden, dass die Deregulation zeitlich mit der Induktion der CTCFL-Expression überlappt. War die Expression von GPR56 in untransfizierten NIH3T3-Zellen noch sehr gering oder nicht nachweisbar, ist bereits in uninduzierten Zellen von Klon 34 eine deutliche Expression von GPR56 und auch GSTM5 zu sehen, welche vermutlich durch die *leakyness* hervorgerufen wird. Mit zunehmender Dauer der Induktion steigt neben der Menge von CTCFL auch die Menge von GPR56 und GSTM5 an.

Bereits die Zeitkinetik der Deregulation von GPR56 und GSTM5 wies darauf hin, dass die Veränderung der Genexpression mit der Menge von CTCFL korreliert. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurde die relative Expression von CTCFL in mehreren Klonen bestimmt. Mit der gleichen cDNA wurde anschließend die Deregulation verschiedener Gene bestimmt. Anschließend wurden die verschiedenen Werte von CTCFL gegen die Deregulation der Gene geplottet, danach erfolgte eine Korrelationsanalyse (Abb. 31, S. 93). Diese zeigte für alle untersuchten Gene eine deutliche Korrelation zwischen CTCFL-Expression und Deregulation des jeweiligen Gens.

#### 6.4.4 Biologische Bedeutung der Deregulation

Die durchgeführte *GO-term*-Analyse zeigte lediglich für herunterregulierte Gene eine signifikante Überrepräsentation von Genen, welche eine Rolle in der Sterol-Biosynthese spielen. Die biologische Bedeutung ist in diesem Fall unklar. Zusätzlich fiel auf, dass unter den stark deregulierten Genen mit GPR56, GSTM5 und TEX14 drei Gene auftauchen, für welche ein Bezug zu Testis-Gewebe bekannt ist.

GPR56 ist aus mehreren Gründen ein interessantes Ziel-Gen von CTCFL. Es gehört zur Gruppe der GPCRs (*G-protein coupled receptors*) und innerhalb dieser zur Untergruppe der Adhäsions-GPRs (Yona et al., 2008). Eine mögliche Verbindung von GPCRs und der Tumorentstehung wurde in mehreren Publikationen beschrieben (Dorsam and Gutkind, 2007; Spiegelberg and Hamm, 2007) und im Speziellen konnte auch mehrfach ein Einfluss von Adhäsions-GPCRs auf die Zellmigration, -invasion und Metastasis beobachtet werden (Galle et al., 2006; Nishimori et al., 1997; Wang et al., 2005). In einigen Krebszelllinien und Tumorgeweben konnte eine erhöhte Expression von GPR56 beobachtet werden, und es wird vermutet, dass es an der Entstehung von Krebs beispielsweise über Beeinflussung der

\_\_\_\_114

Zelladhäsion, beteiligt sein könnte (Ke et al., 2007). Wichtig wäre in diesem Zusammenhang, die Spleiß-Variante von GPR56 zu ermitteln, deren Expression durch CTCFL-Überexpression aktiviert wird, da eine Überexpression von GPR56 möglicherweise die Expression von Tumor-assoziierten Genen in einer Spleiß-Varianten-spezifischen Form aktiviert (Kim et al., 2010). Entgegen diesen Befunden wurde jedoch auch festgestellt, dass das Expressionslevel GPR56 korreliert mit dem metastatischen Potential von invers im humanen Melanoma-Zelllinien (Xu et al., 2006; Zendman et al., 1999) und eine Re-Expression führte zu einer Unterdrückung des Melanoma-Wachstums und der Metastasis in einem Xenograft-Model (Xu et al., 2006). GPR56 könnte zumindest in frühen Stadien der Krebsentstehung eine krebsfördernde Wirkung haben. In drei der wichtigsten Krebsformen (Brustkrebs, Prostatakrebs und Melanome) konnte gezeigt werden, dass GPR56 unterschiedliche Effekte auf die Entwicklung von Tumoren ausübt (Xu et al., 2010). Die gesteigerte Expression von GPR56 nach Überexpression von CTCFL ist ein weiteres Indiz dafür, dass CTCFL bei der Entwicklung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen könnte. Da jedoch GPR56 derzeit noch nicht eindeutig eine aktivierende oder reprimierende Funktion in diesem Zusammenhang zugeschrieben werden kann, muss offen bleiben, inwiefern CTCFL über die Beeinflussung der GPR56-Expression wirkt.

Neben der möglichen Rolle bei der Tumorentstehung und/oder -entwicklung stellt sich die Frage, welche biologische Funktion die eventuell spezifische und direkte Aktivierung von GPR56 durch CTCFL im Kontext der Genexpression in nicht-malignen Zellen hat. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Expression von GPR56 in Testis-Gewebe essentiell für die Testis-Entwicklung und die Fertilität in männlichen Mäusen ist. Eine Expression von GPR56 wurde dabei in Sertoli-Zellen nachgewiesen, es wird jedoch vermutet, dass auch in einigen anderen Testis-spezifischen Zelltypen GPR56 exprimiert wird (Chen et al., 2010). Vor diesem Hintergrund könnte CTCFL eine Rolle bei der Testis-Entwicklung spielen, indem es zur Aktivierung der Expression von GPR56 führt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für ein weiteres stark dereguliertes Gen, GSTM5. Eine Expression ist, ähnlich wie für GPR56, bisher nur im Gehirn und in Testis-Gewebe nachgewiesen (Listowsky, 2005; Nakamura et al., 2010). In Testis-Gewebe wurde GSTM5 als unlösliche zellspezifische Komponente der sogenannten *fibrous sheath* (FS, fibröse Hülle, eine Cytoskelett-Struktur im Flagellum des Spermiums) identifiziert (Fulcher et al., 1995), wo das Protein an die PFKM (*muscle-type phosphofructokinase*, Phosphofructokinase Typ Muskel) bindet, welche wiederum zur Rekrutierung von HK1S (*spermatogenic cell-specific variant isozyme hexokinase type 1;* Hexokinase Typ 1-Variante welche spezifisch in an der

115

Spematogenese beteiligten Zellen exprimiert wird) führt (Nakamura et al., 2010). GSTM5 hat somit letztlich eine wichtige Funktion bei der für die Spermien-Motilität notwendigen Spaltung von ATP.

Ein weiteres dereguliertes Gen, für welches ein Zusammenhang zu Testis-Gewebe besteht, ist TEX14 (*testis expressed gene 14*, in Testisgewebe exprimiertes Protein Nr. 14). Dieses gehört wie CTCFL zur Gruppe der *cancer-testis*-Gene (Condomines et al., 2009). Das Protein ist lokalisiert in interzellulären Brücken zwischen Keimzellen und hat eine wichtige Funktion bei der Spermatogenese und der männlichen Fertilität (Greenbaum et al., 2006). Ohne TEX14 kommt es nicht zur Ausbildung dieser interzellulären Brücken, was zu einem Abbruch der Spermatogenese bereits in frühen Stadien und somit zur Unfruchtbarkeit führt.

Die Deregulation von GPR56 und GSTM5 wurde in individuellen Experimenten validiert (z.B. Abb. 26, S. 87), für TEX14 beruhen die Daten zur Deregulation bisher ausschließlich auf den Daten aus der Genexpressionsanalyse. Zwar wurde bei der GO-term-Analyse keine Anhäufung Testis-spezifischer Gene ermittelt, dies könnte jedoch darauf beruhen, dass kein einschlägiger GO-term für diese Gene hinterlegt ist. Für keines der drei angesprochenen deregulierten Gene existiert derzeit ein Testis-spezifischer GO-term-Eintrag in den Datenbanken. Es kann vermutet werden, dass auch eine Reihe weiterer deregulierter Gene funktionell mit Testis-Gewebe in Zusammenhang steht, diese jedoch keinen entsprechenden GO-term-Eintrag aufweisen. Dies kann somit nur durch individuelle Überprüfung weiterer deregulierter Gene erfolgen. Die Aktivierung Testis-spezifischer Gene könnte somit eine wichtige Funktion von CTCFL sein und für einige Gene konnte dies belegt werden. Sollten tatsächlich noch weitere Testis-spezifische Gene beeinflusst werden, würde dies belegen, dass eine Expression von CTCFL zu einer Annäherung des Genexpressionsmusters von NIH3T3-Zellen an das Muster in Testis-spezifischen Zelltypen führt. Es kann jedoch vermutet werden, dass weitere Faktoren dabei eine Rolle spielen, welche eventuell nur in Testis-Gewebe vorhanden sind und in NIH3T3-Zellen somit fehlen. Dies könnte der Grund dafür sein, dass kein phänotypischer Effekt der CTCFL-Expression beobachtet werden konnte. Bei einer den natürlichen Bedingungen entsprechenden Zellumgebung könnten möglicherweise deutlich mehr CTCFL-Effekte beobachtet werden. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass CTCFL auch außerhalb von Testis-Gewebe zu spezifischen Änderungen der Genexpression führen kann. Einige der deregulierten Gene stehen in einem, wenn auch nicht vollständig aufgeklärten, Zusammenhang mit der Entstehung oder Entwicklung von Tumoren. Eine außerhalb von Testis-Gewebe auftretende Expression von CTCFL könnte somit durchaus an der Entstehung und Entwicklung von Tumoren beteiligt sein.

Wie bereits erwähnt, könnte ein großer Teil der Effekte, welche durch eine CTCFL-Expression hervorgerufen werden, auf einer indirekten Wirkung von CTCFL beruhen. So kann vermutet werden, dass CTCFL spezifische Co-Faktoren bindet, welche zwar in Testis-Gewebe vorhanden sind, jedoch in NIH3T3-Zellen fehlen. In diesem Falle dürfte zumindest ein gewisser Teil der Effekte nicht auf eine direkte Wirkung von CTCFL auf die Expression von Genen zurückgehen, sondern mit der Konkurrenz mit CTCF um bestimmte Bindestellen zusammenhängen. Die zunehmende Expression von CTCFL könnte dabei zur Verdrängung von CTCF von seinen Bindestellen und somit zu einem Verlust CTCF-spezifischer Funktionen führen.

Um dies zu untersuchen, mussten zuerst die Bindestellen von CTCF und CTCFL in NIH3T3-Zellen beziehungsweise in Klon 34 identifiziert werden. Der Nachweis der Bindung von CTCFL sollte dabei über ChIP erfolgen, jedoch ergab sich dabei das Problem, dass keine Bindestellen von CTCFL in NIH3T3 bekannt waren, welche als Positivkontrolle für den ChIP verwendet werden konnten. Für den verwendeten Antikörper CTCFL6 war zudem nicht bekannt, ob er für ChIP-Experimente überhaupt geeignet ist. Zwar werden erfolgreiche FLAG-ChIPs in der Literatur beschrieben, jedoch wurde in diesen Fällen immer ein 3-faches FLAG-tag verwendet. Um eine CTCFL-Bindestelle zu finden, wurden bekannte CTCF-Bindestellen untersucht, welche in der Nähe deregulierter Gene, wie beispielsweise GPR56, lagen. Zusätzlich konnten Daten unserer Kooperationspartner in Rotterdam verwendet werden. Diese hatten V5-getagtes CTCFL in embryonalen Stammzellen überexprimiert und über ChIP-Sequenzierung eine Reihe von CTCFL-Bindestellen in diesen Zellen identifiziert. Zusätzlich wurden von dieser Gruppe auch Genexpressionsanalysen in diesen Zellen durchgeführt. Ein Vergleich der deregulierten Gene zeigte wenig Übereinstimmung zwischen Klonen aus embryonalen Stammzellen und NIH3T3-Zellen. Dies zeigt zum Einen, dass die Identität der Zellen (Differenzierungsstatus, Gewebe) einen großen Einfluss auf die durch CTCFL hervorgerufene Veränderung der Genexpression hat, zusätzlich bedeutet dies jedoch auch, dass die Bindestellen von CTCFL in beiden Zelllinien nicht übereinstimmen müssen. Dies kennt man bereits von CTCF, welches je nach Zelllinie auch unterschiedliche Bindestellen besetzt (Lee et al., 2011). Dennoch bot dies die einzige Möglichkeit, die Zahl möglicher Bindestellen zu reduzieren, welche untersucht werden sollten.

