

**Institut für Genetik  
Fachbereich für Biologie und Chemie  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Analyse der dreidimensionalen Anordnung  
genomischer Isolatoren in *Drosophila melanogaster***

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

vorgelegt von Melanie Karin Buxa

Gießen, 2016

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann  
1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz  
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Brehm

---

*Für meine Familie*

## Publikationsliste

Gartner, S.M., Rothenbusch, S., **Buxa, M.K.**, Theofel, I., Renkawitz, R., Rathke, C., and Renkawitz-Pohl, R. (2015). The HMG-box-containing proteins tHMG-1 and tHMG-2 interact during the histone-to-protamine transition in *Drosophila* spermatogenesis. *European journal of cell biology* 94, 46-59.

### Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Bohla, D., Herold, M., Panzer, I., **Buxa, M.K.**, Ali, T., Demmers, J., Kruger, M., Scharfe, M., Jarek, M., Bartkuhn, M., *et al.* (2014). A functional insulator screen identifies NURF and dREAM components to be required for enhancer-blocking. *PloS one* 9, e107765.

Maksimenko, O., Bartkuhn, M., Stakhov, V., Herold, M., Zolotarev, N., Jox, T., **Buxa, M.K.**, Kirsch, R., Bonchuk, A., Fedotova, A., *et al.* (2015). Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome research* 25, 89-99.

### Teile dieser Arbeit sind zur Publikation eingereicht:

**Buxa, M.K.**, Slotman, J.A., van Royan, M.E., Houtsmuller, A.B. and Renkawitz, R. (2016). Insulator speckles associated with long-distance chromatin contacts. *Journal of Cell Science*

# Abkürzungsverzeichnis

## Allgemeine Abkürzungen

Hi-C	3C Derivat
3C	<i>Chromosome Conformation Capture</i>
4C	<i>Chromosome Conformation Capture on ChIP</i>
%	Prozent
α	anti oder Alpha
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenosin oder Adenin
A	Ampere (Stromstärke)
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin oder Cytidin
FastAP	Thermosensitive Alkaline Phosphatase
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ctrl	Kontrolle
Da	Dalton [g/Mol]
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	2', 3'-Didesoxynucleosid-5'Triphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol

---

ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FISH-I	Immunfärbung nach Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FHB	FISH Hybridisierungspuffer
g	Erdbeschleunigung [9,81 m/sec <sup>2</sup> ] bei Zentrifugationen
g	Gramm
G	Guanosin oder Guanin
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
Kb	Kilobasenpaare (1.000 Basenpaare)
kD	Kilodalton
Kd	knock-down
KLSM	Konfokale Laserscan-Mikroskopie
l	Liter
lacZ	Gen für β-Galactosidase
LB	Luria-Bertani (Medium)
Lsg	Lösung
m	milli [10 <sup>-3</sup> ]
M	Molar [mol/l]
Mb	Megabasenpaare (10 <sup>6</sup> Basenpaare)
MeOH	Methanol
min	Minuten
MW	Molekulargewicht
μ	mikro [10 <sup>-6</sup> ]
n	nano [10 <sup>-9</sup> ]
NaAc	Natriumacetat
NGS	Normal Goat Serum (normales Ziegenserum)P
NP-40	Nonidet P40
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffer Solution)
PCR	Polymerasekettenreaktion

---

Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pHM	Prä-Hybridisierungsgemisch
PIPES	Piperazin-N, N' bis-[2-ethansulfonsäure]
PolyA	Polyadenylierungssignal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	Structured Illumination Mikroskopy
s. o.	siehe oben
Strep	Streptomycin
T	Thymidin oder Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TB	Teriffic Broth (Medium)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Triton X-100	Oktylphenol-Ethelenglykolether
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	unit, Einheit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt (Spannung)
VT	Volumenteile
(v/v)	Volumenanteile
W	Watt (Leistung)
(w/v)	Masse pro Volumen
(w/w)	Massenanteile
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger oder Zinkfingerdomäne
z.T.	zum Teil
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid

## Den biologischen Kontext betreffende Abkürzungen

<i>Antp</i>	<i>Antennapedia</i>
<i>abd-A</i>	<i>abdominal A</i>
<i>Abd-B</i>	<i>Abdominal B</i>
ANT-C	Antennapedia Komplex
BEAF-32	<i>boundary element associated factor 32</i>
BX-C	Bithorax Komplex
CAF-1/p55	<i>chromatin assembly factor 55 kDa</i>
Chro	<i>Chromator</i>
CP190	<i>Centrosomal protein 190 kDa</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
dCTCF	<i>Drosophila Ortholog zu CTCF</i>
dREAM	<i>Drosophila RBF, E2F and Myb-interacting proteins</i>
GAGA	<i>Trithorax-like protein</i>
<i>gypsy</i>	<i>gypsy-Retrotransposon</i>
ISWI	<i>Imitation SWI</i>
<i>Mcp</i>	<i>miscadastral pigmentation</i>
Mip120	<i>Myb-interacting protein 120</i>
Mip130	<i>Myb-interacting protein 130</i>
Mod(mdg4)	<i>modifier of mdg4</i>
Myb	<i>Myb oncogene-like</i>
NURF	<i>Nucleosome Remodeling Factor</i>
PcG	<i>Polycomb Group</i>
PRE	<i>Polycomb Response Element</i>
<i>scs</i> und <i>scs'</i>	<i>specialized chromatin structures</i>
Su(Hw)	<i>Suppressor of hairy wing</i>
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
ZIPIC	<i>zinc finger protein interacting with CP190</i>
Zw5	<i>zeste-white 5</i>

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationsliste</b> .....	3
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	4
Allgemeine Abkürzungen .....	4
Den biologischen Kontext betreffende Abkürzungen .....	7
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	8
<b>1 Zusammenfassung / Abstract</b> .....	13
1.1 Zusammenfassung.....	13
1.2 Abstract.....	14
<b>2 Einleitung</b> .....	15
2.1 Chromatinstruktur .....	15
2.1.1 Chromosomen Territorien (CT).....	16
2.1.2 Chromatindomänen .....	17
2.2 <i>Long-range</i> Chromatin-Kontakte .....	19
2.2.1 <i>Hox gene kissing</i> und <i>Polycomb bodies</i> .....	19
2.3 Isolatoren .....	22
2.3.1 Isolatorproteine.....	23
2.3.2 Isolator <i>bodies</i> und Isolator <i>speckles</i> .....	24
2.4 Zielsetzung der Arbeit.....	26
<b>3 Material</b> .....	27
3.1 Geräte .....	27
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	28
3.3 Chemikalien .....	29
3.4 Enzyme.....	31
3.5 Komplettsysteme.....	31

---

3.6	Größenstandards.....	32
3.6.1	DNA-Längenstandards .....	32
3.6.2	Protein-Molekulargewichtsmarker .....	33
3.7	Antibiotika .....	33
3.8	Bakterienstämme.....	33
3.9	Fliegenlinien.....	34
3.10	Eukaryotische Zelllinien .....	34
3.11	Antikörper .....	35
3.11.1	Primärantikörper .....	35
3.11.2	Sekundärantikörper .....	37
3.12	Plasmide.....	37
3.13	Oligonukleotide .....	38
3.14	Software .....	38
4	Methoden .....	39
4.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	39
4.1.1	Lagerung von DNA .....	39
4.1.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	39
4.1.3	Präparation von BAC-DNA .....	40
4.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	43
4.1.5	Alkoholische Fällung von DNA.....	44
4.1.6	Sequenzierung von DNA .....	44
4.2	Enzymatische Modifikation von DNA .....	44
4.2.1	Restriktionsspaltung .....	44
4.2.2	Dephosphorylierung .....	45
4.2.3	Ligation.....	45
4.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
4.3	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten .....	46
4.3.1	Agarose-Gel.....	46
4.3.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	47
4.3.3	Direkte Fluoreszenz-Markierung von DNA-Sonden mittels <i>Nick Translation</i> .....	47
4.3.4	Herstellung doppelsträngiger RNA .....	48
4.4	Arbeiten mit Bakterien .....	48

---

4.4.1	Vermehrung und Lagerung .....	48
4.4.2	Herstellung kompetenter Bakterien .....	49
4.4.3	Transformation von Bakterien .....	50
4.5	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	50
4.5.1	Lagerung und Auftauen von eukaryotischen Zellen .....	50
4.5.2	Kultivierung von Zellen .....	51
4.5.3	Einfrieren eukaryotischer Zellen .....	51
4.5.4	DNA Transfektion eukaryotischer Zellen – CaPO <sub>4</sub> -Methode .....	52
4.5.5	dsRNA-Transfektion von S2-Zellen .....	52
4.5.6	Indirekte Immunfluoreszenz an kultivierten eukaryotischen Zelllinien (modifiziert nach Epigenome NoE – protocol PROT08, Chaumeil 2007) .....	53
4.6	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i> .....	53
4.6.1	Fliegenhaltung .....	53
4.7	DNA Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (DNA FISH) .....	54
4.7.1	Multicolor DNA FISH an Imaginalscheiben von <i>Drosophila melanogaster</i> (Epigenome NoE – protocol PROT07, Bantignies 2007) .....	54
4.7.2	Immunfärbung nach DNA FISH (DNA FISH-I) an Imaginalscheiben von <i>Drosophila melanogaster</i> (Epigenome NoE – protocol PROT07, Bantignies 2007) .....	56
4.7.3	DNA FISH an Polytänchromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i> (modifiziert nach Epigenome NoE – protocol PROT04, Grimaud 2007) .....	57
4.7.4	Immunfluoreszenz an fixierten imaginalen Flügelscheiben von <i>Drosophila melanogaster</i> (Klein, 2008) .....	59
4.8	Arbeiten mit Proteinen .....	60
4.8.1	Lagerung von Proteinen .....	60
4.8.2	Herstellung von Kernextrakten aus eukaryotischen Zelllinien (Yusufzai et al., 2004) .....	60
4.8.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	62
4.8.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	62
4.8.5	Western-Blot/ Elektrobplot .....	64
4.8.6	Immundetektion .....	65
4.8.7	Antikörperbefreiung der Membran ( <i>strip</i> ) .....	66
4.9	Analyse von Protein/Protein-Wechselwirkungen .....	66

---

4.9.1	Co-Immünpräzipitation (endogene CoIP/ Flag-CoIP).....	66
4.10	3D-SIM Mikroskopie (Structured Illumination Microscopy) .....	67
4.11	Bioinformatische Analysen .....	68
4.12	Statistik .....	69
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
5.1	Analyse der eindimensionalen Anordnung von Isolatorproteinen .....	70
5.1.1	PITA und ZIPIC Signale sind in Interbanden und an Übergängen von Banden/ Interbanden von <i>Drosophila</i> Polytäanchromosomen lokalisiert .....	71
5.1.2	NURF und dREAM Komponenten binden an CP190 und dCTCF....	73
5.2	Analyse der dreidimensionalen Anordnung von Isolatorproteinen.....	75
5.2.1	Structured Illumination Microscopy (SIM) detektiert Lücken in den hybridisierten BAC-Sonden .....	76
5.2.2	<i>Hox gene kissing</i> ist ein seltenes Ereignis in Interphase-Zellkernen der Flügelimaginalscheibe von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	81
5.2.3	Kein signifikanter Unterschied im Auftreten von <i>Hox gene kissing</i> zwischen Flügelimaginalscheibe und Augenimaginalscheibe .....	83
5.2.4	Isolator <i>speckles</i> und Polycomb <i>bodies</i> sind unterschiedliche Strukturen.....	86
5.2.5	Flag-SUMO hat einen negativen Effekt auf die Bildung von Isolator <i>speckles</i> .....	90
5.2.6	Isolator <i>speckles</i> sind in der direkten Nähe von <i>Hox gene kissing</i> Ereignissen lokalisiert.....	93
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>97</b>
6.1	Analyse der eindimensionalen Anordnung von Isolatorproteinen .....	97
6.1.1	Die Isolatorproteine PITA und ZIPIC binden an Interbanden und Übergängen zwischen Banden/ Interbanden.....	97
6.1.2	CP190 und dCTCF zeigen Protein-Protein-Interaktionen mit Komponenten des NURF und dREAM Komplexes .....	99

---

<b>6.2</b>	<b>Analyse der dreidimensionale Anordnung von Isolatorproteinen .....</b>	<b>101</b>
6.2.1	<i>Hox gene kissing</i> ist ein seltenes Ereignis in Flügelimaginalscheiben von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	104
6.2.2	Funktionelle Unterschiede zwischen Polycomb Group Proteinen und Isolatorproteinen in <i>long-range</i> Interaktionen .....	106
6.2.3	Isolator <i>speckles</i> sind mit <i>long-distance</i> Chromatin-Kontakten assoziiert .....	110
<b>6.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>127</b>
8.1	Genomische Position der verwendeten Sonden .....	127
8.2	DNA-Konstrukte.....	128
8.3	Oligonukleotide .....	133
8.4	Zweiseitiger Mann-Whitney-U Test .....	135
8.5	Vergleich der Berechnungen der <i>Hox gene kissing</i> Häufigkeiten mit und ohne z-Ebene.....	136
8.6	Distanzmessungen.....	136
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>139</b>

# 1 Zusammenfassung / Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Kürzlich wurden die zwei Isolatorproteine PITA und ZIPIC neu identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit lieferten Immunfluoreszenz-Analysen von *Drosophila* Polytänchromosomen eine visuelle Darstellung der genomweiten Verteilung von PITA und ZIPIC an typischen Isolatorpositionen, den Banden/ Interbanden-Grenzen sowie eine Protein-Protein-Interaktionen mit CP190. Die Befunde der Kolo-kalisation der Isolatorproteine mit CP190 belegen, dass CP190 eine gemeinsame Funktion aller Isolatorproteine vermittelt. Diese Kolo-kalisation wirkt sich auf die Chromatin-Konformation aus. Um den möglichen molekularen Mechanismus hinter dieser Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden Funktionstest (RNAi Screen) und massenspektrometrische Analysen durchgeführt (Bohla et al., 2014). Die in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunpräzipitationen verifizierten diese zuvor erzielten Ergebnisse, dass Komponenten des NURF und dREAM Komplexes Interaktionspartner von dCTCF und CP190 sind.

Isolatorproteinen wird die architektonische Funktion zugeschrieben, dass sie Chromatin-Chromatin-Interaktionen über große Distanzen vermitteln. Sie kolo-kalisieren innerhalb des Zellkerns und bilden Strukturen, die als Isolator *bodies* bezeichnet werden. Isolator *bodies* sind nicht an Isolation (und auch nicht an Chromatin-Chromatin-Interaktionen) beteiligt. Im Gegensatz dazu ist für die filigraneren Isolator *speckles* nicht bekannt, inwieweit diese am Phänomen der Isolation involviert sind. Für Polycomb *bodies* wird postuliert, dass sie *long-distance* Interaktionen der *Hox*-Gencluster Antennapedia Komplex (ANT-C) und Bithorax Komplex (BX-C) von *Drosophila* vermitteln. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eher Isolatorproteine als PcG-Komplexe an der *long-range* Organisation von PcG regulierten Genen innerhalb des Zellkerns mitwirken.

