

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

Analyse des durch den Isolationsfaktor CTCF vermittelten Einfluss auf Chromatin

**Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades**

**vorgelegt von Christine Paprotka
Gießen, Mai 2010**

**Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters
1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud**

*Für Aurelia
und Julius*

1	Zusammenfassung/ Abstract	1
1.1	Zusammenfassung.....	1
1.2	Abstract	2
2	Einleitung.....	3
2.1	Chromatin.....	4
2.2	Genregulation.....	6
2.3	Der Faktor CTCF	10
2.4	Ziel der Arbeit	20
3	Material	23
3.1	Geräte.....	23
3.2	Verbrauchsmaterialien	24
3.3	Chemikalien	24
3.3.1	Enzyme	25
3.3.2	Komplettsysteme	25
3.3.3	Protein-Größenstandard	25
3.3.4	DNA-Längenstandards	26
3.3.5	Antibiotika.....	26
3.4	Antikörper.....	26
3.5	Oligonukleotide	28
3.6	Plasmide	31
3.7	Zelllinien	32
3.7.1	Eukaryotische Zelllinien	32
3.7.2	Bakterien	33
4	Methoden.....	34
4.1	Arbeiten mit DNA	34
4.1.1	Lagerung.....	34
4.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
4.1.3	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	34
4.1.4	Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Minipräparation).....	35
4.1.5	Plasmidpräparation in mittlerem Maßstab (Midipräparation)	36
4.1.6	Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxipräparation)	36
4.1.7	Fällung von DNA.....	38
4.1.8	Sequenzierung.....	39
4.1.9	Enzymatische Modifizierung von DNA.....	39
4.1.9.1	Restriktion	39
4.1.9.2	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden	39
4.1.9.3	Dephosphorylierung der freien 5'Enden eines linearisierten Vektors	40
4.1.9.4	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	40
4.1.9.5	Ligation	40
4.1.10	PCR	41
4.1.11	Realtime PCR.....	42
4.1.12	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	43
4.1.13	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
4.2	Arbeiten mit RNA.....	44
4.2.1	RNA-Isolierung	44
4.2.2	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	44
4.2.3	RT-PCR.....	45

4.3	Arbeiten mit Proteinen.....	45
4.3.1	Isolierung von Proteinen aus Zellkernen	45
4.3.2	Konzentrationsbestimmung.....	46
4.3.3	Fällung von Proteinen (TCA-Fällung)	46
4.3.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender Polyacrylamidgele (SDS-PAGE).....	47
4.3.5	Western Blot	49
4.3.6	Immundetektion von Proteinen auf einer Trägermembran.....	50
4.4	Arbeiten mit Bakterien	51
4.4.1	Vermehrung und Lagerung	51
4.4.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	52
4.5	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien	52
4.5.1	Haltung und Lagerung.....	53
4.5.2	RNA-Transfer in Zellen (RNA-Interferenz)	55
4.5.3	DNA-Transfer in Zellen	55
4.5.3.1	Calciumphosphat-Präzipitation.....	56
4.5.3.2	DNA-Transfer in Zellen mittels jetPEI™	56
4.6	Analyse des Chromatinstatus und Kolo-kalisierung potentieller Interaktionspartner ...	57
4.6.1	LacO-LacI-Modellsystem	57
4.6.2	Indirekte Immunfluoreszenz	58
4.6.3	Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	59
4.6.4	Chromatin-Immunopräzipitation.....	62
4.7	Computergestützte Analyse von CTCF-Barriereelementen	64
4.8	Messung der Reporter-genaktivität mittels Luciferase-Assay	65
5	Ergebnisse	68
5.1	Analyse des Einflusses von CTCF auf Chromatin an endogenen Loci	68
5.1.1	Identifizierung potentieller funktioneller CTCF-Barriereelemente <i>in silico</i>	68
5.1.2	Der Chromatinstatus der Genloci ATP8B2 und EXT2.....	70
5.1.3	Sowohl EXT2 als auch die Transkript-Variante 2 von ATP8B2 werden in HeLa-Zellen exprimiert	74
5.1.4	Führt die Herunterregulierung der CTCF-Expression zu einer Änderung des Chromatinstatus an den beiden Genloci?	75
5.1.4.1	Eine Herunterregulierung der CTCF-Expression in HeLa-Zellen ist prinzipiell möglich	75
5.1.4.2	Die Herunterregulierung der CTCF-Expression führt zu einer Abnahme der ATP8B2_2- und EXT2-Expression in HeLa-Zellen	76
5.1.4.3	Die Herunterregulierung der CTCF-Expression ist nicht reproduzierbar.....	79
5.2	Analyse des Einflusses von CTCF auf Chromatin mittels des LacO-LacI-Modellsystems .	81
5.2.1	Der LacO-Array weist eine kompakte Struktur in der DNA-Färbung auf.....	81
5.2.2	Der LacO-Array zeigt eine heterochromatische DNA-Struktur.....	83
5.2.3	Bindung von CTCF führt zu Dekondensierung des heterochromatischen DNA-Arrays	87
5.2.4	Bindung von CTCF führt zu Euchromatinisierung des LacO-Arrays	92
5.2.5	Identifizierung der funktionellen Domäne von CTCF.....	97
5.2.5.1	Der N-Terminus als auch die Zinkfingerdomäne von CTCF sind nötig für eine vollständige Dekondensierung des Arrays	97

5.2.5.2	Die Enhancerblockade-vermittelnde Domäne von CTCF ist nicht ausreichend für eine vollständige Dekondensierung	101
5.2.5.3	Acetylierung von CTCF spielt keine Rolle für die Dekondensierung	103
5.2.6	Dynamik des Dekondensierungsprozesses	106
5.2.7	Der paraloge Faktor BORIS führt ebenfalls zu Dekondensierung des Arrays ...	109
5.2.8	Vergleich von CTCF mit dem Transaktivator VP16	111
5.2.9	CTCF besitzt kein Transaktivierungspotential im Vergleich mit VP16	112
5.2.10	CTCF besitzt ein stärkeres Dekondensierungspotential als VP16.....	114
5.2.11	Analyse potenzieller Interaktionspartner von CTCF	119
5.2.11.1	CTCF rekrutiert sich selbst an den LacO-Array.....	120
5.2.11.2	Bekannte Interaktionspartner von CTCF sind nicht am dekondensierten Array nachzuweisen	121
5.2.11.3	Verschiedene Chromatin-modifizierende Faktoren sind am dekondensierten DNA-Array nicht nachzuweisen.....	126
5.2.11.4	WDR5 zeigt Kolokalisierung mit CTCF am dekondensierten Array.....	128
5.2.11.5	Untersuchung des Einflusses von WDR5 auf die Dekondensierung	131
6	Diskussion.....	139
6.1	Untersuchung der Barriereaktivität von CTCF an endogenen Loci	140
6.2	Untersuchung des Einflusses von CTCF auf Chromatin mittels des LacO-LacI-Modellsystems.....	142
6.2.1	CTCF ändert die Chromatinstruktur eines heterochromatischen DNA-Arrays	143
6.2.2	Der Vergleich von CTCF und VP16	145
6.2.3	WDR5 konnte als Kofaktor von CTCF am dekondensierten DNA-Array identifiziert werden.....	147
6.2.4	Der paraloge Faktor BORIS verursacht ebenfalls Dekondensierung des heterochromatischen DNA-Arrays.....	154
6.2.5	Bewertung des LacI-LacO-Modellsystems	156
6.2.5.1	Vorteile	156
6.2.5.2	Nachteile	157
6.3	Interpretation der Ergebnisse	158
6.4	Ausblick.....	160
7	Literaturverzeichnis.....	162
8	Anhang	171
8.1	Abkürzungsverzeichnis	171
8.2	Klonierung von verwendeten Plasmiden	174
8.3	Größe von detektierten PCR-Produkten	179
8.3.1	RT-Analyse.....	179
8.3.2	Chromatin-IP	180
8.4	Molekulargewichte der detektierten Proteine	180

1 Zusammenfassung/ Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die Regulation der Genaktivität ist wichtig für die Differenzierung und Entwicklung von Zellen höherer Organismen. Nur eine zellspezifische Genexpression kann zu der Ausbildung von unterschiedlichen Geweben und Organen und somit zu der Ausprägung eines vielzelligen Organismus führen. Die Expression von Genen in eukaryotischen Zellen ist deshalb genauestens reguliert. Isolatorelemente unterteilen das Genom in funktionelle Bereiche, indem sie einerseits Gene von ungewollter Enhancer-Aktivität abschirmen und andererseits die Ausbreitung von Heterochromatin in transkriptionell aktive Bereiche verhindern. Das Protein CTCF spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation und ist in Vertebraten der einzig bekannte Faktor, der die Enhancerblockade-Aktivität von Isolator-Elementen ausübt. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Ob CTCF ebenfalls generell an der Barriere-Aktivität von Isolatorelementen beteiligt ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Funktion von CTCF in der Isolation genauer zu beleuchten. Nach Identifizierung potentieller CTCF-Barriereelemente in HeLa-Zellen sollten diese auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass CTCF in HeLa-Zellen an mindestens zwei Genloci einen heterochromatischen von einem euchromatischen Bereich mit aktiven Genen trennt und dass die Herunterregulierung der CTCF-Expression mit einer Herunterregulierung der Transkription der untersuchten Gene einhergeht. Zusätzlich wurde mittels eines Modellsystems der direkte Einfluss von CTCF auf Chromatin untersucht. So konnte demonstriert werden, dass CTCF die Dekondensierung eines heterochromatischen DNA-Arrays vermittelt, was mit Euchromatinisierung und Rekrutierung des Faktors WDR5 assoziiert ist. WDR5 scheint ein Brückenfaktor für mehrere Enzymkomplexe zu sein, die die Einführung von euchromatischen Histonmodifikationen katalysieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass CTCF tatsächlich in der Lage ist, die Umwandlung von fakultativem Heterochromatin in Euchromatin zu dirigieren, was einem generellen Kennzeichen der Barriereaktivität entspricht.

1.2 Abstract

Regulation of gene expression is very important for proper differentiation and development of higher organisms. At the same time a cell-specific gene expression is crucial for specification of different tissues and organs and thereby for the formation of a multicellular organism. Thus, gene expression in eukaryotic cells is tightly regulated. Insulator elements divide the genome into functional domains by shielding genes from inappropriate enhancer action or by blocking the spread of heterochromatin into transcriptionally active domains. The factor CTCF plays an important role in regulating gene expression. Furthermore, in vertebrates it is the only factor known to execute enhancer blocking activity of insulator elements. However, the mechanism behind this function is still unknown. Moreover, a general participation of CTCF in the barrier activity of insulator elements is controversially discussed.

Therefore, this thesis was aimed at elucidating the function of CTCF in insulation. Following identification of potential CTCF barrier elements, these were analyzed regarding their functionality. CTCF binds at the boundary of at least two gene loci in HeLa cells and downregulation of its expression is associated with downregulation of the analyzed genes. Additionally, a model system was used to determine the direct influence of CTCF on chromatin. Utilizing this, it was shown that CTCF is mediating the decondensation of a heterochromatic DNA array. This decondensation is accompanied with establishment of euchromatin and recruitment of the factor WDR5. This protein has been reported to interact with different enzymatic protein complexes involved in the introduction of euchromatic histone modifications. The results of this thesis suggest that CTCF is indeed capable of directing the conversion from facultative heterochromatin to euchromatin, corresponding with a general feature of barrier activity.

2 Einleitung

Alle eukaryotischen Lebewesen haben in ihren Zellen das Problem zu lösen, trotz der enormen Größe ihres Genoms dieses in dem nur mehrere μm großen Zellkern unterbringen zu müssen. So liegt die Größe des humanen, diploiden Genoms bei sechs Mrd. Basenpaaren, die Gesamtlänge beträgt 1,8m. Dennoch können Genome ausreichend verpackt werden und es findet noch regulierbare Genexpression statt.

Der Zellkern ist ein hochgradig strukturiertes, aber auch dynamisches Zellorganell, in dem die Lokalisation von Genen auch die Expression dieser beeinflusst. So spricht man beispielsweise von so genannten Chromosomen-Territorien, i.e. definierte Bereiche, in denen die einzelnen Chromosomen vorliegen (Cremer et al., 2006). Dabei korreliert die Lokalisation der DNA mit der Aktivität: aktive Gene befinden sich eher im Inneren des Zellkerns, während inaktive Gene in der Peripherie lokalisiert sind.

Strukturegebende Komponenten sind die so genannte Kernmatrix (*nuclear matrix*) oder auch Kernskelett, eine hoch dynamische Struktur, deren Fasern den gesamten Kern durchziehen, sowie die Kernlamina (*nuclear lamina*), eine netzartige Struktur direkt an der inneren Kernmembran, die hauptsächlich aus so genannten Laminen besteht. Chromosomen-Domänen können mit der Kernlamina oder der Kernmatrix interagieren. Diese DNA-Domänen werden als MARs (*matrix attached regions*) oder LADs (*lamin-associated domains*) bezeichnet. MARs sind generell AT-reiche Regionen, die die Basis von Chromatinschleifen bilden und somit die Ausbildung von Chromatindomänen definieren (Gasser and Laemmli, 1986). Die Ausbildung der LADs wird über die Bindung an Lamin B vermittelt und ist mit Genrepression assoziiert (Guelen et al., 2008). Ein weiteres, strukturelles Kompartiment stellen die Kernporen dar. Sie dienen einerseits dem Austausch von Molekülen zwischen Kern und Cytoplasma und stellen damit eine Plattform für Transkriptionsfaktoren dar. Sie dienen jedoch andererseits ebenfalls als Basis zur Ausbildung von Chromatinschleifen (Kohler and Hurt, 2010).

Zusätzlich gibt es weitere dynamische Kernkompartimente mit spezifischen Funktionen wie beispielsweise die Nukleoli, die der Herstellung der ribosomalen RNA (rRNA) dienen, oder auch die so genannten „Transkriptionsfabriken“ (*transcription factories*), in denen aktiv

transkribierte Gene zusammenkommen, selbst wenn diese auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (Osborne et al., 2004).

Aber wie genau sind Verpackung des Genoms und Regulation der Genexpression eukaryotischer Zellen vereinbar?

2.1 Chromatin

Die Verpackung der DNA eukaryotischer Zellen zu Chromatin geschieht hauptsächlich mittels Bindung durch spezifische Proteine, den so genannten Histonen. Dies sind kleine, basische Proteine, bestehend aus einer globulären Domäne sowie eines N-terminalen „Schwanzes“, die sich zu einem Oktamer zusammenlagern, um das die DNA herumgewunden wird (pro Nukleosom 146bp, Abb. 2.1). Ein Nukleosom besteht aus jeweils zwei der vier Kern-Histone H2A und H2B sowie H3 und H4 (Luger et al., 1997). Zwischen den einzelnen Nukleosomen befindet sich der Bereich der so genannten Linker-DNA, ein Abschnitt von durchschnittlich 50bp Länge. An der Eintrittsstelle des DNA-Stranges am Nukleosom befindet sich das Linker-Histon H1.

Die Abfolge von um Nukleosom gewundene DNA hat etwa einen Durchmesser von 10nm (Verpackungsgrad: 5-10fach). Diese auch „Perlschnur“ genannte Struktur wird nun weiter aufgewickelt zur 30nm-Faser (Verpackungsgrad: ~50fach), die ebenfalls noch weiter eingewunden wird. Es bilden sich so genannte Chromatinschleifen, aus denen sich die Windungen einer einzelnen Chromatide zusammensetzen (Abb. 2.1). Für die Zellteilung wird das Chromatin noch weiter kondensiert – es entstehen die typischen Chromosomen-Strukturen (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Das Besondere an Histonen ist, dass v.a. der N-terminale Bereich der Kern-Histone kovalent modifiziert werden kann. Je nach Art der Modifikation wird die gebundene DNA stärker oder weniger verpackt. Da diese Modifikationen auch die Bindung weiterer Faktoren an die DNA beeinflusst, die diese „lesen“ können, wird dies als Histon-Code bezeichnet (Jenuwein and Allis, 2001). Aufgrund des Verpackungsgrades während der Interphase der Zellteilung können zwei Arten von Chromatin unterschieden werden.

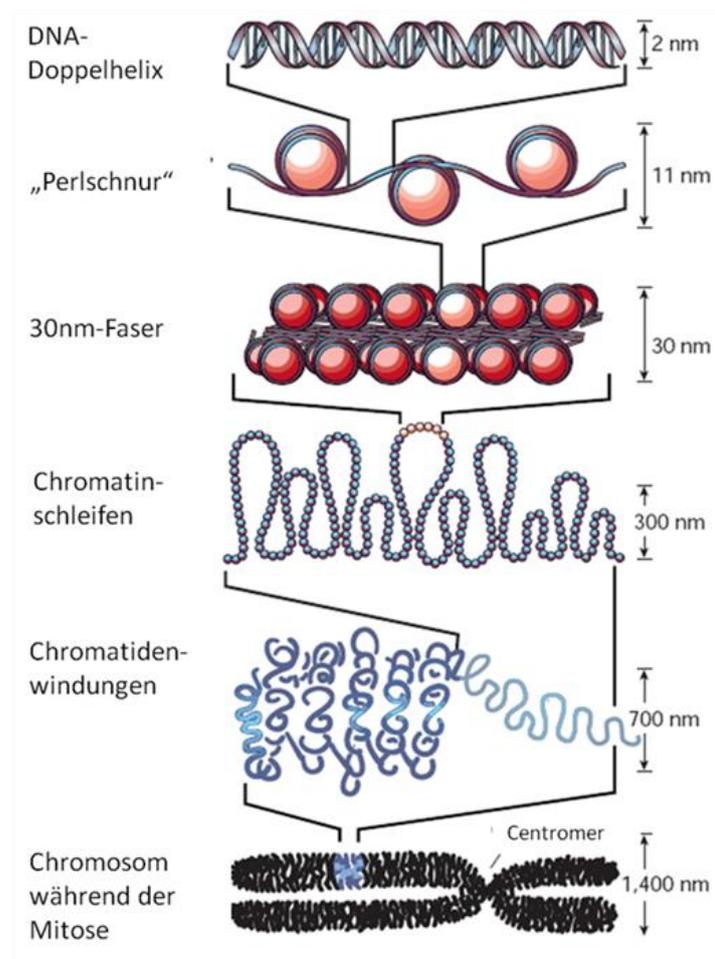


Abb.2.1: Die Verpackung der genomischen DNA

Adaptiert nach Felsenfeld & Groudine, 2003

Dicht verpacktes Chromatin, das Heterochromatin, wird während der Interphase nicht dekondensiert. Es ist gekennzeichnet durch eine stärkere Anfärbbarkeit in Interphase als auch in der Mitose und eine späte Replikation in der S-Phase der Zellteilung. Heterochromatin liegt v.a. in der Peripherie der Kerns vor. Es wird zusätzlich unterschieden zwischen konstitutivem Heterochromatin (in Bereichen der Telomere und des Centromers sowie in hochrepetitiven Sequenzen wie Satelliten-DNA) und fakultativem Heterochromatin (des inaktivierten X-Chromosoms oder von stillgelegten Genen).

Weniger dicht gepacktes Chromatin ist das so genannte Euchromatin, in dessen Bereich sich die aktiven Gene befinden. Euchromatin ist weniger kompakt als Heterochromatin, lässt sich daher nicht so gut anfärben und ist früh replizierend.

Der Verpackungsgrad des Chromatins bedingt naturgemäß auch die Zugänglichkeit von Faktoren an die DNA. Damit ist die Regulierung des Verpackungsgrades der DNA auch immer mit Genregulation verbunden.

2.2 Genregulation

Die Regulation der Genaktivität ist wichtig für die Differenzierung und Entwicklung von Zellen höherer Organismen. Nur eine zellspezifische Genexpression kann zu der Ausbildung von unterschiedlichen Geweben und Organen und somit zu der Ausprägung eines vielzelligen Organismus führen.

Die Expression von Genen in eukaryotischen Zellen ist deshalb genauestens reguliert und kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Im Folgenden ist die Regulation am Beispiel von Protein-kodierenden Genen auf Ebene der Transkription und des Chromatinstatus dargestellt.

Genregulation auf Ebene der Transkription

Genregulation findet auf Ebene der Initiation der Transkription statt. Hier wird Häufigkeit und Effizienz der Transkription reguliert. Dies wird bestimmt durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren (generellen und speziellen) und nachfolgender Rekrutierung der RNA-Polymerase II im Bereich von Promotor und Enhancer der Gene. Zusätzlich spielt der Chromatinstatus eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren.

Chromatin

Dieser wird reguliert durch die Einführung von kovalenten Modifikationen v.a. an den freien Resten bestimmter Aminosäuren in den N-terminalen Domänen der Histone durch spezifische Histon-modifizierende Enzyme. Dieser Histon-Code wird von stromabwärts wirkenden Faktoren gelesen und interpretiert. So ist generell die Acetylierung (Anheftung einer Acetylgruppe) von Lysinresten (z.B. H3K9, H4K8 und H4K16) sowie die Di- und Trimethylierung (Anheftung von Methylgruppen) anderer Lysinreste (H3K4, H3K36) ein Zeichen für aktives Chromatin (Abb. 2.2), da durch die Anheftung der Modifikationen die positive Ladung der Lysin-Seitenkette beseitigt und dadurch die Affinität der Histone zur DNA verringert werden kann. Diese wird zugänglicher für die Bindung von Faktoren: Transkriptionsfaktoren und Aktivatoren werden rekrutiert und die Transkription initiiert.

Inaktives Chromatin ist gekennzeichnet durch Hypo-Acetylierung sowie Trimethylierung weiterer spezifischer Lysinreste (z.B. H3K9, H3K27 und H3K79) (Schneider and Grosschedl, 2007) oder Methylierung bestimmter Arginine (z. B. H3R2). Das „Lesen“ des Histon-Codes ermöglichen Erkennungsmotive innerhalb der bindenden Faktoren. Eine Chromodomäne

bindet beispielsweise an trimethyliertes H3K9, acetylierte Lysine werden durch Bromodomänen erkannt. Die Modifizierungsreaktionen werden katalysiert durch spezifische Enzyme wie Histon-Acetyltransferasen (HATs), Histon-Methyltransferasen (HMTs) oder Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs). Histon-Deacetylasen (HDACs) entfernen Acetylgruppen.

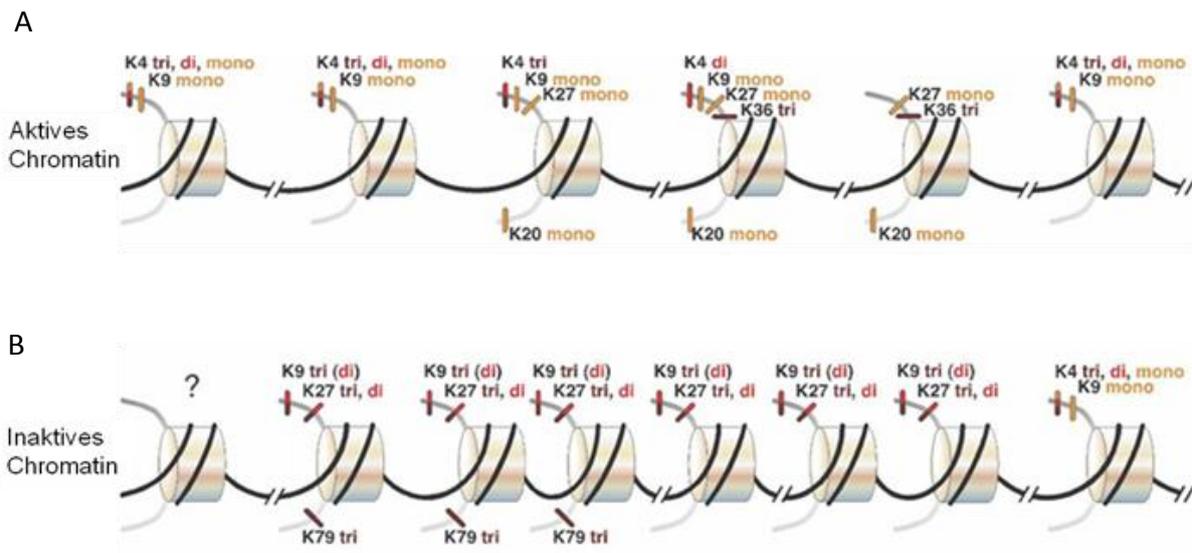


Abb. 2.2: In verschiedenen Arten von Chromatin liegen unterschiedliche Histonmodifikationen vor - Beispiel Lysin-Methylierung

Aktives Chromatin ist weniger kompakt als inaktives und ist durch andere Histon-Modifikationen gekennzeichnet. **A.** Aktives Chromatin ist gekennzeichnet durch di- und trimethyliertes Lysin K4 und trimethyliertes K36 von Histon H3 sowie Monomethylierung von K9 und K27 von H3 und K20 von Histon H4. **B.** Inaktives Chromatin ist gekennzeichnet durch di- und trimethylierte Lysine K9 und K27 sowie trimethyliertes Lysin K79 von Histon H3. Adaptiert nach Schneider and Grosschedl, 2007

Andere mögliche Modifikationen sind die Phosphorylierung, i.e. die Anheftung einer Phosphatgruppe an die Hydroxylgruppe von Serinresten wie beispielsweise S10 oder S28 des Histons H3. Mitotische Chromosomen sind mit dieser Markierung angereichert (Goto et al., 1999). Des Weiteren gibt es die Ubiquitynylierung, i.e. die Anheftung eines kleinen Peptids, des sogenannten Ubiquitins, z.B. in der globulären Domäne des Histones H2A (H2AK119ub). Diese Modifikation ist mit inaktivem Chromatin assoziiert. Die Deubiquitynylierung von H2AK119 ermöglicht die nachfolgende Di- und Trimethylierung von H3K4 und kann damit die Aktivierung der Genexpression kontrollieren (Nakagawa et al., 2008)

Auch die Einbindung von Histonvarianten in die Nucleosomen anstatt der kanonischen Histone hat einen Einfluss auf die Genexpression. So sind beispielsweise

Regulationselemente wie LCRs (*locus control region*) sowie Promotoren und Enhancer bevorzugt mit H3.3-tragenden Nukleosomen (einer Variante von Histon H3, die in vier AS abweicht) assoziiert (Jin and Felsenfeld, 2006). Auch die Histonvariante H2A.Z scheint bevorzugt an Promotoren von aktiven Genen vorzuliegen und ist in Hefe sogar mit Barrierefunktion assoziiert (Meneghini et al., 2003), die die Ausbreitung von Heterochromatin in transkriptionell aktive Bereiche verhindert. In *Drosophila melanogaster* ist H2A.Z auch an der Stilllegung von Genen beteiligt (Swaminathan et al., 2005).

Auch die DNA selbst kann modifiziert werden, was einen Einfluss auf die Transkription hat. So können die Cytosine von CpG-Inseln im Promotor-Bereich von Genen methyliert vorliegen, was zu einer Stilllegung dieser Gene führt, da die Bindung von Transkriptionsfaktoren durch die Methylierung verhindert wird. Heterochromatin ist daher durch einen hohen Anteil an methylierter DNA gekennzeichnet.

Bei dieser Art der genetischen Information, enthalten in dem Modifikationsstatus des Chromatins, spricht man von Epigenetik, da die Information nicht in der DNA-Sequenz selbst liegt.

Isolation

Neben den bereits genannten Promotorelementen gibt es weitere *cis*-wirkende Elemente, die in die Kontrolle der Genregulation involviert sind. So sind Enhancer ebenfalls DNA-Elemente der Genregulation, die die Genexpression positiv beeinflussen, indem sie die Aktivität von Promotoren steigern. Dies geschieht über die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, was zu einer Veränderung der Chromatinstruktur und des Aufbaus des Transkriptionskomplexes führt. Ein zusätzliches Kennzeichen ist, dass sie über lange Distanzen hinweg wirken können. Ihre Aktivität ist außerdem Zelltyp-spezifisch; dies zeigt sich darin, dass Chromatinmodifikationen im Enhancerbereich ebenfalls Zelltyp-spezifisch sind, während sie in Promotorbereichen in allen bisher analysierten Zelltypen kaum variieren (Heintzman et al., 2009).

Silencer, das Gegenstück zu den Enhancern, sind ebenso unabhängig von Distanz und Orientierung relativ zum Gen. Ihre Funktion wird ebenfalls über die Bindung von Faktoren ausgeführt. Diese wirken sich jedoch negativ auf die Expression aus.

Da Enhancer über lange Distanzen wirken können, müssen Gene, die im Einflussbereich eines Enhancers liegen, aber nicht von ihm reguliert werden sollen, abgeschirmt werden. Dazu dienen Isolatorelemente, die das Genom so in funktionelle Abschnitte gliedern. Die Enhancerblockade geschieht mittels eines direktionalen Mechanismus, da sie nur erfolgt, wenn das Isolatorelement zwischen Promoter und entsprechendem Enhancer liegt (Abb. 2.3). In Vertebraten ist der einzige bis jetzt identifizierte Faktor, das Enhancer-blockierende Isolatorelemente bindet, das Protein CTCF (Bell et al., 1999).

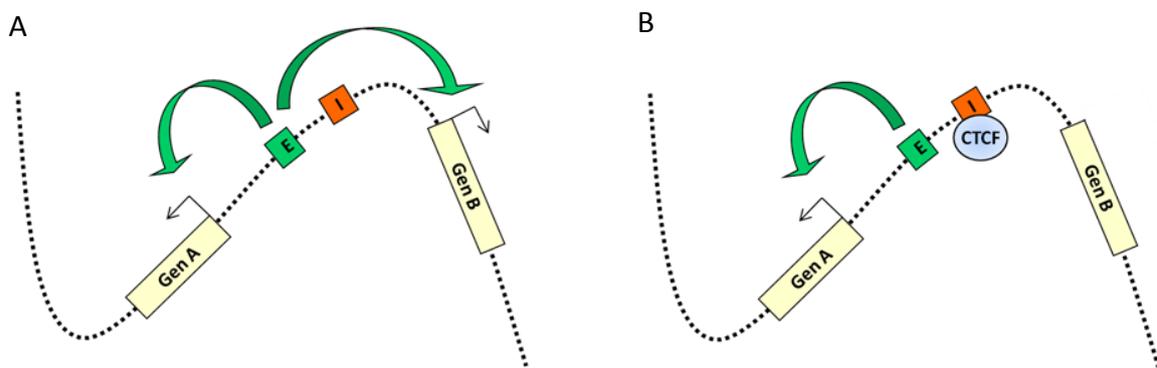


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der durch CTCF vermittelten Enhancerblockade

A. Der Enhancer E wirkt bidirektional auf den Promotor sowohl von Gen A (gewollt) als auch von Gen B (ungewollt). **B.** Bindet CTCF das zwischen Enhancer E und Gen B liegende Isolatorelement I, kann der Enhancer den Promotor von Gen B nicht mehr beeinflussen, das Gen wird nicht exprimiert. Die Expression von Gen A wird dabei nicht beeinträchtigt.

Die zweite Funktion, die Isolatoren ausführen, ist die so genannte Barriere-Funktion. Diese ist nötig, um die Ausbreitung von Heterochromatin in transkriptionell aktive Bereiche zu unterbinden, was zu einer ungewollten Stilllegung von Genen führen könnte. Ein Beispiel für die ungewollte Ausbreitung von Heterochromatin ist der Positionseffekt (*position effect variegation*). Dabei ist zu beobachten, dass ein Genabschnitt, der durch Translokation oder Transfektion angrenzend an einen heterochromatischen Bereich ins Genom integriert, inaktiviert wird (Henikoff, 1992). Die Ausbreitung von Heterochromatin gleicht einem *perpetuum mobile*. Über seine Chromodomäne kann HP1 (**H**eterochromatin **P**rotein 1) an methyliertes H3K9me3 binden. HP1 rekrutiert die HMT SUV39H1, die im benachbarten Nukleosom H3K9 methyliert. Dies führt wiederum zur Rekrutierung von HP1 (Bannister et al., 2001) (Abb. 2.4). Nach einem gängigen Modell (Gaszner and Felsenfeld, 2006) wird die Barriere durch aktives Einführen von euchromatischen Histonmodifikationen

aufrechterhalten, um das *perpetuum mobile* zu unterbrechen (Abb. 2.4). Ob CTCF auch an dieser Isolatorfunktion beteiligt wird, wird derzeit noch diskutiert.

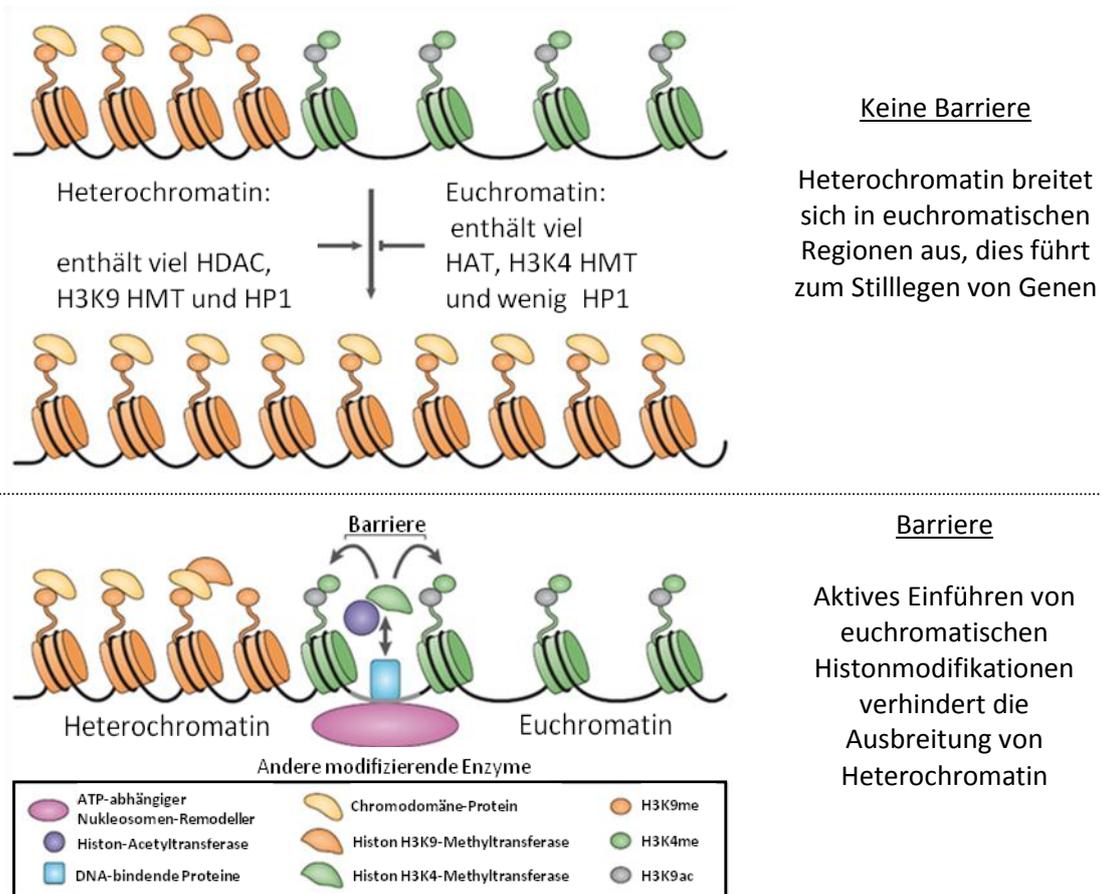


Abb. 2.4 Modell der Barrierefunktion von Isolatoren
 Adaptiert nach Gazner & Felsenfeld, 2006

2.3 Der Faktor CTCF

Der *CCCTC Binding Factor* CTCF, 1990 entdeckt als Transkriptionsfaktor des *c-myc*-Gens (Lobanenkov et al., 1990) und des *Lysozym*-Gens in Hühnern (Banahmad et al., 1990), zeichnet sich durch seine vielfältigen Funktionen in der Genregulation aus. Das Kernprotein ist vom Menschen bis zur Fruchtfliege in allen untersuchten mehrzelligen Organismen hoch konserviert (Burke et al., 2002; Filippova et al., 1996; Hore et al., 2008; Klenova et al., 1993; Moon et al., 2005; Pugacheva et al., 2006) und wird mit Ausnahme von Ganglien und amakrinen Zellen in der Säugetierretina (Canto-Soler et al., 2008) sowie primären Spermatozyten (Loukinov et al., 2002) ubiquitär exprimiert.

Die Konservierung beträgt beispielsweise zwischen Huhn und Mensch 93% im gesamten Protein und sogar 100% in der Zinkfinger-Domäne (Filippova et al., 1996).

CTCF zeigt eine Zellzyklus-abhängige Verteilung im Zellkern. So befindet sich CTCF während der Interphase im gesamten Zellkern, nicht aber im Nukleolus. Während der Mitose ist CTCF an den kondensierten Chromosomen lokalisiert; in der Telophase findet man CTCF in den neugebildeten Zellkernen sowie im *Midbody* wieder (Zhang et al., 2004). Eine nukleoläre Lokalisation von CTCF kann jedoch durch PARYlierung des Proteins herbeigeführt werden (Torrano et al., 2006).

Die biologische Funktionen von CTCF

Die biologische Funktion von CTCF ist sehr vielfältig. Das Protein ist beispielsweise in die X-Chromosom-Inaktivierung involviert. Die Kontrolle der Inaktivierung erfolgt über das *choice/imprinting*-Center, in dem sich CTCF-Zielsequenzen befinden (Chao et al., 2002). *XIST* (*X-inactivation-specific transcript*), eine nicht-kodierende RNA, induziert die Inaktivierung, indem sie das gesamte zu inaktivierende X-Chromosom überzieht und damit isoliert. Zusätzlich konnten gebündelte Bindungsstellen sowohl von CTCF als auch von YY1 (*Ying Yang 1*), einem multifunktionalen ZF-Protein, im Enhancerbereich von *Tsix* identifiziert werden. YY1 interagiert direkt mit CTCF. Beide Faktoren kooperieren außerdem in der Transaktivierung des *Tsix*-Genes in ES-Zellen (Donohoe et al., 2007). Wird *Tsix* transkribiert, verhindert dies die Initiation der *XIST*-Transkription und somit die Inaktivierung des aktiven X-Chromosoms. Es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass CTCF bei der Paarung der beiden X-Chromosomen eine Rolle spielt (Xu et al., 2007). Eine Interaktion von CTCF mit Oct4 konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Oct4 ist ein essentieller Faktor für die Paarung und das *Counting* der beiden X-Chromosomen (Donohoe et al., 2009).

CTCF spielt ebenfalls in der epigenetischen Regulation eine wichtige Rolle (Bell and Felsenfeld, 2000). Für den *Igf2* (Insulin-like growth factor 2)/*H19*-Genocus konnte die Rolle von CTCF in der genetische Prägung (*Imprinting*) ausführlich beschrieben werden. Unter genetischer Prägung versteht man das unterschiedliche Expressionsverhalten maternal und paternal vererbter Allele basierend auf dem spezifischen Methylierungsmuster des Keimzellgenoms.

In dem Genlocus *Igf2/H19* ist die *Imprinting*-Kontrollregion (ICR) 2kb stromaufwärts vom *H19*-Gen lokalisiert. Die ICR liegt allel-abhängig methyliert oder unmetyliert vor (DMR -

differentially methylated region). Dort befinden sich sieben Bindestellen für CTCF. Das *Igf2*-Gen befindet sich weitere 90kb stromaufwärts von der ICR. Auch im 5'-Bereich des *Igf2*-Gens befindet sich eine DMR (DMR1). Der für beide Gene verantwortliche Enhancer liegt stromabwärts vom *H19*-Gen.

Auf dem maternalen Allel liegt die ICR unmethyliert vor, sodass CTCF binden kann (Bell and Felsenfeld, 2000). Dadurch wird der Enhancer blockiert und kann nicht auf den *Igf2*-Promotor wirken. Die Expression von *Igf2* wird dadurch nicht aktiviert, *H19* wird jedoch exprimiert. Auf dem paternalen Allel liegt die ICR methyliert vor (Kanduri et al., 2000), was dazu führt, dass CTCF nicht binden kann. Das *Igf2*-Gen wird exprimiert, da der Enhancer nun auf seinen Promotor wirken kann. Das *H19*-Gen dagegen wird nicht exprimiert.

Wie wichtig CTCF ist, zeigt sich daran, dass beispielsweise zur Entwicklung des Beckwith-Wiedemann-Syndroms mit assoziiertem Wilms'-Tumor eine 2,2kb große Mikrodeletion in der ICR des *Igf2/H19*-Locus beiträgt (Prawitt et al., 2005). Diese Deletion verursacht das Fehlen von drei CTS, was zu einer aberranten, biallelen Expression des *Igf2*-Gens führt. CTCF fungiert daher möglicherweise ebenfalls als Tumorsuppressor-Gen. In verschiedenen Krebsarten konnten Mutationen der DNA-Bindedomäne von CTCF festgestellt werden, die die Bindung von CTCF an seine Bindestellen verhindern (Filippova et al., 2002). Außerdem befindet sich der Genlocus für CTCF auf dem langen Arm des Chromosoms 16 im Bereich der Bande 22.1, einer Region, die häufig bei der Entwicklung von Krebs deletiert ist (Filippova et al., 1998). Bindestellen für CTCF konnten ebenfalls in einem Bereich stromabwärts der minimalen Promoterregion des *hTERT*-Gens (kodiert für die katalytische Untereinheit des Telomerase-Komplexes) identifiziert werden. Die Bindung von CTCF ist in normalen Zellen assoziiert mit der Repression des Gens. In Telomerase-positiven Zellen ist dagegen keine Bindung von CTCF an diese CTS zu detektieren (Renaud et al., 2005).

Neben dieser Funktion in der Tumorsuppression ist CTCF ebenfalls wichtig für die Verhinderung von Krankheiten, die durch die Expansion von Trinukleotid-Wiederholungen in den nicht-kodierenden Bereichen bestimmter Gene verursacht werden. Bei der Spinocerebelläre Ataxie 7 (SCA7) kommt es beispielsweise zu einer Expansion der Folge CAG. Für diese wiederholte CAG-Abfolge konnte gezeigt werden, dass sie von CTS flankiert wird. Die Mutation der CTCF-Bindestelle im 3'-Bereich verstärkt die genetische Instabilität des SCA7-Locus (Libby et al., 2008). CTCF stabilisiert demnach die Anzahl der Trinukleotid-Wiederholungen. Dieser Mechanismus wird auch für den DM1-Locus postuliert. Dort führt

die Expansion der CTG-Wiederholungen in der 3'Region des *DMPK*-Genes zur Ausbildung der Myotonischen Dystrophie, einer adulten Form der Muskelschwäche (Filippova et al., 2001).

Der paraloge Faktor BORIS

2002 konnte das Protein BORIS (*Brother of Regulator of Imprinted Sites*) oder CTCFL (CTCF-like) als paraloger Faktor von CTCF in Mäusen und Mensch identifiziert werden, der ausschließlich in Testis-Gewebe und verschiedenen Krebsarten exprimiert wird (Loukinov et al., 2002; Vatolin et al., 2005). BORIS wird daher auch zu der Gruppe der *cancer-testis*-Gene gezählt. BORIS-Expression ist konserviert in Amnioten, wobei die Expression in Monotremata und Reptilien nicht nur auf Testes beschränkt ist (Hore et al., 2008).

In der ZF-Domäne ist die Sequenz von BORIS konserviert, die N- und C-terminalen Bereiche divergieren jedoch zwischen den beiden Faktoren (Loukinov et al., 2002). Die Funktion in der Zelle ist noch nicht bekannt. Es gibt Hinweise auf eine aktivierende Funktion (Nguyen et al., 2008a; Sun et al., 2008).

Es wird diskutiert, ob BORIS als dominant-negative Variante von CTCF fungiert oder die Funktionen von CTCF ersetzen kann, da BORIS durch die konservierte DNA-Bindedomäne an CTS binden kann (Hong et al., 2005). Außerdem bindet BORIS im Gegensatz zu CTCF an methylierte DNA-Sequenzen. Dies konnte für das paternale (methylierte) DMR-Element im *Igf2/H19*-Locus gezeigt werden (Nguyen et al., 2008b). Interessanterweise befindet sich das *BORIS*-Gen im Gegensatz zu CTCF in einem Locus auf Chromosom 20q13, der in vielen Tumoren amplifiziert ist (Klenova et al., 2002). Aufgrund der Unterschiede in den Domänen scheinen die beiden Faktoren aber unterschiedliche Funktionen auszuüben.

Aufbau und Funktionen von CTCF

Das Protein besteht aus 728 Aminosäuren (AS) in *Gallus gallus* (*chicken* CTCF, chCTCF; vgl. 727 AS des humanen CTCF) und besitzt ein Molekulargewicht von 82kDa, welches bei elektrophoretischer Auftrennung allerdings in der Höhe eines Molekulargewichts von 130kDa nachzuweisen ist (Klenova et al., 1997). Strukturell wird das Protein in verschiedene Bereiche unterteilt: es besitzt eine N-terminale Domäne, eine zentralen DNA-Bindedomäne und C-terminale Domäne. Den verschiedenen Domänen sind ebenfalls unterschiedlichen Funktionen zuzuordnen (Abb. 2.5).

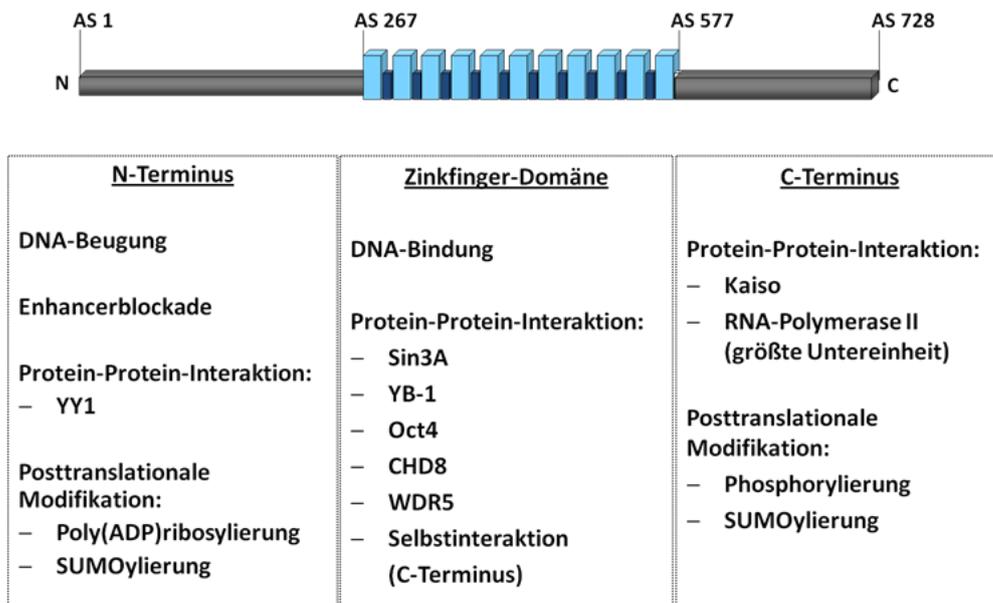


Abb. 2.5 Schematische Darstellung von CTCF

Dargestellt sind die drei strukturellen Domänen des Proteins sowie diesen zugeordnete Funktionen. Diese werden des Weiteren im nebenstehenden Text erläutert. Die hellblauen Rechtecke repräsentieren die elf einzelnen Zinkfinger der DNA-Bindedomäne.

Die DNA-Bindedomäne besteht aus insgesamt elf Zinkfinger-Motiven. Zinkfinger-Motive kennzeichnen in der Regel DNA-bindende Faktoren. Durch die Zink-Bindung der AS-Seitenketten liegt eine kompakte Finger-förmige Struktur mit einer α -Helix zur Erkennung der DNA vor. Die DNA-Bindung findet in der großen Furche der DNA statt.

Das Besondere an der DNA-Bindung von CTCF ist, dass das Protein an unterschiedliche Bindungsstellen (*CTS*, *CTCF target site*) mit verschiedenen Kombinationen der einzelnen Zinkfinger bindet (Filippova et al., 1996). Daraus ergibt sich eine sehr hohe Anzahl an Variationsmöglichkeiten. Durch Analyse genomweiter Bindungsdaten von CTCF konnte eine sehr hohe Anzahl an CTS sowohl im humanen als auch im murinen Genom nachgewiesen werden. Die Angaben schwanken für das humane Genom zwischen 14.000 (Kim et al., 2007) und mehr als 20.000 Bindestellen (Barski et al., 2007) in unterschiedlichen Zelltypen. Anhand dieser Daten war es auch möglich, eine Konsensus-Sequenz zu definieren (Jothi et al., 2008; Kim et al., 2007)

Daneben gibt es aber auch Bindestellen, die keine Ähnlichkeit mit dem Konsensus haben. Die ungewöhnliche Größe der Bindungsstellen umfasst ungefähr 50 Basenpaare (Ohlsson et al., 2001). Die genomweite Analyse zeigte außerdem, dass die identifizierten CTS in verschiedenen Zelltypen zum Großteil konserviert sind, da die Bindungsmuster überlappen

(Cuddapah et al., 2009). Die Funktion der CTSs scheint jedoch Zelltyp-spezifisch zu sein, da das umgebende Chromatin in unterschiedlichen Zelltypen variiert (Cuddapah et al., 2009).

CTCF bindet DNA als Monomer, ist aber auch in der Lage, Dimere (Pant et al., 2004) sowie Trimere (Yusufzai et al., 2004) zu bilden. Beteiligt an der Dimerisierung sind die Zinkfinger-Domäne des einen sowie der C-Terminus des anderen CTCF-Moleküls. Neben der DNA-Bindung finden über die Zinkfinger-Domäne auch eine Reihe weiterer Protein-Protein-Interaktionen statt (Abb. 2.5). Durch die Bindung von CTCF an die DNA wird diese gebogen. Verantwortlich dafür ist ein Bereich in der N-terminalen Domäne des Proteins (Arnold et al., 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CTSs von positionierten Nukleosomen umgeben sind und damit CTCF auch eine Funktion im Chromatin-Remodelling zukommt (Fu et al., 2008).

CTCF und Genregulation

Die Rolle von CTCF in der Genregulation ist vielfältig und seinen verschiedenen Funktionen in der Zelle können unterschiedliche Kofaktoren zugeordnet werden. So wurde CTCF zuerst als negativer Regulator der Transkription identifiziert. Die Repressionsfunktion von CTCF wird beispielsweise von Korepressoren wie SIN3A oder YB-1 (Y-Box-Bindeprotein 1) unterstützt. Beide Faktoren interagieren mit CTCF über dessen ZF-Domäne. Sin3A interagiert mit CTCF *in vitro* (Lutz et al., 2000). Es wird angenommen, dass CTCF seine Funktion in der Genrepression über Rekrutierung von Sin3A ausübt, das nachfolgend Histon-Deacetylasen rekrutiert. YB-1 kooperiert mit CTCF in der Regulation des *c-myc*-Gens (Chernukhin et al., 2000).

Neben seiner Rolle in der Repression der Transkription, konnte CTCF auch eine Rolle in deren Aktivierung nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass CTCF die Transkription des β -Amyloid-Precursor-Protein (APP) positiv beeinflusst (Vostrov and Quitschke, 1997). Verantwortlich dafür ist ein Bereich in der N-terminalen Domäne von CTCF (Vostrov et al., 2002).

Posttranslationale Modifikationen von CTCF

Die Aktivität von CTCF kann zusätzlich durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden, beispielsweise durch Phosphorylierung. Die Proteinkinase CK2 erkennt und modifiziert spezifisch vier Serin-Reste eines in Vertebraten hochkonservierten Motivs

(SKKEDSSDS) im C-Terminus (Klenova et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass diese Modifikation die reprimierende Aktivität von CTCF in eine aktivierende Funktion ändert. Essentiell dafür ist das Serin 612 (El-Kady and Klenova, 2005).

Des Weiteren wird der N-terminale Bereich von CTCF durch das Enzym PARP-1 (Poly[ADP-ribose]-Polymerase) poly(ADP-ribosyl)iert. Bei der so genannten Poly(ADP)ribosylierung (PARylierung) werden unter Verbrauch von NAD⁺ ADP-Ribose-Polymere unterschiedlicher Länge an Proteine angeheftet. Diese Modifikation ist mit der Isolator-Funktion von CTCF assoziiert (Farrar et al., 2010; Witcher and Emerson, 2009; Yu et al., 2004) und verändert sein Molekulargewicht (180kDa nach elektrophoretischer Auftrennung). Als Zielstelle für die PARylierung wurden acht Glutamine im Bereich der AS 210 bis 250 von CTCF identifiziert (Farrar et al., 2010). Eine direkte Interaktion der beiden Faktoren konnte ebenfalls gezeigt werden. Die PARylierung verändert außerdem die Lokalisierung von CTCF in der Zelle; es ist nun ebenfalls in den Nukleoli zu detektieren. Dies kann außerdem einer weiteren Funktion von CTCF zugeordnet werden: CTCF inhibiert die Transkription der rRNA abhängig von seiner PARylierung (Torrano et al., 2006). Die nukleoläre Lokalisation von CTCF ist in verschiedenen Zelltypen assoziiert mit der Inhibierung des Zellwachstums. CTCF fungiert demnach PARylierungs-abhängig als Suppressor der Zellproliferation. Expressionsanalysen mit einer dominant-negativen Form von CTCF, die nicht mehr PARyliert werden kann, unterstützen diesen Befund. Die Funktion von CTCF in der Suppression des Zellwachstums ist gestört (Farrar et al., 2010). Für verschiedene Zelltypen konnte zudem gezeigt werden, dass die Überexpression von CTCF zu einer deutlichen Inhibierung des Zellwachstums führt. Überexpression von CTCF führt ebenfalls zu einer Lokalisierung von CTCF im Nukleolus (eigene Beobachtung). Die Wachstumshemmung der Zellen geschieht über eine Blockade im Zellzyklus (S-Phase sowie Zellteilung) (Rasko et al., 2001). CTCF scheint daher eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus zu besitzen.

Eine weitere posttranslationale Modifikation von CTCF ist die SUMOylierung. SUMO steht für *small ubiquitin like modifier*. Ähnlich der Ubiquitinylierung wird auch hier ein kleines Peptid kovalent angeheftet, das die Funktion des modifizierten Faktors beeinflusst. CTCF kann sowohl im N- als auch im C-Terminus (Lysin 74 im Motiv MKTE und Lysin 698 im Motiv VKKE) durch SUMO 1, 2 und 3 *in vitro* modifiziert werden. Diese beiden Motive sind evolutionär

konserviert. Funktionell unterstützt diese Modifikation die reprimierende Funktion von CTCF in der *c-myc*-Expression (MacPherson et al., 2009).

Auch eine Acetylierung von CTCF wird postuliert, da die Histon-Acetyltransferase P/CAF CTCF zumindest *in vitro* effizient acetylieren kann (J. Leers, persönliche Kommunikation). Einer Funktion von CTCF konnte dies aber noch nicht zugeordnet werden.

CTCF und Isolation - Enhancerblockade

Für die schon beschriebene Funktion von CTCF in der Enhancerblockade (Bell et al., 1999), konnten bereits ebenfalls Kofaktoren identifiziert werden. So spielen sowohl das Protein CHD8, ein Faktor mit Chromatin-Remodelling-Funktion (Ishihara et al., 2006), als auch der Cohesin-Komplex (essentiell für die Schwesterchromatiden-Kohäsion) eine Rolle in der CTCF-vermittelten Enhancerblockade. So konnte für murine und humane Zellen gezeigt werden, dass Cohesin oft dieselben Bindestellen wie CTCF besetzt und die Anwesenheit von Cohesin für die Enhancerblockade am *Igf2/H19*-Locus und am β -Globin-Locus notwendig ist (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Wendt et al., 2008)

Als die Region von CTCF, die der Vermittlung der Enhancerblockade-Funktion zugeordnet werden kann, gelten die AS 2-67 im N-terminalen Bereich (Bardenhagen, Diplomarbeit 2003). Selbst die AS 2-43 sind noch ausreichend für Vermittlung der Enhancerblockade. Für CHD8 jedoch konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit CTCF über dessen Zinkfinger-Domäne stattfindet (Ishihara et al., 2006); die Interaktionsdomäne von CTCF für Cohesin ist noch nicht bekannt.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der nukleoläre Faktor Nukleophosmin (ein molekulares Chaperon, das eine Rolle im Aufbau der Ribosomen hat) mit CTCF an endogenen Isolatorelementen kolokalisiert. Auch werden exogene Isolatorsequenzen (HS4 im 5'-Bereich des Hühner- β -Globin-Locus) durch CTCF zum Nukleolus rekrutiert (Yusufzai et al., 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das 5'-HS4-Isolatorelement ebenfalls CTCF-abhängig mit der nukleären Matrix assoziiert ist (Yusufzai and Felsenfeld, 2004). Dieser Befund führte zu einem Modell, dass CTCF durch Bildung von Chromatinschleifen und „Anheftung“ von Isolatorelementen an nukleäre Strukturen seine Funktion als Enhancerblocker ausübt (*looping model*).

Für den Genlocus *Igf2/H19* konnte in 3C (*chromosome conformation capture*)-Analysen gezeigt werden, dass CTCF eine Chromatinschleife zwischen der ICR und der DMR1 vermittelt, die zur Stilllegung der *Igf2*-Expression beitragen könnte (Kurukuti et al., 2006).

Außerdem konnte bisher nicht nur die Ausbildung von Chromatinschleifen innerhalb des Locus, sondern auch mit Genloci auf anderen Chromosomen nachgewiesen werden (4C-Assay). Die Chromatinschleifen werden v.a. an der unmethylierten, maternalen ICR von *H19* CTCF-abhängig vermittelt und sind notwendig für die Expression der beteiligten Gene (Ling et al., 2006). Für Cohesin konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es nur an die maternale ICR bindet (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Wendt et al., 2008). In transienten Reporterassays konnte zudem gezeigt werden, dass Cohesin ebenfalls für die Enhancerblockade am *Igf2/H19*-Locus verantwortlich ist (Wendt et al., 2008). Für Cohesin wird entsprechend postuliert, dass es zur Stabilisierung von Chromatinschleifen beiträgt. Dies konnte bereits für CTCF-Bindestellen im humanen INFG (Interferon- γ)-Locus (Hadjur et al., 2009) als auch für den humanen *Igf2/H19*-Locus nachgewiesen werden (Nativio et al., 2009).

Für den MHC II-Locus (*major histocompatibility complex class II*) wurde ebenfalls ein Enhancerblockade-Element beschrieben (XL9), das in der intergenischen Sequenz zwischen den Genen HLA-DRB1 und HLA-DQA1 lokalisiert ist. Dieses Element ist durch ein hohes Level an Acetylierung sowie Bindung von CTCF gekennzeichnet und assoziiert mit der Kernmatrix (Majumder et al., 2006). Die Herunterregulierung der CTCF-Expression verringert die Expression der beiden Gene. CTCF ist neben den Faktoren CIITA (*class II transactivator*) und RFX (*regulatory factor X*) notwendig für die Aktivierung der Transkription von HLA-DRB1 und HLA-DQA1, indem die drei Faktoren in der Ausbildung von Chromatinschleifen von XL9 und der Promotor-Regionen der beiden Gene kooperieren (Majumder et al., 2008).

Für humane Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass einige der so genannte LADs, die Lamin B1-abhängig an die Kernlamina gezogen werden und inaktive Chromatinregionen darstellen, von CTCF-Bindestellen flankiert werden. Es wird postuliert, dass das humane Genom durch Ausbildung der LADs in funktionell unterschiedlichen Domänen organisiert ist und dass CTCF als Isolator-bindendes Protein darin eine Rolle spielt (Guelen et al., 2008).

Zusätzlich konnte das humane, subtelomere *repeat* D4Z4 als ein CTCF- und Lamin A-abhängiger Isolator beschrieben werden (Ottaviani et al., 2009a). Dieses Element ist außerdem fähig, ein Telomer in der Kernperipherie zu positionieren. Auch dieser Mechanismus ist abhängig von CTCF und Lamin A (Ottaviani et al., 2009b).

Auch für die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II, der für die Transkription von Protein-kodierenden Genen und einiger ncRNAs (*noncoding* RNA) zuständigen RNA-Polymerase, konnte eine direkte Interaktion mit einer Subpopulation von CTCF in humanen Zellen nachgewiesen werden. Die Interaktion findet am C-Terminus von CTCF statt (Chernukhin et al., 2007). RNA-Polymerase II ist außerdem CTCF-abhängig an eine Reihe von CTSs rekrutiert. In Reporterassays konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein einer CTS vor einem Promotor-losen Reporter gen dessen Expression aktivieren kann. Die physische Interaktion von CTCF mit der RNA-Polymerase II unterstützt ein anderes Modell für die Enhancerblockade, nach dem die Transkriptionsmaschinerie durch einen physischen Block daran gehindert wird, vom Enhancer entlang des DNA-Stranges zum Promotor weiter zu wandern (*tracking model*). Dieses Modell wird auch durch Analysen des Hühner β -Globin-Enhancers 5'HS4 bestätigt. Dort konnte gezeigt werden, dass die CTCF-vermittelte Enhancerblockade von einer Hyper-Acetylierung der Region zwischen Enhancer und Gen begleitet wird, während die Rekrutierung von HATs an den Enhancer inhibiert wird. Daneben kommt es zu einer Akkumulation von RNA-Polymerase II am Enhancer sowie zwischen Enhancer und Isolatorelement, während die Menge des Enzymes am Promotor abnimmt (Zhao and Dean, 2004).

Regulation der CTCF-vermittelten Enhancerblockade-Funktion

Die durch CTCF vermittelte Enhancerblockade kann reguliert werden. Für das Hühner-Lysozym-Gen konnte gezeigt werden, dass sich dort unmittelbar neben der CTS eine Bindestelle für den Thyroidhormonrezeptor (TR) befindet (Lutz et al., 2003). In Hormon-freiem Medium ist die Anwesenheit des TRs notwendig für die Ausübung der Enhancerblockade. Die Zugabe von Thyroidhormon inhibiert die Enhancerblockade, selbst wenn CTCF noch an seiner Bindestelle vorliegt. Dieser Mechanismus konnte ebenfalls für das humane ESRR α -Gen nachgewiesen werden (Weth et al., 2010). Als negativer Regulator der CTCF-vermittelten Enhancerblockade am humanen β -Globin-Locus konnte der Faktor Kaiso identifiziert werden, ein Mitglied der POZ (Poxvirus und ZF)-Familie der ZF-Transkriptionsfaktoren. Kaiso interagiert über seine POZ-Domäne mit dem C-Terminus von CTCF (Defossez et al., 2005). Auch durch Methylierung von CTCF-Bindestellen kann die Enhancerblockade reguliert werden. CTCF-Bindungsstellen sind generell nicht methyliert (Mukhopadhyay et al., 2004). So kann die Enhancerblockade an den CTCF-Bindestellen des Genlocus *Igf2/H19* durch Methylierung verhindert werden (Hark et al., 2000).