Tatsächlich konnte dann in der Nähe des Gens THOC1 an einer starken CTCFL-Bindestelle in embryonalen Stammzellen auch in Klon 34 eine Bindung von CTCFL detektiert werden. Nachdem nun mit THOC1 eine Positivkontrolle zur Verfügung stand, wurden die ChIP-Bedingungen mit den beiden Antikörpern (Anti-FLAG und CTCFL6) optimiert. Es konnten jedoch nur mit CTCFL6 befriedigende Ergebnisse erreicht werden.

Mit dem so gewonnenen Material wurden nun zahlreiche potentielle Bindestellen in der Nähe deregulierter Gene beziehungsweise starke Bindestellen aus embryonalen Stammzellen in individuellen Experimenten untersucht. Dabei konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, welche eine deutliche CTCFL-Bindung in der Nähe der Gene (z.B. im Promotorbereich) nach Induktion von Klon 34 zeigen, darunter beispielsweise GPR56. Da GPR56 eines der am stärksten deregulierten Gene darstellt, könnte die Bindung von CTCFL funktionell mit der Deregulation korreliert sein. Für GPR56 sind zwei lange, eine mittlere und eine kurze Version auf mRNA-Ebene bekannt, die identifizierte CTCFL-Bindestelle liegt genau im vermeintlichen Promotorbereich der kurzen Variante. Über RT-PCR konnte zwar ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem in den Zellen exprimierten GPR56 um die beiden langen Versionen handelt, jedoch ist eine Unterscheidung zwischen der kurzen und der mittleren Version auf diesem Wege nicht möglich (Abb. 32, S. 95). Somit bleibt die Frage zu klären, ob es tatsächlich zur Expression der kurzen Version kommt.

#### 6.4.6 Genomweite Identifikation von CTCFL-Bindestellen

Um genomweit alle Bindestellen für CTCFL in NIH3T3-Klonen zu bestimmen, wurde mit ChIP-Material von Klon 34 sowie untransfizierten NIH3T3-Zellen eine Sequenzierung (ChIP-Seq) durchgeführt. Zusätzlich wurden auch für CTCF auf diese Weise alle Bindestellen im Genom bestimmt. Die für CTCF ermittelten Bindestellen in Klon 34 und untransfizierten NIH3T3-Zellen lagen rein zahlenmäßig betrachtet nah beieinander und ein großer Teil der Bindestellen ist identisch, die Anzahl an CTCF-Bindestellen ist bezüglich der Größenordnung mit der Zahl der CTCF-Bindestellen in anderen Zellen vergleichbar (Lee et al., 2011). Dennoch wurden auch Bindestellen detektiert, welche nur in einer der beiden Zelllinien vorliegen. Allerdings beruht ein großer Teil davon auf Fehlinterpretationen der Bindedaten aufgrund der verwendeten Schwellenwerte. Diese Fehlerquelle bei der Definition von peaks (sogenanntes *peak-calling*) ist somit methodenbasiert. Eine letztendliche Klärung, ob es sich um eine gemeinsame Bindestelle handelt, ist somit nur durch individuellen Abgleich der jeweiligen Bindedaten möglich. Stichprobenvergleiche zeigten dabei, dass in den meisten Fällen tatsächlich eine Bindestelle in beiden Zelllinien vorliegt, jedoch in einem der beiden Fälle der peak knapp unterhalb des angesetzten Schwellenwertes liegt oder durch benachbarte *peaks* in Vergleichsregionen nicht als *peak* detektiert wird.

Das aufgrund der ChIP-Sequenzierungen für beide Proteine ermittelte Bindemotiv (Abb. 35, S. 98) zeigte nur kleinere Abweichungen. Auch im Vergleich mit bereits veröffentlichten Bindemotiven (Jothi et al., 2008; Kim et al., 2007; Lee et al., 2011) sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Zusammen mit dem Vergleich mit randomisierten Verteilungen der Binderegionen (Abb. 36, S. 99) zeigt dies die Verwendbarkeit beider Antikörper für ChIP-Seq-Experimente und validiert die Qualität der ermittelten Daten. CTCFL bindet somit in NIH3T3-Zellen und daraus hervorgehenden Zellklonen wie erwartet an dieselben Sequenzen wie auch CTCF. Die Bindung von CTCF durch den CTCFL-Antikörper kann trotz der Ähnlichkeit der Sequenzen ausgeschlossen werden, da dies auch in den untransfizierten Zellen zu einem *peak* hätte führen müssen.

Ein gemeinsames Bindemotiv bedeutete dennoch nicht zwangsläufig, dass CTCF und CTCFL auch an identischen Stellen im Genom gemeinsam binden. So ist für CTCF bekannt, dass es an unmethylierte Sequenzen bindet, CTCFL hingegen auch an methylierten Sequenzen binden kann (Nguyen et al., 2008b). Somit konnte vermutet werden, dass eine Reihe von potentiellen CTCF-Bindestellen im Genom in methylierter Form vorliegen und somit keine CTCF-Bindung an diesen Stellen detektiert werden kann. CTCFL hingegen könnte somit an diesen Stellen ohne direkte Konkurrenz zu CTCF binden. Anhand dieser Annahmen wurde vermutet, dass nach der ChIP-Sequenzierung eine Reihe von Bindestellen detektiert werden, welche ausschließlich eine CTCFL-Bindung aufweisen. Tatsächlich wurden solche Bindestellen nur in sehr geringem Ausmaß gefunden, wobei die CTCFL-Bindung in diesen Fällen meist zusätzlich sehr schwach war. Der größte Teil aller CTCFL-Bindestellen (und vor allem die starken Bindestellen) wurde gleichzeitig von CTCF gebunden (Abb. 37B, S. 100). In diesen Fällen sollten CTCF und CTCFL um die Bindestellen konkurrieren. Dies ist jedoch nur möglich, sofern die Bindestellen vollständig unmethyliert vorliegen, nur in diesem Fall können beide Proteine tatsächlich um die gleiche Bindestelle auf einem Chromosom konkurrieren, da sowohl CTCF als auch CTCFL an unmethylierte DNA binden können. Mit steigender CTCFL-Konzentration sollte in diesem Falle eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zur Bindung von CTCFL zu beobachten sein und somit eine Abnahme der CTCF-Bindung. Zwar konnten eine Reihe von Bindestellen identifiziert werden, an denen eine Bindung von CTCFL zur Verringerung der CTCF-Bindung (Vergleich untransfizierter NIH3T3-Zellen mit Zellen von Klon 34) führte, jedoch wurden in der gleichen Größenordnung auch Bindestellen beobachtet, an welchen die Bindung von CTCFL zu einer stärkeren Bindung von CTCF führte. Letzteres wäre, sofern es sich um einen tatsächlichen Effekt handelt, nicht mit dem derzeitigen Konkurrenzmodell zu erklären. Handelt es sich hingegen um Fehler bei der Sequenzierung, so muss zumindest davon ausgegangen werden, dass auch an den Stellen mit einer Abnahme der CTCF-Bindung in gleicher Anzahl fehlerhafte Bindestellen detektiert wurden. Selbst wenn es sich bei der Abnahme der CTCF-Bindung um einen durch Konkurrenz mit CTCFL ausgelösten Effekt handelt, so ist dieser nur in einer geringen Zahl der beobachteten Bindestellen zu sehen. In den meisten Fällen kann zwar eine gemeinsame Bindung von CTCF und CTCFL nachgewiesen werden, jedoch gibt es keine Hinweise auf eine Konkurrenz um die Bindestelle. Ein Beispiel für eine verringerte Bindung von CTCF nach Bindung von CTCFL ist in der Region des Gens DIEXF zu sehen (Abb. 38, S. 101).

Die fehlende Konkurrenz könnte hingegen auch darauf beruhen, dass die jeweiligen Bindestellen nie in allen Zellen gleichzeitig völlig unmethyliert vorliegen, sondern dass immer ein gewisser Teil dieser Bindestellen auch methyliert vorliegt, beispielsweise aufgrund von Varianz innerhalb des Klons oder der jeweiligen Phase im Zellzyklus. Da keine synchronisierten Zellen verwendet wurden, dürfte vor allen Dingen die unterschiedliche Zellphase eine große Rolle spielen. Sofern ein gewisser Anteil der Bindestellen methyliert vorliegt, könnten diese methylierten Sequenzen von CTCFL gebunden werden, wohingegen die unmethylierten auch weiterhin vorwiegend durch CTCF besetzt werden würden. Unter Annahme einer stärkeren Affinität von CTCF zu unmethylierten Bindestellen verglichen mit al., 2008b), würde selbst eine größere CTCFL (Nguyen et Steigerung der CTCFL-Konzentration aufgrund der Verringerung des freien CTCFL durch Bindung an methylierte Bindestellen und der geringeren Affinität nur zu einer geringfügigen Abnahme der CTCF-Bindung führen, welche mit den durchgeführten Analysemethoden als nicht signifikant erkannt werden könnte. Dieses Problem ließe sich durch eine höhere Anzahl an Replikaten zumindest teilweise lösen.

Aufgrund der Daten der ChIP-Sequenzierung stellt sich somit die Frage, ob bei den gemeinsamen Bindestellen tatsächlich das gleiche DNA-Molekül von beiden Proteinen gleichzeitig gebunden wird, oder ob es sich um unterschiedliche Moleküle handelt, welche sich eventuell durch den Methylierungsstatus unterscheiden. Ersteres kann mit einem Re-ChIP-Experiment untersucht werden, jedoch scheitert dieser Nachweis aktuell an der geringen Präzipitation, welche mit dem Antikörper CTCFL6 erreicht wurde. Entsprechende Versuche führten nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Für zukünftige Re-ChIP-Experimente wurden daher CTCFL-Vektoren kloniert, welche einen V5-tag aufweisen. Mit diesem tag konnten in unserer Arbeitsgruppe und auch von anderen Arbeitsgruppen bereits erfolgreich ChIPs mit einer hohen Präzipitation des jeweiligen Zielproteins durchgeführt werden.

Weiterhin erleichtert das V5-tag auch die Durchführung von Re-ChIP-Experimenten (*residual antibody problem*, die Verwendung von an den Antikörper gekoppelten *beads* führt zu einer deutlichen Verringerung von zurückbleibendem Antikörper nach der ersten Immunopräzipitation verglichen mit der für CTCFL6 verwendeten Methode), mit welchen untersucht werden kann, ob CTCF und CTCFL tatsächlich an demselben Molekül binden. Derzeit liegen jedoch noch keine stabilen Zellklone mit V5-getagtem CTCFL vor.