In der vorliegenden Arbeit wurden hochauflösende 3-dimensionale Analysen von Isolatorproteinen durchgeführt, welche dCTCF Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* als unterschiedliche Strukturen innerhalb der Interphase-Zellkerne von *Drosophila melanogaster* identifizieren konnten. Diese Strukturen unterscheiden sich sowohl in ihrer Anzahl als auch in ihrer räumlichen Anordnung.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit lag darin, den Abstand von Isolator *speckles* relativ zu *long-range* Interaktionen zu messen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Isolator *speckles* und *long-range* Chromatin-Interaktion zu finden. Unter Verwendung von DNA FISH und Sonden gegen die *Hox*-Gencluster konnten sowohl *Hox gene kissing* Ereignisse identifiziert werden, als auch, durch eine Kombination von DNA FISH und dCTCF-Immunfluoreszenz, die Distanz zwischen dCTCF *speckles* und dem Sondenpaar bestimmt werden. Die Auswertungen der Structured Illumination Microscopy (SIM) Aufnahmen ergaben, dass die Distanzen zwischen dCTCF *speckles* und *kissing* Sondenpaaren signifikant kürzer waren als in nicht-interagierenden Fällen, was dafür spricht, dass ein Zusammenhang zwischen Isolator *speckles* und *long-range* Chromatin-Interaktionen besteht. Man kann deshalb annehmen, dass Isolator *speckles* mit *long-distance* Chromatin-Kontakten assoziiert sind.

## 1.2 Abstract

Recently, the two insulator proteins PITA and ZIPIC have been identified. In this work, immunofluorescence analysis of *Drosophila* polytene chromosomes provided a visual representation of the genome-wide distribution of PITA and ZIPIC at typical insulator positions, borders between bands and interbands, as well as protein-protein-interactions with CP190. The findings of co-localization between the insulator proteins and CP190 demonstrate that CP190 mediates a common function of all insulator proteins. This co-localization affects the chromatin conformation. To analyze a potential molecular mechanism behind this observation, RNAi screen and analysis by mass spectrometry were performed (Bohla et al., 2014). In the present work, these results could be validated to the effect that components of the NURF and dREAM complexes are interaction partners of dCTCF and CP190.

Specific architectural proteins mediate long-range chromatin-chromatin-interactions. This architectural function is attributed to insulator proteins which are co-localize within the nucleus and form structures called insulator bodies.

Insulator proteins have been shown to aggregate into insulator bodies, which are large structures not involved in insulation. In contrast, the more diffusely distributed insulator speckles have not been analyzed in this respect. It has been suggested that Polycomb bodies mediate long-distance interactions between the two *Hox* gene cluster Antennapedia complex (ANT-C) and Bithorax complex (BX-C). Furthermore, insulator binding proteins have been shown to drive binding sites for Polycomb group proteins into Polycomb bodies.

In the respect work, high-resolution analysis revealed that insulator speckles, marked by the insulator protein dCTCF, and Polycomb bodies are distinct structures. These structures differ in number and three-dimensional location within the nucleus. To identify a potential association between insulator speckles and long-range chromatin interaction, another part of this work was based on the distance measurement between insulator speckles relative to long-range Interactions.

By using FISH probes to identify long-range interaction (kissing) of the *Hox* gene clusters Antennapedia complex (ANT-C) and Bithorax complex (BX-C), the distance of the site of long-range chromatin interaction to the closest insulator speckle was measured. This distance was significantly shorter in the case of a kissing event, suggesting that the location of insulator speckles is shaped by the long-distance interaction. The results of the present work lead to the conclusion that insulator speckles are associated with long-distance chromatin contacts.

## 2 Einleitung

### 2.1 Chromatinstruktur

Die physikalische Organisation eukaryotischer Chromosomen innerhalb des Zellkerns ist entscheidend mit der Transkription und der Replikation der genetischen Information verflochten. Eukaryotische Zellen verpacken ihre genomische DNA, die bis zu zwei Meter lang sein kann, durch hierarchische Organisation in winzige, nur wenige  $\mu\text{m}$  große Zellkerne (Felsenfeld and Groudine, 2003). Die Verpackung wird hauptsächlich dadurch erreicht, dass die genomische DNA durch Histone in Chromatin organisiert wird. Die grundlegende Wiederholungseinheit von Chromatin ist das Nukleosom, das aus dem Kernpartikel und Linker-DNA besteht. Das Nukleosomen-Kernpartikel (NCP) besteht aus 146/147 bp DNA, die um ein Oktamer von Histonproteinen gewickelt ist. Diese Oktamere besteht aus zwei Histon H3-H4-Dimeren und zwei Histon H2A-H2B-Dimeren, welche durch 10-80 bp Linker-DNA voneinander getrennt werden (Übersichtsartikel Felsenfeld and Groudine (2003)). Das NCP ist mit dem benachbarten NCP durch ein Segment von Linker-DNA verbunden um eine 10 nm Chromatinfaser zu bilden, die „Perlen auf einer Schnur“ ähneln (Olins and Olins, 1974). Diese nukleosomale Anordnung wird weiter durch Linker-Histone (H1 und H5) in eine kondensiertere 30 nm Chromatinfaser organisiert, die üblicherweise als Sekundärstruktur des Chromatins angesehen wird (Li and Reinberg, 2011).

Basierend auf dem Grad der Verdichtung kann Chromatin in Euchromatin und Heterochromatin eingeteilt werden. Euchromatin ist üblicherweise reich an Genen, wenig kondensiert und mit aktiver Transkription assoziiert, wohingegen Heterochromatin allgemein gen-arm, stark kondensiert und transkriptionell inert ist. Die Chromatinstruktur wird sowohl durch Chromatin-*Remodelling* Aktivität als auch durch Modifikationen von Histonen und der DNA reguliert (Zentner and Henikoff, 2013). Mit Heterochromatin assoziierte Nukleosomen sind generell frei von Acetylierung und oft an Histon H3 Lysin 9 methyliert (H3K9me) (Nakayama et al., 2001; Rea et al., 2000; Suka et al., 2001). Für Heterochromatin konnte gezeigt werden, dass Gene, die aus ihrer ursprünglichen Chromatin-Umgebung in Heterochromatin integriert werden (durch Neuordnung oder Translokation) einen veränderten Phänotyp zeigen. Diese Positionseffekt-Variegation (PEV) weist darauf hin, dass solch eine Neuordnung

eine heterochromatische Struktur des neu positionierten Genes bewirkt (Übersichtsartikel Elgin and Reuter (2013)).

Während der Zellteilung wird das Genom in leicht zu erkennende kondensierte mitotische Chromosomen organisiert, die jedoch nicht während der Interphase des Zellzyklus aufrecht erhalten bleiben. In der Interphase liegt das Genom organisiert in separaten Kerndomänen vor, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

### 2.1.1 Chromosomen Territorien (CT)

Während der Mitose nehmen Chromosomen eine sehr kompakte Gestalt an, die nach dem Beenden der Mitose aufgelockert wird. DNA/Chromatin liegt in der Interphase zwar stark dekondensiert, aber trotzdem nicht zufällig lokalisiert vor. Vielmehr kommen Chromosomen in definierten Bereichen zum Liegen, wahrscheinlich durch *cis*-Interaktionen innerhalb der Chromosomen definiert. Das *Chromosome Painting*, die Visualisierung von individuellen Chromosomen oder Chromosomendomänen durch DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (DNA FISH), führte zu der Erkenntnis, dass Interphase-Chromosomen in bestimmten Bereichen im Zellkern, den sogenannten Chromosomen-Territorien (*chromosome territories*, CT) angeordnet sind (Bolzer et al., 2005; Cremer and Cremer, 2001). 3C-basierte Techniken konnten im Jahre 2009 das Vorhandensein von CTs auch biochemisch bestätigen (Lieberman-Aiden et al., 2009). Diese Form der Kernarchitektur ist konserviert und findet sich in Hefe, *Drosophila* bis hin zu Säugetieren (Berger et al., 2008; Bolzer et al., 2005; Sexton et al., 2012).

Die Position der Gene innerhalb der CTs hat Auswirkung auf deren Expression. Es konnte gezeigt werden, dass transkriptionell aktive Gene in der Peripherie der CTs lokalisiert sind, wohingegen nicht-kodierende Regionen im Inneren der CTs liegen (Kurz et al., 1996; Mahy et al., 2002; Scheuermann et al., 2004). Die Lage der aktiven Gene in der Peripherie ermöglicht eine höhere Mobilität und eine Positionierung der Gene und regulatorischer Bereiche, um diese besser zugänglich für die Transkription zu machen (Bornfleth et al., 1999; Verschure et al., 1999).

In vielen Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass aktiv exprimierte Gene aus deren CTs in Schleifen hervorragen, aber sich innerhalb ihrer CTs befinden, wenn keine Expression stattfindet (Galiova et al., 2004; Volpi et al., 2000; Williams et al., 2002).

## 2.1.2 Chromatindomänen

Die chromosomalen Territorien sind nicht zufällig im Zellkern angeordnet. In Vertebraten neigen gen-reiche und transkriptionell aktive DNA-Abschnitte dazu, sich zentral im Kern zu positionieren, wohingegen heterochromatische Regionen, die gen-arm, wenig transkribiert und spät repliziert werden, sich in der unmittelbaren Nähe der Peripherie des Kerns befinden (Croft et al., 1999; Scheuermann et al., 2004).

Die Fragmente des Genoms, die in der Peripherie mit der Kernlamina interagieren, werden als *lamin-associated domains* (LADs) bezeichnet. In *Drosophila* umfassen LADs üblicherweise 7 bis 700 kb und beinhalten im Durchschnitt sieben Gene pro LAD (van Bemmelen et al., 2010). In ähnlicher Weise sind Säugetier LADs große und gen-arme Domänen, die 0,1 bis 10 Mb umfassen und rund 40 % des Genoms einer Zellpopulation ausmachen (Guelen et al., 2008; Peric-Hupkes et al., 2010).

In *Drosophila* interagieren rund 500 Gene, die eine schwache Expression zeigen, mit Lamin (Pickersgill et al., 2006). So konnte mittels DNA FISH Experimenten gezeigt werden, dass LADs in der Fliege hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, in der Kernperipherie lokalisiert sind (Pickersgill et al., 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass die nukleare Peripherie, die aus der inneren Kernmembran und sich dort befindenden Proteinen besteht, als ein reprimierendes Kompartiment wirkt (Kind and van Steensel, 2010).

Neben den LADs existiert, neben einer Reihe weiterer, noch eine Organisationsebene des Chromatins, die in Eukaryonten als *Topologically Associated Domains* (TADs) (Nora et al., 2012) bezeichnet wird und auch als *topological domains* (Dixon et al., 2012) und *physical domains* (Hou et al., 2012; Sexton et al., 2012) bekannt ist. TADs können als lineare Chromatin-Einheiten definiert werden, die sich als getrennte dreidimensionale Strukturen falten. Einzelne Chromosomen sind in TADs unterteilt, die eine durchschnittliche Größe von 880 kb in Mäusen bzw. 107 kb in *Drosophila* besitzen und durch Regionen getrennt werden, die als TAD *borders* bezeichnet werden. Dieser Übergang zweier TADs ist frei von Interaktionen (Dixon et al., 2012; Hou et al., 2012; Sofueva et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass genomische Bereiche innerhalb einer TAD häufiger im dreidimensionalen Raum interagieren als Bereiche zwischen benachbarten TADs, was dafür spricht, dass TADs Regionen repräsentieren, die interagierendes Chromatin zeigen (Nora et al., 2012). TAD *borders* sind an aktiv

transkribierenden Genen, insbesondere *Housekeeping* Genen, und Bindestellen von Isolatorproteinen angereichert (Dixon et al., 2012; Hou et al., 2012; Lieberman-Aiden et al., 2009; Nora et al., 2012; Sexton et al., 2012). Generell scheint es nicht so zu sein, dass TAD *borders* Regionen mit unterschiedlichen Chromatin-Umgebungen voneinander trennen. So beinhaltet ein einzelnes TAD mehrere Chromatin-Typen (Hou et al., 2012; Nora et al., 2012).

Es gibt Hinweise darauf, dass TADs die Kompartimentierung von regulatorischen Elementen darstellt. So resultiert die Depletion von *Xist-Tsix* TAD *borders* in neuen Chromatin-Interaktionen, die zu einer teilweisen Verschmelzen der zwei benachbarten TADs und einer veränderten Genexpression führt (Lupianez et al., 2015; Nora et al., 2012). Darüber hinaus konnten ektopische Interaktionen zwischen Enhancern und Genen außerhalb ihrer normalen TADs mittels 4C-Analyse detektiert werden, was mit dem aberranten Expressionsprofil übereinstimmt (Lupianez et al., 2015). Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass sich diese ektopischen Interaktionen nicht über das nächste proximale TAD *border* ausbreitet, was dafür spricht, dass TAD Strukturen teilweise zur Genregulation beitragen (Lupianez et al., 2015; Nora et al., 2012). Diese Daten legen nahe, dass Gene innerhalb einer TAD eine teilweise gemeinsame regulatorische Umgebung haben. Hinweise hierfür geben Genexpressionsanalysen, die zeigten, dass die koordinierte Genexpression am besten korreliert, wenn die analysierten Gene sich innerhalb eines TADs befinden (Arner et al., 2015; Nora et al., 2012).

In den beschriebenen Studien wurden TADs durch 3C-Technologien mit anschließender DNA Sequenzierung entdeckt und analysiert. Ein direkter Bezug auf Chromosomen-Kondensation konnte so jedoch nicht gezogen werden. Eine hierarchische Beziehung zwischen TADs wurde vielmehr durch Rechenmodelle postuliert (Gibcus and Dekker, 2013; Sexton et al., 2012). Gerade kürzlich konnte in zwei Studien gezeigt werden, dass TADs und die Regionen zwischen TADs Banden und Interbanden von *Drosophila* Polytänchromosomen entsprechen (Eagen et al., 2015; Ulianov et al., 2016). Durch diese direkte Visualisierung von TADs kann die Beziehung zwischen TAD und Kompartiment, sowie die strukturelle Korrelation von Chromatin-Kondensation im Interphase-Zellkern abgeleitet werden (Eagen et al., 2015).

## 2.2 Long-range Chromatin-Kontakte

*Long-range* Chromatin-Kontakte sind dreidimensionale Chromatin-Strukturen, die Interaktionen entfernt liegender chromosomaler Domänen darstellen. Diese spezifischen Interaktionen beinhalten biophysikalische und biochemische Eigenschaften, wie etwa Protein-Protein-Interaktionen (Fullwood et al., 2009). So konnte in embryonalen Mäusestammzellen (ES-Zellen) gezeigt werden, dass das Isolatorprotein CTCF das Genom in verschiedene Chromatindomänen und sub-nukleare Bereiche formt, die spezifische epigenetische Zustände und eine Vielzahl an transkriptionellen Aktivitäten aufweisen (Handoko et al., 2011).

Darüber hinaus kommen diese *long-range* Kontakte häufig zwischen ko-exprimierten Genen vor. Es wird postuliert, dass diese ko-regulierten Gene sich bevorzugt in *transcription factories* gruppieren, die eine starke Transkription ermöglichen (Schoenfelder et al., 2010). Ferner können zell-spezifische *long-range* DNA-Kontakte eine vielfältige Genexpression bewirken. Es wird angenommen, dass regulatorische DNA Elemente nach bevorzugten Interaktionspartnern suchen, die im Falle der *Locus Control Region* (LCR), Gene sind, die durch gemeinsame Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden (Noordermeer et al., 2011).

Eine gut untersuchte *long-range* Interaktion zwischen ko-regulierten Genen ist das sogenannte *Hox gene kissing* in *Drosophila melanogaster*.