CTCF und Isolation - Barriere

Die Rolle von CTCF in der Barrierefunktion von Isolatoren wird noch kontrovers diskutiert. So konnte einerseits für den 5'HS4-Isolator am β -Globin-Locus gezeigt werden, dass die Barrierefunktion dort unabhängig von CTCF ausgeführt wird (Recillas-Targa et al., 2002); diese Funktion konnte den Faktoren USF1 und 2 (*upstream factor 1/2*) zugeordnet werden (West et al., 2004). Andererseits wurde für den *p16 Ink4a/Arf*-Locus gezeigt, dass CTCF in p16-exprimierenden Zellen stromaufwärts des *p16*-Gens bindet, während Zellen, die keine p16-Expression aufweisen, diese CTCF-Bindung verloren haben. Gleichzeitig weist diese Genomstelle in den p16-negativen Zellen eine H3K9-Trimethylierung auf, die nicht in p16-exprimierenden Zellen vorhanden ist, wogegen eine Trimethylierung von H3K4 in p16-positiven Zellen an dieser Stelle den p16-negativen Zellen fehlt. Durch *Knockdown*-Analysen konnte bewiesen werden, dass tatsächlich CTCF für die Stilllegung des Gens kombiniert mit der Einführung eines inaktiven Chromatinstatus verantwortlich ist (Witcher and Emerson, 2009).

Aufgrund seiner hohen Konservierung, der hohen Anzahl an Bindestellen sowie seiner vielfältigen Funktionen in Organisation von Chromatin und in der Genregulation sowie des Zellwachstums ist CTCF ein essentieller Faktor von Zellen. Seine Funktionen sind abhängig von einer Vielzahl an Kofaktoren, posttranslationalen Modifikationen und dem Sequenzkontext, in dem das Protein an seinen Bindestellen vorliegt.

2.4 Ziel der Arbeit

Die Rolle von CTCF in der Enhancerblockade ist vielfach belegt. Der genaue Mechanismus ist aber immer noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt verschiedene Hinweise, die zu der Etablierung unterschiedlicher Modelle geführt haben. Eines ist diesen Modellen jedoch gemeinsam: CTCF organisiert Chromatin. Dagegen ist die Rolle von CTCF in der Barrierefunktion von Isolatorelemente noch nicht geklärt. Ein Merkmal auch dieser Isolatorfunktion ist, dass der verantwortliche Faktor die Struktur von Chromatin organisiert. Interessanterweise konnten sowohl im Genom von *Drosophila melanogaster* als auch im humanen Genom über CHIP-chip-Analysen CTCF-Bindestellen identifiziert werden, die an der Grenze von heterochromatisch und euchromatischen Bereichen lokalisiert sind (Bartkuhn et al., 2009; Cuddapah et al., 2009).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den direkten Einfluss von CTCF auf Chromatin zu untersuchen, um die Funktion von CTCF in der Isolatorfunktion besser zu verstehen. Dies wurde in zwei parallelen Ansätzen versucht.

Mittels eines *in silico*-Ansatzes sollten funktionelle CTCF-Barriereelemente identifiziert werden, die anschließend in HeLa-Zellen nach Herunterregulierung der CTCF-Expression auf ihre Funktionalität untersucht werden sollten, indem die Chromatin-Umgebung ausgewählter Genloci mittels Chromatin-Immunopräzipitation analysiert wurde.

Parallel dazu wurde der Effekt von CTCF auf Chromatin mittels des LacO-LacI-Modellsystem analysiert. Grundlage des Modellsystems sind U-2OS-Zelllinien, die eine Vielzahl an Lac-Operator (LacO)-Sequenzen aus dem Lac-Operon von *E.coli* in ihrem Genom integriert enthalten. Die Integrationsstelle konnte mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ermittelt werden. Sie befindet sich in F42B8-Zellen im Bereich eines der Centromere (Abb. 2.6). Welches Chromosom den Array trägt, ist nicht bekannt.

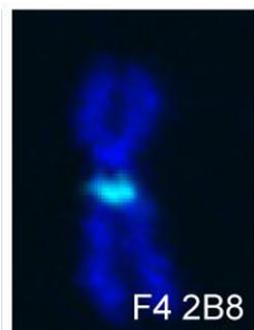


Abb. 2.6: Integrationsstelle des LacO-Arrays in U-2OS F42B8-Zellen

Metaphase-FISH mit einer Sonde gegen die LacO-Sequenz zeigt eine Lokalisation des LacO-Arrays im Bereich des Centromers eines Chromosomes (Jegou et al., 2009)

F6B2-Zellen tragen drei unterschiedlich große LacO-Arrays in den telomeren Regionen der Chromosomen 6, 11 und 12 integriert (Jegou et al., 2009).

Die direkte Visualisierung des LacO-Arrays erfolgt durch Bindung eines Fusionsproteins aus Lac-Repressor (Lac) und einem fluoreszierenden Protein (GFP oder mCherry; Abb. 2.7). Darüber hinaus ist die Herstellung eines Fusionsproteins aus Lac-Repressor und einem Faktor, dessen Einfluss auf Chromatin analysiert werden soll, möglich. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Fusionskonstrukt aus mCherry- oder GFP-Lac und CTCF hergestellt. Dieses

System erlaubt somit mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die direkte Untersuchung des Einflusses von CTCF auf Chromatin.

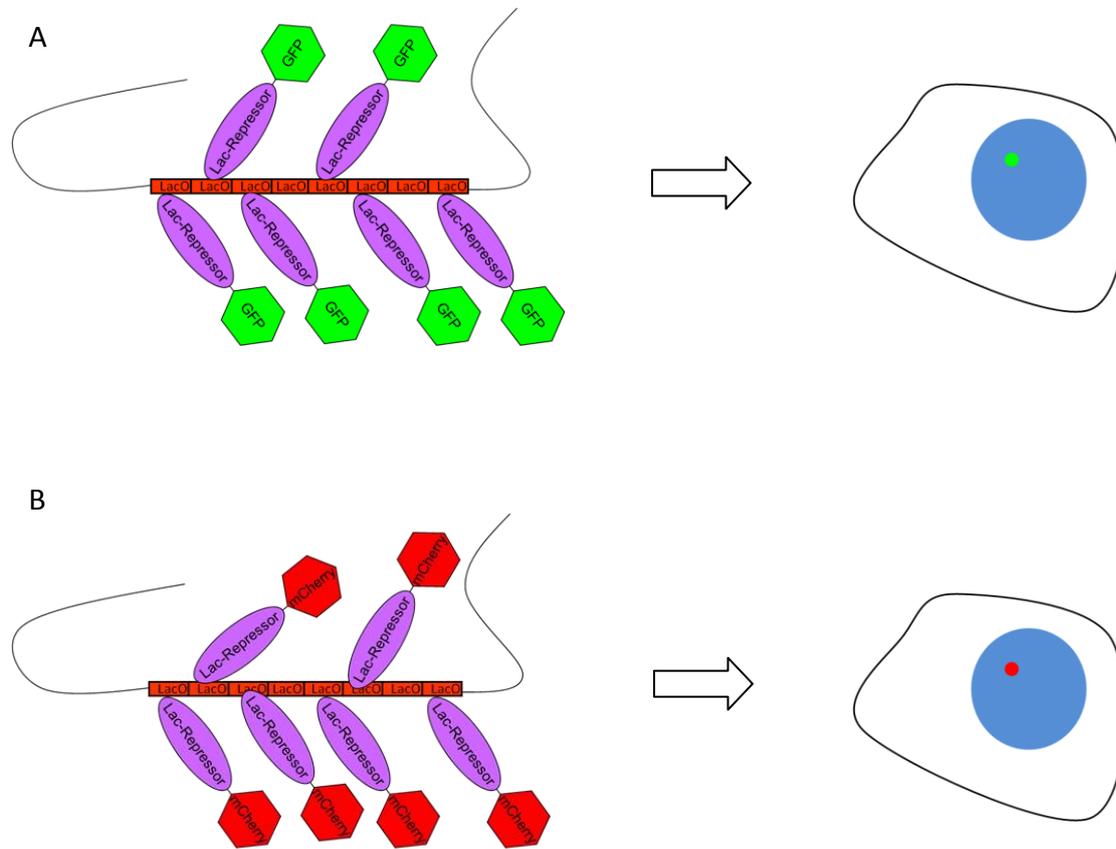


Abb. 2.7: Visualisierung des integrierten LacO-Arrays

Schematische Darstellung mehrerer LacO-Sequenzen mit gebundenem Lac-Repressor sowie Visualisierung des Arrays im Fluoreszenzmikroskop; **A.** Die Bindung als GFP-Fusionsprotein führt zu einer deutlichen Markierung des LacO-Arrays als grünes Fluoreszenzsignal im Zellkern; **B.** Die Bindung als mCherry-Fusionsprotein führt zu einer deutlichen Markierung des LacO-Arrays als rotes Fluoreszenzsignal im Zellkern; rote Rechtecke stellen die einzelnen LacO-Sequenzen dar. Ein violette Oval mit grünem oder rotem Sechseck stellt die beiden verschiedenen Fusionsproteine dar. Der Zellkern wird durch einen blauen Kreis, der integrierte LacO-Array durch einen grünen oder roten Fleck dargestellt.

3 Material

3.1 Geräte

Blotapparatur	BIO-RAD
Dokumentationssystem	VersaDoc™, BIO-RAD
Elektrophoresekammern	AGS, Peqlab; Hoefer
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Observer.Z1
Luminometer	SIRIUS, Berthold Detection Systems
pH-Meter	inoLab
Quarzküvetten	Hellma
Software	Excel 2007 (Microsoft)
	FB12 (Berthold)
	Quantity One (BIO-RAD)
	RotorGene 6, Corbett Research
	Volocity® (Improvision®)
	WinSTAT® (Microsoft)
Spektralphotometer	Ultraspec 3100 pro, Amersham
Thermocycler	GeneAmp PCR System, Perkin Elmer
	Mastercycler gradient, Eppendorf
	RotorGene RG-3000, Corbett Research
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250
UV-Transilluminator	Bachofer (366nm), UVP (254nm)
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal

3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (Ø 25mm)	Marienfeld
Deckgläschen (Ø 8mm)	Marienfeld
Gewebekulturschalen	Greiner, Sarstedt, Nunc
HRP-Substrat Immobilion™ Western	Millipore
Kanülen	B. Braun
Objektträger (76mm x 26mm x 1mm)	Marienfeld, Menzel
PVDF-Membran Immobilion P	Millipore
Spritzen	Henke Sass Wolf
Zellspachtel	TPP

3.3 Chemikalien

Allgemein übliche Chemikalien werden nachfolgend nicht aufgelistet. Generell wurden Chemikalien der Firmen Roth, Merck und Sigma verwendet.

<i>Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> -Tabletten	Roche
Betain	Sigma
DMEM	Gibco
F-12 (Ham)	Gibco
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Hoechst 33342	Molecular Probes
Immersionsöl	ZEISS
jetPEI™	Polyplus transfection
Ladepuffer (6x loading dye solution)	MBI Fermentas
Lipofectamine 2000	Invitrogen
OPTI®MEM I	Invitrogen
Protein G Plus/ Protein A Agarose	Calbiochem
<i>Random hexamer</i> -Primer	Roche

3.3.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Proteinase K	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
Reverse Transkriptase <i>innuSkript</i>	analytikjena
<i>Transcriptor</i> Reverse Transkriptase	Roche
RNase A	Roche
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase)	Promega

3.3.2 Komplettsysteme

<i>High Purity Plasmid Midiprep-System</i>	Marligen Biosciences
<i>illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band purification-Kit</i>	GE Healthcare
<i>QIAquick® Gel Extraction-Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy® Mini-Kit</i>	Qiagen
<i>SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™-PCR-Kit</i>	Sigma

3.3.3 Protein-Größenstandard

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas

kDa
 170
 130
 95
 72
 55
 43
 34
 26
 17
 10

3.3.4 DNA-Längenstandards

Verwendet werden DNA-Marker von MBI Fermentas.

M16 λ /Eco130I (bp)	M23 pUC19/Mspl (bp)	GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (bp)
19329	501/489	3000
7743	404	2000
6223	331	1500
4254	242	1200
3747	190	1000
2690	147	900
1882	111/110	800
1489	67	700
925	34	600
421		500
		400
		300
		200
		100

3.3.5 Antibiotika

<i>Ampicillin</i>	Invitrogen	Flüssigkultur und Agarplatten: 100 μ g/ml
Chloramphenicol	Invitrogen	Flüssigkultur: 170 μ g/ml
G418	Invitrogen	Zellkultur: 800 μ g/ml
Kanamycin	Gibco	Flüssigkultur und Agarplatten: 50 μ g/ml
Penicillin/ Streptomycin (Pen/ Strep)	Gibco	Zellkultur: 100 U/ml bzw. 100 μ g/ml

3.4 Antikörper

Kontroll-IgG für Chromatin-Immunopräzipitation

Spezies	Firma/ Bestellnummer	Anwendung
Kaninchen	Abcam/ ab46540-1	2 μ l (2 μ g)
Maus	Santa Cruz/ sc-2028	3 μ l (2,4 μ g)
Ziege	Santa Cruz/ sc-2025	3 μ l (2,4 μ g)

Primärantikörper

Antikörper	Firma/Bestellnummer	Spezies	Anwendung		
			IF	ChIP	WB
B23	Santa Cruz/sc-32256	Maus, monoklonal	1:100		
CHD8	Bethyl/ IHC-00246	Kaninchen, polyklonal	1:200		
CTCF	Santa Cruz/ sc-5916	Ziege, polyklonal		4µg (20µl)	1:200
GAPDH	Santa Cruz/ sc-25778	Kaninchen, polyklonal			1:1000
H2A.Z	Abcam/ ab4174	Kaninchen polyklonal	1:100	2µg (2µl)	
H3	Abcam/ ab1791	Kaninchen, polyklonal		2µl	
H3K27me3	Abcam/ ab6002	Maus, monoklonal	1:50	5µg (5µl)	
H3K4me2	Abcam/ ab32356	Kaninchen, monoklonal	1:200	2µl	
H3K4me3	Diagenode/ pAb-003-050	Kaninchen, polyklonal	1:100	4µg (2µl)	
H3K9ac	Upstate/ 07-352	Kaninchen, polyklonal	1:200	1µl	
H3K9me3	Abcam/ ab8898	Kaninchen-Serum	1:1000	2µg (2µl)	
H4ac	Upstate/ 06-866	Kaninchen, polyklonal	1: 200	1µl	
PARP-1	Santa Cruz/ sc-74470	Maus, monoklonal	1:200		
RAD21	Abcam/ ab992	Kaninchen, polyklonal	1:200		
RNA-Pol II	Santa Cruz/ sc-899	Kaninchen, polyklonal	1:200	1µg (5µl)	
Topo II α	Abcam/ ab45175	Kaninchen, polyklonal	1:250		
WDR5	Santa Cruz/ sc-47574	Ziege, polyklonal			1:100
β-Tubulin (E7)	DSHB	Maus, monoklonal			1:30000

Sekundärantikörper für indirekte Immunfluoreszenz

Antikörper	Firma/ Bestellnummer	λ_{em} (nm)	Anwendung
Ziege anti-Maus-Alexa A-568	Invitrogen/ A11019	603	1:200
Ziege anti-Kaninchen-Alexa A-568	Invitrogen/ A11011	603	1:200

Sekundärantikörper für Western Blot

Antikörper	Firma/ Bestellnummer	Anwendung
Ziege anti-Maus-HRP	Santa Cruz/ sc-2055	1:20000
Esel anti-Kaninchen-HRP	GE Healthcare/ NA934V	1:20000
Esel anti-Ziege-HRP	Santa Cruz/ sc-2020	1:7500

3.5 Oligonukleotide

Generell wurden Oligonukleotide der Firma Invitrogen verwendet.

Klonierung

Name	Sequenz (5'-3')
Cherry Lac WDR5 fw	CCATGGCGACGGAGGAGAA
WDR5 bw neu	TTAGCAGTCACTCTCCACAGTTTAAT
humanWDR5_fw	ATGGCGACGGAGGAGAAGAA
humanWDR5_bw	GCAGTCACTCTCCACAGTTTAAT
BAF57 fw	ATGTCAAAAAGACCATCTTATG
BAF57 bw	TTACTCCTTCTTCTCGTCTT
hBORIS_cDNA_fw	TTATGGCAGCCACTGAGATCTCT
hBORIS-cDNA_bw	CTCTCACTTCATCGTGTTGAGGA
humanGCN5_fw	ATGGCGGAACCTTCCCAGG
humanGCN5_bw	CTTGTC AATGAGGCCTCCCTC
mouseJmjD3_fw	ATGCATCGGGCAGTGGACCCT
mouseJmjD3_bw	TCGAGACGTGCTGGCGGGA

Sequenzanalyse

Name	Sequenz (5'-3')
Seq wdr5pointmut_ok	CTAAAGTTCACCCTTGCTGG
seq Lac constructs fw	TCAGGGCCAGGCGGTGAAGG
Seq lacCTCF 3prime	GTCTGCCTGGTTCGGTGCTA
seqYFPC2-CTCF_fw	GATCACTCTCGGCATGGACG

Chromatin-Immunopräzipitation

Kürzel	Name	Sequenz (5'-3')
	A05.1	GCGTACAGGATGGGAGGAT
	A06.1	CCTCAGGCATAGACCTCCAC
A1	ATP8B2 1kb up outside fw	GTTATCCATGGGTGCCAACT
A2	ATP8B2 1kb up outside bw	GCAGAGGAAGGTGAGTGGAG
A3	ATP8B2 CTCF fw	ACCAGGACTCAGGCTTCTCA
A4	A4neu	GGTTGTGCCCTACACTGGAT
A5	ATP8B2 1kb down inside 2 fw	CTGAGCGCTGAGGTGAGG
A6	ATP8B2 1kb down inside 2 bw	TCCCATCCTGTACGCAGAC
A7	ATP8B2 3.1kb down inside 1 fw	GTCCCTGGGATGGATACCTT
A8	ATP8B2 3.1kb down inside 1 bw	GCCTCCTTCTCCAGTCTCT
	ACCS ChIP fw	TGGGACCAAGTAGAGGGTTG
	ACCS ChIP bw	CACCTCCACCAGCATTACCT
AQP10	AQP10 5prime fw	TCTGTCTGGTGATGGTGGAA
	AQP10 5prime bw	GGTGGGGGATACAAGAGGAT
E01	Ext2 01 ChIP-	TTCCAATTCCAGGGTTCAAG
E02	Ext2 02 ChIP-	TGGTGGCTCATGCCTATGTA
E3	E3_neull	GTGCTCGGACTCCTCCTGT
E4	E4_neu	GCTTGGTCACCGGCTCAT
E5	EXT2 1kb down inside fw	GACGGGGCAGGAGTATGTTA
E6	EXT2 1kb down inside bw	CCCAAACACCTCTGGACTTC

RNAi

Verwendet wurde siRNA⁽⁺⁾- oder Stealth RNAi™ siRNA^(*)-Duplex-Oligoribonukleotide.

Name	Gen	Sequenz (5'-3')
siCTCFhum ⁺ (C. Nordhammer, Gießen)	hCTCF	UCUCUGGUAAGUCUUUCUCTT GAGAAAGACUUACCAGAGATT
STEALTH, JL [*] (#626; Wendt, 2008)	hCTCF	UCACCCUCCUGAGGAAUCACCUUAA UUAAGGUGAUUCCUCUAGGAGGGUGA
CTCF 628 ⁺ (J. Leers, Gießen)	hCTCF	GAUGCGCUCUAAGAAAGAA UUCUUUCUUAGAGCGCAUC
WDR5HSS145960(3_RNAi) [*] Invitrogen	hWDR5	GGCCACACAGAUGUCGUGAUCUCA UUGAGAUCACGACAUCUGUGUGGCC
WDR5HSS145962(3_RNAi) [*] Invitrogen	hWDR5	UCGUCAGAUUCUAACCUUCUUGUUU AAACAAGAAGGUUAGAAUCUGACGA
hnonsiRNA ⁺ (J. Leers, Gießen)	-	CUACGAUGAAGCACUAUUATT UAAUAGUGCUUCAUCGUAGTT

RT-Analysen

Name	Sequenz (5'-3')	Anmerkung
gapdh_rt as	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
gapdh_rt s	CACCACCAACTGCTTAGC	
Actin RT as	CCTCGTAGATGGGCACAGT	
Actin RT s	CCGTCTTCCCCTCCATCGTG	
ATP8B2 RT_2 fw	GCTGAGCGCTGAGGGTCT	
ATP8B2 RT_2 bw	CCTGGAACTGCTCAAAGAGG	
EXT2 RT_2 bw	GAAGTACGCTTCCCAGAACCA	
EXT2 RT_2 fw	GCAGTATTGAGCGATGTGTTACA	
hCTCF bw	GCTTGTATGTGTCCCTGCTGGCA	(Torrano et al., 2005)
hCTCF fw	TTACACGTGTCCACGGCGTTC	(Torrano et al., 2005)
WDR5 RT fw	GCGTATGATGGGAAATTTGAG	
WDR5 RT bw	CCATATCCTCACGCTTTCGT	

3.6 Plasmide

pBluescript II SK+ (pBSK)	Stratagene
pCMV-LacZ	U. Deutsch, Bad Nauheim
pEGFP-C2-chCTCF	R. Zhang, Gießen
pEGFP-C2-hWDR5	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pEGFP-C2-mBAF57	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pEGFP-C2-mJMJD3	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pEGFP-C2-hGCN5	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pGL3 LacO-Reporter	K. Günther, Gießen (unveröffentlicht)
pSV2 eGFP-LacI	K. Rippe, Heidelberg (Jegou et al., 2009)
pSV2 eGFP-LacI-chCTCF	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 eGFP-LacI-chCTCF_C	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 eGFP-LacI-chCTCF_N	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 eGFP-LacI-chCTCF_N+ZF	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 eGFP-LacI-chCTCF_ZF	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 eGFP-LacI-chCTCF_ZF+C	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 eGFP-LacI-VP16	K. Günther, Gießen (unveröffentlicht)
pSV2 mCherry-LacI	M. Rust, Gießen (unveröffentlicht)
pSV2 mCherry-LacI-chCTCF	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 mCherry-LacI-chCTCF_RR	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 mCherry-LacI-chCTCF_NT1	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 mCherry-LacI-hBORIS	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 mCherry-LacI-mBORIS	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pSV2 mCherry-LacI-hWDR5	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pEGFP-C2-hWDR5 F133A	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)
pEGFP-C2-hWDR5 S91K	C. Paprotka, diese Arbeit (s. Anhang)

3.7 Zelllinien

3.7.1 Eukaryotische Zelllinien

HeLa (ATCC®-Nr. CCL-2™)

Hierbei handelt es sich um humane Cervix-Adenokarzinom-Zellen. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf und wachsen adhärent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen. Sie werden in DMEM mit 10% FCS bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

HEK 293T

Hierbei handelt es sich um humane Nierenzellen. Die Zellen sind ein Derivat der HEK 293-Zelllinie. Sie sind sehr gut transfizierbar und tragen das SV40 T-Antigen. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf und wachsen adhärent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen. Sie werden in DMEM mit 10% FCS bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

U-2OS F42B8

Diese Zellen sind ein Derivat der U-2OS-Zelllinie (ATCC-Nr®. HTB-96™); hierbei handelt es sich um humane Osteosarkoma-Zellen. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf und wachsen adhärent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen. Sie werden in DMEM mit 10% FCS bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. U-2OS F42B8-Zellen tragen stabil einen artifizialen DNA-Array im Genom. Für die stabile Transfektion wurde ein Vektor (pLAU43) verwendet, der 240x die Lac-Operator (LacO)-Sequenz aus dem Lac-Operon von *E.coli* enthält. Die tatsächliche Anzahl der enthaltenen LacO-Bindestellen ist nicht bekannt. Die Integrationsstelle befindet sich im Bereiche eines der Centromere. Der integrierte Vektor vermittelt außerdem eine Resistenz gegen G418 (Jegou et al., 2009).

U-2OS F6B2

Diese Zellen sind ebenfalls ein Derivat der U-2OS-Zelllinie; sie tragen drei unterschiedlich große DNA-Arrays im Genom (Integration in den Telomeren der Chromosomen 6q (der mittelgroße Array, 11p (der größte Array) und 12q (der kleinste Array)). Für die stabile Transfektion wurde ebenfalls der pLAU43-Vektor verwendet. Alle drei Integrationsstellen

befinden sich im Bereich von Telomeren. Der integrierte Vektor vermittelt außerdem eine Resistenz gegen G418 (Jegou et al., 2009).

CHO RRE B1

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein Derivat der DG44 CHO-Zelllinie (CHO - Chinese hamster ovary, ATCC-Nr[®]. CCL-61™), die stabil einen dekondensierten, euchromatischen Array enthalten (Robinett et al., 1996). Position und Größe des Arrays sind nicht bekannt. Für die stabile Transfektion wurde ein Vektor verwendet, der 256 Kopien des Lac-Operators (etwa 10,1-kb großes Fragment) trägt. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf und werden in Ham F-12-Medium mit 10% FCS bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

3.7.2 Bakterien

Zum Transformieren von Plasmid-DNA in Bakterien wurde folgender chemisch-kompetenter Labor-Sicherheitsstamm verwendet.

Escherichia coli XL1-Blue MRF` (Stratagene)

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

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

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit DNA

4.1.1 Lagerung

Die Lagerung von DNA erfolgt in TE-Puffer bei -20°C.

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

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in Quarzküvetten bestimmt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Extinktion von 1 der Konzentration von 50 µg/ml.

Mit folgender Formel kann man aus der gemessenen Extinktion E die DNA-Konzentration rechnerisch ermitteln:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

4.1.3 Plasmidpräparation aus Bakterien

Um Plasmide schnell zu vermehren, bedient man sich der Hilfe von Bakterien. Die Plasmide werden in Bakterien eingebracht (s. 4.4.2), die Bakterien vermehrt und die Plasmide anschließend aus den Bakterien präpariert. Die Menge der präparierten Plasmide richtet sich nach dem Zweck. Kleine Mengen an Plasmid werden schneller gewonnen, wenn diese zum Testen einer Klonierung benötigt werden, größere Mengen werden gewonnen, wenn ein Plasmid für Transfektionen verwendet werden soll. Diese haben dann einen höheren Reinheitsgrad.

Nach einer Plasmid-Präparation wird überprüft, ob das erhaltene dem erwarteten Produkt entspricht. Dafür wird erst ein Restriktionsverdau (4.1.9.1) durchgeführt und der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.1.12). Werden die Plasmide für eine Klonierung gewonnen, werden diese anschließend noch einer Sequenzanalyse unterzogen (4.1.8). Werden die Plasmide für Transfektionen präpariert, wird außerdem ungeschnittenes Plasmid gelelektrophoretisch untersucht, um den Grad an „*supercoil*“ zu bestimmen.

4.1.4 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Einzelne Klone werden von entsprechenden Agarplatten isoliert und in 3ml LB-Medium (mit geeigneter Konzentration des entsprechenden Antibiotikums) mindestens für 12h bei 37°C geschüttelt.

1,5ml dieser Übernachtskultur werden in Eppendorf-Gefäße gefüllt und bei 13000rpm 1min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet wird in 100µl der Lösung 1 sorgfältig resuspendiert. Dann werden 200µl der Lösung 2 zugegeben, es wird gut gemischt und für 5min auf Eis inkubiert - alkalische Lyse der Zellen. Danach werden 150µl der Lösung 3 zugegeben und wie eben verfahren - Neutralisierung der Lösung und Fällen der Proteine und der chromosomalen DNA. Der nächste Schritt ist Zentrifugation bei 13000rpm für 15min bei RT, um den Zelldebris aus der Lösung zu entfernen.

Lösung 1	50mM Glukose 25mM Tris-Cl pH 8,0 10mM EDTA
Lösung 2	0,2M NaOH 1% SDS frisch ansetzen
Lösung 3	5M Kaliumacetat pH 4,8

Der Überstand, der die Plasmide enthält, wird abgenommen und in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Plasmid-DNA wird für 10min mit 0,8 Volumenteile (VT) Isopropanol auf Eis gefällt. Dann erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 13000rpm für weitere 10min bei RT. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet wird mit 500µl 70%igem Ethanol (w = 70%) gewaschen und für 5min zentrifugiert (13000rpm, RT). Der Überstand wird erneut

abgenommen, das Pellet wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wird die Plasmid-DNA in 40µl TE + RNase A aufgenommen und 45min bei 37°C inkubiert, um mitpräparierte RNA abzubauen.

TE-Puffer	10mM TRIS-HCl, pH 7,5 1mM EDTA
RNase A	10mg/ml

4.1.5 Plasmidpräparation in mittlerem Maßstab (Midipräparation)

Verwendet wird das *High Purity Plasmid Midiprep*-System von Marligen Biosciences verwendet. Gearbeitet wird nach Protokoll des Herstellers. Alle Zentrifugationsschritte finden bei 5000rpm statt.

4.1.6 Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxipräparation)

Die Abtrennung von RNA und genomischer Bakterien-DNA erfolgt hierbei mittels zweimaliger Dichtezentrifugation über einen Cäsiumchlorid-Gradienten. Dies führt zu einem höheren Reinheitsgrad.

Zu 360ml TB-Medium werden 40ml Phosphat-Puffer, zur Selektion geeignete Antibiotika und die Bakterien aus einer Vorkultur gegeben und für 7- 8h bei 37°C im Inkubator geschüttelt.

TB-Medium (Terrific-Broth)	12g/l Bactotrypton 24g/l Hefe-Extrakt 0,4% Glycerol autoklaviert
10x Phosphat-Puffer	0,17M KH_2PO_4 0,72M K_2HPO_4 autoklaviert

In TB-Medium können Bakterien zu einer höheren Dichte wachsen als in LB-Medium. Dann wird die Bakteriensuspension mit 400µl einer Chloramphenicol-Lösung (34mg/ml in Ethanol) versetzt und für weitere 10-16h geschüttelt. Das Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese der Bakterien, während die Plasmid-DNA-Replikation weiter von statten

geht. Die Verwendung von TB-Medium sowie Chloramphenicol dient der Erhöhung der Ausbeute.

Die Bakteriensuspension wird für 10min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterien-Pellet in 10ml Lösung 1 resuspendiert und für 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 20ml Lösung 2 wird der Aufschluss sehr gut gemischt und für weiter 5min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 15ml Lösung 3 und erneuter Inkubation für 5min auf Eis erfolgt eine Zentrifugation (30min, 5000rpm, 4°C).

Lösung 1	50mM Glukose 25mM Tris-Cl pH 8,0 10mM EDTA 50mg Lysozym; frisch zugeben
Lösung 2	0,2M NaOH 1 % SDS; frisch ansetzen
Lösung 3	5M Kaliumacetat pH 4,8

Der Überstand wird durch 3 Lagen Gaze in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 0,7VT Isopropanol (20min, RT) gefällt und anschließend präzipitiert (30min, 5000rpm, RT). Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet. Dann wird das Pellet in 3ml TE-Puffer bei 37°C auf einem Schüttler resuspendiert, mit 4,25g CsCl versetzt und nochmals bei 37°C gelöst. Danach werden 500µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) zugegeben, gut durchmischt und zentrifugiert (10min, 6000rpm, RT). So werden große Mengen an Proteinen abgetrennt.

Der Überstand wird in ein Beckmann Quickseal™-Zentrifugenröhrchen (13mm x 51mm) überführt. Das Zentrifugenröhrchen wird daraufhin mit einer 50%igen CsCl-Lösung (w/w) oder MilliQ so aufgefüllt, dass ein Gesamtgewicht zwischen 9,5 und 9,8g vorliegt. Anschließend werden die Zentrifugenröhrchen zugeschweißt und in einen Vertikalrotor VTi 90 überführt. Der Gradient bildete sich durch Ultrazentrifugation in einer Beckmann XL-70 Ultrazentrifuge aus (16h, 55000rpm, 20°C).

Im Anschluss an die Zentrifugation wird mit einer Einwegspritze jeweils die untere der entstandenen Banden abgezogen und in ein neues Quickseal™-Zentrifugenröhrchen überführt. Wie vorher wird mit 50%iger CsCl-Lösung oder MilliQ aufgefüllt (Gesamtgewicht 9,5-9,8g) und erneut zentrifugiert (4h, 55000rpm, 20°C). Erneut wird die untere Bande abgezogen und diesmal in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das gelöste

Ethidiumbromid wird mittels einer CsCl-gesättigten Isopropanol-Lösung so oft ausgeschüttelt, bis die Lösung farblos ist. Zur quantitativen Entfernung des Ethidiumbromids wird dieses Ausschütteln dann noch zweimal wiederholt. Die obere wässrige Phase wird mit 2VT MilliQ verdünnt und in ein 50ml Beckmann-Zentrifugenröhrchen überführt.

Durch Zugabe von 0,6VT Isopropanol wird die DNA für 20min bei RT gefällt und durch Zentrifugation (20min, 5000rpm, RT) sedimentiert. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und je nach Ausbeute in bis zu 500µl TE-Puffer aufgenommen. Gelöst wird die DNA über Nacht bei RT.

4.1.7 Fällung von DNA

Um DNA in einem anderen Puffer aufnehmen zu können, wird diese einer Ethanol-Fällung oder Isopropanol-Fällung unterzogen.

Ethanol-Fällung

Zu der DNA-Lösung wird 10%ig 3M Natriumacetat gegeben. Dazu gibt man dann 2,5VT 100%iges Ethanol. Es wird für 20min bei -18°C inkubiert, dann erfolgt eine Zentrifugation für 25min bei 13000rpm und 4°C . Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 600µl 70%igem Ethanol gewaschen und für 5min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgenommen. Das Trocknen des Pellets erfolgt in der Vakuumzentrifuge. Das Pellet wird in einem bestimmten Volumen des geeigneten Puffers oder MilliQ aufgenommen.

Isopropanol-Fällung

Werden kleine DNA-Fragmente gefällt, wie z.B. PCR-Produkte, wird dem Reaktionsansatz Glykogen zugesetzt.

Zu der DNA-Lösung wird 10%ig 3M Natriumacetat gegeben, dann werden 0,05% Glykogen und 0,8VT Isopropanol zugefügt und gut durchmischt und 10min auf Eis inkubiert. Nach Pellettieren der gefällten DNA (10min, 13000rpm, RT) wird diese mit 500µl einer 70%igen Ethanolösung gewaschen und wieder zentrifugiert (5min, 13000rpm, RT). Das DNA-Pellet wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet und im geeigneten Puffer oder MilliQ aufgenommen.

4.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse erfolgt bei der Firma Seqlab. Der Sequenzierungsansatz besteht aus 600ng Plasmid-DNA und 20pmol des entsprechenden Sequenzierprimers in einem Gesamtvolumen von 7 μ l.

4.1.9 Enzymatische Modifizierung von DNA

4.1.9.1 Restriktion

Doppelsträngige DNA kann durch eine Vielzahl spezifischer Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Die Restriktionsenzyme werden aus Mikroorganismen isoliert und können die DNA an sequenzspezifischen Stellen, die aus palindromischen Sequenzen bestehen, schneiden. Dabei werden überhängende (*sticky*) oder glatte (*blunt*) Enden erzeugt. Die Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen für den entsprechenden Restriktionsverdau richten sich nach den Angaben der Hersteller, die Inkubationszeiten nach den eingesetzten DNA- und Enzymmengen. Im Allgemeinen wird eine Enzym-Einheit (U) pro μ g Plasmid-DNA verwendet und etwa 1h bei 37°C inkubiert.

4.1.9.2 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

Um zwei DNA-Fragmente, deren Enden nicht kompatibel zueinander sind, miteinander ligieren zu können, ist es notwendig, überhängende Enden durch eine Polymerase-Reaktion zu glatten Enden mit Deoxynukleotiden aufzufüllen. Das hierfür verwendete Enzym ist die T4-DNA-Polymerase. Dieses Enzym katalysiert die Addition von Deoxynukleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe eines DNA-Moleküls, das einen 5'-Überhang besitzt und somit sowohl als Primer als auch als Matrize dient. Bei dieser Reaktion werden bis zu 1 μ g DNA im entsprechenden Reaktionspuffer mit 3 μ l eines dNTP-Mixes (10mM pro dNTP) und 1 μ l Enzym (5U) in einem Volumen von 20 μ l für 1h bei 37°C inkubiert.

4.1.9.3 Dephosphorylierung der freien 5'Enden eines linearisierten Vektors

Das Einbringen eines DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor, der nur mit einem einzigen Restriktionsenzym geschnitten wurde, wird durch die Religation des Vektors erschwert. Durch die hydrolytische Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppen des Vektors mittels alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIAP) kann dessen Religation verhindert werden. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgt mit einer Enzym-Einheit für mindestens 1h bei 37°C im zugehörigen Reaktionspuffer.

4.1.9.4 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Da, wie im oberen Kapitel beschrieben, Vektoren aufgrund ihrer Religationseigenschaften am 5'-Ende dephosphoryliert werden, müssen PCR-Produkte, die als Inserts verwendet werden sollen, ihrerseits am 5'-Ende phosphoryliert werden, um eine Ligation zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wird die T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) verwendet, die die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf die 5'OH-Gruppe von einzel- und doppelsträngiger DNA und RNA sowie Oligonukleotiden katalysieren kann (*forward reaction*).

Eingesetzt werden 10 Enzymeinheiten für 200pmol des zu phosphorylierenden Primers in Puffer A. Dem Reaktionsmix werden außerdem 40mM ATP zugesetzt. Es wird für 1h bei 37°C inkubiert. 1 μ l Reaktionsansatz (20pmol phosphorylierter Primer) wird direkt für die anschließende PCR verwendet.

4.1.9.5 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wird T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert ATP-abhängig die Verbindung von 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen zu Phosphodiesterbindungen. Vektor und Insert werden dabei im Mengenverhältnis 1:5 im entsprechenden Ligase-Puffer mit einer Enzymeinheit Ligase pro μ g Gesamt-DNA inkubiert. Im Falle kohäsiver Enden erfolgte die Ligation bei RT für mindestens 2h, im Falle glatter Enden über Nacht.

4.1.10 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren, um sehr spezifisch gewünschte DNA-Fragmente in einer exponentiell verlaufenden Polymerisierungsreaktion zu amplifizieren.

Bei der PCR kommen drei wesentliche Komponenten zum Einsatz: eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (verwendet wird die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* mit *proof reading*-Funktion oder die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die keine 5'-3' Exonuklease-Aktivität besitzt); ein Plasmid oder ein DNA-Fragment, das der Polymerase als Matrize dient (Template) und schließlich zwei Primer, die komplementär zu den flankierenden Regionen der zu amplifizierenden Sequenz sind, an die sie antiparallel hybridisieren und deren freies 3'-OH der Polymerase als Substrat für die Anheftung von freien Deoxynukleotiden dient. Zusätzlich müssen im Reaktionsansatz geeignete Pufferbedingungen vorliegen, sowie, falls nötig, Mg^{2+} -Ionen (in Form von $MgSO_4$ oder $MgCl_2$) zugegeben werden.

Die Reaktionen der PCR verlaufen zyklisch, die Einzelreaktionen der PCR sind temperaturabhängig und verlaufen in drei Schritten. Der Denaturierung bei 94°C, bei der sich die beiden Stränge der DNA trennen, folgt die Hybridisierung der Primer an die DNA-Einzelstränge bei 45-65°C. Die anschließende Elongation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, schließt den Zyklus ab.

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

Standard-Protokoll <i>GoTaq</i> [®]	Standard-Protokoll <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
Enzym 1U	Enzym 2,5U
1x <i>Green GoTaq</i> [®] <i>Flexi</i> -Puffer	1x Puffer + $MgSO_4$ (4mM)
4mM $MgCl_2$	je 2pmol Primer fw + bw
je 10pmol Primer fw + bw	0,2 mM dNTPs
0,5 mM dNTPs	~100ng Template
Template (1µl ChIP oder RT-Material)	
ad 20µl MilliQ	ad 50µl MilliQ

Bei Bedarf wurde dem Reaktionsansatz 1M Betain zugesetzt, um die Bildung von Primer-Dimeren zu unterbinden und damit den Ertrag der Amplifizierungsreaktion zu erhöhen.

4.1.11 Realtime PCR

Die *realtime* PCR folgt demselben Prinzip wie die konventionelle PCR (4.1.10). Das Besondere aber ist, dass eine direkte Quantifizierung der hergestellten PCR-Produkte erfolgt, da die Amplifikation in Echtzeit aufgezeichnet wird. Dies geschieht, indem der Reaktion ein Farbstoff zugesetzt wird, der in doppelsträngige DNA interkaliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™-Kit von Sigma verwendet. Neben allen für die PCR-Reaktion (außer Template und Primer) benötigten Reagentien enthält der Fertig-Mix zusätzlich den Farbstoff SYBR Green I. Dieser fluoreszierende Farbstoff wird häufig für die Färbung von DNA verwendet. Sein Anregungsmaximum liegt bei 494nm Wellenlänge, sein Emissionsmaximum bei 521nm. Die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgt über die Detektion des Farbstoffs über Messung der Fluoreszenzzunahme während der Elongationsphasen durch die gesamte PCR-Reaktion hindurch.

Der Mix enthält außerdem den *JumpStart Taq*-Antikörper, der die Polymerase inhibiert, indem er mit dieser einen Antigen-Antikörper-Komplex bildet. Dieser Komplex wird im ersten Denaturierungsschritt des PCR-Zyklus zerstört, die Polymerase kann danach arbeiten.

Standard-Protokoll
1x SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ mit
3,5mM MgCl ₂
0,25U Taq-Polymerase
0,2mM dNTPs
je 10pmol Primer fw + bw
Template (1µl ChIP oder RT-Material)
ad 10µl MilliQ

4.1.12 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können gelelektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Da die DNA als negativ geladenes Molekül vorliegt, wandert sie in einem elektrischen Feld zum Pluspol - je kleiner das Molekül, desto schneller. Als Gelmatrix dient Agarose.

Zur Herstellung analytischer oder präparativer Agarosegele wird abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente eine Agarosekonzentration (0,6 - 2%) gewählt. Die Agarose wird entsprechend in 1xTAE-Puffer gelöst, in einem Mikrowellenherd aufgeköcht und mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) versetzt. Ethidiumbromid ist eine Substanz, die nach Interkalierung in die DNA unter UV-Licht (Anregung bei 254-366nm Wellenlänge) verstärkt rot-orange fluoresziert. Dadurch kann die DNA im Gel detektiert werden.

Ist die Agarose auf unter 60°C abgekühlt, kann das Gel in einer Flachbettapparatur gegossen werden. Beim Erkalten wird die Agarose fest. Um DNA auftragen zu können, wird beim Gießen im oberen Teil der Flachbettapparatur ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erkalten wird der Kamm gezogen, in die resultierenden Taschen kann nun die mit Auftragspuffer versetzte DNA-Lösung pipettiert werden. Der Auftragspuffer beschwert die Probe und macht die Lauffront im Gel sichtbar. Um später die Größen der aufgetrennten Fragmente bestimmen zu können, werden 2µg eines DNA-Längenstandards als Marker aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wird in einer Elektrophoresekammer bei einer Spannung vom 60-90V durchgeführt. Laufpuffer ist ebenfalls 1xTAE. Zur Dokumentation werden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

50x TAE-Puffer	2M TRIS pH 7,8 150mM Natriumacetat 50mM EDTA
Auftragspuffer (6x loading dye solution, MBI)	0,09% Bromphenolblau 0,09% Xylencyanol 60mM EDTA

Für präparative Zwecke werden nach abgeschlossener Elektrophorese die DNA-Fragmente unter längerwelligem UV-Licht (365nm) mit einem scharfen, sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt, um später aus dem Gel extrahiert zu werden.

4.1.13 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wird das *QIAquick® Gel Extraction*-Kit von Qiagen verwendet. Die Ausführung erfolgt laut Protokoll des Herstellers. Eluiert wird in 30-50µl Elutionspuffer oder MilliQ.

4.2 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA muss strikt darauf geachtet werden, dass alle Materialien frei von RNasen sind. MilliQ wird vorher mit DMPC behandelt. DMPC methoxycarbonyliert Histidinreste und führt dadurch u.a. zur Hemmung von Enzymen wie RNasen. Alle Arbeiten werden möglichst auf Eis durchgeführt. Es wurden nur sterile Geräte und Lösungen benutzt. Über aus Zellen isolierte RNA kann man Aussagen über die Aktivität bestimmter Gene anhand der Messung der mRNA-Transkriptionslevel treffen. Dazu wird die RNA isoliert, von einer Reversen Transkriptase in cDNA (*complementary DNA*) übertragen und anschließend in einer Amplifizierungsreaktion quantifiziert.

4.2.1 RNA-Isolierung

Verwendet wird das *RNeasy® Mini* -Kit von Qiagen. Gearbeitet wird nach dem Protokoll "Purification of total RNA from animal cells using spin technology".

Die Zellen wurden entweder geerntet (wenn parallel ebenfalls Protein isoliert worden ist) oder direkt lysiert. Für die Homogenisierung wurden 0,9mm-Kanülen und 5ml-Spritzen verwendet. Die Zellsuspension wurde darin 9x heraufgezogen und wieder hinunter gedrückt.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in Quarzküvetten bestimmt. Bei RNA entspricht eine Extinktion (E) von 1 der Konzentration von 40µg/ml.

Mit folgender Formel kann man aus der gemessenen Extinktion die DNA-Konzentration rechnerisch ermitteln:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

4.2.3 RT-PCR

Verwendet wird entweder das *Transcriptor* Reverse Transkriptase-Kit von Roche. Gearbeitet wird nach Angaben des Herstellers für multiple Reaktionen. Es werden *random hexamer primer* eingesetzt, die reverse Transkription findet bei 55°C für 30min statt. Im Anschluss wird 1µl des Ansatzes direkt für die anschließende PCR verwendet.

Alternativ wurde die Reverse Transkriptase *innuScript* von analyticaljena verwendet. Gearbeitet wurde nach Herstellerprotokoll. Als Primer für die RT-Reaktion wurden ebenfalls *random hexamers* (60µM) von Roche eingesetzt.

4.3 Arbeiten mit Proteinen

Alle Arbeiten mit Proteinen wurden bei 4°C oder auf Eis ausgeführt. Es wurden nur sterile Geräte und Lösungen benutzt.

4.3.1 Isolierung von Proteinen aus Zellkernen

Zur Gewinnung eines Kernextraktes werden die Zellen zuerst geerntet. Dazu wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1xPBS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des Puffers werden die Zellen für 2-5min in Trypsin-Lösung inkubiert. Nach Ablösen der Zellen werden diese in 1ml Medium aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und pelletiert (RT, 3000rpm, 1min). Anschließend wird das Zellpellet 2x gewaschen (je 1ml 1xPBS eiskalt; 4°C, 3000rpm, 1min) und in Puffer A (Volumen abhängig von Zellzahl, 100µl – 400µl) durch Schnippen resuspendiert. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wird 10s gevortext, gefolgt von exakt 10s Anzentrifugieren in der Tischzentrifuge (4°C).

Puffer A	10mM HEPES-KOH pH 7,9
	1,5mM MgCl ₂
	10mM KCl

Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet in 50µl-200µl Puffer C aufgenommen. Resuspendieren erfolgt durch Auf- und Abpipettieren.

Puffer C	20mM HEPES-KOH pH 7,9
	25% Glycerol
	1,5mM MgCl ₂
	0,2mM EDTA
	420mM NaCl

Nach 20minütiger Inkubation auf Eis folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (4°C, 13000rpm, 10min). Der Überstand wird dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und zur Konzentrationsbestimmung direkt verwendet oder eingefroren.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgt spektralphotometrisch. Sie basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie-Lösung von 495nm zu 595nm Wellenlänge, wenn Protein zur Lösung hinzugefügt wird (Bradford-Assay). Zur Konzentrationsbestimmung werden 1-10µl Proteinlösung mit 200µl Roti®-Quant versetzt und durch Zugabe von 0,25M Tris-Cl pH 6,8 auf ein Volumen von 1ml gebracht. Die Proben werden gegen einen proteinfreien Leerwert bei 595nm gemessen.

Die Proteinkonzentration errechnet sich aufgrund einer Eichkurve gemäß der Formel:

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

4.3.3 Fällung von Proteinen (TCA-Fällung)

Ist die vorhandene Proteinlösung zu gering konzentriert für weitere Analysen, kann die Lösung durch eine Fällungsreaktion aufkonzentriert werden.

Dazu wird dem Proteingemisch 1/3VT 80%iges TCA (Trichloressigsäure) zugesetzt, gut durchmischt und für 20min auf Eis inkubiert. Dann wird für 10min bei 13.000rpm und RT

abzentrifugiert und der Überstand abgezogen. Dabei ist zu beachten, dass das Pellet bei diesem Schritt gallertartig ist. Dehydrierung des Pellets erfolgt durch dreimaliges Waschen mit 500µl Aceton, anschließender Zentrifugation (3min, 13.000rpm, RT) und Abziehen des Überstandes. Nach dem letzten Waschschrift lässt man das restliche Aceton bei RT abdampfen und nimmt das Pellet anschließend in dem gewünschten Volumen MilliQ auf. Dann wird die Lösung 1:4 mit SDS-Ladepuffer (Roti®-Load) versetzt, direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren.

4.3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender Polyacrylamidgele (SDS-PAGE)

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

In dem von Ulrich Lämmli 1970 erstmals beschriebenen System lassen sich Proteinmischungen unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe auftrennen. Bei diesem Verfahren dient das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Entfalten der Proteinstrukturen. Dabei lagern sich pro AS durchschnittlich zwei Moleküle SDS an und geben allen Proteinen eine ellipsoide Raumstruktur, was eine ausschließlich durch das Molekulargewicht abhängige Auftrennung ermöglicht. Eine stark reduzierende Chemikalie (β -Mercaptoethanol) bricht zusätzlich alle Disulfid-Bindungen auf. Auf diese Weise standardisierte Proteinmischungen können über die regulierbare Matrix eines Polyacrylamidgels der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei nutzt man die doppelt negative Ladung von SDS aus, die alle Eigenladungseffekte der Proteine überdeckt und eine Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und erfolgt in Richtung Anode.

Das verwendete Gelsystem steht senkrecht und besteht aus zwei Polyacrylamid-Bereichen, die sich im pH-Wert unterscheiden und nacheinander von den Proteinen durchlaufen werden. Dabei fokussiert das obenliegende Sammelgel die Proteinprobe in einem schmalen Band, bevor mit dem Wechsel zum Trenngel der pH-Anstieg eine Auftrennung bewirkt. Dabei kann die Porengröße des Trenngels mit unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration

variiert werden, so dass eine optimale Auftrennung in jeweils verschiedenen Molekulargewichts-Bereichen gewährleistet ist. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde parallel ein standardisiertes Proteingemisch (Marker) aufgetragen.

Alle Zubehörteile des Hoefer-Gelsystem werden mit entionisiertem Wasser und 70% (v/v) Ethanol gereinigt. Es wird eine Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1 (w/v), Rotiphorese® Gel 30) benutzt, die 7,5 bis 12%ig im Trenngel, und 6%ig im Sammelgel eingesetzt wird. Die gewünschten Gellösungen werden für Trenn- und Sammelgel separat angesetzt.

Sammelgel	6%	Trenngel	12%	7,5%
0,5M Tris/HCl pH6,8	2,5ml	1,5M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid	1,3ml	Acrylamid	4ml	2,5ml
MilliQ	6,1ml	MilliQ	4,1ml	4,9 ml
SDS 10%	100µl	SDS 10%	100µl	100µl
APS	50µl	APS	50µl	50µl
TEMED	10µl	TEMED	5µl	5µl

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

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

Die Proteinproben werden in SDS-Auftragspuffer (Roti®-Load) bei 85°C 5min erhitzt, anschließend bei 13.000rpm herunterzentrifugiert und in die Probenauftragstaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird bei 80V (Einlaufen der Proben in die Matrix) begonnen und dann bei 100-120V weitergeführt.

4.3.5 Western Blot

Der Elektroblot (oder Western Blot analog zu dem nach seinem Erfinder benannten Southern Blot zum Transferieren von DNA auf eine Trägermembran) erlaubt den Transfer von zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran. Da diese Proteine mit SDS beladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode und können so aus der Gelmatrix heraus auf eine Membran transferiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen verwendet, die vor dem Blot-Vorgang durch Inkubation mit Methanol 10s aktiviert wurden.

Angewendet wurde die so genannte *wetblot*-Methode, bei der der Proteintransfer in einem Puffer-gefüllten Tank erfolgt.

Wetblot

Die PVDF-Membran und 4 Filterpapiere (Whatman-3MM-Papier) werden auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten.

Das Transfer-Sandwich wird wie folgt unter Transferpuffer zusammengesetzt (die angegebene Reihenfolge bezieht sich auf die Anordnung von der Anode aus betrachtet):

Zunächst eine Schwamm-Matte gefolgt von 2 Filterpapieren, der 10s in Methanol aktivierten Membran, dem Gel mit den aufgetrennten und SDS-beladenen Proteinen, 2 Filterpapiere und eine Schwamm-Matte. Das in einer Plastikvorrichtung entsprechend zusammengesetzte Sandwich wird in die *wetblot*-Apparatur (BIO-RAD) eingespannt und in einen Tank eingebracht, der mit kaltem Transfer-Puffer (1x) gefüllt ist.

1x Transfer-Puffer	25mM Tris
	192mM Glycin
	20% Methanol

Zusätzlich werden ein Kühlakku und ein Rührfisch eingesetzt, da die Temperatur während des Transfers stark ansteigt und so die Apparatur vor Überhitzung geschützt werden kann. Der *wetblot* wird auf Eis und auf dem Magnetrührer bei 100V für 1h durchgeführt.

4.3.6 Immundetektion von Proteinen auf einer Trägermembran

Die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden.

Die Immunodetektion ist eine sensitive Nachweismethode für Proteine. Diese Methode beruht auf der immunologischen Reaktion zwischen einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) mit seinem Antigen (Protein). Zur Visualisierung dieses Antikörper/Antigen-Komplexes dient ein gegen den Primärantikörper gerichteter, enzymgekoppelter Sekundärantikörper. Dadurch, dass an einen Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper binden, wird eine Signalverstärkung erreicht, die zusammen mit der hohen Sensitivität der Enzymreaktion die Empfindlichkeit dieses Nachweissystems ausmacht. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Primärantikörper aus verschiedenen Organismen in Kombination mit geeigneten Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern eingesetzt.

Nach dem Elektroblob wird die „proteinbeladene“ PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen ÜN bei 4°C mit einer fettfreien Milchlösung (5% (w/v) Milchpulver in PBST) inkubiert. Die abgesättigte Membran wird im Folgenden für 1h mit dem in Milch/ PBST verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten (je 5-10min mit PBST) zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Primärantikörpern wird die Membran für eine weitere Stunde mit einem entsprechend in Milch/ PBST verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wird erneut 3x gewaschen (s.o) und stand danach für die Nachweisreaktion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (Millipore) zur Verfügung.

PBST	1x PBS
	0,1% Tween-20

Die Signalentstehung bei diesem Entwicklersystem beruht auf einer verstärkten Peroxidasekatalysierten Chemilumineszenz. Dabei wird das Substrat Luminol von dem Enzym HRP, einer Peroxidase, oxidiert. Oxidiertes Luminol emittiert Licht, das mittels eines Abbildungssystems (Versadoc) dokumentiert werden kann.

In den meisten Fällen reichen Expositionen zwischen 5s und 5min aus, um ausreichende Signalintensitäten zu erreichen. Hierzu wird die Membran in einer großen Petrischale mit einem Gemisch aus gleichen Anteilen der Detektionslösungen Luminol und Peroxid benetzt, 1min inkubiert und anschließend im Versadoc analysiert.

Wurde mittels der mitgeführten Ladekontrolle eine ungleiche Beladung der verschiedenen Spuren festgestellt, wurden die Signalintensitäten der einzelnen Spuren ermittelt. Die Markierung erfolgte über das *volume contour tool*, die Berechnung über den *volume analysis report*. Die erhaltenen Werte wurden anschließend mit der jeweiligen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (*ratio*).

4.4 Arbeiten mit Bakterien

4.4.1 Vermehrung und Lagerung

Das Wachstum von *Escherichia coli* XL1Blue erfolgt bei 37°C entweder als Schüttelkultur in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten, jeweils versetzt mit einem geeigneten Antibiotikum. Auf letzteren können die Bakterien bis zu 3 Wochen bei 4°C gelagert werden.

LB-Medium (Luria-Bertani)	10g/l	Bactotrypton	
	5g/l	Hefe-Extrakt	
	10g/l	NaCl	autoklaviert
LB-Agar auf Platten	10g/l	Bactotrypton	
	5g	Hefe-Extrakt	autoklaviert;
	5g/l	NaCl	nach Zugabe geeigneter Antibiotika wird der
	15g/l	Agar	Agar in Petrischalen gegossen

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wird einer LB-Bakteriensuspension Glycerol (87%) bis zu einer Endkonzentration von 15 Prozent zugegeben. Die Suspension wird als Glycerolstock bei -80°C gelagert.

Glycerolstock	10%	Bakteriensuspension
	15%	Glycerol
	75%	LB-Medium

4.4.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Zu 5µl eines Ligationsansatzes werden 60µl kompetente Bakterienzellen (Glycerolstock, auf Eis aufgetaut) gegeben. Inkubation erfolgt für 30min auf Eis. Danach wird die Bakteriensuspension für exakt 90 Sekunden im Wasserbad auf 42°C gebracht; durch den Hitzeschock können die Bakterien die DNA aufnehmen. Danach werden die Ansätze erneut für 5min auf Eis gestellt, damit sich die Zellwände wieder schließen. Anschließend werden 100µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen für weitere 10min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dies dient dem Aufbau der Antibiotikaresistenz. Die Zellsuspension wird anschließend unter der Flamme eines Bunsenbrenners auf einer LB-Agarplatte, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausgestrichen. Dann wird bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Selektion der Bakterienklone erfolgt über die Antibiotikaresistenz, die das transformierte Plasmid vermittelt, und/oder über Blau-Weiß –Selektion.

Der Agar muss für diese Art der Selektion zusätzlich zum Antibiotikum mit dem Laktose-Analogen IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid, 0,5mM) und dem normalerweise farblos vorliegenden Farbstoff X-Gal [(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-β-D-galactosid, 0,01%] versetzt worden sein. Die Polylinker-Region (MCS, *multiple cloning site*) des entsprechenden Plasmids liegt im *LacZ*-Gen. Ohne Insertion eines DNA-Fragments in das Plasmid erscheinen die gewachsenen Kolonien blau, da das *LacZ*-Gen für die β-Galaktosidase durch Insertion nicht zerstört wird. Das Enzym wird exprimiert und kann sein Substrat X-Gal spalten. So entsteht das blaue 5-Brom-4-chlor-indigo. Ist die Ligation von Insert und Vektor jedoch erfolgreich gewesen, erscheint die gewachsene Kolonie weiß, da das Gen durch die Insertion zerstört ist.

4.5 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

Für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen werden ausschließlich sterile Puffer, Medien, Glasgeräte und Zentrifugenröhrchen verwendet. Alle Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen in Sterilboxen durchgeführt.

4.5.1 Haltung und Lagerung

Alle verwendeten Zelllinien werden in einem begasteten Inkubationsschrank (5%iger CO₂-Beimischung) bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

Adhärente Zellen werden auf beschichteten Gewebekulturschalen als Monolayer kultiviert und je nach Wachstumsrate alle zwei bis drei Tage vor Erreichen der Konfluenz wie folgt beschrieben auf neue Schalen aufgeteilt und ausgesät.

Bei adhärennten Zellen wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1xPBS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des Puffers werden die Zellen für 2-5min in Trypsin-Lösung inkubiert. Die proteolytische Reaktion des Trypsins bewirkt das Ablösen der Zellen von den Gewebekulturschalen. Die Reaktion wird durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt, die abgelösten Zellen werden vorsichtig resuspendiert und abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 auf neue Kulturschalen ausgesät.

10x PBS-Puffer	60mM Na ₃ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7,4 10mM KH ₂ PO ₄ 1M NaCl 20mM KCl autoklaviert
Trypsin/EDTA-Lösung	137mM NaCl 2,6mM KCl 1mM KH ₂ PO ₄ 6mM Na ₂ HPO ₄ 0,125% Trypsin 0,6mM CaCl ₂ 0,4mM MgSO ₄ autoklaviert

Für die hier verwendeten Zelllinien besteht das Kulturmedium aus den Grundkomponenten FCS (Fetales Kälberserum, 10%) und Penicillin/Streptomycin-Lösung (1%) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) oder F-12 (Ham).

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	13,38g/l DMEM (Gibco) 3,7g/l Na-Bicarbonat 25mM HEPES autoklaviert
F-12 (Ham)	10,625 g/l F-12 (Gibco) 1,175g/l NaHCO ₃ autoklaviert

Die Menge der verschiedenen Lösungen richtet sich nach den verwendeten Kulturschalen:

	Medium	1xPBS	Trypsin
Maxi-Schale	20ml	10ml	2,5ml
10cm-Schale	10ml	5ml	1,5ml
6well-Schälchen	2ml	1ml	250µl

Die Lagerung von Zellen über einen längeren Zeitraum erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Zum Einfrieren der Zellen werden diese aus konfluente Maxi-Schalen geerntet und in 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zentrifugation (5min, 800rpm, 37°C) werden die Zellen pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1ml frischem Medium sorgfältig resuspendiert. Die Zellsuspension wird nun in 2ml Einfriergefäße (Kryotube) pipettiert, dann wird 1ml Einfriermedium zugegeben und die Zellen in einem Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium	45% Kulturmedium 40% FCS 5% DMSO
-----------------------	----------------------------------------

Zum Auftauen von eingefrorenen Zellen werden die Zellen bei RT aufgetaut und in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt, in das 8ml Kulturmedium vorgelegt worden sind. Durch Zentrifugation (5min, 1000rpm, 37°C) werden die Zellen pelletiert und so von dem Einfriermedium befreit. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf einer Maxi-Schale ausgesät.

4.5.2 RNA-Transfer in Zellen (RNA-Interferenz)

Das Prinzip der RNA-Interferenz durch doppelsträngige RNA-Moleküle wurde erstmals im Modellorganismus *C. elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Kleine doppelsträngige RNA-Moleküle so genannte siRNAs (*small interfering RNAs*) mit einer Länge von 21 bis 22nt binden spezifisch an mRNA, was zum Abbau dieser führt (Elbashir et al., 2001). Das entsprechende Protein kann nicht mehr gebildet werden.