Der Methylierungsstatus der Bindestellen könnte durch entsprechende Experimente entweder individuell oder genomweit ermittelt werden, beispielsweise durch Bisulfit-Sequenzierung. Liegt in diesen Fällen eine Bindestelle teilweise methyliert, teilweise unmethyliert vor, so könnten beide Proteine ohne gegenseitige Beeinflussung an diesen Stellen binden, da es sich um voneinander unabhängige DNA-Moleküle handelt. Leider liegen für NIH3T3-Zellen noch keine genomweiten Daten zur Methylierung vor, welche eine schnelle Klärung dieser Frage ermöglichen würden. Möglich wäre es aber, dies in einer humanen Zelllinie zu untersuchen. Im Falle der Zelllinie K562 ist bekannt, dass CTCFL in hohen Konzentrationen exprimiert wird, sie gilt als Zelllinie mit der höchsten CTCFL-Konzentration (Pugacheva et al., 2010), und auch genomweite Bindedaten sind vorhanden (gene expression omnibus, accession number: GSM803401). Zusätzlich existieren für diese Zelllinie seit kurzem auch Daten zur globalen Methylierung des Genoms (UCSC accession number: wgEncodeEH002195). Zwar unterscheiden sich humanes und murines CTCFL in den N- und C-Termini deutlich (Hore et al., 2008), dennoch konnte beispielsweise für das Gen GPR56 gezeigt werden, dass dessen Expression nicht nur nach Überexpression von CTCFL in NIH3T3-Zellen aktiviert wird. Bei einer Verringerung der CTCFL-Expression in K562-Zellen durch siRNA-Experimente konnte in diesen Zellen eine gleichzeitige Verringerung der Expression von GPR56 beobachtet werden (P. Bergmaier, JLU Gießen, persönliche Mitteilung). Somit scheinen in humanen und murinen Zellen gemeinsame CTCFL-Zielgene vorzuliegen, welche auf gleiche Weise durch CTCFL-Expression beeinflusst werden. Ein Vergleich der Methylierungsdaten mit der CTCFL-Bindung in humanen Zellen könnte somit durchaus Erkenntnisse liefern, welche auch zur Bewertung der Situation in murinen Zellen herangezogen werden könnten. Wie Abb. 37B (S. 100) zeigt findet eine starke CTCFL-Bindung sehr häufig an Bindestellen statt, welche gleichzeitg auch starke Signale für H3K4me3 zeigen. Letztere sind mit Promotorbereichen assoziiert. Gerade diese Promotorbereiche sind nicht nur von entscheidender Bedeutung für die Genexpression, auch einer der bisher bekannten Regulationsmechanismen basiert auf der Methylierung des Promotors und somit der Inaktivierung der Genexpression. Somit ist es durchaus möglich, dass diese Bereiche beispielsweise aufgrund von Unterschieden in der Zellphase zumindest in einem Teil der Zellen methyliert vorliegen und diese Bindestellen dann von CTCFL besetzt werden können.

Dennoch weist die geringe Zahl rein CTCFL-spezifischer Bindestellen darauf hin, dass CTCFL nicht prinzipiell an alle methylierten CTCF-Bindestellen binden kann. Die geringe Zahl dieser Bindestellen widerspricht somit der Vermutung, CTCF und CTCFL könnten durch andere Co-Faktoren (aufgrund der unterschiedlichen N- und C-Termini) oder durch Schlüsselunterschiede in der Zinkfinger-Sequenz unterschiedliche Bindestellen erkennen (Nguyen et al., 2008b). Sollte dies der Fall sein, so dürfte dies nur für eine geringe Zahl von Bindestellen zutreffen und stellt somit keinen generellen Mechanismus dar. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die für CTCFL nötigen Co-Faktoren eventuell nur in einem passenden zellulären Hintergrund exprimiert werden und möglicherweise nur in Testis-Gewebe vorhanden sind. Eine durch solche Co-Faktoren ausgelöste Bindung wäre in NIH3T3-Abkömmlingen somit kaum zu detektieren. Tatsächlich könnte aufgrund der Daten für NIH3T3 auch vermutet werden, dass die Bindung von CTCF nicht nur auf der richtigen Sequenz der Bindestelle beruht, sondern zusätzliche Faktoren benötigt, weshalb nicht alle potentiellen Bindestellen tatsächlich besetzt sind. Sofern CTCFL den gleichen Faktor erkennen kann, würde dies erklären, warum beide Proteine an denselben Bindestellen zu detektieren sind. Ähnlich könnte auch die allgemeine Zugänglichkeit der Bindestelle wirken. Sofern CTCF bindet, könnte es sich um zugängliche Sequenzen handeln, an denen dann CTCFL auch binden kann. Potentielle CTCF-Bindestellen, an denen keine CTCF-Bindung detektiert werden kann, könnten in einer sehr unzugänglichen Form vorliegen, so dass auch CTCFL dort nicht binden kann. Auch dadurch könnte die niedrige Zahl CTCFL-spezifischer Bindestellen teilweise erklärt werden.

#### 6.4.7 CTCFL-Bindestellen in der Nähe deregulierter Gene

Nachdem sowohl die Effekte einer CTCFL-Überexpression auf die Expression anderer Gene als auch die Bindestellen von CTCFL identifiziert wurden, stellte sich die Frage nach einem funktionellen Zusammenhang. Es zeigte sich, dass fast die Hälfte der deregulierten Gene eine CTCFL-Bindestelle in der Nähe aufweisen. Bei dieser Analyse wurde jedoch nicht der direkte Abstand zur Bindestelle berücksichtigt, sondern es wurde für jede Bindestelle nach dem nächsten Gen bzw. dessen TSS gesucht und dieses dann der Bindestelle zugeordnet. Es ist somit durchaus möglich, dass noch weitere Gene eine Bindestelle nahe dem TSS aufweisen, jedoch ein anderes Gen in geringerem Abstand *up- oder downstream* vorliegt. Der Abstand bedeutet somit jedoch nicht zwangsläufig, dass nur das nächstgelegene Gen durch die Bindestelle reguliert werden könnte. In einigen wenigen Genen konnte die CTCFL-Bindestelle auch direkt an der TSS oder wenige Basenpaare *upstream* detektiert werden. Zu diesen Genen gehört beispielsweise RAB7L1, für welches die Deregulierung auch in individuellen Experimenten belegt wurde. Speziell bei diesen Genen könnte die CTCFL-Bindung einen direkten Einfluss auf die Regulation der Gene haben. Diese Gene bieten sich außerdem für zukünftige Experimente an, um den möglichen Mechanismus der Aktivierung aufzuklären. Über ChIP-Experimente könnte speziell an diesen Bindestellen untersucht werden, welche Histonmodifikationen in NIH3T3-Zellen vorliegen, und ob diese sich nach Überexpression von CTCFL verändern. Auch der Methylierungsstatus dieser Bindestellen könnte in Einzelexperimenten analysiert werden.

Generell zeigen die Ergebnisse aber auch, dass knapp die Hälfte der deregulierten Gene keine CTCFL-Bindestelle aufweisen (Abb. 39, S. 102). Wie bereits erwähnt, muss dabei die Zuweisung der Bindestellen zu den Genen berücksichtigt werden, dennoch dürfte eine größere Anzahl an deregulierten Genen nicht durch CTCFL-Bindung im Promotorbereich gekennzeichnet sein. Selbst bei einigen Genen, welche als nächstes Gen zu einer Bindestelle identifiziert wurden, kann dieser Abstand so groß sein, dass nicht mehr von einer Bindung im unmittelbaren Promotorbereich gesprochen werden kann. In diesen Fällen ist es möglich, dass es sich bei der Deregulation um sekundäre Effekte handelt, welche durch Gene hervorgerufen werden, die selbst primär oder sekundär durch CTCFL aktiviert wurden. Es besteht, jedoch auch die Möglichkeit, dass die Bindung von CTCFL strukturelle Auswirkungen auf die Chromatinstruktur hat, welche auch über weite Distanzen wirksam werden. Für CTCF wurde beispielsweise die enhancer-Blockade beschrieben, bei welcher durch Bindung von CTCF der Einfluss eines enhancers auf ein Gen blockiert werden kann. Ähnliches wäre auch für CTCFL denkbar. Speziell wenn es sich um eine Bindestelle handelt, an welcher CTCF und CTCFL gemeinsam binden können, würde eine Verdrängung von CTCF durch CTCFL an diesen Stellen zu einem Verlust der enhancer-Blockade führen. In diesem Zusammenhang bleibt auch zu klären, ob neben CTCF auch für CTCFL eine Verbindung mit Cohesin nachgewiesen werden kann. CTCF und Cohesin sind nach dem derzeitigen Model an der Ausbildung von Chromatin-Schleifen beteiligt (Wendt and Peters, 2009), welche die Chromatin-Struktur organisieren. Diese Schleifen spielen eine Rolle bei der enhancer-Blockade. Dass CTCFL ebenfalls mit Cohesin zur Ausbildung von Chromatin-Schleifen führt, wurde noch nicht beobachtet. Sollte CTCFL aber ebenfalls zur Bildung von Chromatin-Schleifen in der Lage sein, könnte dies direkte Effekte auf die Genexpression erklären. Es ist jedoch erneut vorstellbar, dass die Effekte auf die Expression bestimmter Gene keine direkten Folgen der CTCFL-Expression darstellen, sondern auf eine indirekte Wirkung durch Konkurrenz zu CTCF zurückzuführen sind. In diesen Fällen könnte eine Verdrängung von CTCF durch CTCFL eine Beeinflussung der Schleifenstruktur zur Folge haben. Durch einen Verlust der Chromatin-Schleifen könnte CTCFL indirekt eine Auswirkung auf die Genexpression bestimmter Gene haben, indem es den Einfluss von CTCF unterbindet. Ob CTCFL tatsächlich auf diese Weise die Genexpression beeinflusst, müssen weitere Forschungen und Untersuchungen aufklären.

### 6.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Genen nach einer induzierten Überexpression von CTCFL eine Veränderung der Genexpression zeigen. Gleichzeitig wurden in derselben Zelllinie auch die Bindestellen von CTCFL und CTCF identifiziert. Ein großer Teil der BTS befindet sich in Bereichen deregulierter Gene, jedoch überlappt die Bindung von CTCFL fast in allen Fällen mit einer Bindung von CTCF. Daher ist nicht klar, ob es sich bei den beobachteten Effekten der CTCFL-Induktion um direkte Effekte von CTCFL handelt, oder ob die Deregulierung durch eine Verdrängung von CTCF an diesen Bindestellen, und somit indirekt, erfolgt. Dazu muss zukünftig geklärt werden, ob CTCF und CTCFL tatsächlich an ein und demselben Molekül gleichzeitig binden können, oder ob nur jeweils eines der Proteine gebunden ist. Zur Klärung dieser Frage bieten sich Re-ChIP-Experimente an, jedoch ist dies bisher aufgrund der geringen Präzipitation des Chromatins nach Verwendung des CTCFL-Antikörpers nicht möglich. CTCFL-Vektoren in welchen zusätzlich ein V5-tag mit dem Protein fusioniert ist, könnten dies jedoch in naher Zukunft ermöglichen. Eine zusätzliche Analyse des Methylierungsstatus würde außerdem zeigen, ob CTCFL nur die methylierten Bindestellen bindet. Sofern beide Proteine an getrennte Moleküle binden und diese beispielsweise einen Unterschied bezüglich der Methylierung zeigen, würde dies gegen eine direkte Konkurrenz von CTCF und CTCFL sprechen. In diesem Zusammenhang müsste auch untersucht werden, ob der Zellzyklus eine Rolle bei der Bindung der beiden Proteine spielen könnte.