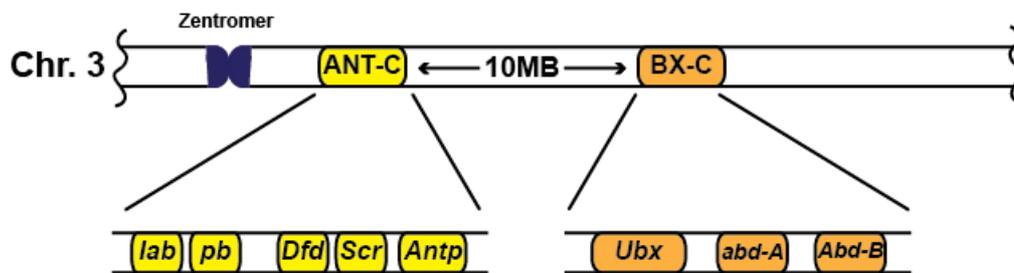
### 2.2.1 Hox gene kissing und Polycomb bodies

*Hox* Gene kodieren für eine Familie von homeotischen Transkriptionsfaktoren, die bestimmte entwicklungsbiologische Programme entlang der anterioren-posterioren Achse von Tieren auslösen. Die Reihenfolge, in der die individuellen *Hox* Gene entlang der Kopf-zu-Schwanz-Achse exprimiert werden, spiegelt auch die physikalische Reihenfolge der Gene und der deren Expression kontrollierenden regulatorische Bereiche innerhalb des *Hox*-Genclusters wider, welches generell als räumliche Kolinearität bezeichnet wird (Akam, 1987; Harding et al., 1985).

*Hox* Gene wurden zuerst in *Drosophila* entdeckt (Bridges und Morgan, 1923), wo sie in zwei separaten Clustern angeordnet sind: dem Antennapedia und dem Bithorax

Komplex (ANT-C bzw. BX-C) (Kaufman et al., 1980; Lewis, 1978; Lewis et al., 1980). Die zwei Komplexe befinden sich auf dem rechten Arm von Chromosom 3 (3R) und sind durch etwa 10 Mb voneinander getrennt.

Entwicklungsbiologisch kontrolliert der Antennapedia Komplex die Ausbildung des Kopfes und des anterioren Thoraxes. Der Komplex beinhaltet die Gene *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* und *Antp* (Kaufman et al., 1990). Der Bithorax Komplex dagegen kontrolliert durch die regulierte Expression der drei homeotischen Gene *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abd-A)* und *Abdominal B (Abd-B)* (Duncan, 1987; Lewis et al., 2003) die Identität jener Segmente, die für den posterioren Thorax und den Abdomen der Fliege verantwortlich sind.



**Abb. 1 Schematische Darstellung des anterioren und posterioren *Hox*-Genclusters in *D. melanogaster*.** Die homeotischen Gene sind in zwei *Hox*-Gencluster angeordnet, die auf dem rechten Arm von Chromosom 3 lokalisiert sind und etwa 10 Mb voneinander getrennt vorliegen. Der Antennapedia Komplex (ANT-C) erstreckt sich über 400 kb und beinhaltet fünf *Hox*-Gene (*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr*, und *Antp*), die den Kopf und Teile des anterioren Thorax festlegen (Kaufman et al., 1990). Der Bithorax Komplex hingegen erstreckt sich über 350 kb und beinhaltet drei *Hox*-Gene (*Ubx*, *abd-A* und *Abd-B*), die an der Entwicklung des posterioren Thorax und Abdomens involviert sind (Duncan, 1987; Lewis et al., 2003).

Die drei *Hox*-Gene des BX-C werden durch neun regulatorische Domänen kontrolliert (Maeda and Karch, 2006), die durch die Bindung des Isolatorproteins dCTCF an deren Grenzen gekennzeichnet sind (Holohan et al., 2007; Mohan et al., 2007). Die Depletion dieser Isolatoren resultiert in einem Verschieben der Segmentidentität dahingehend, dass benachbarte Segmente den identischen Phänotyp zeigen (Übersichtsartikel Maeda and Karch (2006)).

Die epigenetische Regulation dieser Gene ist essentiell für das korrekte Ablaufen der Entwicklungsprogramme des Embryos. Die homeotischen Expressionsmuster werden durch die Wirkung von Polycomb Group (PcG) Proteinen, welche einen reprimierenden Status aufrechterhalten, und trithorax Group (trxG) Proteine, welche den aktiven Zustand begünstigen, erhalten (Pirrotta, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass PcG und trxG Proteine multimere Komplexe formen, die nicht zur Initiation der Regulation der *Hox*-Gene benötigt werden, sondern eher zur Aufrechterhaltung des Expressionsstatus, nachdem die initial benötigten Transkriptionsregulatoren des Embryos nicht mehr vorhanden sind. Nachfolgende Analysen führten zu der Identifikation von DNA regulatorischen Elementen, die PcG und trxG Faktoren an Chromatin rekrutieren. Diese Elemente, PcG and trxG response elements (PREs bzw. TREs), vermitteln eine epigenetische Vererbung von aktiven und reprimierten Chromatin-Zuständen während der Entwicklung (Moehrle and Paro, 1994).

Für PcG Proteine ist bekannt, dass deren Aktivität eng mit der Modulation des Chromatin-Status verknüpft ist. Diese Modulation ist gewöhnlich nicht auf spezifische Gene beschränkt, sondern betrifft eher große H3K27me3-Domänen (Schuettengruber et al., 2007; Schwartz et al., 2006).

Es gibt Hinweise darauf, dass die weit voneinander getrennten liegenden *Hox*-Gencluster und andere PcG regulierten Gene durch PcG Proteine in direkten Kontakt treten (Bantignies et al., 2011; Grimaud et al., 2006). Im dreidimensionalen Raum kolokalisieren *Antp* (ANT-C) und *Abd-B/Ubx* (BX-C) durch die Assoziation mit PcG Proteinen. Diese Kolokalisation wird als *Hox gene kissing* bezeichnet (Bantignies et al., 2011). Dieses Phänomen findet man jedoch nur in Geweben, in denen beide Komplexe reprimiert vorliegen und ist abhängig von PcG Proteinen. 3D DNA FISH Analysen zeigten eine Kolokalisation (*kissing*) der Komplexe in 15 – 28 % aller Zellkerne, wenn die Gene der Komplexe durch PcG Proteine reprimiert vorlagen, verglichen zu 5 – 15 % bei nur einem reprimierten Komplex oder Polyclomb-insuffizienten Fliegen. Diese Beobachtung konnten in verschiedenen Veröffentlichungen durch Chromosome Conformation Capture (3C)-basierte Techniken wie Circularized Chromosome Conformation Capture (4C) und das 3C-Derivat Hi-C bestätigt werden (Bantignies et al., 2011; Lanzaolo et al., 2007; Sexton et al., 2012).

Eine Kombination von DNA FISH mit Polycomb-Immunfärbung zeigte, dass das *Hox gene kissing* in 80 – 85 % der Fälle mit großen nuklearen Strukturen, den PcG *bodies*

assoziiert ist. Polycomb *bodies* sind nach Polycomb-Immunfärbung mikroskopisch sichtbare Strukturen innerhalb des Zellkerns, die sich durch hohe lokale Konzentrationen an Polycomb Proteinen auszeichnen (Dietzel et al., 1999; Ficz et al., 2005; Hernandez-Munoz et al., 2005; Saurin et al., 1998). Die Anzahl und Größe dieser Strukturen variiert in verschiedenen Zelltypen. In *Drosophila* z.B. steigt die Anzahl an Polycomb *bodies* während der Embryogenese auf über 100 an (Buchenau et al., 1998), wohingegen die Anzahl in larvalen Imaginalscheiben um eine Magnitude kleiner ist (Ficz et al., 2005). Das PcG-vermittelte Gen-*Silencing* findet innerhalb dieser Strukturen statt (Grimaud et al., 2006). Es gibt zwei Hypothesen, wie es zur Bildung von Polycomb *bodies* kommen könnte: 1) die Bindung von PcG Proteinen an ihren Chromatin-Bindestellen induziert die Bildung von Polycomb *bodies* oder 2) Polycomb *bodies* sind spezialisierte Kernstrukturen, in denen PcG regulierte Gene zusammen kommen, um stillgelegt zu werden (Cheutin and Cavalli, 2012).

Wie bereits beschrieben, wird postuliert, dass Polycomb *bodies* in *long-range* Interaktionen der *Hox*-Gencluster ANT-C und BX-C involviert sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eher Isolatorproteine als PcG-Komplexe an der *long-range* Organisation von PcG regulierten Genen innerhalb des Zellkerns beteiligt sind (Li et al., 2011). In *Drosophila* ist die Assoziation der zwei miteinander interagierenden PcG-Bindestellen, *Mcp* und *Fab-7*, unabhängig von PREs, die sie enthalten. Diese Interaktion ist abhängig von der Isolator-Aktivität innerhalb dieser Elemente. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von PcG-regulierten Genen mit verschiedenen Kernstrukturen von dem Vorhandensein von Isolatorproteinen abhängig ist (Li et al., 2013). Sind zwei Gene reprimiert, so kolokalisieren sie in Polycomb *bodies*, sind sie jedoch aktiv, so werden sie mit Hilfe von Trithorax und dem Isolatorprotein dCTCF zu *transcription factories* gebracht (Li et al., 2013).

## 2.3 Isolatoren

Isolatoren sind regulatorische DNA-Sequenzen, die funktionell unterschiedliche Chromatindomänen daran hindern, miteinander in Wechselwirkung zu treten. Basierend auf ihren Eigenschaften und dem regulatorischen Kontext des Chromatins,

in dem diese vorkommen, können sie als Enhancer-blockierende Isolatoren oder Barriere-Isolatoren klassifiziert werden. Enhancer-blockierende Isolatoren sind in der Lage, die Kommunikation zwischen Enhancer und Promotor zu verhindern, wenn sie zwischen ihnen positioniert sind, wohingegen Barriere-Isolatoren die Ausbreitung von reprimierenden Heterochromatin in benachbarte Bereiche verhindern. Darüber hinaus sind manche Isolatoren in der Lage sowohl als Barriere-Isolator als auch als Enhancer-blockierender Isolator zu wirken (Sun and Elgin, 1999).

Enhancer-blockierende Isolatoren verhindern Interaktionen, wohingegen durch eine architektonische Funktion Isolatoren in der Lage sind, entfernt liegende regulatorische Sequenzen zusammen zu bringen. In der richtigen Anordnung können sie regulatorische Interaktionen eher fördern, als sie zu behindern (Chetverina et al., 2014; Kyrchanova and Georgiev, 2014). Beruhend auf spezifischen Interaktionen zwischen Proteinen, die an Isolatoren binden (Blanton et al., 2003; Li and Reinberg, 2011) vermitteln Isolatoren *long-range* Kontakten zwischen Sequenzen (Schleifenbildung).

### 2.3.1 Isolatorproteine

Die Isolator-Aktivität wird durch Proteine ermöglicht, die an Isolatoren binden. Anders als in Vertebraten, in denen bislang nur das Isolatorprotein CTCF bekannt ist (Baniahmad et al., 1990; Lobanenko et al., 1990), konnten in *Drosophila* bisher neun Isolatorproteine identifiziert werden (Ali et al., 2016). Zu ihnen zählen unter anderem Su(Hw) (Parkhurst et al., 1988), GAGA-binding factor GAF (Ohtsuki and Levine, 1998), Zw5 (Gaszner et al., 1999), BEAF-32 (Zhao et al., 1995), dCTCF (Moon et al., 2005) und die neu identifizierten Isolatorproteine PITA und ZIPIC (Maksimenko et al., 2015). ChIP-seq Experimente zeigten eine Kolo-kalisation der Proteine im Genom und Co-Immunpräzipitationen (CoIPs) identifizierten zusätzliche Proteine, die mit Isolatorproteinen interagieren (Bartkuhn et al., 2009; Bohla et al., 2014; Ghosh et al., 2001; Maksimenko et al., 2015; Mohan et al., 2007). Mittels genetischer Tests konnten die Proteine Mod(mdg4)67.2 (Buchner et al., 2000) und Zentrosomales Protein 190 (CP190) (Pai et al., 2004) identifiziert werden, die physikalisch und funktionell mit Isolatoren verbunden sind, ohne dabei über offensichtliche DNA-Bindemotive zu verfügen. Deshalb wird vermutet, dass diese Faktoren durch Isolatorproteine an Isolatoren rekrutiert werden. Darüber hinaus konnten Komponenten von Komplexen

identifiziert werden, wie Komponenten des Nukleosomen Remodelling Faktor NURF und Komponenten des Transkriptionsrepressor dREAM (Bohla et al., 2014), die mit dCTCF und CP190 interagieren.

Isolatorproteine und ihre zusätzlichen Interaktionspartner binden im Genom in unterschiedlichen Kombinationen (Van Bortle et al., 2014). An manchen genomischen Bindestellen findet man ein Isolatorprotein, wohingegen es Stellen im Genom gibt, die Bindung von mehreren Isolatorproteinen und ihren Interaktionspartnern zeigen. Diese zwei Typen an Bindestellen haben verschiedene Rollen in der Genom-Organisation und Funktion (Van Bortle et al., 2014).

Wie bereits erwähnt, ist das *Drosophila* Genom, aber auch das Genom von Säugetieren, in TADs unterteilt. TAD *borders* beinhalten stark transkribierte Gene, wie etwa *Housekeeping* Gene, und sind mit Isolatorproteinen angereichert (Dixon et al., 2012; Hou et al., 2012; Sexton et al., 2012). In *Drosophila* gruppiert sich z.B. dCTCF an TAD *borders* mit Proteinen wie BEAF-32, Su(Hw), CP190, Mod(mdg4) und weiteren (Van Bortle et al., 2014). Gerade kürzlich konnte gezeigt werden, dass Su(Hw) bevorzugt innerhalb von TADs vorhanden ist, wohingegen dCTCF nur schwach angereichert ist (Ulianov et al., 2016). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Bindung der Isolatorproteine dCTCF und Su(Hw), im Vergleich zu aktiven Chromatin-Markierungen, die TAD Grenzen voraussagen (Ulianov et al., 2016).

Isolatoren unterstützen, zusammen mit Isolatorproteinen, die Bildung von übergeordneten Chromatinstrukturen durch die Vermittlung von *long-range* Kontakten zwischen verschiedenen Bereichen im Genom. Es wird postuliert, dass Isolatoren dies durch die Bildung von Kernstrukturen erreichen, die als Isolator *bodies* bezeichnet werden (Labrador and Corces, 2002).

### **2.3.2 Isolator *bodies* und Isolator *speckles***

*Drosophila* Isolatorproteine kolokalisieren in Strukturen innerhalb des Zellkerns, die als Isolator *bodies* bezeichnet werden. Bisherige Veröffentlichungen zeigten, dass *Drosophila* Isolator *bodies* große Kernstrukturen sind, die durch hohe lokale Konzentrationen an Isolatorproteinen charakterisiert sind. Typischerweise findet man etwa 5 bis 25 dieser Strukturen pro Zellkern. Für die Isolatorproteine Su(Hw),

Mod(mdg4)67.2 (Gerasimova et al., 2000; Gerasimova and Corces, 1998), CP190 (Pai et al., 2004) und dCTCF (Gerasimova et al., 2007) ist die Bildung von Isolator *bodies* bekannt. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass Isolatorfaktoren zusammenarbeiten, um Isolator *bodies* zu bilden und dass sie als Kontaktstellen funktioneller Isolatoren im dreidimensionalen *Drosophila* Interphase-Zellkern agieren. Abweichend hierzu zeigen Studien, dass Isolator *bodies* nicht als funktionelle Kontaktstellen fungieren, sondern eher als eine Ansammlung an Proteinen, die nicht an Isolation beteiligt sind (Golovnin et al., 2008; Golovnin et al., 2012). Es konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass Isolator *bodies* sich als Antwort auf osmotischen Stress aus diffus verteilten *speckles* bilden (Schoborg et al., 2013).