Dieses Prinzip wird heute in der Molekularbiologie gezielt für die Herunterregulierung der Expression (*knockdown*) bestimmter Gene in eukaryotische Zellen verwendet, indem eine spezifische siRNA eingebracht wird.

Für den Transfer werden die Zellen in serumfreiem Medium ohne Zusatz von Antibiotika gehalten (OPTI®MEM). Inkubation des Transferagens (Lipofectamin 2000) erfolgt in 250µl OPTI®MEM für 15min. Unterdessen werden 200-300pmol siRNA-Duplices in ebenfalls 250µl OPTI®MEM verdünnt. Erneute Inkubation für 15min erfolgt nach Vereinigung der beiden Lösungen. Anschließend wird der Transferansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 7h (CTCF) oder 24h (WDR5) inkubiert.

Danach erfolgt die weitere Inkubation der Zellen bis zur Ernte (für die anschließende Extraktion von RNA, Protein und Chromatin) nach Waschen mit 1xPBS in DMEM. Der Nachweis eines erfolgreichen *Knockdowns* erfolgt auf Proteinebene (s. 4.3).

4.5.3 DNA-Transfer in Zellen

Um für jeden Transfer konstante Bedingungen zu erreichen, wird jeweils die gleiche Anzahl Zellen pro Zellkulturschale ausgesät. Die Menge an Zellen und der Schalendurchmesser richten sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit und Größe der Zellen. Die verwendete Plasmid-DNA aus einer Maxipräparation wird vor dem Transfer durch Gelelektrophorese auf Reinheit und Konzentration überprüft.

Für den DNA-Transfer werden die Zellen so ausgesät, dass sie bei Transfektion zu 70% konfluent sind. Werden die Zellen mittels Mikroskopie analysiert, werden in die einzelnen Schälchen Deckgläschen gegeben, auf denen die Zellen adhärent wachsen können. Für den Transfer werden verschiedene Mengen unterschiedlicher Expressionsvektoren verwendet.

Alle Ansätze werden mit dem Träger-Plasmid pBSK auf die gleiche Gesamtmenge an DNA eingestellt.

4.5.3.1 Calciumphosphat-Präzipitation

Bei dieser Methode wird die zu transfizierende Plasmid-DNA zusammen mit Calciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) präzipitiert. Die gebildeten Mischkristalle senken sich auf die adhärennten Zellen. Über Phagozytose nehmen die Zellen die DNA in dieser Form auf.

Pro Ansatz wird die DNA-Lösung mit MilliQ auf ein Gesamtvolumen von 183,6µl gebracht. Dann werden 21,6µl 10xHEBS zugegeben und gut durchmischt. Anschließend werden 10,8µl 2M CaCl_2 zugegeben und erneut gut durchmischt.

10x HEBS-Puffer	1,37M NaCl
	0,2M HEPES
	7mM Na_2HPO_4
	exakt pH 7,2; sterilfiltrieren

Durch das Durchmischen beider Reagenzien bilden sich Kristalle, deren Größe von der Länge der Inkubation, der Temperatur und dem pH-Wert der Lösung abhängt. Nach 12min Inkubation bei RT wird die DNA- CaPO_4 -Lösung auf die vorbereiteten Zellen pipettiert. Die gebildeten Kristall-DNA-Komplexe können lichtmikroskopisch beobachtet werden. Sie setzen sich nach einiger Zeit auf den Zellen ab und werden zum Teil phagozytiert. Nach Inkubation der Zellen mit den DNA-Kristall-Komplexen für 16h wird das alte Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und die Schalen mit frischem Medium beschickt. Nach weiteren 48h Inkubation werden die Zellen untersucht.

4.5.3.2 DNA-Transfer in Zellen mittels jetPEI™

Bei dieser Transfektionsmethode wird ein Polymer-basiertes DNA-Transfektionsreagenz verwendet, das hauptsächlich aus linearem Polyethylenimin (PEI) besteht. Gearbeitet wird nach Protokoll des Herstellers (*Transient transfection protocol for adherent cells*).

4.6 Analyse des Chromatinstatus und Kolokalisierung potentieller Interaktionspartner

4.6.1 LacO-LacI-Modellsystem

Um direkt den isolierten Effekt eines Faktors auf Chromatin zu untersuchen, ohne den Genomkontext berücksichtigen zu müssen, kann ein artifizielles DNA-Array als Modellsystem verwendet werden - das so genannte LacO-LacI-Modellsystem.

Grundlage des Modellsystems sind U-2OS-Zelllinien, die eine unbekannte Anzahl an Lac-Operator (LacO)-Sequenzen aus dem Lac-Operon von *E.coli* in ihrem Genom enthalten (Jegou et al., 2009 und Abb. 4.1). Dieser LacO-Array kann direkt durch Bindung eines Fusionsproteins aus Lac-Repressor (Lac) und eGFP (*enhanced GFP*, nachfolgend GFP genannt; $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 509\text{nm}$) oder mCherry ($\lambda_{\text{ex}} = 587\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610\text{nm}$) im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Gegenfärbung des Kerns erfolgt mittels Hoechst-Farbstoff ($\lambda_{\text{ex}} = 352\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455\text{nm}$).

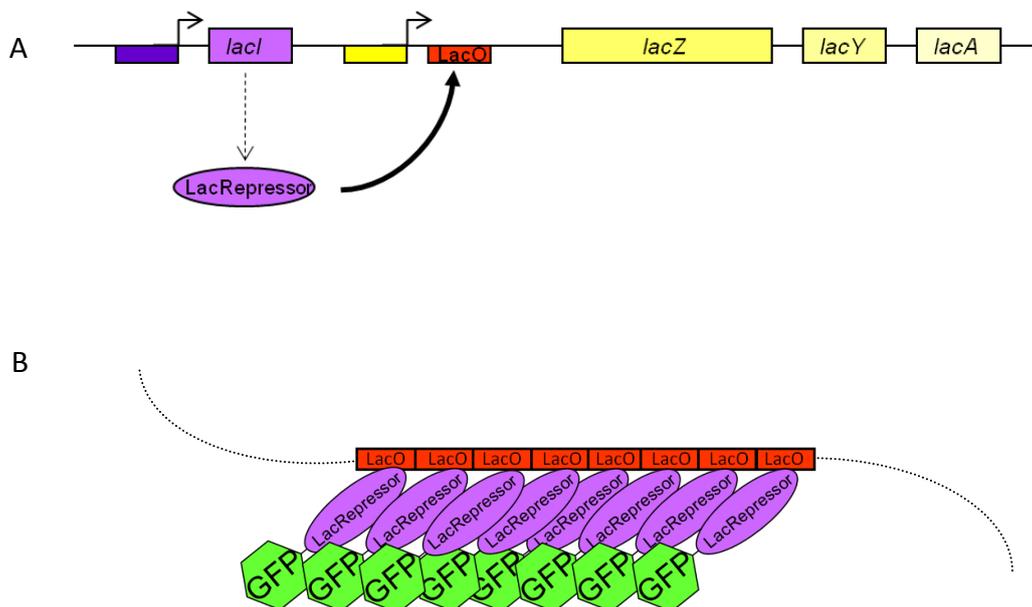


Abb. 4.1 Schematische Darstellung des LacO-LacI-Modellsystems

A. Das Lac-Operon von *E.coli*. Der Lac-Repressor (violette Oval), kodiert durch *lacI*, bindet mit hoher Affinität an die Lac-Operator (*LacO*)-Sequenz (rotes Rechteck); **B.** Multimerisierte *LacO*-Sequenzen (rote Rechtecke) können von GFP-Lac-Fusionsproteinen (grüne Sechsecke an violettem Oval) gebunden werden, um den Array zu visualisieren.

Dem verwendeten Lac-Repressor-Protein fehlt die C-terminale Domäne, die für seine Tetramerisierung verantwortlich ist (Chen and Matthews, 1992). Der Repressor bindet daher als Dimer nur jeweils eine Lac-Operator-Sequenz.

Dieses System erlaubt somit mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die direkte Untersuchung des Einflusses von CTCF als Fluorophor-markiertes Lac-Fusionsprotein auf Chromatin, da mittels indirekter Immunfluoreszenz oder auch Chromatin-Immunpräzipitation der Chromatinstatus untersucht werden kann. Zusätzlich ist ebenfalls per indirekter Immunfluoreszenz oder Kotransfektion eines anderen, ebenfalls Fluoreszenz-markierten Faktors eine Untersuchung von Interaktionspartner möglich.

Zusätzlich bietet das System außerdem die Möglichkeit, die Bindung der Lac-Fusionsproteine an den Array zu regulieren. Dies geschieht über die Zugabe von IPTG (Fieck et al., 1992).

4.6.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die folgenden Angaben gelten für 6well-Schalen. Die Zellen wachsen auf Deckgläschen (\emptyset 25mm) in Gewebekulturschalen und werden während der Prozedur in den Gewebekulturschalen belassen. Gearbeitet wird möglichst im Dunkeln (Abdecken mit Alufolie) und bei Raumtemperatur.

Die Zellen werden 1x in 1xPBS (1ml) gewaschen, dann mit 4% PFA für 10-20min fixiert. Anschließend wird 2x mit 1xPBS gewaschen. Darauf folgt die Permeabilisierung der Zellen mit 0,15% Triton in 1xPBS für 10min. Um unspezifische Antikörper (AK)-Bindungen zu verhindern, wird für 30-60min mit Blockpuffer inkubiert.

Blockpuffer	2% BSA in Waschpuffer
--------------------	-----------------------

Dann erfolgt die Erstantikörper-Inkubation in entsprechender Konzentration in Blockpuffer für 45min. Dazu wird die Antikörperlösung (100 μ l) auf Parafilm gegeben und die Deckgläschen mit den Zellen nach unten luftblasenfrei auf die AK-Lösung gelegt. Während der Inkubation befinden sich die Zellen in einer feuchten Kammer.

Waschpuffer	0,05% Tween-20 in 1xPBS
--------------------	-------------------------

Anschließend wird 3x 5min mit Waschpuffer gewaschen. Dazu werden die Deckgläschen wieder in die Gewebekulturschalen gegeben.

Die Inkubation mit Zweitantikörper erfolgt ebenfalls auf Parafilm in einer feuchten Kammer, der AK wird wieder in Blockpuffer verdünnt. Nach 30-45min wird wiederum 3x für 5min mit Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgt die DNA-Gegenfärbung, um den Zellkern kenntlich zu machen. Dies erfolgt ebenfalls auf Parafilm in einer feuchten Kammer mit 2,5µg/ml Hoechst-Lösung in 1xPBS. Es wird einmal mit 1xPBS gewaschen, dann mit 90%igem Ethanol 1min dehydriert. Nachdem die Zellen luftgetrocknet sind, können sie in Fluoromount-G (11µl) eingebettet werden.

Um die Spezifität der indirekten Immunfärbung zu testen, wird immer eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper mitgeführt. So kann eine unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper ausgeschlossen werden.

4.6.3 Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Einfluss von Faktoren auf den Array: Größenauswertung

Das in 4.6.1 beschriebene Modellsystem kann für die Untersuchung des direkten Einflusses von Faktoren auf den LacO-Array mittels Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

Wichtig für die Untersuchung ist, dass die Zellen auf Deckgläschen gehalten werden. Auf diesen können sie gut mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert und fixiert werden. Für die anschließende Analyse werden die Zellen auf Objektträgern eingebettet, um dann unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert zu werden (Bild-Aufnahme). Danach erfolgt die Auswertung mit Hilfe des Programms Volocity® (Improvision®) (Abb. 4.2).

Dazu werden die einzelnen Bilder geöffnet, unter dem Fenster *Measurements* die Auswahl *Find objects by intensity* getroffen und der entsprechende Aufnahmekanal (*channel*) gewählt. Anschließend wird der Schwellenwert für die Intensität festgelegt; die Messung der Fläche (*area*) erfolgt automatisch. Die Daten werden in das Programm Excel exportiert und abschließend mit dem Statistikprogramm WinSTAT ausgewertet.

Die Darstellung der Daten erfolgt als Box-Whisker-Plot. Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgt mittels des Chi-Quadrat-Tests. Die statistische Signifikanz der erhaltenen Werte wird daraufhin mittels des U-Tests (Mann-Whitney) untersucht, da dieser

statistische Test unabhängig von einer Normalverteilung der Werte angewendet werden kann.

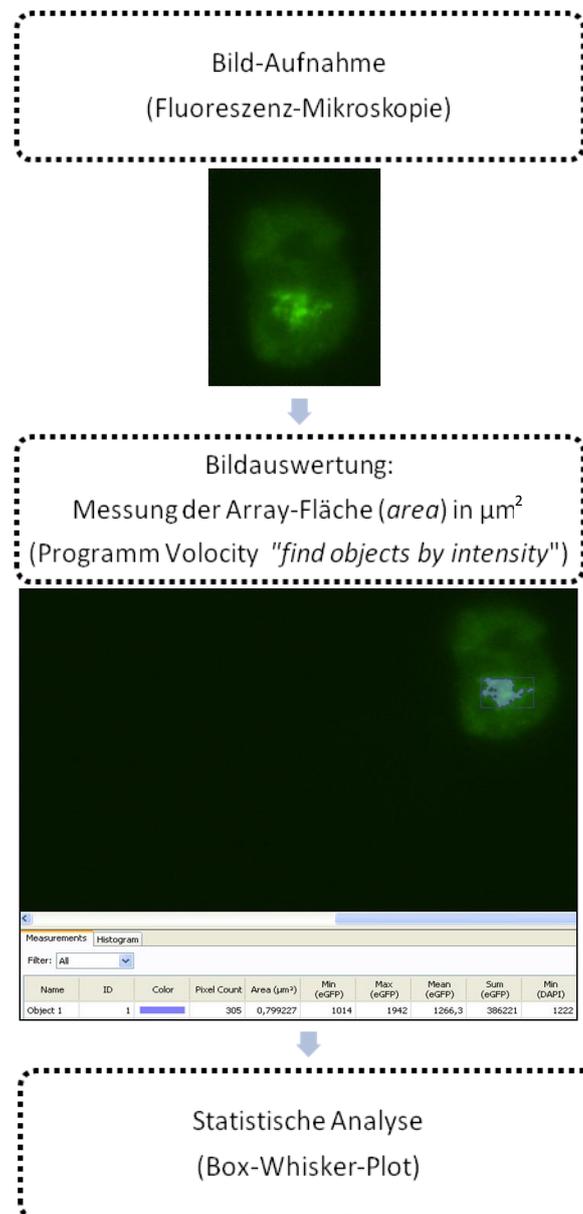


Abb. 4.2: Fließschema Größenauswertung

Untersuchung von Chromatinstatus oder Interaktion: **Kolokalisierung**

Das LacO-LacI-Modellsystem kann darüber hinaus auch für die Analyse von Histonmodifikationen oder Interaktionspartnern am Array genutzt werden. Dabei kann man sich entweder einer Kotransfektion zweier Faktoren oder der einfachen Transfektion eines Faktors und der anschließenden Detektion des anderen Proteins durch indirekte

Immunfluoreszenz bedienen. Wichtig dabei ist nur, dass beide Faktoren durch unterschiedliche Fluorophore gekennzeichnet sind, um die Lokalisierung beider Faktoren in der Zelle unterscheiden zu können. Mögliche Kombinationen sind dabei GFP mit mCherry (Kotransfektion) oder dem Alexa-Farbstoff A-568 (Immunfärbung), da sie unterschiedlich angeregt werden und auch in verschiedenen Filtern detektiert werden.

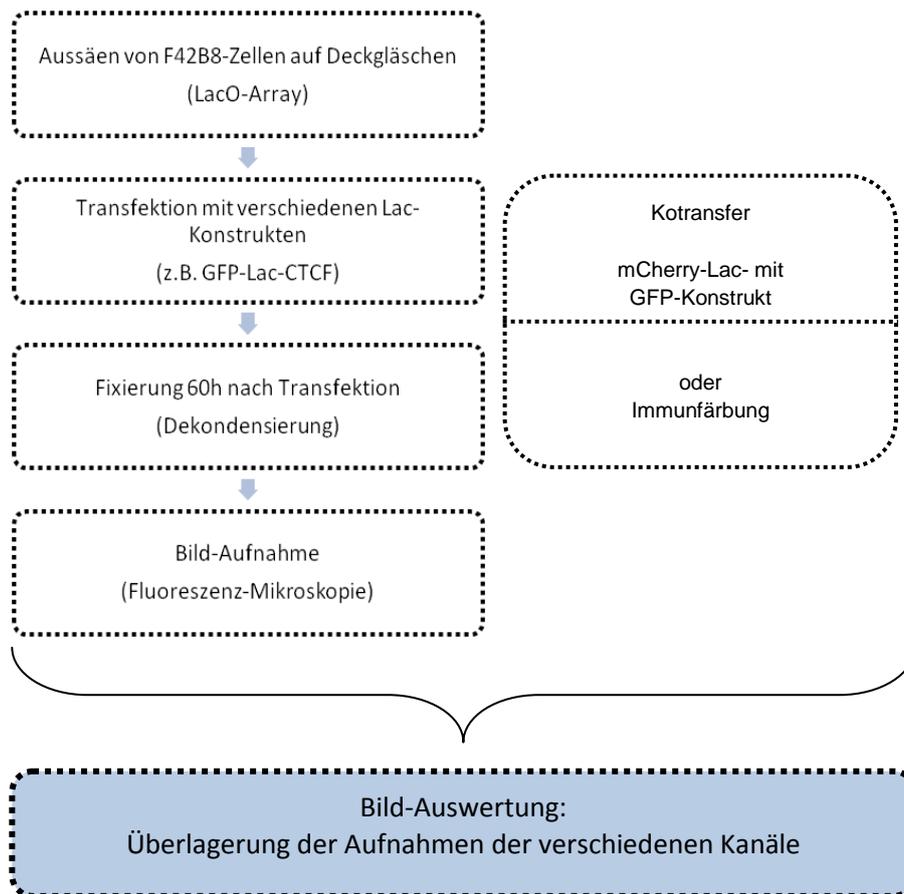


Abb. 4.3: Fließschema Kolokalisierung

Nötig ist auch hier, dass die Zellen auf Deckgläschen gehalten werden. Auf diesen werden sie mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und können dann fixiert (Kotransfektion) oder einer Immunfärbung unterzogen werden. Für die Analyse im Fluoreszenzmikroskop werden die auf den Deckgläschen wachsenden Zellen auf Objektträgern eingebettet und können so einfach analysiert und dokumentiert (Bild-Aufnahme) werden.

Für die Auswertung, ob die untersuchten Faktoren interagieren, werden die Aufnahmen der beiden verschiedenen Kanäle übereinandergelegt (Abb. 4.3).

4.6.4 Chromatin-Immunopräzipitation

Diese Methode wurde entwickelt, um die direkte Interaktion von Proteinen mit einem spezifischen Bereich genomischer DNA *In vivo* nachweisen zu können. Grundlage dabei ist die stabile, aber reversible Vernetzung von Protein und DNA (*crosslinking*), gefolgt von einer spezifischen Protein-Isolierung mittels Immunreaktion und Aufhebung der Vernetzung. Der Nachweis der Interaktion erfolgt über eine spezifische Amplifizierungsreaktion (PCR).

Gearbeitet wird stets mit Filtertips, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Puffer müssen frei von DNA sein.

Im ersten Schritt erfolgt das *Crosslinking* des Chromatins. Dies geschieht, indem 1%ig Formaldehyd auf die Zellen in der Gewebekulturschale gegeben und 10min bei RT inkubiert wird. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 1/7VT 1M Glycin und Inkubation für 5min ebenfalls bei RT.

Nach 2x Waschen der Zellen mit kaltem 1xPBS wird 1ml 1xPBS mit 1mM PMSF auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber in ein 1,5ml-Eppendorf-Gefäß geerntet.

Nach dem Pelletieren der Zellen (5min, 2000rpm, 4°C) werden diese in 1ml SDS-Lysepuffer ohne Schäumen resuspendiert und in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Lysiert wird für 15min auf Eis.

SDS-Lysepuffer	1% SDS
	10mM EDTA
	50mM Tris-Cl pH 8,1
	frisch zusetzen:
	1mM PMSF, irreversibler Inhibitor für Serinproteasen,
	0,7x <i>Complete Mini</i> Protease-Inhibitor-Cocktail
7x <i>Complete Mini</i>-Stocklösung	1 Tablette in 1,5ml MilliQ lösen

Anschließend wird das Chromatin durch Ultraschall geschert. Dazu wird in Eiswasser bei konstantem Puls sonifiziert (HeLa: 7x Stufe 1 für 10s). Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Proben nicht schäumen. Dann wird das Chromatin wieder in ein 1.5ml-Eppendorf-Gefäß überführt, um die Zelltrümmer herunter zu zentrifugieren (10min, 13000rpm, 4°C). Der Überstand, der das Chromatin enthält, wird im Anschluss in neue Gefäße überführt. Sofort wird der Input vom Überstand abgenommen (10%) und bei -20°C weggefroren.

Bei Bedarf kann das Chromatin ebenfalls eingefroren werden. Dies erfolgt bei -80°C nach Zugabe Glycerol (5%ig). Beim Auftauen muss darauf geachtet werden, dass die Lösung klar ist, bevor weitergearbeitet wird.

Zwischenzeitlich werden $30\mu\text{l}$ Protein G/A-Agarose mit $500\mu\text{l}$ Dilutionspuffer äquilibriert und abzentrifugiert (2min, 2000rpm 4°C). Im Anschluss wird der Überstand verworfen.

Dilutionspuffer	0,01%	SDS
	1,1%	Triton-X-100
	1,2mM	EDTA
	16,7mM	Tris-Cl pH 8,1
	167mM	NaCl

Für das *Preclearing* (Verhindern von unspezifischen Bindungen) wird der Überstand in Dilutionspuffer verdünnt und jeweils 1ml in die vorbereiteten 1,5ml-Eppendorf-Gefäße mit der Protein G/A-Agarose gegeben. Es werden $2\mu\text{g}$ der entsprechenden IgGs zugesetzt. Dann wird 2h bei 4°C rotierend inkubiert.

Zum Entfernen der Protein G/A-Agarose wird 5min bei 2000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dann werden die AK und die jeweiligen Kontroll-IgGs zugegeben. Inkubation erfolgt rotierend bei 4°C und ÜN.

Um die Immunkomplexe an die Protein G/A-Agarose zu binden, wird diese wie oben beschrieben äquilibriert, dann werden die Immunkomplexe zugeben und 2h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend daran folgt das Waschen der an die Protein G/A-Agarose gebundenen Immunkomplexe. Dazu werden jeweils 1ml Puffer zugeben (Reihenfolge der Waschpuffer: Niedrigsalz-, Hochsalz-, LiCl- und 2x mit TE-Puffer), 5min bei 4°C rotierend inkubiert und 2min bei 2000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird jeweils quantitativ abgezogen.

Niedrigsalzpuffer	0,1%	SDS
	1%	Triton-X-100
	2mM	EDTA
	20mM	Tris-Cl pH 8,1
	150mM	NaCl

Hochsalzpuffer	0,1%	SDS
	1%	Triton-X-100
	2mM	EDTA
	20mM	Tris-Cl pH 8,1
	500mM	NaCl
LiCl-Puffer	250mM	LiCl
	1%	NP40
	1%	Deoxycholat
	1mM	EDTA
	10mM	Tris-Cl pH 8,1

Dann werden die an die Protein G/A-Agarose gebundenen Immunkomplexe mit 100µl TE-Puffer versetzt, der Input wird auf 100µl aufgefüllt. Es folgt die Behandlung mit RNase A (10µg, 37°C, 30min), gefolgt von der Zugabe von 0,5%ig SDS und Behandlung mit Proteinase K (0,5mg/ml, 37°C, 4h). Dann erfolgt das reverse *Crosslinking* bei 65°C ÜN. Die Agarose wird abzentrifugiert und 100µl in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Für die Reinigung der DNA wird das *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*-Kit von GE Healthcare verwendet. Gearbeitet wird nach dem *Protocol for purification of DNA from PCR mixtures or an enzymatic reaction*. Eluiert wird mit 50µl Elutionspuffer Typ 4. Zur Analyse der präzipitierten DNA wird jeweils 1µl für die PCR eingesetzt.

4.7 Computergestützte Analyse von CTCF-Barriereelementen

In silico konnte bereits eine Vielzahl an CTCF-Bindestellen als potentielle Barriere-Elemente identifiziert werden (Cuddapah et al., 2009). Dies geschah über chip-ChIP-Analysen in verschiedenen Ziellinien u.a. in HeLa-Zellen. Ein potentielles CTCF-Barriere-Element wurde als CTCF-Bindestelle definiert, die einen heterochromatischen Bereich (identifiziert über chip-ChiP der Histonmodifikation H3K27me3) von einem euchromatischen Bereich (identifiziert über chip-ChiP der Histonmodifikation H2AK5ac) trennt.

In einer anderen Studie konnte mittels Transkriptom-Analyse von HeLa-Zellen gezeigt werden, dass die Expression verschiedener Gene nach *CTCF-Knockdown* ebenfalls herunterreguliert war (Wendt et al., 2008).

Um funktionelle, von CTCF abhängige Barriere-Elemente zu identifizieren, wurden die *in silico* identifizierten CTCF-Barriere-Elemente in HeLa-Zellen mit der Lokalisierung der durch CTCF-*Knockdown* herunterregulierten Gene abgeglichen.

Als Grundlage für diese Analyse diente die humane Genomsequenz aus dem März 2006 (*March 2006 human reference sequence (NCBI Build 36.1)* oder *Mar.2006 NCBI36/hg18* des *International Human Genome Sequencing Consortium*). Um die vorhandenen Daten zu vergleichen, wurden diese in die Nutzeroberfläche des UCSC *Genome Browser* (University of California Santa Cruz; <http://genome.ucsc.edu/>) geladen.

Die Identifizierung der exakten CTCF-Bindestellen-Sequenz erfolgte im Anschluss mit Hilfe der Datenbank für CTCF-Bindestellen (CTCFBDB; <http://insulatordb.utmem.edu/> (Bao et al., 2008)).

4.8 Messung der Reporterogenaktivität mittels Luciferase-Assay

Um das Transaktivierungspotenzial von Faktoren zu untersuchen, wird Luciferase (aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*) als Reportergen verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter Energieverbrauch die oxidative Carboxylierung seines Substrat Luciferin zum Produkt Oxyluciferin. Dabei kommt es gleichzeitig zu einer Emission von Licht (Wellenlänge 562nm), die im Luminometer quantitativ gemessen werden kann. Anhand des im Luminometer gemessenen Lichts (*relative light units, rlu*) kann die Aktivität der Luciferase bestimmt werden. Diese ist abhängig vom Transaktivierungspotential der zu testenden Faktoren.

Das verwendete Reporter-Konstrukt enthält 7x die LacO-Sequenz vor einem SV40-Promotor und dem Luciferase-Gen. Analysiert werden jeweils Triplets.

Da sich die Transfereffizienz in den einzelnen Ansätzen unterscheidet, wird der Vektor pCMV-LacZ jeweils mittransfiziert. Er codiert für die β -Galaktosidase, die das Substrat ONPG (*o*-Nitrophenol- β -Galactopyranosid) umsetzt. Dabei wird *o*-Nitrophenol abgespalten. Diese Reaktion zeigt sich durch einen gelben Farbumschlag. Die Bildung des Reaktionsprodukts lässt sich durch Messung der optischen Dichte der Probe bei 420nm mit dem Spektralphotometer quantifizieren. Die gemessenen Werte sollten im Bereich von 0,1-1 liegen, da die Menge des gebildeten Farbstoffes in diesem Bereich proportional mit dem Messwert korreliert.

Die Zellen werden entsprechend des unten aufgeführten Ansatzes transfiziert.

Transfer-Ansatz pro 6well	1µg Reporter-Konstrukt 0,25µg Lac-Konstrukt 0,6µg pCMV-LacZ
----------------------------------	-------------------------------------------------------------------

Die Zellernte erfolgt 60h nach Transfektion. Dafür wird erst das Medium abgesaugt und 2x mit 1xPBS gewaschen. Dann werden 250µl Lysepuffer pro 6well auf die Zellen gegeben und diese für 15min inkubiert.

Lysepuffer	25mM Tris-Cl pH7,5 8mM MgCl ₂ 1mM EDTA 1% Triton-X-100 15% Glycerol pH 7,1-7,5 frisch DTT zusetzen (1mM)
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Anschließend wird der Zellextrakt in Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

Aktivitätsbestimmung der Luciferase (Luciferase-Assay)

Für den Luciferase-Assay werden je 50µl Proteinextrakt in Glasröhrchen gegeben (Leerwert Lysepuffer) und in das Luminometer gestellt. Das Gerät verfügt über einen Injektor, so dass jeweils 100 µl Luciferin/ATP-Lösung nach dem Einstellen der Probe in das Gerät automatisch zugefügt wurden. Nach einer Inkubation von 5s wurde die Lichtemission über einen Zeitraum von 10s gemessen und als Summe gezählt (Integration). Dies ergibt den Luc-Wert. Dokumentation der Messung erfolgt mittels des FB12-Programms von Berthold (*STLS protocol manager*).

Luciferin/ATP	90mg/l D-Luciferin 0,8mM ATP pH 7
----------------------	-----------------------------------------

Aktivitätsbestimmung der β -Galactosidase (LacZ-Assay)

Um die Transfereffizienz zu normalisieren, wird im Anschluss der LacZ-Assay durchgeführt.

Dazu werden je 50 μ l Proteinextrakt mit 750 μ l Z-Puffer und 200 μ l ONPG versetzt. Inkubiert wird bei 30°C im Dunkeln bis zum Farbumschlag (Leerwert: Lyse-Puffer). Die OD wird im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 420nm gemessen. Die Enzymaktivität (LacZ-Wert) ergibt sich aus der Farbveränderung pro Zeit, d.h. bei genügendem Farbumschlag wurden alle Proben gleichzeitig gemessen. Der LacZ-Wert ergibt sich nach folgender Formel:

$$OD_{420nm} \times 1000 / t$$

Für die Normalisierung des Luc-Wertes wird dieser mit dem entsprechenden LacZ-Wert ins Verhältnis gesetzt (Luc/ LacZ).

Z-Puffer	60mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 40mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 10mM KCl 0,1mM MgSO ₄ x 7H ₂ O pH 7, sterilfiltrieren
ONPG	100mM KPO ₄ pH 7 4g/l ONPG

5 Ergebnisse

5.1 Analyse des Einflusses von CTCF auf Chromatin an endogenen Loci

Ein Isolatorelement mit Barriere-Funktion verhindert die Ausbreitung von Heterochromatin in transkriptionell aktive Bereiche des Genoms. Ist die Barriere-Funktion gestört, führt dies zur Ausbreitung des Heterochromatins über das Isolator-Element hinweg und zur Stilllegung benachbarter Gene. Für das Genom von *Drosophila melanogaster* konnte bereits gezeigt werden, dass dCTCF-Bindestellen oft Bereiche von sogenannten H3K27me3-Blöcken flankieren und dort als funktionelle Barriere dienen, da die Herunterregulierung der dCTCF-Expression diese Barriere zerstört (Bartkuhn et al., 2009).

Um die Funktion von CTCF in der Barriereaktivität zu untersuchen, sollten mittels vorhandener Daten genomweiter Analysen aus HeLa-Zellen potentielle Barriereelemente identifiziert und weiterführend auf ihre CTCF-abhängige Funktionalität untersucht werden.

5.1.1 Identifizierung potentieller funktioneller CTCF-Barriereelemente *in silico*

Für HeLa-Zellen wurde in genomweiten Analysen mittels ChIP-seq (Chromatin-Immunopräzipitation kombiniert mit Sequenzieranalysen) gezeigt, dass ein Teil der identifizierten CTCF-Bindestellen an der Grenze von euchromatischen (markiert durch H2AK5ac-Anreicherung) von heterochromatischen Bereichen (markiert durch H3K27me3-Anreicherung) liegt (Cuddapah et al., 2009). Diese potentiellen CTCF-Barriereelemente sind Zelltyp-spezifisch.

Zusätzlich liegen Daten einer Transkriptom-Analyse nach *Knockdown* von CTCF in HeLa-Zellen vor. Diese zeigen, dass die Herunterregulierung der CTCF-Expression sowohl zum Anstieg als auch zur Verringerung der Expression verschiedener Gene bewirkt. Ein Anstieg der Genexpression konnte für insgesamt 380 Gene gezeigt werden, während 244 Gene durch den CTCF-*Knockdown* herunterreguliert werden (Wendt et al., 2008).

Um funktionelle CTCF-Barriereelemente zu identifizieren, wurden diese Ergebnisse mit den Daten aus den ChIP-seq Analysen hinsichtlich des Chromatinstatus und der die Anwesenheit einer potentiellen CTCF-Barriereelemente mit Hilfe des *Genome Browser* abgeglichen.

Es konnten mittels dieser Computer-gestützten Analyse sechs putativ funktionelle CTCF-Barriereelemente identifiziert werden (Tab. 5.1), die innerhalb von 50kb einen H3K27me3-Block von einem euchromatischen Bereich mit einem nach CTCF-*Knockdown* ebenfalls herunterregulierten Gen trennen.

Tab. 5.1: Identifizierung von sechs potentiellen CTCF-Barriereelemente in HeLa-Zellen

Gen	Beschreibung	Abnahme der Expression	Entfernung zur CTCF-Barriere-Bindestelle	Bemerkungen
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	2,2fach	CTS - TSS: 6,3kb	
EXT2	exostoses (multiple) 2	2,2fach	CTS überlappt mit TSS	
SLC35B2	solute carrier family 35, member B2	2,1fach	CTS - TSS: 10,2kb	ebenfalls beeinflusst von RAD21 RNAi
PDE9A	phosphodiesterase 9A	2fach	CTS - 3'-Ende des Gens: 43kb	
TRIM29	tripartite motif-containing 29	2fach	CTS - 3'-Ende des Gens: 2,9kb	
ATP8B2	ATPase, Class I, type 8B, member 2	2fach	CTS - TSS: 0,8kb bzw. 3kb	
ACCS/ PHACS	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homolog (Arabidopsis)(non-functional)	-	CTS - 3'-Ende des Gens: 11,5kb	stromaufwärts von EXT2 im H3K27me3-Block lokalisiert
AQP10	Aquaporin 10	-	CTS überlappt mit 3'-Ende des Gens	stromaufwärts von ATP8B2 im H3K27me3-Block lokalisiert

Dargestellt sind sechs Gene, deren Expression nach CTCF-*Knockdown* mindestens um das Zweifache herunterreguliert ist, und zwei Gene, die nicht betroffen sind, sowie die Entfernung der TSS bzw. 3'-Ende des Gens zum jeweiligen *in silico*-identifizierten CTCF-Barriereelement; Daten der Transkriptom-Analyse nach CTCF-*Knockdown* stammen von Wendt et al., 2008; genomweite Daten zu H3K27me3-Verteilung und CTCF-Barriere-Bindestellen wurden aus Cuddapah et al., 2009 entnommen. TSS – *transcriptional start site*

Zwei der Genloci wurden für weitergehende Analysen ausgewählt: *EXT2* und *ATP8B2* (Abb. 5.1 A und 5.2 A). Diese zeigen neben einer zweifachen Abnahme der Expression nach Herunterregulierung von CTCF einen geringen Abstand zwischen CTS und TSS. Bei *ATP8B2* liegt die CTS innerhalb von 1kb zum aktiven Promotor, bei *EXT2* überlappt die TSS mit der CTS (Abb. 5.1 und 5.2). *ATP8B2* ist ein Homolog des Faktors *FIC1 (intrahepatic cholestasis*

type 1) und gehört damit zur Proteinfamilie der Typ IV P-Typ-ATPasen. Diese fungieren als ATP-abhängige Aminophospholipid-Translokasen (Harris and Arias, 2003). Mutationen in FIC1 führen zu Erkrankungen der Leber. Betroffen von der CTCF-Herunterregulierung ist die Transkriptvariante 2 (ATP8B2 var.2), während die Transkriptvariante 1 nicht dereguliert wird. EXT2 ist kodiert für eine Glykosyltransferase, die eine Rolle in der Biosynthese von Heparansulfat spielt (Lind et al., 1998).

Zusätzlich wurden zwei Gene, deren Expression nicht durch den CTCF-*Knockdown* betroffen wird, als Kontrollen verwendet (Tab. 5.1).

5.1.2 Der Chromatinstatus der Genloci ATP8B2 und EXT2

Im nächsten Schritt wurde der Chromatinstatus der ausgewählten Genloci durch Chromatin-Immunpräzipitation (Chromatin-IP) verifiziert. Dazu wurde das Chromatin von HeLa-Zellen fixiert und präpariert. Für die anschließende Immunpräzipitation wurden Antikörper gegen Histon H3 sowie gegen verschiedene heterochromatische (H3K9me3, H3K27me3) und euchromatische Histonmodifikation (H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac und H4ac), gegen H2A.Z sowie gegen CTCF und RNA-Polymerase II verwendet. Nach Aufreinigung der präzipitierten DNA wurde diese spezifisch mittels einer PCR-Reaktion amplifiziert. Für den Nachweis der Anreicherung wurden Primerpaare innerhalb des H3K27me3-Blocks sowie für die CTS und die TSS der beiden Gene verwendet. Zusätzlich wurden weitere Stellen innerhalb des Genkörpers analysiert (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Verwendete Primerpaare für die Chromatin-Immunopräzipitation und ihre Zielstelle

	ATP8B2-Locus	EXT2-Locus
Heterochromatin	AQP10; A1/2	ACCS; E01/02
CTS	A3/4	E3/4
Euchromatin	A5/6; A05/06.1	E3/4
Genkörper	A7/8 (alternative TSS)	E5/6

Der Farbcode demonstriert, für welche Chromatinregion ein Nachweis mittels der angegebenen Primerpaare erwartet wird; s. auch Abb. 5.1 A und 5.2 A.

Nach Auswertung des Experiments zeigt sich, dass die Chromatin-IP erfolgreich war.

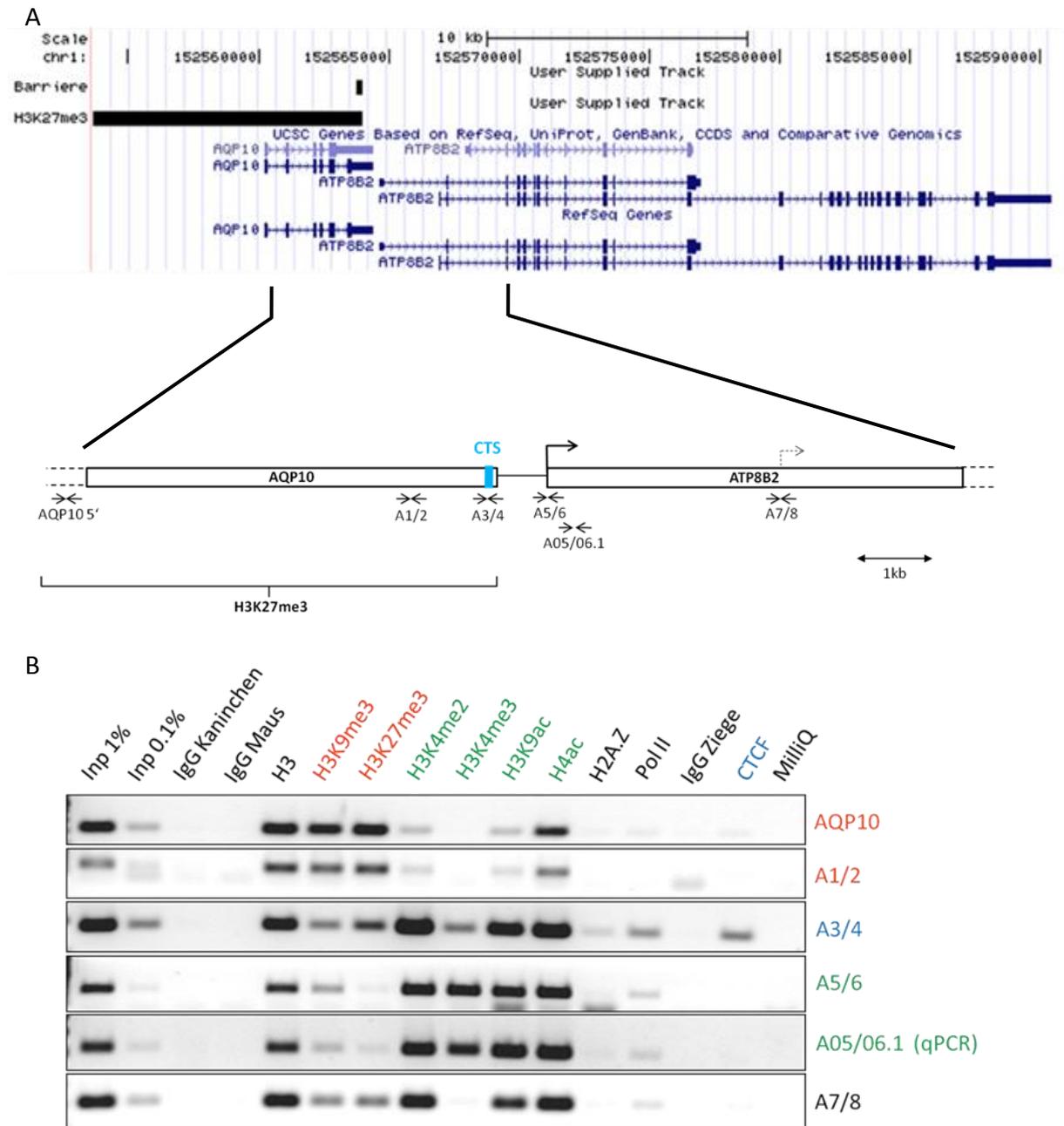


Abb. 5.1: Chromatinstatus des Genlocus ATP8B2 *in silico* und *in vivo*

A. Der ATP8B2-Locus in der Ansicht des *Genome Browser*. Dargestellt ist das putative CTCF-Barriereelement, der H3K27me3-Block und die Gene AQP10 und ATP8B2 mit ihren Transkriptvarianten sowie die schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primerpaare für die Chromatin-IP; **B.** Auswertung der Chromatin-IP mittels konventioneller PCR. Für die IP wurden die angezeigten Antikörper oder Kontroll-IgGs verwendet. Für die PCR wurden die angezeigten Primerpaare verwendet; Inp: Input, MilliQ: Wasserkontrolle der PCR-Reaktion. Der Farbcode demonstriert für welche Antikörper der Nachweis einer Anreicherung mittels der angegebenen Primerpaare erwartet wurde

Der H3-Antikörper, der als Kontrolle mitgeführt worden ist, zeigt für jede untersuchte Region eine Anreicherung von etwa 1% Input. Nur für die CTS in beiden Loci scheint es

etwas weniger zu sein (Abb. 5.1 B und 5.2 B). Für den ATP8B2-Locus zeigt sich, dass im Bereich des H3K27me₃-Blocks eine starke Anreicherung von H3K9me₃ und H3K27me₃ zu beobachten ist. Diese liegt ebenfalls in der Größenordnung von 1% Input (Abb. 5.1 B). Im Bereich der CTS ist eine Abnahme der beiden heterochromatischen Histonmodifikationen zu vermerken. Dafür liegen H3K4me₂, H3K9ac, sowie H4ac stark angereichert vor. Ebenso ist eine spezifische Bindung von CTCF zu detektieren (Abb. 5.1 B). Diese euchromatischen Modifikationen sind ebenfalls im Bereich der TSS der Transkriptionsvariante 2 als auch Transkriptionsvariante 1 angereichert.

H3K4me₃ ist im Gegensatz dazu nur im Bereich des aktiven Promotors zu detektieren (Variante 2). Die Promotorregion von Variante 1, die nicht in HeLa-Zellen exprimiert wird (Wendt et al. 2008), weist zusätzlich auch wieder höhere Level der heterochromatischen Modifikationen auf. Für H2A.Z lässt sich nur eine leichte, aber spezifische Anreicherung im Bereich der CTS beobachten. RNA-Polymerase II wird sowohl im Bereich der TSS als auch über den gesamten Genkörper in geringen Mengen detektiert (Abb. 5.1 B).

Die H4ac-IP ist etwas problematisch, da diese Modifikation ebenfalls im heterochromatischen Block auftaucht. Dort liegen die Signale jedoch unter 1% Input, während sie im euchromatischen Bereich über 1% Input liegen.

Für den EXT2-Locus zeigt sich eine ähnliche Tendenz. Im Bereich des H3K27me₃-Blocks ist eine starke Anreicherung von H3K9me₃ und H3K27me₃ zu beobachten. Diese liegt für H3K9me₃ in einer Größenordnung von 1% Input, für H3K27me₃ ist die Anreicherung im Bereich des ACCS-Gens etwas geringer, im intergenischen Bereich aber genauso stark (Abb. 5.2 B). Im Bereich der CTS ist auch in diesem Locus eine Abnahme der beiden heterochromatischen Histonmodifikationen zu vermerken. Dafür liegen H3K4me₂, H3K9ac, H4ac stark angereichert vor (über 1% Input). H3K4me₃ ist ebenfalls stark angereichert, da hier die CTS mit der TSS überlappt. Ebenso ist eine spezifische Bindung von RNA-Polymerase II und CTCF zu detektieren (Abb. 5.2 B). Für H2A.Z lässt sich hier keine Anwesenheit im Bereich der CTS beobachten. Die euchromatischen Modifikationen H3K4me₂, H3K9ac, H4ac liegen ebenfalls im Bereich des Genkörpers angereichert vor. (Abb. 5.2 B).

Die H4ac-IP ist auch hier etwas problematisch, da diese Modifikation ebenfalls im heterochromatischen Block auftaucht. Dort liegt die Signalstärke jedoch unter 1% Input, während sie im euchromatischen Bereich deutlich über 1% Input liegt.

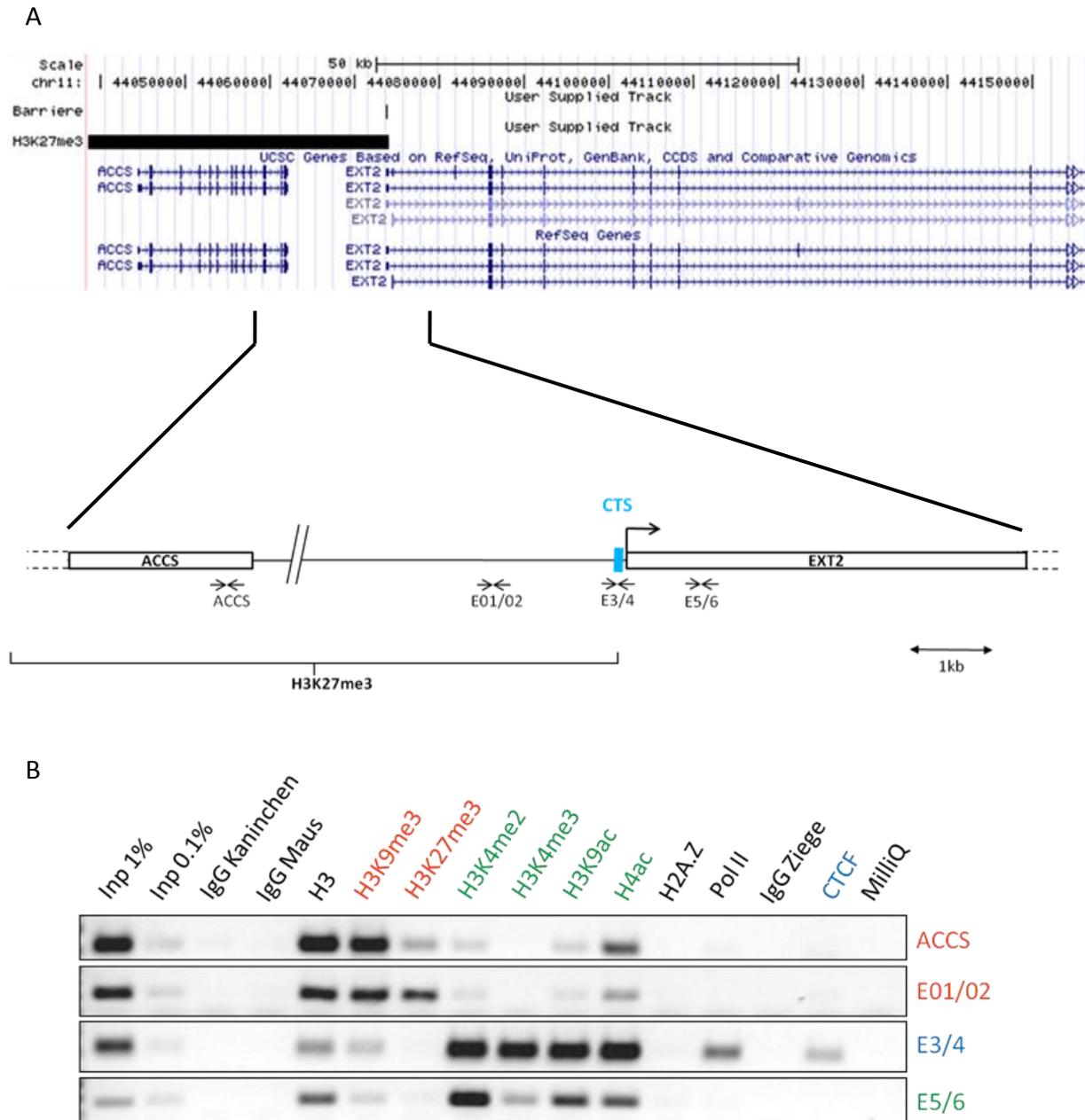


Abb. 5.2: Chromatinstatus des Genlocus EXT2 *in silico* und *in vivo*

A. Der EXT2-Locus in der Ansicht des *Genome Browser*. Dargestellt ist das putative CTCF-Barriereelement, der H3K27me3-Block und die Gene ACCS und EXT2 sowie die schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primerpaare für die Chromatin-IP; **B.** Auswertung der Chromatin-IP mittels konventioneller PCR. Für die IP wurden die angezeigten Antikörper oder Kontroll-IgGs verwendet. Für die PCR wurden die angezeigten Primerpaare verwendet; Inp: Input, MilliQ: Wasserkontrolle der PCR-Reaktion. Der Farbcode demonstriert, für welche Antikörper der Nachweis einer Anreicherung mittels der angegebenen Primerpaare erwartet wurde.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass CTCF in den beiden untersuchten Loci in der Tat an der Grenze zwischen einer heterochromatischen und einer euchromatischen Region gebunden ist.

5.1.3 Sowohl EXT2 als auch die Transkript-Variante 2 von ATP8B2 werden in HeLa-Zellen exprimiert

Die Befunde zur Untersuchung des Chromatinstatus der beiden Kandidaten-Loci bestätigen die ChIP-seq-Analysen: die jeweilige CTS befindet sich in HeLa-Zellen an der Grenze zwischen einem heterochromatischen und einem euchromatischen Chromatinbereich. Um weiterführende Analysen zur Barrierefunktion von CTCF an diesen CTS durchführen zu können, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die beiden Kandidatengene in HeLa-Zellen tatsächlich exprimiert werden.

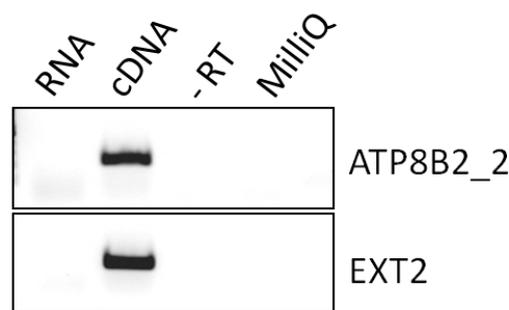


Abb. 5.3: Die Transkriptvariante 2 von ATP8B2 und EXT2-mRNA können in HeLa-Zellen detektiert werden

Expressionsanalyse mittels reverser Transkription. RNA aus HeLa-Zellen wurde extrahiert und anschließend zur Herstellung von cDNA einer reversen Transkriptionsreaktion unterzogen. Die anschließende Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primern für ATP8B2 var.2 (ATP8B2_2) und EXT2.; -RT: Reverse Transkription ohne RNA, MilliQ: Wasserkontrolle der Amplifikation.

Dafür wurde RNA aus HeLa-Zellen extrahiert und einer reversen Transkriptionsreaktion unterzogen. Diese wurde anschließend mittels konventioneller PCR auf Vorhandensein von cDNA analysiert. Die verwendeten Primerpaare dafür waren jeweils spezifisch für ATP8B2 var.2- oder EXT2-cDNA. Die Auswertung erfolgte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung. Sowohl ATP8B2 var.2-spezifische als auch EXT2-spezifische cDNA konnte amplifiziert werden (Abb.5.3). Als Negativkontrolle für die Amplifizierung wurde die präparierte RNA mitgeführt. Hier konnte kein Material amplifiziert werden. Beide Kandidatengene sind demnach auf RNA-Ebene in HeLa-Zellen exprimiert.

5.1.4 Führt die Herunterregulierung der CTCF-Expression zu einer Änderung des Chromatinstatus an den beiden Genloci?

Nach der Überprüfung des Chromatinstatus und der Expression der von ATP8B2 und EXT2 präsentieren sich diese als geeignete Kandidatengene für die Analyse der Barrierefunktion von CTCF. In weiterführenden RNAi-Analysen sollte daher untersucht werden, ob der beobachtete Einfluss einer CTCF-Herunterregulierung auf die Expression der beiden Gene mit einer Änderung der Chromatinstruktur einhergeht, i.e., ob eine Ausbreitung von Heterochromatin über die CTS hinweg der Grund für die Deregulation der beiden Gene ist.

5.1.4.1 Eine Herunterregulierung der CTCF-Expression in HeLa-Zellen ist prinzipiell möglich

Für diese Art der Untersuchung musste daher erst ein *Knockdown* von CTCF in HeLa-Zellen etabliert werden. Dafür wurden HeLa-Zellen für 7h mit insgesamt 300pmol CTCF-spezifischen siRNAs (kd) sowie einer Kontroll-RNA (ctrl) in behandelt. Eine längere RNAi-Behandlung der Zellen ist aufgrund cytotoxischer Effekte nicht möglich. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 3 oder 6 Tagen. Für die Expressionsanalyse zur Kontrolle einer erfolgreichen CTCF-Herunterregulierung wurden Kernproteine extrahiert, um den Effekt des *Knockdowns* auf Proteinebene zu kontrollieren.

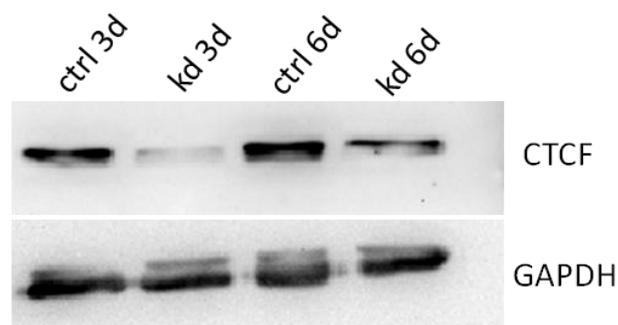


Abb. 5.4: Ein *Knockdown* von CTCF ist in HeLa-Zellen möglich

Expressionsanalyse mittels Immundetektion. HeLa-Zellen wurden für 7h mit CTCF-spezifischer siRNA (kd) oder einer Kontroll-RNA (ctrl) behandelt. Präparation des Kernextraktes erfolgte nach 3d oder 6d. Der Proteinextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (20µg pro Spur), auf eine Trägermembran übertragen und mittels eines spezifischen anti-CTCF-Antikörpers detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von GAPDH.

Vergleicht man den Proteinextrakt siRNA-behandelter Zellen mit der Kontrolle, lässt sich eine deutliche Abnahme der Intensität der Signale nach 3d beobachten; nach 6d erreicht die Menge an CTCF fast wieder ein normales Level (Abb. 5.4). Die Ladekontrolle mittels Verwendung des GAPDH-Antikörpers zeigt, dass das verwendete Material in gleichen Mengen eingesetzt wurde.

Die Herunterregulierung der CTCF-Expression in HeLa-Zellen ist demnach nach 3d auf Protein-Ebene sehr effektiv.

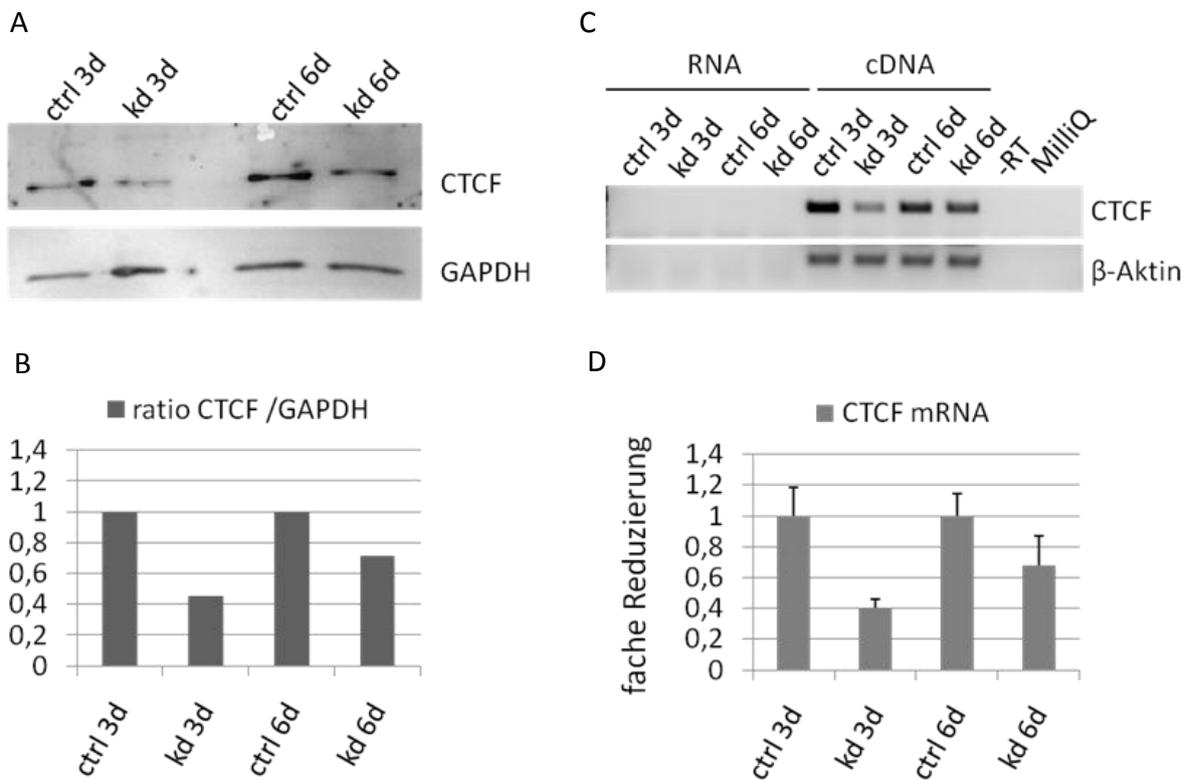
5.1.4.2 Die Herunterregulierung der CTCF-Expression führt zu einer Abnahme der ATP8B2_2- und EXT2-Expression in HeLa-Zellen

Um den Effekt von CTCF auf die Expression der beiden Kandidatengene nach Herunterregulierung der CTCF-Expression untersuchen zu können, wurden HeLa-Zellen wiederum mit den CTCF-spezifischen siRNAs sowie der Kontroll-RNA (ctrl) behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 3 oder 6 Tagen. Für die nachfolgende Expressionsanalyse wurden sowohl RNA als auch Kernproteine extrahiert.

Für den Nachweis der erfolgreichen CTCF-Herunterregulierung wurde der präparierte Kernextrakt gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Trägermembran einer Immundetektion unterzogen. Die verwendeten Antikörper waren spezifisch für CTCF oder GAPDH (Ladekontrolle). Die Auswertung zeigt, dass auch diesmal nach 3d und nach 6d im Vergleich zum Kontrollansatz weniger CTCF zu detektieren ist (Abb. 5.5 A). Der Effekt ist aber nicht so ausgeprägt wie im vorangegangenen Experiment. Die Ladekontrolle mittels Verwendung des GAPDH-Antikörpers zeigt, dass das verwendete Material nicht in gleichen Mengen eingesetzt wurde. Eine genaue Aussage über den tatsächlichen Effekt ist daher erst nach Ermittlung des Verhältnisses (*ratio*) der Intensitäten des CTCF-Signals und des GAPDH-Signals. Dieses zeigt, dass nach 3 Tagen CTCF-*Knockdown* die Expression auf 45% gesunken ist (Abb. 5.5 B). Nach 6d ist die Expression wieder auf 70% angestiegen.

Die ebenfalls isolierte RNA wurde einer reversen Transkriptionsreaktion unterzogen und anschließend mittels konventioneller und quantitativer PCR auf Vorhandensein von CTCF-cDNA analysiert. Die verwendeten Primerpaare dafür sind jeweils spezifisch für CTCF- oder β -Aktin-cDNA. Letztere wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung des konventionellen PCR-Ansatzes erfolgte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung. Mit den CTCF-spezifischen Primern konnte sowohl nach RNAi als auch in der Kontrolle cDNA amplifiziert werden; nach *Knockdown* ist das Signal jedoch schwächer (Abb. 5.5 C). Die Kontroll-PCR mit den β -Aktin-Primern zeigt, dass das verwendete Material in gleichen Mengen eingesetzt wurde. Als Negativkontrolle für die Amplifizierung wurde die präparierte RNA mitgeführt. Hier konnte kein Material amplifiziert werden.

Um diesen Befund zu quantifizieren, wurde parallel eine Analyse des Materials in der *realtime* PCR durchgeführt.