Durch die Identifizierung eindeutiger CTCFL-Bindestellen wird es zukünftig möglich sein, den Einfluss einer CTCFL-Bindung auf den Zustand des Chromatins an dieser Stelle näher zu untersuchen und damit die Wirkungsweise von CTCFL zu identifizieren. Beispielsweise könnte nach spezifischen Chromatin-Modifikationen gesucht werden, welche mit einer Bindung von CTCFL einhergehen. Sofern eine Konkurrenz mit CTCF vorliegt, könnten in Anbetracht der Wechselwirkungen von CTCF mit Cohesin auch Analysen der dreidimensionalen Chromatin-Struktur durchgeführt werden. Letztendlich müssten alle bekannten Funktionen von CTCF dahingehend untersucht werden, ob sie durch gleichzeitiges Vorhandensein von CTCFL beeinflusst werden, beispielsweise die *enhancer*-Blockade. Zusätzlich müsste aber auch geklärt werden, ob CTCFL nicht einen Teil der Funktionen mit CTCF teilt und dieses ersetzen könnte. Dies könnte erklären, warum CTCFL in Testis-Gewebe exprimiert wird, während CTCF fehlt. Da Zellen ohne CTCF sterben, könnte möglicherweise in diesem speziellen Umfeld CTCFL einen Teil der Funktionen von CTCF aufrechterhalten (Loukinov et al., 2002). Letztlich würden alle diese Experimente nicht nur zur Aufklärung der Wirkung von CTCFL beitragen, sondern könnten zusätzlich auch neue Ergebnisse zur Wirkungsweise von CTCF liefern und zu einem besseren Verständnis der Chromatin-Struktur führen.

Speziell im Hinblick auf die fast ausschließlich auf Testis-Gewebe beschränkte Expression von CTCFL und der gehäuft auftretenden Expression in Tumorgewebe und Krebszelllinien könnte CTCFL ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Therapie von Krebserkrankungen sein. Sofern CTCFL tatsächlich direkt oder indirekt (durch Konkurrenz mit CTCF) an der Entstehung von Krebs beteiligt ist, könnten spezifisch gegen die CTCFL-Expression oder -Bindung gerichtete Medikamente eingesetzt werden, ohne dass in somatischem Gewebe Nebenwirkungen durch einen Verlust von CTCFL zu erwarten wären. Erste Studien belegen, dass eine Behandlung zumindest einiger Krebsformen durch gegen CTCFL gerichtete Therapieformen erfolgreich sein könnte (Ghochikyan et al., 2007; Loukinov et al., 2006; Mkrtichyan et al., 2011; Mkrtichyan et al., 2008). Aber auch wenn CTCFL nicht an der Entstehung von Krebs beteiligt ist, ist noch immer zu klären, welche Rolle CTCFL in Testis-Gewebe einnimmt und welche Unterschiede im Chromatin nach der Bindung im Vergleich zu einer Bindung von CTCF bestehen.

# 7 Literaturverzeichnis

Affymetrix. 2007. GeneChip Gene 1.0 ST Array Design. Santa Clara, USA: Affymetrix Inc.

- Ahmad K, Henikoff S. 2002. Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 99 Suppl 4:16477-16484.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2007. Molecular Biology of the cell. 5 ed. New York: Garland Science.
- Amaxa. 2005. Optimization Protocol for Cell Line Optimization Nucleofector Kit. Amaxa GmbH.
- Amaxa. 2007. Cell Line Nucleofector Kit V for THP-1 Cells [ATCC]. Amaxa AG.
- Amaxa. 2008. General protocol for nucleofection of Suspension cell lines. Amaxa GmbH.
- Amaxa. 2009. Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V for THP-1 [ATCC TIB-202, cryopreserved]. Lonza Cologne AG.
- analytikjena. 2009. innuScript Reverse Transcriptase. Analytik Jena AG, Jena.
- AppliedBiosystems. 2000. GeneAmp RNA PCR Kit. Applied Biosystems, Foster City.
- Ausubel F. 1989. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman I, Smith J, Struhl K. 1989. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing associates and Wiley Interscience.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Res 37(Web Server issue):W202-208.
- Baniahmad A, Steiner C, Kohne AC, Renkawitz R. 1990. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. Cell 61(3):505-514.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature 410(6824):120-124.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell 129(4):823-837.
- Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW. 2009. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. BIOspektrum 5(15):512-515.
- Becker PB, Horz W. 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. Annu Rev Biochem 71:247-273.
- Bell AC, Felsenfeld G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature 405(6785):482-485.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. Cell 98(3):387-396.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7(6):1513-1523.
- Bolivar F, Backman K. 1979. Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. Methods Enzymol 68:245-267.
- 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 72:248-254.
- Burke LJ, Hollemann T, Pieler T, Renkawitz R. 2002. Molecular cloning and expression of the chromatin insulator protein CTCF in Xenopus laevis. Mech Dev 113(1):95-98.

- Canto-Soler MV, Huang H, Romero MS, Adler R. 2008. Transcription factors CTCF and Pax6 are segregated to different cell types during retinal cell differentiation. Dev Dyn 237(3):758-767.
- Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT. 2002. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. Science 295(5553):345-347.
- Chen G, Yang L, Begum S, Xu L. 2010. GPR56 is essential for testis development and male fertility in mice. Dev Dyn 239(12):3358-3367.
- Chen K, Rajewsky N. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. Nat Rev Genet 8(2):93-103.
- Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH. 2008. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. Cell 133(6):1106-1117.
- Chen YT, Gure AO, Tsang S, Stockert E, Jager E, Knuth A, Old LJ. 1998. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. Proc Natl Acad Sci U S A 95(12):6919-6923.
- Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. 2007. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. Proc Natl Acad Sci U S A 104(49):19428-19433.
- Clontech. 2003. BD Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual. BD Biosciences Clontech, Heidelberg.
- Condomines M, Hose D, Reme T, Requirand G, Hundemer M, Schoenhals M, Goldschmidt H, Klein B. 2009. Gene expression profiling and real-time PCR analyses identify novel potential cancer-testis antigens in multiple myeloma. J Immunol 183(2):832-840.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. Genome Res 14(6):1188-1190.
- D'Arcy V, Pore N, Docquier F, Abdullaev ZK, Chernukhin I, Kita GX, Rai S, Smart M, Farrar D, Pack S, Lobanenkov V, Klenova E. 2008. BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. Br J Cancer 98(3):571-579.
- de Both NJ, Hagemeijer A, Rhijnsburger EH, Vermey M, van't Hull E, Smit EM. 1981. DMSO-induced terminal differentiation and trisomy 15 in myeloid cell line transformed by the Rauscher murine leukemia virus. Cell Differ 10(1):13-21.
- Dorsam RT, Gutkind JS. 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer 7(2):79-94.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE. 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res 30(1):207-210.
- Eklund AC, Turner LR, Chen P, Jensen RV, deFeo G, Kopf-Sill AR, Szallasi Z. 2006. Replacing cRNA targets with cDNA reduces microarray cross-hybridization. Nat Biotechnol 24(9):1071-1073.
- Emig D, Salomonis N, Baumbach J, Lengauer T, Conklin BR, Albrecht M. 2010. AltAnalyze and DomainGraph: analyzing and visualizing exon expression data. Nucleic Acids Res 38(Web Server issue):W755-762.
- Eppendorf. 2006. Multiporator Basis-Applikations-Anleitung Elektroporation. Eppendorf AG, Hamburg.
- Felsenfeld G, Groudine M. 2003. Controlling the double helix. Nature 421(6921):448-453.
- Fermentas. 2010. Molecular Cloning. Molecular Biology Catalog & Product Application Guide
- Fermentas GmbH, St. Leon-Rot.

- Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenkov VV. 1996. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. Mol Cell Biol 16(6):2802-2813.
- Filippova GN, Lindblom A, Meincke LJ, Klenova EM, Neiman PE, Collins SJ, Doggett NA, Lobanenkov VV. 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(1):26-36.
- Filippova GN, Qi CF, Ulmer JE, Moore JM, Ward MD, Hu YJ, Loukinov DI, Pugacheva EM, Klenova EM, Grundy PE, Feinberg AP, Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Cornelisse CJ, Suzuki H, Komiya A, Lindblom A, Dorion-Bonnet F, Neiman PE, Morse HC, 3rd, Collins SJ, Lobanenkov VV. 2002. Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter tts DNA-binding specificity. Cancer Res 62(1):48-52.
- Fulcher KD, Welch JE, Klapper DG, O'Brien DA, Eddy EM. 1995. Identification of a unique mu-class glutathione S-transferase in mouse spermatogenic cells. Mol Reprod Dev 42(4):415-424.
- Galle J, Sittig D, Hanisch I, Wobus M, Wandel E, Loeffler M, Aust G. 2006. Individual cellbased models of tumor-environment interactions: Multiple effects of CD97 on tumor invasion. Am J Pathol 169(5):1802-1811.
- Gaszner M, Felsenfeld G. 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. Nat Rev Genet 7(9):703-713.
- Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Loukinov D, Mamikonyan G, Pack SD, Movsesyan N, Ichim TE, Cribbs DH, Lobanenkov VV, Agadjanyan MG. 2007. Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancertestis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. J Immunol 178(1):566-573.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 89(12):5547-5551.
- Graham F, Smiley J, Russell W, Nairn R. 1977. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. Journal of General Virology 36:59-72.
- Greenbaum MP, Yan W, Wu MH, Lin YN, Agno JE, Sharma M, Braun RE, Rajkovic A, Matzuk MM. 2006. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. Proc Natl Acad Sci U S A 103(13):4982-4987.
- Hadjur S, Williams LM, Ryan NK, Cobb BS, Sexton T, Fraser P, Fisher AG, Merkenschlager M. 2009. Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. Nature 460(7253):410-413.
- Heger P, Marin B, Schierenberg E. 2009. Loss of the insulator protein CTCF during nematode evolution. BMC Mol Biol 10:84.
- Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenkov VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B. 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. Nature 459(7243):108-112.
- Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G, Galas DJ. 1989. A simple method for sitedirected mutagenesis using the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res 17(16):6545-6551.
- Henikoff S. 1992. Position effect and related phenomena. Curr Opin Genet Dev 2(6):907-912.

- Hertz GZ, Stormo GD. 1999. Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. Bioinformatics 15(7-8):563-577.
- Hines WC, Bazarov AV, Mukhopadhyay R, Yaswen P. 2010. BORIS (CTCFL) is not expressed in most human breast cell lines and high grade breast carcinomas. PLoS One 5(3):e9738.
- Hoffmann MJ, Muller M, Engers R, Schulz WA. 2006. Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. Biochem Pharmacol 72(11):1577-1588.
- Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR, Adnani MT, Loukinov DI, Vatolin S, Risinger JI, Custer M, Chen GA, Zhao M, Nguyen DM, Barrett JC, Lobanenkov VV, Schrump DS. 2005. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. Cancer Res 65(17):7763-7774.
- Hore TA, Deakin JE, Marshall Graves JA. 2008. The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCFL in amniotes. PLoS Genet 4(8):e1000169.
- Hu G. 1993. DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. DNA Cell Biol 12(8):763-770.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. Nature Protocols 4(1):44-57.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409(6822):860-921.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 431(7011):931-945.
- Invitrogen. 2008. Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits. Invitrogen.
- Jelinic P, Stehle JC, Shaw P. 2006. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. PLoS Biol 4(11):e355.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. Science 293(5532):1074-1080.
- Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. 2007. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. Science 316(5830):1497-1502.
- Jones PA, Baylin SB. 2007. The epigenomics of cancer. Cell 128(4):683-692.
- Jones TA, Ogunkolade BW, Szary J, Aarum J, Mumin MA, Patel S, Pieri CA, Sheer D. 2011. Widespread expression of BORIS/CTCFL in normal and cancer cells. PLoS One 6(7):e22399.
- Jothi R, Cuddapah S, Barski A, Cui K, Zhao K. 2008. Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. Nucleic Acids Res 36(16):5221-5231.
- Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, Ohlsson R, Lobanenkov VV. 2000. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. Curr Biol 10(14):853-856.
- Kang Y, Hong JA, Chen GA, Nguyen DM, Schrump DS. 2007. Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. Oncogene 26(30):4394-4403.
- Karpf AR, Jones DA. 2002. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. Oncogene 21(35):5496-5503.
- Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA. 2001. Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. Mol Pharmacol 59(4):751-757.
- Ke N, Sundaram R, Liu G, Chionis J, Fan W, Rogers C, Awad T, Grifman M, Yu D, Wong-Staal F, Li QX. 2007. Orphan G protein-coupled receptor GPR56 plays a role in cell transformation and tumorigenesis involving the cell adhesion pathway. Mol Cancer Ther 6(6):1840-1850.

- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. 2002. The human genome browser at UCSC. Genome Res 12(6):996-1006.
- Kessler C, Manta V. 1990. Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases a review (Edition 3). Gene 92(1-2):1-248.
- Kholmanskikh O, Loriot A, Brasseur F, De Plaen E, De Smet C. 2008. Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. Int J Cancer 122(4):777-784.
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Scholer HR. 2009. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. Cell 136(3):411-419.
- Kim JE, Han JM, Park CR, Shin KJ, Ahn C, Seong JY, Hwang JI. 2010. Splicing variants of the orphan G-protein-coupled receptor GPR56 regulate the activity of transcription factors associated with tumorigenesis. J Cancer Res Clin Oncol 136(1):47-53.
- Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, Zhang MQ, Lobanenkov VV, Ren B. 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCFbinding sites in the human genome. Cell 128(6):1231-1245.
- Klenova EM, Fagerlie S, Filippova GN, Kretzner L, Goodwin GH, Loring G, Neiman PE, Lobanenkov VV. 1998. Characterization of the chicken CTCF genomic locus, and initial study of the cell cycle-regulated promoter of the gene. J Biol Chem 273(41):26571-26579.
- Klenova EM, Morse HC, 3rd, Ohlsson R, Lobanenkov VV. 2002. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. Semin Cancer Biol 12(5):399-414.
- Klenova EM, Nicolas RH, Paterson HF, Carne AF, Heath CM, Goodwin GH, Neiman PE, Lobanenkov VV. 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(12):7612-7624.
- Kornberg R. 1975. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Science 184:868-871.
- Kosaka-Suzuki N, Suzuki T, Pugacheva EM, Vostrov AA, Morse HC, 3rd, Loukinov D, Lobanenkov V. 2011. Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. J Biol Chem 286(31):27378-27388.
- Kriaucionis S, Heintz N. 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science 324(5929):929-930.
- Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenkov V, Reik W, Ohlsson R. 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. Proc Natl Acad Sci U S A 103(28):10684-10689.
- Lander ES. 2011. Initial impact of the sequencing of the human genome. Nature 470(7333):187-197.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10(3):R25.
- Lee BK, Bhinge AA, Battenhouse A, McDaniell RM, Liu Z, Song L, Ni Y, Birney E, Lieb JD, Furey TS, Crawford GE, Iyer VR. 2011. Cell-type specific and combinatorial usage of diverse transcription factors revealed by genome-wide binding studies in multiple human cells. Genome Res.
- Leers J, Treuter E, Gustafsson JA. 1998. Mechanistic principles in NR box-dependent interaction between nuclear hormone receptors and the coactivator TIF2. Mol Cell Biol 18(10):6001-6013.

- Levine M, Tjian R. 2003. Transcription regulation and animal diversity. Nature 424(6945):147-151.
- Li T, Lu Z, Lu L. 2004. Regulation of eye development by transcription control of CCCTC binding factor (CTCF). J Biol Chem 279(26):27575-27583.
- Listowsky I. 2005. A subclass of mu glutathione S-transferases selectively expressed in testis and brain. Methods Enzymol 401:278-287.
- Lobanenkov VV, 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(12):1743-1753.
- Lonza Cologne AG. 2009. Amaxa Cell Line Optimization Nucleofector Kit. Köln: Lonza Cologne AG.
- Loukinov D, Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Ichim TE, Lobanenkov VV, Cribbs DH, Agadjanyan MG. 2006. Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. J Cell Biochem 98(5):1037-1043.
- Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC, 3rd, Lobanenkov VV. 2002. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. Proc Natl Acad Sci U S A 99(10):6806-6811.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature 389(6648):251-260.
- Lutz M, Burke LJ, Barreto G, Goeman F, Greb H, Arnold R, Schultheiss H, Brehm A, Kouzarides T, Lobanenkov V, Renkawitz R. 2000. Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. Nucleic Acids Res 28(8):1707-1713.
- Machanick P, Bailey TL. 2011. MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. Bioinformatics 27(12):1696-1697.
- Marligen. 2005. High Purity Plasmid Purification System. Marligen Biosciences, Inc., Ijamsville MD.
- Martin-Kleiner I. 2011. BORIS in human cancers A review. Eur J Cancer.
- McGee J, von Hippel P. 1975a. Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. Biochemistry 14:1281-1296.
- McGee J, von Hippel P. 1975b. Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. Biochemistry 14:1297-1303.
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. Nature 448(7153):553-560.
- Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, Rosen ED. 2010. Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. Cell 143(1):156-169.
- Miller H. 1987. Practical aspects of preparing phage and plasmid DNA: growth, maintenance, and storage of bacteria and bacteriophage. Methods Enzymol 152:145-170.
- Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Davtyan H, Movsesyan N, Loukinov D, Lobanenkov V, Cribbs DH, Laust AK, Nelson EL, Agadjanyan MG. 2011. Cancer-testis antigen, BORIS based vaccine delivered by dendritic cells is extremely effective against a very

aggressive and highly metastatic mouse mammary carcinoma. Cell Immunol 270(2):188-197.

- Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Loukinov D, Davtyan H, Ichim TE, Cribbs DH, Lobanenkov VV, Agadjanyan MG. 2008. DNA, but not protein vaccine based on mutated BORIS antigen significantly inhibits tumor growth and prolongs the survival of mice. Gene Ther 15(1):61-64.
- Monk M, Hitchins M, Hawes S. 2008. Differential expression of the embryo/cancer gene ECSA(DPPA2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT4, in human preimplantation development. Mol Hum Reprod 14(6):347-355.
- Moon H, Filippova G, Loukinov D, Pugacheva E, Chen Q, Smith ST, Munhall A, Grewe B, Bartkuhn M, Arnold R, Burke LJ, Renkawitz-Pohl R, Ohlsson R, Zhou J, Renkawitz R, Lobanenkov V. 2005. CTCF is conserved from Drosophila to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. EMBO Rep 6(2):165-170.
- Moore MJ. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. Science 309(5740):1514-1518.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 420(6915):520-562.
- Müller H-J. 2001. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -Das Methodenbuch. Heidelberg -Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155:335-350.
- Nakamura N, Mori C, Eddy EM. 2010. Molecular complex of three testis-specific isozymes associated with the mouse sperm fibrous sheath: hexokinase 1, phosphofructokinase M, and glutathione S-transferase mu class 5. Biol Reprod 82(3):504-515.
- Nativio R, Wendt KS, Ito Y, Huddleston JE, Uribe-Lewis S, Woodfine K, Krueger C, Reik W, Peters JM, Murrell A. 2009. Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. PLoS Genet 5(11):e1000739.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J 1(7):841-845.
- Nguyen P, Bar-Sela G, Sun L, Bisht KS, Cui H, Kohn E, Feinberg AP, Gius D. 2008a. BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. Mol Cell Biol 28(21):6720-6729.
- Nguyen P, Cui H, Bisht KS, Sun L, Patel K, Lee RS, Kugoh H, Oshimura M, Feinberg AP, Gius D. 2008b. CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. Cancer Res 68(14):5546-5551.
- Nicholl DST. 2002. Gentechnische Methoden. 2 ed. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, Yoshida S, Ono M, Kuwano M, Nakamura Y, Tokino T. 1997. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. Oncogene 15(18):2145-2150.
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. 2001. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. Trends Genet 17(9):520-527.
- Palmer M, Prediger E. 2004. Assessing RNA Quality. Ambion TechNotes 11(1).
- Phillips JE, Corces VG. 2009. CTCF: master weaver of the genome. Cell 137(7):1194-1211.
- Pirooznia M, Nagarajan V, Deng Y. 2007. GeneVenn A web application for comparing gene lists using Venn diagrams. Bioinformation 1(10):420-422.
- Polyplus. 2011. jetPEI<sup>TM</sup> in vitro DNA Transfection Protocol. Polyplus Transfection<sup>TM</sup>.
- Popovici C, Leveugle M, Birnbaum D, Coulier F. 2001. Coparalogy: physical and functional clusterings in the human genome. Biochem Biophys Res Commun 288(2):362-370.

- Pradervand S, Paillusson A, Thomas J, Weber J, Wirapati P, Hagenbuchle O, Harshman K. 2008. Affymetrix Whole-Transcript Human Gene 1.0 ST array is highly concordant with standard 3' expression arrays. Biotechniques 44(6):759-762.
- Prawitt D, Enklaar T, Gartner-Rupprecht B, Spangenberg C, Oswald M, Lausch E, Schmidtke P, Reutzel D, Fees S, Lucito R, Korzon M, Brozek I, Limon J, Housman DE, Pelletier J, Zabel B. 2005. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. Proc Natl Acad Sci U S A 102(11):4085-4090.
- Promega. 2006. TNT Coupled Wheat Germ Extract Systems. Promega Corporation, Madison, WI.
- Pugacheva EM, Kwon YW, Hukriede NA, Pack S, Flanagan PT, Ahn JC, Park JA, Choi KS, Kim KW, Loukinov D, Dawid IB, Lobanenkov VV. 2006. Cloning and characterization of zebrafish CTCF: Developmental expression patterns, regulation of the promoter region, and evolutionary aspects of gene organization. Gene 375:26-36.
- Pugacheva EM, Suzuki T, Pack SD, Kosaka-Suzuki N, Yoon J, Vostrov AA, Barsov E, Strunnikov AV, Morse HC, 3rd, Loukinov D, Lobanenkov V. 2010. The structural complexity of the human BORIS gene in gametogenesis and cancer. PLoS One 5(11):e13872.
- Qiagen. 2006. QIAquick Spin Handbook. Qiagen GmbH, Hilden.
- Qiagen. 2010. Purification of total RNA from animal cells using spin technology. RNeasy Mini Handbook: Qiagen.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 409 p.
- Recillas-Targa F, De La Rosa-Velazquez IA, Soto-Reyes E, Benitez-Bribiesca L. 2006. Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. J Cell Mol Med 10(3):554-568.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. Curr Opin Genet Dev 12(2):162-169.
- Renaud S, Pugacheva EM, Delgado MD, Braunschweig R, Abdullaev Z, Loukinov D, Benhattar J, Lobanenkov V. 2007. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. Nucleic Acids Res 35(21):7372-7388.
- Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. Cancer Immunol Immunother 50(1):3-15.
- Risinger JI, Chandramouli GV, Maxwell GL, Custer M, Pack S, Loukinov D, Aprelikova O, Litzi T, Schrump DS, Murphy SK, Berchuck A, Lobanenkov V, Barrett JC. 2007. Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. Clin Cancer Res 13(6):1713-1719.
- Rivera RM, Bennett LB. 2010. Epigenetics in humans: an overview. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 17(6):493-499.
- Roberts RJ, Macelis D. 1991. Restriction enzymes and their isoschizomers. Nucleic Acids Res 19 Suppl:2077-2109.
- Robertson G, Hirst M, Bainbridge M, Bilenky M, Zhao Y, Zeng T, Euskirchen G, Bernier B, Varhol R, Delaney A, Thiessen N, Griffith OL, He A, Marra M, Snyder M, Jones S. 2007. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. Nat Methods 4(8):651-657.
- Robertson KD. 2005. DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet 6(8):597-610.
- Roche. 2007. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.