Im Vergleich zu den Isolator *bodies* ist bislang sehr wenig über die feiner strukturierten Isolator *speckles* bekannt. Bekannt ist, dass die Ansammlung von diffus verteilten Isolator *speckles* abhängig ist von post-transkriptioneller Modifikation der Isolatorproteine durch SUMO und intaktem CP190 (Golovnin et al., 2012). Gerade kürzlich konnte die gleiche Gruppe zeigen, dass EAST mit CP190 und Mod(mdg4)-67.2 interagiert und deren Aggregation in nukleare *speckles* reguliert (Golovnin et al., 2015). EAST stellt eine Komponente eines Kernskeletts dar, dass dabei hilft, die Bewegung der Chromosomen in der Interphase, der Mitose und Meiose einzuschränken (Wasser and Chia, 2003).

Ob jedoch Isolator *speckles* funktionell sind und *long-distance* Chromatin-Interaktionen vermitteln, ist bis jetzt nicht bekannt.

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Nukleare *bodies* von Chromatin-bindenden Faktoren werden häufig als Stellen von *long-range* Chromatin-Interaktionen im dreidimensionalen Raum diskutiert. Für Isolatorproteine ist bekannt, dass sie in Isolator *bodies*, die nicht an Isolation beteiligt sind, zusammenkommen. Im Gegensatz dazu wurden die diffus verteilten Isolator *speckles* bezüglich dieses Aspekts noch nicht näher untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Antwort auf die Frage zu finden, ob die fein strukturierten Isolator *speckles* an *long-distance* Chromatin-Interaktionen beteiligt sind. Dazu sollte DNA FISH mit anschließender Immunfärbung von dCTCF durchgeführt und mittels Structured Illumination Microscopy (SIM) analysiert werden. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob es sich bei Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* um dieselben Kernstrukturen handelt, da gezeigt werden konnte, dass Isolatorproteine Bindestellen für PcG Proteine in Polycomb *bodies* zusammenbringen (Li et al., 2013). Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, sollten Immunfärbungen von Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* auf ihren prozentualen Anteil an Kollokalisierungen mit Hilfe von SIM näher untersucht werden.

Ein Teilaspekt dieser Arbeit lag darin, Isolatorproteine im eindimensionalen Raum näher zu untersuchen. Für die neu identifizierten Isolatorproteine PITA und ZIPIC (Maksimenko et al., 2015) sollten deren Bindemuster auf Polytänchromosomen genauer analysiert werden. Des Weiteren sollten zur Verifizierung von RNAi –und massenspektrometrischer Daten (Bohla et al., 2014) Co-Immunopräzipitationen mit Isolatorproteinen durchgeführt werden, um Interaktionspartner von CTCF und CP190 zu charakterisieren.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Dokumentationssystem	VersaDoc (Bio-Rad)
Diamantschneider	N.N.
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, Stratagene bzw. OWL Hoefer Scientific Instruments
Färbeküvetten	N.N.
Feinwaage	Kern KB
Glasware	Brand, Schotte
Heizblock	Techne Dri-Block
Inkubatoren	Heraeus, HT
Kaltlichtquelle	Schott KL1500LCD
Magnetrührer	Janke&Kunkel KG, IKA-Combimag RCO
Mikroskope	Zeiss Axio Observer Z.1 Zeiss Elyra PS.1 Zeiss LSM 780 Leica TCS-SP2
Mikrotiterplatten-Leser	Tecan M200PRO
PCR-Maschinen	Eppendorf, PerkinElmer
pH-Meter	inoLab
Pinzetten	Dumont 5-Inox-H Federstahlpinzette
Reinstwasser-Filteranlage	Millipore
Rotatoren	NeoLab
Spannungsgeräte	Phase
Stereomikroskop	Nikon SM Z800
Thermomixer	Eppendorf
Videoanlage	Nikon N50 CCD Videokamera, Software Biometra
Vortexer	Scientific Industries Vortex-Genie 2
Zellzähler	Countess™, Invitrogen

Zentrifugen	Hettich Micro120 Heraeus Minifuge GL Heraeus Multifuge 3 S-R Beckman J2-MC (JA 10, JA 17, J 7,5) Beckman L-70 und LX-70
-------------	---

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth, Marienfeld
Einmalhandschuhe, Nitril	Roth
Einmalkanülen	Becton, Dickinson und Co.
Einmalskalpell	Braun
Einmalspritzen	Rose
Gaze	Param
Gefäße	15 ml und 50 ml Falcon bzw. Sarstedt
Objektträger	Menzel-Gläser
Pasteurpipetten	Brandt
PCR-Platte, 96er Vollrand	Sarstedt
PCR Softtubes, 0,2ml	Biozym
PVDF-Membran	Millipore
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Ratiolab, Nerbe
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
Sterilfilter	Sartorius
Tücher, fusselfrei	Kimberly-Clark
Whatman p81 Filterpapier	Whatman
Whatman 3MM Papier	Whatman
Zentrifugenröhrchen	Beckman
Zellkulturflaschen	Nunc

### 3.3 Chemikalien

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

Acrylamid	Roth
Agar	Gibco
Agarose	IBI, Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Merck, SERVA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bactopecton	Difco
Bactotrypton	Difco
Bisbenzimid H33342	AppliChem
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Butanol	Merck
Caesiumchlorid	Merck, Roth
Calciumchlorid	Merck
Chaps	Roth
Chloramphenicol	Roth
Dextransulfat	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Pharmacia
DNA Ladepuffer, 6x	Fermentas
dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	Fermentas
EDTA-Natriumsalz	SERVA
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)	Roth
Ficoll™	Merck
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Formaldehyd (37 %)	Calbiochem
Formamid, deionisiert	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Glukose	Merck
Glycin	Merck

---

Glycogen	Roche
Hefeextrakt	Difco
HEPES (n-2-Hydroxyethylpiperazin)	Roth
IPTG	Applichem
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kalium-di-hydrogenphosphat-3-hydrat	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kupfersulfat	Roth
Lachssperma-DNA	Sigma
Maismehl	Alnatura
Manganchlorid	Merck
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	SERVA
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natrium-Bicarbonat	SERVA
Natriumcarbonat	Merck, Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natrium-di-hydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
Nipagin	Merck
Nonidet P-40 (NP-40) substitute	SERVA
Normales Ziegen Serum	Gibco
Paraformaldehyd	Sigma
Pen/ Strep-Lösung	Gibco
PIPES	Sigma, Roth
Poly-L-Lysin	Sigma
Propionsäure	Merck

Saccharose	SERVA
Salzsäure	Merck
SDS, ultra pure	Roth
SSC-Puffer, 10x	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris	Merck
Triton X-100	SERVA
Trockenhefe	Ja!
Tween 20	Roth
X-Gal	Sigma
Xylencyanol	Sigma
Zuckerrübensirup	Grafschafter

### 3.4 Enzyme

Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP)	Thermo Scientific
Restriktionsendonuklease	Fermentas, New England Biolabs
RNase A (DNase-frei)	Sigma
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
<i>Taq</i> -Polymerase	Promega

### 3.5 Komplettsysteme

ECL-Detektionssystem	Millipore
Expand long Template PCR system	Roche
FISH Tag <sup>TM</sup> DNA Green Kit	Thermo Fisher Scientific
FISH Tag <sup>TM</sup> DNA Multicolor Kit	Thermo Fisher Scientific
FISH Tag <sup>TM</sup> DNA Red Kit	Thermo Fisher Scientific
Illustra GFX PCR DNA and Gel Purification	GE healthcare
MEGAscript® T7	Ambion
Protein G Plus/ Protein A Agarose	Calbiochem

Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Roti-Load (4x konzentriert)	Roth

## 3.6 Größenstandards

### 3.6.1 DNA-Längenstandards

$\lambda$  DNA *Eco130I* (*Styl*) (Fermentas)

Fragmentgrößen (bp)

19329  
7743  
6223  
4254  
3472  
2690  
1882  
1489  
925  
421

pUC19 DNA/*MspI* (*HspII*) (Fermentas)

Fragmentgrößen (bp)

501  
489  
404  
331  
242  
190  
147  
111  
110  
67  
34, 34

1kb DNA Ladder (Fisher Scientific)

Fragmentgrößen (bb)

10000  
8000  
6000  
5000  
4000  
3000  
2500  
2000  
1500  
1000  
700  
500  
300

### 3.6.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

PageRuler™ prestained protein ladder (MBI Fermentas)

Proteingröße (kDa)

170  
130  
100  
70  
55  
40  
35  
25  
15  
10

### 3.7 Antibiotika

Ampicillin-Vorratslösung: 100 mg/ml

Einsatz in Flüssigkultur und Agarplatten 100 µg/ml

Chloramphenicol-Vorratslösung: 34 mg/ml in Ethanol

Einsatz in Flüssigkultur und Agarplatten 12,5 µg/ml

### 3.8 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Sicherheitsstämme des Prokaryoten *Escherischia coli* K12 verwendet, die nicht zur Konjugation befähigt sind.

#### DH5α (Hanahan, 1983)

Dieser Stamm besitzt den Genotyp F-, *endA1*, *hsdR17* (rk-mk-), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nalr), *relA1*, D (*lacZYAargF*), U169, F80/*lacZDM15*.

Dieser Bakterienstamm wurde zur Amplifikation von Plasmiden verwendet.

**DH10B** (Durfee et al., 2008)

Dieser Stamm besitzt den Genotyp F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 endA1 recA1 deoR*  $\Delta$ (*ara,leu*)7697 *araD139 galU galK nupG rpsL*  $\lambda$ -.

Er wird zur Vermehrung von großen Insert-DNA Klonen verwendet. Dieser Stamm ist in der Lage große Plasmide, wie etwa BAC-DNA, stabil aufzunehmen.

### 3.9 Fliegenlinien

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Wildtyp-Fliegenlinie Oregon-R verwendet.

### 3.10 Eukaryotische Zelllinien

**S2 Zellen** (Schneider, 1972)

Embryonale *Drosophila melanogaster*-Zellen

Die Zellen werden in Schneiderzell-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % Glutamin bei 25°C und ohne zusätzliche CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

**S2 K6 HA-FLAG-CP190** (Bohla et al., 2014)

S2-Zellen wurden stabil mit pRm-HA-FLAG-CP190 unter Kontrolle eines CuSO<sub>4</sub>-induzierbaren Promotors transfiziert. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

**S2 K4 HA-FLAG-dCTCF** (Bohla et al., 2014)

S2-Zellen wurden stabil mit pRm-HA-FLAG-dCTCF unter Kontrolle eines CuSO<sub>4</sub>-induzierbaren Promotors transfiziert. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

**S2 K15 His-Flag-dSUMO** (Masterarbeit Meike-Kristin Abraham, Gießen)

S2-Zellen wurden stabil mit pAW-His-Flag-dSUMO unter Kontrolle des Aktin-Promotors transfiziert. Kultivierung entsprechend S2-Zellen.

## 3.11 Antikörper

### 3.11.1 Primärantikörper

#### $\alpha$ -CAF-1/p55 (polyclonal-rabbit) (Tyler et al., 1996)

Western: 1: 1000 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch

#### $\alpha$ -Chro (polyclonal-rabbit) (Gan et al., 2011)

Western: 1: 1000 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch

#### $\alpha$ -CP190 (monoclonal-mouse) (Frasch et al., 1986)

Immunfärbung Polytänschromosomen: 1:2 in PBS/ 5 % Milch/ 2 % NSG  
Immunpräzipitation: 200  $\mu$ l/ IP  
Western: 1: 2000 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch

#### $\alpha$ -CP190 (polyclonal-rat) (Golovnin et al., 2012)

Immunfärbung Imaginalscheiben: 1:1000 in PBS/ 0,1 % Triton X-100/  
10 % NGS  
Immunfärbung S2-Zellen: 1:1000 in PBS/ 10 % NGS  
Immunpräzipitation: 10  $\mu$ l/ IP  
Western: 1:1000 in PBS/ 0,1 % Tween/ 3 %  
Milch

#### $\alpha$ -dCTCF N-terminal (polyclonal-rabbit) (Mohan et al., 2007)

Immunfärbung Imaginalscheiben: 1:1000 in PBS/ 0,1 % Triton X-100/  
10 % NGS  
Immunpräzipitation: 10  $\mu$ l/ IP  
Western: 1:2000 in PBS/ 0,1 % Tween/ 3 %  
Milch

**$\alpha$ -FLAG M2 (monoclonal-mouse) (Sigma, F1804):**

Immunfärbung Zellkultur: 1:1000 in PBS/ 10 % NGS

Immunpräzipitation: 10  $\mu$ l/ IP **$\alpha$ -IgG (polyclonal, verschiedene Spezies; verschiedene Anbieter)**Immunpräzipitation: 10  $\mu$ l/ IP **$\alpha$ -ISWI (polyclonal-rabbit) (Moshkin et al., 2012)**Western: 1: 1000 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch **$\alpha$ -Lamin Dm0 (monoclonal-mouse, Developmental Studies Hybridoma Bank, ADL67.10)**Immunfärbung Imaginalscheiben: 1:200 in PBS/ 0,1 % Triton X-100/  
10% NGS **$\alpha$ -Mip120 (polyclonal-rabbit) (Beall et al., 2002)**Western: 1: 100 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch **$\alpha$ -Mip130 (polyclonal-rabbit) (Beall et al., 2002)**Western: 1: 100 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch **$\alpha$ -Pita (polyclonal-rabbit) (Page et al., 2005)**

Immunfärbung Polytänchromosomen: 1:10 in PBS/ 5 % Milch/ 2 % NSG

 **$\alpha$ -Polycomb (polyclonal-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, sc-25762)**Immunfärbung Zellkultur: 1:500 in PBS/ 0,1 % Triton X-100/  
10% NGS **$\alpha$ -Pzg (polyclonal-rabbit) (Gan et al., 2011)**Western: 1: 250 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch

**$\alpha$ -beta-Tubulin** (monoclonal-mouse; Developmental Studies Hybridoma Bank, E7):

Western: 1: 20000 Verdünnung in PBS/ 0,1 %  
Tween/ 3 % Milch

 **$\alpha$ -ZIPIC** (polyclonal-rat) (Maksimenko et al., 2015)

Immunfärbung Polytänchromosomen: 1:10 in PBS/ 5 % Milch/ 2 % NSG

**3.11.2 Sekundärantikörper**

Die folgenden Sekundärantikörper wurden in Immunfärbungen in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/ 0,1 % Triton X-100/ 10 % NGS verwendet:

Alexa Fluor® 488 F(ab')<sub>2</sub> fragment of  $\alpha$ -rabbit IgG (H+L) (Molecular probes, A11070)

Alexa Fluor® 594 F(ab')<sub>2</sub> fragment of  $\alpha$ -rabbit IgG (H+L) (Molecular probes, A11072)

Alexa Fluor® 647 goat  $\alpha$ -rabbit IgG (H+L) (Molecular probes, A21244)

Alexa Fluor® 488 F(ab')<sub>2</sub> fragment of  $\alpha$ -mouse IgG (H+L) (Molecular probes, A11017)

Alexa Fluor® 594 F(ab')<sub>2</sub> fragment of  $\alpha$ -mouse IgG (H+L) (Molecular probes, A11020)

Alexa Fluor® 647 goat  $\alpha$ -mouse IgG (H+L) (Molecular probes, A21235)

Alexa Fluor® 594 goat  $\alpha$ -rat IgG (H+L) (Molecular probes, A11007)

Die folgenden Sekundärantikörper wurden im Western in einer Verdünnung von 1:30000 in PBS/ 0,1 % Triton X-100/ 3 % Milch verwendet:

$\alpha$ -mouse-IgG-HRP (Santa Cruz, sc-2055)

$\alpha$ -rabbit-IgG-HRP (GE Healthcare, NA934V)

$\alpha$ -rat-IgG-HRP (GE Healthcare, NA935V)

**3.12 Plasmide****Plasmide zur direkten Fluoreszenz-Markierung**

BacR32J03 (RP98-32J3) BACPAC Resources Center (BPRC)

BacR28H01 (PR98-28H1) BACPAC Resources Center (BPRC)

Plasmide zur Klonierung

BacR32J03 (RP98-32J3)	BACPAC Resources Center (BPRC)
BacR28H01 (PR98-28H1)	BACPAC Resources Center (BPRC)
BacR02L12 (PR98-2L12)	BACPAC Resources Center (BPRC)
BacR08N16 (PR98-8N16)	BACPAC Resources Center (BPRC)
BacR09O13 (PR98-9O13)	BACPAC Resources Center (BPRC)
pBluescript II SK(+/-)	Stratagene

Plasmide für die eukaryotische Expression

pRm-HA-FLAG-CP190	Bohla et al. (2014)
pRm-HA-FLAG-dCTCF	Bohla et al. (2014)
pAW-dSUMO-Flag-His	Eugenia Wagner (IMT Marburg)

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Konstrukte: **siehe Anhang**

### 3.13 Oligonukleotide

**Siehe Anhang**

### 3.14 Software

Adobe®Illustrator®CS5.1	Adobe®
Adobe®Photoshop® 7.0	Adobe®
BioDocAnalyze	Biometra
EndNoteX.0.2	Thompson
Fiji (Fiji is just ImageJ)	ImageJ
GATCViewer	GATC Biotech
IBM® SPSS® Statistics Version 22	IBM®
i.control 1.7	Tecan
Microsoft Office 2007	Microsoft
Quantity One 4.6.7	BioRad Laboratories. Inc.
Vector NTI® Advance9	Informax Inc.