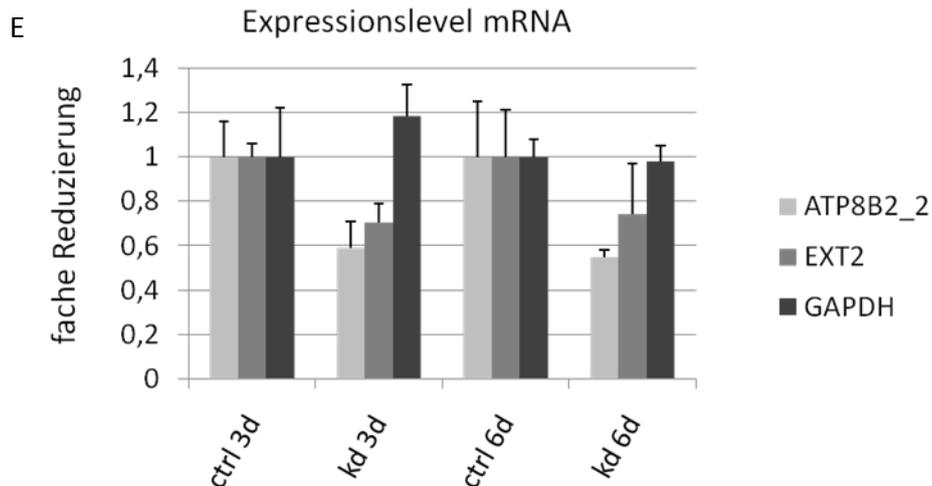


Abb. 5.5: Der Knockdown von CTCF führt zur Herunterregulierung der Expression von ATP8B2 var.2 und EXT2

HeLa-Zellen wurden mit CTCF-spezifischer siRNA (kd) oder einer Kontroll-RNA (ctrl) behandelt. **A und B.** Expressionsanalyse von CTCF mittels Immundetektion. Präparation des Kernextraktes erfolgte 3d oder 6d nach Transfektion. Der Proteinextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (15µg pro Spur), auf eine Trägermembran übertragen und mittels eines spezifischen anti-CTCF-Antikörpers detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von GAPDH. **A.** Immunodetektion; die Ladekontrolle zeigt eine ungleiche Beladung der verschiedenen Spuren; **B.** Das Verhältnis der Signalintensitäten von CTCF und GAPDH verdeutlicht den *Knockdown*-Effekt; **C und D.** Expressionsanalyse von CTCF mittels reverser Transkription. RNA-Extraktion erfolgte nach 3d oder 6d nach siRNA-Transfer. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primern für CTCF sowie β-Aktin als Ladekontrolle. **C.** -RT: Reverse Transkription ohne RNA, MilliQ: Wasserkontrolle der Amplifikation; **D.** Quantitative Auswertung. Normalisierung der Werte erfolgte mit β-Aktin; **E.** Quantitative Expressionsanalyse von ATP8B2 var.2 (ATP8B2_2) und EXT2 mittels reverser Transkription. Die anschließende Amplifikation erfolgte mittels *realtime* PCR mit spezifischen Primern für die ATP8B2_2 und EXT2. Normalisierung der Werte erfolgte mit β-Aktin.

Dabei zeigt sich, dass die siRNA-behandelte Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-RNA behandelt wurden, eine Verringerung des mRNA-Levels auf 40% nach 3 Tagen sowie 70% nach 6 Tagen aufweisen (Abb. 5.5 D). Dies entspricht einer 2,5fachen Reduktion der CTCF-Expression nach 3 Tagen bzw. einer 1,5fachen Abnahme nach 6 Tagen. Der *Knockdown* von CTCF scheint daher zumindest nach 3 Tagen sehr effektiv zu sein. Um den Effekt der geringeren CTCF-Expression auf die Expression der Kandidatengene untersuchen zu können, wurde das vorhandene cDNA-Material einer erneuten Quantifizierung unterzogen, diesmal mit spezifischen Primerpaaren für die Amplifizierung von ATP8B2 var.2 und EXT2 sowie GAPDH als Kontrolle. Die anschließende Auswertung lässt erkennen, dass der Knockdown von CTCF nach 3 Tagen tatsächlich einen Einfluss auf die Expression der beiden Kandidatengene hat. So ist die Expression von ATP8B2 var.2 verglichen mit der Kontrolle auf 60%, die Expression von EXT2 auf 70% gesunken (Abb. 5.5 E). Dies entspricht einer 1,7fachen

bzw. 1,5fachen Reduktion. Interessanterweise ist dies ebenfalls noch nach 6 Tagen zu beobachten. Der Effekt ist für EXT2 schwächer; dies stimmt nicht ganz mit den Daten aus der Transkriptomanalyse von Wendt und Kollegen überein, da für beide Gene ein stärkerer Effekt beschrieben wurde.

5.1.4.3 Die Herunterregulierung der CTCF-Expression ist nicht reproduzierbar

Im nächsten Schritt wurden Expressionsanalyse und Untersuchung des Chromatins nach Herunterregulierung kombiniert. Dazu wurden HeLa-Zellen erneut für 7h mit den CTCF-spezifischen siRNAs sowie der Kontroll-RNA (ctrl) behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte wiederum nach 3 oder 6 Tagen. Für die nachfolgende Expressionsanalyse wurde RNA extrahiert, für die Untersuchung des Chromatins wurden die Zellen fixiert, lysiert und sonifiziert, um das Chromatin zu erhalten. Für die anschließende Chromatin IP wurden Antikörper gegen H3, H3K4me2, H3K27me3 sowie CTCF verwendet.

Für den Nachweis der erfolgreichen CTCF-Herunterregulierung wurde die RNA einer Reversen Transkriptionsreaktion unterzogen. Diese wurde anschließend mittels quantitativer PCR analysiert. Verwendet wurden Primerpaare zur Amplifizierung von CTCF-, ATP8B2 var.2-, EXT2-, GAPDH-sowie β -Aktin-cDNA. Die RNA wurde mittels konventioneller PCR überprüft. Diese konnte nicht amplifiziert werden (nicht gezeigt). Nach Normalisierung der Werte ist nach 3 Tagen eine Herunterregulierung der CTCF-Expression um 50% zu beobachten, nach 6 Tagen ist dieser Effekt jedoch wieder aufgehoben (Abb. 5.6 A). Die Analyse der Kandidatengene zeigt jedoch, dass die Herunterregulierung der CTCF-Expression keinen negativen Effekt auf die Expression hat. Für EXT2 ist sogar eine Zunahme zu beobachten. Nach 6 Tagen zeigen beide Gene eine erhöhte Expression (Abb. 5.6 B).

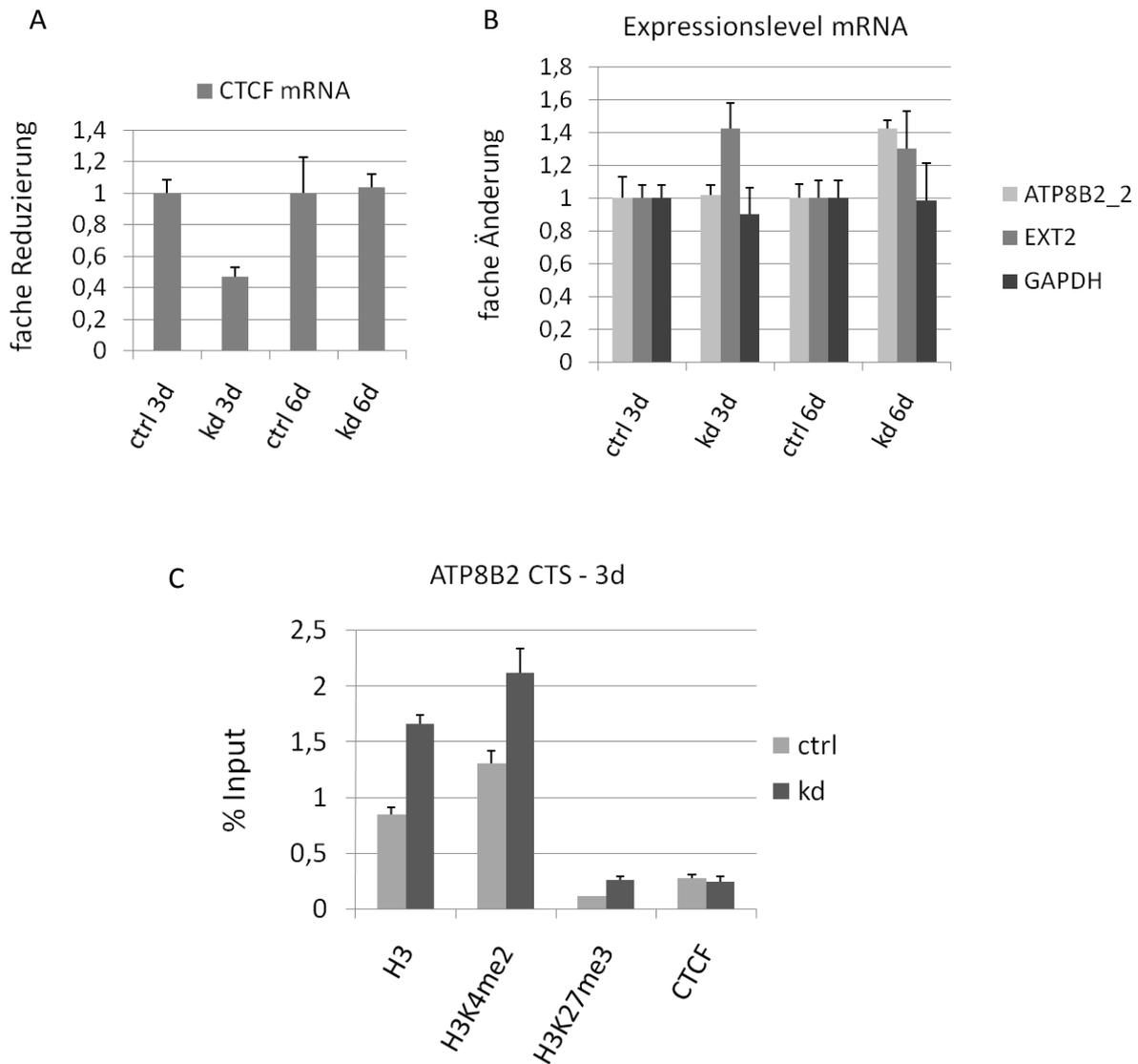


Abb. 5.6: Der Knockdown von CTCF ist nicht reproduzierbar

HeLa-Zellen wurden für 7h mit CTCF-spezifischer siRNA (kd) oder einer Kontroll-RNA (ctrl) behandelt. **A und B.** Quantitative Expressionsanalyse von CTCF sowie der beiden Kandidatengene mittels reverser Transkription. RNA-Extraktion erfolgte nach 3d oder 6d nach siRNA-Transfer. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primern für CTCF (A), ATP8B2_2, EXT2 und GAPDH (B); **A.** Normalisierung der Werte erfolgte mit β -Aktin; **B.** Der *Knockdown* von CTCF hat nach 3 Tagen keine Reduktion der Transkription der Kandidatengene zur Folge; **C.** Analyse des Chromatinstatus an der CTS des ATP8B2-Locus mittels Chromatin-IP. Das Chromatin wurde nach 3 Tagen präpariert. Verwendet wurden Antikörper gegen H3, H3K4me2, H3K27me3 sowie CTCF, als Kontrolle wurden die entsprechenden Kontroll-IgG mitgeführt. Diese zeigen kein Signal und sind daher nicht dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels quantitativer PCR, verwendet wurden Primer für die Amplifizierung der CTS am ATP8B2-Locus.

Die Analyse des Chromatins erfolgt für den ATP8B2-Locus ebenfalls mittels quantitativer PCR. Für den EXT2-Locus ist dies nicht möglich, da dieser Genombereich nicht mittels *realtime* PCR amplifiziert werden kann. Es wurden Primer verwendet, die die CTS des ATP8B2-Locus amplifizieren. Es zeigt sich, dass in Kontroll-RNA-behandelten Zellen eine Anreicherung

von CTCF an seine Bindestelle von 0,25% Input zu detektieren ist (Abb. 5.6 C). Die Bindung verändert sich nach CTCF-*Knockdown* für 3 Tage jedoch nicht. Der *Knockdown* von CTCF ist demnach nicht effizient genug, um an diesem Locus die Bindung von CTCF zu verhindern. Die Anreicherung von H3 beträgt 1% Input für mit Kontroll-RNA behandelte Zellen, ist jedoch erhöht in den RNAi-behandelten Zellen. Dies gilt ebenfalls für die mitgeführten Histonmodifikationen. Dieser Unterschied scheint aber CTCF-unabhängig zu sein, da CTCF selbst keine veränderte Bindung in beiden Ansätzen zeigt.

In weiteren Experimenten konnte ebenfalls keine für die Analyse ausreichende Herunterregulierung der CTCF-Expression erzielt werden.

5.2 Analyse des Einflusses von CTCF auf Chromatin mittels des LacO-LacI-Modellsystems

Um den Effekt von CTCF auf Chromatin unabhängig von genomischen Bindestellen untersuchen zu können, wurde das LacO-LacI-Modellsystem für die Analyse verwendet. Dieses erlaubt die Untersuchung des direkten Effekts von CTCF auf Chromatin (s. Kap. 4.6.1). In einem ersten Schritt musste der Chromatinstatus des verwendeten LacO-Array genau charakterisiert werden, um eventuelle Änderungen durch die Bindung von CTCF erkennen zu können. Dazu wurden die Zellen mit dem GFP-Lac-Konstrukt transfiziert, um den Array zu visualisieren. Nach dem Transfer wurden die Zellen fixiert und anschließend die DNA angefärbt oder die Histonmodifikationen durch indirekte Immunfärbung detektiert. Die Transfektion von GFP-Lac dient ebenfalls dazu, um mögliche Effekte des Lac-Repressors auf den Chromatinstatus im späteren Vergleich zu GFP-Lac-CTCF vernachlässigen zu können. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

5.2.1 Der LacO-Array weist eine kompakte Struktur in der DNA-Färbung auf

Mit dem GFP-Lac-Konstrukt transfizierte U-2OS F42B8-Zellen (Integration des Arrays im Bereich des Centromers) wurden nach 60h fixiert und einer DNA-Färbung unterzogen.

Der einzelne GFP-Lac-gebundene Array zeigt im Fluoreszenzmikroskop eine kompakte Struktur (Abb. 5.7 A und C). Der Lac-Repressor liegt ausschließlich am DNA-Array gebunden vor, Hintergrundfluoreszenz im Zellkern ist nicht zu beobachten (Abb. 5.7 A). Die kompakte Struktur des Arrays ist ebenfalls in der DNA-Färbung gut zu erkennen (Abb. 5.7 B und C).

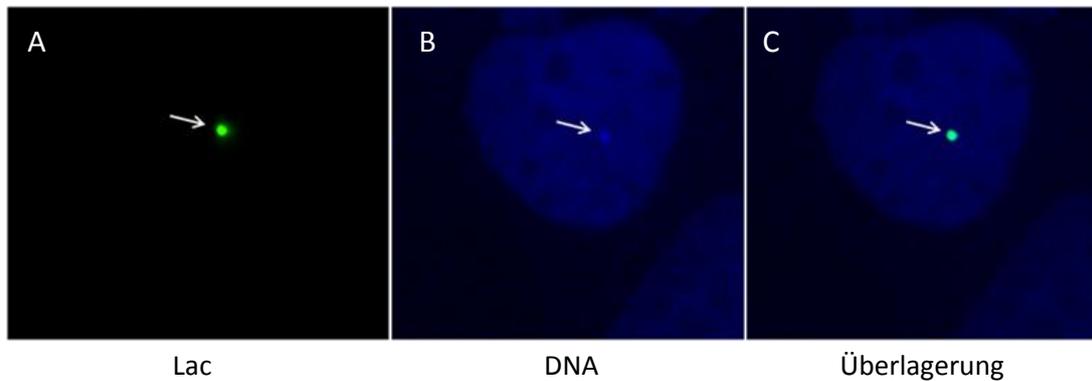


Abb. 5.7: Der DNA-Array im Centromerbereich liegt als kompakte Struktur vor

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac, Fixierung nach 60h und DNA-Färbung; **A.** Repräsentative Darstellung des GFP-Lac-gebundenen LacO-Arrays. Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac; **B.** Der Zellkern wird durch die Hoechst-Färbung als blaues Fluoreszenzsignal sichtbar. Die kompakte Struktur des DNA-Arrays ist klar zu erkennen; **C.** Überlagerung beider Aufnahmen; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Auch U-2OS F6B2-Zellen (drei unterschiedlich große Integrationen im Bereich von Telomeren) wurden mit dem GFP-Lac-Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und die DNA angefärbt.

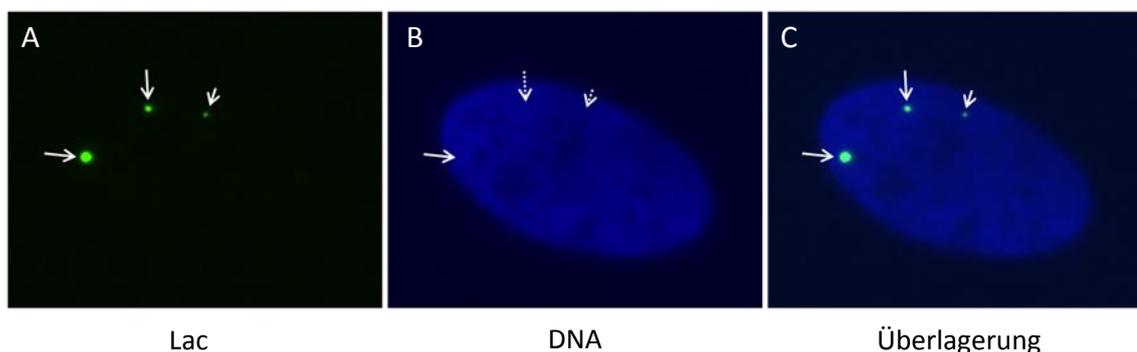


Abb. 5.8: Die DNA-Arrays im Telomerbereich liegen ebenfalls als kompakte Struktur vor

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F6B2-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac, Fixierung nach 60h und DNA-Färbung; **A.** Repräsentative Darstellung der drei GFP-Lac-gebundenen LacO-Arrays. Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac; **B.** Der Zellkern wird durch die Hoechst-Färbung als blaues Fluoreszenzsignal sichtbar. Die kompakte Struktur des größten DNA-Arrays ist klar zu erkennen; **C.** Überlagerung beider Aufnahmen; weiße Pfeile zeigen die sichtbaren LacO-Arrays an, gestrichelte Pfeile weisen auf die Position der nicht sichtbaren Arrays.

Bei diesen Zellen weisen die integrierten DNA-Arrays, visualisiert durch die GFP-Lac-Bindung, unter dem Fluoreszenzmikroskop ebenfalls eine kompakte Struktur auf (Abb. 5.8 A und C). Dabei ist zu beobachten, dass die drei verschiedenen Arrays wie schon beschrieben eine unterschiedliche Größe aufweisen (Jegou et al., 2009). Interessanterweise ist nur der größte der LacO-Arrays ebenfalls in der DNA-Färbung als kompakte Struktur zu erkennen (Abb. 5.8 B).

5.2.2 Der LacO-Array zeigt eine heterochromatische DNA-Struktur

Um den Chromatinstatus am kompakten Array zu untersuchen, wurden U-2OS F42B8-Zellen mit dem GFP-Lac-Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und einer indirekten Immunfärbung unterzogen. Dabei wurden Antikörper verwendet, die unterschiedliche Histonmodifikationen spezifisch detektieren können.

Als Nachweis für heterochromatische Markierungen wurden Antikörper gegen die trimethylierten Lysine 9 und 27 des Histons H3 (H3K9me₃, H3K27me₃) ausgewählt, als Nachweis für euchromatische Markierungen wurden Antikörper gegen di- und trimethyliertes Lysin 4 sowie acetyliertes Lysin 9 von Histon H3 (H3K4me₂, H3K4me₃ sowie H3K9ac) und ein Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 (H4ac) verwendet.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse lässt erkennen, dass der LacO-Array deutlich durch die Bindung des GFP-markierten Lac-Repressors sichtbar ist (Abb. 5.9 A und D). Die Immunfärbungen sowohl mit dem H3K27me₃- als auch dem H3K9me₃-spezifischen Antikörper zeigt eine Reihe von heterochromatischen Foci (Abb. 5.9 B und E). Durch anschließende Überlagerung der beiden Aufnahmen der unterschiedlichen Kanäle ist zu beobachten, dass einer der durch den anti-H3K27me₃-Antikörper sichtbaren heterochromatischen Foci dem LacO-Array entspricht (Abb. 5.9 C). Dies ist jedoch nicht für H3K9me₃ zu erkennen (Abb. 5.9 F).

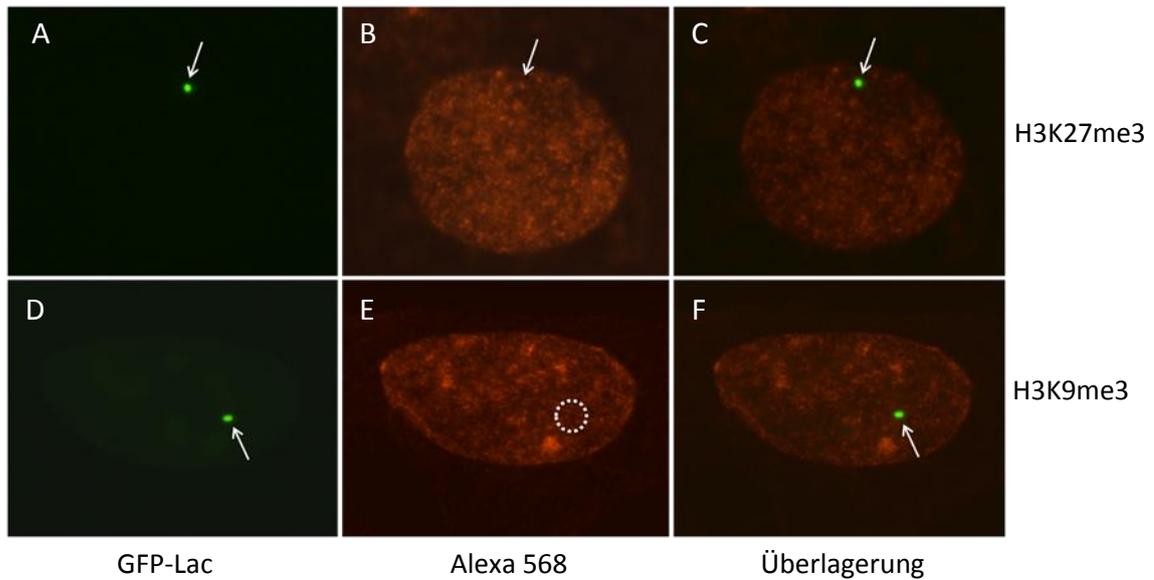


Abb. 5.9: Der kondensierte LacO-Array im Centromerbereich weist eine heterochromatische Struktur auf

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung; Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen Immunfärbungen **A und D**. Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac; **B und E**. Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung. B: anti-H3K27me3, E: anti-H3K9me3; Der jeweils verwendete Sekundärantikörper ist markiert mit Alexa 568-Farbstoff; **C und F**. Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein gelbes Signal weist auf eine Kolo-kalisierung hin; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, ein weißer Kreis markiert ein fehlendes Signal.

Betrachtet man die Immunfärbungen, die mit den vier verschiedenen Antikörpern gegen die euchromatischen Histonmodifikationen durchgeführt worden ist, lässt sich beobachten, dass diese ebenfalls spezifisch den Zellkern mit Ausnahme der Nukleoli anfärben. Die Färbung ist im Vergleich mit den heterochromatischen Modifikationen gleichmäßiger (Abb. 5.10 B, E, H und K). Der von GFP-Lac gebundene DNA-Array weist jeweils eine kondensierte Struktur auf (Abb. 5.10 A, D, G und J). Die Überlagerung der Aufnahmen der verschiedenen Färbungen mit der Aufnahme im GFP-Kanal, die die Position des integrierten LacO-Arrays zeigt, macht deutlich, dass der Chromatinbereich des Arrays keine der vier untersuchten, euchromatischen Histonmodifikationen aufweist (Abb. 5.10 C, F, I und L).

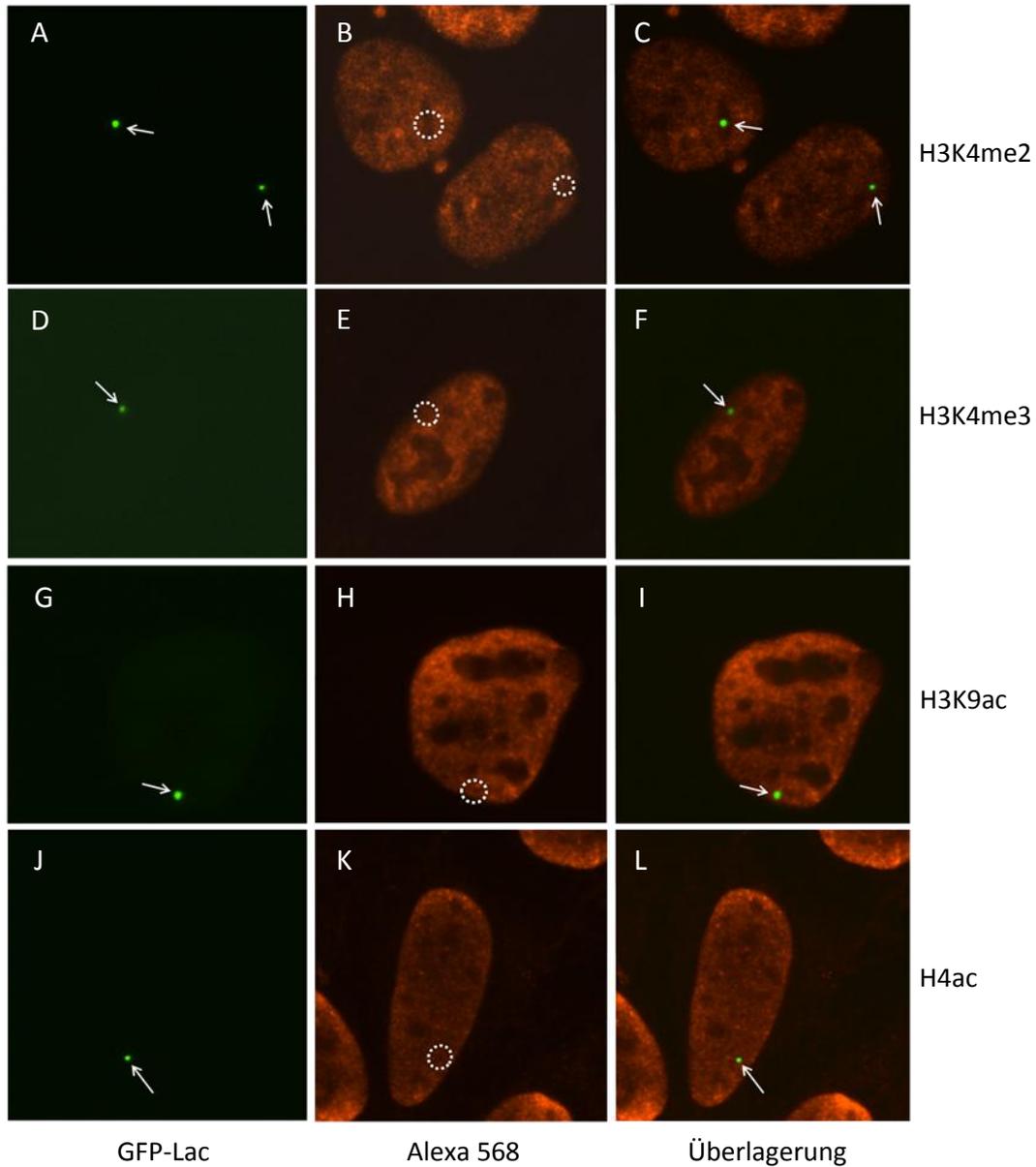


Abb. 5.10: Dem kondensierten LacO-Array im Centromerbereich fehlen euchromatische Histonmodifikationen

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung; Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen Immunfärbungen **A, D, G und J**. Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac; **B, E, H und K**. Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung. B: anti-H3K4me2, E: anti-H3K4me3, H: anti-H3K9ac J: anti-H4ac; Der jeweils verwendete Sekundärantikörper ist markiert mit Alexa 568-Farbstoff; **C, F, I und L**. Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein gelbes Signal weist auf eine Kolokalisierung hin; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, weiße Kreise markieren ein fehlendes Signal.

Um den Chromatinstatus der drei Telomer-nah integrierten LacO-Arrays mit der Chromatinzusammensetzung des centromeren LacO-Arrays vergleichen zu können, wurden U-2OS F6B2-Zellen mit dem GFP-Lac-Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und ebenfalls

einer indirekten Immunfärbung unterzogen. Verwendet wurde dazu exemplarisch jeweils ein Antikörper spezifisch gerichtet gegen eine heterochromatische (H3K27me3) und eine euchromatische Histonmodifikation (H3K9ac).

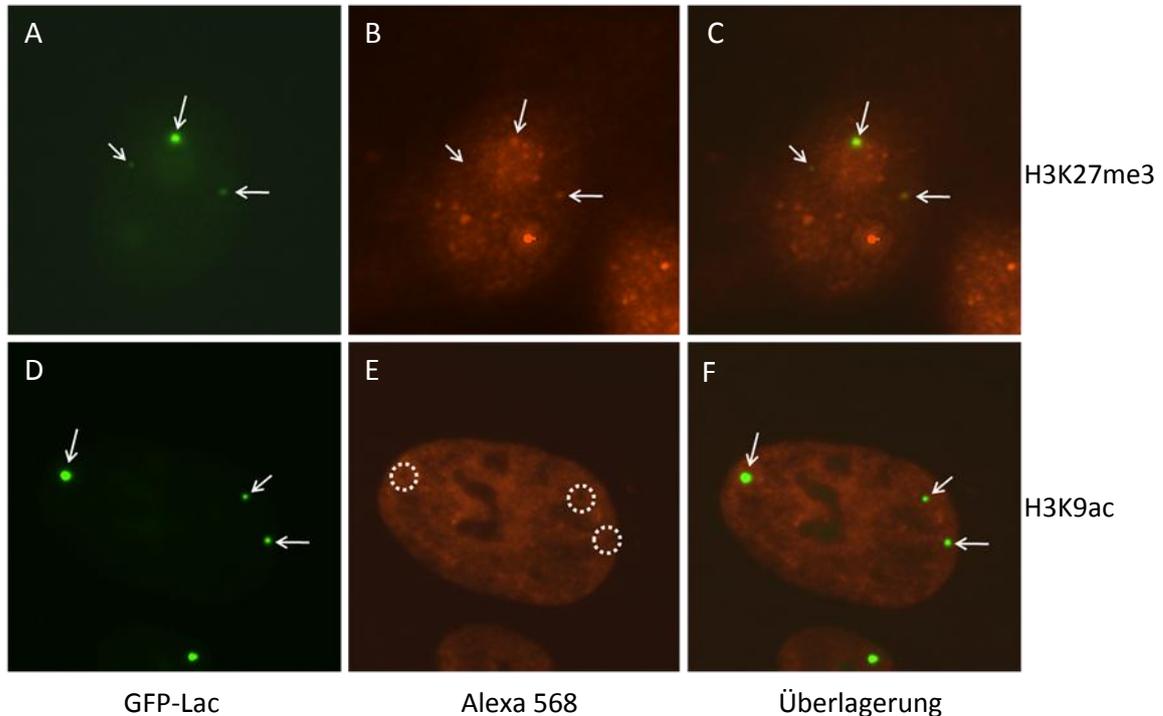


Abb. 5.11: Die kondensierten LacO-Arrays im Telomerbereich weisen ebenfalls eine heterochromatische Struktur auf

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F6B2-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung. Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen Immunfärbungen **A und D**. Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac; **B und E**. Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung. B: anti-H3K27me3, E: anti-H3K9ac. Sekundärantikörper markiert mit Alexa 568-Farbstoff; **C und F**. Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein gelbes Signal weist auf eine Kolo-kalisierung hin (C); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, weiße Kreise markieren ein fehlendes Signal.

Bei der nachfolgenden Analyse im Fluoreszenzmikroskop ist zu beobachten, dass durch die Bindung von GFP-Lac die drei LacO-Arrays deutlich im Zellkern zu erkennen sind (Abb. 5.11 A und D). Die Immunfärbung mit dem H3K27me3-spezifischen Antikörper färbt eine Reihe von heterochromatischen Foci an (Abb. 5.11 B). Durch anschließende Überlagerung der beiden Aufnahmen der unterschiedlichen Kanäle zeigt sich, dass drei der durch den anti-H3K27me3-Antikörper sichtbaren Foci den drei unterschiedlich großen LacO-Arrays dieser Zelllinie entsprechen (Abb. 5.11 C).

Betrachtet man die H3K9ac-spezifische Immunfärbung, ist zu beobachten, dass diese Histonmodifikation relativ einheitlich über den Zellkern verteilt ist (i.e. Foci sind nicht zu

erkennen). Ausnahme bilden die Nukleoli (Abb. 5.11 E). Überlagert man die diese Aufnahme mit der entsprechenden Aufnahme, die die Position der Telomer-nah integrierten LacO-Arrays zeigt, wird deutlich, dass das Chromatin im Bereich der Arrays frei ist von dieser euchromatischen Histonmodifikation (Abb. 5.11 E und F).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der LacO-Array im centromeren Bereich (U-2OS-F42B8-Zellen) als auch in Telomer-Regionen (U-2OS-F6B2-Zellen) in einer heterochromatischen DNA-Konformation vorliegt.

5.2.3 Bindung von CTCF führt zu Dekondensierung des heterochromatischen DNA-Arrays

Um nun den Einfluss von CTCF auf den heterochromatischen Array zu untersuchen, wurde ein Vektor hergestellt, der für ein Fusionsprotein aus GFP-Lac und chCTCF (nachfolgend CTCF genannt) kodiert (s. Anhang). Dieser Vektor wurde sowohl in U-2OS F42B8- als auch in F6B2-Zellen eingebracht. Diese wurden nach 60h fixiert und einer DNA-Färbung unterzogen.

Nach Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop lässt sich feststellen, dass die Struktur des Arrays sich im Vergleich zu nur Lac-gebundenem Array (s. 5.2.1) verändert hat. Der Array befindet sich nicht mehr in einer kompakten Form, sondern erscheint diffus (Abb. 5.12 A und C, D und F). In den Zellen mit den drei integrierten LacO-Arrays wird auch in diesem Zustand die unterschiedliche Größe sichtbar. In der DNA-Färbung jedoch ist keine Struktur mehr zu erkennen (Abb. 5.12 B und E). zusätzlich ist zu beobachten, dass die Hintergrundfluoreszenz des Zellkerns in GFP-Lac-CTCF-exprimierenden Zellen (Abb. 5.5 A und D) stärker als in GFP-Lac-exprimierenden Zellen ist (Abb. 5.11 A, Abb. 5.12 A).

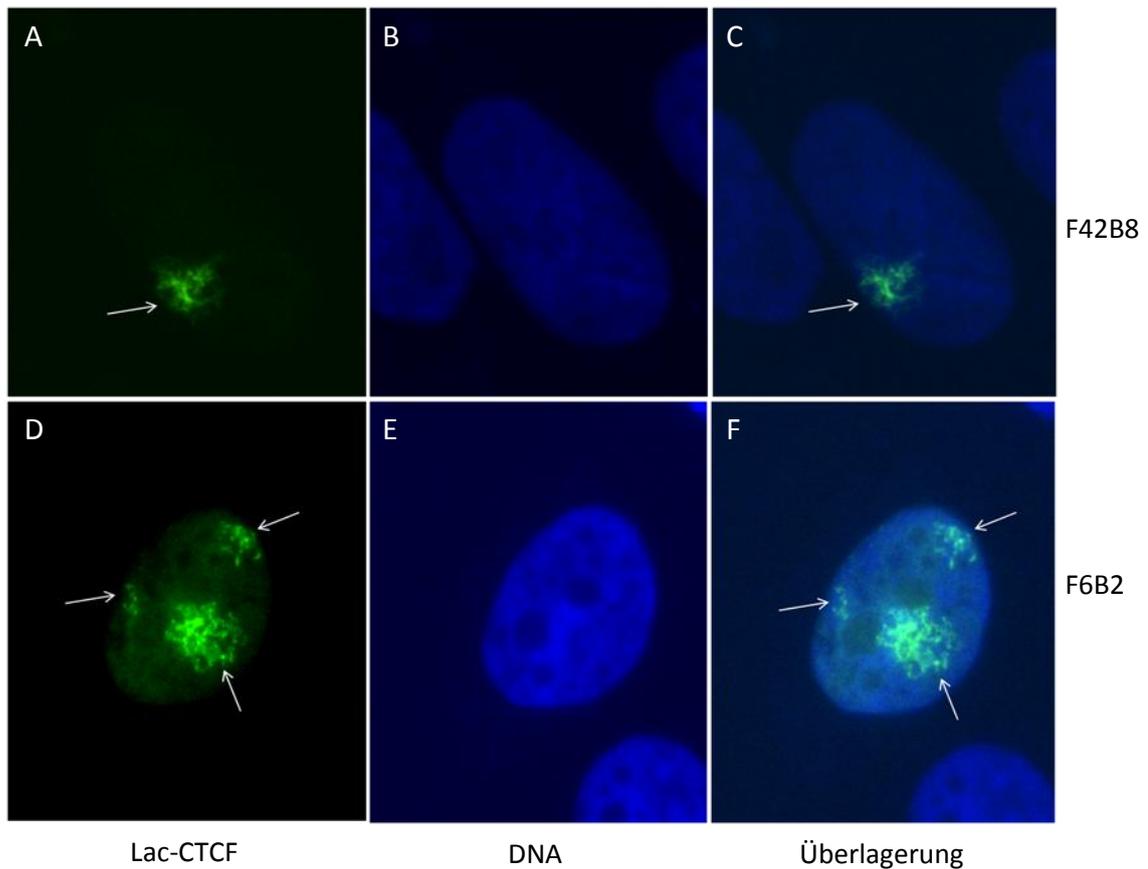


Abb. 5.12: Bindung von Lac-CTCF führt zu einer starken Dekondensierung des LacO-Arrays
 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F42B8-Zellen (A-C) und -F6B2-Zellen (D-F) nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und nachfolgender DNA-Färbung. **A und D.** Repräsentative Darstellung der GFP-Lac-CTCF-gebundenen LacO-Arrays. Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF; **B und E.** Der Zellkern wird durch die Hoechst-Färbung als blaues Fluoreszenzsignal sichtbar; **C und F.** Überlagerung beider Aufnahmen; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Die Bindung von CTCF an den heterochromatischen DNA-Array führt in beiden Zelllinien zu einer starken Dekondensierung.

Zusätzlich lässt sich beobachten, dass es verschiedenen Arten der Dekondensierung gibt. Der von CTCF gebundene LacO-Array erscheint zumeist fadenförmig oder fibrillär (Abb. 5.13 A und D). Er kann aber auch in einer aufgeblähten Form (Abb. 5.13 C und F) oder in einem intermediären Zustand vorliegen, bei dem das Zentrum des Arrays aufgebläht erscheint, aus diesem aber zusätzlich einzelne fadenförmige Strukturen herausragen (Abb. 5.13 B und E).

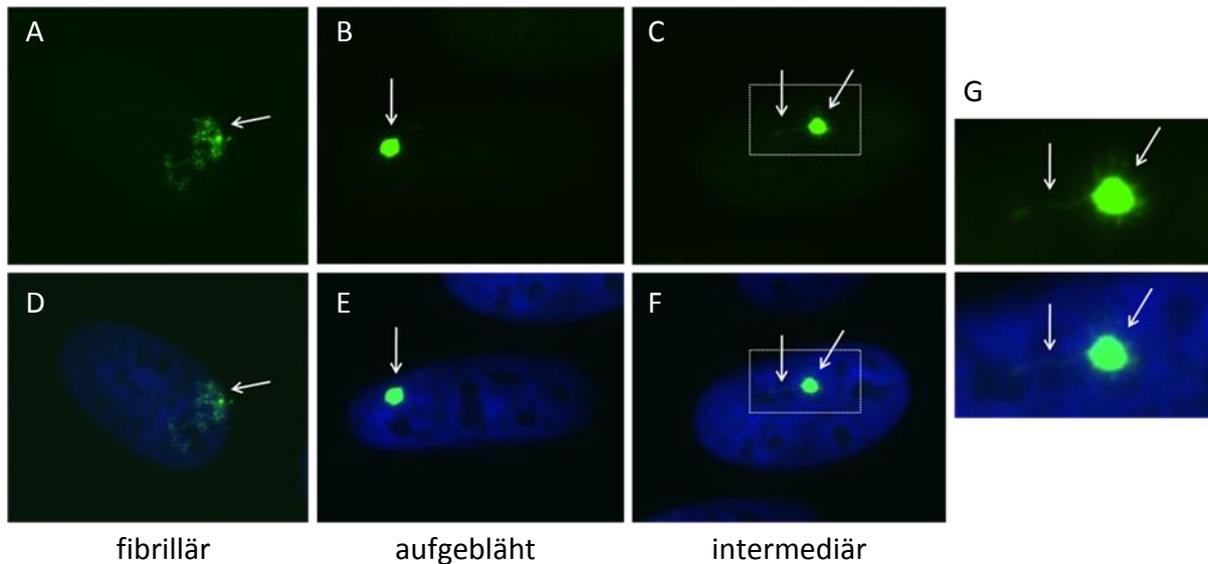


Abb. 5.13: Der durch CTCF dekondensierte LacO-Array kann verschiedene Strukturen aufweisen
 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und DNA-Färbung. **A-C.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF; **D-F.** Überlagerung des GFP-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaues Fluoreszenzsignal); **A und D.** Der GFP-Lac-CTCF-gebundene LacO-Array weist eine fadenförmige Struktur auf (fibrillär); **B und E.** Der GFP-Lac-CTCF-gebundene LacO-Array weist eine aufgeblähte Form auf, aus der einzelne „Fäden“ herausragen (intermediär); **C und F.** Der GFP-Lac-CTCF-gebundene LacO-Array weist eine rein aufgeblähte Form auf; **G.** Vergrößerung der angezeigten Ausschnitte aus C und D; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array und seine Ausläufer an.

Um einen genaueren Einblick in das vorliegende Ergebnis zu bekommen, wurden die vorhandenen Daten einer statistischen Analyse unterzogen. Nach Auszählung kondensierter und dekondensierter Arrays in GFP-Lac- und GFP-Lac-CTCF-exprimierenden U-2OS F42B8-Zellen ergibt sich, dass die Mehrheit der Lac-CTCF-gebundenen Arrays dekondensiert ist (82% (+/- 2,4)), wogegen die Lac-gebundenen Arrays fast alle kondensiert vorliegen (98.6% (+/- 0,6); Abb. 5.14 A).

Analysiert man die vorliegenden Daten mithilfe der Größenauswertung (s. 4.6.3; Abb. 4.2), zeigt sich, dass der Lac-gebundene DNA-Array im Median eine Fläche von 0,07µm² aufweist, während CTCF-gebundene LacO-Arrays im Median eine Fläche von 2µm² haben (Abb. 5.14 B). Die Vergrößerung der Arrayfläche erreicht sogar einen Maximalwert von 6,7µm². Der U-Test zeigt, dass die Dekondensierung signifikant ist (P<0,005).

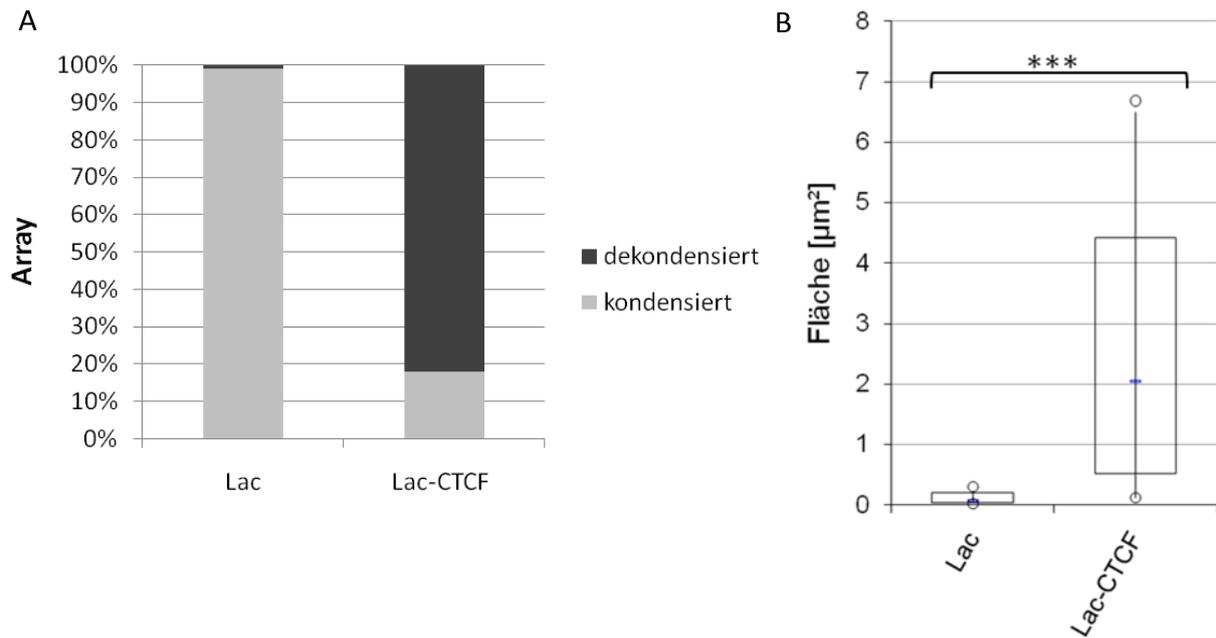


Abb. 5.14: Die Mehrheit der CTCF-gebundenen LacO-Arrays liegt stark dekondensiert vor

Statistische Analyse der Dekondensierung. **A.** U-2OS F42B8-Zellen wurden nach Transfer mit je $1\mu\text{g}$ GFP-Lac oder GFP-Lac-CTCF nach 60h fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. $n > 100$; **B.** Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen; Lac: $n=17$, Lac-CTCF: $n=38$; U-Test: ***- $P < 0,005$.

Die Bindung von Lac-CTCF an den Array führt demnach zu einer 28,6fachen Vergrößerung seiner Fläche.

Zusätzlich wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dazu wurden GFP-Lac-CTCF und mCherry-Lac in unterschiedlichen Mengenverhältnissen kotransfiziert, nach 60h fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Es zeigt sich, dass das GFP-Signal (CTCF) am Array und im Zellkern im Verhältnis 1:2 schwächer als das mCherry-Signal (Lac-Repressor) ist (Abb. 5.15 A und B); im Vergleich zu GFP-Lac-CTCF ist mehr mCherry-Lac im Zellkern vorhanden. Dies zeigt sich auch dadurch, dass der Lac-Repressor seine Bindestellen an allen drei LacO-Arrays besetzt, während Lac-CTCF nur an zwei der drei Arrays zu detektieren ist (Abb. 5.15 A). Daraus lässt sich schließen, dass Überschuss an gebundenem Lac-Repressor die Bindung von Lac-CTCF an den Array beeinträchtigt und somit nicht genügend CTCF am Array vorliegt, um zu einem Dekondensierungseffekt zu führen – der Array bleibt kondensiert (Abb. 5.15 A-C).

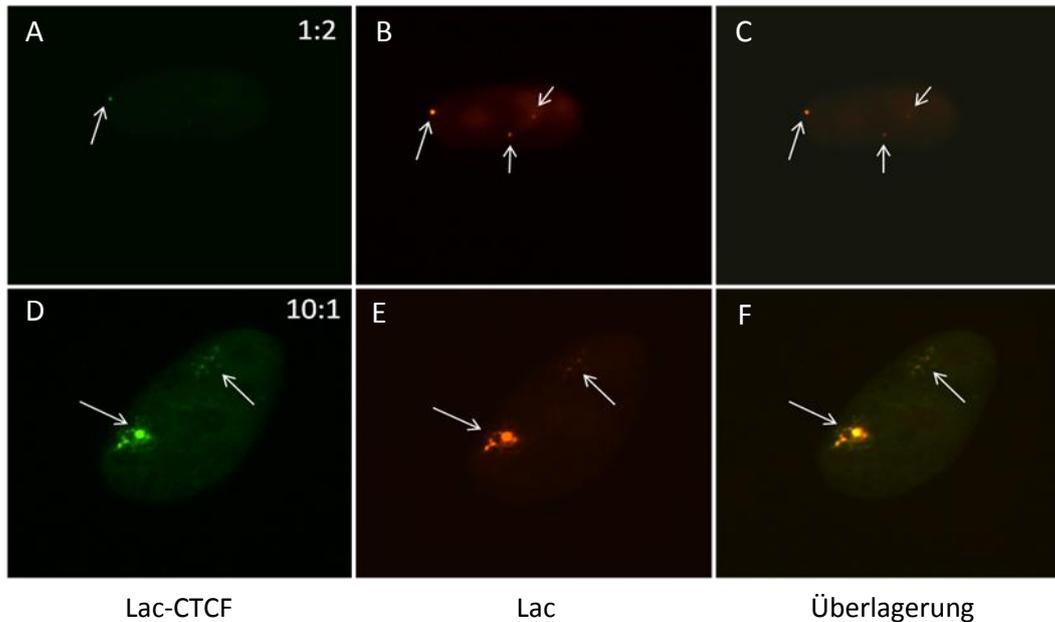


Abb. 5.15: Die durch CTCF vermittelte Dekondensierung des LacO-Arrays ist Dosis-abhängig
 Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F6B2-Zellen nach Köttransfer mit GFP-Lac-CTCF und mCherry-Lac im Mengenverhältnis 1:2 (A-C) und 10:1 (D-F) sowie Fixierung nach 60h. **A und D.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF; **B und E.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von mCherry-Lac; **C und F.** Überlagerung des GFP-Signals mit dem mCherry-Signal; weiße Pfeile zeigen die sichtbaren LacO-Arrays an.

Werden die beiden Konstrukte im Verhältnis 1:10 transfiziert, erscheint die Signalintensität von GFP im Zellkern stärker, während am Array die Intensitäten in beiden Kanälen gleich sind (Abb. 5.15 D und E). Insgesamt ist mehr Lac-CTCF vorhanden, scheint aber in relativ gleicher Menge zu dem Lac-Repressor am Array vorzuliegen (Abb. 5.15 D-E), da der Lac-Repressor offenbar eine höhere Affinität zu der Lac-Operator-Sequenz besitzt als das Lac-CTCF-Fusionsprotein.

Der Einfluss von CTCF überwiegt in diesem Fall jedoch und der Array wird dekondensiert (Abb. 5.15 D-F).

Die Bindung eines Fusionsproteins aus GFP-Lac und CTCF führt demnach zu einer starken Dekondensierung des heterochromatischen LacO-Arrays sowohl in Centromer-, als auch in Telomer-Regionen; dieser Prozess ist abhängig von der Menge an gebundenem CTCF.

5.2.4 Bindung von CTCF führt zu Euchromatinisierung des LacO-Arrays

Die Bindung von CTCF an den heterochromatischen LacO-Array führt zu der oben beschriebenen Dekondensierung. Nun stellt sich die Frage, ob dieser Effekt von einer Veränderung des Chromatins in diesem Bereich begleitet wird. Um dies zu untersuchen, wurden U-2OS F42B8-Zellen mit dem GFP-Lac-CTCF-Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und anschließend einer indirekten Immunfärbung unterzogen.

Hierfür wurden als Nachweis für heterochromatische Markierungen ebenfalls Antikörper gegen die trimethylierten Lysine 9 und 27 des Histons H3 (H3K9me3, H3K27me3) genommen, als Nachweis für euchromatische Markierungen wurden erneut Antikörper gegen di- und trimethyliertes Lysin 4 sowie acetyliertes Lysin 9 von Histon H3 (H3K4me2, H3K4me3 sowie H3K9ac) und ein Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 (H4ac) verwendet.

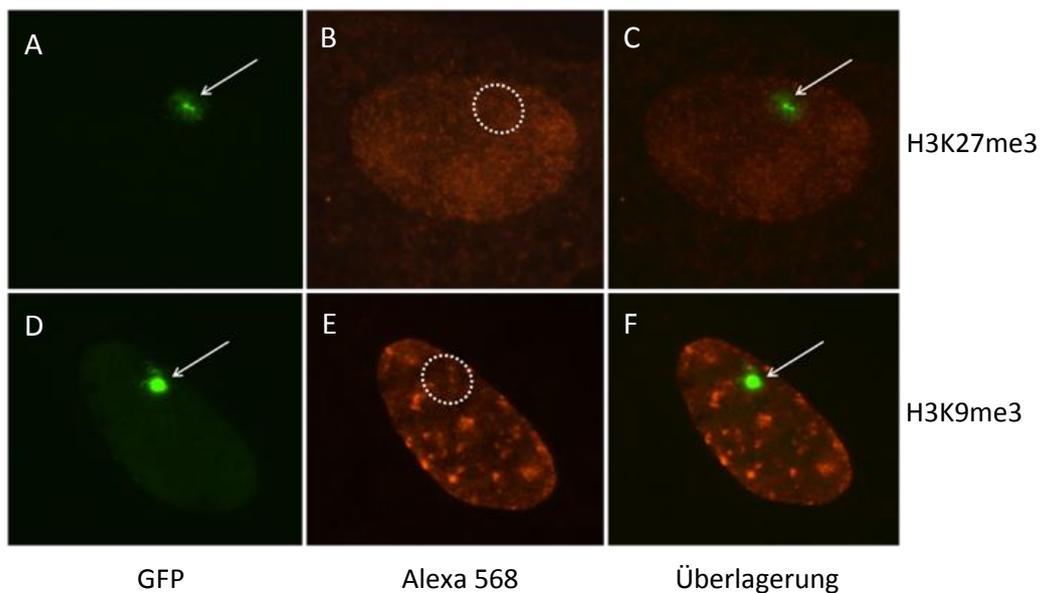


Abb. 5.16: Dem durch CTCF-Bindung dekondensierten LacO-Array im centromeren Bereich fehlen heterochromatische Histonmodifikationen

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung. **A und D.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF. Der LacO-Array ist dekondensiert; **B und E.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung. B: anti-H3K27me3, E: anti-H3K9me3; Der jeweils verwendete Sekundärantikörper ist markiert mit Alexa 568-Farbstoff; **C und F.** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein gelbes Signal weist auf eine Kolokalisierung hin; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, weiße Kreise markieren ein fehlendes Signal.

Bei der nachfolgenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse ist zu beobachten, dass durch die Bindung von GFP-Lac-CTCF der LacO-Array in seiner Fläche deutlich vergrößert ist

(Abb. 5.16 A und D). Beide Immunfärbungen zeigen eine spezifische Anfärbung der Zellkerne, wobei durch die Immunfärbung mit dem H3K9me3-spezifischen Antikörper deutlich eine Reihe von heterochromatischen Foci angefärbt wird (Abb. 5.16 B und E). Durch Überlagerung der beiden Aufnahmen der unterschiedlichen Kanäle zeigt sich, dass das Chromatin im Bereich des GFP-Lac-CTCF-gebundenen LacO-Arrays keine Anreicherung der beiden heterochromatischen Histonmodifikationen aufweist (Abb. 5.16 C und E).

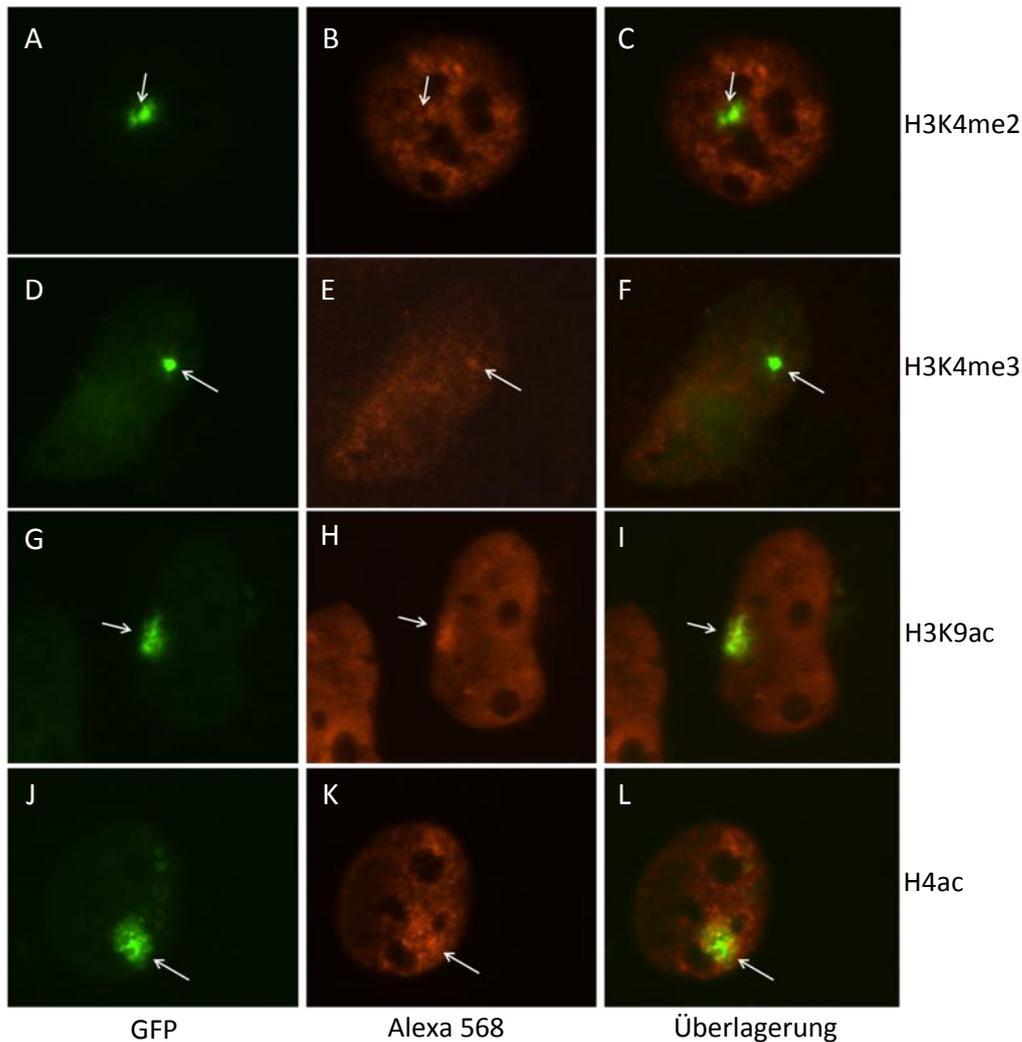


Abb. 5.17: CTCF-vermittelte Dekondensierung im centromeren Bereich ist mit Euchromatinisierung verbunden

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung. **A, D, G und J.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF; **B, E, H und K.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung. B: anti-H3K4me2, E: anti-H3K4me3, H: anti-H3K9ac J: anti-H4ac; Der jeweils verwendete Sekundäntikörper ist markiert mit Alexa 568-Farbstoff; **C, F, I und L.** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein gelbes Signal weist auf eine Kolokalisierung hin; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Betrachtet man dagegen die Immunfärbungen, die mit den vier verschiedenen Antikörpern gegen die euchromatischen Histonmodifikationen durchgeführt worden ist, lässt sich beobachten, dass diese ebenfalls spezifisch den Zellkern mit Ausnahme der Nukleoli anfärben. Die Färbung zeigt aber auch, dass die einzelnen Histonmodifikationen im Zellkern in bestimmten Bereichen angereichert sind (Abb. 5.17 B, E, H und K). Der von GFP-Lac-CTCF-gebundene Array weist jeweils eine dekondensierte Struktur auf (Abb. 5.17 A, D, G und J). Die Überlagerung der Immunfärbung gegen H3K4me2, H3K4me3 und H3K9ac mit der entsprechenden Aufnahme, die die Position des integrierten LacO-Arrays zeigt, macht deutlich, dass die beobachtete Anreicherung in der Immunfärbung genau der Struktur des durch CTCF dekondensierten LacO-Arrays entspricht (Abb. 5.17 C, F, und I). Für die H4ac-Färbung trifft dies nicht zu. Hier ist nur eine Anreicherung im Bereich des dekondensierten Arrays zu beobachten, die die Struktur nicht exakt widerspiegelt (Abb. 5.17 L).

Zusätzlich wurde noch untersucht, ob CTCF die Einführung der Histonvariante H2A.Z im Bereich des dekondensierten LacO-Arrays verursacht, da die Nukleosomen an CTCF-Bindestellen mit dieser Variante des kanonischen Histons H2A angereichert sind (Fu et al., 2008; Barski et al., 2007).

U-2OS F42B8-Zellen wurden daher mit GFP-Lac-CTCF transfiziert, nach 60h fixiert und einer indirekten Immunfärbung mit einem spezifisch gegen H2A.Z gerichteten Antikörper unterzogen.

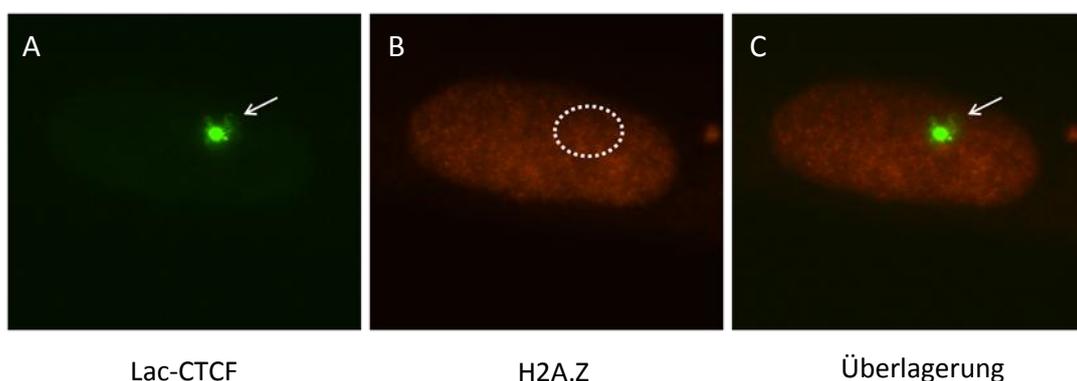


Abb. 5.18: CTCF-vermittelte Chromatin-Dekondensierung ist unabhängig von der Integration der Histonvariante H2A.Z

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung; **A.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF; **B.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung mit anti-H2A.Z-Antikörper und Alexa568-markiertem Sekundärantikörper; **C.** Überlagerung der beiden Aufnahmen; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, ein weißer, gestrichelter Kreis markiert ein fehlendes Signal.

Die anschließende Analyse im Fluoreszenzmikroskop zeigt ein deutliches und spezifisches Signal für die Immunfärbung. H2A.Z ist im gesamten Zellkern zu detektieren (Abb. 5.18 B). Der von GFP-Lac-CTCF gebundene und dekondensierte DNA-Array ist ebenfalls gut sichtbar (Abb. 5.18 A). Die Überlagerung der beiden Aufnahmen lässt erkennen, dass H2A.Z nicht im Bereich des CTCF-gebundenen Arrays akkumuliert ist (Abb. 5.18 C). Die durch CTCF vermittelte Dekondensierung geht demnach nicht einher mit einer Anreicherung des Chromatins mit der Histonvariante H2A.Z.

Zusätzlich sollte der Effekt von CTCF auf den Chromatinstatus der drei Telomer-nah integrierten LacO-Arrays untersucht werden. Dazu wurden U-2OS F6B2-Zellen ebenfalls mit dem GFP-Lac-CTCF-Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und einer indirekten Immunfärbung unterzogen.

Verwendet wurden dazu wiederum exemplarisch Antikörper spezifisch gerichtet gegen die heterochromatische Histonmodifikation H3K27me3 sowie die euchromatische Histonmodifikation H3K9ac.