- Roche. 2008. Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230(4732):1350-1354.
- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. Cancer Immun 4:1.
- Schneider R, Grosschedl R. 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. Genes Dev 21(23):3027-3043.
- Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. Nat Rev Cancer 5(8):615-625.
- Sleutels F, Soochit W, Bartkuhn M, Heath H, Dienstbach S, Bergmaier P, Franke V, Rosa-Garrido M, van de Nobelen S, Caesar L, van der Reijden M, Bryne JC, van IJcken W, Grootegoed JA, Delgado MD, Lenhard B, Renkawitz R, Grosveld F, Galjart N. 2012. Nucleosome dynamics specifies genome-wide binding of the male germ cell gene regulator CTCFL and CTCF. unpublished.
- Smith MM. 2002. Centromeres and variant histones: what, where, when and why? Curr Opin Cell Biol 14(3):279-285.
- Solomon MJ, Varshavsky A. 1985. Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. Proc Natl Acad Sci U S A 82(19):6470-6474.
- Spiegelberg BD, Hamm HE. 2007. Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription. Curr Opin Genet Dev 17(1):40-44.
- Sun L, Huang L, Nguyen P, Bisht KS, Bar-Sela G, Ho AS, Bradbury CM, Yu W, Cui H, Lee S, Trepel JB, Feinberg AP, Gius D. 2008. DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. Cancer Res 68(8):2726-2735.
- Suzuki T, Kosaka-Suzuki N, Pack S, Shin DM, Yoon J, Abdullaev Z, Pugacheva E, Morse HC, 3rd, Loukinov D, Lobanenkov V. 2010. Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. Mol Cell Biol 30(10):2473-2484.
- Tabor S, Richardson CC. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 84(14):4767-4771.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 324(5929):930-935.
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y. 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell 146(6):1016-1028.
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan F, Hintz M, Kuo WL, et al. 1994. Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. Cancer Res 54(16):4257-4260.
- Todaro GJ, Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J Cell Biol 17:299-313.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer 26(2):171-176.
- Vatolin S, Abdullaev Z, Pack SD, Flanagan PT, Custer M, Loukinov DI, Pugacheva E, Hong JA, Morse H, 3rd, Schrump DS, Risinger JI, Barrett JC, Lobanenkov VV. 2005.

Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. Cancer Res 65(17):7751-7762.

- Venter et al. 2001. The sequence of the human genome. Science 291(5507):1304-1351.
- Waddington C. 1942. The epigenotype. Endeavour 1:18-20.
- Wallace JA, Felsenfeld G. 2007. We gather together: insulators and genome organization. Curr Opin Genet Dev 17(5):400-407.
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. Nucleic Acids Res 6(11):3543-3557.
- Wang T, Ward Y, Tian L, Lake R, Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Kelly K. 2005. CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells. Blood 105(7):2836-2844.
- Weintraub H, Groudine M. 1976. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. Science 193(4256):848-856.
- Wendt KS, Peters JM. 2009. How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. Chromosome Res 17(2):201-214.
- Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. Nature 451(7180):796-801.
- Woloszynska-Read A, James SR, Link PA, Yu J, Odunsi K, Karpf AR. 2007. DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCFL expression in ovarian cancer. Cancer Immun 7:21.
- Woloszynska-Read A, James SR, Song C, Jin B, Odunsi K, Karpf AR. 2010. BORIS/CTCFL expression is insufficient for cancer-germline antigen gene expression and DNA hypomethylation in ovarian cell lines. Cancer Immun 10:6.
- Woloszynska-Read A, Zhang W, Yu J, Link PA, Mhawech-Fauceglia P, Collamat G, Akers SN, Ostler KR, Godley LA, Odunsi K, Karpf AR. 2011. Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with the BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage. Clin Cancer Res 17(8):2170-2180.
- Wong TK, Neumann E. 1982. Electric field mediated gene transfer. Biochem Biophys Res Commun 107(2):584-587.
- Wyatt GR, Cohen SS. 1952. A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids. Nature 170(4338):1072-1073.
- Xu K, Zhu Z, Zeng F. 2007. Expression and significance of Oct4 in bladder cancer. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 27(6):675-677.
- Xu L, Begum S, Barry M, Crowley D, Yang L, Bronson RT, Hynes RO. 2010. GPR56 plays varying roles in endogenous cancer progression. Clin Exp Metastasis 27(4):241-249.
- Xu L, Begum S, Hearn JD, Hynes RO. 2006. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 103(24):9023-9028.
- Yin DX, Zhu L, Schimke RT. 1996. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. Anal Biochem 235(2):195-201.
- Yona S, Lin HH, Siu WO, Gordon S, Stacey M. 2008. Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. Trends Biochem Sci 33(10):491-500.
- Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN. 1999. TM7XN1, a novel human EGF-TM7-like cDNA, detected with mRNA differential display using human melanoma cell lines with different metastatic potential. FEBS Lett 446(2-3):292-298.

- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). Genome Biol 9(9):R137.
- Zhang Y, Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. Genes Dev 15(18):2343-2360.
- Zimmermann U. 1982. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim Biophys Acta 694(3):227-277.

# 8 Anhang

# 8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	Anti
β	Beta-
γ	Gamma
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenin
А	Absorbtion
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense-Orientierung
ATCC	american type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	basic local alignment search tool
BORIS	brother of regulator of imprinted sites, CTCFL
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
BTS	BORIS-target site (BORIS-Bindestelle)
bzw	beziehungsweise
С	concentration (Konzentration)
С	Cytosin
C-	Carboxy-
CIAP	<i>calf intestine alkaline phospatase</i> (alkalische Kälberdarm Phosphatase)
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CMV	Cytomegalovirus
CTA	cancer testis antigens (Krebs-Testis-Gene)
CTCF	CCCTC binding factor
CTCFL	CTCF-like (BORIS)
CTP	Cytosintriphosphat
CTS	CTCF-target site (CTCF-Bindestelle)
DMEM	Dulbecco's modified eagle serum
DMPC	Dimethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynucleotidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
Et	Elongationszeit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced GFP
et al	et alii (und andere)
FCS	fetales Kälberserum
fw	forward (vorwärts)

g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEO	gene expression omnibus
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	human
h	<i>hour</i> (Stunde)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGP	Humangenomprojekt
HRP	horseradish peroxidase (Meerettich-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid
K	Klon
kb/kbp	Kilobasennaar
kDa	Kilo-Dalton
1	Liter
LB	lysogeny broth
m	mouse (Maus)
M	Mol pro Liter
MCS	multiple cloning site
mø	Milligramm
MilliO	entionisiertes Wasser
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
mRNA	messenger RNA
mut	mutiert
N_	Amino-
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n	Plasmid
P PAGE	Polyacrylamid-Gelelektronhorese
PRS	nhosphate-huffered saling (Phosphat-genufferte Salzlösung)
PRST	PRS + 0.1% (v/v) Tween 20
PCR	nolymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
ng	Picogramm
pg pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
P7	Poak-Zentrum
RNA	Ribonukleinsäure
rnm	rounds ner minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkrintase
rw	rückwärts
C T AA	Sekunde(n)
ວ ຊ	sense-Orientierung
6	sense onennerung

SDS	sodium dodecyl sulfat (Natriumdodekylsulfat)
seq	Sequenzierung
Sleu	Sleutels (Frank Sleutels, Erasmus MC, Rotterdam)
Strep	Streptomycin
Т	Thymin
T <sub>an</sub>	Anlagerungs-Temperatur
T <sub>m</sub>	melting temperature (Schmelztemperatur)
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
ТВ	terrific broth
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	transcriptional end site (Transkriptionsende)
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	transcriptional start site (Transkriptionsstartstelle)
ТТР	Thymidintriphosphat
U	unit (Einheit)
utr	untransfiziert
UV	Ultraviolett
VS	versus
VT	Volumenteile
v/v	volume per volume
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
W/V	weight per volume
W/W	weight per weight
x-Gal	[(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-β-D-galactosid]
z.B.	zum Beispiel



## 8.2 Klonierungsschemata verschiedener erstellter Vektoren





Abb. 41: Ablauf der Klonierung zum Anhängen eines N-terminalen FLAG-tags an mCTCFLmut. Aus dem Vektor pCDNA3-FLAG-chCTCF wurde durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI chCTCF entfernt und anschließend mCTCFLmut, welches durch Verdau mit denselben Restriktionsendonukleasen dem Vektor pGEM-T-mCTCFLmut freigesetzt wurde, über aus sticky-end-Klonierung eingefügt. Die Bindestellen der Enzyme sind in roter Schrift angegeben. chCTCF = *chicken* CTCF



Abb. 42: Einfügen von FLAG-mCTCFLmut in ein Tet-response-Plasmid mit bidirektionalem Promotor und eGFP-Sequenz. Das FLAG-mCTCFLmut-Insert wurde aus pCDNA3-FLAGmCTCFLmut durch Verdau mit *Hind*III und *Xho*I freigesetzt und nach Auffüllen der Überhänge mit dem Klenow-Fragment in den durch *Pvu*II-Verdau geöffneten Vektor pBI-eGFP eingefügt. Im daraus resultierenden Vektor pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut wird die Expression von FLAG-mCTCFLmut und von eGFP durch den bidirektionalen Promotor reguliert. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind in roter Schrift angegeben. TRE = tetracyclin-response-element; P<sub>min</sub> CMV = Minimalpromotor Cytomegalovirus.


Abb. 43: Entfernung des FLAG-tags aus pCDNA3-FLAG-Derivaten, hier exemplarisch gezeigt für pCDNA3-FLAGmCTCFLmut. Der auf pCDNA3-FLAG basierende Vektor pCDNA3-FLAGmCTCFLmut wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hin*dIII verdaut und über Gelextraktion erfolgte die Abtrennung des Vektor-Rückgrats vom FLAG-tag. Nach Auffüllen der Überhänge mittels Klenow-Fragment entstand über Selbstligation der FLAG-freie Vektor pCDNA3-mCTCFLmut. Die Klonierung von pCDNA3-hCTCFL (hCTCFL-Variante) aus dem Ausgangsvektor pCDNA3-FLAG-hCTCFL erfolgte auf gleiche Weise. Bindestellen von Restriktionsendonukleasen sind in roter Schrift, die Bindestelle für den Sequenzierprimer S027 ist mit blauer Schrift angegeben, seine Orientierung wird durch die Pfeilrichtung dargestellt.



Herstellung Expressionsvektors mit **mCTCFLmut** Abb. 44: eines HA-tag und (pBK-CMV-HAmCTCFLmut). Die beiden pCDNA3-FLAGmCTCFLmut Ausgangsvektoren und pBK-CMV-HA-TIF2 wurden mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI verdaut. Über Gelextraktion wurde aus pCDNA3-FLAGmCTCFLmut die mCTCFLmut-Sequenz und aus pBK-CMV-HA-TIF2 das Vektor-Rückgrat (ohne TIF2 aber mit HA-tag) aufgereinigt und anschließend über sticky-end-Klonierung zusammengefügt. Im so entstandenen Vektor pBK-CMV-HAmCTCFLmut weist mCTCFLmut somit ein N-terminales HA-tag auf. Die Bindestellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in roter Schrift angegeben.

### 8.3 Optimierung von jetPEI-Transfektion von THP-1 und RMB-3

**Tab. 11: Optimierung der Transfektion von THP-1 und RMB-3 mittels jetPEI.** Es wurden verschiedene vom Hersteller empfohlene Parameter verändert, um die Transfektionseffizienz für beide Zelllinien zu optimieren. Die Angaben beziehen sich auf je ein *well* einer 6-*well*-Schale. Zeichenerklärung: - = keine Zellen; 1 = eine grüne Zelle im gesamten *well*; += 2 - 5 grüne Zellen pro *well*; ++= 6 - 20 grüne Zellen pro *well*; +++ = >20 und <100 grüne Zellen pro *well*.