## 4 Methoden

Nährmedien und Gelpuffer wurden ausschließlich mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Sterile Lösungen wurden durch Autoklavieren oder, bei Vorliegen hitzelabiler Komponenten, durch Sterilfiltration hergestellt. Glasgeräte wurden autoklaviert oder 4 h bei 180°C hitzesterilisiert. Die Konzentrationsangaben der Lösungen beziehen sich auf deren Endkonzentration.

### 4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 4.1.1 Lagerung von DNA

Die Lagerung von DNA erfolgte bei -20°C in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer.

TE-Puffer	10 mM Tris/ HCl, pH 7,6
	1 mM EDTA

#### 4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

##### 4.1.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* – in kleinem Maßstab

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde das „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ von Qiagen verwendet. Alle Schritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

##### 4.1.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* – in mittlerem Maßstab

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA in mittlerem Maßstab wurde das „Qiagen® Plasmid Midi Kit“ von Qiagen verwendet. Alle Schritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 4.1.3 Präparation von BAC-DNA

#### 4.1.3.1 BAC-Präparation aus *E.coli* - in kleinem Maßstab

Zur Aufreinigung von BAC-DNA in kleinem Maßstab wurde das“ QIAprep® Spin Miniprep Kit“ von Qiagen verwendet. Alle Schritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

#### 4.1.3.2 BAC-Präparation aus *E.coli* - in mittlerem Maßstab

Zur Aufreinigung von BAC-DNA in mittlerem Maßstab wurde das „Qiagen® Plasmid Midi Kit“ von Qiagen verwendet, wobei Schritte abweichend des Herstellerprotokolls durchgeführt wurden. Für die Präparation wurde das Mills Lab Protokoll „BAC Midi Prep, Qiagen kit, Rev. 10.1029“ verwendet.

Die verwendeten BAC-Klone wurden auf selektiven Agarplatten (12,5 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte das Animpfen von Vorkulturen (12,5 µg/ml Chloramphenicol in 3 ml LB-Medium) mit den jeweiligen Einzelkolonien. Die folgenden Arbeitsschritte beziehen sich auf jeweils einen Klon: Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator wurde anschließend 100 ml selektives LB-Medium (Chloramphenicol 12,5 µg/ml) inokuliert und eine weitere Nacht bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkultur wurde in 2x 50 ml Ansätze aufgeteilt und für 20 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 5 ml Puffer *P1* pro 50 ml resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen vereint. Nach der Zugabe von 10 ml Puffer *P2*, was zur Lyse der Zellen führte, wurde das Zentrifugenröhrchen sechsmal invertiert und bei RT 5 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die Neutralisation mit 10 ml Puffer *P3*, erneutem 6-maligen Invertieren und einer Inkubation auf Eis für 15 min. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 13350 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert (15 min, 13350 rpm, 4°C). Während die Proben zentrifugierten, wurden die Säulen mit 4 ml Puffer *QBT* equilibriert und Puffer *QF* im Wasserbad auf 65°C erhitzt.

Der Überstand nach Zentrifugation wurde in die equilibrierten Säulen überführt und diese, nach Durchfluss der Proben, zweimal mit 10 ml Puffer *QC* gewaschen. Die DNA wurde mit 5ml aufgewärmten Puffer *QF* eluiert und 3,5 ml Isopropanol dem Eluat

hinzugegeben. Abweichend vom Protokoll wurde das Eluat/ Isopropanol-Gemisch in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und die BAC-DNA 45 min bei 13000 rpm und 4°C gefällt. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets getrocknet, in TE-Puffer über Nacht gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt. Um qualitative und quantitative Aussagen über die gewonnene DNA treffen zu können, wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und 1 µg der BAC-DNA durch Restriktionsverdau auf Richtigkeit überprüft bzw. Test-Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt.

#### **4.1.3.3 BAC-Präparation aus *E.coli* - in großem Maßstab**

Zur Aufreinigung großer Mengen an BAC-DNA wurde die Methode von Doug Mortlock, 2009 (modifiziert vom Kingsley Lab Protocol) verwendet. Diese BAC-Präparation beruht auf der alkalischen Lyse nach Birnboim and Doly (1979). Die Abtrennung der Plasmid-DNA von RNA und genomischer Bakterien-DNA erfolgte mit Hilfe zweimaliger Dichtezentrifugation in einem CsCl-Gradienten (Radloff et al., 1967).

Die verwendeten BAC-Stämme wurden auf selektiven Agarplatten (12,5 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte das Animpfen von Vorkulturen (12,5 µg/ml Chloramphenicol in 3 ml LB-Medium) mit den jeweiligen Einzelkolonien. Von jedem BAC-Stamm wurden je zwei Einzelkolonien verwendet, da die Qualität zwischen BAC-Präparationen stark variieren kann. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator wurden pro BAC-Stamm und Einzelkolonie zwei Kolben mit 500 ml selektiven LB-Medium (Chloramphenicol 12,5 µg/ml) inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte die alkalische Lyse der Zellen. Hierzu wurden die Zellen für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden anschließend in 40 ml Lösung 1 resuspendiert. Dann erfolgten die Zugabe von 40 ml frisch angesetzter Lösung 2 und ein behutsames Invertieren der Proben für 30 s. Die darauf folgende Inkubation auf Eis für 5 min führte zur kompletten Lyse der Zellen. Nach Zugabe von 40 ml Lösung 3, starkem Mischen und erneuter Inkubation für 15 min auf Eis, erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 7000 rpm und 4°C. Dieser Schritt dient der Neutralisierung, wobei hauptsächlich Plasmide wieder in Lösung gehen. Um feste Bestandteile zu entfernen, wurden die Überstände durch mehrere Schichten Gaze in

neue Zentrifugenflaschen überführt und mit je 120 ml Isopropanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte bei 7000 rpm, 20 min und 4°C. Die Pellets wurden mit 10 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7000 rpm, 10 min, 4°C). Die getrockneten Pellets wurden in je 4,9 ml TE-Puffer durch Schütteln bei 37°C gelöst. Dann wurden 9,8 g CsCl in ein 15 ml-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 9,8 ml DNA-Lösung (zwei Proben in eine vereinigt) gelöst. Nach dem kompletten Auflösen des CsCl wurde 0,98 ml Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm, bei der große Mengen an Proteinen abgetrennt wurden. Die Überstände wurden in Beckmann Quickseal™-Zentrifugenröhrchen (13 x 51mm) überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden daraufhin mit gesättigter CsCl-Lösung so aufgefüllt, dass die Proben ein Gesamtgewicht zwischen 9,4 g und 9,45 g besaßen. Es folgte das Verschweißen der Zentrifugenröhrchen und die Überführung in einen Vertikalrotor (Vti90). Der erste Gradient wurde durch eine Ultrazentrifugation bei 65000 rpm über Nacht ausgebildet. Bei diesem Schritt trennen sich die Bestandteile nach ihrer spezifischen Dichte im CsCl-Dichtegradienten auf. Die dann sichtbare Plasmid-DNA-Bande wurde mit Hilfe einer Injektionskanüle und einer Einwegspritze abgesaugt, in ein neues Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 50 %iger CsCl-Lösung (w/w) auf 9,4 g-9,45 g gebracht und erneut bei 65000 rpm über Nacht zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde abgezogen, in ein 15 ml- Reaktionsgefäß überführt und mit TE-Puffer auf ein Volumen von 2 ml gebracht. Die DNA-Lösung wurde durch NaCl-gesättigtes Butanol (20 ml 3 M NaCl in 100 ml Butanol) aufgereinigt. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit gleichen Volumen NaCl-gesättigtem Butanol versetzt, mehrmalig invertiert und 30 s in einen Reaktionsgefäß-Ständer platziert. So konnte sich die obere Phase abtrennen, die dann abgenommen und verworfen wurde. Dieser Vorgang wurde 4- 5 mal wiederholt. Nachdem die DNA-Lösung farblos war, wurde 1 ml ddH<sub>2</sub>O und das dreifache Volumen Ethanol hinzugegeben. Für die Fällung wurde die DNA-Lösung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 13000 rpm, 30 min bei 4°C präzipitiert. Die Pellets wurden in insgesamt 500 µl 0,3 M NaOAc resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit Ethanol erneut präzipitiert. Nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol und dem anschließenden Trocknen, wurde das Pellet über Nacht in 100 µl TE-Puffer gelöst. Um qualitative und quantitative Aussagen über die gewonnene DNA treffen zu können, wurde die DNA-Konzentration photometrisch

bestimmt und 1 µg der BAC-DNA durch Restriktionsverdau auf Richtigkeit überprüft bzw. Test-Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

**Lösung 1**            50 mM Glukose  
                         25 mM Tris/ HCl, pH 8,0  
                         10 mM EDTA  
                         50 µg/ml RNase A  
                         steril filtriert, Lagerung bei 4°C

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

**Lösung 3**            294,5 g Kaliumacetat  
                         mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen,  
                         auf 1 L mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

#### 4.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentration einer Probe wurde photometrisch mittels des Infinite M200 PRO NanoQuant Reader und der NanoQuant Platte sowie der i-control Software der Firma Tecan ermittelt.

Für die Quantifizierung der Probe ist ein Volumen von 2 µl ausreichend. Die Absorption wird bei 260 nm gemessen. Darüber hinaus wird die Probe bei 280 nm gemessen, um Proteine in der Probe zu ermitteln. Die Bildung des Quotienten OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub>, der idealerweise bei 1,8 - 1,9 liegt, zeigt an, ob eine Kontamination der DNA mit Proteinen vorliegt. Für die Messung musste die Infinite NanoQuant Plate zuerst geeicht werden. Zum Eichen wurden je 2 µl ddH<sub>2</sub>O auf die zu benutzenden Felder pipettiert. Nach dem Eichen wurden je 2 µl der zu messenden DNA Proben auf die Felder aufgetragen. Die DNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert.

### 4.1.5 Alkoholische Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA aus wässriger Lösung wurde diese mit 1/ 10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen 100 %igem Ethanol versetzt, gut gemischt und für mindestens 30 min bei -20 °C gefällt. Danach wurde die Probe 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde dann in geeignetem Volumen ddH<sub>2</sub>O bzw. TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

### 4.1.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse erfolgte bei der Firma Seqlab/Microsynth. Der Sequenzierungsansatz bestand aus 100 ng/ µl Plasmid-DNA bzw. 150 ng/ µl PCR-Produkt und 2 pmol/ µl des entsprechenden Sequenzierprimers in einem Gesamtvolumen von 15 µl.

## 4.2 Enzymatische Modifikation von DNA

Enzymatische Modifikationen von DNA wurden nach Angaben der Hersteller und mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

### 4.2.1 Restriktionsspaltung

Doppelsträngige DNA kann durch spezifische Restriktionsendonukleasen geschnitten werden (Roberts and Macelis, 1992). Diese Restriktionsenzyme werden aus Mikroorganismen isoliert und können die DNA an sequenz-spezifischen Stellen, die aus palindromischen Sequenzen bestehen, schneiden. Dabei werden überhängende (*sticky*) oder glatte (*blunt*) Enden erzeugt. Die Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen für den entsprechenden Restriktionsverdau richteten sich nach den Angaben der Hersteller, die Inkubationszeiten nach den eingesetzten DNA- und Enzymmengen. Im Allgemeinen werden 2 - 3 Enzym-Einheit (U) pro µg Plasmid-DNA verwendet und mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

## 4.2.2 Dephosphorylierung

Bei einer Ligation eines linearisierten Vektors, der zwei gleiche Enden aufweist, mit einem DNA-Fragment, kann es zu unerwünschter Religation des Vektors kommen. Dieser Vorgang kann durch die hydrolytische Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe durch das Enzym Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fast AP) verhindert werden. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte mit einer Enzym-Einheit für 10 min bei 37°C. Die Reaktion findet sowohl in Restriktionspuffern als auch in PCR Puffern statt. Das Enzym kann anschließend bei 75°C für 5 min inaktiviert werden. Eine Aufreinigung vor einer Ligation ist nicht notwendig.

## 4.2.3 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten kam die T4-DNA-Ligase zum Einsatz. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Verbindung von 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen zu Phosphodiesterbindungen. Das Vektor/Insert-Verhältnis lag im Bereich von 1:5 bis 1:10. Des Weiteren wurden 5 U Ligase pro 100 ng DNA eingesetzt und die Ligation bei 18°C über Nacht durchgeführt.

## 4.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, um sehr spezifisch DNA-Fragmente in einer exponentiell verlaufenden Polymerisierungsreaktion zu amplifizieren. Darüber hinaus wird sie dazu verwendet, Restriktionsschnittstellen in ein DNA-Fragment oder Plasmid einzuführen. Bei der PCR kommen drei wesentliche Komponenten zum Einsatz: eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (verwendet wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* der Firma Invitrogen und ein *long-expand* Polymerase-Mix der Firma Roche); ein Plasmid oder ein DNA-Fragment, das der Polymerase als Matrize dient und schließlich zwei Primer, die komplementär zu den flankierenden Regionen der zu amplifizierenden Sequenz sind, an die sie antiparallel hybridisieren und deren freies 3'-OH der DNA-Polymerase als Substrat für die Addition von freien Desoxynukleotiden dient.