Bei der nachfolgenden Analyse im Fluoreszenzmikroskop ist zu beobachten, dass durch die Bindung von GFP-Lac-CTCF die drei Telomer-nah integrierten LacO-Arrays deutlich in ihrer Fläche vergrößert sind (Abb. 5.19 A und D). Die Immunfärbung mit dem H3K27me3-spezifischen Antikörper zeigt ein unregelmäßiges Muster im Zellkern, da eine Reihe von heterochromatischen Foci angefärbt wird (Abb. 5.19 B). Durch anschließende Überlagerung der beiden Aufnahmen der unterschiedlichen Kanäle zeigt sich, dass der anti-H3K27me3-Antikörper jedoch im Chromatinbereich der drei unterschiedlich großen LacO-Arrays bei Bindung von GFP-Lac-CTCF kein Signal mehr zeigt (Abb. 5.19 C).

Betrachtet man dagegen die H3K9ac-spezifische Immunfärbung, ist zu beobachten, dass diese Histonmodifikation neben der einheitlichen Verteilung im Zellkern in bestimmten Bereichen angereichert ist (Abb. 5.19 E). Die Überlagerung dieser Aufnahme mit der entsprechenden Aufnahme, die die Position der Telomer-nah integrierten LacO-Arrays zeigt, macht deutlich, dass diese Anreicherung von H3K9ac im Chromatin genau der Struktur des durch CTCF dekondensierten LacO-Arrays entspricht (Abb. 5.19 E und F).

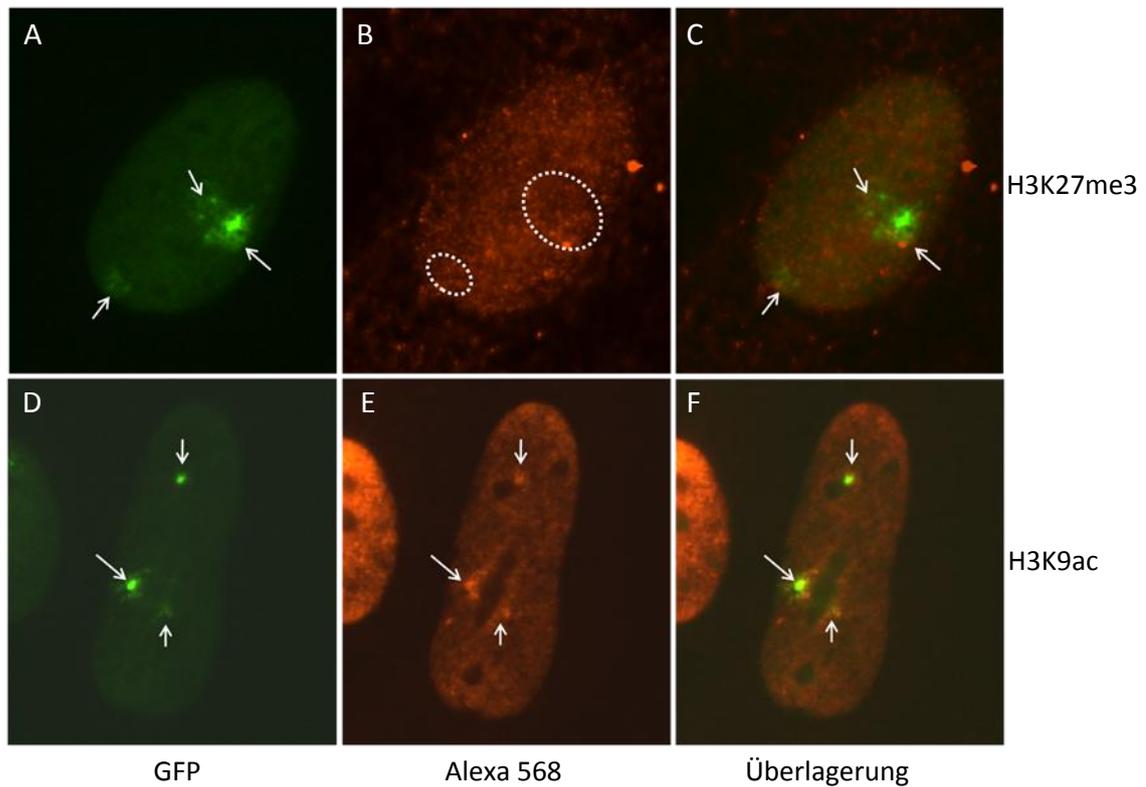


Abb. 5.19: CTCF-vermittelte Dekondensierung in telomeren Bereichen ist ebenfalls mit Euchromatinisierung verbunden

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F6B2-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung; **A und D.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF; **B und E.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung. B: anti-H3K27me3, E: anti-H3K9ac. Sekundärantikörper markiert mit Alexa568-Farbstoff; **C und F.** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein gelbes Signal weist auf eine Kolokalisierung hin (F); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, weiße Kreise markieren ein fehlendes Signal.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Chromatinstatus des LacO-Arrays vor und nach CTCF-Bindung:

Tab 5.3: Übersicht über die CTCF-bedingte Chromatinveränderung am LacO-Array

Histonmodifikation	Lac	Lac-CTCF
H3K9me3	-	-
H3K27me3	+	-
H3K9ac	-	+
H3K4me2	-	+
H3K4me3	-	+
H4ac	-	+/-
H2A.Z	nt	-

-: keine Anreicherung am LacO-Array; +: Anreicherung am LacO-Array, die die genaue Struktur widerspiegelt; +/-: Anreicherung im Bereich des LacO-Arrays; nt: nicht getestet

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CTCF-vermittelte Dekondensierung der heterochromatischen LacO-Arrays sowohl im Centromer- als auch im Telomerbereich mit der Veränderung von Histonmodifikationen einhergeht. Es kommt zu einer CTCF-bedingten Euchromatinisierung der Chromatinstruktur im Arraybereich.

5.2.5 Identifizierung der funktionellen Domäne von CTCF

Um einen besseren Einblick in den Mechanismus der beschriebenen Dekondensierung zu erhalten, wurden verschiedene CTCF-Deletionskonstrukte als Fusionsprotein mit GFP- oder mCherry-Lac hergestellt (s. Anhang). So sollte die für die Dekondensierung verantwortliche Domäne von CTCF identifiziert werden.

5.2.5.1 Der N-Terminus als auch die Zinkfingerdomäne von CTCF sind nötig für eine vollständige Dekondensierung des Arrays

Zuerst wurde die Funktion der verschiedenen strukturellen Domänen von CTCF in Hinsicht auf die Dekondensierung untersucht. Verwendet wurden Fusionen aus GFP-Lac sowie der N-terminale Domäne (CTCF N), der Kombination aus N-Terminus und Zinkfinger-Domäne (CTCF N + ZF), der Zinkfinger-Domäne allein (CTCF ZF), der Kombination aus Zinkfinger-Domäne und C-Terminus (CTCF ZF + C) sowie der C-terminale Domäne allein (CTCF C) (Abb. 5.20). Als Kontrollen dienten der Lac-Repressor (kondensierter Array) und Lac-CTCF (vollständig dekondensiert).

U-2OS F42B8-Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, nach 60h fixiert und die DNA gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie und nachfolgender Größenauswertung.

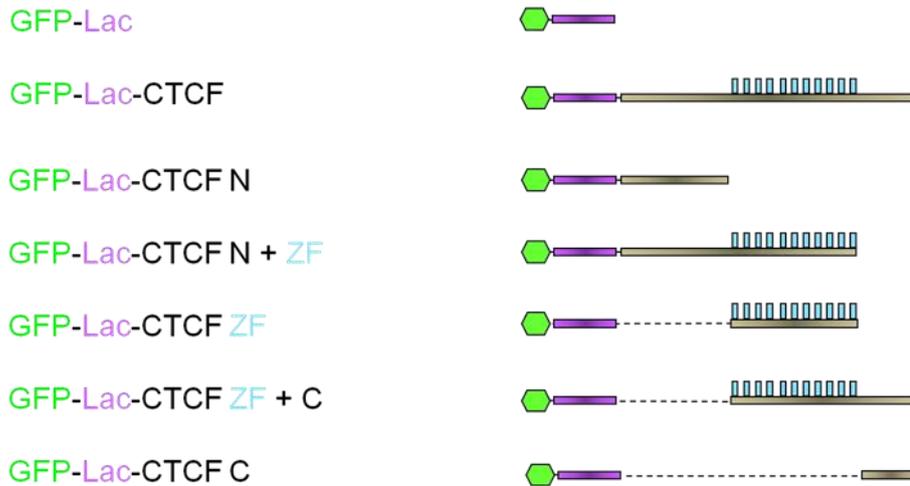


Abb. 5.20: Schematische Darstellung der verwendeten Deletionskonstrukte als GFP-Lac-Fusionsproteine

Dargestellt sind GFP-Lac, GFP-Lac-CTCF-Wildtyp sowie die verschiedenen Deletionen von CTCF als GFP-Lac-Fusionsproteine. Grünes Sechseck: GFP; violettes Rechteck: Lac-Repressor; graues Rechteck: CTCF. Ein verkürztes Rechteck weist auf eine Deletion des entsprechenden Bereiches im Vergleich zum Wildtyp-Protein hin; elf blaue Rechtecke repräsentieren die Zinkfinger-Domäne von CTCF; eine gestrichelte Linie weist auf das Fehlen der entsprechenden Domäne(n) hin.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop lässt sich erkennen, dass der vom Lac-Repressor gebundene DNA-Array wie erwartet eine kondensierte Struktur zeigt (Abb. 5.21 A und B). Die Bindung von Lac-CTCF dagegen hat einen starken Einfluss auf die Struktur des LacO-Arrays; er liegt vollständig dekondensiert vor (Abb. 5.21 C und D). Die Analyse der verschiedenen Deletionskonstrukte von CTCF zeigt, dass diese einen unterschiedlich starken Effekt auf den LacO-Array haben. So führt die Bindung des N-Terminus von CTCF an den LacO-Array ebenfalls zu einer Dekondensierung. Diese erscheint jedoch schwächer ausgeprägt als beim Wildtyp-Protein (Abb. 5.21 E und F). Die Bindung der Kombination von N-terminaler und ZF-Domäne zeigt dagegen einen genauso effizienten Dekondensierungseffekt wie das Wildtyp-Protein (Abb. 5.21 G und H). Kaum einen Effekt zeigt das Lac-CTCF ZF-Konstrukt. Bindet dieses an den LacO-Array, bleibt jener kondensiert (Abb. 5.21 I und J). Der C-Terminus von CTCF (Abb. 5.21 M und N) sowie die Kombination von C-Terminus und ZF-Domäne (Abb. 5.21 K und L) zeigen ebenfalls einen Dekondensierungseffekt am LacO-Array. Dieser Effekt ist jedoch schwächer als der vom Wildtyp-Protein verursachte. Der LacO-Array nimmt zudem meist eine aufgeblähte Form an.

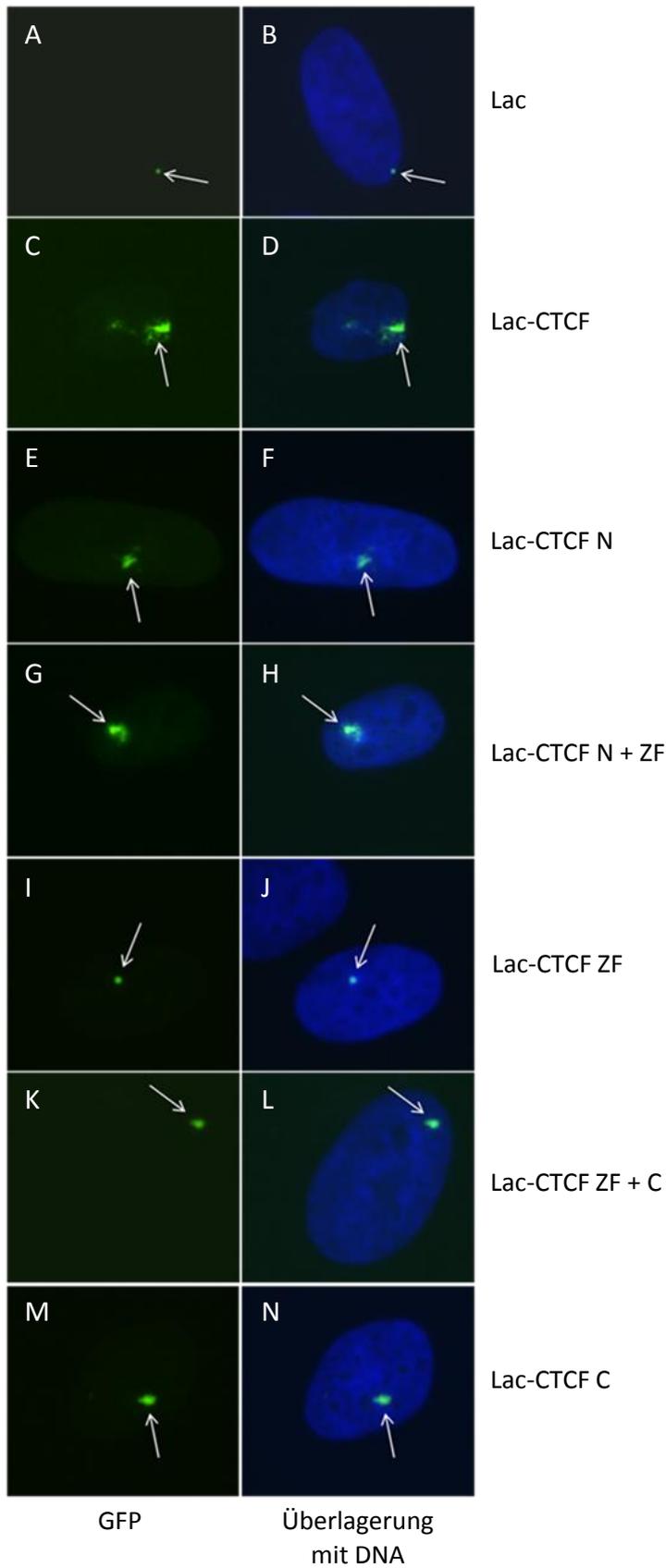


Abb. 5.13: Verschiedene Domänen von CTCF haben ein unterschiedlich starkes Dekondensierungspotential

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer von je 1µg GFP-Lac, GFP-Lac-CTCF oder der verschiedenen GFP-Lac-CTCF-Deletionskonstrukte sowie anschließender Fixierung und DNA-Färbung. **A, C, E, G, I, K und M.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung der verschiedenen GFP-Lac-Fusionsproteine an; **B, D, F, H, J, L und N.** Überlagerung des GFP-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaue Fluoreszenz); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Die statistische Analyse der Größenauswertung ergibt für den Array-gebundenen Lac-Repressor eine Fläche von $0,09\mu\text{m}^2$ im Median (Maximalwert $0,24\mu\text{m}^2$), während der CTCF-gebundene LacO-Array stark dekondensiert vorliegt. Die Fläche beträgt $2\mu\text{m}^2$ im Median mit einem Maximalwert von $5,86\mu\text{m}^2$ (Abb. 5.22).

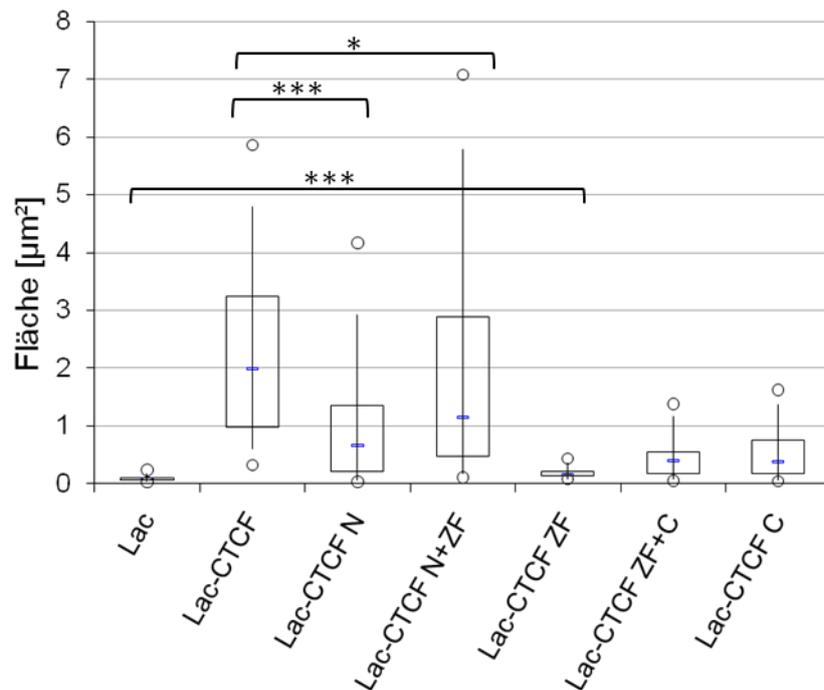


Abb. 5.22: Die N-terminale Domäne und die Zinkfinger-Domäne von CTCF führen synergistisch zur Dekondensierung des LacO-Arrays

U-2OS F42B8-Zellen wurden nach Transfer mit je $1\mu\text{g}$ GFP-Lac, GFP-Lac-CTCF oder der angezeigten Deletionskonstrukte von CTCF nach 60h fixiert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die statistische Analyse der Dekondensierung erfolgte mittels Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen; Lac: n=42, Lac-CTCF: n=42, Lac-CTCF N: n=48, Lac-CTCF N+ZF: n=38, Lac-CTCF ZF: n=39, Lac-CTCF ZF+C: n=41, Lac-CTCF +C: n=51; U-Test: ***- $P < 0,005$, *- $P > 0,05$.

Betrachtet man den Effekt der verschiedenen CTCF-Deletionskonstrukte, so zeigt sich, dass mit Ausnahme von CTCF ZF (Fläche: $0,16\mu\text{m}^2$ im Median und einem Maximalwert von $0,44\mu\text{m}^2$) die Bindung alle Konstrukte zu einer mehr oder weniger starken Dekondensierung des LacO-Arrays führt (Abb. 5.22). So hat ein von CTCF N gebundener Array eine Fläche von $0,67\mu\text{m}^2$ im Median (Maximalwert $4,17\mu\text{m}^2$). Die Bindung von CTCF N+ZF führt zu einer Vergrößerung der Array-Flächen auf $1,16\mu\text{m}^2$ im Median (Maximalwert $7,08\mu\text{m}^2$). Die CTCF-Deletionen, die den C-terminalen Bereich enthalten, haben einen geringeren Einfluss auf die

Struktur des LacO-Arrays. Die Bindung von CTCF ZF+C als auch von CTCF C führt zu einer Vergrößerung der Array-Fläche auf rund $0,4 \mu\text{m}^2$ im Median. Die Maximalwerte betragen $1,38$ bzw. $1,62 \mu\text{m}^2$ in der Fläche (Abb. 5.22).

Der U-Test für die verschiedenen CTCF-Deletionen und CTCF ergibt, dass sich der Dekondensierungseffekt aller CTCF-Deletionskonstrukte mit Ausnahme von CTCF N+ZF signifikant vom CTCF-Wildtyp unterscheidet (Abb. 5.22). Der U-Test für alle CTCF-Deletionskonstrukte und GFP-Lac zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($P < 0,005$).

Die N-terminale und die ZF-Domäne von CTCF scheinen daher in der Dekondensierung zu synergieren.

5.2.5.2 Die Enhancerblockade-vermittelnde Domäne von CTCF ist nicht ausreichend für eine vollständige Dekondensierung

In Isolationsexperimenten mittels eines GAL-Reporter-Systems konnte gezeigt werden, dass der vordere Bereich der N-terminalen Domäne von CTCF für die Vermittlung der Enhancerblockade ausreichend ist (Bardenhagen, Diplomarbeit 2003). Die Enhancerblockade-Domäne (NT1) beschränkt sich auf die ersten 67 Aminosäuren des Proteins. Um den Effekt dieser funktionellen Domäne auf den heterochromatischen DNA-Array zu untersuchen, wurden ein Konstrukt hergestellt, das für ein Fusionsprotein aus mCherry-Lac und NT1 kodiert (s. Anhang und Abb. 5.23). Mit diesem wurden U-2OS F42B8-Zellen transfiziert und nach 60h fixiert.



Abb. 5.23: Schematische Darstellung des verwendeten Deletionskonstruktes als mCherry-Lac-Fusion

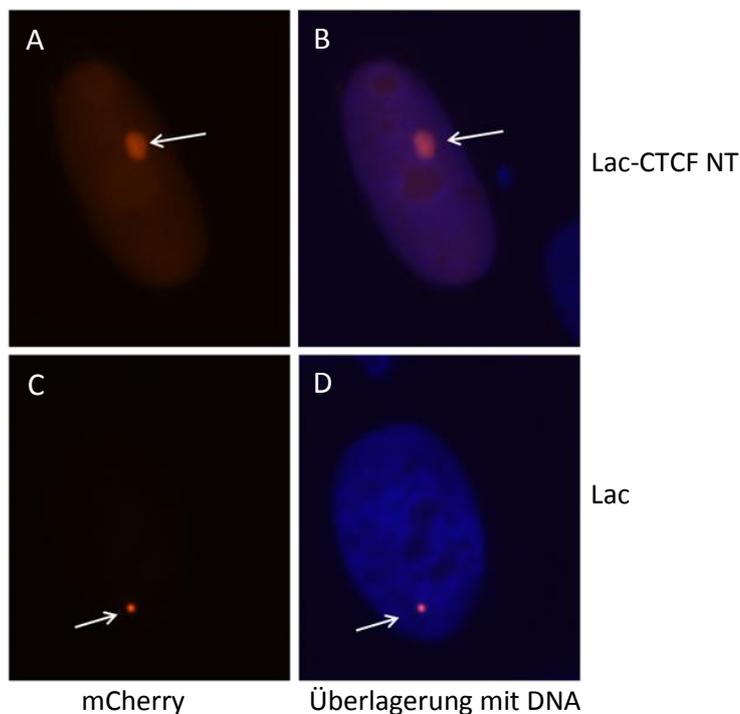
Dargestellt sind mCherry-Lac, der mCherry-Lac-CTCF-Wildtyp sowie das Fusionsprotein aus mCherry-Lac und CTCF NT1. Rotes Sechseck: mCherry; violettes Rechteck: Lac-Repressor; graues Rechteck: CTCF. Ein verkürztes Rechteck weist auf eine Deletion des entsprechenden Bereiches im Vergleich zum Wildtyp-Protein hin; elf blaue Rechtecke repräsentieren die Zinkfinger-Domäne von CTCF.

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit nachfolgender Größenauswertung. Als Kontrolle dienten wiederum Lac-Repressor und Lac-CTCF Wildtyp.

Im Fluoreszenzmikroskop konnte beobachtet werden, dass der CTCF NT1-gebundene Array im Vergleich zum Lac-Repressor (kondensierter Array (Abb. 5.24 C und D)) eher kondensiert oder unvollständig dekondensiert vorliegt; die Art der Dekondensierung ist aufgebläht (Abb. 5.24 A und B).

Die Größenauswertung ergab, dass sich die Fläche des CTCF NT1-gebundene LacO-Arrays verglichen mit dem Lac-gebundenem Array (Medianwert $0,07\mu\text{m}^2$, Maximalwert $0,3\mu\text{m}^2$) um das 6,4fache vergrößert, der Medianwert der Arrayfläche beträgt für CTCF NT1 $0,45\mu\text{m}^2$, der Maximalwert liegt bei $1,49\mu\text{m}^2$ Fläche (Abb. 5.24 E). Somit reicht der Effekt von CTCF NT1 nicht an den des vollständigen Proteins, mit einer Fläche von $2,05\mu\text{m}^2$ im Median und von $6,69\mu\text{m}^2$ als Maximalwert, heran. Der U-Test ergibt für alle drei Konstrukte einen signifikanten Unterschied im vermittelten Dekondensierungseffekt ($P < 0,005$).

Die Enhancerblockade-Domäne von CTCF ist demnach nicht ausreichend für den vollen Dekondensierungseffekt am LacO-Array, scheint aber dennoch einen Anteil daran zu haben.



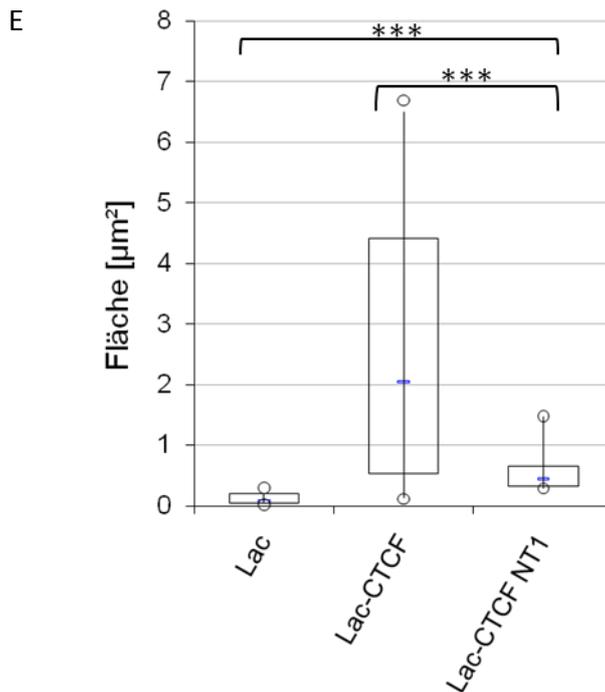


Abb. 5.24: Die Enhancerblockade-Domäne von CTCF zeigt nur einen schwachen Dekondensierungseffekt

A-D. Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit je 1µg mCherry-Lac oder mCherry-Lac-CTCF NT1 und anschließender Fixierung und DNA-Färbung nach 60h. **A und C.** Das rote Fluoreszenz-signal zeigt jeweils die Lokalisierung von mCherry-Lac oder mCherry-Lac-CTCF NT1; **B und D.** Überlagerung des mCherry-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaue Fluoreszenz); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an; **E.** Die statistische Auswertung der Dekondensierung erfolgte mittels Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen); Lac: n=17, Lac-CTCF: n=38; Lac-CTCF NT1: n=19; U-Test: ***-P<0,005.

5.2.5.3 Acetylierung von CTCF spielt keine Rolle für die Dekondensierung

In *in vitro*-Acetylierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass CTCF neben anderen post-translationalen Modifikationen auch durch Anheftung von Acetyl-Gruppen modifiziert werden kann (J. Leers, persönliche Kommunikation). Als das Enzym, das diese Reaktion hauptsächlich katalysiert, konnten die Histon-Acetyltransferasen P/CAF und p300 identifiziert werden. Ort der Acetylierung sind zwei Lysine an der Basis des ersten Zinkfingers der DNA-Bindedomäne von CTCF (K263 und K264; J. Leers, persönliche Kommunikation). Im Zuge dieser Studien wurde auch eine Mutante von CTCF generiert, die den nicht-acetylierten Status von CTCF unter Beibehaltung der negativen Ladung der Aminosäuren simuliert. Dafür wurden die zwei Lysine (KK) durch je ein Arginin (RR) ausgetauscht.

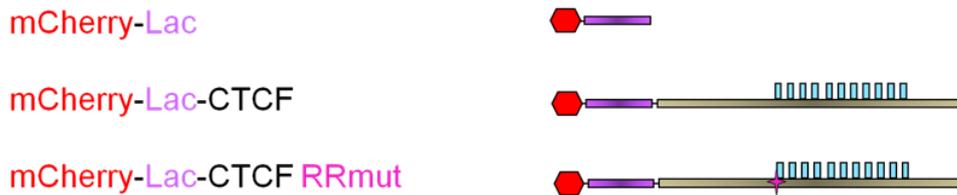


Abb. 5.25: Schematische Darstellung des verwendeten mutierten CTCF-Konstruktes als mCherry-Lac-Fusion

Dargestellt sind mCherry-Lac, der mCherry-Lac-CTCF-Wildtyp sowie das Fusionsprotein aus mCherry-Lac und CTCF RRmut. Rotes Sechseck: mCherry; violettes Rechteck: Lac-Repressor; graues Rechteck: CTCF; elf blaue Rechtecke repräsentieren die Zinkfinger-Domäne von CTCF; ein rosafarbener Stern markiert die Mutation.

Diese mutierte Form von CTCF (CTCF RRmut) wurde ebenfalls als mCherry-Lac-Konstrukt hergestellt (s. Anhang und Abb. 5.25), um zu untersuchen, ob der Acetylierungsstatus von CTCF einen Einfluss auf die CTCF-vermittelte Dekondensierung des LacO-Array hat.

Dazu wurden U-2OS F42B8-Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und die DNA gefärbt. Als Kontrollen wurden ebenfalls Lac-Repressor und Lac-CTCF (Wildtyp) mitgeführt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich, dass wie erwartet der Lac-Repressor den kondensierten Array markiert (Abb. 5.26 A und B), während Bindung von Lac-CTCF zu einer starken Dekondensierung führt (Abb. 5.26 C und D). Bindet die mutierte Form von CTCF an den LacO-Array, wird dieser ebenfalls stark dekondensiert (Abb. 5.26 E und F).

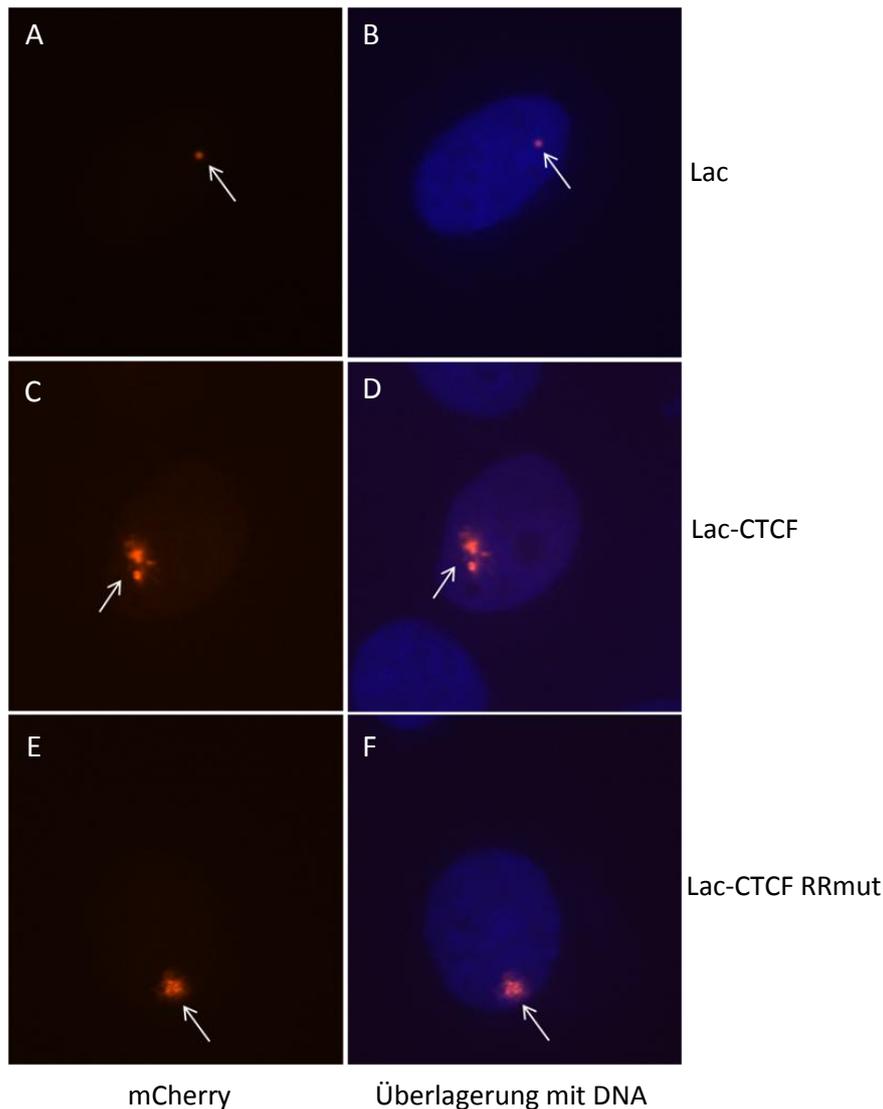


Abb. 5.26: Die Acetylierungsmutante von CTCF kann den LacO-Array ebenfalls dekondensieren
 Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit je 1µg mCherry-Lac, mCherry-Lac-CTCF oder mCherry-Lac-CTCF RRmut, anschließender Fixierung nach 60h und DNA-Färbung. **A, C und E.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung der verschiedenen mCherry-Lac-Proteine. **B, D und F.** Überlagerung des mCherry-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaue Fluoreszenz); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Analysiert man diese Daten anschließend mittels Größenauswertung, zeigt sich, dass die Bindung des Lac-Repressors den DNA-Array kondensiert belässt. Der Array hat eine mediane Fläche von $0,23\mu\text{m}^2$. Maximal ist der LacO-Array $0,37\mu\text{m}^2$ groß. Die Bindung von Lac-CTCF zeigt abermals den erwarteten Dekondensierungseffekt (Abb. 5.27). Der LacO-Array hat maximal eine Fläche von $4,11\mu\text{m}^2$. Im Median hat ein CTCF-gebundener LacO-Array eine Fläche von $1,55\mu\text{m}^2$. Für die Acetylierungsmutante von CTCF ergibt die Bindung an den LacO-

Array eine mediane Fläche von $0,73\mu\text{m}^2$, der Maximalwert liegt bei $4,55\mu\text{m}^2$ (Abb. 5.27). Somit besitzt Lac-CTCF RRmut ebenfalls ein starkes Dekondensierungspotential.

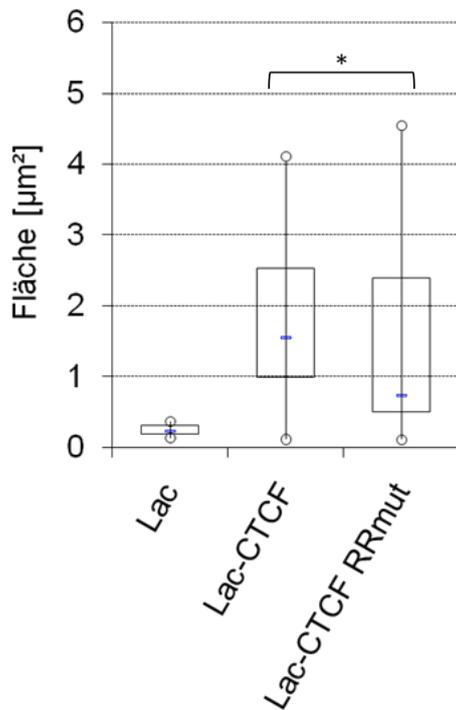


Abb. 5.27: Acetylierung von CTCF ist nicht nötig für die Vermittlung der Dekondensierung

Die statistische Analyse der Dekondensierung erfolgte anschließend mittels Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen; Lac: n=27, Lac-CTCF: n=24; Lac-CTCF RRmut: n=23; U-Test: *-P>0,05.

Der U-Test ergibt, dass der Dekondensierungseffekt des mutierten CTCF sich nicht signifikant vom Effekt des Wildtyp-Proteins unterscheidet (P>0,05).

Die durch CTCF vermittelte Dekondensierung des heterochromatischen LacO-Arrays ist demnach unabhängig von einer möglichen Acetylierung der beiden analysierten Lysinreste *in vivo*.

5.2.6 Dynamik des Dekondensierungsprozesses

Durch Behandlung der Array-tragenden U-2OS-Zellen mit IPTG kann man die Bindung von Lac-Proteinen an den LacO-Array regulieren. IPTG, ein Laktose-Analogon, wird vom Lac-Repressor gebunden; dies führt zu einer Konformationsänderung des Repressorproteins

(Fieck et al., 1992), wodurch das Protein nicht mehr an die Lac-Operator-Sequenz binden kann. So kann die Bindung von Lac-CTCF an den Array reguliert werden. Dies kann man sich zunutze machen, um einen Einblick in die Dynamik der Dekondensierung zu erhalten.

Dafür werden erstmal F6B2-Zellen vor, während und nach der Transfektion mit dem GFP-Lac-CTCF-Konstrukt mit 150 μ M IPTG behandelt und für eine bestimmte Zeit unter IPTG-Behandlung belassen. Später werden die GFP-Lac-CTCF-exprimierenden Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewaschen und in IPTG-freiem Medium weiter gehalten. Die Fixierung und folgende DNA-Färbung findet parallel statt. So erhält man Zellen, an deren Array GFP-Lac-CTCF unterschiedlich lang gebunden vorlag. Als Kontrolle werden Zellen verwendet, die permanent unter IPTG-Behandlung waren und damit die Ausgangssituation der Kondensierung widerspiegeln.

Die Auswertung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop, indem die Zellen nach kondensiertem oder dekondensiertem Array ausgezählt werden. Dabei werden verschiedene Stadien der Dekondensierung definiert:

- (i) Kein Array ist sichtbar oder es findet keine Dekondensierung statt. Das Protein ist über den gesamten Zellkern verteilt, da IPTG seine Bindung an den LacO-Array verhindert. Keiner oder nur größte der drei LacO-Arrays wird durch Bindung des GFP-Lac-CTCF-Fusionsproteins sichtbar, ist aber noch kondensiert (Abb. 5.28 A und B).
- (ii) Eine unvollständige Dekondensierung liegt vor. Das Protein bindet vermehrt an die LacO-Arrays. Zwei der drei Arrays sind daher sichtbar und beginnen zu dekondensieren, die Hintergrundfluoreszenz des Zellkerns nimmt ab (Abb. 5.28 C).
- (iii) Eine vollständige Dekondensierung liegt vor. Alle drei LacO-Arrays sind durch Bindung von GFP-Lac-CTCF sichtbar und sind dekondensiert. Die Hintergrundfluoreszenz im Zellkern ist gering (Abb. 5.28 D).

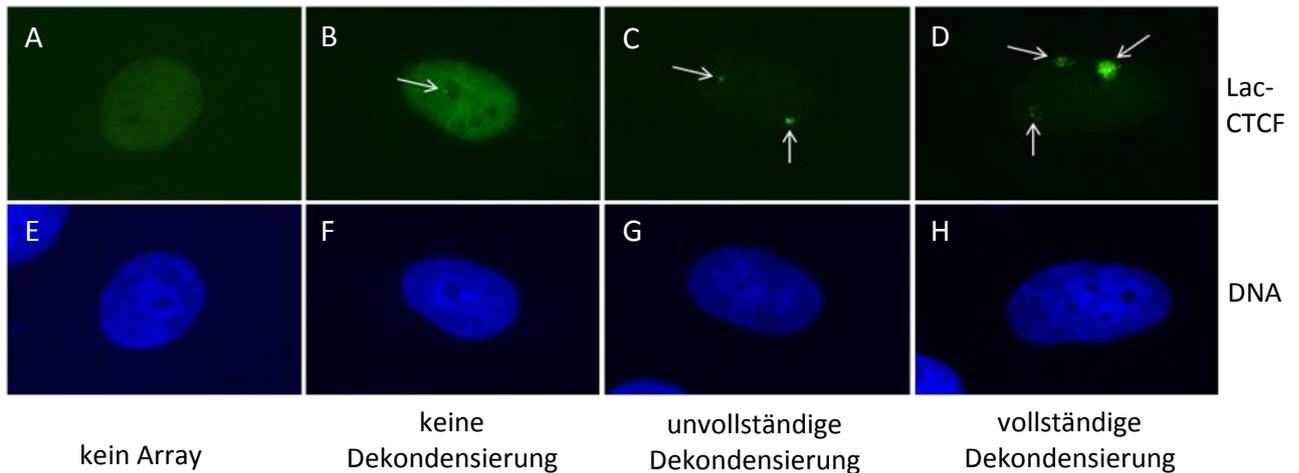


Abb. 5.28: Verschiedene Stadien der Dekondensierung

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F6B2-Zellen. Die Zellen wurden unter IPTG-Behandlung (150µM) mit 1µg GFP-Lac-CTCF transfiziert, nach 48h gewaschen und weiter in IPTG-freiem Medium gehalten (B-D und F-H). Als Kontrolle wurden Zellen permanent unter IPTG-Behandlung belassen (A und E). Die Fixierung und DNA-Färbung erfolgte an unterschiedlichen Zeitpunkten. **A-D.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF; **E-H.** Die Hoechst-Färbung zeigt den jeweils zugehörigen Zellkern (blaues Fluoreszenzsignal); weiße Pfeile zeigen die sichtbaren LacO-Arrays an.

U-2OS F42B8-Zellen, die permanent unter IPTG-Behandlung waren, zeigen zu 88,4% (+/-5,44) keine Dekondensierung des LacO-Arrays; 11,7% (+/-5,51) liegen unvollständig dekondensiert vor (Abb. 5.29). In Zellen, die nur eine Stunde in IPTG-freiem Medium gehalten wurden, zeigen sich bereits 8,3% (+/-0,5) der Arrays vollständig und 41,3% (+/-3,25) unvollständig dekondensiert. Die Dekondensierung schreitet mit zunehmender Zeit voran, so liegen nach zwei Stunden insgesamt 61% (49,2 +/-0,14% bzw. 11,7 +/-4,52%) und nach vier Stunden rund 73% (49,6 +/-0% bzw. 23,2 +/-2,26%) der ausgezählten Arrays unvollständig oder vollständig dekondensiert vor. Neun Stunden nach CTCF-Bindung an den Array ergibt sich eine Dekondensierung von etwa 80% (19,85 +/-4,67% unvollständig bzw. 59,05 +/-2,33% vollständig) der Arrays (Abb. 5.29). Die Dekondensierung ist damit nahezu abgeschlossen.

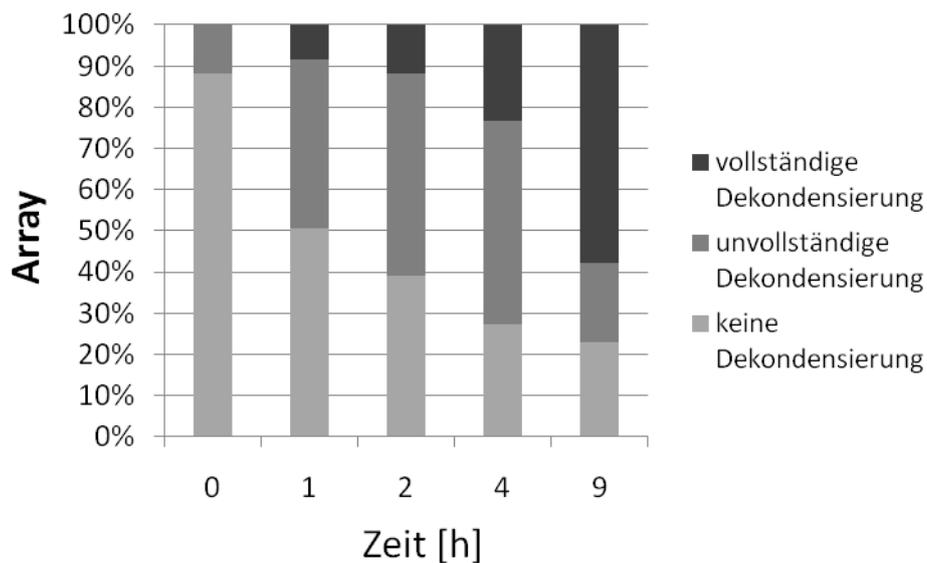


Abb. 5.29: Die Dekondensierung beginnt innerhalb einer Stunde nach Bindung von CTCF und ist nach neun Stunden nahezu abgeschlossen

Statistische Auswertung der Dynamik der Dekondensierung. U-2OS F42B8-Zellen wurden unter IPTG-Behandlung (150µM) mit 1µg GFP-Lac-CTCF transfiziert, nach 48h gewaschen und weiter in IPTG-freiem Medium gehalten. Als Kontrolle wurden Zellen permanent unter IPTG-Behandlung belassen (0h). Die Fixierung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel (nach 1,2,4, oder 9h). Anschließend wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt; n>150.

5.2.7 Der paraloge Faktor BORIS führt ebenfalls zu Dekondensierung des Arrays

2002 konnte ein zu CTCF paraloger Faktor identifiziert werden (Loukinov et al., 2002). Dieser Faktor, BORIS (*Brother of Regulator of Imprinted Sites*) genannt, ist in der Zinkfinger-Domäne zu CTCF konserviert, in den N- und C-terminalen Bereichen jedoch nicht. Über die Funktion ist noch wenig bekannt.

Um zu testen, ob dieser Faktor ebenfalls in der Lage ist, heterochromatische DNA zu dekondensieren, wurden Vektoren hergestellt, die ein Fusionsprotein aus mCherry-Lac und humanem BORIS (hBORIS) oder murinem BORIS (mBORIS) kodieren (s. Anhang).

U-2OS F42B8-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert, die Zellen nach 60h fixiert und die DNA gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop zeigt sich, dass sowohl humanes (Abb. 5.30 A und B) als auch murines BORIS den Array dekondensieren kann (Abb. 5.30 C und D).

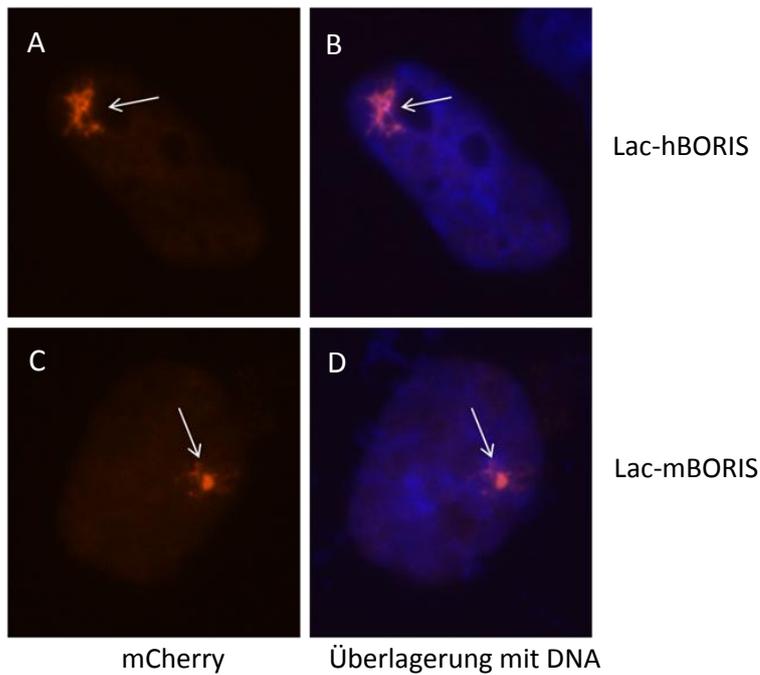


Abb. 5.30: Bindung von BORIS führt ebenfalls zu einer Dekondensierung des LacO-Arrays

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit je $1\mu\text{g}$ mCherry-Lac-hBORIS oder mCherry-Lac-mBORIS, sowie Fixierung und DNA-Färbung nach 60h. **A und C.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung der beiden mCherry-Lac-BORIS-Proteine. **B und D.** Überlagerung des mCherry-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaue Fluoreszenz); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Um den Dekondensierungseffekt von BORIS mit dem von CTCF genauer vergleichen zu können, wurde eine Größenauswertung der dekondensierten Arrays nach Bindung von Lac, Lac-CTCF oder Lac-hBORIS vorgenommen (Schulte, Diplomarbeit 2009).

Dabei ergibt sich, dass die Bindung von Lac-CTCF an den DNA-Array verglichen mit dem Lac-Repressor einen starken und signifikanten Dekondensierungseffekt aufweist ($2,5\mu\text{m}^2$ Fläche im Median). Die Bindung von Lac-hBORIS führt ebenfalls zu einer signifikanten Vergrößerung der Array-Fläche ($0,7\mu\text{m}^2$ Fläche im Median, Abb. 5.31), der Maximalwert liegt bei $2,5\mu\text{m}^2$ Fläche.

Der Effekt ist aber deutlich geringer als der durch CTCF vermittelte Effekt; Bindung von CTCF führt zu einer rund 15fachen Vergrößerung, Bindung von hBORIS nur zu einer rund 4fachen Vergrößerung der Array-Fläche im Median. Somit ist der Effekt von CTCF rund 3,5fach stärker als der seines paralogen Faktors.

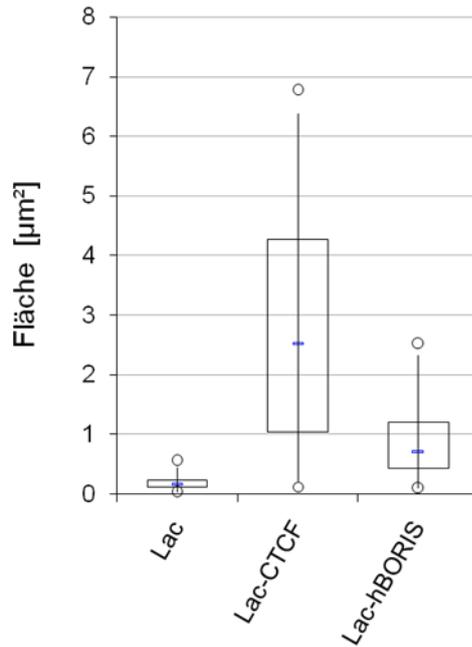


Abb.5.31: Der Dekondensierungseffekt von CTCF ist stärker als der Effekt von BORIS

Die statistische Analyse der Dekondensierung erfolgte mittels Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen; Lac: n=31, Lac-CTCF: n=51; Lac-hBORIS: n=47 (die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt, Schulte, Diplomarbeit 2009).

5.2.8 Vergleich von CTCF mit dem Transaktivator VP16

Aufgrund der vorhandenen Befunde stellte sich die Frage, ob die durch CTCF vermittelten Ereignisse an dem heterochromatischen DNA-Array – i.e. Dekondensierung und Euchromatinisierung – auf eine aktivierende Funktion von CTCF zurückzuführen sind.

Um dieser Frage nachzugehen, sollte das Aktivierungspotential von CTCF mit VP16, einem sehr starken Transaktivator, verglichen werden. Das Protein VP16 (aus *Herpes simplex*) enthält eine C-terminale Region bestehend aus 78 Aminosäuren, die sehr säurereich und notwendig für die Aktivierung der *immediate early*-Gene des *Herpes simplex*-Virus ist (AAD-Domäne für *acidic activation domain*) (Triezenberg et al., 1988). Zusätzlich wurde ein Fusionsprotein aus GAL (Aktivatorprotein in Hefe) und der AAD-Domäne von VP16 als extrem potenter Transaktivator in Säugerzellen beschrieben (Sadowski et al., 1988).

In den folgenden Analysen wurde die AAD-Domäne von VP16 (nachfolgend VP16 genannt) als GFP-Lac-Fusionsprotein verwendet.

5.2.9 CTCF besitzt kein Transaktivierungspotential im Vergleich mit VP16

Um das Aktivierungspotential von CTCF mit VP16 vergleichen zu können, sollte die Wirkung der beiden Faktoren als GFP-Lac-Fusionsproteine auf ein Reportersystem untersucht werden. Als Reporter wurde Luciferase verwendet, das unter der Kontrolle eines SV40-Promotors steht. Um dieselben Lac-Konstrukte, die in den vorherigen Analysen verwendet worden waren, testen zu können, enthält das Reporterkonstrukt außerdem noch eine Sequenz von sieben LacO-Bindestellen stromaufwärts vom Promotor (Abb. 5.24). Als Negativkontrolle wurden GFP-Lac sowie GFP-Lac-CTCF ZF mitgeführt, da beide Konstrukte keinen Dekondensierungseffekt am LacO-Array zeigen (s. Abb. 5.32).



Abb. 5.24: Schematische Darstellung des verwendeten Reporterkonstruktes

Dargestellt ist die SV40-Promotorregion (graues Rechteck) mit dem Reporter gen Luciferase (gelber Pfeil). Sieben rote Rechtecke repräsentieren die sieben LacO-Bindestellen stromaufwärts vom Promotorbereich.

Dazu wurden das Reporterkonstrukt und die verschiedenen GFP-Fusionskonstrukten sowie ein β -Galaktosidase-Vektor für die Normalisierung der Transfereffizienz transient in HEK293T-Zellen eingebracht. Nach 48h wurde der Zelleextrakt geerntet und mittels Messung der Luciferase- und der β -Galaktosidase-Aktivität analysiert.

Die Auswertung zeigt, dass GFP-Lac bereits einen Einfluss auf die Expression des Reporter gens Luciferase hat. Im Vergleich zur basalen Aktivität des Reporterkonstruktes (gleich 1fache Aktivierung) führt die Bindung von GFP-Lac an das Reporterkonstrukt zu einer 14,5fachen Erniedrigung der Expression (0,07fache Aktivierung; Abb. 5.33 B). Deutlich zu erkennen ist die Aktivierung durch VP16. Im Vergleich zu basalen Aktivität bewirkt die Bindung von GFP-Lac-VP16 eine 8,6fache Aktivierung (Abb. 5.33 A), im Vergleich zu GFP-Lac sogar eine 123fache Aktivierung der Expression. Die Bindung von GFP-Lac-CTCF bzw. des ZF-Konstruktes hat jedoch keinen zu VP16 vergleichbaren Effekt auf die Reporteraktivität. Verglichen mit der basalen Aktivität des Reporters führt CTCF zu einer 5fachen Erniedrigung der Expression (0,2fache Aktivierung), die ZF-Domäne führt zu einer 3,3fachen Erniedrigung

(0,3fache Aktivierung; Abb. 5.33 A). Verglichen mit dem Effekt von GFP-Lac ist dies eine 3fache Erhöhung der Aktivität für CTCF sowie eine 4,4fache Erhöhung durch die ZF-Domäne.

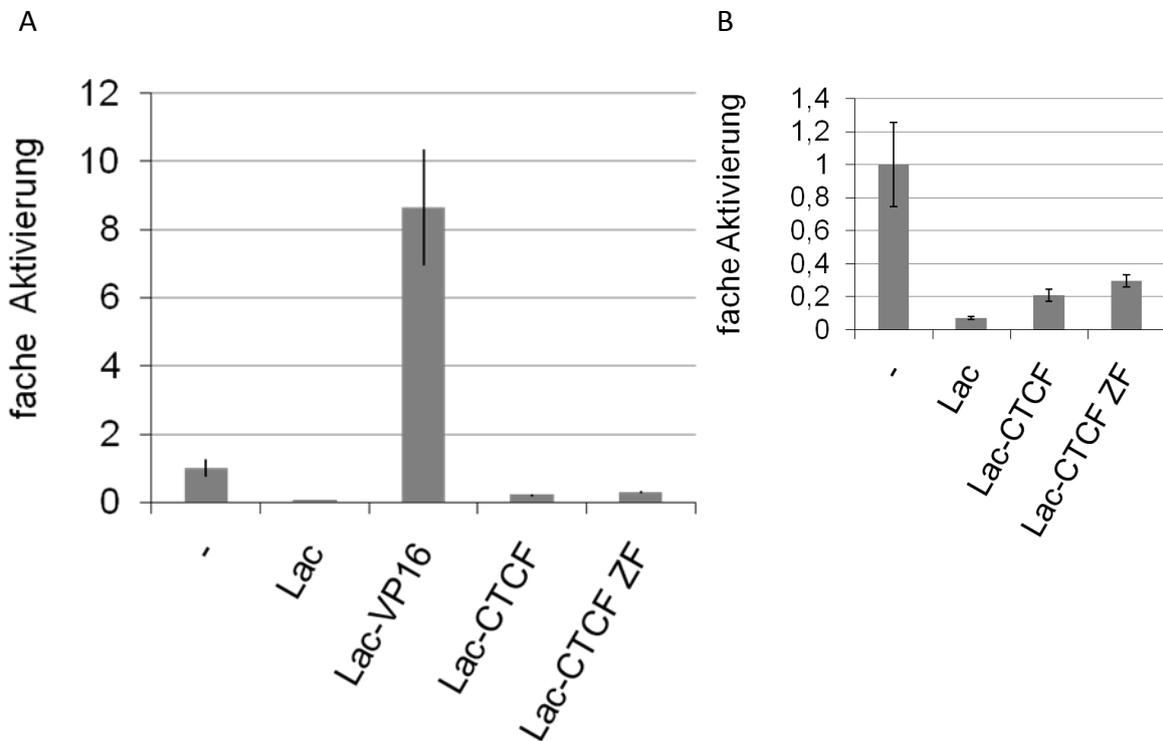


Abb. 5.33 CTCF hat keinen aktivierenden Effekt auf ein Reporterogen in HEK293T-Zellen

Transienter Reporterassay in HEK293T-Zellen. Die Zellen wurden mit je 1µg Reporterkonstrukt, 0,25µg der angezeigten GFP-Lac-Konstrukte sowie 0,6µg pCMV-LacZ transfiziert. Nach 48h wurde der Zelleextrakt geerntet und auf Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität untersucht. Analysiert wurden jeweils Triplets; **A.** Darstellung der relativen, normalisierten Luciferase-Aktivität. **B.** Darstellung der relativen, normalisierten Luciferase-Aktivität ohne GFP-Lac-VP16.

Der Versuch wurde parallel mit U-2OS F42B8-Zellen durchgeführt, da in diesen Zellen die CTCF-vermittelte Dekondensierung beobachtet worden war.

Die Auswertung zeigt eine ähnliche Tendenz wie für HEK293T-Zellen. GFP-Lac hat einen leichten Einfluss auf die Expression des Reportergens Luciferase. Im Vergleich zur basalen Aktivität des Reporterkonstruktes (gleich 1fache Aktivierung) führt die Bindung von GFP-Lac an das Reporterkonstrukt zu einer 3fachen Erniedrigung der Expression (0,34fache Aktivierung; Abb. 5.34 B). Deutlich zu erkennen ist die Aktivierung durch VP16. Im Vergleich zu basalen Aktivität bewirkt die Bindung von GFP-Lac-VP16 schon eine 138fache Aktivierung

der Expression (Abb. 5.26 A). Die Bindung von GFP-Lac-CTCF bzw. des ZF-Konstruktes hat kaum einen Effekt auf die Reporteraktivität. Verglichen mit der basalen Aktivität des Reporters führt CTCF zu einer 1,8fachen Erniedrigung der Expression (0,6fache Aktivierung), die ZF-Domäne hat keinen Effekt (1fache Aktivierung; Abb. 5.34 B). Verglichen mit dem Effekt von GFP-Lac ist dies eine 1,7fache Erhöhung der Aktivität durch CTCF sowie eine 3fache Erhöhung durch die ZF-Domäne. CTCF besitzt demnach kein Transaktivierungspotential.

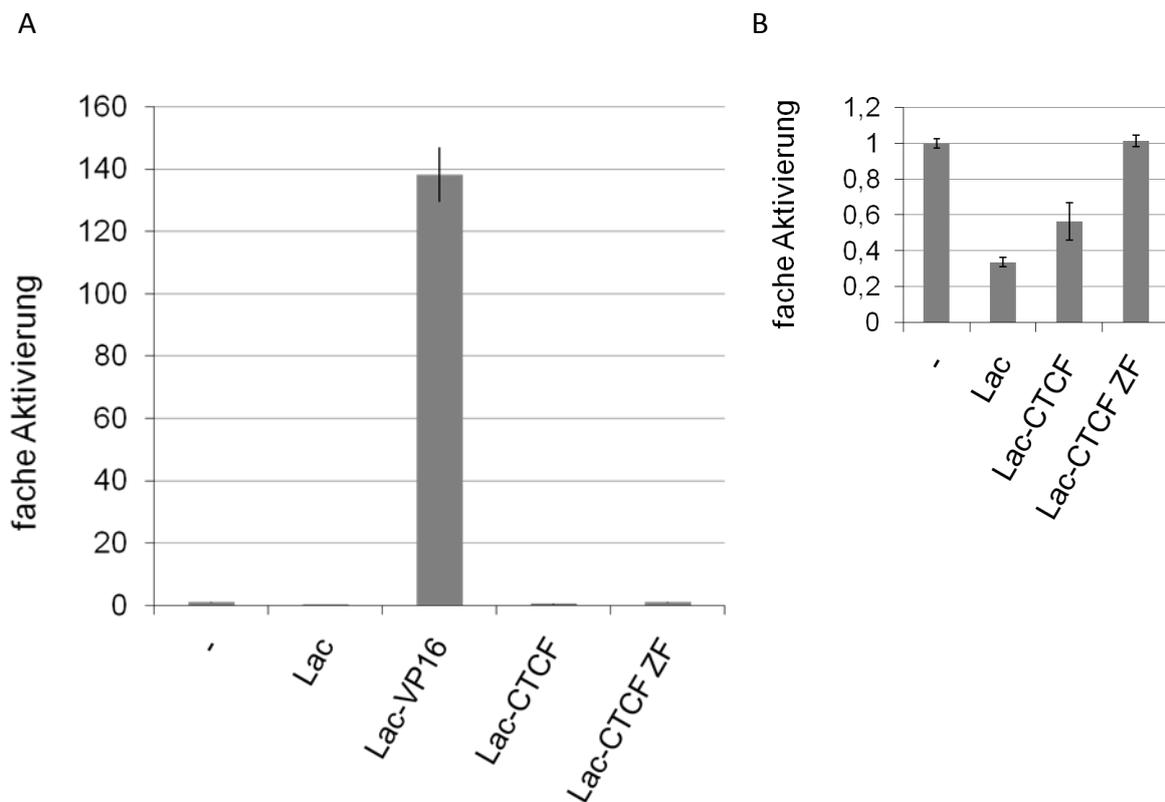


Abb. 5.34: CTCF hat keinen aktivierenden Effekt auf ein Reporter gen in U-2OS F42B8-Zellen

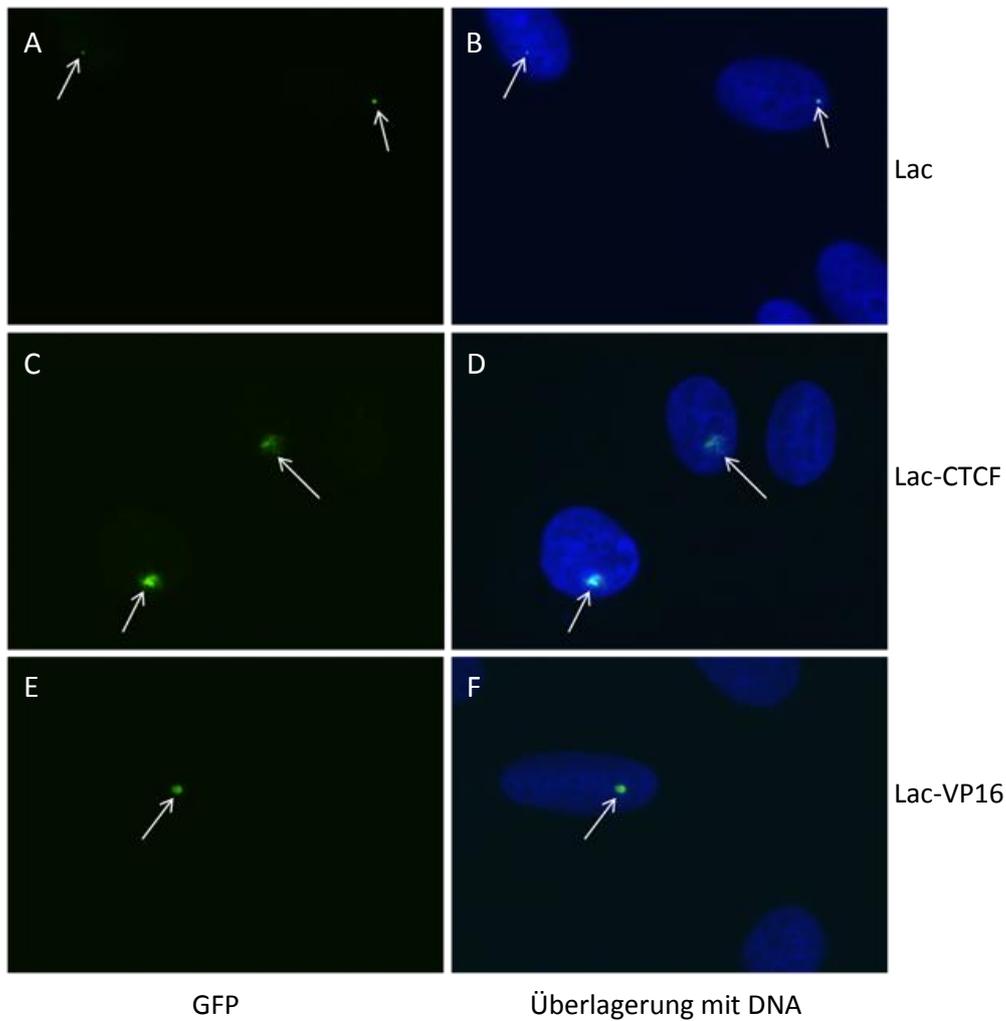
Transienter Reporterassay in U-2OS F42B8-Zellen. Die Zellen wurden mit je 1µg Reporterkonstrukt, 0,25µg der angezeigten GFP-Lac-Konstrukte sowie 0,6µg pCMV-LacZ transfiziert. Nach 48h wurde der Zelleextrakt geerntet und auf Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität untersucht. Analysiert wurden jeweils Dupletts; **A.** Darstellung der relativen, normalisierten Luciferase-Aktivität. **B.** Darstellung der relativen, normalisierten Luciferase-Aktivität ohne GFP-Lac-VP16.