Volumen Medium [ml]	Volumen jetPEI [µl]	Menge DNA [µg]	Zellen pro well	Ergebnis RMB-3	Ergebnis THP-1
2	-	-	$5 * 10^5$	-	-
1	4	2	$2 * 10^5$	-	+++
1	4	2	$5 * 10^5$	-	+++
2	8	4	$2 * 10^5$	-	++
2	8	4	$5 * 10^5$	+	+++
1	8	2	$2 * 10^5$	1	+
1	8	2	$5 * 10^5$	+	+
2	4	4	$2 * 10^5$	1	+
2	4	4	$5 * 10^5$	-	++
2	6	4	$2 * 10^5$	1	++
2	6	4	$5 * 10^5$	1	++

#### 8.4 Stabil transfizierte NIH3T3-Klone mit eGFP-Signal

Tab. 12: Aufgelistet sind alle NIH3T3-Klone, welche nach Selektion über Puromycin-Resistenz ein eGFP-Signal zeigten. Von 100 resistenten Klonen zeigten nur 25 ein eGFP-Signal bei der Fluoreszenzmikroskopie. Bei der weiteren Charakterisierung über RT-PCR und Western Blot zeigte sich, dass nicht alle dieser Klone gleichzeitig mit eGFP auch FLAG-mCTCFLmut exprimierten, was aufgrund des bidirektionalen Promotors des transfizierten Vektors pBI-eGFP-FLAGmCTCFLmut erwartet wurde. " $\square$ " = Nachweis erfolgreich, "-" = konnte nicht nachgewiesen werden,  $\square$  = nicht untersucht

			Nachweis FLAG-mCTCFLmut über:		
Klon-Nummer	eGFP-Signal (-Tet)	RNA	Western Blot		
4	V	$\overline{\mathbf{A}}$			
5	V	$\overline{\mathbf{A}}$	M		
9	V	-			
11	V	$\overline{\mathbf{A}}$	M		
15	N	-			
17	N	$\overline{\mathbf{A}}$	N		
18	N	$\overline{\mathbf{A}}$			
19	V	-			
34	V	V	V		
39	V	V	V		
48	V	V			
49	V	-			
51	N	$\overline{\mathbf{A}}$			
52	N	-			
53	V	$\overline{\mathbf{A}}$			
57	V	$\overline{\mathbf{A}}$			
60	V	$\overline{\mathbf{A}}$	M		
61	$\checkmark$				
62					
63	$\checkmark$	-			

Fortsetzung Tabelle 12				
		Nachweis FLAG-mCTCFLmut über:		
Klon-Nummer	eGFP-Signal (-Tet)	RNA	Western blot	
64	$\checkmark$	-		
68	$\overline{\mathbf{A}}$	-		
90	$\checkmark$	$\overline{\mathbf{A}}$	$\overline{\mathbf{A}}$	
94	$\checkmark$	-		
95	$\checkmark$	$\checkmark$		

#### 8.5 Auswertung colony formation assay

Tab. 13: Ergebnis der quantitativen Auswertung des *colony formation assays* anhand der mit dem VersaDoc *Imaging* System ermittelten Messwerte. Sofern nicht anders angegeben, berechnen sich der Mittelwert und die Standardabweichung aus Triplikaten. In einigen Fällen waren aufgrund flächigen Wachstums der Zellen auf dem *base agar* nicht alle drei *wells* auswertbar, in drei Fällen war keines der Triplikate auswertbar. Die Zelllinie FTC133 wurde als Positivkontrolle verwendet, in diesem Falle berechneten sich die Werte aus 29 Messwerten.

NIH3T3 Klon	Induziert	Mittelwert Kolonien	Standardabweichung
untronsfiziort	-	527 (2 Messwerte)	36
unuansnzien	+	519 (1 Messwert)	0
1	-	Nicht auswertbar	
4	+	Mittelwert Kolonien           527 (2 Messwerte)           519 (1 Messwert)           Nicht auswertbar           547 (1 Messwert)           133 (2 Messwerte)           93 (1 Messwert)           410 (1 Messwert)           313 (1 Messwert)           Nicht auswertbar           Nicht auswertbar           Nicht auswertbar           36           7           102           112           359           468 (2 Messwerte)           396           448           129           137           71 (1 Messwert)           41 (2 Messwerte)	0
11	-	133 (2 Messwerte)	4,9
11	+	Mittelwert Kolonien           527 (2 Messwerte)           519 (1 Messwert)           Nicht auswertbar           547 (1 Messwert)           133 (2 Messwerte)           93 (1 Messwert)           410 (1 Messwert)           313 (1 Messwert)           Nicht auswertbar           Nicht auswertbar           Nicht auswertbar           36           7           102           112           359           468 (2 Messwerte)           396           448           129           137           71 (1 Messwert)           41 (2 Messwerte)           75           125           121 (1 Messwert)           67           855           523	0
17	-	410 (1 Messwert)	0
17	+	527 (2 Messwerte)         519 (1 Messwert)         Nicht auswertbar         547 (1 Messwert)         133 (2 Messwerte)         93 (1 Messwert)         410 (1 Messwert)         313 (1 Messwert)         Nicht auswertbar         Nicht auswertbar         Nicht auswertbar         Nicht auswertbar         102         112         359         468 (2 Messwerte)         396         448         129         137         71 (1 Messwert)         41 (2 Messwerte)         75         125         121 (1 Messwert)	0
19	-	Nicht auswertbar	
10	+	Nicht auswertbar	
34	-	36	53,4
	+	7	5,7
39	-	102	43,9
	+	112	27,2
10	-	359	9,2
48	+-	468 (2 Messwerte)	114,1
51	-	396	105,4
51	+	$\begin{array}{r} 527 (2 \text{ Messwerte}) \\ \hline 519 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline \text{Nicht auswertbar} \\ \hline 547 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline 133 (2 \text{ Messwerte}) \\ \hline 93 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline 410 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline 313 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline 313 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline \text{Nicht auswertbar} \\ \hline 313 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline 112 \\ \hline 36 \\ \hline 7 \\ \hline 102 \\ \hline 112 \\ \hline 359 \\ \hline 468 (2 \text{ Messwerte}) \\ \hline 396 \\ \hline 448 \\ \hline 129 \\ \hline 396 \\ \hline 448 \\ \hline 129 \\ \hline 137 \\ \hline 71 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline 41 (2 \text{ Messwert}) \\ \hline 41 (2 \text{ Messwert}) \\ \hline 75 \\ \hline 125 \\ \hline 121 (1 \text{ Messwert}) \\ \hline 67 \\ \hline 855 \\ \hline 523 \\ \hline 1498 \\ \end{array}$	131,6
52	-	129	31,0
55	+	137	38,2
57	-	71 (1 Messwert)	0
57	+	41 (2 Messwerte)	35,4
57 60	-	75	4,4
	+	125	35,9
()	-	121 (1 Messwert)	0
02	+	36         7         102         112         359         468 (2 Messwerte)         396         448         129         137         71 (1 Messwert)         41 (2 Messwerte)         75         125         121 (1 Messwert)         67         855         523         1498	14,7
05	-	855	69,9
93	+	523	175,1
FTC133		1498	96,8

## 8.6 Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer

Tab. 14: Auflistung der verwendeten Oligonukleotidprimer. Neben der Bezeichnung ist die jeweilige Sequenz angegeben, sowie die Verwendung des Primers und Besonderheiten wie z.B. *header*-Sequenzen.

Gen / CTS /	Primer	Sequenz	Verwendung /
BTS		_	Besonderheiten
Abhd6 CTS	Abhd6as	TGCCTATAAGGTGAAAGGGC	ChIP (real-time-PCR)
Abhd6 CTS	Abhd6s	CTTGGTCTGTGTGGACATGC	ChIP (real-time-PCR)
AKR1C18	Akr1c18as	CCAGGCCATTCTAAGCAAGA	RT-PCR, real-time-PCR
AKR1C18	Akr1c18s	TCAGGGAATTTTCCAAGCTG	RT-PCR, real-time-PCR
Amylase CTS	Amy99	CTCCTTGTACGGGTTGGT	ChIP, Negativkontrolle
Amylase CTS	Amy100	AATGATGTGCACAGCTGAA	ChIP, Negativkontrolle
B2M	B2mfw	CATGGCTCGCTCGGTGACC	RT-PCR, real-time-PCR
B2M	B2mrw	AATGTGAGGCGGGTGGAACTG	RT-PCR, real-time-PCR
ССК	Cck1	ACTGCTAGCGCGATACATCC	real-time-PCR,
ССК	Cck2	CCCACTACGATGGGTATTCG	real-time-PCR
COL12A1 CTS	Col12a1CTSas	ATTCTTGGCTGGCTGAGATG	ChIP ( <i>real-time</i> -PCR)
COL12A1 CTS	Col12a1CTSs	GTCTAGTGCGCCACCTATCG	ChIP (real-time-PCR)
CYFIP2 CTS	Cyfip2CTSas	CTGATGCAGGAACCGAAATG	ChIP (real-time-PCR)
CYFIP2 CTS	Cyfip2CTSs	GAGGGGAGAAGGGACAACAC	ChIP (real-time-PCR)
DLK1 CTS	Dlk1ChIPas	CGTGCCTCAACTTTTCTACCA	ChIP (real-time-PCR)
DLK1 CTS	Dlk1ChIPs	CCTCTTCCTCCTCCACGTT	ChIP (real-time-PCR)
FZD4	Fzd41	AGAACCTCGGCTACAACGTG	RT-PCR, real-time-PCR
FZD4	Fzd42	TGGCACATAAACCGAACAAA	RT-PCR, real-time-PCR
GAPDH	GAPDHfw	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	RT-PCR, real-time-PCR
GAPDH	GAPDHrw	ACACATTGGGGGTAGGAACA	RT-PCR, real-time-PCR
GPR56	Gpr56as	TTGGTGTTCTGCACGACAAT	RT-PCR, real-time-PCR
GPR56 CTS	Gpr56CTSas	CCCTCCTCATTCAGGAAACA	ChIP ( <i>real-time</i> -PCR)
GPR56 CTS	Gpr56CTSs	GGCGGGAGCACATAGACTAA	ChIP ( <i>real-time</i> -PCR)
GPR56 lange	Gpr56las	CAGCACCTGGACAGCCATTA	RT-PCR
Version	1		
GPR56 lange	Gpr56ls	TGGGAGGAGGAGGAGACATT	RT-PCR
Version	1		
GPR56 mittlere	Gpr56mas	TGCACCAGAGAAAACAGACTCA	RT-PCR
Version	1		
GPR56 mittlere	Gpr56ms	CCTGGCTCCTTCCAGAACC	RT-PCR
Version	-		
GPR56	Gpr56s	AGGCATACTCGCTGTTGCTT	RT-PCR, real-time-PCR
GSTM5	Gstm5as	CGGAAGTCCATGATCTGGTT	RT-PCR, real-time-PCR
GSTM5	Gstm5s	CTACCTCATGGACGGGAAGA	RT-PCR, real-time-PCR
GUSB	Gusbfw	ACTGACACCTCCATGTATCCCAAG	RT-PCR
GUSB	Gusbrw	CAGTAGGTCACCAGCCCGATG	RT-PCR
HPRT	Hprtfw	CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA	RT-PCR
HPRT	Hprtrw	CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA	RT-PCR
IFITM3 CTS	Ifitm3as	CTTAGCAGTGGAGGCGTAGG	ChIP ( <i>real-time</i> -PCR)
IFITM3 CTS	Ifitm3s	AACATGCCCAGAGAGGTGTC	ChIP ( <i>real-time</i> -PCR)
ITFG3	Itfg31	ACGAGGTGTCTTCTGCCTGT	RT-PCR, real-time-PCR
ITFG3	Itfg32	GTTCCCACTAAAGCTGCTGG	RT-PCR. real-time-PCR
KLHL24 BTS	Klhl24BTSfw	ATGTTTGGAATTAGCAGCCC	ChIP ( <i>real-time</i> -PCR)
KLHL24 BTS	Klhl24BTSrw	AACACTTAGCGTCACCCACC	ChIP (real-time-PCR)