Die Reaktionen der PCR verlaufen zyklisch, die Einzelreaktionen sind temperaturabhängig und verlaufen in drei Schritten. Der Denaturierung bei 94°C, bei der sich die beiden Stränge der DNA trennen, folgt das *Annealing* bei 45 - 65°C zur Hybridisierung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Die anschließende Elongation bei 72°C, dem Temperatur-Optimum der Polymerase, schließt den Zyklus ab. Die Anzahl der Zyklen variierte je nach Art des Experimentes. Bei der Auswahl von geeigneten Primern wurde darauf geachtet, dass sie eine Länge von 17-28 Nukleotiden im hybridisierenden Bereich und einen GC-Gehalt von 50 – 60 % besaßen. Die Primerpaare sollten Schmelztemperaturen  $T_m$  zwischen 55 und 70°C haben.

### 4.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, das die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung nutzt. Da die DNA als negativ geladenes Molekül vorliegt, wandert sie in einem elektrischen Feld zum Pluspol; je kleiner das Molekül, desto schneller. Das Verfahren wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Als Gelmatrix diente Agarose.

#### 4.3.1 Agarose-Gel

Agarose-Gele eignen sich als Matrix zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten mit über 100 bp Länge (Southern, 1979). Zur Herstellung analytischer oder präparativer Agarosegele wurde, abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente, eine Agarosekonzentration von 0,6 – 2,5 % (w/v) gewählt.

Die Agarose wurde entsprechend in 1x TAE-Puffer gelöst, in einem Mikrowellenherd aufgeköcht und mit Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) versetzt. Ethidiumbromid ist eine Substanz, die nach Interkalierung in die DNA unter UV-Licht (Anregung bei 254 - 366 nm Wellenlänge) verstärkt rot-orange fluoresziert. Hierdurch kann die DNA im Gel detektiert werden.

Nach dem Abkühlen der Gel-Lösung auf unter 60°C, wurde diese in eine Flachbettapparat gegossen. Das kalte Gel wurde anschließend in der

Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutrennenden DNA-Lösungen wurden mit 1/5 Volumen an Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zum Längenvergleich wurde 0,5 µg eines DNA-Längenstandards in einer separaten Spur aufgetrennt. Die bei der Elektrophorese verwendete Spannung betrug 5 - 10 V/cm Elektrodenabstand. Die Gele wurden zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

Für präparative Zwecke wurde nach abgeschlossener Elektrophorese die DNA-Fragmente unter länger welligem UV-Licht (365 nm) mit einem scharfen, sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, um später aus dem Gel extrahiert zu werden.

<b>50x TAE-Puffer</b>	2 M Tris/ HCl, pH 8,0 50 mM EDTA Mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt
<b>Gel-Ladepuffer</b>	40 % (w/v) Ficoll 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol

### 4.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde das Illustra „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von GE Healthcare verwendet. Alle Schritte erfolgten gemäß dem Herstellerprotokoll. Eluiert wurde in 30 - 50 µl Elutionspuffer oder ddH<sub>2</sub>O.

### 4.3.3 Direkte Fluoreszenz-Markierung von DNA-Sonden mittels *Nick Translation*

Zur direkten Fluoreszenz-Markierung der verwendeten DNA-Sonden wurde das FISH Tag™ DNA Multicolor Kit von Invitrogen™ verwendet. Alle Schritte erfolgten gemäß dem Herstellerprotokoll. Für die Markierung von BAC-DNA-Templates wurde 6 µl „*DNaseI working solution*“ eingesetzt und die *Nick Translation* erfolgte für zwei

Stunden bei 15°C. Bei den deutlich kürzeren Klonierungs-/PCR-Fragmenten wurden 2 µl „*DNaseI working solution*“ eingesetzt und die Reaktion erfolgte 1,5 h bei 15°C.

Für die genomische Position der verwendeten Sonden siehe Tabelle 1 im Anhang.

#### **4.3.4 Herstellung doppelsträngiger RNA**

Zur Analyse des *loss-of-function*-Phänotyps von Genen und deren Genprodukten stellt der RNAi-Mechanismus ein leicht anwendbares Werkzeug dar. Dabei führt die Transfektion doppelsträngiger RNA (dsRNA), die homolog zur cDNA des zu untersuchenden Gen ist, zu einer spezifischen Degradierung der entsprechenden mRNA (Clemens et al., 2000).

Hier wurde in Anlehnung an das DRSC-Protokoll (Drosophila RNAi Screening Center, Harvard) gearbeitet. Dabei wurden 300 - 500bp große Fragmente der jeweiligen cDNA mit Primerpaaren amplifiziert, die jeweils die komplette T7-Phagen-Promotorsequenz an ihrem 5'-Ende besaßen, verwendet. Das PCR-Amplifikationsprodukt wurde dann verwendet, um mittels des MEGAscript® T7-Kits (Ambion) dsRNA in hoher Ausbeute zu synthetisieren. Diese wurde anschließend mit RNeasy-Säulen (QIAGEN) aufgereinigt und bei -20°C gelagert.

### **4.4 Arbeiten mit Bakterien**

#### **4.4.1 Vermehrung und Lagerung**

Die Vermehrung der beschriebenen Bakterienstämme erfolgte bei 37°C entweder als Schüttelkultur in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten, eventuell mit geeigneten Antibiotika supplementiert. Auf letzteren konnten die Bakterien bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurde einer LB-Bakteriensuspension Glycerin bis zu einer 40 %igen Endkonzentration zugegeben. Die Suspension wurde als Glycerinstock bei -80°C gelagert.

<b>LB-Medium</b>	10 g/l Bactotrypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl autoklaviert
<b>Agarplatten</b>	10 g/l Bactotrypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl 15 g/l Agar autoklaviert, auf ca. 50°C in einem Wasserbad abgekühlt und nach Zugabe geeigneter Antibiotika in Petri-Schalen gegossen. Aufbewahrung bei 4°C.
<b>Glycerinstock</b>	60 % Bakteriensuspension 40 % Glycerin Lagerung bei -80°C

#### 4.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien

25 ml einer Übernachtskultur wurden in 450 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer Dichte von  $OD_{600nm} = 0,6$  bei 18°C geschüttelt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Bakteriensuspension herunter zentrifugiert (4800 U/min, 10 min, 4°C, Rotor 10), in 40 ml kaltem TB-Puffer resuspendiert und in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden sie erneut zentrifugiert (3200 U/min, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml TB-Puffer, supplementiert mit 7 % DMSO, resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<b>TB-Puffer</b>	10 mM PIPES 15 mM $CaCl_2$ 250 mM KCl mit KOH auf pH 6,7 eingestellt und autoklaviert + 55 mM $MnCl_2$ (steril filtrierte Stammlösung)
------------------	--

### 4.4.3 Transformation von Bakterien

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen wird Transformation genannt. Die Kompetenz wird zuvor durch eine Behandlung mit Calcium- oder anderen zweiwertigen Ionen generiert. Sie bewirkt auf eine wesentlich leichtere Aufnahme der DNA (Mandel and Higa, 1970). 50–200 µl transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100-500 ng Plasmid-DNA und einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis, folgte eine Hitzebehandlung für 90 s bei 42°C. Danach wurde 2 VT LB-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 min bei 2500 U/min) wurde das Bakterienpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf einer Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatte enthielt ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum. Nach 10-16 h Inkubation bei 37°C konnten Einzelkolonien isoliert werden.

## 4.5 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden ausschließlich sterile Puffer, Medien, Glasgeräte und Zentrifugenröhrchen verwendet. Alle Arbeiten sind unter sterilen Bedingungen durchgeführt worden.

### 4.5.1 Lagerung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Ein kleine Menge ( $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen) in flüssigem Stickstoff gelagerter Zellen wurde bei RT langsam aufgetaut, unmittelbar darauf in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und mit 9 ml Medium versetzt. Hierbei musste beachtet werden, dass das Medium sehr langsam zugeben wurde, um einen Schock der Zellen zu vermeiden und das DMSO auszuwaschen. Nach einer Zentrifugation (5 min, 1000 xg, RT) wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer Kulturflasche ausgesät.

## 4.5.2 Kultivierung von Zellen

*Drosophila* S2 wurden in Gewebekulturflaschen und, wenn nicht anders deklariert, in *Drosophila* Schneider Medium (Gibco) mit 10 % FCS und 1 % Pen/ Strep-Lösung bei 25°C kultiviert.

<b>Pen/Strep-Lösung</b> (Gibco)	10.000 units/ ml Penicillin
	10.000 µg/ ml Streptomycin

Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurden sie in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsrate umgesetzt. Das Umsetzen adhärenter Zellen erfolgte vor Erreichen der Konfluenz. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des PBS-Puffers wurden die S2-Zellen in 2 ml frischem Medium durch heftiges Schütteln abgelöst und in weiteren 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis von 1:3 bis 1:15 auf neuen Kulturschalen ausgesät.

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

## 4.5.3 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$ -  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zelldichte wurde automatisch mit Hilfe des Countess™, Zellzähler ermittelt. Die adhärenenten Zellen wurden durch heftiges Schütteln von den Gewebekulturflaschen abgelöst und nach Zugabe von Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie zentrifugiert (5 min, 1000 g, RT), in geringer Menge Medium aufgenommen und ihre Zelldichte bestimmt. Das Einstellen der Zelldichte erfolgte durch Zugabe einer errechneten Menge Mediums. In die Zellsuspension wurde langsam und unter Schwenken DMSO bis zum Erreichen einer Endkonzentration von

7,5 % (v/v) zugetropft und die Zellsuspension portionsweise (1,8 ml) in Gefrierampullen überführt. Die Ampullen wurden in einem Einfrierbehälter (Technomara) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht herunter gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 4.5.4 DNA Transfektion eukaryotischer Zellen – $\text{CaPO}_4$ -Methode

Diese Transfermethode basiert auf der Kopräzipitation der zu transfizierenden DNA mit Calciumphosphat. Die sich bildenden Kristalle senken sich auf die adhärenen Zellen und werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

Pro Well einer 6-Well-Platte wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium am Tag vor der Transfektion ausgesät. Für den Transferansatz wurden 5  $\mu\text{g}$  DNA in 183,6  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und gemischt. Zu den 183,6  $\mu\text{l}$  Transferansatz wurden mit 21,6  $\mu\text{l}$  10x HEBS und 10,8  $\mu\text{l}$  2M  $\text{CaCl}_2$  gegeben und gut gemischt. Danach erfolgt eine Inkubation des Ansatzes für 10 min bei RT. Nach der Inkubationszeit wird das Transfektionsgemisch gevortext und vorsichtig auf die Zellen getropft. 16 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen zweimal mit 1 ml 1xPBS gewaschen und mit 2 ml neuem Medium versehen.

##### 10x HEBS-Puffer

1,37 M NaCl

60 mM Glucose

50 mM KCl

200 mM HEPES

7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

mit HCl auf pH 7,12 einstellen und steril filtrieren

#### 4.5.5 dsRNA-Transfektion von S2-Zellen

Zur dsRNA-Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well auf kleinen runden Glasplättchen in serumfreien Medium ausgesät und für 1 h mit 8  $\mu\text{g}$  spezifischer dsRNA bei RT inkubiert. Anschließend wurden 3 ml komplettes Medium (+10 % FCS, 1 % Pen/Strep) zugegeben und 96 h bei  $25^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden dann gewaschen und zur Immunfärbung (siehe 4.5.6) eingesetzt.

#### **4.5.6 Indirekte Immunfluoreszenz an kultivierten eukaryotischen Zelllinien (modifiziert nach Epigenome NoE – protocol PROT08, Chaumeil 2007)**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz an Schneider S2-Zellen und Schneider S2-K15-Zellen nach Knockdown-Zellen von Smt3, Luziferase und Doppelknockdown von Aos1/ Uba2 durchgeführt. Abhängig von dem Experiment wurden  $1 \times 10^6$  (Wildtyp) bzw.  $1 \times 10^5$  (Knockdown-Experiment) Zellen auf runde Deckgläschen ausgesät und 24 h bzw. 4 Tage wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und in frisch angesetztem 3 % PFA/ 1xPBS für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3x 5 min in 1xPBS auf dem Schüttler gewaschen und 5 min in 1xPBS/ 0,5 % Triton X-100 auf Eis permeabilisiert. Diesem Schritt folgten 3 weitere Waschschrte für 5 min RT mit 1xPBS. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch eine 15-minütige Absättigung mit 1xPBS/ 10 % NGS reduziert. Danach erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden anschließend 3x in 1xPBS gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit den Zweitantikörpern für 40 min bei RT in einer dunklen und feuchten Kammer. Die Zellen wurden anschließend wieder 3x in 1xPBS gewaschen und die DNA mit Hoechst33342 (0,2 mg/ml Hoechst33342 in 1xPBS) gegengefärbt. Nach zwei abschließenden Waschschrten in 1xPBS, wurden die Zellen mit Fluoromount-G eingedeckelt.

## **4.6 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster***

### **4.6.1 Fliegenhaltung**

Die Anzucht der Fliegen erfolgte in Kunststoffröhrchen verschiedener Größe mit 5-10 ml Maismehlagar. Die Röhrchen wurden mit einem Polyester- Milbenstopfen verschlossen. Die Haltung der Fliegenlinien erfolgte bei 18°C oder 22°C. Zweimal pro Woche wurde der verwendete Wildtyp-Stamm in frisch angesetzte Röhrchen umgesetzt.

---

<b>Maismehlagar</b>	14 g Agar
	142 g Maismehl
	64 g Hefe
	134 g Zucker
	28 ml 10 % Nipagin in 70 % Ethanol
	30 ml 40 % Propionsäure
	1 EL Zuckerrübensirup
	2 l Wasser

## 4.7 DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (DNA FISH)

DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ermöglicht die Studie der Position von *single copy Genen* innerhalb eines Zellkerns. Des Weiteren ermöglicht die Verwendung von verschiedenen Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden die Analyse von zwei oder mehr *single copy Genen* und deren Position zueinander.

### 4.7.1 Multicolor DNA FISH an Imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* (Epigenome NoE – protocol PROT07, Bantignies 2007)

Alle Arbeitsschritte erfolgten in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen, rotierend bzw. schüttelnd.

#### 4.7.1.1 Präparation der Imaginalscheiben

Für die DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an Imaginalscheiben mussten diese zuerst aus 3. Larven von *Drosophila melanogaster* präpariert werden. Die Dissektion erfolgte in 1xPBS. Die frei präparierten Flügel-/bzw. Augenimaginalscheiben wurden in ein 1,5 ml- Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Die Fixierung der Imaginalscheiben erfolgte in 4 % PFA/ PBT (1xPBS, 0,1 % Tween20) für 20 min rotierend bei RT.

#### 4.7.1.2 Prä-Hybridisierung, Hybridisierung und Waschgänge

Nach der Fixierung wurden die Imaginalscheiben in 1 ml 150µg/ml RNaseA/ PBT für mindestens zwei Stunden rotierend bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung des Gewebes in 1 ml PBS-Tr (1xPBS/ 0,3 % Triton-X 100) für

mindestens 1 h bei RT. Nach der Permeabilisierung wurden die Imaginalscheiben schrittweise (je 1ml, 20 min pro Schritt) in Prä-Hybridisierungsgemisch (pHM) überführt.