5.2.10 CTCF besitzt ein stärkeres Dekondensierungspotential als VP16

Wie in den vorangegangenen Analysen gezeigt werden konnte, ist CTCF im Gegensatz zu VP16 nicht in der Lage, in einem transienten Reporterassay die Expression des Reportergens zu aktivieren. Interessanterweise konnte für VP16 bereits ebenfalls gezeigt werden, dass es

einen heterochromatischen DNA-Array dekondensieren kann (Memedula and Belmont, 2003). Daher sollte nun der Dekondensierungseffekt beider Faktoren miteinander verglichen werden. Dazu wurden U-2OS F42B8-Zellen mit GFP-Lac-, GFP-Lac-CTCF- oder GFP-Lac-VP16-Konstrukten transfiziert, nach 60h fixiert und die DNA angefärbt. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit nachfolgender Bewertung der Ergebnisse mittels Größenauswertung.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich, dass Zellen, die mit dem GFP-Lac-Konstrukt transfiziert wurden, wie erwartet einen kondensierten LacO-Array tragen (Abb. 5. 34 A und B). Auch die Bindung von GFP-Lac-CTCF an den Array zeigt das erwartete Resultat – der LacO-Array liegt stark dekondensiert vor (Abb. 5. 34 C und D).



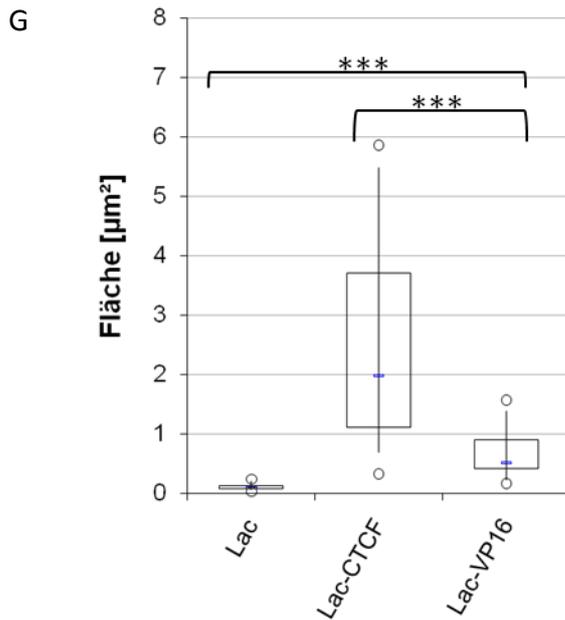


Abb. 5.346: CTCF zeigt einen stärkeren Dekondensierungseffekt an dem heterochromatischen DNA-Array als der Aktivator VP16

A-F Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit je 1µg GFP-Lac, GFP-Lac-CTCF oder GFP-Lac-VP16 sowie Fixierung und DNA-Färbung nach 60h. **A, C und E.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung der unterschiedlichen GFP-Lac-Proteine; **B, D und F.** Überlagerung des GFP-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaue Fluoreszenz); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an. **G.** Die statistische Analyse der Dekondensierung erfolgte mittels Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen; Lac: n=42, Lac-CTCF: n=42, Lac-VP16: n=43; U-Test: ***-P<0,005.

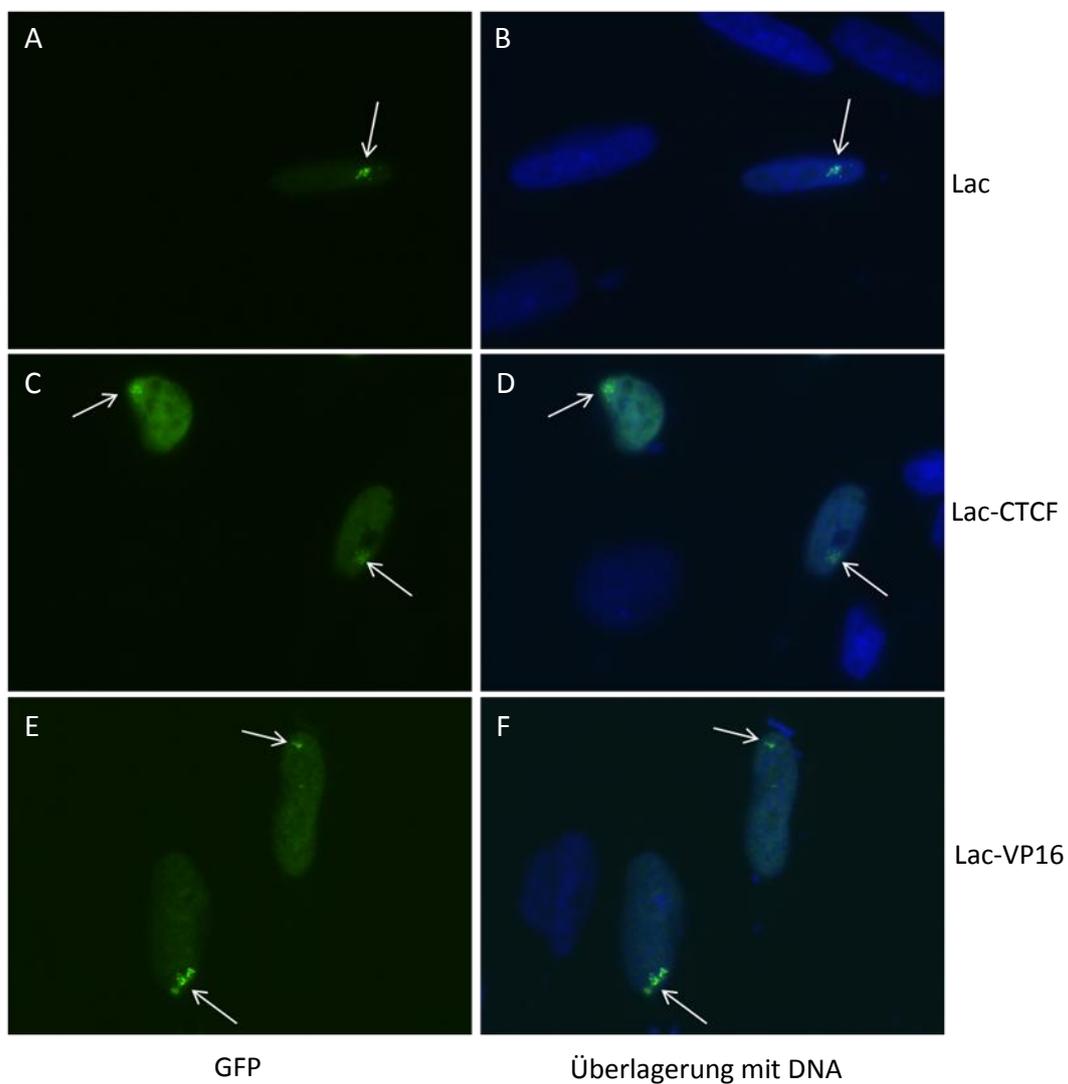
Bindet GFP-Lac-VP16 an den DNA-Array, liegt dieser ebenfalls dekondensiert vor und weist dabei v.a. eine aufgeblähte Form auf (Abb. 5. 34 C und D). Dieser Dekondensierungseffekt scheint aber nicht so stark zu sein wie der von CTCF vermittelte Effekt.

Diesen Eindruck bestätigt auch die im Anschluss durchgeführte Größenauswertung. Die Größe der Arrayfläche liegt nach Bindung des Lac-Repressors im Median bei 0,09µm² und erreicht einen maximalen Wert von 0,24µm² (Abb. 5. 34 G). Während die Bindung von Lac-CTCF an den Array eine Vergrößerung der medianen Fläche auf 2µm² mit einem Maximalwert von 5,86µm² verursacht (entspricht einer rund 22fache Vergrößerung der Array-Fläche), zeigt ein Lac-VP16-gebundener DNA-Array nur eine Fläche von 0,52µm² im Median (Abb. 5.34 G). Der Maximalwert liegt bei 1,57µm² Fläche. Dies entspricht einer rund 6fachen Vergrößerung der Fläche.

CTCF zeigt damit einen rund 3,5fach stärkeren Dekondensierungseffekt an dem heterochromatischen LacO-Array als VP16.

Der U-Test ergibt, dass der Dekondensierungseffekt von Lac-VP16 sich signifikant zum Lac-Repressor und Lac-CTCF unterscheidet ($P < 0,005$; Abb. 5. 34 G).

Um den Einfluss von CTCF und VP16 weiter zu vergleichen, wurden RRE_B1-Zellen ebenfalls mit GFP-Lac, GFP-Lac-CTCF oder GFP-Lac-VP16 transfiziert, nach 60h fixiert und die DNA angefärbt.



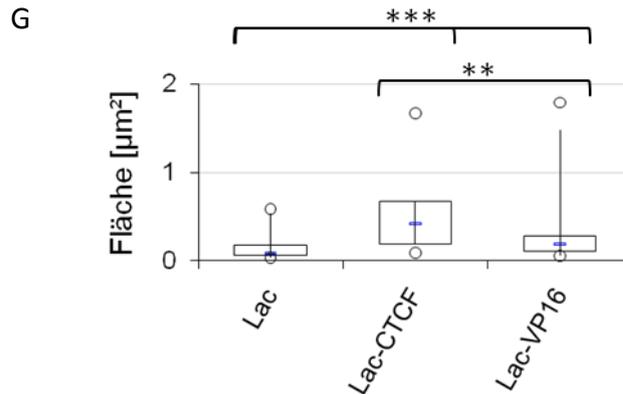


Abb. 5.35: CTCF zeigt einen etwas stärkeren Dekondensierungseffekt als der Aktivator VP16 an einem euchromatischen DNA-Array

A-F Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von RRE_B1-Zellen nach Transfer mit je 1µg GFP-Lac, GFP-Lac-CTCF oder GFP-Lac-VP16 sowie Fixierung und DNA-Färbung nach 60h. **A, C und E.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung der unterschiedlichen GFP-Lac-Proteine; **B, D und F.** Überlagerung des GFP-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaue Fluoreszenz); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an. **G.** Die statistische Analyse der Dekondensierung erfolgte mittels Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen; Lac: n=29, Lac-CTCF: n=18, Lac-VP16: n=27; U-Test: ***-P<0,005; **-P<0,05.

Diese Derivate einer Hamsterzelllinie enthalten einen euchromatischen LacO-Array in ihrem Genom, der bereits in einem dekondensierten Zustand vorliegt (Robinett et al., 1996). Dieser LacO-Array lässt sich beispielsweise durch die Bindung eines GFP-Lac-MBD2-Fusionsproteins kondensieren (K. Günther, unveröffentlichte Beobachtung). MBD2 (*methyl CpG binding domain protein 2*) ist in der Lage, den NuRD (*nucleosome remodeling and histone deacetylation*)-Komplex an methylierte Promotoren zu rekrutieren und spielt dabei eine wichtige Rolle in der Stilllegung der entsprechenden Gene (Feng and Zhang, 2001).

Im Fluoreszenzmikroskop ist zu erkennen, dass der LacO-Array, visualisiert durch die Bindung von GFP-Lac, tatsächlich dekondensiert vorliegt (Abb. 5.35 A und B). Die Bindung von GFP-Lac-CTCF oder GFP-Lac-VP16 scheint auf den DNA-Array keinen wesentlichen Effekt zu haben, der LacO-Array bleibt dekondensiert (Abb. 5.35 C-F). Auffallenderweise sind nur vergleichsweise wenig RRE_B1-Zellen zu beobachten, die das GFP-Lac-CTCF-Konstrukt exprimieren.

Die Größenauswertung erlaubt auch hier einen genauen Blick auf die Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten. Der bereits euchromatische LacO-Array, visualisiert durch GFP-

Lac, besitzt im Median eine Fläche von $0,09\mu\text{m}^2$; der maximale Wert liegt bei $0,59\mu\text{m}^2$ (Abb. 5.35 G). Interessanterweise haben RRE_B1-Zellen im Vergleich zu U2OS-Zellen einen wesentlich kleineren Zellkern. Dies spiegelt sich auch in der Größe der LacO-Arrays wider. Der Array liegt zwar bereits dekondensiert vor, ist aber dennoch in der Fläche etwa genau so groß wie der kondensierte Array in den U-2OS F42B8-Zellen (vgl. Abb. 5.34).

Bindet Lac-CTCF an den euchromatischen LacO-Array, führt dies zu einer rund 4,5fachen Vergrößerung der Arrayfläche. Der Array hat nun im Median eine Fläche von $0,42\mu\text{m}^2$; maximal ist der CTCF-gebundene LacO-Array in RRE_B1-Zellen $1,67\mu\text{m}^2$ groß (Abb. 5.35 G). Liegt Lac-VP16 am euchromatischen DNA-Array vor, führt dies nur zu einer rund 2fachen Vergrößerung der Arrayfläche. Der mediane Wert beträgt $0,19\mu\text{m}^2$, der maximale Wert ist $1,79\mu\text{m}^2$ für die Fläche des VP16-gebundenen LacO-Arrays (Abb. 5.35 G).

Der U-Test ergibt, dass sowohl die Bindung von VP16 als auch von CTCF einen signifikanten Effekt auf die Arrayfläche hat ($P < 0,005$). Der Effekt von CTCF ist dabei ein wenig stärker ($P < 0,05$; Abb. 5.35). CTCF zeigt damit ein höheres Dekondensierungspotential als der Transaktivator VP16.

5.2.11 Analyse potenzieller Interaktionspartner von CTCF

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass CTCF zu einer Änderung der Chromatinzusammensetzung an einem heterochromatischen DNA-Array führt. Da CTCF selbst keinerlei bisher gezeigte Histon-modifizierende Funktion besitzt, stellt sich die Frage, wie die Einführung der euchromatischen Modifikationen an dem DNA-Array herbeigeführt wird.

Um dies zu analysieren, wird mittels Kotransfektion oder indirekter Immunfluoreszenz auf eine Interaktion von CTCF mit verschiedenen Enzymen oder Faktoren getestet. Dabei werden einerseits schon bereits bekannte Interaktionspartner von CTCF untersucht wie beispielsweise RNA-Polymerase II oder Cohesin, andererseits aber auch Faktoren, für die noch keine Interaktion gezeigt werden konnte, deren Aktivität aber am Array nach CTCF-Bindung beobachtet wird. Beispiele hierfür sind JMJD3, eine H3K27-Demethylase oder GCN5, eine Histon-Acetyltransferase.

5.2.11.1 CTCF rekrutiert sich selbst an den LacO-Array

Um zu testen, ob dieses System geeignet ist, Protein-Protein-Interaktionen zwischen an den Array gebundenem CTCF und einem potenziellen Kofaktor zu detektieren, wurde zuerst die bereits beschriebene Multimerisierung von CTCF untersucht (Pant et al., 2004; Yusufzai et al., 2004). Dazu wurden U-2OS F42B8-Zellen mit dem mCherry-Lac-CTCF-Konstrukt als auch einem GFP-CTCF-Konstrukt kotransfiziert, nach 60h fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

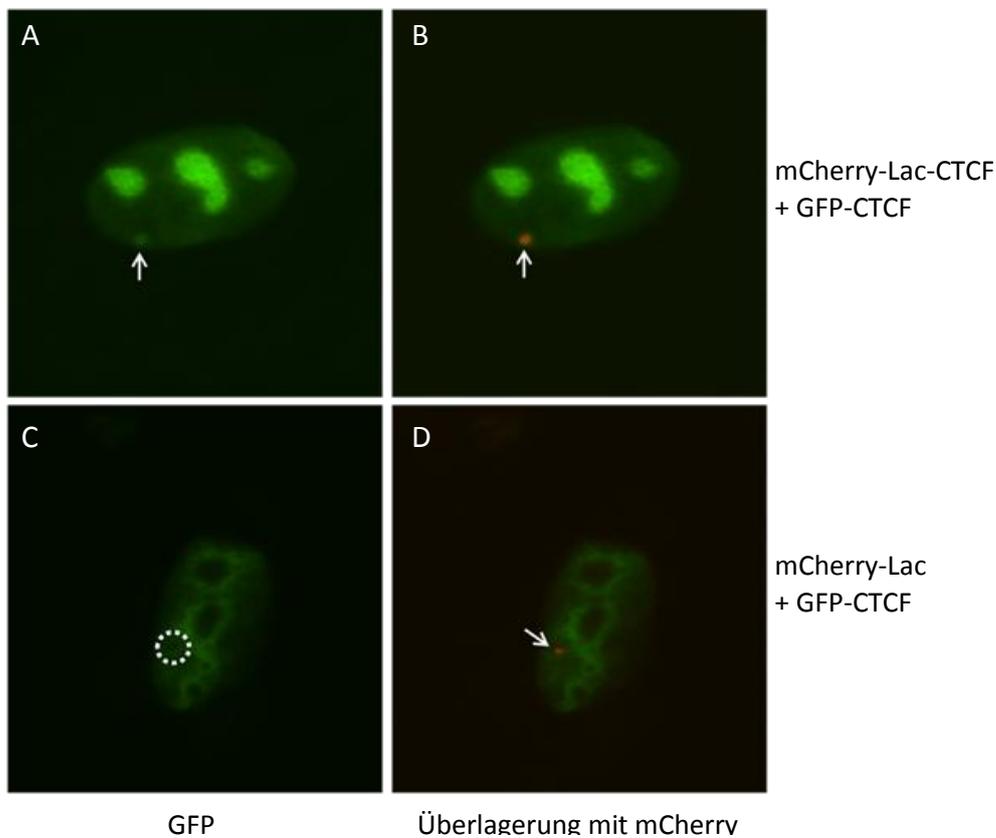


Abb. 5.36: CTCF kann sich selbst an den LacO-Array rekrutieren

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Kotransfer von je 1µg mCherry-Lac-CTCF (rotes Fluoreszenzsignal, A und B) oder mCherry-Lac (rotes Fluoreszenzsignal, C und D) mit 1µg GFP-CTCF sowie Fixierung nach 60h. **A und C.** Grüne Fluoreszenz zeigt die Lokalisierung von GFP-CTCF; **B und D.** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein orangefarbenes Signal weist auf eine Kolokalisierung hin (B); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, ein weißer Kreis markiert ein fehlendes Signal.

Dabei zeigt sich, dass durch die Überexpression von mCherry-Lac-CTCF sowie GFP-CTCF dieses nicht nur im Zellkern, sondern auch in den Nukleoli lokalisiert ist. Zusätzlich ist eine weitere Struktur erkennbar (Abb. 5.36 A). Die Überlagerung mit der Aufnahme des roten

Fluoreszenzkanals zeigt, dass diese Struktur dem von mCherry-Lac-CTCF-gebundenem, dekondensiertem DNA-Array entspricht (Abb. 5.36 B). Der Array erscheint dabei v.a. in der aufgeblähten Form. Werden mCherry-Lac und GFP-CTCF koexprimiert, bleiben die Nukleoli frei von GFP-CTCF (Abb. 5.36 C). Die Überlagerung mit der roten Fluoreszenzaufnahme zeigt, dass die durch mCherry-Lac visualisierte Array-Struktur ebenfalls frei von GFP-CTCF bleibt (Abb. 5.36 C und D). Somit kann überexprimiertes GFP-CTCF über an den Array gebundenes CTCF an diesen rekrutiert werden, während der Lac-Repressor allein kein CTCF rekrutiert kann.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass Protein-Protein-Interaktionen zwischen an dem LacO-Array gebunden vorliegendem CTCF und einem frei im Zellkern verfügbaren Faktor mittels dieses Systems untersucht werden können.

5.2.11.2 Bekannte Interaktionspartner von CTCF sind nicht am dekondensierten Array nachweisbar

Für CTCF konnte bereits eine Reihe von Interaktionspartnern identifiziert werden. Einige davon zeigen eine funktionelle Beziehung zu der von CTCF vermittelten Isolatorfunktion der Enhancerblockade. Deshalb sollte untersucht werden, ob diese bekannten Interaktionspartner von CTCF ebenfalls an dem von Lac-CTCF gebundenem LacO-Array zu detektieren sind und eventuell sogar zu der von CTCF vermittelten Dekondensierung des heterochromatischen DNA-Arrays beitragen, um so möglicherweise Rückschlüsse auf den Mechanismus der CTCF-vermittelten Funktion ziehen zu können.

Für die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II konnte eine direkte Interaktion mit einer Subpopulation von CTCF in humanen Zellen nachgewiesen werden (Chernukhin et al., 2007). Das Enzym wird außerdem CTCF-abhängig an eine Reihe von CTSS rekrutiert. Es wird spekuliert, ob diese Interaktion eine Rolle in der CTCF-vermittelten Enhancerblockade spielt.

Als weiterer Interaktionspartner von CTCF konnte der Faktor CHD8 (Ishihara et al., 2006) identifiziert werden. CHD8 gehört zur CHD-Proteinfamilie (*chromodomain, helicase, DNA binding*), die zwei Chromodomänen zur Bindung von methylierten Lysinen im N-terminalen Bereich enthalten sowie eine katalytische *Snf2*-Helikase-Domäne besitzen (Marfella and Imbalzano, 2007). Zudem konnte für CHD8 gezeigt werden, dass das Protein ein ATP-

abhängiger Chromatin-Remodelling-Faktor ist (Thompson et al., 2008). CHD8 interagiert mit CTCF in HeLa-Zellen und kann auch an CTCF-Bindestellen detektiert werden. Diese Rekrutierung ist CTCF-abhängig. Auch eine Funktion konnte CHD8 zugeordnet werden. Die von CTCF vermittelte Enhancerblockade am *H19*-Locus ist abhängig von CHD8 (Ishihara et al., 2006).

Der Faktor RAD21 (SCC1) als Komponente des Cohesin-Komplexes konnte ebenfalls bereits mit CTCF in Verbindung gebracht werden. So konnte für murine und humane Zellen gezeigt werden, dass SCC1 oft dieselben Bindestellen wie CTCF besetzt und die Anwesenheit von Cohesin für die Enhancerblockade am *Igf2/H19*-Locus und am β -Globin-Locus notwendig ist (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Wendt et al., 2008).

Für Cohesin wird entsprechend postuliert, dass es zur Stabilisierung der von CTCF vermittelten Chromatinschleifen beiträgt (Nativio et al., 2009).

Um eine mögliche Interaktion dieser Faktoren mit CTCF am dekondensierten LacO-Array zu untersuchen, wurden U-2OS F42B8-Zellen mit dem GFP-Lac-CTCF-Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und einer indirekten Immunfärbung unterzogen. Verwendet wurden dazu Antikörper, die spezifisch die drei beschriebenen Faktoren erkennen.

Die Analyse am Fluoreszenzmikroskop zeigt, dass RNA-Polymerase II und RAD21 eine spezifische Lokalisierung im gesamten Zellkern aufweisen. (Abb. 5.37 B und H). CHD8 scheint sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert zu sein (Abb. 5.37 E).

Das GFP-Signal zeigt, wo der LacO-Array liegt, der durch Lac-CTCF gebunden in einer dekondensierten Konformation vorliegt (Abb. 37 A, D und G). Der Vergleich der beiden Aufnahmen lässt erkennen, dass keines der drei Proteine mit CTCF am dekondensierten LacO-Array lokalisiert ist (Abb. 5.37 C, F und I).

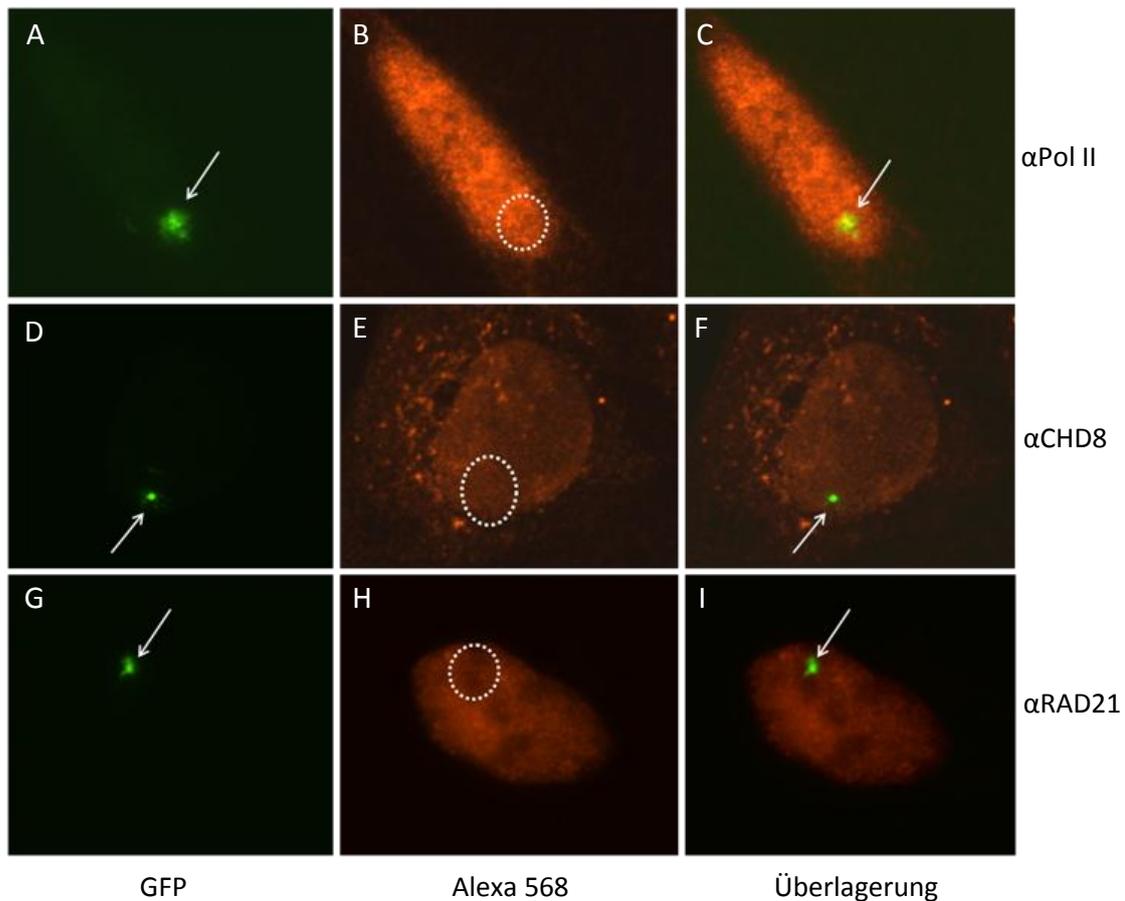


Abb. 5.37: Einige bereits bekannte Interaktionspartner von CTCF zeigen keine Kolo­kalisation mit CTCF am dekondensierten LacO-Array

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung; **A, D und G.** Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF am LacO-Array; **B, E und H.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung (B: αRNA-Polymerase II (PolIII), E: αCHD8, H: αRAD21). Der Sekundärantikörper ist markiert mit Alexa 568-Farbstoff; **C, F und I:** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, weiße Kreise markieren ein fehlendes Signal.

Einige der bereits bekannten Interaktionspartner von CTCF zeigen eine nukleoläre Lokalisation. Aufgrund der Befunde, dass CTCF in der Lage ist, DNA-Elemente an den Nukleoli zu positionieren, sollten auch diese Faktoren mittels des LacO-LacI-Modellsystems auf eine Interaktion oder Beteiligung in der Dekondensierung hin untersucht werden.

Der Faktor Nucleophosmin konnte sowohl in HeLa als auch in murinen ES-Zellen als Interaktionspartner von CTCF nachgewiesen werden (Yusufzai et al., 2004; van de Nobelen, 2008). Funktionell besteht eine Verbindung zu CTCF in der Ausführung der Enhancerblockade (Yusufzai et al., 2004).

Topoisomerase II, ein essentielles Enzym in Eukaryoten, das ATP-abhängig die transiente Einführung von Doppelstrangbrüchen in die DNA katalysiert, um Torsionsspannungen zu verhindern, die im Zuge von zellulären Prozessen wie Transkription oder Replikation auftreten. Die alpha-Form dieses Enzymes konnte in HeLa-Zellen im Komplex mit CTCF nachgewiesen werden (Yuzufzai et al., 2004). Eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen konnte jedoch noch nicht bestätigt werden. Einer Funktion konnte die potentielle Interaktion mit CTCF ebenfalls noch nicht zugeordnet werden.

Für das Enzym PARP-1 konnte bereits in Komplexaufreinigungen aus humanen und murinen Zellextrakten eine Assoziation mit CTCF nachgewiesen werden (Yusufzai et al., 2004; van de Nobelen, 2008). Eine funktionelle Verbindung in der Isolatorfunktion zwischen den beiden Faktoren besteht ebenfalls, da die PARylierung von CTCF darin eine wichtige Rolle einnimmt (Yu et al., 2004; Witcher & Emerson, 2009; Farrar et al., 2010).

Für die Analyse wurden U-2OS-F42B8-Zellen mit dem GFP-Lac-CTCF-Konstrukt transfiziert, nach 60h fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die beschriebenen Faktoren immungefärbt.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigt für alle drei Proteine eine spezifische Lokalisierung in den Nukleoli. (Abb. 5.38 A, C und E). Das GFP-Signal macht sichtbar, wo der LacO-Array liegt, der durch Lac-CTCF gebunden in einer dekondensierten Konformation vorliegt (Abb. 38 B, D und F). Der Vergleich der beiden Aufnahmen lässt erkennen, dass keines der drei Proteine mit CTCF am dekondensierten LacO lokalisiert ist.

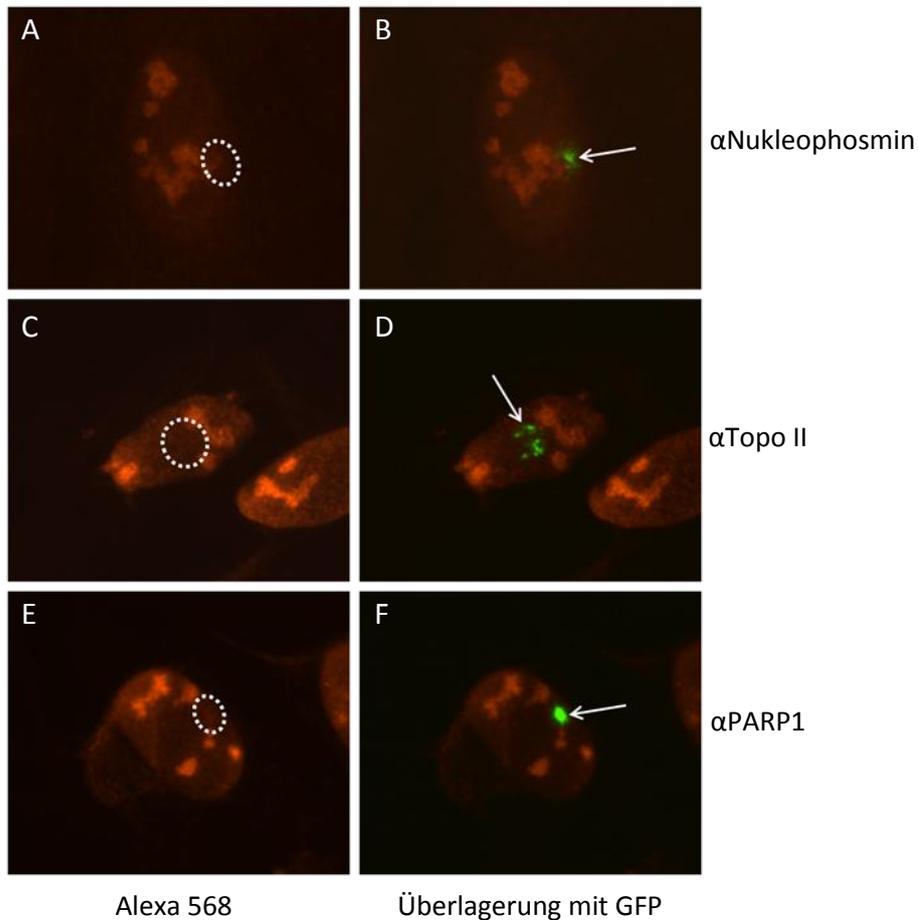


Abb. 5.38: Verschiedene Nucleolus-assoziierte Faktoren zeigen keine Kolokalisation mit CTCF am dekondensierten LacO-Array

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung;. **A, C und E.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung (A: αNucleophosmin, C: αTopoisomerase II (Topo II), E: αPARP1). Der Sekundärantikörper ist markiert mit Alexa 568-Farbstoff; **B, C und F:** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen; Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF am LacO-Array; weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, weiße Kreise markieren ein fehlendes Signal.

Für keinen der Nucleolus-gebundenen Faktoren konnte eine Kolokalisation mit CTCF am LacO nachgewiesen werden. In einigen Zellen konnte aber das Phänomen beobachtet werden, dass der CTCF-gebundene LacO-Array sich scheinbar um den Nucleolus herumlegt (Abb. 5.39).

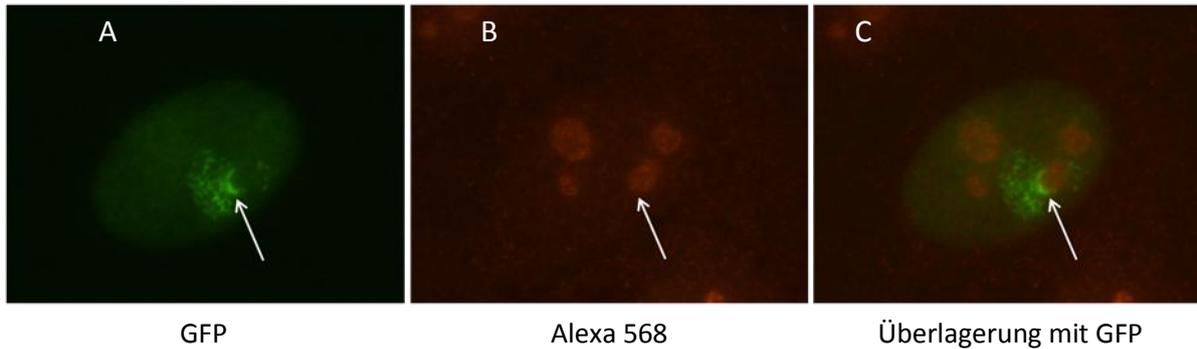


Abb. 5.39: Vereinzelt lagert sich der CTCF-gebundene LacO-Array scheinbar am Nukleolus an
 Fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F6B2-Zellen nach Transfer mit 1µg GFP-Lac-CTCF, Fixierung nach 60h und anschließender Immunfärbung mit αNukleophosmin und Alexa 568-markiertem Sekundärantikörper; Ein grünes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung von GFP-Lac-CTCF am LacO-Array (A). Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die indirekte Immunfärbung (B). Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen (C); eine weißer Pfeil weist auf die Anlagerung.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass für keinen der untersuchten Faktoren eine Interaktion mit CTCF mittels des LacO-LacI-Modellsystems bestätigt werden konnte.

5.2.11.3 Verschiedene Chromatin-modifizierende Faktoren sind am dekondensierten DNA-Array nicht nachzuweisen

Da die zuvor beschriebene durch CTCF vermittelte Dekondensierung eines heterochromatischen DNA-Arrays mit einer Änderung der Chromatinstruktur assoziiert ist (s. Kapitel 5.2.4), sollte untersucht werden, ob verschiedene Chromatin-verändernde Faktoren durch CTCF an den LacO-Array rekrutiert werden und dort ihre Funktion ausüben. Kandidaten für diesen Ansatz waren (i) verschiedene Enzyme, die Histone spezifisch modifizieren können, (ii) ein Enzym, das aktiv eine Histonmodifikation entfernt sowie (iii) eine Komponente eines Chromatin-Remodelling-Komplexes.

(i) Histon-Acetyltransferasen (HATs) sind Enzyme, die spezifische eine Acetylgruppe auf die Aminosäure Lysin übertragen. Diese Modifikation geht in der Regel mit einer aufgelockerten Chromatinstruktur einher. Wie bereits beschrieben, zeigt der dekondensierte DNA-Array eine Anreicherung an acetyliertem Lysin 9 des Histons H3. Als Kandidat für die Untersuchung wurde daher die HAT GCN5 ausgewählt, da dieses Enzym eine der beiden bisher bekannten HATs ist, die spezifisch den Transfer von Acetyl-Gruppen auf H3K9 übertragen (Peterson and Laniel, 2004).

(ii) Lysin-Demethylasen enthalten als katalytische Domäne die Jumonji C-Domäne (JmjC). Das Protein JMJD3, das ebenfalls eine konservierte JmjC-Domäne enthält, konnte als spezifische Demethylase für das Lysin 27 des Histons H3 in HeLa-Zellen identifiziert werden (Xiang et al., 2007). Der durch die Bindung von CTCF dekontensierte LacO-Array zeigt eine Abnahme der Trimethylierung von H3K27. Somit ist auch JMJD3 ein guter Kandidat für die Analyse.

(iii) Der Faktor BAF57 (*Brg1/Brm-associated factor 57*) ist eine Komponente des SWI/SNF-Komplexes, der ATP-abhängig das Remodeling von Chromatin katalysiert.

Für murines BAF57 konnte bereits gezeigt werden, dass es mit CTCF im Thymusgewebe von *knock in*-Mäusen in einem Komplex vorliegt (van de Nobelen, 2008). Aufgrund seiner Rolle im Chromatin-Remodelling ist BAF57 ebenfalls ein geeigneter Kandidat für die Interaktionsanalyse.

Für die Untersuchung der Interaktion wurden die beschriebenen Kandidatenproteine als GFP-Fusionsproteine hergestellt (s. Anhang). Für JMJD3 und BAF57 war jeweils nur die murine cDNA für die Klonierung verfügbar. Die GFP-Fusionskonstrukte wurden zusammen mit mCherry-Lac-CTCF in U-2OS F42B8-Zellen eingebracht, nach 60h fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Dabei zeigt sich, dass alle drei GFP-Fusionsproteine eine spezifische Lokalisierung im gesamten Zellkern aufweisen. (Abb. 5.41 A, C und E). GFP-hGCN5 zeigte einen Ausschluss aus den Nukleoli (Abb. 5.41 A). GFP-mJMJD3 liegt im gesamten Kern vor, die Ausbildung kleiner Foci ist zu erkennen (Abb. 5.41 C). GFP-mBAF57 ist im Zellkern besonders in der äußeren Region der Nukleoli zu detektieren (Abb. 5.41 E). Die Überlagerung mit dem mCherry-Signal zeigt, wo der kondensierte LacO-Array liegt, der durch Lac-CTCF gebunden ist. Der Vergleich der beiden Aufnahmen lässt erkennen, dass keines der drei Proteine mit CTCF am dekontensierten LacO lokalisiert ist (Abb. 5.41 B, D und F).

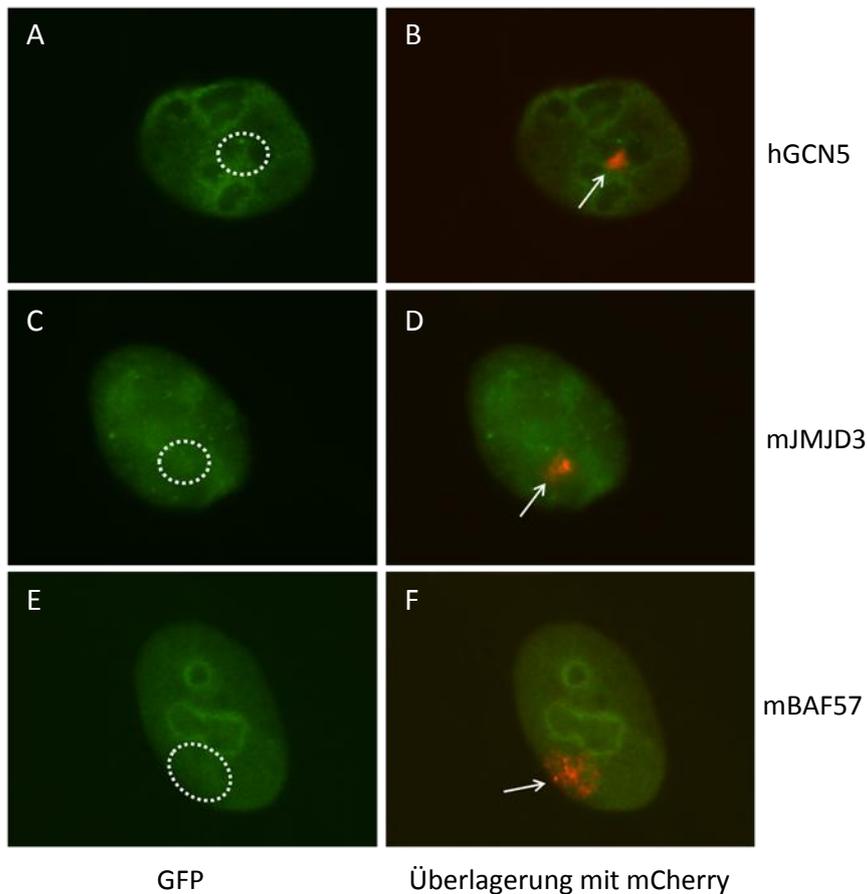


Abb. 5.40: Verschiedene Chromatin-modifizierenden Faktoren zeigen keine Kolokalisation mit CTCF am dekondensierten Array

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Kotransfer von 1µg mCherry-Lac-CTCF mit je 1µg der verschiedenen GFP-Fusionsproteine sowie Fixierung nach 60h. **A, C und E.** Grüne Fluoreszenz zeigt die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine; A: GFP-hGCN5, C: GFP-mJMJD3, E: GFP-mBAF57; **B, D und F.** Überlagerung der GFP-Aufnahme mit der jeweiligen Aufnahme von mChery-Lac-CTCF (rotes Fluoreszenzsignal); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, ein weißer Kreis markiert ein fehlendes Signal.

Keinem der untersuchten Chromatin-modifizierenden Faktoren ist eine Interaktion mit CTCF am dekondensierten LacO-Array eindeutig nachzuweisen.

5.2.11.4 WDR5 zeigt Kolokalisation mit CTCF am dekondensierten Array

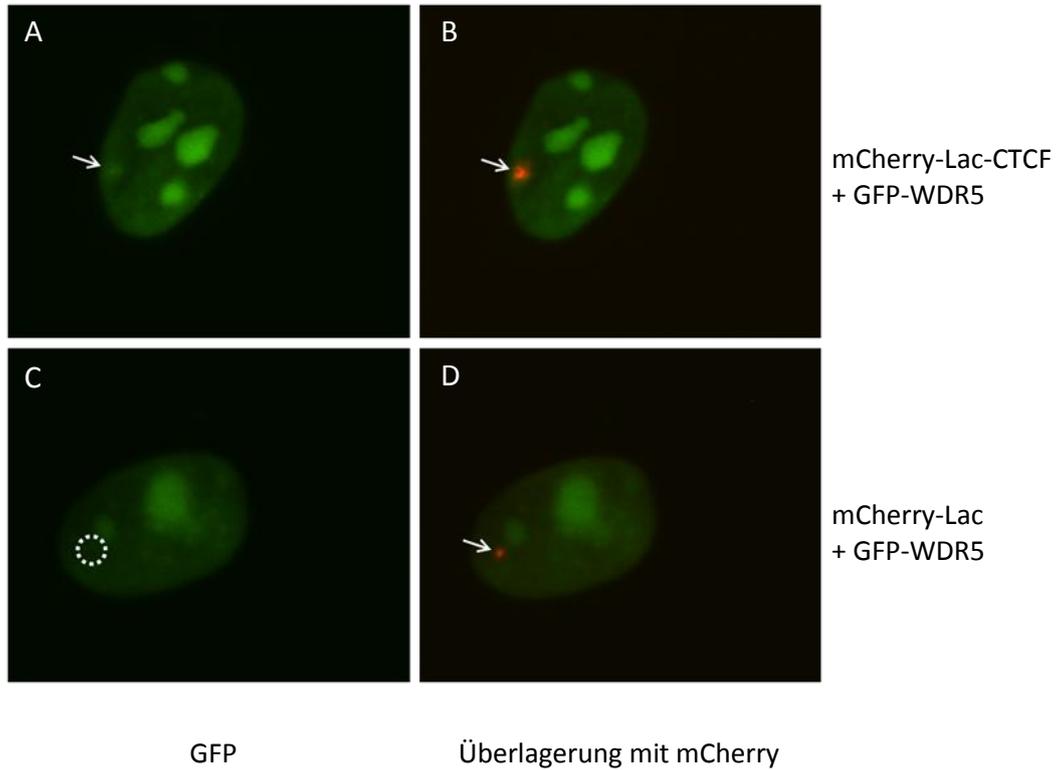
Ein weiterer Faktor, der in der Modifizierung von Chromatin eine Rolle spielt, ist WDR5. Im Zuge der Analyse des Chromatinstatus des dekondensierten LacO-Arrays konnte eine Di- und Trimethylierung des Lysins 4 von Histon H3 nach Bindung von CTCF an den Array nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte in murinen ES-Zellen der Faktor WDR5, eine essentielle Untereinheit der humanen MLL und SET1 (hCOMPASS) H3K4-Methyl-

transferase-Komplexe (Dou et al., 2006), im Komplex mit CTCF gezeigt werden (van de Nobelen, 2008). Zusätzlich konnte das *Drosophila*-Homolog von WDR5, WDS, ebenfalls in einem Komplex mit dCTCF nachgewiesen werden (Panzer, persönliche Kommunikation). Zudem konnte *in vitro* eine direkte Interaktion der beiden Faktoren gezeigt werden (van de Nobelen, unveröffentlichte Beobachtung).

WDR5 ist ein hochkonserviertes WD40-Domänen-Protein, das sieben Wiederholungen dieser namensgebenden Domäne enthält. Diese Wiederholungen bilden eine sogenannte Propellerstruktur aus, deren Funktion der Kontakt mit H3K4 ist (Schuetz et al., 2006). WDR5 ist daher essentiell für den Aufbau des MLL1 (*mixed lineage leukemia protein 1*)-Komplexes, indem es als Brückenfaktor zwischen den strukturgebenden Komponenten und der katalytischen Untereinheit MLL1 vermittelt (Dou et al., 2006). Außerdem ist WDR5 nötig für die Interaktion mit dem Substrat H3K4. Ob diese Interaktion vom Methylierungsstatus von H3K4 abhängig ist, wird in der Literatur diskutiert (Couture et al., 2006; Schuetz et al., 2006; Wysocka et al., 2005). Somit ist WDR5 ebenfalls ein geeigneter Kandidat für die Interaktionsanalyse. Es wurde daher ein Fusionsprotein aus GFP und humanem WDR5 hergestellt (s. Anhang).

Um zu untersuchen, ob WDR5 mit CTCF am dekondensierten Array vorliegt, wurden U-2OS F42B8-Zellen mit mCherry-Lac oder mCherry-Lac-CTCF und GFP-WDR5 kotransfiziert, nach 60h fixiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Dabei zeigt sich, dass GFP-WDR5 im gesamten Zellkern inklusive der Nukleoli lokalisiert ist (Abb. 5.41 A und C). Zusätzlich lässt sich beobachten, dass im Fall der Koexpression mit mCherry-Lac-CTCF eine Anreicherung von GFP-WDR5 an einer weiteren Struktur im Zellkern zu beobachten ist. Die Überlagerung mit dem mCherry-Signal zeigt, dass diese Struktur dem LacO-Array entspricht, der durch Lac-CTCF gebunden ist (Abb. 5.45 B). Dieser zeigt eine dekondensierte Konformation. Bei Koexpression mit mCherry-Lac ist für GFP-WDR5 keine weitere Anreicherung zu erkennen (Abb. 5.45 C). Die Überlagerung mit dem mCherry-Signal zeigt, dass der der Lac-Repressor den Array deutlich sichtbar macht (Abb. 5.45 D), GFP-WDR5 ist dort jedoch nicht gebunden.

**Abb. 5.41: WDR5 kolokalisiert mit LacO-gebundenem CTCF**

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Kotransfer von je 1 μ g mCherry-Lac-CTCF (rotes Fluoreszenzsignal, A und B) oder mCherry-Lac (rotes Fluoreszenzsignal, C und D) mit 1 μ g GFP-hWDR5 sowie Fixierung nach 60h. **A und C.** Grüne Fluoreszenz zeigt die Lokalisierung von GFP-hWDR5; **B und D.** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein orangefarbenes Signal weist auf eine Kolokalisierung hin (B); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an, ein weißer Kreis markiert ein fehlendes Signal.

Von allen untersuchten Faktoren konnte nur für WDR5 gezeigt werden, dass es von CTCF an den dekondensierten Array rekrutiert wird. Für die übrigen, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Faktoren konnte keine Interaktion mit CTCF am LacO-Array nachgewiesen werden (zur Übersicht s. Tab. 5.4).

Tab. 5.4: Übersicht über die nachgewiesenen Interaktionspartner von CTCF

Faktor	Funktion	Bereits gezeigte Interaktion mit CTCF und Funktion	Interaktion mit Lac-CTCF
CTCF	Dimerisierung	+ Bildung von Chromatinschleifen	+
RNA-Polymerase II	Transkription	+ Enhancerblockade	-
CHD8	Chromatin-Remodelling	+ Enhancerblockade	-
RAD21	Cohesin	Direkte Interaktion? Enhancerblockade	-
Nucleophosmin	Ribosomen-zusammenbau	Direkte Interaktion? Enhancerblockade	+/-
PARP-1	PARYlierung	+ Isolation, rRNA	+/-
Topoisomerase II α	DNA-Topologie	Direkte Interaktion?	+/-
GCN5	HAT	-	-
WDR5	HMT-Komplex	+	+
JMJD3	Demethylase	-	-
BAF57	Chromatin-Remodelling	Direkte Interaktion?	-

+ : Interaktion mit CTCF am dekondensierten LacO-Array; - : keine Interaktion; +/- : keine Interaktion, vereinzelt Anlagerung am Nukleolus

5.2.11.5 Untersuchung des Einflusses von WDR5 auf die Dekondensierung

Für WDR5 konnte die Interaktion mit CTCF am dekondensierten LacO-Array bestätigt werden. Seine Beteiligung an der Methylierung von H3K4 als essentielles Mitglied der verschiedenen MLL-Komplexen, wirft nun die Frage auf, ob WDR5 an der CTCF-vermittelten Dekondensierung beteiligt ist, da diese aktive Chromatin-Modifikation nach Bindung von CTCF am LacO-Array nachgewiesen werden konnte.

Die Rekrutierung von WDR5 wird über die ZF-Domäne von CTCF vermittelt, die selbst ebenfalls nur einen minimalen Effekt auf den Array zeigt. In Kombination mit dem N-Terminus erzielt die Bindung an den LacO-Array einen Effekt wie das Wildtyp-Protein. Dies lässt darauf schließen, dass CTCF über diese beiden Domäne mehrere Kofaktoren rekrutiert, die gemeinsam zur Dekondensierung des LacO-Arrays führen.

Es stellt sich nun die Frage, ob WDR5 funktionell an der CTCF-vermittelten Dekondensierung beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, sollte der Effekt von CTCF auf den LacO-Array nach

Herunterregulierung der WDR5-Expression sowie nach Kotransfer von zwei dominant-negativen Mutanten von WDR5 untersucht werden.

5.2.11.5.1 Etablierung eines Knockdowns von WDR5 in U-2OS F42B8-Zellen

Um den Effekt von CTCF auf den LacO-Array nach Herunterregulierung der WDR5-Expression untersuchen zu können, sollte zuerst der *Knockdown* von WDR5 in U-2OS F42B8-Zellen etabliert werden. Dafür wurden U-2OS F42B8-Zellen für 24h mit WDR5-spezifischen siRNAs (siRNA1 allein oder kombiniert mit siRNA3) sowie einer Kontroll-RNA (ctrl) in Dupletts (I und II) behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 4 Tagen. Für die Expressionsanalyse zur Kontrolle einer erfolgreichen WDR5-Herunterregulierung wurden sowohl RNA als auch Kernproteine extrahiert. Die isolierten RNA wurde einer reversen Transkriptionsreaktion unterzogen und anschließend mittels konventioneller und quantitativer PCR auf Vorhandensein von cDNA analysiert. Die verwendeten Primerpaare dafür waren jeweils spezifisch für WDR5- oder β -Aktin-cDNA. Letztere wurden als Kontrolle mitgeführt.

Die Auswertung des konventionellen PCR-Ansatzes erfolgte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung. Die WDR5-spezifischen Primer amplifizieren das erwartete Produkt; WDR5 wird demnach in F42B8-Zellen auf RNA-Ebene exprimiert (Abb. 5.44 A). Wurden die Zellen mit WDR5-spezifischer siRNA behandelt, ist im Vergleich mit der Kontrolle eine Abnahme der Amplikon-Menge und damit der Menge an WDR5-mRNA zu beobachten. Dies gilt für die Behandlung mit siRNA1 sowie für die Kombination aus siRNA1 und 3 (Abb. 5.44 A). Die Kontroll-PCR mit den β -Actin-Primern zeigt, dass das verwendete Material in gleichen Mengen eingesetzt wurde. Als Negativkontrolle für die Amplifizierung wurde die präparierte RNA mitgeführt. Hier konnte kein Material amplifiziert werden.

Sowohl die siRNA1 als auch siRNA1+3 sind geeignet, die Menge an WDR5-mRNA in F42B8-Zellen effektiv zu reduzieren.

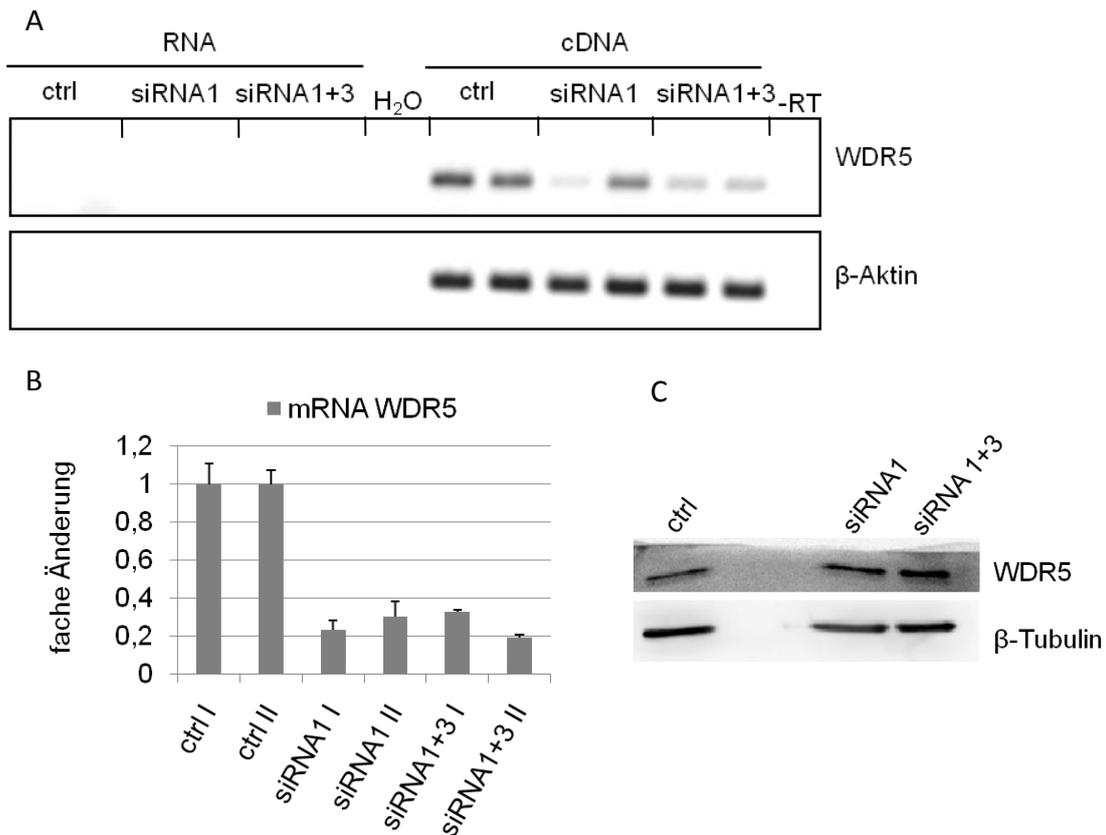


Abb. 5.44: WDR5 ist ein sehr stabiles Protein in U-2OS F42B8-Zellen

U-2OS F42B8-Zellen wurden in Dupletts (I und II) für 24h mit insgesamt 200pmol WDR5-spezifischer siRNA (siRNA1 allein oder kombiniert mit siRNA3) oder einer Kontroll-RNA (ctrl) behandelt. Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 4 Tagen. **A und B.** Expressionsanalyse von WDR5 mittels reverser Transkription. RNA wurde extrahiert und einer RT-Reaktion unterzogen. cDNA wurde nachfolgend mit WDR5- sowie β-Aktin-spezifischen Primerpaaren amplifiziert **A.** Semiquantitative Analyse; -RT: Reverse Transkription ohne RNA, MilliQ: Wasserkontrolle der Amplifikation. **B.** Quantitative Auswertung. Normalisierung der Werte erfolgte über β-Aktin-Amplifizierung. **C.** Expressionsanalyse von WDR5 mittels Immundetektion. Der Proteinextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (15µg pro Spur), auf eine Trägermembran übertragen und mittels eines spezifischen anti-WDR5-Antikörpers detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von β-Tubulin.

Die Analyse des Materials in der *realtime* PCR bestätigt dieses Ergebnis. Im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-RNA behandelt wurden, zeigen siRNA-behandelte Zellen eine Verringerung der mRNA-Level auf 23% bzw. 33% für siRNA1 sowie 33% bzw. 19% für siRNA1+3 (Abb. 5.44 B). Dies entspricht einer 3 bis 5fachen Reduktion der WDR5-Expression. Parallel wurde die Expression von WDR5 auf Proteinebene untersucht. Der präparierte Kernextrakt eines *Knockdown*-Ansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Trägermembran einer Immundetektion unterzogen. Die verwendeten Antikörper waren spezifisch für WDR5 oder β-Tubulin (Ladekontrolle). Die Auswertung mittels Versadoc zeigt, dass im Kontrollansatz der WDR5-spezifische Antikörper Protein

detektiert (Abb. 5.44 C); WDR5 wird demnach in F42B8-Zellen auch auf Protein-Ebene exprimiert. Vergleicht man den Proteinextrakt siRNA-behandelter Zellen mit der Kontrolle, lässt sich allerdings keine Abnahme der Intensität der Signale sowohl für siRNA1 als auch für siRNA1+3 beobachten (Abb. 5.44 C). Die Ladekontrolle mittels Verwendung des β -Tubulin-Antikörpers zeigt, dass das verwendete Material in gleichen Mengen eingesetzt wurde.

Obwohl der *Knockdown* von WDR5 nach 5 Tagen einen sehr guten Effekt auf die WDR5-Expression auf RNA-Ebene zeigt, kann keine Abnahme der Proteinmenge beobachtet werden. Das Protein scheint daher sehr stabil zu sein.

Es wurde nun versucht, die Bedingungen für den WDR5-*Knockdown* zu optimieren. Dazu wurden die F42B8-Zellen für 24h mit je 100pmol der WDR5-spezifischen siRNA1 und 3 oder mit 200pmol der Kontroll-RNA (ctrl) behandelt. Nach 36h wurden die Zellen erneut dieser Behandlung unterzogen. Während der Inkubation war zu beobachten, dass die WDR-RNA1-behandelten Zellen in ihrem Wachstum beeinträchtigt sind. Nach insgesamt 6 Tagen nach der ersten Behandlung wurden die Zellen geerntet und das Kernprotein präpariert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration ergab, dass die Gesamtmenge an extrahiertem Protein nicht für eine Analyse per Immundetektion ausreicht. WDR5 scheint daher nicht nur sehr stabil, sondern auch ein essentieller Faktor für U-2OS-Zellen zu sein.

Somit kann der Einfluss von WDR5 auf die CTCF-vermittelte Dekondensierung mittels dieser Art der Untersuchung nicht analysiert werden.

5.2.11.5.2 Koexpression von Lac-CTCF mit dominant-negativen Mutanten hat keinen Effekt auf die CTCF-vermittelte Dekondensierung

Ein weiterer Ansatz für die Untersuchung des Einflusses von WDR5 auf die CTCF-vermittelte Dekondensierung des LacO-Arrays waren Überexpressionsanalysen mit dominant-negativen Mutanten von WDR5. Dazu wurden wiederum Koexpressionsanalysen mit mCherry-Lac-CTCF durchgeführt. Die verwendeten Mutanten von WDR5 wurden dafür als GFP-Fusion generiert (s. Anhang).