Fortsetzung Tabelle 14				
Gen / CTS /	Primer	Sequenz	Verwendung /	
BTS		_	Besonderheiten	
MT2	MT21	GCAAATGCAAACAATGCAAA	real-time-PCR	
MT2	MT22	CACTTGTCGGAAGCCTCTTT	real-time-PCR	
RAB7L1	Rab7111	CAGCCGAGATCACCTGTTTA	RT-PCR, real-time-PCR	
RAB7L1	Rab7112	TCAGACCACTGGAGAACCTTG	RT-PCR, real-time-PCR	
IGFBP4	Igfbp41	AGCAAGATGAAGATCGTGGG	RT-PCR, real-time-PCR	
IGFBP4	Igfbp42	ACAGTTTGGAATGGGGATGA	RT-PCR, real-time-PCR	
RPL13	Rpl13afw	CACTCTGGAGGAGAAACGGAAGG	RT-PCR	
RPL13	Rpl13arw	GCAGGCATGAGGCAAACAGTC	RT-PCR	
mCTCFL	S025	TTTGAATTCATGGCTGCCGCTGAGGTCCC	PCR (header),	
			Sequenzierung	
mCTCFL	S026	AAACTCGAGTCACTTATCCATCATGTTAAA	PCR (header),	
		G	Sequenzierung	
β-Actin	S042	CCGTCTTCCCCTCCATCGTG	RT-PCR, real-time-PCR	
β-Actin	S043	CTGGGTCATCTTCTCGCGGT	RT-PCR, real-time-PCR	
β-2-Μ	S052	ATTCACCCCCACTGAGACTG	RT-PCR, real-time-PCR	
β-2-Μ	S053	TGCTATTTCTTTCTGCGTGC	RT-PCR, real-time-PCR	
β-Actin	S054	CAACGAGCGGTTCCGATG	RT-PCR, real-time-PCR	
β-Actin	S055	GCCACAGGATTCCATACCCA	RT-PCR, real-time-PCR	
FLAG-CTCFL	S062	ATGGACTACAAGGACGACGAT	RT-PCR, real-time-PCR	
FLAG-CTCFL	S071	GCAGGCAACTGTTCTCGGC	RT-PCR, real-time-PCR	
CTCF	S072	GGAAGGACTGCTGTCTGAGG	RT-PCR	
CTCF	S073	GTGTGGCTTTTCATGTGACG	RT-PCR	
SORCS2 CTS	Sorcs2CTSas	AAGAAGGAAGGGGTCTTGGAG	ChIP (real-time-PCR)	
SORCS2 CTS	Sorcs2CTSs	GAGCAAGAGCGCAGAGAAAG	ChIP (real-time-PCR)	
STRA8 CTS	Stra8CTSas	CGGGTGATGCACAGATCC	ChIP (real-time-PCR)	
STRA8 CTS	Stra8CTSs	TGTGTGTCCTCCTCGACTCC	ChIP (real-time-PCR)	
TBP	TBPfw	CCCCACAACTCTTCCATTCT	RT-PCR	
TBP	TBPrw	GCAGGAGTGATAGGGGTCAT	RT-PCR	
THOC1 CTS	Thoc1CTSas	GTCAGGTTGGGAGCAAAGAGA	ChIP (real-time-PCR)	
THOC1 CTS	Thoc1CTSs	GAGCTGACAACACGAAACACC	ChIP (real-time-PCR)	
THOC ctrl CTS	Thoc1downas	GCTGGGATTTGAACTCCTGAC	ChIP (real-time-PCR)	
THOC ctrl CTS	Thoc1downs	AGGCCAAACCGAAGAGTGTTA	ChIP (real-time-PCR)	
hCTCFL	Unfor	GGCAAAGGCTTTTCCCGCTGG	RT-PCR, real-time-PCR	
hCTCFL	Unrev	TTCGCGGCTTCCTTCCATCCC	RT-PCR, real-time-PCR	

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung nach §17 Absatz 2 Punkt 2 der Promotionsordnung der Gemeinsamen Kommission Naturwissenschaften für die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der JLU Gießen:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation 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 Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Ort / Datum

Sven Dienstbach

# 10 Danksagung

An dieser Stelle nun möchte ich mich bei all den Personen bedanken, ohne die es mir nie gelungen wäre, diese Arbeit in der vorliegenden Form fertigzustellen. Und da ich ohnehin so viele Seiten geschrieben habe, werde ich mich auch hier nicht kurzfassen. Vielen Dank:

- Prof. Dr. Rainer Renkawitz f
  ür die M
  öglichkeit, die der Arbeit zugrunde liegenden Versuche im Institut f
  ür Genetik durchzuf
  ühren und f
  ür die Geduld, die er dabei bewies.
- @ den Mitgliedern von Labor 329, sowohl den aktuellen, als auch den ehemaligen.
  - Ø Jörg. In jedem Menschen steckt angeblich ein Buch. Wenn ich jemals eines schreibe, dann über deine gesammelten Geschichten und über die Apfelweinherstellung.
  - Ø Ölle. Was ich von dir alles gelernt habe...ChIP, Börse, Doktorarbeit schreiben...Wer mich kennt, dem ist klar, was ich von jemandem halte, der eigenes Gemüse anbaut und Rocky verehrt.
  - Philipp. Ein immer gut gelauntes wandelndes Literaturlexikon. Wie oft habe ich gefragt, in welchem Paper stand dies und jenes...und nie bekam ich eine falsche Antwort. Außerdem bekam ich noch das Paper dazu, sowie einen Energy-Drink. Und auch über Dinge außerhalb des Laboralltags habe ich viel gelernt... Tja, er hat eben beim Besten gelernt. Padawan und Jedi-Ritter, Pinky & Brain, Pat und Patachon, Harley-Davidson und der Marlboro-Man.
  - Christine (CP). Wir hatten einen schweren Start mit billigem Rasierwasser...aber am Ende haben wir einen Weg gefunden, auf dem wir gut miteinander auskamen. Ich gestehe, ich habe unsere Kabbeleien nach deiner Dissertation vermisst.
  - @ Nadine, Anne und Katharina. Drei Superlative...ich habe zuvor nie jemanden gesehen, dem das Pech so an den Hacken klebte (und der doch nie aufgab), der mein Gehirn regelmäßig überforderte (und in dessen Gegenwart selbst ich nicht schlecht gelaunt sein konnte) und jemanden, der im Labor auf der Suche nach einem Millionär so ziemlich alle Register bei der Auswahl der Kleidung zog. Ich danke euch außerdem für den schönsten Arbeitsplatz, den ich je hatte.
  - @ Theresa. Ja, in 329 fing alles an, auch du hast beim Besten gelernt. Und du hast mir die Betreuung damals recht leicht gemacht. Bessere Flag-Western-Blots mit 3T3-Klonen hat nach dir niemand mehr gemacht. Und deine beständigen Nörgeleien sind irgendwie doch amüsant.
  - @ Manuel. Nicht nur dass du ein unheimlich freundlicher Mensch bist...du hast mir gezeigt, dass es Menschen gibt, die von Süßkram (Unmengen) nicht dick werden. Aber deine Laster...kein Kaffee! Und dein etwas anderer Musikgeschmack.
- @ Melanie. Der weibliche Teil der Nespresso-Gang. Ich werde nie wieder vergessen dass du FISH gemacht hast. Und mit dir würde ich jederzeit Pferde stehlen. Unsere Gespräche in eurem Office werde ich echt vermissen. Was auch immer andere sagen...bleib bitte wie du bist.
- @ Martin. Entschuldige, dass ich es nicht ein einziges Mal auf deine legendäre Geburtstagsfeier geschafft habe. Niemand von uns sah im Hemd so gut aus wie du. Und schlechte Laune ist ebenfalls ein Fremdwort für dich. Und im Institut der einzige, mit dem ich über Gott reden konnte, ohne zu missionieren.

- @ Marek. Wo soll ich anfangen? Trotz Stress hast du, wenn auch hin und wieder etwas wirsch, alle meine Fragen beantwortet. Leider war mein Intellekt dem Deinen nie gewachsen...weshalb ich im Labor oft bereits die Hälfte wieder vergessen hatte. Nur beim Würfel war ich komischerweise besser...
- @ Hoshi. Ohne dich wäre keine einzige VectorNTI-Grafik in dieser Arbeit. Und auch sonst konntest du mir oft helfen bei technischen Problemen.
- @ Dorte. Ich denke du verstehst mittlerweile, was ich meine, wenn ich dich einen Kumpel nenne. Und mit Sekt wurde es nochmal so schön...
- @ Katharina. Unglaublich engagiert (um 5:30 Uhr an einem Sonntag an der Uni getroffen!). Unglaublich schnell (im Reden, im Forschen, im Laufen...).
- Ø Steffi und Steffen. Für eine unvergessliche Party mit unvergesslichen Fotos...Und einen knallharten Gegner im Kicktipp...
- Prof. Dr. Reinhard Damman. Für cDNA von Stammzellen, hilfreiche Fragen in den Seminaren und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit.
- @ Anna und Angelika. Ohne euch wäre es nicht gegangen. Danke, dass ihr euch um so vieles so gut gekümmert habt.
- @ Leni. Das kann ich alles gar nicht aufschreiben...*colony-formation*, growth curves, etc. Und wenn man etwas sucht...wenn wir es hatten, dann hast du es auch gefunden. Und in der besten Sprache der Welt konnte man mit dir auch reden.
- Ø Nadine, Sonja, Bashir. Für Hilfe bei Versuchen, für Fischfutter, für Quitten und dass ihr immer hilfsbereit wart.
- Christa, Israil, Doris. Ohne euch ginge gar nichts. Das hat man immer gemerkt, wenn ihr nicht da wart...
- @ Andreas. Ob Batterien, Lampen, Internetzugang oder Computerfragen, du konntest immer helfen.
- @ Man und Sajad. Für die Erweiterung meiner engen Weltsicht und eine enorme Verbesserung meiner Englisch-Kenntnisse.
- @ alle anderen Mitglieder des Instituts, ob aktuelle oder ehemalige. Wenn ich euch nicht namentlich aufführe, dann vermutlich, weil es gerade schon sehr spät ist, der Platz begrenzt ist und ihr so viele wart...
- @ Tanja, Dennis, Ferdi, Sebastian. Das Vierergespann meiner engsten Freunde. Schon in meiner Diplomarbeit habe ich euch gedankt, und ich muss und will dies hier wiederholen. Für DMPC-Wasser, Korrekturlesen, Kaffeepausen, unvergessliche Angelerlebnisse in Schweden, ein eiskaltes Bad, wiederholte Motivation und Entspannung außerhalb des Laboralltags.
- @ Franz. Von dir hat "der Beste" gelernt. Schade dass du nicht mehr an der Uni bist. Deine Betreuung war die Beste die ich je erleben durfte, und was ich dabei gelernt habe, hat mir mehr als einmal auch bei dieser Arbeit geholfen.
- @ Meine Eltern. Last but not least. Ohne euch wäre das niemals möglich gewesen. Ohne eure Unterstützung in jedweder Hinsicht hätte dieses Abenteuer sein Ende schon viel früher gefunden.