- 80 % PBS-Tr / 20 % pHM
- 50 % PBS-Tr / 50 % pHM
- 20 % PBS-Tr / 80 % pHM
- 100 % pHM

Daraufhin wurde die larvale DNA 15 min bei 80°C in 100 % pHM denaturiert und so viel pHM wie möglich abgenommen. Zeitgleich wurden die Fluoreszenz-markierten Sonden für die Hybridisierung vorbereitet. Pro Hybridisierungsreaktion wurden 200 ng (bei Single-Color- FISH) in 30 µl FISH Hybridisierungspuffer (FHB) bzw. je 300 ng (bei Multicolor- FISH) in 40 µl FHB verwendet. Die Sonden wurden anschließend bei 95°C für 10 min denaturiert und ohne Abkühlung zu den Imaginalscheiben gegeben.

Die nun folgende Hybridisierung erfolgte über Nacht (14- 17 h) bei 450 rpm und 37°C. Nach der Hybridisierung wurden die Proben mit Post-Hybridisierungs-Waschlösungen 1, 2, 3, 4 im Thermomixer bei 37°C und 800rpm gewaschen. Die darauffolgenden Waschschrte mit den Waschlösungen 5, 6, 7 wurden rotierend bei RT durchgeführt.

- |                    |           |                                   |
|--------------------|-----------|-----------------------------------|
| <b>Waschlösung</b> | <b>1.</b> | 50 % Formamid/ 2xSSC/ 0,3 % CHAPS |
|                    | <b>2.</b> | 40 % Formamid/ 2XSSC/ 0,3 % CHAPS |
|                    | <b>3.</b> | 30 % Formamid/ 70 % PBT           |
|                    | <b>4.</b> | 20 % Formamid/ 80 % PBT           |
|                    | <b>5.</b> | 10 % Formamid/ 90 % PBT           |
|                    | <b>6.</b> | 100 % PBT                         |
|                    | <b>7.</b> | 100 % PBS-Tr                      |

Final wurden die Imaginalscheiben in 1xPBS überführt, so viel 1xPBS abgenommen bis sich noch etwa 50 µl im Reaktionsgefäß befanden. Mit abgeschnittener 200 µl-Pipettenspitze wurden die Imaginalscheiben im Restvolumen auf einen Objektträger überführt. Mit Hilfe von saugfähigem Filter-Papier wurde das PBS entfernt und das Probengewebe mit einem Tropfen Fluoromount-G eingedeckelt. Nun konnten die Imaginalscheiben mikroskopisch untersucht werden.

---

<b>pHM</b>	50 % Formamid, deionisiert 4xSSC 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0 0,1 % Tween 20 frisch angesetzt
<b>FHB</b>	2xSSC 10 % Dextransulfat 50 % Formamid, deionisiert 0,05 % Lachssperma-DNA, 0,5 mg/ml bei -20°C, vor Nutzung auf 37°C aufwärmen

#### **4.7.2 Immunfärbung nach DNA FISH (DNA FISH-I) an Imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* (Epigenome NoE – protocol PROT07, Bantignies 2007)**

Die DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung kann, wenn die biologische Fragestellung es erfordert, um einen Immunfärb-Schritt erweitert werden.

Hierzu wurden die Imaginalscheiben nach dem letzten Post-Hybridisierungs-Waschschritt (100 % PBS-Tr) 2 h rotierend bei RT in PBS-Tr/ 10 % Normal Goat Serum (NGS) geblockt und über Nacht mit dem Erstantikörper (in PBS-Tr/ 10 % NGS) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Imaginalscheiben in PBS-Tr gewaschen (3x 5 min, 3x 30 min). Darauf folgte eine einstündige Inkubation im Dunkeln mit dem Zweitantikörper (in PBS-Tr/ 10 % NGS). Die Gewebe wurden wieder in PBS-Tr gewaschen (3x 5 min, 3x 20 min). Final wurden die Imaginalscheiben in 1xPBS überführt, soviel PBS abgenommen bis sich noch etwa 50 µl in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß befanden und mit einer abgeschnittenen 200 µl-Pipettenspitze auf einen Objektträger überführt. Mit Hilfe von saugfähigem Filter-Papier wurde das PBS entfernt und das Probengewebe mit einem Tropfen Fluoromount-G eingedeckelt. Nun konnten die Imaginalscheiben mikroskopisch untersucht werden.

### **4.7.3 DNA FISH an Polytänchromosomen von *Drosophila melanogaster* (modifiziert nach Epigenome NoE – protocol PROT04, Grimaud 2007)**

In der vorliegenden Arbeit diente diese Technik dem Überprüfen der Spezifität der verwendeten DNA-Sonden.

#### **4.7.3.1 Extraktion der Speicheldrüsen der 3. Larve von *Drosophila melanogaster* und Spreizung der Polytänchromosomen (Murawska and Brehm, 2012)**

Für die Extraktion der Speicheldrüsen wurden Larven des 3. Stadiums verwendet. Zwei bis drei Larven wurden in einem kleinen Glasschälchen mit 1xPBS gewaschen. Sie wurden dann in einen Tropfen 1xPBS überführt, der sich auf einem Objektträger unter einem Binokular befand. Mit einer Pinzette wurde das Tier an der Spitze des Beißwerkzeuges gepackt, mit einer weiteren Pinzette am Hinterleib fixiert. Mit gleichmäßigem Zug wurde dann der Kopf entfernt und die Speicheldrüsen frei präpariert. Die Speicheldrüsen wurden anschließend in einen Tropfen Fixierlösung auf einem Deckgläschen überführt und 5 min darin fixiert. Ein Objektträger wurde auf die in Fixierlösung gelagerte Speicheldrüsen gelegt. Mit Hilfe der Radiergummi-Seite eines Bleistiftes wurden die Speicheldrüsen zwischen Deckgläschen und Objektträger zerquetscht. Während des Quetschens wurde das Deckgläschen vorsichtig nach vorne und hinten bewegt, was zum Spreizen der Polytänchromosomen führte. Dann wurde die überschüssige Fixierlösung unter Druck auf das Deckgläschen entfernt, den Objektträger 30 s in flüssigen Stickstoff gehalten und dann das Deckgläschen mit Hilfe eines Skalpell abgesprengt. Die fertigen Objektträger wurden in einem mit 1xPBS gefüllten Farbe-Gefäß überführt.

<b>Fixierlösung</b>	500 µl ddH <sub>2</sub> O
	450 µl Essigsäure
	50 µl 10 % Formaldehyd
	frisch ansetzen, Lösung stabil für 2 Stunden

#### 4.7.3.2 Hybridisierung und Waschen der Proben (nach Epigenome NoE – protocol PROT04, Grimaud 2007)

Die Objektträger wurden anschließend in 2x SSC bei RT überführt und 45 min in einem 70°C heißen Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurden die Objektträger mittels 70 % Ethanol (2x 5 min) und 96 % Ethanol (2x 5 min) dehydriert. Zur Denaturierung der chromosomalen DNA wurde diese 10 min in 0,07 M NaOH inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger in 2xSSC (2x 1 min, 1x 5 min) gewaschen und wie bereits beschrieben dehydriert. Während den Dehydrierungsschritten wurden die Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden für die Hybridisierung vorbereitet. Hierzu wurde je Objektträger 120 ng DNA-Probe in 12 µl Hybridisierungspuffer überführt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis herunter gekühlt. Wieder auf 37°C aufgewärmt, wurden die DNA-Proben auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Hybridisierung fand dann über Nacht bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer statt.

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger 3x 5 min in 2xSSC bei 42°C und 1x 5 min bei RT gewaschen. Bevor die DNA mit Hoechst33342 (10 ng/ml) gefärbt wurde, wurden die Objektträger 15 min in 1xPBS gewaschen. Nach der 10-minütigen Inkubation der DNA mit Hoechst33342 wurden die Objektträger nochmal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit Fluoromount-G eingedeckt. Die Objektträger waren nun fertig zur mikroskopischen Analyse.

<b>20x SSC Puffer</b>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
<b>Hybridisierungspuffer</b>	2xSSC 10 % Dextransulfat 50 % Formamid, deionisiert 0,8 mg/ml Lachssperma-DNA

#### **4.7.4 Immunfluoreszenz an fixierten imaginalen Flügelscheiben von *Drosophila melanogaster* (Klein, 2008)**

Alle durchgeführten Inkubationsschritte erfolgten rotierend und bei RT.

##### **4.7.4.1 Präparation und Fixierung der Imaginalscheiben**

Für die Dissektion der Imaginalscheiben wurden dritte Larven von *Drosophila melanogaster* verwendet. Zwei bis drei Larven wurden in einem kleinen Glasschälchen mit 1xPBS gewaschen. Sie wurden dann in einen Tropfen 1xPBS überführt, der sich auf einem Objektträger unter einem Binokular befand. Mit einer Pinzette wurde das Tier an der Spitze des Beißwerkzeuges gepackt, mit einer weiteren Pinzette am Hinterleib fixiert. Mit gleichmäßigem Zug wurde dann der Kopf entfernt und die Imaginalscheiben frei präpariert. Die frei präparierten Flügel-/bzw. Augenimaginalscheiben wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 1xPBS auf Eis überführt. Die Fixierung der Imaginalscheiben erfolgte in 4 % PFA/ 1xPBS für 20 min rotierend bei RT.

##### **4.7.4.2 Immunfärbung**

Das Fixativ wurde anschließend gegen PBS-Tr (1xPBS/ 0,3 % Triton X-100) ausgetauscht und die Imaginalscheiben 3x 20 min darin gewaschen. Nach dieser Permeabilisierung erfolgte das Blocken unspezifischen Protein-Antikörper-Interaktionen. Hierfür wurden die Gewebe 30 min in *Blocking*-Lösung inkubiert. In der *Blocking*-Lösung wurden die Imaginalscheiben 90 min mit dem Erstantikörper behandelt und anschließend 3x 20 min in PBS-Tr gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper in ebenfalls in der *Blocking*-Lösung für 60 min im Dunklen, gefolgt von einem 20-minütigen Waschriff in PBS-Tr. Die DNA wurde mit Hoechst33342 für 4 min gefärbt und dann nochmals mit PBS-Tr gewaschen.

Final wurden die Imaginalscheiben in 1xPBS überführt, soviel PBS abgenommen bis sich noch etwa 50 µl in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß befanden und mit einer abgeschnittenen 200 µl-Pipettenspitze auf einen Objektträger überführt. Mit Hilfe von saugfähigem Filter-Papier wurde das PBS entfernt und das Probengewebe mit einem Tropfen Fluoromount-G ein gedeckelt. Nun konnten die Imaginalscheiben mikroskopisch untersucht werden.

## 4.8 Arbeiten mit Proteinen

Das Arbeiten mit Proteinen erfolgte immer bei 4°C oder auf Eis.

### 4.8.1 Lagerung von Proteinen

Die Lagerung von Proteinen aus Kern-Extrakten erfolgte in den verwendeten Puffern (s.u.) bei -80°C. Proteine, die durch Protein-A/G – Agarose gewonnen wurden, wurden nach Zugabe von 2x Rotiload-Ladepuffer bei -20°C gelagert.

### 4.8.2 Herstellung von Kernextrakten aus eukaryotischen Zelllinien (Yusufzai et al., 2004)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schneider S2-Zellen verwendet, die stabil mit pRm-HA-FLAG-dCTCF beziehungsweise pRm-HA-FLAG-CP190 transfiziert waren. Die Zellklone wurden jeweils mit 500 mM CuSO<sub>4</sub> für 24 Stunden induziert. Darüber hinaus wurden auch Schneider S2-Wildtyp-Zellen verwendet. Für die Herstellung von Kernextrakt wurden 1 - 5x10<sup>9</sup> Zellen/ Extrakt verwendet. Die Zellen wurden geerntet und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß vereinigt. Die Zellen wurden 2x mit 1xPBS gewaschen und dann mit dem dreifachen Pelletvolumen hypotonischen Puffer schwellen gelassen. Daraufhin wurde die Zellsuspension in einen Homogenisator überführt und 8x *homogenisiert*. Das Zellhomogenat wurde zurück in ein 50ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei 2000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in dem 0,5-fachen Volumen Niedrigsalz-Puffer resuspendiert und 6x *homogenisiert*. Anschließend wurde mit einer 1000 µl Spitze das 0,5-fache Volumen Hochsalz-Puffer dem Homogenat zugeführt. Die Zellyse fand dann für 30 min rotierend bei 4°C statt. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 10800 rpm und 4°C abgetrennt. Der erste Überstand (ÜS1) wurde entnommen, das unlösliche Pellet in 10 ml TGME-Puffer resuspendiert und 8x homogenisiert. Die Suspension wurde mit 100 U/ml Micrococcal Nuclease für 30 min bei RT inkubiert und nochmal 15 min bei 10800 rpm, 4°C zentrifugiert (ÜS2). Der zweite Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Überstand konnte direkt für die Komplexaufreinigung eingesetzt werden oder bei -80°C gelagert werden.

---

<b>Hypotonischer Puffer</b>	10 mM Tris (pH 7,4) 10 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT Protease-Inhibitor-Tabletten
<b>Niedrigsalz-Puffer</b>	20 mM Tris (pH 7,4) 20 mM KCl 25 % Glycin 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA 1 mM DTT Protease-Inhibitor-Tabletten
<b>Hochsalz-Puffer</b>	20 mM Tris (pH 7,4) 1,2 M KCl 25 % Glycin 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA 1 mM DTT Protease-Inhibitor-Tabletten
<b>TGME-Puffer</b>	50 mM Tris (pH 7,9) 25 % Glycin 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 1 mM DTT Protease-Inhibitor-Tabletten

### 4.8.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgt spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Sie basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie-Lösung von 495 nm zu 595 nm, wenn Protein zur Lösung hinzugefügt wird. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 3 µl Proteinlösung mit 200 µl Roti-Quant versetzt und durch Zugabe von ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Die Proben wurden gegen einen proteinfreien Leerwert bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration errechnet sich aufgrund einer Eichkurve gemäß der Formel:

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

### 4.8.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt nach der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970) der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Es handelt sich dabei um eine Größenauftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Deren native Konformation wird durch β-Mercaptoethanol, das eine reduktive Spaltung von Disulfidbrücken induziert, und Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergenz, aufgehoben. Die dadurch bedingte gleichmäßige Einführung negativer Ladung durch SDS bewirkt, dass alle Proteine unabhängig von ihrer eigenen Ladung im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode wandern. Das Separieren der Proteine erfolgt in einem Trenngel (Tabelle A). Zur Herstellung dieses Gels wurde eine entsprechende Menge (5-15 % (w/v) Endkonzentration) einer Acrylamid/ Bisacrylamid-Stammlösung (30:0,8 % (w/v)) mit 1/4 des Endvolumens an Trenngel-Puffer gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O zum Endvolumen aufgefüllt.

Nach Zugabe von SDS, APS und TEMED wurde die Lösung gründlich gemischt und zwischen zwei durch Abstandshaltern getrennte Glasplatten (Bio-Rad-System) bis zu 2/3 der Füllhöhe eingefüllt. Das Trenngel wurde anschließend vorsichtig mit 100 % Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche des Gels zu gewährleisten. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde der Ethanol sorgfältig entfernt. Für das

Sammelgel wurde die benötigte Menge an Acrylamid/Bisacrylamid mit 1/4 des Endvolumens an Sammelgel-Puffer vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O bis zum Endvolumen aufgefüllt (Tabelle A). Nach Zugabe von SDS, APS und TEMED und gründlichem Mischen der Bestandteile wurde die Lösung auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Taschen-Bildung eingebracht.

Nach Polymerisation wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingebaut und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt. Protein-Lösungen wurden mit 1/3 Volumen eines 4-fach konzentrierten SDS-Auftragspuffers supplementiert. Die Proben wurden in einem kochenden Wasserbad 5 min erhitzt. Nachdem die Proben abgekühlt (RT) waren, wurden sie zentrifugiert (1 min, 12000 U/min) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Größenvergleich diente ein mitgeführter Proteinstandard. Die Elektrophorese erfolgte bei RT und Stromstärken von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel.