Für die HMT MLL1 konnte mittels Strukturanalysen das Motiv identifiziert werden, über das die Interaktion mit WDR5 stattfindet. Dieses so genannte WIN-Motiv (**WDR5 interaction**

motif) befindet sich in der Nähe der katalytischen SET-Domäne. Es ist konserviert in den Mitgliedern der SET1-Proteinfamilie (i.e. MLL2-4 sowie SETA und B), die mit WDR5 interagieren, und ist essentiell für die Komplex-Formierung als auch für die Dimethylierungsaktivität des Komplexes (Patel et al., 2008a). Das Arginin an der Position 3765 innerhalb des WIN-Motivs interagiert mit verschiedenen AS innerhalb von WDR5, namentlich Serin 91, Phenylalanin 133, Serin 175, Serin 218, Lysin 261, Phenylalanin 263 und Isoleucin 305 (Patel et al., 2008b). Die Kristallstruktur von WDR5 im Komplex mit dem WIN-Peptid zeigt, dass diese erwähnten AS innerhalb einer Tasche liegen, in die das WIN-Motiv von MLL1 binden kann. Derselbe Mechanismus für die Bindung konnte auch für Histon H3 gezeigt werden (Schuetz et al., 2006; Song and Kingston, 2008).

Für zwei der AS, die in die Interaktion von WDR5 mit MLL1 involviert sind, konnte in Sedimentationsanalysen gezeigt werden, dass ein Austausch dieser AS - Serin 91 zu Lysin (S91K) und Phenylalanin 133 zu Alanin (F133A) - die Interaktion von WDR5 mit MLL1 reduziert. Diese Mutationen in WDR5 führen ebenfalls zu einer Abnahme der H3K4-Dimethylierungsaktivität des MLL1-Kernkomplexes von 80% (Patel et al., 2008a).

Um den Effekt dieser WDR5-Mutanten zu untersuchen, wurden U-2OS F42B8-Zellen mit mCherry-Lac-CTCF sowie mit je einer der beiden mutierten Proteine als GFP-Fusion (GFP-WDR5 S91K oder F133) transfiziert, die Zellen nach 60h fixiert und anschließend per Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dabei zeigt sich, dass beide mutierten Formen von WDR5 wie auch das Wildtyp-Protein im gesamten Zellkern inklusive der Nukleoli lokalisiert sind (Abb. 5.45 A und C, vgl. Abb. 5.41). Zusätzlich lässt sich beobachten, dass beide Mutanten eine Anreicherung an einer weiteren Struktur im Zellkern aufweisen. Die Überlagerung mit dem mCherry-Signal zeigt, dass diese Struktur dem LacO-Array entspricht, der durch Lac-CTCF gebunden ist (Abb. 5.45 B und D). Dieser zeigt eine dekondensierte Konformation. Beide Mutationen scheinen daher keinen Effekt auf die durch CTCF-vermittelte Dekondensierung des LacO-Arrays zu haben.

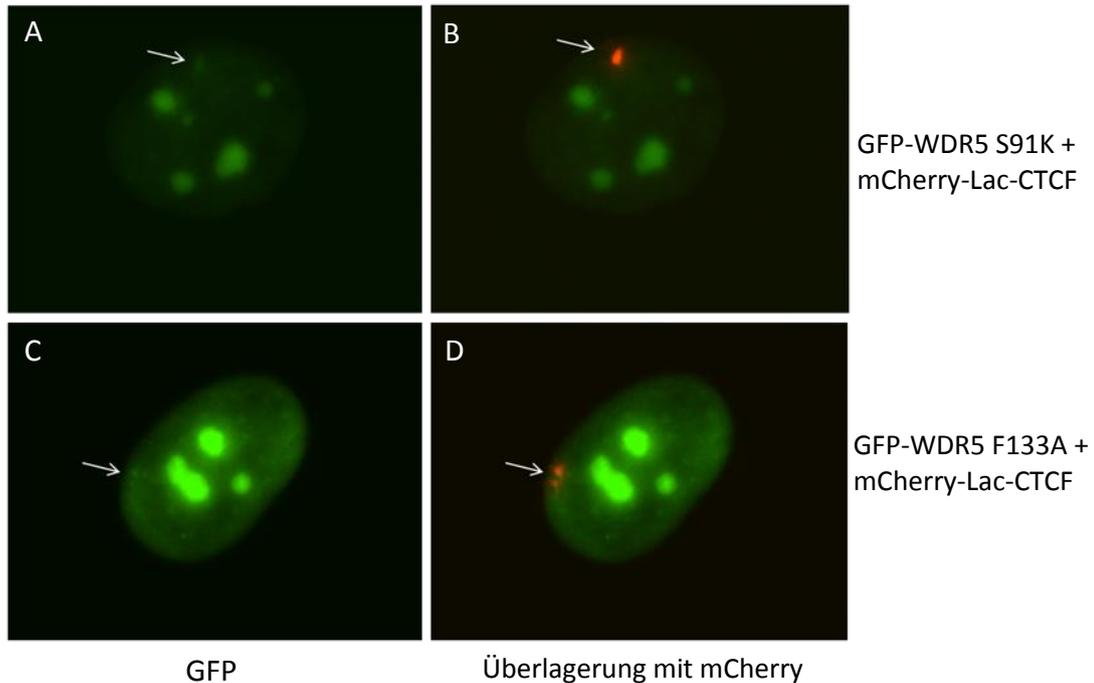


Abb. 5.45: Überexpression verschiedener Mutanten von WDR5 hat keinen Effekt auf die CTCF-vermittelte Dekondensierung

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Kotransfer von je 1µg mCherry-Lac-CTCF (rotes Fluoreszenzsignal, B und D) mit je 1µg GFP-WDR5 S91K oder F133A sowie Fixierung nach 60h. **A und C.** Grüne Fluoreszenz zeigt die Lokalisierung der mutierten GFP-WDR5-Proteine im Zellkern; **B und D.** Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Aufnahmen. Ein orangefarbenes Signal weist auf eine Kolokalisierung hin (B und D); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass WDR5 möglicherweise an der Dekondensierung des LacO-Arrays durch CTCF beteiligt ist, aber nicht der einzige Faktor zu sein scheint.

5.2.11.5.3 WDR5 selbst führt nur zu einer geringen Dekondensierung des DNA-Array

Um den direkten Einfluss von WDR5 selbst auf den kondensierten LacO-Array zu testen, wurde ein mCherry-Lac-WDR5-Konstrukt hergestellt (s. Anhang). Dieses wurde neben mCherry-Lac und mCherry-Lac-CTCF in U-2OS F42B8-Zellen transfiziert, die Zellen fixiert und die DNA gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich, dass der WDR5-gebundene LacO-Array ebenso kondensiert vorliegt (Abb. 5.42 A und B) wie auch der Lac-gebundene Array (Abb. 5.42 E und F). Bindung von Lac-CTCF führt wie erwartet zu einer starken Dekondensierung des DNA-Arrays (Abb. 5.42 C und D).

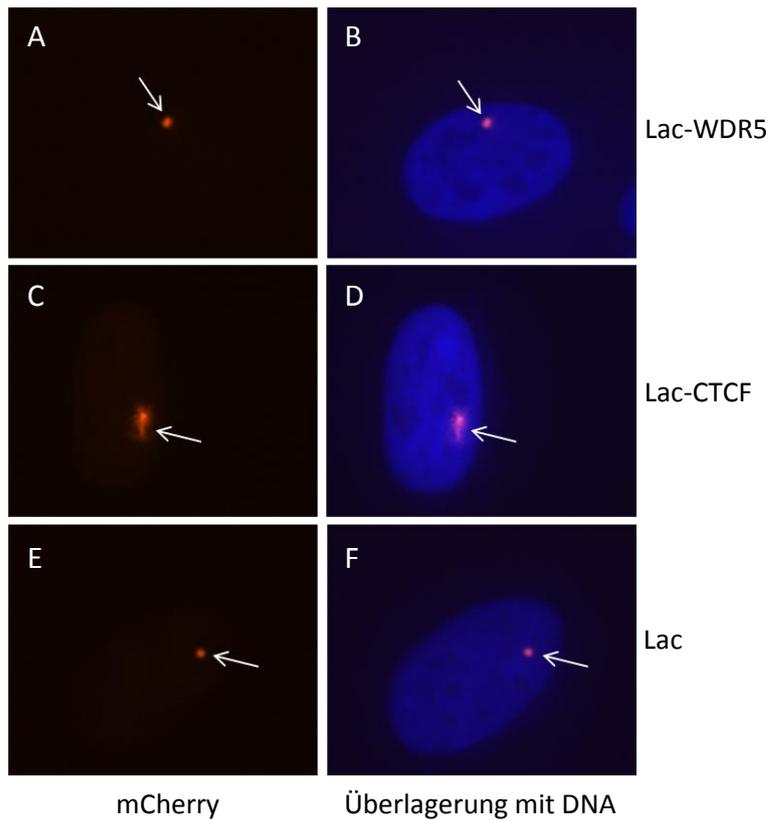


Abb. 5.42: Der Lac-WDR5-gebundene DNA-Array bleibt kondensiert

Repräsentative Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von U-2OS F42B8-Zellen nach Transfer mit je $1\mu\text{g}$ mCherry-Lac, mCherry-Lac-CTCF oder mCherry-Lac-WDR5, Fixierung nach 60h und DNA-Färbung. **A, C und E.** Ein rotes Fluoreszenzsignal zeigt die Lokalisierung der verschiedenen mCherry-Lac-Proteine. **B, D und F.** Überlagerung des mCherry-Signals mit der Hoechst-Färbung des Zellkerns (blaue Fluoreszenz); weiße Pfeile zeigen den LacO-Array an.

Um den Effekt genauer bewerten zu können, folgte der Analyse am Fluoreszenzmikroskop eine Größenauswertung. Diese macht den vorhergehenden Befund noch deutlicher. Der Lac-gebundene Array hat eine Fläche von $0,24\mu\text{m}^2$ im Median (Maximalwert $0,35\mu\text{m}^2$), während der CTCF-gebundene Array eine Fläche von $1,59\mu\text{m}^2$ im Median mit einem Maximalwert von $4,1\mu\text{m}^2$ aufweist (Abb. 5.43). Dies entspricht einer Flächenvergrößerung um das 7fache. Der WDR5-gebundene Array hat jedoch nur eine Fläche von $0,32\mu\text{m}^2$ im Median mit einem Maximalwert von $0,59\mu\text{m}^2$ (Abb. 5.43). Dies entspricht einer rund 1,5fachen Flächenvergrößerung.

Nach Durchführung des U-Test zeigt sich aber, dass der durch WDR5 vermittelte Dekondensierungseffekt am heterochromatischen LacO-Array signifikant verschieden sowohl zu Lac ($P < 0,05$) als auch zu Lac-CTCF ist ($P < 0,005$).

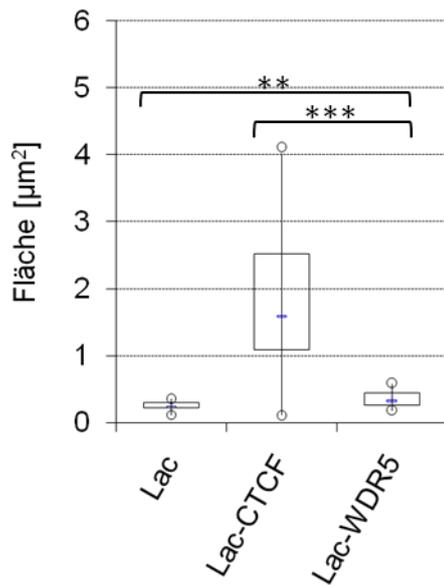


Abb. 5.43: WDR5 selbst zeigt nur einen sehr geringen Dekondensierungseffekt

Die statistische Analyse der Dekondensierung erfolgte mittels Größenauswertung der Arrays mit anschließender Darstellung im Box-Whisker-Plot. Die Darstellung des Median erfolgt als blaue Linie, Maximal- und Minimalwert sind als Kreis dargestellt. Die Ränder der Box entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen, die *Whisker* markieren die 5. bzw. 95. Perzentilen; Lac: n=20, Lac-CTCF: n=24; Lac-WDR5: n=20; U-Test: ***-P<0,005; **-P<0,05.

Somit führt die Bindung von Lac-WDR5 zu einer sehr schwachen, aber signifikanten Dekondensierung des heterochromatischen LacO-Arrays. WDR ist damit wahrscheinlich an der CTCF-vermittelten Dekondensierung des heterochromatischen LacO-Arrays beteiligt.

6 Diskussion

Der Faktor CTCF ist ein essentieller Regulator der Genexpression mit vielfältigen Funktionen in der Zelle. So ist er in der Lage, Isolatorelemente zu binden und dadurch das Genom in funktionelle Domänen zu unterteilen. Isolatoren haben zwei Aufgaben im Genom: Sie schützen Gene vor dem Einfluss ungewollter Enhancerwirkung (Enhancerblockade), was die aberrante Aktivierung von Genen verhindert. Und sie blockieren die ungewollte Ausbreitung von Heterochromatin in transkriptionell aktive Bereiche, was die aberrante Stilllegung von Genen unterbindet.

Die isolierende Funktion von CTCF in der Enhancerblockade ist bereits ausführlich beschrieben (Bell et al., 1999; Hark et al., 2000; Lutz et al., 2003; Tanimoto et al., 2003; Yusufzai and Felsenfeld, 2004), der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Die Enhancerblockade erfolgt directional, i.e. das Isolatorelement muss zwischen Enhancer und Promotor lokalisiert sein, um wirken zu können. Verschiedene Modelle wurden entwickelt, um diesen Mechanismus zu erklären. So gibt es das so genannte *looping modell*. Nach diesem ist CTCF an der Ausbildung von Chromatinschleifen beteiligt, die Enhancer und Promotor räumlich voneinander trennen, um die Aktivierung zu unterbinden. Nach dem *tracking model* bildet sich an Isolatorelementen ein physikalischer Block aus, der das aktivierende Signal, das von Enhancer zum Promotor wandert, anhält. Beiden Modellen ist gemeinsam, dass der ausführende Faktor dazu befähigt sein muss, Chromatin zu organisieren.

Die Beteiligung von CTCF in der Barrierefunktion von Isolatorelementen wird in der Literatur noch diskutiert. Es gibt Hinweise, dass die Barriere am β -Globin-Locus unabhängig von CTCF ausgeführt wird (Recillas-Targa et al., 2002). Für andere Genloci konnte jedoch eine Abhängigkeit von CTCF bewiesen werden (Chen et al., 2007; Witcher and Emerson, 2009). Für die Barriereaktivität wird ein Modell postuliert, nach dem am Isolatorelement aktivierende Faktoren lokalisiert sind, die dort euchromatische Modifikationen aktiv einführen, um so der Ausbreitung von heterochromatischen Modifikationen entgegen zu wirken. Der beteiligte Faktor muss daher ebenfalls fähig sein, Chromatin zu organisieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den direkten Einfluss von CTCF auf Chromatin zu untersuchen, um die Funktion von CTCF in der Isolatorfunktion besser zu verstehen. Dies wurde in zwei parallelen Ansätzen versucht.

Mittels eines *in silico*-Ansatzes sollten funktionelle CTCF-Barriereelemente identifiziert werden, die anschließend in HeLa-Zellen nach Herunterregulierung der CTCF-Expression auf ihre Funktionalität untersucht werden sollten, indem die Chromatin-Umgebung ausgewählter Genloci mittels Chromatin-Immunopräzipitation analysiert wurde.

Parallel dazu wurde der Effekt von CTCF auf Chromatin mittels des LacO-LacI-Modellsystem analysiert. Grundlage des Modellsystems sind U-2OS-Zelllinien, die eine Vielzahl an Lac-Operator (LacO)-Sequenzen aus dem Lac-Operon von *E.coli* in ihrem Genom integriert enthalten, an die CTCF als Lac-Fusionsprotein binden kann. Der Einfluss von CTCF im Chromatinbereich des Arrays wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Gleichzeitig wurde dieses System zur Untersuchung von möglichen Interaktionspartnern verwendet.

6.1 Untersuchung der Barriereaktivität von CTCF an endogenen Loci

Für das Genom von *Drosophila melanogaster* konnte bereits gezeigt werden, dass dCTCF-Bindestellen oft Bereiche von sogenannten H3K27me3-Blöcken flankieren und dort als funktionelle Barriere dienen, da die Herunterregulierung der dCTCF-Expression diese Barriere zerstört (Bartkuhn et al., 2009).

In einem genomweiten Ansatz konnte ebenfalls für das Genom verschiedener humaner Zelllinien gezeigt werden, dass eine Reihe von CTCF-Bindestellen existiert, die heterochromatische von euchromatischen Bereichen abgrenzt. Diese sind Zelltyp-spezifisch (Cuddapah et al., 2009). Eine tatsächliche Abhängigkeit der Barrierefunktion von CTCF an diesen Stellen konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Um die Funktion von CTCF in der Barriereaktivität zu untersuchen, wurden die vorhandenen Daten aus HeLa-Zellen mit der Lokalisation von Genen verglichen, die nach der Herunterregulierung von CTCF ebenfalls eine Abnahme der Expression zeigen (Wendt et al., 2008), um potentielle Barriereelemente zu identifizieren und weiterführend auf ihre CTCF-abhängige Funktionalität zu untersuchen. Die Daten der Transkriptomanalyse stammen ebenfalls aus HeLa-Zellen. Der Abgleich erfolgte mittels des *UCSC Genome Browsers*.

Aus 142 untersuchten Genloci konnten 6 CTCF-Bindestellen (i.e. 4,2%) in HeLa-Zellen identifiziert werden, die als putatives funktionelles Barriereelement fungieren.

Mittels Chromatin-IP konnte im Zuge dieser Arbeit bestätigt werden, dass an 2 dieser Genloci - ATP8B2 und EXT2 - die CTCF-Bindestelle einen heterochromatischen Bereich von einem euchromatischen Bereich, in dem ein aktives Gen liegt, trennt. Der heterochromatische Bereich ist gekennzeichnet durch die Anwesenheit der Histonmodifikationen von H3K9me3 und H3K27me3, sowie die Anwesenheit nur geringer Mengen der euchromatischen Modifikation H3K4me3 H3K4me2, H3K9ac und H4ac. Das vorhandene Signal könnte aber auch auf eine unspezifische Bindung der Antikörper zurückzuführen sein. Der euchromatische Bereich ist gekennzeichnet durch eine deutliche Reduzierung der heterochromatischen Modifikationen sowie einer starken Zunahme der euchromatischen Modifikationen. H3K4me3 ist nur am aktiven Promotor zu angereichert. Da im Falle von EXT2 die CTS mit der TSS überlappt, ist auch hier ein deutliches Signal zu beobachten. Die alternative TSS der nichttranskribierten Variante von ATP8B2 zeigt verstärkte Signale für H3K9me3 und H3K27me3.

An der CTS selbst ist die Menge von Histon H3 verringert. Dies könnte ein Hinweis auf durch CTCF vermittelte Nukleosomen-Positionierung (Fu et al., 2008) oder Auflockerung der Chromatinstruktur sein. Die beiden untersuchten heterochromatischen Modifikationen liegen verringert vor, dafür ist eine Zunahme der euchromatischen Modifikationen zu beobachten. Die CTS hält somit die Waage zwischen beiden Chromatinbereichen.

Im Zuge dieser Arbeit konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Herunterregulierung der CTCF-Expression auf 40% mit einer Herunterregulierung der beiden untersuchten Gene korreliert.

Die notwendige Untersuchung des Chromatinstatus nach Herunterregulierung der CTCF-Expression war leider nicht möglich, da ein ausreichend effektiver *Knockdown* von CTCF nur schwer reproduzierbar ist. Ist der *Knockdown* von CTCF zu effektiv, sterben die vom *Knockdown* betroffenen Zellen ab, da ihnen dieser essentielle Faktor fehlt. Ist der Effekt zu gering, ist keine Änderung der Genexpression der Kandidatengene zu beobachten. Bereits eine zweifache Herunterregulierung der CTCF-Expression ist nicht ausreichend, um die Bindung von CTCF an die CTS des ATP8B2-Locus zu verhindern. Es gibt daher nur ein äußerst

kleines Fenster, in dem der Einfluss der CTCF-Herunterregulierung auf den Chromatinstatus der beiden Gene untersucht werden kann. Weiterführende Experimente sind jedoch zwingend notwendig, um diese Untersuchung durchzuführen. Alternativ zu einem RNAi-Experiment könnte die Überexpression einer dominant-negativen Form von CTCF wie die ZF-Domäne sein, die die Bindung des Wildtyp-Proteins an seine Bindungsstellen kompetitiv inhibiert. Die ZF-Domäne selbst sollte keinen Einfluss auf das Chromatin nehmen.

Ist CTCF in den beiden untersuchten Loci tatsächlich für die Barriere verantwortlich, bestärkt das die Berichte über seine Beteiligung an dieser Funktion von Isolatorelementen. Wie die Auswertung der genomweiten Analysen jedoch zeigt, ist dies zumindest in HeLa-Zellen kein generelles Phänomen. CTCF scheint in diesen Zellen die Barrierefunktion nur in einer kleinen Teilmenge seiner Bindungsstellen auszuführen. Da HeLa-Zellen jedoch eine vor bereits mehreren Jahrzehnten etablierte Krebszelllinie darstellen, die keinen normalen Karyotyp mehr besitzt, kann man von einer Vielzahl an Mutationen innerhalb des Genoms ausgehen. Für eines der identifizierten, potentiellen CTCF-Barriereelemente in HeLa-Zellen (TRIM29) konnte im Zuge dieser Arbeit mittels Chromatin-IP gezeigt werden, dass der Chromatinstatus sich nicht mit dem veröffentlichten deckt; an der CTS als auch im Genbereich ist die heterochromatische Modifikation H3K27me3 angereichert (nicht gezeigt). Zusätzlich konnte für den *p16 Ink4a/Arf*-Locus eine CTS als beschriebenes CTCF-Barriereelement in HeLa-Zellen (Witcher & Emerson, 2009) nicht bestätigt werden. CTCF kann an an dieser Genomposition nicht präzipitiert werden (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die in vielen Laboren verwendete HeLa-Zelllinie innerhalb dieser divergieren kann.

Interessant wäre es daher, die Auswirkung der Herunterregulierung von CTCF auf die Expression einiger anderer Zelllinien zu testen und die herunterregulierten Genloci ebenfalls auf deren Chromatinstatus zu untersuchen.

6.2 Untersuchung des Einflusses von CTCF auf Chromatin mittels des LacO-LacI-Modellsystems

Um direkt den Effekt von CTCF auf Chromatin untersuchen zu können, wurde das LacO-LacI-Modellsystem herangezogen. Dieses basiert auf einem DNA-Array bestehend aus LacO-Sequenzen, die stabil in das Genom von U-2OS-Zellen integriert sind. Dieser Array kann

durch Bindung eines Fluorophor-markierten Lac-Repressor-Proteins im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Im Zuge dieser Arbeit konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass das Chromatin im Bereich des LacO-Arrays in heterochromatischer Konformation vorliegt. Der Array erscheint sowohl nach Bindung des Fluorophor-markierten Lac-Repressors als auch in der DNA-Färbung als kompakte Struktur und ist gekennzeichnet durch die Anwesenheit der heterochromatischen Histonmodifikation H3K27me3. Die Anwesenheit von H3K9me3 wurde nicht nachgewiesen. Euchromatische Histonmodifikationen fehlen. Getestet wurde auf Anwesenheit von H3K4me2 und 3 sowie von H3K9ac und H4ac. Die Abwesenheit von H3K9me3 spricht dafür, dass es sich um fakultatives Heterochromatin handelt. Der integrierte Vektor trägt ein Resistenzgen gegen Neomycin. Im Laufe der Generierung der Zelllinien wurden diese einer Selektion gegen Neomycin unterzogen, d.h. ein gewisses Maß an Expression des Resistenzgens muss vorhanden sein.

6.2.1 CTCF ändert die Chromatinstruktur eines heterochromatischen DNA-Arrays

Für die Untersuchung des Einflusses von CTCF auf den heterochromatischen DNA-Array wurde ein Fusionsprotein aus Fluorophor-markiertem Lac-Repressor und CTCF generiert. Die Bindung von CTCF über den Lac-Repressor an den DNA-Array führt zu einer starken Dekondensierung des Chromatins in diesem Bereich. Die ermittelten Werte sind von Zelle zu Zelle verschieden und zeigen eine sehr große Spanne. Dies könnte einerseits durch das unterschiedliche Expressionslevel innerhalb der Zellen verursacht werden. Andererseits wurde mit nicht synchronisierten Zellen gearbeitet. Die Zellen befanden sich bei der Auswertung demnach jeweils in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Hinzu kommt, dass die Anzahl der tatsächlichen Integrate in den verschiedenen Zellen variieren kann.

Die Dekondensierung des LacO-Arrays wird von Veränderungen im Chromatin begleitet. So ist in der DNA-Färbung kein Signal mehr sichtbar. Der Array zeigt sich demnach nach Bindung von CTCF als weniger kompakte Struktur. Es ist ebenfalls eine Euchromatinisierung des Chromatins zu beobachten. Die Untersuchung des Chromatinstatus nach Bindung von CTCF mittels indirekter Immunfluoreszenz zeigt, dass H3K27me3 nicht

mehr vorhanden ist. H3K9me3 wird nicht eingeführt. Dafür wird eine Anreicherung der vier untersuchten euchromatischen Histonmodifikationen detektiert.

Für Bindestellen von CTCF konnte in vorangegangenen Studien genomweit bereits eine Anreicherung von H3K4me2 und 3 nachgewiesen werden (Barski et al., 2007; Fu et al., 2008). Für die Histonvariante H2A.Z konnte ebenfalls eine Anreicherung gezeigt werden. Dies kann in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

Die Untersuchungen zur Dynamik des Dekondensierungsprozesses zeigen, dass diese bereits in der ersten Stunde nach Bindung von CTCF startet und nach einigen weiteren Stunden beendet ist.

Als funktionelle Domäne konnte der N-Terminus in Kombination mit der ZF-Domäne identifiziert werden. Der N-Terminus sowie der C-Terminus allein oder die Kombination aus ZF-Domäne und C-Terminus sowie die Enhancerblockade-Domäne zeigen in etwa den gleichen Dekondensierungseffekt. Die ZF-Domäne allein zeigt nur einen minimalen Effekt.

Zusammengenommen lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die CTCF-abhängige Dekondensierung des LacO-Arrays durch die Rekrutierung von unterschiedlichen Histonmodifizierenden Faktoren sowohl an die N-terminale als auch die ZF-Domäne des Proteins vermittelt wird, die einige Stunden benötigen, um die gesamte Region des Arrays zu euchromatinisieren.

Inwieweit die Vermittlung von Chromatinschleifen dabei eine Rolle spielt, ist noch unklar. *Chromosome conformation capture*-Analysen wären die Methode der Wahl, um Interaktion des Arrays mit endogenen CTCF-Bindestellen zu untersuchen. Ein Hinweis auf die Ausbildung von Chromatinschleifen könnte die fibrilläre Struktur sein, die der dekondensierte DAN-Array meist einnimmt, da dies den Eindruck vermittelt, dass einzelne Chromatinfäden sichtbar werden, die durch CTCF zu endogenen Loci gezogen werden. Im Zuge der Analyse der Selbstinteraktion von CTCF konnte beobachtet werden, dass der dekondensierte Array, v.a. eine aufgeblähte Struktur annimmt. Dieses Phänomen könnte aufgrund einer Inhibierung der Chromatinschleifenausbildung durch Absättigung der endogenen mit überexprimiertem GFP-CTCF erklärt werden. Dass dies in Ansätzen mit Überexpression von

Lac-CTCF nicht zu erkennen ist, erklärt die hohe Affinität des Lac-Repressors an seine Bindestellen, sodass die Mehrheit von Lac-CTCF am Array gebunden vorliegt.

6.2.2 Der Vergleich von CTCF und VP16

Der Vergleich zwischen VP16 und CTCF demonstriert, dass beide Faktoren unterschiedliche Effekte sowohl auf den heterochromatischen Array als auch auf das Reportersystem zeigen. So konnte in transienten Reporterassays die Funktion von VP16 als sehr effektiver Aktivator bestätigt werden. Für CTCF ist in diesem System jedoch keine solche Aktivität nachgewiesen worden. Die Analyse des Dekondensierungseffektes beider Faktoren zeigt jedoch, dass der von CTCF vermittelte Einfluss auf das Chromatin wesentlich stärker ist. Wie sind diese Unterschiede zu erklären?

Für VP16 (AAD) konnte in früheren Studien mittels des LacO-LacI-Modellsystems gezeigt werden, dass die Chromatin-Dekondensierung zu einer Histon-Hyperacetylierung sowie zur Rekrutierung von HATs (beispielsweise GCN5, PCAG, CBP/p300) führt und mit Aktivierung der Transkription verbunden ist (Tumbar et al., 1999). Zusätzlich ist eine Rekrutierung der katalytischen Untereinheiten BRG1 und BMR des SWI/SNF-Chromatin-Remodelling-Komplexes sowie der beiden Untereinheiten BAF155 und BAF170 zu beobachten. Für humanes SWI/SNF konnte bisher keine Interaktion mit VP16 nachgewiesen werden. Dies spricht für eine indirekte Rekrutierung dieser Faktoren an den Array (Memedula et al., 2003). Inwieweit VP16 die Methylierung von Histonen beeinflusst, ist nicht bekannt. In einer weiteren Studie konnte eine Abnahme von HP1 α nach Bindung von VP16 gezeigt werden (Chen et al., 2004). Demnach ist VP16 in der Lage, Chromatin-verändernde Faktoren an den heterochromatischen Array zu rekrutieren.

Für CTCF konnte ebenfalls eine Hyper-Acetylierung nach Bindung des LacO-Arrays nachgewiesen werden. Eine entsprechende HAT konnte jedoch nicht identifiziert werden. Ein Vergleich der beiden Studien ist schwierig, da beide Analysen in unterschiedlichen Zelltypen vorgenommen wurden. Dadurch unterscheidet sich ebenfalls die Position der integrierten Arrays. Der Mechanismus, der hinter dem jeweiligen Dekondensierungseffekt steckt, scheint für beide Faktoren dennoch unterschiedlich zu sein. Für die CTCF-vermittelte

Dekondensierung konnte eine klare Beteiligung der Demethylierung von H3K27me3 gezeigt werden. Bei VP16 scheint dagegen die Demethylierung von H3K9me3 eine Rolle zu spielen, da eine Abnahme von HP1 nach VP16-Bindung beobachtet wurde. H3K9me3 ist allerdings im Chromatin des LacO-Arrays, der für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen verwendet wurde, nicht angereichert.

Zusätzlich unterscheiden sich die Ergebnisse für die Untersuchung des Transaktivierungspotentials beider Faktoren. Obwohl für CTCF eine direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase II beschrieben worden ist und es Hinweise auf eine aktivierende Funktion in der Transkription gibt (Chernukhin et al., 2007; Vostrov and Quitschke, 1997), kann CTCF als GFP-Lac-Fusionsprotein die Expression des Reportergens nicht aktivieren. Die Interaktion mit der RNA-Polymerase II wurde für den C-Terminus von CTCF gezeigt. Dieser allein zeigt in etwa den gleichen Effekt auf den LacO-Array wie VP16. Es wäre daher interessant, nur diese Domäne von CTCF auf ihr Transaktivierungspotential hin zu untersuchen, da ein aktivierender Effekt bei Verwendung des Wildtyp-Proteins eventuell durch die Interaktion mit weiteren Interaktionspartnern maskiert wird.

VP16 kann die Expression jedoch steigern. Hinsichtlich des Transaktivierungsmechanismus konnte für VP16 eine Interaktion mit den generellen Transkriptionsfaktoren wie TFIID (Xiao et al., 1994) sowie mit dem Mediator-Komplex nachgewiesen werden (Ikeda et al., 2002); auch darin unterscheiden sich die beiden Faktoren.

Möglicherweise ist jedoch das verwendete Reportersystem nicht geeignet für die Untersuchung. Die Transaktivierung wurde in einem transienten System auf Plasmidbasis analysiert. Dies spiegelt nicht die Situation im Genom wider. Eine entsprechende Untersuchung am integrierten LacO-Array war nicht durchzuführen, da dieser kein Reportergen enthält. Es ist zwar das Resistenzgen enthalten, aber eine Untersuchung auf erhöhte Resistenz nach Expression von CTCF gestaltet sich schwierig, da der Expressionsvektor ebenfalls eine Resistenz gegen Neomycin vermittelt.

Anhand der vorhandenen Daten lässt sich schließen, dass der von VP16 vermittelte Effekt eine aktivierende Funktion repräsentiert. Die Interpretation der verfügbaren Daten bezüglich CTCF ist schwieriger. Die Dekondensierung und Euchromatinisierung des LacO-Arrays, die CTCF zeigt, scheint nicht auf Transaktivierungsereignisse zurückzugehen.

6.2.3 WDR5 konnte als Kofaktor von CTCF am dekondensierten DNA-Array identifiziert werden

Aufgrund der Befunde zur Untersuchung des Chromatinstatus des LacO-Arrays, können mindestens drei Histon-modifizierende Aktivitäten am Array nach CTCF-Bindung nachgewiesen werden: HAT, HMT und H3K27me3-Demethylierung. Da CTCF selbst keine dieser Aktivitäten besitzt, müssen diese durch Rekrutierung von Kofaktoren vermittelt werden. Für CTCF ist bereits eine Reihe von Kofaktoren bekannt, die im Zuge der vorliegenden Arbeit auf eine Interaktion mit CTCF am LacO-Array und Beteiligung an der CTCF-vermittelten Dekondensierung untersucht werden sollten.

Die untersuchten Faktoren waren einerseits Proteine, für die eine Interaktion mit CTCF bereits gezeigt worden ist. Andererseits wurden Proteine untersucht, für die eine Interaktion mit CTCF noch beschrieben werden konnte. Ausgenommen von der Analyse wurden Faktoren wie Kaiso oder Sin3A, die eine Rolle in der reprimierenden Funktion von CTCF spielen. Prinzipiell sind Interaktionsstudien mittels des LacO-LacI-Modellsystems möglich, da für CTCF eine Selbstrekrutierung erfolgreich bestätigt werden kann.

Für die meisten im Zuge der vorliegenden Arbeit getesteten Faktoren konnte keine Interaktion mit CTCF am dekondensierten Array nachgewiesen werden, obwohl einige von diesen bereits als funktionelle Interaktionspartner von CTCF beschrieben worden sind (Tab. 5.4). Nur für WDR5 konnte eine Kollokalisierung mit CTCF gezeigt werden.

Die nukleolär lokalisierten Proteine Nukleophosmin, PARP1 und Topoisomerase II

Für Topoisomerase II alpha konnte bisher weder eine direkte Interaktion mit CTCF noch eine funktionelle Beziehung gezeigt werden. Die ursprüngliche Identifikation erfolgte mittels Komplexaufreinigung in HeLa-Zellen. Das Protein konnte innerhalb des Komplexes nur in geringen Mengen detektiert werden (Yusufzai et al., 2004). Auch in dieser Arbeit kann diesem Enzym keine CTCF-assoziierte Funktion nachgewiesen werden. Dieser Befund steht im Einklang mit neuen Daten zur Barriereaktivität. In diesem Zusammenhang konnte für Topoisomerase II alpha keine gemeinsame Bindung an eine CTS nachgewiesen werden, jedoch für Topoisomerase II beta (Witcher & Emerson, 2009).

Auch eine Kolo-kalisation von CTCF und Nukleophosmin konnte nicht beobachtet werden. Interessanterweise war in den Färbungen mit anti-Nukleophosmin-Antikörper vereinzelt zu erkennen, dass der dekondensierte Array sich an den Nukleolus anlagert. Für Nukleophosmin konnte bereits gezeigt werden, dass es an der CTCF vermittelten Enhancerblockade beteiligt ist, indem es dazu beiträgt, das Isolatorelement an den Nukleolus zu ziehen (Yusufzai et al., 2004). Dieser Aspekt lag jedoch nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit, könnte aber für weitergehende Experimente von Interesse sein.

Obwohl für PARP1 schon mehrfach ein funktioneller Zusammenhang mit CTCF beschrieben worden ist (Torrano et al., 2006; Farrar et al., 2010), konnte in der vorliegenden Arbeit keine Interaktion mit CTCF demonstriert werden. PARP1 und demnach auch eine PARylierung von CTCF scheinen für den beobachteten Dekondensierungseffekt keine Rolle zu spielen. Dies bestätigt sich, da die Behandlung von PJ34, einer Substanz, die die PARylierung inhibiert, keinen Effekt auf die CTCF-vermittelte Dekondensierung aufwies (Daten nicht gezeigt).

RAD21

Auch für den Cohesin-Komplex konnte bereits mehrfach eine funktionelle Beziehung zu CTCF hergestellt werden (Wendt et al., 2008; Parelho et al., 2008). Für diese Untereinheit des Cohesin-Komplexes konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch ebenfalls keine Interaktion nachgewiesen werden. Dies spricht gegen die Beteiligung der Ausbildung von Chromatinschleifen, da Cohesin diese stabilisieren soll (Nativio et al., 2009). Allerdings ist bisher zwischen diesen Faktoren keine direkte Interaktion gezeigt worden, vielmehr könnte die funktionelle Verbindung über eine gemeinsame Rekrutierung an dieselben Bindestellen zustande kommen. Beide Faktoren zeigen in HeLa-Zellen für über 80% ihrer Bindestellen eine Kolo-kalisierung. Der Vergleich der Konsensussequenzen von CTCF und Cohesin zeigt kaum einen Unterschied (Wendt et al., 2008). Cohesin scheint daher von CTCF an die CTS rekrutiert zu werden. Möglicherweise bindet Cohesin nur DNA-gebundenes CTCF. Dem Modellsystem fehlen endogene CTS, daher kann Cohesin möglicherweise nicht rekrutiert werden.

RNA-Polymerase II

Für dieses Enzym konnte bereits eine Interaktion mit dem C-Terminus von CTCF beschrieben werden (Chernukhin et al., 2007). Eine Interaktion kann jedoch mittels des in dieser Arbeit

verwendeten Modellsystems nicht bestätigt werden. Unter der Annahme, dass der Dekondensierungseffekt, den der C-Terminus allein zeigt, eine Aktivierungsaktivität von CTCF widerspiegelt, die im Reporterassay vom Wildtyp-Protein maskiert wird, könnte dies ebenfalls für eine Interaktion gelten. Um dies zu untersuchen, sollte eine indirekte Immunfärbung gegen RNA-Polymerase II nach Bindung von CTCF C an den Array durchgeführt werden.

BAF57

Diese Untereinheit und die Untereinheit BAF170 des SWI/SNF-Remodelling-Komplexes konnten als Interaktionspartner von CTCF im Lungengewebe von Mäusen identifiziert werden, jedoch nicht in ebenfalls untersuchten ES-Zellen (van de Nobelen, 2008). Für die vorliegende Arbeit stand für die Klonierung des GFP-Fusionsproteins nur die murine cDNA zur Verfügung. Obwohl BAF57 ein konserviertes Protein ist, könnte dies ein Problem für die vorgenommenen Analysen sein. BAF57 zeigt jedoch in Mäusen eine Zelltyp-abhängige Interaktion mit CTCF. Daher scheint es wahrscheinlich, dass BAF57 tatsächlich nicht mit CTCF in U-2OS-Zellen interagiert. Der Befund, dass der dekondensierte LacO-Array weniger dichtes Chromatin enthält, lässt jedoch den Schluss zu, dass an der CTCF-vermittelten Dekondensierung ebenfalls Chromatin-Remodelling beteiligt ist.

Daher könnte Snf2H ein interessanter Faktor sein. Snf2H ist als Mitglied der SNF2-ATPase-Protein-Superfamilie und Komponente mehrerer Komplexe wie des RSF-Komplexes (*nucleosome-remodeling and spacing factor*) beteiligt an Chromatin-Remodelling (Lusser and Kadonaga, 2003) und wurde als möglicher Interaktionspartner von CTCF in murinen ES-Zellen identifiziert (van de Nobelen, 2008). Diese Interaktion scheint indirekt zu sein, da die Interaktion durch Benzoylase-Behandlung verhindert wird, sollte aber dennoch in weiterführenden Experimenten durchgeführt werden.

WDR5

Eine Kolo-kalisierung mit LacO-gebundenem CTCF konnte nur für CTCF selbst und WDR5 beobachtet werden (Kapitel 5.1.11). WDR5 selbst scheint jedoch keinen Einfluss auf die Dekondensierung des DNA-Arrays zu haben (Kapitel 5.1.11.6). In vorangegangenen Studien zur Interaktion der beiden Faktoren konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* interagieren und dass an dieser direkten Interaktion die Zinkfinger-Domäne von CTCF beteiligt ist (van de

Nobelen, persönliche Kommunikation). Interessanterweise hat die Bindung nur der CTCF-Zinkfinger-Domäne einen ähnlich geringen Effekt wie die Bindung von WDR5 auf den LacO-Array. Die Zinkfinger- und die N-terminale Domäne zusammen zeigen jedoch einen Dekondensierungseffekt wie das Wildtyp-Protein. Beide Domänen synergieren demnach in der Dekondensierung des LacO-Arrays.

Eine Erklärung für den geringen Effekt von WDR5 auf den LacO-Array könnte sein, dass die Bindung von WDR5 allein nicht ausreicht, sondern dass weitere Enzymaktivität, angezeigt durch die vorhandene Acetylierung von H3K9 oder die Demethylierung von H3K27me₃, durch die N-terminale Domäne von CTCF an den Array rekrutiert wird und dies dann zusammen zur vollen Dekondensierung des heterochromatischen Arrays führt. Für den N-Terminus konnte ja bereits eine Rolle für die Aktivierung des APP-Gens gezeigt werden (Vostrov et al., 2002). Ob dies jedoch direkt oder indirekt über einen weiteren Brückenfaktor geschieht, ist noch zu klären. Doch WDR5 könnte nicht nur für die Rekrutierung eines Enzymkomplexes verantwortlich sein.

WDR5 konnte ebenfalls als Komponente eines CHD8-haltigen Komplexes in HeLa-Zellen identifiziert werden (Thompson et al., 2008). Die beiden Proteine zeigen außerdem eine direkte Interaktion miteinander. Die H3K4-spezifische HMT MLL1 ist dagegen nicht in diesem Komplex enthalten. Für den WDR5-Komplex konnte dagegen ebenfalls in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass sowohl MLL1 als auch CHD8 in diesem vorliegen (Dou et al., 2005). Eine direkte Interaktion wurde nicht beschrieben. So könnte WDR5 tatsächlich als Brückenfaktor dienen, um MLL1 mit den weiteren Kernkomponenten des Komplexes zu verbinden, da WDR5 essentiell für die Integrität des Komplexes ist (Steward et al., 2006). Die Interaktion von WDR5 mit CHD8 und MLL1 scheint sich aber gegenseitig auszuschließen.

Für CTCF konnte bereits eine direkte Interaktion mit CHD8 in HeLa-Zellen demonstriert werden (Ishihara et al., 2006), CTCF und CHD8 zeigen jedoch nur eine partielle Kolokalisierung in Immunfluoreszenz-Analysen. CTCF selbst konnte nicht als Mitglied des CHD8-Komplexes in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Thompson et al., 2008). Umgekehrt konnte CHD8 ebenfalls nicht als Mitglied des CTCF-Komplexes in murinen Zellen (van de Nobelen, 2008) identifiziert werden. Dies gilt auch für Kismet, dem Drosophila-Homolog von

CHD8. Das Protein ist nicht im dCTCF-Komplex enthalten (I. Panzer, persönliche Kommunikation).

Schließen WDR5 und CHD8 sich als Interaktionspartner von CTCF demnach an? Beide interagieren mit CTCF über dessen Zinkfinger-Domäne und könnten um eine Bindung konkurrieren. Dafür spricht, dass CHD8 nicht am dekondensierten Array nachgewiesen werden konnte. Dies macht eine Rekrutierung von MLL1 über WDR5 und CTCF an den Array wahrscheinlicher. Aber: die getesteten Mutanten von WDR5 reduzieren die Interaktion mit MLL1 sowie die HMT-Aktivität um etwa 80% (Patel et al., 2008a). Da die Proteine in den Zellen überexprimiert wurden, ist es wahrscheinlich, dass das endogene Wildtyp-Protein vom exogenen, mutierten Protein verdrängt wurde. Daher scheinen die Mutationen keinen Einfluss auf die Dekondensierung zu haben. Die Interaktion von MLL1 mit WDR5 findet über ein konserviertes Bindemotiv statt, das in allen weiteren Mitgliedern der SET-Proteinfamilie ebenfalls vorhanden ist. Eine Beteiligung der MLL/SET-Komplexe an der Dekondensierung ist daher nicht gegeben oder allein nicht ausreichend. Die Interaktionsanalysen wurden allerdings *in vitro* durchgeführt. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Mutation einer einzelnen AS *in vivo* nicht ausreicht, um eine Interaktion zu verhindern. Die Generierung einer mehrfach mutierten Form von WDR5 wäre sinnvoll, um diese als dominant-negative Variante in weiteren Experimenten zu untersuchen. Die getesteten Mutationen betreffen jedoch nur die Interaktion von WDR5 mit den MLL/SET-Komplexen. Diese sind jedoch nicht die einzigen Komplexe mit Histon-modifizierender Aktivität, in die WDR5 eingebunden ist.

Eine weitere Komplexaufreinigung in WDR5-überexprimierenden humanen Zellen zeigte, dass sowohl MLL1 als auch die HAT MOF mit WDR5 in einem Komplex vorliegen (Dou et al., 2005). Dass MOF eventuell an der CTCF-vermittelten Dekondensierung beteiligt ist, scheint eher unwahrscheinlich, da eine globale H4-Acetylierung am dekondensierten Array zwar nachzuweisen ist, aber nicht exakt die Struktur des Arrays widerspiegelt. Diese Möglichkeit sollte jedoch ausgeschlossen werden, bevor nicht der dekondensierte Array auf die spezifische Acetylierung von H4K16 oder eine Interaktion mit MOF untersucht worden ist.

Interessanterweise konnte ebenfalls ein Komplex in murinen und humanen Zellen als auch in *Drosophila* identifiziert werden, der sowohl WDR5 (bzw. WDS) als auch GCN5 (bzw. Gcn5) als konservierte Untereinheiten beinhaltet (Guelman et al., 2009; Suganuma et al., 2008). Dieser

so genannte ATAC-Komplex zeigt HAT-Aktivität (u.a. an H3K9) und stimuliert zumindest in *Drosophila* die Aktivität von Chromatin-Remodelling-Komplexen. Eine direkte Interaktion von humanem WDR5 und GCN5 *in vivo* konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

In einer anderen Studie konnten weitere Untereinheiten des humanen ATAC-Komplexes identifiziert werden. Zu diesen gehört u.a. das Protein UBAP2L, ein Faktor mit unbekannter Funktion, der eine Ubiquitin-assoziierte Domäne enthält (UBA) (Wang et al., 2008).

Interessanterweise konnte mittels der Komplexaufreinigung das murine Homolog von UBAP2L als Interaktionspartner von CTCF identifiziert werden (van de Nobelen, 2008).

Die UBA-Domäne bindet sowohl an Ubiquitin, als auch an ubiquitylierte Proteine und scheint daher neben seiner Rolle in dem Abbau von Proteinen auch für Protein-Protein-Interaktionen wichtig zu sein (Madura, 2002). Eine Funktion im Zusammenhang mit CTCF muss noch geklärt werden. Der ATAC-Komplex scheint aber eine interessante Verbindung zu sein, da für CTCF bereits die Interaktion mit 2 der Untereinheiten dieses Komplexes nachgewiesen werden konnte. Die Verbindung zum ATAC-Komplex sollte in weiteren Untersuchungen eine Rolle spielen.

Im Zuge der hier vorliegenden Arbeit konnte zwar keine Rekrutierung von GCN5 an den Array gezeigt werden, doch kann diese nicht ausgeschlossen werden, da die vorhandenen Mengen unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegen könnten. Durch die beschriebenen Interaktion von WDR5 und GCN5 könnte die HAT eventuell indirekt an den Array rekrutiert werden.

Neben GCN5 ist bisher eine weitere HAT beschrieben worden, die die Acetylierung von H3K9 katalysiert, SRC-1 (*Steroid receptor coactivator-1*) (Peterson and Laniel, 2004). Daher sollte auch dieses Enzym auf eine Kolo-kalisierung mit CTCF am dekondensierten Array untersucht werden.

WDR5 scheint daher nicht für den SET/MLL-Komplex, sondern für weitere Proteinkomplexe eine wichtige Untereinheit zu sein, die alle eine Rolle in der Modifikation von Chromatin spielen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die starke Rekrutierung von WDR5 über CTCF an den dekondensierten Array seine Rolle als Brückenfaktor widerspiegelt. Da mehrere Proteinkomplexe rekrutiert werden, fallen diese Komponenten eventuell unter die Nachweisgrenze des Systems, was die nicht nachgewiesene Interaktion von GCN5 erklären

könnte. Die Rekrutierung von WDR5 durch an den LacO-Array wirft die Frage auf, ob diese Rekrutierung ebenfalls an endogenen Bindestellen von CTCF nachweisbar ist. Dies konnte im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht werden, da der verfügbare Antikörper gegen WDR5 nicht für eine Chromatin-IP geeignet ist. Die Einbindung von WDR5 in diverse Enzymkomplexe könnte die Ursache sein, warum das Protein sich nach erfolgreicher RNAi-Behandlung auf mRNA-Ebene als sehr stabil erweist. Wenn es v.a. in Komplex-gebundener Form in der Zelle vorliegt, könnte es durch die umgebenden Proteine gegen Abbau geschützt sein.

JMJD3

Ein Kennzeichen der CTCF-vermittelten Dekondensierung des LacO-Arrays ist die Demethylierung von H3K37me₃ im Chromatinbereich des Arrays. Der humane Faktor JMJD3 konnte als spezifische Demethylase dieser Histonmodifikation identifiziert werden (Agger et al., 2007; Hong et al., 2007). Deshalb wurde auch dieses Enzym auf eine mögliche Interaktion mit CTCF am dekondensierten Array untersucht; diese konnte jedoch nicht demonstriert werden. Wie im Fall von BAF57 war für die Klonierung des GFP-Fusionskonstruktes nur die cDNA des murinen JMJD3 verfügbar. Dies könnte ein Problem für die Interaktionsanalysen darstellen. Der zweite bisher beschriebene Faktor, der die Demethylierung von H3K27me₃ katalysiert, ist UTX (Agger et al., 2007; Hong et al., 2007). Dieser Faktor konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht auf eine Interaktion untersucht werden, da weder ein Antikörper noch eine Wildtyp-cDNA zur Verfügung stand. Für UTX konnte jedoch bereits eine Interaktion mit MLL2 beschrieben werden (Issaeva et al., 2007), und scheint daher ebenfalls konzertiert mit weiteren Faktoren zu agieren. Für weiterführende Untersuchungen sollte demnach ebenfalls UTX in Betracht gezogen werden.

Die Analyse der Proteinstruktur von CTCF zeigt, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus keine geordnete Struktur aufweisen (i.e. ungeordnete Peptide, die keine strukturellen oder funktionellen Motive aufweisen) (Martinez and Miranda, 2010). Dies suggeriert, dass beide Domänen als Plattform dienen, um Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln. Eine Zusammenfassung aller möglichen Protein-Interaktionen, die über CTCF am LacO-Array aufgebaut werden, gibt das dargestellte Modell (Abb. 6.1).

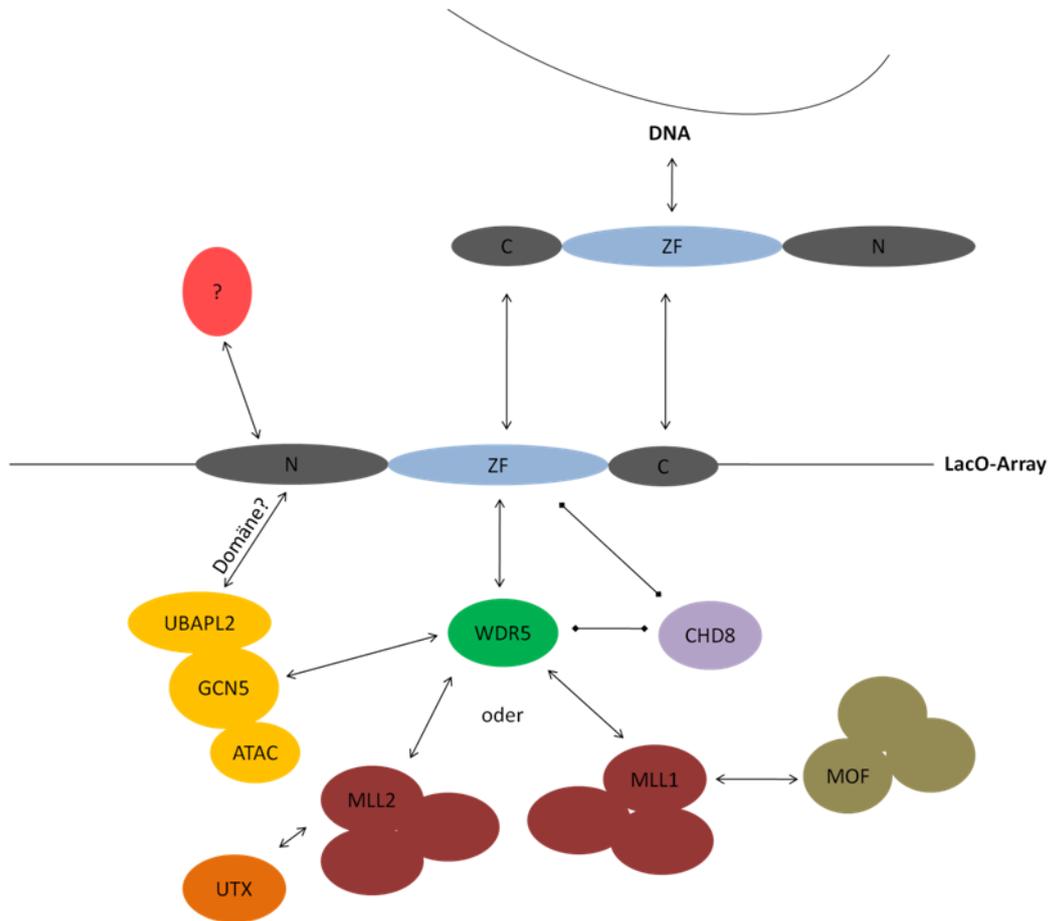


Abb. 6.1 Modell des potentiellen, durch CTCF vermittelten Netzwerks an Protein-Interaktionen am LacO-Array

CTCF interagiert über seine drei Domänen (N, ZF und C) mit verschiedenen Faktoren. Darunter befinden sich die Selbstinteraktion (ZF mit C), was zur Ausbildung von Chromatinschleifen führen kann, sowie eine Interaktion über die ZF-Domäne mit WDR. Diese verhindert die Interaktion mit CHD8, kann aber zur Rekrutierung weiterer Proteinkomplexe wie ATAC und MLL führen. Unklar ist die Rekrutierung über den N-Terminus. Hier befindet sich die Enhancerblockade-Domäne.

6.2.4 Der paraloge Faktor BORIS verursacht ebenfalls Dekondensierung des heterochromatischen DNA-Arrays

Für BORIS konnte im Gegensatz zu CTCF gezeigt werden, dass für die Dekondensierung sowohl die N-terminale (BORIS N) als auch die C-terminale Domäne (BORIS C) ausreichend ist (Schulte, Diplomarbeit 2009). Die Zinkfinger-Domäne von BORIS spielt keine Rolle. Die beteiligten Faktoren scheinen aufgrund dieses Befundes für CTCF und BORIS spezifisch zu sein. Für WDR5 kann eine Beteiligung an der BORIS-vermittelten Dekondensierung ausgeschlossen werden. Die ZF-Domäne von BORIS zeigt trotz der hohen Konservierung im Gegensatz zu CTCF keine Interaktion mit WDR5 (van de Nobelen, unveröffentlichte

Beobachtung). Eine mögliche Rolle in der BORIS-vermittelten Dekondensierung des LacO-Arrays könnte dagegen die HMT SET1A (Methylierung von H3K4) spielen, für die bereits eine Interaktion mit BORIS in humanen Zellen nachgewiesen werden konnte (Nguyen et al., 2008a). Die für die Interaktion verantwortliche Domäne von BORIS ist jedoch noch nicht bekannt. Eine Anreicherung von H3K4me2 konnte nach Bindung von Lac-BORIS am dekondensierten DNA-Arrays mittels Immunfluoreszenz bereits nachgewiesen werden (Baumgart, Bachelor-Arbeit, 2009). Welche Funktion von BORIS der Dekondensierungseffekt jedoch repräsentiert, ist noch unklar. Transaktivierungspotential besitzt BORIS wie CTCF als mCherry-Lac-Konstrukt nicht; dies konnte in einem transienten Reporterassay gezeigt werden (Baumgart, Bachelor-Arbeit, 2009). Interessanterweise konnte mittels des Hefe-2-Hybridsystems ebenfalls eine Interaktion von BORIS mit CHD8, einem Interaktionspartner von CTCF, der für die Enhancerblockade notwendig ist (Ishihara et al., 2008), nachgewiesen werden. Diese findet im Gegensatz zu CTCF über die N-terminale Domäne von BORIS statt und scheint sich auf einen Bereich zwischen den AS 100-200 zu beschränken (Nguyen et al., 2008a). Im Zuge der Identifizierung der Enhancerblockade-Domäne von CTCF mittels des GAL-Reporter-Systems konnte ebenfalls für einen N-terminalen Bereich von BORIS (AS 1-72) nachgewiesen werden, dass dieser eine Tendenz zur Vermittlung der Enhancerblockade zeigt (Bardenhagen, Diplomarbeit 2003). Diese Funktion könnte sich in der BORIS N-vermittelten Dekondensierung des Arrays widerspiegeln. Interessant für weiterführende Experimente wäre daher, BORIS 1-72 auf seinen Dekondensierungseffekt sowie eine Kollokalisierung von CHD8 mit BORIS N am dekondensierten LacO-Array zu untersuchen.

Die Herunterregulierung von *BORIS* führt zur Abnahme der SET1A- und ASH2-Bindung (einer weiteren Komponente des HMT-Komplexes) an die Promotoren der *Myc*- und *BRCA1*-Gene sowie der H3K4-Dimethylierung in diesem Bereich. Dies wird von einer Verringerung der Genexpression begleitet (Nguyen et al., 2008a). Zusammengenommen mit diesen Ergebnissen scheint BORIS wie CTCF seine Funktion dadurch auszuüben, indem das Protein als Plattform für die Rekrutierung von unterschiedlichen Chromatin-modifizierenden Faktoren dient. Auch für BORIS wurde die Proteinstruktur analysiert. Wie für CTCF beschrieben, bestehen sowohl der N- als auch der C-Terminus aus ungeordneten Peptiden, die weder strukturelle noch funktionelle Motive ausbilden. So scheint auch BORIS als Plattform zu dienen, um Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Campbell et al., 2010).

6.2.5 Bewertung des LacI-LacO-Modellsystems

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System zur Untersuchung des direkten Einflusses von Faktoren auf Chromatin konnte bereits in der Vergangenheit erfolgreich für Analysen solcher Art für unterschiedliche Faktoren eingesetzt werden. So konnte für den Aktivator VP16 (Tumbar et al., 1999; Memedula et al., 2003) sowie den Faktor UBF, einen Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase I, gezeigt werden (Chen et al., 2004), dass sie in der Lage sind, Heterochromatin in Euchromatin zu verwandeln. Dies geschieht jedoch auf unterschiedliche Weise. Auch für den BRCA1 konnte ein Einfluss auf Chromatin bewiesen werden (Ye et al., 2001).

Für den Faktor HP1 (Heterochromatisches Protein 1) konnte der umgekehrte Fall gezeigt werden. Die beiden Varianten HP1 α und HP1 β sind in der Lage, einen euchromatischen DNA-Array zu kondensieren (Verschure et al., 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dieses System erfolgreich genutzt werden, um die Funktion von CTCF in der Organisation von Chromatin zu erhellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen verwendet, die LacO-Arrays in verschiedenen Regionen des Genoms integriert haben. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigte sich jedoch, dass die Integrationsposition keine Rolle spielte. Mit beiden verwendeten Zelllinien wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Die Fortsetzung der Experimente erfolgte daher nur mit einer Zelllinie. Dazu wurden die F42B8-Zellen ausgewählt, die nur einen integrierten Array tragen, da beispielsweise Experimente, die mittels der Größenauswertung analysiert wurden, nur in diesen Zellen durchgeführt werden konnten.

6.2.5.1 Vorteile

Die Verwendung des LacO-Arrays ermöglicht die direkte Visualisierung des Chromatins in diesem Bereich, da der Lac-Repressor mit sehr hoher Affinität als Fusionsprotein mit einem fluoreszierenden Protein (GFP oder mCherry) an seine Bindungsstellen bindet. Die Art des Fluorophors macht dabei keinen Unterschied. Die Herstellung einer Fusion mit einem beliebigen Protein wie CTCF, dessen Funktion in Hinsicht auf Chromatin untersucht werden soll, erlaubt die Rekrutierung dieses Faktors direkt an Chromatin.

Dabei geschieht die Bindung des zu untersuchenden Faktors an eine Region, die keine flankierenden Sequenzen, die Bindestellen für Kofaktoren enthalten. Die Funktion von CTCF wird daher ohne umgebende Sequenzen untersucht, die eventuell die Funktion modulieren könnten.

6.2.5.2 Nachteile

Das Modellsystem bedient sich eines artifiziell in die Zellen eingebrachten DNA-Arrays, der keinesfalls eine natürliche Chromatinumgebung darstellt. Dies sollte man bei einer Bewertung der erhaltenen Ergebnisse berücksichtigen. Eine Überprüfung der erhaltenen Daten an endogenen Loci ist daher unumgänglich.

Im Zuge der Analysen konnte beobachtet werden, dass im Falle einer Kolo-kalisierung diese nicht in 100% aller Fälle detektiert werden konnte. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mittels des Modellsystems wurden mit einem normalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es ist daher möglich, dass eine Kolo-kalisierung nur beobachtet werden konnte, wenn sehr starke Signale detektiert werden, da die Hintergrundfluoreszenz zu hoch ist. Die Sensitivität des Systems war deshalb eventuell nicht ausreichend für die Detektion weiterer Interaktionspartner. Weitere Versuche sollten deshalb mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden, um den Hintergrund zu minimieren.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass einige Komponenten, die für die durch CTCF vermittelte Dekondensierung notwendig sind, nur im Zuge der Dekondensierung am Array vorlagen, und somit zum Zeitpunkt der Auswertung (60h nach Transfektion) nicht mehr zu detektieren waren und somit übersehen wurden. Eventuell findet eine Interaktion auch nur über einen kurzen Zeitraum statt. Dies könnte beispielsweise für PARP-1, das nur so lange mit CTCF interagiert, wie es dieses modifiziert.

Die ermittelten Werte für die CTCF-vermittelte Dekondensierung variieren zwischen den einzelnen Experimenten. Die Analyse erfolgte mittels der in Kapitel 4.6.1 beschriebenen Größenauswertung. Die Ermittlung der Fläche erfolgte über Festlegung der gemessenen Intensität der Fluoreszenzsignale. Da die Intensität von Zelle zu Zelle variiert, musste der Schwellenwert für die Intensität in verschiedenen Aufnahmen verändert werden. Dies könnte einer der Gründe für die Abweichung der Werte sein. Es wurde jedoch darauf

geachtet, die Auswertung eines Experiments in sich geschlossen vorzunehmen, um diesen Fehler zu minimieren.

Eine Untersuchung des Chromatinstatus ohne und mit Bindung von CTCF mittels ChIP war nicht möglich, da die Zellen für diese Art der Analyse nicht ausreichend transfizierbar sind. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Zelllinie zu generieren, die zusätzlich zum LacO-Array stabil Fluorophor-markiertes Lac-CTCF exprimiert. Dies war jedoch nicht erfolgreich.

6.3 Interpretation der Ergebnisse

Im Zuge unterschiedlicher Studien konnten sehr viele Proteine beschrieben werden, die mit CTCF einen großen Komplex bilden. In verschiedenen Zellen, Geweben und Organismen unterscheiden sich diese. Dies ist einerseits bedingt durch die Unterschiedlichkeit des verwendeten Materials, andererseits spielt jedoch auch die verwendete Analysemethode eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit konnten einige bereits bekannten Interaktionspartner von CTCF nicht nachgewiesen, jedoch auch keine neuen Partner identifiziert werden. Dabei muss jedoch auch bedacht werden, dass in den vorangegangenen Studien lösliche Proteinkomplexe isoliert wurden, wogegen in der vorliegenden Arbeit eine Analyse von Chromatin-gebundenem CTCF vorgenommen wurde.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Funktion von CTCF in verschiedenen Geweben und Zellen durch die Interaktion mit zellspezifischen Partnern und die Besetzung unterschiedlicher Bindestellen reguliert wird. Eine Unterteilung der CTS anhand der Konsensussequenz wurde bisher in humanen Zellen vorgenommen. Es wurden *low-occupancy sites* definiert, die Zelltyp-spezifisch sind sowie mit aktivem Chromatin und erhöhter Genexpression einhergehen. Sie zeigen außerdem eine höhere Konservierung der umgehenden DNA-Sequenz als die so genannten *high-occupancy sites*. Diese sind mit reprimierendem Chromatin assoziiert (Essien et al., 2009). Doch welche Funktion von CTCF stellt die beobachtete Dekondensierung des heterochromatischen DNA-Arrays dar?

CTCF und Aktivierung

Für CTCF konnte bereits eine Rolle in der Aktivierung der Transkription sowie eine Interaktion mit RNA-Polymerase II beschrieben werden (Vostrov et al., 2002; Chernukhin et

al., 2007). Die Initiation der Transkription geht einher mit der Rekrutierung von generellen Transkriptionsfaktoren, Aktivatoren, Koaktivatoren wie etwa der Mediator-Komplex und Chromatin-verändernde Faktoren sowie der RNA-Polymerase II.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels des LacO-LacI-Modellsystems gezeigt werden, dass durch CTCF Chromatin-verändernde Faktoren rekrutiert werden können, RNA-Polymerase II ist jedoch nicht dabei. Zusätzlich kann CTCF in transienten Reporterassays die Aktivität des Reportergens nicht steigern. Zusammengenommen ist es unwahrscheinlich, dass die Ereignisse, die durch CTCF am LacO-Array stattfinden, die Aktivierung der Transkription darstellen.

Die Studien für den EXT2-Locus zeigen, dass die CTS nicht nur zwei unterschiedlich beschaffenen Chromatindomänen trennt, sondern auch mit der TSS überlappt. Daher könnte CTCF an diesem Gen eine aktivierende Funktion ausüben. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, kann der Effekt von CTCF an dieser CTS mittels transienter Reporterassays analysiert werden.

CTCF und Enhancer-Blockade

Für den *Igf2/H19*-Locus, in dem die ICR als CTCF-abhängiges Enhancerblockade-Element fungiert, konnte gezeigt werden, dass CTCF für den Chromatinstatus des Locus verantwortlich ist. Die maternale, von CTCF gebundene ICR sowie die Promotorregion von *H19* weisen normalerweise eine Allel-spezifische Acetylierung von H3K9 sowie Methylierung von H3K4 auf, während die Promotorregion und die DMR1 des nicht exprimierten *Igf2* eine Allel-spezifische Trimethylierung von H3K27 aufweisen. Sind die CTS in der ICR nicht von CTCF gebunden, führt dies zu einer Verminderung der beschriebenen Histonmodifikationen (Han et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von CTCF an dem LacO-Array zu der Einführung von H3K9ac sowie Methylierung von H3K4 führt, wogegen H3K27me3 demethyliert wird. Eine Rekrutierung an den Nukleolus, wie es für das 5'HS4 des Hühner- β -Globin-Locus gezeigt worden ist, konnte nur vereinzelt beobachtet werden. Es wurde außerdem berichtet, dass die Enhancerblockade an der ICR von *H19* PARylierungs-abhängig ist (Farrar et al., 2010). Die Enhancerblockade-Domäne von CTCF zeigt zudem nur einen geringen Dekondensierungseffekt im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Zusammengenommen lassen die vorhandenen Daten darauf schließen, dass die durch CTCF

hervorgerufenen Ereignisse am LacO-Array die Funktion von CTCF in der Enhancerblockade zum Teil darstellen, sie aber nicht ausreichend erklären.

CTCF und Barriereaktivität

Generell trennt ein Barriereelement heterochromatische von euchromatischen Genomregionen. Für das 5'HS4-Barriereelement konnte gezeigt werden, dass dieses gekennzeichnet durch ein hohes Maß an H3-Acetylierung sowie Methylierung von H3K4 ist, was die DNA im Promotorbereich vor Methylierung schützt (Mutskov et al., 2002; West et al., 2004). Für den *p16 Ink4a/Arf*-Locus konnte gezeigt werden, dass dort die Barrierefunktion von CTCF PARylierungs-abhängig ist (Witcher and Emerson, 2009).

Die Studien an endogenen CTS in dieser Arbeit bestätigen, dass CTCF an Elementen binden kann, die einen heterochromatischen Bereich von einem euchromatischen Bereich trennen. Die Studien mittels des LacO-LacI-Systems zeigen, dass durch das Vorhandensein von CTCF HAT- und H3K4-HMT-Aktivität an den LacO-Array rekrutiert wird. Zusätzlich nimmt die Anwesenheit einer heterochromatischen Modifikation ab. Jedoch konnte keine Abhängigkeit von einer PARylierung von CTCF nachgewiesen werden. Die Ereignisse am LacO-Array scheinen aber dennoch am wahrscheinlichsten die Barriereaktivität von CTCF zu repräsentieren. Die Regulation von CTCF durch PARP-1 kann Zelltyp-spezifisch sein.

Aufgrund dieser Befunde lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass CTCF generell dazu befähigt ist, neben der Enhancerblockade auch die Barriereaktivität von Isolatorelementen auszuführen. Die Funktion ist jedoch abhängig vom vorhandenen Sequenzkontext und Interaktionspartnern. Deshalb sollte im Weiteren besonders die Abhängigkeit der Funktion von CTCF von seinen Interaktionspartnern in unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden.

6.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die funktionelle Abhängigkeit der identifizierten Barriereelemente von CTCF nicht untersucht werden. Daher sollte die Weiterführung der *Knockdown*-Analysen eine wichtige Rolle spielen. Dazu jedoch sollten nicht nur der Einfluss der CTCF-Expression, sondern auch potentieller Interaktionspartnern wie WDR5 oder MLL1/2 und GCN5 untersucht werden.

Mittels des LacO-LacI-Modellsystems konnte der direkte Einfluss von CTCF auf Chromatin untersucht sowie eine Analyse einiger Interaktionspartner durchgeführt werden. Dabei wurde jedoch nur eine Reihe von Kandidaten untersucht. Dies gibt einen Einblick in die Vorgänge, vermittelt jedoch nicht das Gesamtbild. Um dieses zu erhalten, könnte beispielsweise ein *Peptid-Pulldown* mit einer größeren Anzahl an modifizierten Histonmodifikationen durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre PICh (*proteomics of isolated chromatin segments*). Mittels dieser Methode lässt sich untersuchen, ob ein bestimmtes Protein an einer spezifischen Genomstelle vorliegt. Die Analyse erfolgt mittels Massenspektrometrie (Dejardin and Kingston, 2009). Mit diesem Ansatz können sowohl der Chromatinstatus als auch interagierende Proteine ermittelt werden. Allerdings wäre hierfür eine Zelllinie nötig, die sowohl den integrierten LacO-Array aufweist als auch Lac-CTCF stabil (bzw. Lac als Kontrolle) exprimiert.

Ein weiterer Aspekt ist die Rolle von CTCF in der Vermittlung von Chromatinschleifen und damit in der räumlichen Organisation des Genoms. CTCF kann mit der Kernmatrix assoziieren (Dunn et al., 2003) und rekrutiert Isolatorelemente an die Kernmatrix (Jusufzai & Felsenfeld, 2004) sowie an den Nukleolus (Yusufzai et al., 2004). Eine Interaktion mit Lamin A und C (Yusufzai et al., 2004) konnte bereits ebenfalls gezeigt werden sowie eine Lamin A- und CTCF-abhängige Positionierung eines DNA-Elements in die Kernperipherie (Ottaviani et al., 2009b). CTCF wird zudem eine Rolle Beteiligung in der Definition von LADs zugeschrieben (Guelen et al., 2008). Interessanterweise konnte für die Kernporen gezeigt werden, dass sie als Basis für die Ausbildung von Chromatinschleifen dienen können und damit eventuell eine Rolle in der Abgrenzung unterschiedlicher Chromatindomänen spielen (Kohler & Hurt 2010). Nach Aufreinigung des CTCF-Komplexes aus Maus und *Drosophila* konnten Komponenten des Kernporenkomplexes identifiziert werden. Der Faktor Ranbp2 assoziiert in Maus mit CTCF (van de Nobelen, 2008), sein *Drosophila*-Homolog Nup358 sowie eine weitere Komponente (Nup44A) konnte für dCTCF im Komplex gezeigt werden (I. Panzer, persönliche Kommunikation). Das Modellsystem könnte daher ebenfalls genutzt werden, um eine mögliche strukturelle Rolle von CTCF in der Organisation des Genoms zu beleuchten. Ein erster Hinweis ist die beobachtete Assoziation des CTCF-gebundenen Arrays mit dem Nukleolus. Dieser Aspekt sollte in nachfolgenden Analysen ebenfalls berücksichtigt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Agger, K., Cloos, P.A., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E. and Helin, K. (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*, **449**, 731-734.
- Arnold, R., Burcin, M., Kaiser, B., Muller, M. and Renkawitz, R. (1996) DNA bending by the silencer protein NeP1 is modulated by TR and RXR. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2640-2647.
- Baniahmad, A., Steiner, C., Kohne, A.C. and Renkawitz, R. (1990) Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell*, **61**, 505-514.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Bao, L., Zhou, M. and Cui, Y. (2008) CTCFBSDB: a CTCF-binding site database for characterization of vertebrate genomic insulators. *Nucleic Acids Res*, **36**, D83-87.
- Bardenhagen, I. (2003) Charakterisierung einer Enhancer-Blockade-Domäne des Transkriptionsfaktors CTCF. *Diplomarbeit*
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**, 823-837.
- Bartkuhn, M., Straub, T., Herold, M., Herrmann, M., Rathke, C., Saumweber, H., Gilfillan, G.D., Becker, P.B. and Renkawitz, R. (2009) Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *Embo J*, **28**, 877-888.
- Baumgart, S. (2009) Einfluss spezifischer Protein-Domänen auf die Chromatin-Struktur. *Bachelor-Arbeit*
- Bell, A.C. and Felsenfeld, G. (2000) Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, **405**, 482-485.
- Bell, A.C., West, A.G. and Felsenfeld, G. (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*, **98**, 387-396.
- Burke, L.J., Hollemann, T., Pieler, T. and Renkawitz, R. (2002) Molecular cloning and expression of the chromatin insulator protein CTCF in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*, **113**, 95-98.
- Campbell, A.E., Martinez, S.R. and Miranda, J.J. (2010) Molecular architecture of CTCFL. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Canto-Soler, M.V., Huang, H., Romero, M.S. and Adler, R. (2008) Transcription factors CTCF and Pax6 are segregated to different cell types during retinal cell differentiation. *Dev Dyn*, **237**, 758-767.
- Chao, W., Huynh, K.D., Spencer, R.J., Davidow, L.S. and Lee, J.T. (2002) CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science*, **295**, 345-347.
- Chen, D., Belmont, A.S. and Huang, S. (2004) Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15106-15111.
- Chen, J. and Matthews, K.S. (1992) Deletion of lactose repressor carboxyl-terminal domain affects tetramer formation. *J Biol Chem*, **267**, 13843-13850.
- Chen, Q., Lin, L., Smith, S., Huang, J., Berger, S.L. and Zhou, J. (2007) CTCF-dependent chromatin boundary element between the latency-associated transcript and ICPO promoters in the herpes simplex virus type 1 genome. *J Virol*, **81**, 5192-5201.

- Chernukhin, I., Shamsuddin, S., Kang, S.Y., Bergstrom, R., Kwon, Y.W., Yu, W., Whitehead, J., Mukhopadhyay, R., Docquier, F., Farrar, D., Morrison, I., Vigneron, M., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Loukinov, D., Lobanenko, V., Ohlsson, R. and Klenova, E. (2007) CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Mol Cell Biol*, **27**, 1631-1648.
- Chernukhin, I.V., Shamsuddin, S., Robinson, A.F., Carne, A.F., Paul, A., El-Kady, A.I., Lobanenko, V.V. and Klenova, E.M. (2000) Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF. *J Biol Chem*, **275**, 29915-29921.
- Couture, J.F., Collazo, E. and Trievel, R.C. (2006) Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 698-703.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Muller, S., Solovei, I. and Fakan, S. (2006) Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 307-316.
- Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D.E., Roh, T.Y., Cui, K. and Zhao, K. (2009) Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res*, **19**, 24-32.
- Defossez, P.A., Kelly, K.F., Filion, G.J., Perez-Torrado, R., Magdinier, F., Menoni, H., Nordgaard, C.L., Daniel, J.M. and Gilson, E. (2005) The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *J Biol Chem*, **280**, 43017-43023.
- Dejardin, J. and Kingston, R.E. (2009) Purification of proteins associated with specific genomic loci. *Cell*, **136**, 175-186.
- Donohoe, M.E., Silva, S.S., Pinter, S.F., Xu, N. and Lee, J.T. (2009) The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctfc and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature*, **460**, 128-132.
- Donohoe, M.E., Zhang, L.F., Xu, N., Shi, Y. and Lee, J.T. (2007) Identification of a Ctfc cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. *Mol Cell*, **25**, 43-56.
- Dou, Y., Milne, T.A., Ruthenburg, A.J., Lee, S., Lee, J.W., Verdine, G.L., Allis, C.D. and Roeder, R.G. (2006) Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 713-719.
- Dou, Y., Milne, T.A., Tackett, A.J., Smith, E.R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C.D., Chait, B.T., Hess, J.L. and Roeder, R.G. (2005) Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*, **121**, 873-885.
- Dunn, K.L., Zhao, H. and Davie, J.R. (2003) The insulator binding protein CTCF associates with the nuclear matrix. *Exp Cell Res*, **288**, 218-223.
- El-Kady, A. and Klenova, E. (2005) Regulation of the transcription factor, CTCF, by phosphorylation with protein kinase CK2. *FEBS Lett*, **579**, 1424-1434.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Essien, K., Vigneau, S., Apreleva, S., Singh, L.N., Bartolomei, M.S. and Hannenhalli, S. (2009) CTCF binding site classes exhibit distinct evolutionary, genomic, epigenomic and transcriptomic features. *Genome Biol*, **10**, R131.
- Farrar, D., Rai, S., Chernukhin, I., Jagodic, M., Ito, Y., Yamine, S., Ohlsson, R., Murrell, A. and Klenova, E. (2010) Mutational analysis of the poly(ADP-ribosylation) sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosylation). *Mol Cell Biol*, **30**, 1199-1216.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, **421**, 448-453.
- Feng, Q. and Zhang, Y. (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev*, **15**, 827-832.
- Fieck, A., Wyborski, D.L. and Short, J.M. (1992) Modifications of the E.coli Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1785-1791.

- Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J. and Lobanekov, V.V. (1996) An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol*, **16**, 2802-2813.
- Filippova, G.N., Lindblom, A., Meincke, L.J., Klenova, E.M., Neiman, P.E., Collins, S.J., Doggett, N.A. and Lobanekov, V.V. (1998) A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, **22**, 26-36.
- Filippova, G.N., Qi, C.F., Ulmer, J.E., Moore, J.M., Ward, M.D., Hu, Y.J., Loukinov, D.I., Pugacheva, E.M., Klenova, E.M., Grundy, P.E., Feinberg, A.P., Cleton-Jansen, A.M., Moerland, E.W., Cornelisse, C.J., Suzuki, H., Komiya, A., Lindblom, A., Dorion-Bonnet, F., Neiman, P.E., Morse, H.C., 3rd, Collins, S.J. and Lobanekov, V.V. (2002) Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Res*, **62**, 48-52.
- Filippova, G.N., Thienes, C.P., Penn, B.H., Cho, D.H., Hu, Y.J., Moore, J.M., Klesert, T.R., Lobanekov, V.V. and Tapscott, S.J. (2001) CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet*, **28**, 335-343.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fu, Y., Sinha, M., Peterson, C.L. and Weng, Z. (2008) The insulator binding protein CTCF positions 20 nucleosomes around its binding sites across the human genome. *PLoS Genet*, **4**, e1000138.
- Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986) The organisation of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *Embo J*, **5**, 511-518.
- Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet*, **7**, 703-713.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T. and Inagaki, M. (1999) Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem*, **274**, 25543-25549.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. and van Steensel, B. (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, **453**, 948-951.
- Guelman, S., Kozuka, K., Mao, Y., Pham, V., Solloway, M.J., Wang, J., Wu, J., Lill, J.R. and Zha, J. (2009) The double-histone-acetyltransferase complex ATAC is essential for mammalian development. *Mol Cell Biol*, **29**, 1176-1188.
- Hadjur, S., Williams, L.M., Ryan, N.K., Cobb, B.S., Sexton, T., Fraser, P., Fisher, A.G. and Merkenschlager, M. (2009) Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. *Nature*, **460**, 410-413.
- Han, L., Lee, D.H. and Szabo, P.E. (2008) CTCF is the master organizer of domain-wide allele-specific chromatin at the H19/Igf2 imprinted region. *Mol Cell Biol*, **28**, 1124-1135.
- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M. and Tilghman, S.M. (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*, **405**, 486-489.
- Harris, M.J. and Arias, I.M. (2003) FIC1, a P-type ATPase linked to cholestatic liver disease, has homologues (ATP8B2 and ATP8B3) expressed throughout the body. *Biochim Biophys Acta*, **1633**, 127-131.
- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., Ching, K.A., Antosiewicz-Bourget, J.E., Liu, H., Zhang, X., Green, R.D., Lobanekov, V.V., Stewart, R., Thomson, J.A., Crawford, G.E., Kellis, M. and Ren, B. (2009) Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, **459**, 108-112.

- Henikoff, S. (1992) Position effect and related phenomena. *Curr Opin Genet Dev*, **2**, 907-912.
- Hong, J.A., Kang, Y., Abdullaev, Z., Flanagan, P.T., Pack, S.D., Fischette, M.R., Adnani, M.T., Loukinov, D.I., Vatolin, S., Risinger, J.I., Custer, M., Chen, G.A., Zhao, M., Nguyen, D.M., Barrett, J.C., Lobanenkov, V.V. and Schrupp, D.S. (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**, 7763-7774.
- Hong, S., Cho, Y.W., Yu, L.R., Yu, H., Veenstra, T.D. and Ge, K. (2007) Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 18439-18444.
- Hore, T.A., Deakin, J.E. and Marshall Graves, J.A. (2008) The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCF in amniotes. *PLoS Genet*, **4**, e1000169.
- Ikeda, K., Stuehler, T. and Meisterernst, M. (2002) The H1 and H2 regions of the activation domain of herpes simplex virion protein 16 stimulate transcription through distinct molecular mechanisms. *Genes Cells*, **7**, 49-58.
- Ishihara, K., Oshimura, M. and Nakao, M. (2006) CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell*, **23**, 733-742.
- Issaeva, I., Zonis, Y., Rozovskaia, T., Orlovsky, K., Croce, C.M., Nakamura, T., Mazo, A., Eisenbach, L. and Canaani, E. (2007) Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Mol Cell Biol*, **27**, 1889-1903.
- Jegou, T., Chung, I., Heuvelman, G., Wachsmuth, M., Gorisch, S.M., Greulich-Bode, K.M., Boukamp, P., Lichter, P. and Rippe, K. (2009) Dynamics of telomeres and promyelocytic leukemia nuclear bodies in a telomerase-negative human cell line. *Mol Biol Cell*, **20**, 2070-2082.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jin, C. and Felsenfeld, G. (2006) Distribution of histone H3.3 in hematopoietic cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 574-579.
- Jothi, R., Cuddapah, S., Barski, A., Cui, K. and Zhao, K. (2008) Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5221-5231.
- Kanduri, C., Pant, V., Loukinov, D., Pugacheva, E., Qi, C.F., Wolffe, A., Ohlsson, R. and Lobanenkov, V.V. (2000) Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol*, **10**, 853-856.
- Kim, T.H., Abdullaev, Z.K., Smith, A.D., Ching, K.A., Loukinov, D.I., Green, R.D., Zhang, M.Q., Lobanenkov, V.V. and Ren, B. (2007) Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*, **128**, 1231-1245.
- Klenova, E.M., Chernukhin, I.V., El-Kady, A., Lee, R.E., Pugacheva, E.M., Loukinov, D.I., Goodwin, G.H., Delgado, D., Filippova, G.N., Leon, J., Morse, H.C., 3rd, Neiman, P.E. and Lobanenkov, V.V. (2001) Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol*, **21**, 2221-2234.
- Klenova, E.M., Morse, H.C., 3rd, Ohlsson, R. and Lobanenkov, V.V. (2002) The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol*, **12**, 399-414.
- Klenova, E.M., Nicolas, R.H., Paterson, H.F., Carne, A.F., Heath, C.M., Goodwin, G.H., Neiman, P.E. and Lobanenkov, V.V. (1993) CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol Cell Biol*, **13**, 7612-7624.
- Klenova, E.M., Nicolas, R.H., U, S., Carne, A.F., Lee, R.E., Lobanenkov, V.V. and Goodwin, G.H. (1997) Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. *Nucleic Acids Res*, **25**, 466-474.
- Kohler, A. and Hurt, E. (2010) Gene regulation by nucleoporins and links to cancer. *Mol Cell*, **38**, 6-15.

- Kurukuti, S., Tiwari, V.K., Tavosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanekov, V., Reik, W. and 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**, 10684-10689.
- Libby, R.T., Hagerman, K.A., Pineda, V.V., Lau, R., Cho, D.H., Baccam, S.L., Axford, M.M., Cleary, J.D., Moore, J.M., Sopher, B.L., Tapscott, S.J., Filippova, G.N., Pearson, C.E. and La Spada, A.R. (2008) CTCF cis-regulates trinucleotide repeat instability in an epigenetic manner: a novel basis for mutational hot spot determination. *PLoS Genet*, **4**, e1000257.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U. and Lidholt, K. (1998) The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem*, **273**, 26265-26268.
- Ling, J.Q., Li, T., Hu, J.F., Vu, T.H., Chen, H.L., Qiu, X.W., Cherry, A.M. and Hoffman, A.R. (2006) CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science*, **312**, 269-272.
- Lobanekov, V.V., Nicolas, R.H., Adler, V.V., Paterson, H., Klenova, E.M., Polotskaja, A.V. and Goodwin, G.H. (1990) A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene*, **5**, 1743-1753.
- Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S.D., Moon, H., Chernukhin, I., Mannan, P., Larsson, E., Kanduri, C., Vostrov, A.A., Cui, H., Niemitz, E.L., Rasko, J.E., Docquier, F.M., Kistler, M., Breen, J.J., Zhuang, Z., Quitschke, W.W., Renkawitz, R., Klenova, E.M., Feinberg, A.P., Ohlsson, R., Morse, H.C., 3rd and Lobanekov, V.V. (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**, 6806-6811.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Lusser, A. and Kadonaga, J.T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*, **25**, 1192-1200.
- Lutz, M., Burke, L.J., Barreto, G., Goeman, F., Greb, H., Arnold, R., Schultheiss, H., Brehm, A., Kouzarides, T., Lobanekov, V. and Renkawitz, R. (2000) Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1707-1713.
- Lutz, M., Burke, L.J., LeFevre, P., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., Bonifer, C., Filippova, G.N., Lobanekov, V. and Renkawitz, R. (2003) Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor. *Embo J*, **22**, 1579-1587.
- MacPherson, M.J., Beatty, L.G., Zhou, W., Du, M. and Sadowski, P.D. (2009) The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO. *Mol Cell Biol*, **29**, 714-725.
- Madura, K. (2002) The ubiquitin-associated (UBA) domain: on the path from prudence to prurience. *Cell Cycle*, **1**, 235-244.
- Majumder, P., Gomez, J.A. and Boss, J.M. (2006) The human major histocompatibility complex class II HLA-DRB1 and HLA-DQA1 genes are separated by a CTCF-binding enhancer-blocking element. *J Biol Chem*, **281**, 18435-18443.
- Majumder, P., Gomez, J.A., Chadwick, B.P. and Boss, J.M. (2008) The insulator factor CTCF controls MHC class II gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions. *J Exp Med*, **205**, 785-798.
- Marfella, C.G. and Imbalzano, A.N. (2007) The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res*, **618**, 30-40.
- Martinez, S.R. and Miranda, J.L. (2010) CTCF terminal segments are unstructured. *Protein Sci*, **19**, 1110-1116.
- Memedula, S. and Belmont, A.S. (2003) Sequential recruitment of HAT and SWI/SNF components to condensed chromatin by VP16. *Curr Biol*, **13**, 241-246.

- Meneghini, M.D., Wu, M. and Madhani, H.D. (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, **112**, 725-736.
- Moon, H., Filippova, G., Loukinov, D., Pugacheva, E., Chen, Q., Smith, S.T., Munhall, A., Grewe, B., Bartkuhn, M., Arnold, R., Burke, L.J., Renkawitz-Pohl, R., Ohlsson, R., Zhou, J., Renkawitz, R. and Lobanenkov, V. (2005) CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep*, **6**, 165-170.
- Mukhopadhyay, R., Yu, W., Whitehead, J., Xu, J., Lezcano, M., Pack, S., Kanduri, C., Kanduri, M., Ginja, V., Vostrov, A., Quitschke, W., Chernukhin, I., Klenova, E., Lobanenkov, V. and Ohlsson, R. (2004) The binding sites for the chromatin insulator protein CTCF map to DNA methylation-free domains genome-wide. *Genome Res*, **14**, 1594-1602.
- Mutskov, V.J., Farrell, C.M., Wade, P.A., Wolffe, A.P. and Felsenfeld, G. (2002) The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes Dev*, **16**, 1540-1554.
- Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji, T., Matsuyama, T., Ikura, T., Muramatsu, M. and Ito, T. (2008) Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev*, **22**, 37-49.
- Nativio, R., Wendt, K.S., Ito, Y., Huddleston, J.E., Uribe-Lewis, S., Woodfine, K., Krueger, C., Reik, W., Peters, J.M. and Murrell, A. (2009) Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. *PLoS Genet*, **5**, e1000739.
- Nguyen, P., Bar-Sela, G., Sun, L., Bisht, K.S., Cui, H., Kohn, E., Feinberg, A.P. and Gius, D. (2008a) BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. *Mol Cell Biol*, **28**, 6720-6729.
- Nguyen, P., Cui, H., Bisht, K.S., Sun, L., Patel, K., Lee, R.S., Kugoh, H., Oshimura, M., Feinberg, A.P. and 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**, 5546-5551.
- Ohlsson, R., Renkawitz, R. and Lobanenkov, V. (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet*, **17**, 520-527.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W. and Fraser, P. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*, **36**, 1065-1071.
- Ottaviani, A., Rival-Gervier, S., Boussouar, A., Foerster, A.M., Rondier, D., Sacconi, S., Desnuelle, C., Gilson, E. and Magdinier, F. (2009a) The D4Z4 macrosatellite repeat acts as a CTCF and A-type lamins-dependent insulator in facio-scapulo-humeral dystrophy. *PLoS Genet*, **5**, e1000394.
- Ottaviani, A., Schluth-Bolard, C., Rival-Gervier, S., Boussouar, A., Rondier, D., Foerster, A.M., Morere, J., Bauwens, S., Gazzo, S., Callet-Bauchu, E., Gilson, E. and Magdinier, F. (2009b) Identification of a perinuclear positioning element in human subtelomeres that requires A-type lamins and CTCF. *Embo J*, **28**, 2428-2436.
- Pant, V., Kurukuti, S., Pugacheva, E., Shamsuddin, S., Mariano, P., Renkawitz, R., Klenova, E., Lobanenkov, V. and Ohlsson, R. (2004) Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of de novo methylation upon maternal inheritance. *Mol Cell Biol*, **24**, 3497-3504.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., Cobb, B.S., Yokomori, K., Dillon, N., Aragon, L., Fisher, A.G. and Merkenschlager, M. (2008) Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*, **132**, 422-433.
- Patel, A., Dharmarajan, V. and Cosgrove, M.S. (2008a) Structure of WDR5 bound to mixed lineage leukemia protein-1 peptide. *J Biol Chem*, **283**, 32158-32161.

- Patel, A., Vought, V.E., Dharmarajan, V. and Cosgrove, M.S. (2008b) A conserved arginine-containing motif crucial for the assembly and enzymatic activity of the mixed lineage leukemia protein-1 core complex. *J Biol Chem*, **283**, 32162-32175.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol*, **14**, R546-551.
- 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, D.E., Pelletier, J. and 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**, 4085-4090.
- Pugacheva, E.M., Kwon, Y.W., Hukriede, N.A., Pack, S., Flanagan, P.T., Ahn, J.C., Park, J.A., Choi, K.S., Kim, K.W., Loukinov, D., Dawid, I.B. and Lobanenko, V.V. (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.
- Rasko, J.E., Klenova, E.M., Leon, J., Filippova, G.N., Loukinov, D.I., Vatolin, S., Robinson, A.F., Hu, Y.J., Ulmer, J., Ward, M.D., Pugacheva, E.M., Neiman, P.E., Morse, H.C., 3rd, Collins, S.J. and Lobanenko, V.V. (2001) Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. *Cancer Res*, **61**, 6002-6007.
- Recillas-Targa, F., Pikaart, M.J., Burgess-Beusse, B., Bell, A.C., Litt, M.D., West, A.G., Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6883-6888.
- Renaud, S., Loukinov, D., Bosman, F.T., Lobanenko, V. and Benhattar, J. (2005) CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6850-6860.
- Rubio, E.D., Reiss, D.J., Welcsh, P.L., Disteche, C.M., Filippova, G.N., Baliga, N.S., Aebersold, R., Ranish, J.A. and Krumm, A. (2008) CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 8309-8314.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. and Ptashne, M. (1988) GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**, 563-564.
- Schneider, R. and Grosschedl, R. (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev*, **21**, 3027-3043.
- Schuetz, A., Allali-Hassani, A., Martin, F., Loppnau, P., Vedadi, M., Bochkarev, A., Plotnikov, A.N., Arrowsmith, C.H. and Min, J. (2006) Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5. *Embo J*, **25**, 4245-4252.
- Schulte, A. (2009) Der Cancer-Testis-Faktor BORIS verändert die Chromatin-Konformation. *Diplomarbeit*
- Song, J.J. and Kingston, R.E. (2008) WDR5 interacts with mixed lineage leukemia (MLL) protein via the histone H3-binding pocket. *J Biol Chem*, **283**, 35258-35264.
- Steward, M.M., Lee, J.S., O'Donovan, A., Wyatt, M., Bernstein, B.E. and Shilatifard, A. (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 852-854.
- Suganuma, T., Gutierrez, J.L., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Abmayr, S.M. and Workman, J.L. (2008) ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 364-372.
- Sun, L., Huang, L., Nguyen, P., Bisht, K.S., Bar-Sela, G., Ho, A.S., Bradbury, C.M., Yu, W., Cui, H., Lee, S., Trepel, J.B., Feinberg, A.P. and 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**, 2726-2735.
- Swaminathan, J., Baxter, E.M. and Corces, V.G. (2005) The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of Drosophila heterochromatin. *Genes Dev*, **19**, 65-76.

- Tanimoto, K., Sugiura, A., Omori, A., Felsenfeld, G., Engel, J.D. and Fukamizu, A. (2003) Human beta-globin locus control region HS5 contains CTCF- and developmental stage-dependent enhancer-blocking activity in erythroid cells. *Mol Cell Biol*, **23**, 8946-8952.
- Thompson, B.A., Tremblay, V., Lin, G. and Bochar, D.A. (2008) CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes. *Mol Cell Biol*, **28**, 3894-3904.
- Torrano, V., Chernukhin, I., Docquier, F., D'Arcy, V., Leon, J., Klenova, E. and Delgado, M.D. (2005) CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*, **280**, 28152-28161.
- Torrano, V., Navascues, J., Docquier, F., Zhang, R., Burke, L.J., Chernukhin, I., Farrar, D., Leon, J., Berciano, M.T., Renkawitz, R., Klenova, E., Lafarga, M. and Delgado, M.D. (2006) Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosylation)-dependent mechanism. *J Cell Sci*, **119**, 1746-1759.
- Triezenberg, S.J., Kingsbury, R.C. and McKnight, S.L. (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev*, **2**, 718-729.
- Tumbar, T., Sudlow, G. and Belmont, A.S. (1999) Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol*, **145**, 1341-1354.
- van de Nobelen, S. (2008) Touched by CTCF – Analysis of a Multi-Functional Zinc Finger Protein. *PhD thesis*
- Vatolin, S., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Flanagan, P.T., Custer, M., Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Hong, J.A., Morse, H., 3rd, Schrupp, D.S., Risinger, J.I., Barrett, J.C. and Lobanenko, V.V. (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**, 7751-7762.
- Verschure, P.J., van der Kraan, I., de Leeuw, W., van der Vlag, J., Carpenter, A.E., Belmont, A.S. and van Driel, R. (2005) In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 4552-4564.
- Vostrov, A.A. and Quitschke, W.W. (1997) The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J Biol Chem*, **272**, 33353-33359.
- Vostrov, A.A., Taheny, M.J. and Quitschke, W.W. (2002) A region to the N-terminal side of the CTCF zinc finger domain is essential for activating transcription from the amyloid precursor protein promoter. *J Biol Chem*, **277**, 1619-1627.
- Wang, Y.L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S. and Martinez, E. (2008) Human ATAC is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J Biol Chem*, **283**, 33808-33815.
- Wendt, K.S., 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. and Peters, J.M. (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, **451**, 796-801.
- West, A.G., Huang, S., Gaszner, M., Litt, M.D. and Felsenfeld, G. (2004) Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell*, **16**, 453-463.
- Weth, O., Weth, C., Bartkuhn, M., Leers, J., Uhle, F. and Renkawitz, R. (2010) Modular insulators: genome wide search for composite CTCF/thyroid hormone receptor binding sites. *PLoS One*, **5**, e10119.
- Witcher, M. and Emerson, B.M. (2009) Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell*, **34**, 271-284.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H. and Allis, C.D. (2005) WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell*, **121**, 859-872.
- Xiang, Y., Zhu, Z., Han, G., Lin, H., Xu, L. and Chen, C.D. (2007) JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res*, **17**, 850-857.

- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C.J. and et al. (1994) Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol*, **14**, 7013-7024.
- Xu, N., Donohoe, M.E., Silva, S.S. and Lee, J.T. (2007) Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctcf protein. *Nat Genet*, **39**, 1390-1396.
- Ye, Q., Hu, Y.F., Zhong, H., Nye, A.C., Belmont, A.S. and Li, R. (2001) BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol*, **155**, 911-921.
- Yu, W., Ginjala, V., Pant, V., Chernukhin, I., Whitehead, J., Docquier, F., Farrar, D., Tavosidana, G., Mukhopadhyay, R., Kanduri, C., Oshimura, M., Feinberg, A.P., Lobanekov, V., Klenova, E. and Ohlsson, R. (2004) Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat Genet*, **36**, 1105-1110.
- Yusufzai, T.M. and Felsenfeld, G. (2004) The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8620-8624.
- Yusufzai, T.M., Tagami, H., Nakatani, Y. and Felsenfeld, G. (2004) CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell*, **13**, 291-298.
- Zhang, R., Burke, L.J., Rasko, J.E., Lobanekov, V. and Renkawitz, R. (2004) Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody. *Exp Cell Res*, **294**, 86-93.
- Zhao, H. and Dean, A. (2004) An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4903-4919.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ac	acetyliert
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BORIS	Brother of Regulator of Imprinted Sites
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
bw	rückwärts (<i>backward</i>)
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CsCl	Cäsiumchlorid
CTCF	<i>CCCTC binding factor</i>
CTS	CTCF-Bindestelle (<i>CTCF target site</i>)
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
DMPC	Dimethyldicarbonat
DMR	<i>differentially methylated region</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynucleotidtriphosphate
DSHB	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
ES (-Zellen)	Embryonale Stammzellen
et al.	<i>et alii</i> - und andere

F	Phenylalanin
FCS	Fetales Kälberserum
fw	vorwärts (<i>forward</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
i.d.R.	in der Regel
i.e.	<i>id est</i> (nämlich)
ICR	<i>imprinting control region</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
K₂HPO₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
m	Meter
M	mol pro Liter
Mb	Megabasenpaar
me	methyliert
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat
MilliQ	entionisiertes Wasser
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	messenger RNA
N-	Amino-
Na₂HPO₄	di-Natriumhydrogenphosphat
Na₃PO₄	Trinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
p	kurzer Chromosomenarm

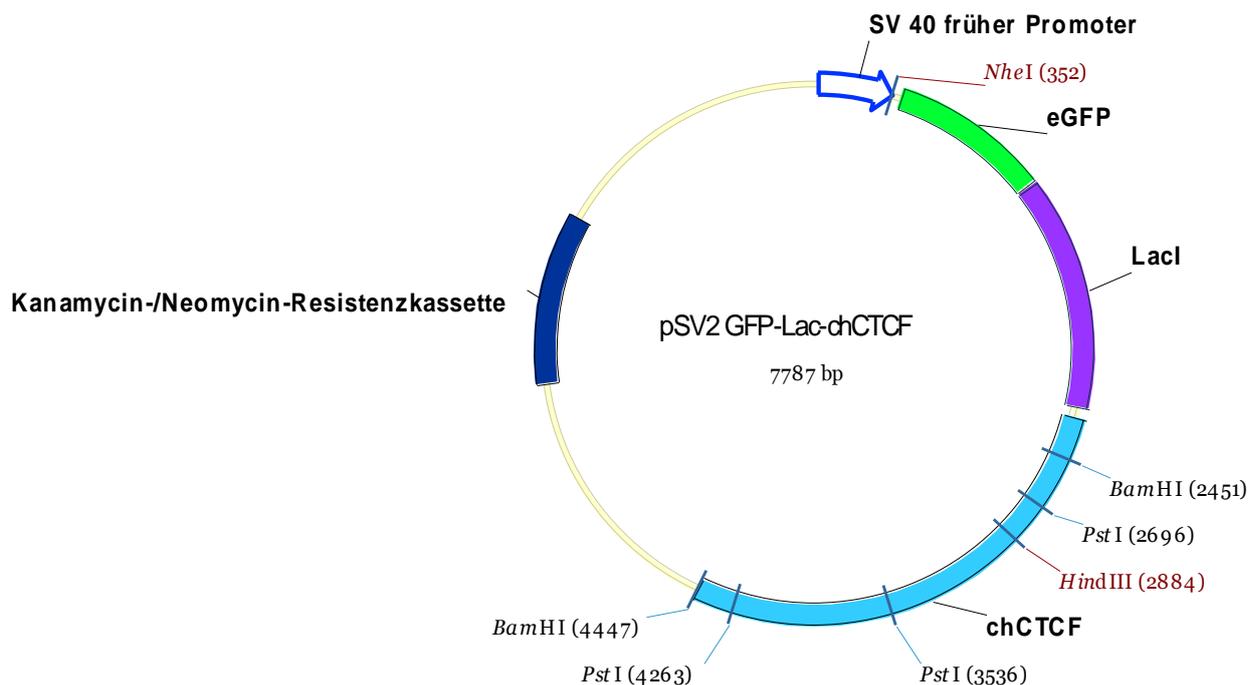
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	langer Chromosomenarm
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Serin
s	<i>sense</i>
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodekylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	small interfering RNA
Strep	Streptomycin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Startort der Transkription (<i>transcriptional start site</i>)
U	Einheit (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
ub	ubiquitinyliert
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumenanteile (<i>volume per volume</i>)
vgl.	vergleiche
VT	Volumenteile
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
w/w	Masseanteile (<i>weight per weight</i>)
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger
α	anti
λ	Wellenlänge

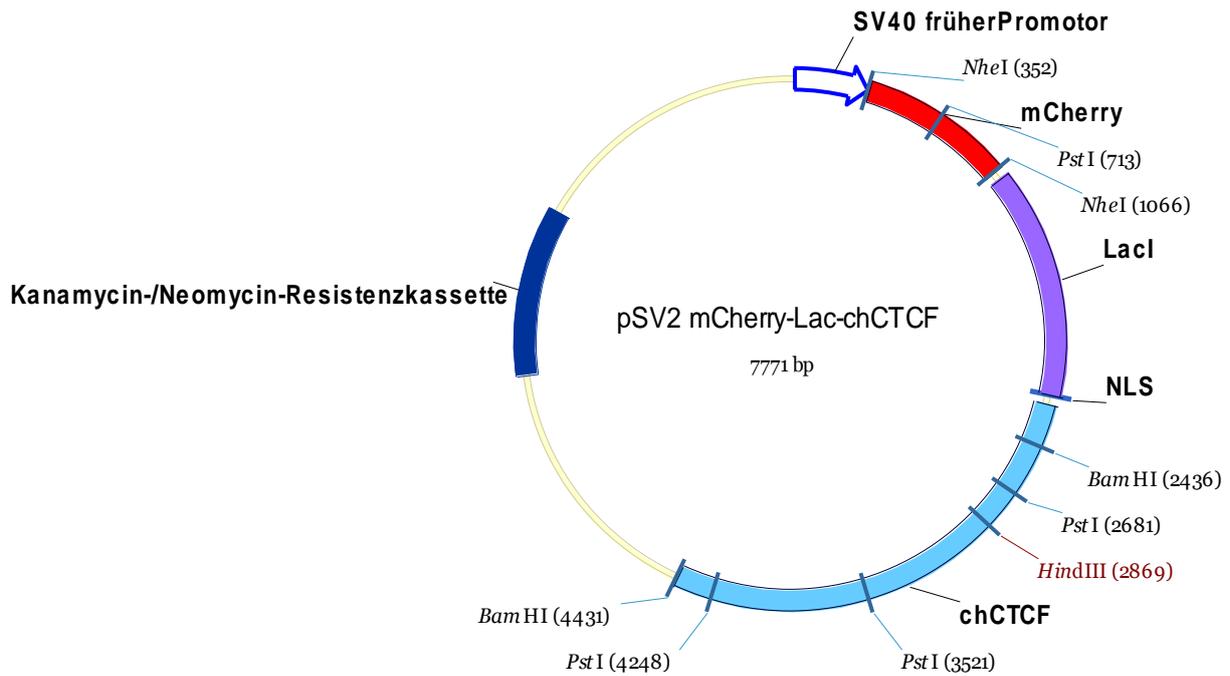
8.2 Klonierung von verwendeten Plasmiden

Aufgrund der hohen Anzahl der in dieser Arbeit klonierten und verwendeten Plasmide, werden Vektorkarten nachfolgend nur exemplarisch aufgeführt. Wurden weitere Plasmide mittels derselben Klonierungsstrategie generiert, werden diese ohne entsprechende Vektorkarte aufgelistet und beschrieben. Alle Vektorkarten sind in elektronischer Form auf dem Server des Genetischen Instituts (Universität Gießen) hinterlegt.

pSV2 GFP-Lac-chCTCF und pSV2 mCherry-Lac-chCTCF

Als Vektorrückgrad wurde pSV2 GFP-LacI NLS neu (M. Rust, Gießen) oder pSV2 mCherry-LacI (M. Rust, Gießen) verwendet. Die Vektoren wurden mit *SmaI* geschnitten. chCTCF-cDNA wurde über *EcoRI* aus dem Vektor pEGFP-C2-CTCF (R. Zhang, Gießen) geschnitten, mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und in das entsprechende Vektorrückgrad eingefügt.

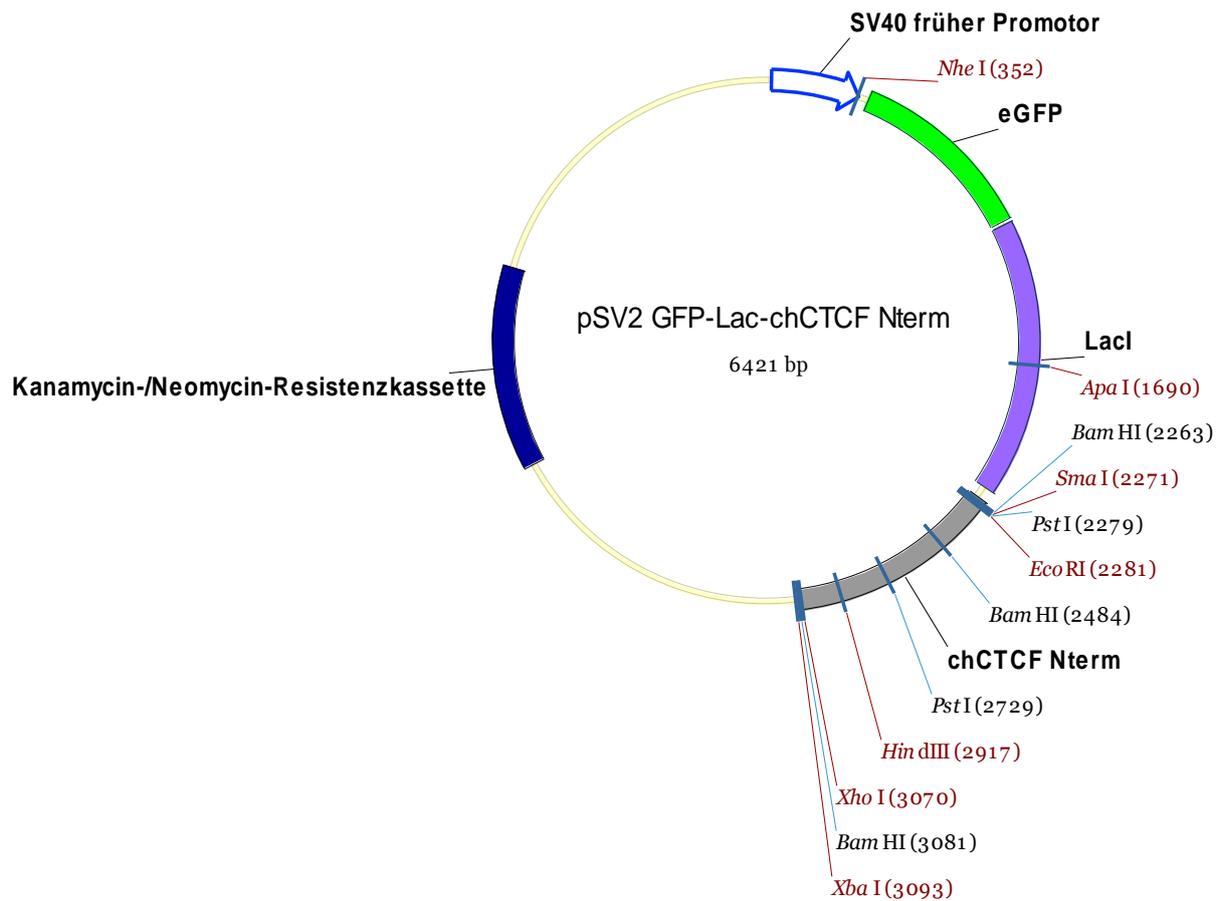




Das vorhandene pSV2 GFP-LacI-Rückgrad (mit *SmaI* geschnitten) wurde für weitere Klonierungen verwendet.

GFP-Lac-CTCF-Deletionskonstrukte

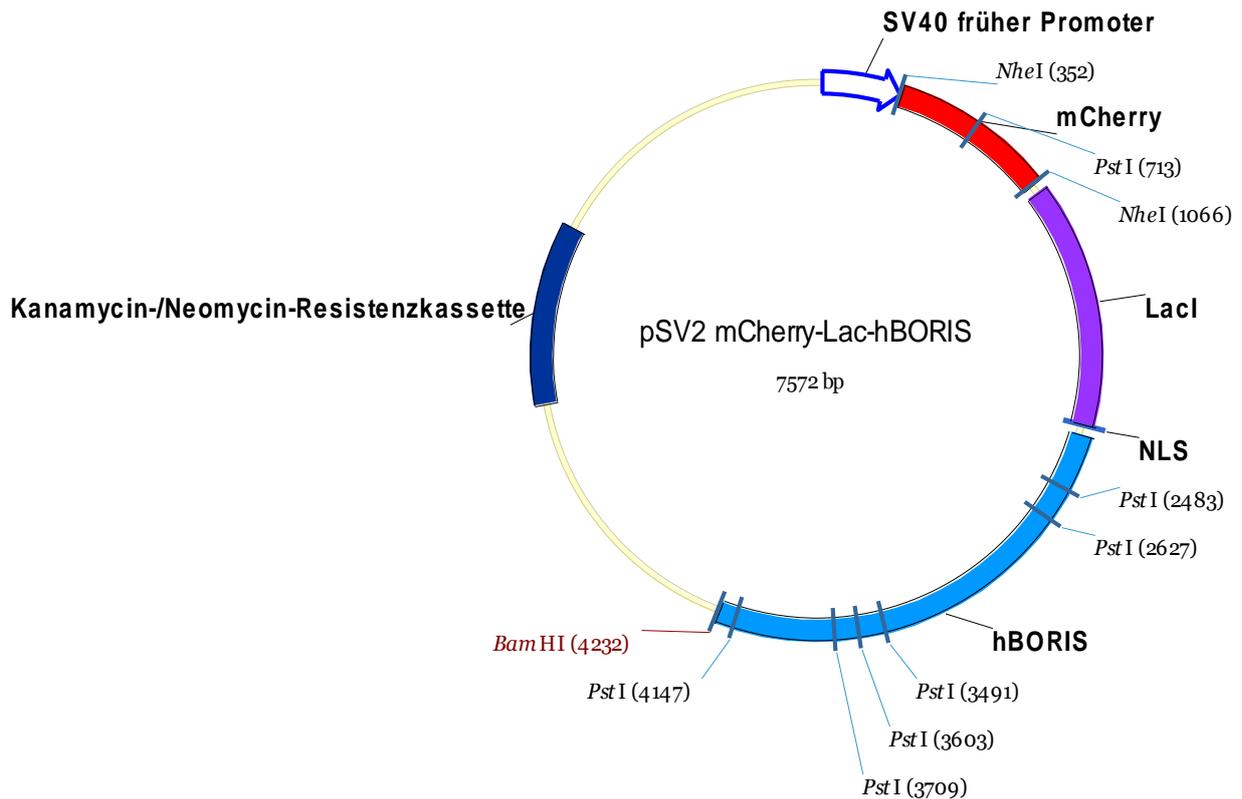
Die Klonierung der verschiedenen CTCF-Deletionkonstrukte in pSV2 GFP-LacI erfolgte über einen Zwischenschritt. chCTCF Nterm, Nterm + ZF, ZF, ZF + Cterm oder Cterm wurde über *EcoRI* und *XhoI* aus pGEX4T1avi (J. Leers, Gießen) geschnitten und in pBSK (ebenfalls mit *EcoRI* und *XhoI* geschnitten) eingefügt. Dann wurden die verschiedenen CTCF-Deletionen über *Apal* und *XbaI* aus pBSK herausgeschnitten, mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und in pSV2 GFP-LacI eingefügt. Exemplarisch ist der Vektor pSV2 GFP-Lac-chCTCF Nterm dargestellt.



Das vorhandene pSV2 mCherry-LacI-Rückgrad (mit *SmaI* geschnitten) ebenfalls wurde für weitere Klonierungen verwendet. Exemplarisch dargestellt ist pSV2 mCherry-LacI-hBORIS.

pSV2 mCherry-Lac-hBORIS

Humane cDNA von BORIS (L. Burke, Gießen) wurde über PCR amplifiziert und in pSV2 mCherry-LacI eingefügt.



pSV2 mCherry-Lac-mBORIS

Murine cDNA von BORIS wurde über *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pCDNA3-mBORIS (S. Dienstbach, Gießen) ausgeschnitten, mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und in pSV2 mCherry-LacI eingefügt.

pSV2 mCherry-Lac-chCTCF RR

chCTCF RR über *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pCDNA3 CTCF RRmut (J. Leers, Gießen) ausgeschnitten, mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und in pSV2 mCherry-LacI eingefügt.

pSV2 mCherry-Lac-chCTCF NT1

Die kodierende Sequenz für die AS 1-67 von chCTCF wurde über *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pGEX4T1avi CTCF 1-67 (J. Leers, Gießen) ausgeschnitten, mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und in pSV2 mCherry-LacI eingefügt.

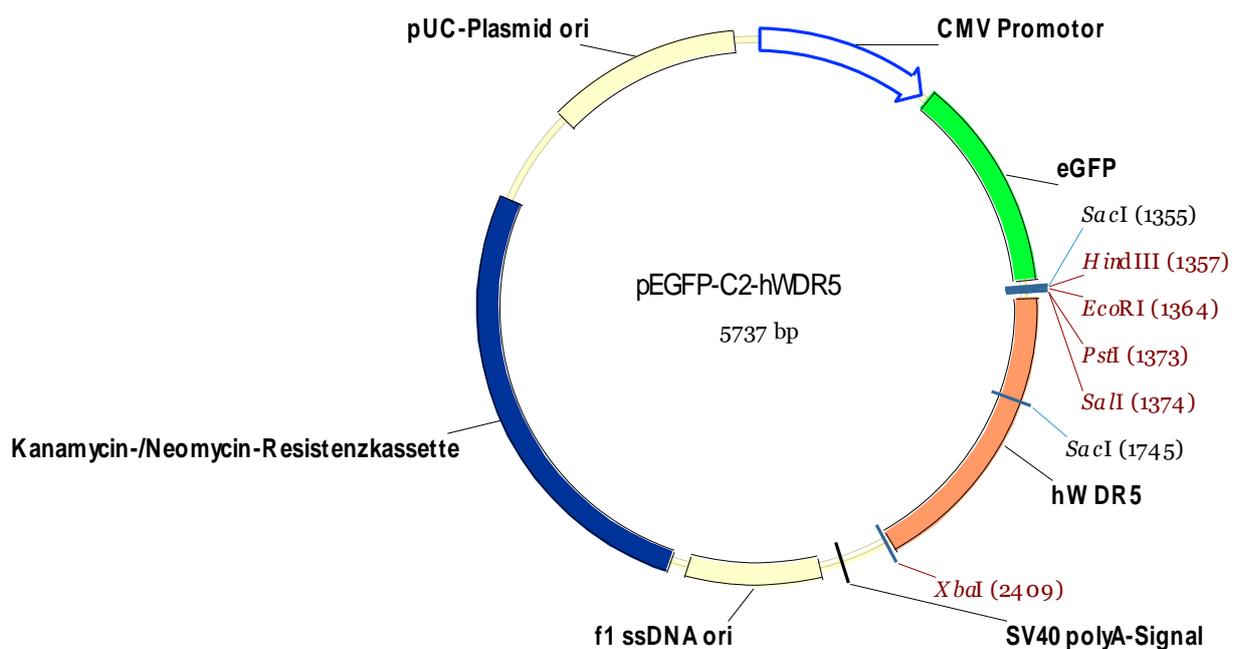
pSV2 mCherry-Lac-hWDR5

humane cDNA von WDR5 (AccNo: BE264849) wurde über PCR unter Verwendung der Primer *Cherry Lac WDR5 fw* und *WDR5 bw neu* amplifiziert und in pSV2 mCherry-LacI eingefügt.

Die Generierung der GFP-Fusionskonstrukte erfolgte in den Vektor pEGFP-C2 von Clontech. Dieser wurde mit *SmaI* geschnitten. Die Herstellung der Inserts erfolgte über PCR. Exemplarisch dargestellt pEGFP-C2-hWDR5 ist.

pEGFP-C2-hWDR5

Die humane cDNA von WDR5 (AccNo: BE264849) wurde unter Verwendung der Primer *humanWDR5_fw* und *humanWDR5_bw* amplifiziert.

pEGFP-C2-mBAF57

Die murine cDNA von BAF57 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Niels Galjart, Rotterdam) wurde unter Verwendung der Primer *BAF57 fw* und *BAF57 bw* amplifiziert.

pEGFP-C2-mJMJD3

Die murine cDNA von JMJD3 (AccNo: CO043144) wurde unter Verwendung der Primer *mouseJmjd3_fw* und *mouseJmjd3_bw* amplifiziert.

pEGFP-C2-hGCN5

Die humane cDNA von GCN5 (AccNo: BC039907) unter Verwendung der Primer *humanGCN5_fw* und *humanGCN5_bw* amplifiziert.

pEGFP-C2-hWDR5 S91K und pEGFP-C2-hWDR5 F133S

Die mutierte humane cDNA von WDR5 wurde unter Verwendung der Primer *humanWDR5_fw* und *WDR5 bw neu* aus pMCGS7-WDR5 S91K oder pMCGS7-WDR5 F133S (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Cosgrove, Syracuse; Patel et al., 2008a) amplifiziert.

8.3 Größe von detektierten PCR-Produkten

Im Folgenden sind die verschiedenen Amplikongrößen verzeichnet, die unter Verwendung der aufgelisteten Primerpaare für RT-Analysen oder Chromatin-IP mittels PCR-Reaktion amplifiziert wurden.

8.3.1 RT-Analyse

Gen	Amplikongröße
hATP8B2_2	213bp
hCTCF	365bp
hEXT2	216bp
hGAPDH	85bp
Humanes β -Aktin	417bp
hWDR5	249bp

8.3.2 Chromatin-IP

Primerpaar	Amplikongröße
ACCS	219bp
AQP10	215bp
A05/06.1	250bp
A1/2	150bp
E01/02	211bp
A3/4	177bp
E3/4	214bp
A5/6	250bp
E5/6	173bp
A7/8	201bp

8.4 Molekulargewichte der detektierten Proteine

Im Folgenden sind die verschiedenen Molekulargewichte verzeichnet, die für die aufgelisteten Proteine mittels Immunoblot detektiert wurden.

Protein	Molekulargewicht
hCTCF	130kDa
hGAPDH	35kDa
Humanes β -Tubulin	55kDa
hWDR5	40kDa

DANKE, Dankeschön, **Danke**, VIELEN DANK, Danke, **Dankeschön**, Vielen Dank, Dank je wel, Grazie, **Merci beaucoup**, Thanks a lot, Danke, *Dankeschön*, **Vielen Dank**, DANKE, Tack så mycket, Gracias, **Dankeschön**, **Vielen Dank**, Thanks a lot, DANKE, *Danke*, **Danke**, DANKESCHÖN, Vielen Dank, **Merci beaucoup**, **Gracias**, **Dank je wel**, *Mille grazie*,
VIELEN DANK

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Art und Weise beigetragen haben.

Dazu gehören natürlich erstmal alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter des Instituts. Einige möchte ich aber besonders erwähnen, die da wären:

- ☺ mein persönlicher *Quatsch Comedy Club*, oder „meine Jungs“ aus 329: Ölle, daß er so geduldig meine Selbstgespräche, Flüche und Verwünschungen ertragen hat; Philipp für die geduldige Beantwortung manch wirklich überflüssiger Computerfrage; Sven für seine tragende Rolle als Blitzableiter und Jörg, daß er mir einfach nicht erlauben wollte, die ganze Sache hinzuschmeißen. Danke.
- ☺ Astrid, Katharina S., Teresa und nicht zu vergessen Grinsebacke Anne, die es leichter gemacht haben, das ganze Testosteron um mich herum zu ertragen!
- ☺ Dorte (das Törtchen), Kimi, und vor allem Katharina, die (leider sehr geschrumpfte, aber dafür mit Familienzuwachs gesegnete!) Hühner-Kaffee-Gang, die so manchen Tag aufhellen konnte. Danke Katharina, dass Du nie müde wirst, uns zu motivieren!
- ☺ Martin H., der Li-La-Laune-Bär. Was würde ich nur ohne Dich machen?
- ☺ Marek, für IGBi und daß sein Licht der Weisheit zum Glück auch manche dunkle Ecke von 329 erhellt hat
- ☺ Leni und Doris, für ihre kleinen Aufmerksamkeiten
- ☺ Tine und Imke, die zwar keine Kollegen mehr, dafür aber jetzt Freundinnen sind
- ☺ Chef für die Möglichkeit, über den Laboralltag hinaus an Tagungen und Weiterbildungen teilzunehmen

I also would like to thank Niels for giving me the opportunity to work in his lab, for good advices and teaching me Nederlands. *Dank je wel!* Special thanks also to always helpful Suzanne.

Danken möchte ich auch meinen Mädels, vor allem Alex für ihre Durchhalteparolen, ohne die es nicht gegangen wäre, sowie Silvia und Jasmin, die weit weg, aber doch da sind.

Vor allem möchte ich aber meiner gesamten Familie danken, die mir Halt gibt, allen voran meine Eltern, die mich immer unterstützt haben, Friedi und Moni, die für mich da sind, Aurelchen und dem kleinen Sonnenschein Julius, die mein Leben bereichern und mir Kraft geben.

Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Gießen, 19.05.2010

Christine Paprotka