**Tabelle A: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels**

<b>Trenngel</b>	<b>7,5 %</b>	<b>10 %</b>
ddH <sub>2</sub> O	7,25 ml	6,0 ml
1,5 M Tris/ HCl (pH 8,8)	3,75 ml	3,75 ml
30 % Acrylamid/Bis	3,75 ml	5,0 ml
10 % SDS	150 µl	150 µl
TEMED*	20 µl	20 µl
40 % APS*	70 µl	70 µl

<b>Sammelgel</b>	<b>4 %</b>	<b>5 %</b>
ddH <sub>2</sub> O	6,0 ml	5,7 ml
0,5 M Tris/ HCl (pH 6,8)	2,5 ml	2,5 ml
30 % Acrylamid/Bis	1,4 ml	1,7 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
TEMED*	20 µl	20 µl
40 % APS*	50 µl	50 µl

\* unmittelbar vor Gebrauch hinzugeben

<b>Trenngel-Puffer</b>	1,5 M Tris/ HCl (pH 8,8)
<b>Sammelgel-Puffer</b>	0,5 M Tris/ HCl (pH 6,8)
<b>10x SDS-Laufpuffer (Laemmli)</b>	30,2 g/l Tris/ HCl 144 g/l Glycin 10 g/l SDS
<b>SDS-Auftragspuffer</b>	4x Roti-Load (Roth)

#### 4.8.5 Western-Blot/ Elektroblot

Der Elektroblot 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 dieser Arbeit wurden Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen verwendet, die vor dem Blot-Vorgang durch Inkubation mit Methanol 10 s aktiviert wurden. Es wurde die so genannte „*wetblot*“-Methode angewandt, bei der der Proteintransfer in einem mit Puffer gefüllten Tank erfolgte.

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

Das Transfer-Sandwich wurde wie folgt unter 1 x *wetblot*-Puffer zusammengesetzt (die angegebene Reihenfolge bezieht sich auf die Anordnung von der Anode aus betrachtet): Zunächst eine Puffermatte gefolgt von 2 Filterpapieren, der in Methanol aktivierten Membran, dem Gel mit den aufgetrennten und SDS-beladenen Proteinen, 2 Filterpapieren und einer zweiten Puffermatte. Das in einer Plastikvorrichtung entsprechend zusammengesetzte Sandwich wurde in die *wetblot*-Apparatur (BioRad) eingespannt und in einen Tank eingebracht, der mit kaltem *wetblot*-Puffer gefüllt war. Zusätzlich wurden ein Kühlakku und ein Rührfisch eingesetzt, da die Temperatur während des Transfers stark ansteigt und so die Apparatur vor Überhitzung geschützt wird. Der *wetblot* wurde bei 4°C und 100 V für 1 h auf dem Magnetrührer durchgeführt.

<b>10x <i>wetblot</i>-Puffer</b>	1,92 M Glycin 250 mM Tris
----------------------------------	------------------------------

### 4.8.6 Immundetektion

Proteine, die auf eine PVDF-Membran übertragen wurden, können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979).

Die Immundetektion ist eine sensitive Nachweismethode für Proteine, die auf einer immunologischen Reaktion zwischen einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) und dessen Antigen (Protein) beruht. Zur Visualisierung dieses Antikörper/Antigen-Komplexes dient ein gegen den Primärantikörper gerichteter, enzymgekoppelter Sekundärantikörper. Mehrere Sekundärantikörper können an einen Primärantikörper binden, wodurch eine Signalverstärkung erreicht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden Primärantikörper aus verschiedenen Organismen in Kombination mit geeigneten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern eingesetzt. Nach dem Elektroblob wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen über Nacht bei 4°C (oder für 1 h bei RT) mit einer 5 %igen fettfreien Milchlösung (5 % (w/v) Milchpulver in 1xPBST (1xPBS/ 0,1 % Tween 20)) inkubiert. Die abgesättigte Membran wurde dann für 1 h mit dem in einer 3 %igen fettfreien Milchlösung verdünnten Primärantikörper inkubiert.

Nach drei Waschschrritten (3x 5 min mit 1xPBST) zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Primärantikörpern, wurde die Membran für eine weitere Stunde mit einem entsprechend in 0,5 %iger fettfreier Milchlösung verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen und danach für die Nachweisreaktion mit dem ECL-Kit (Millipore) verwendet. Hierzu wurde die Membran auf einem Stück Haushaltsfolie mit einem Gemisch aus gleichen Anteilen der ECL-Detektionslösung A und B benetzt und für eine Minute inkubiert. Die Signalentstehung beruht auf einer verstärkten Peroxidase-katalysierten 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 reichten Expositionen zwischen 5 s und 5 min aus, um ausreichende Signalintensitäten zu detektieren.

### 4.8.7 Antikörperbefreiung der Membran (*strip*)

Wenn auf einer Membran mittels Immunblot zwei unterschiedliche Proteine untersucht werden sollten, konnte nach der ersten durchgeführten Immundetektion die Membran wieder von den verwendeten Antikörpern befreit werden und einer zweiten Reaktion unterzogen werden.

Hierfür wurde die Membran für mindestens 45 min bei RT in *Strip*-Puffer inkubiert und anschließend mehrmals mit 1xPBST gewaschen. Nun konnte eine weitere Immundetektion (siehe 4.8.6) durchgeführt werden.

<b><i>Strip</i>-Puffer</b>	25 mM Glycin/ HCl (pH 2,0)
	1 % SDS

## 4.9 Analyse von Protein/Protein-Wechselwirkungen

### 4.9.1 Co-Immunpräzipitation (endogene CoIP/ Flag-CoIP)

Die Immunpräzipitation dient der Isolierung und Aufreinigung eines Proteins aus einem Zellextrakt. Ein Antikörper, der spezifisch gegen das gewünschte Protein gerichtet ist, wird an eine unlösliche, inerte Trägersubstanz (Protein A/G-Agarose) gekoppelt. Der konstante Teil des Antikörpers bindet adhäsiv an die entsprechenden Trägersubstanzen, die kovalent an die Agarose gebunden vorliegen.

Zunächst wurden 40 µl Protein-A/G-Beads mit 1 ml Wasch-Puffer equilibriert. Die equilibrierten Beads wurden mit Antikörper und 1 ml Wasch-Puffer versetzt und für 1,5 h bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation (200 rpm, 1 min, 4°C) wurden die Beads zweimal mit 1 ml Waschlösung gewaschen und mit 5 mg Kernextrakt versetzt. Die Proben wurden über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Daraufhin folgten vier Waschrunde mit je 1 ml Waschlösung und die Aufnahme der Proben in 2x Roti-Load. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Vor der SDS-Gelelektrophorese und dem daran anschließendem Western-Blot wurden die Proben 2 min aufgekocht, bei 13000 rpm kurz herunter zentrifugiert und der Überstand auf das Gel geladen. Es musste darauf geachtet werden, dass keine Protein-A/G-Beads mit beladen wurden.

---

<b>Wasch-Puffer</b>	20 mM Tris/ HCl (pH 7,5)
	100 mM NaCl
	0,25 % NP-40

## **4.10 3D-SIM Mikroskopie (Structured Illumination Microscopy)**

SIM ist eine Weitefeldmikroskopie-Technik, die ein Gittermuster auf eine Probe projiziert (Gustafsson, 2000; Heintzmann et al., 2002). Ein Interferenzmuster wird zwischen Gitter und der räumlichen Frequenzinformation, die die Probe enthält, gebildet. Innerhalb der Interferenzmuster wird die hohe räumliche Frequenzinformation der Probe zu einer geringeren räumlichen Frequenz verschoben. Die verschobene Information hin zur geringeren räumlichen Frequenz ist eine Möglichkeit eine höhere Frequenzinformation durch das Objektiv zu bekommen. Um eine Rekonstruktion der Aufnahme der Probe mit hoher Frequenzinformation zu ermöglichen, müssen viele Aufnahmen mit verschiedenen Gitterwinkel und Phasenpositionen genommen werden. Mit Hilfe eines Algorithmus, welches den Frequenzshift und die Dekonvolution heraus nimmt, kann die hohe Frequenzinformation extrahiert werden und eine Aufnahme mit verstärkter Auflösung kann rekonstruiert werden. Die Verbesserung in der Auflösung liegt bei diese Methode um einen Faktor von zwei verglichen zu konfokaler Laserscan-Mikroskopie.

Die Aufnahmen dieser Arbeit wurden mit dem Zeiss Elyra PS1 System gemacht. 3D-SIM-Daten wurden mit einem a 63x 1.4 NA Öbobjektiv gewonnen. Es wurden 488, 561, 642 100 mW Diodenlaser verwendet, um die Fluorophore anzuregen, zusammen mit einem BP 495-575 + LP 750, BP 570-650 + LP 75 oder LP 655 Anregungsfilter. Für 3D-SIM befand sich ein Gitter im Lichtweg. Das Gitter wurde in 5 Phasen und 5 Rotationen moduliert, und z-Ebenen wurden in 110 nm Intervallen mit einer Andor iXon DU 885, 1002x1004 EMCCD Kamera aufgenommen. Roh-Aufnahmen wurden mit der Zeiss Zen Software rekonstruiert.

## 4.11 Bioinformatische Analysen

Die Auswertungen der *Structured Illumination Microscopy* (SIM) Aufnahmen und der konfokalen Laserscan-Mikroskopie (KLSM) Aufnahmen erfolgten mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Schneider et al., 2012) in dem FIJI Programmierumfeld (Schindelin et al., 2012).

Eine Maximumintensitätsprojektion wurde verwendet, um die laterale Position der FISH Sonden zu ermitteln. Dies wurde mit dem *find local maxima* Algorithmus erreicht. Daraufhin wurde die laterale (Z) Koordinate in der originalen 3D-gestapelten Aufnahme ermittelt. 3D Distanzen zwischen jeder ANT-C Sonde und allen BX-C Sonden wurde berechnet und der „nächste Nachbar“ bestimmt (Tabellen 3 – 8)

Für die Messungen der Distanz zwischen den FISH Sonden und dCTCF speckles wurde jede Sonde in ein *Region of Interest* (ROI) zentriert und innerhalb dieses ROI wurden dCTCF Intensitätsmaxima detektiert. Anschließend wurden die Distanzen zwischen dCTCF Intensitätsmaxima und Sonden berechnet (Tabelle 9):

$$\sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}$$

Die Analyse des CP190 Intensitätsmaxima und Ermittlung der Intensität des FLAG-SUMO Signals erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Schneider et al., 2012) in dem FIJI Programmierumfeld (Schindelin et al., 2012). Die Flag-SUMO Signale, die als *integrated density* gemessen wurden, wurden gegen den *background* korrigiert (Tabelle 10-11).

CP190/ dCTCF und CP190/ Polycomb Kolokalisationsanalysen wurden mit Hilfe des ImageJ plug-in *JACoP* (Bolte and Cordelieres, 2006) unter Verwendung des *Manders' coefficient* durchgeführt (Tabelle 12).

## 4.12 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM® SPSS® Statistics Version 22. Die zu untersuchenden Datensätze wurden zunächst auf ihre Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov Smirnov-Test untersucht. Die Verteilung der Daten gibt eine Aussage darüber, welcher Test für die folgende Statistik zur Anwendung kommt.

Aus diesem Grund wurden signifikante Unterschiede in der Distanz zwischen den zu untersuchenden Probenpaaren mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Das Signifikanzlevel war definiert als die zweiseitige asymptotische Signifikanz der Mann-Whitney-U-Statistik ( $p < 0,05$ ).

Die Berechnung signifikanter Unterschiede in der prozentualen Anzahl an *kissing* zwischen den zu untersuchenden Sondenpaaren erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Test. Das Signifikanzlevel war definiert als die zweiseitige asymptotische Signifikanz der Chi-Quadrat-Statistik ( $p < 0,05$ ).

Für die finalen Berechnungen (ANT-C9kb und BX-C10kb) wurden Distanzen über 2  $\mu\text{m}$  ausgeschlossen.

Der Überlapp zwischen CP190/dCTCF Signalen bzw. CP190/Polycomb Signalen wurde mit der ein Varianzanalyse berechnet. Das Signifikanzlevel war definiert als Welch's F ratio ( $p < 0.05$ ).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analyse der eindimensionalen Anordnung von Isolatorproteinen

Das relativ große eukaryotische Genom muss soweit verpackt werden, dass es in den nur wenige  $\mu\text{m}$  großen Zellkern passt. Diese Verpackung ist nicht uniform und es wird angenommen, dass unterschiedliche Verpackungsniveaus Ausdruck spezifischer Regulationsmechanismen des Genoms sein könnten. Diese unterschiedliche Verpackung des Interphase-Genoms wird am besten durch das Bandenmuster von *Drosophila* Polytänchromosomen widergespiegelt, das durch den Wechsel von Banden und Interbanden verursacht wird.

Polytänchromosomen bilden sich in Zellen, die in ihrer Größe zunehmen, sich jedoch während der larvalen Entwicklung nicht teilen. In diesen Zellen sind homologe Chromosomen eng gepaart und unterziehen sich fortlaufend Amplifikationsrunden. Sie durchlaufen mindestens zehn Replikationsrunden ohne Teilung und setzen sich so aus etwa 1000 DNA-Strängen zusammen, die zusammengelagert bleiben (Urata et al., 1995). Polytänchromosomen sind im Lichtmikroskop sichtbar (Agard and Sedat, 1983; Urata et al., 1995) und weisen ein abwechselndes Bandenmuster mit dichten gepackten Banden und weniger dichten Interbanden auf (Balbiani, 1881; Flemming, 1882). Die größere Dichte in Banden reflektiert einen erhöhten DNA-Gehalt und eine stabile Chromatin-Kondensation (Beermann, 1972). Trotz der ungewöhnlichen Struktur können Polytänchromosomen als Interphase-Chromosomen angesehen werden, da sie transkriptionell aktiv sind und auf Hormone und andere Umgebungssignale reagieren.

Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen von Polytänchromosomen ermöglichen die genomweite Analyse der Lokalisation von Chromatin -und DNA-assoziierten Faktoren auf *Drosophila* Chromosomen (Paro, 2008; Schwartz et al., 2004). So kann im eindimensionalen Raum die Verteilung von Chromatin –und DNA assoziierten Faktoren dargestellt werden. Für einige Isolatorproteine konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass sie auf Polytänchromosomen in Interbanden oder an Übergängen zwischen Banden/ Interbanden lokalisiert sind (Capelson and Corces, 2005; Gerasimova et al., 2007; Kurshakova et al., 2007; Mohan et al., 2007; Zhao et al.,

1995), was dafür spricht, dass Isolatoren eventuell für die Begrenzung des Bandenmusters verantwortlich sein könnten.

### 5.1.1 PITA und ZIPIC Signale sind in Interbanden und an Übergängen von Banden/ Interbanden von *Drosophila* Polytänchromosomen lokalisiert

Kürzlich wurden die zwei Isolatorproteine PITA und ZIPIC neu identifiziert (Maksimenko et al., 2015). Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob diese Proteine an typischen Isolatorpositionen, den Banden/ Interbanden-Grenzen, auf *Drosophila* Polytänchromosomen zu finden sind. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob diese Isolatorproteine mit dem bekannten Isolator-Kofaktor CP190 kolokalisieren (Abb. 2A, F).

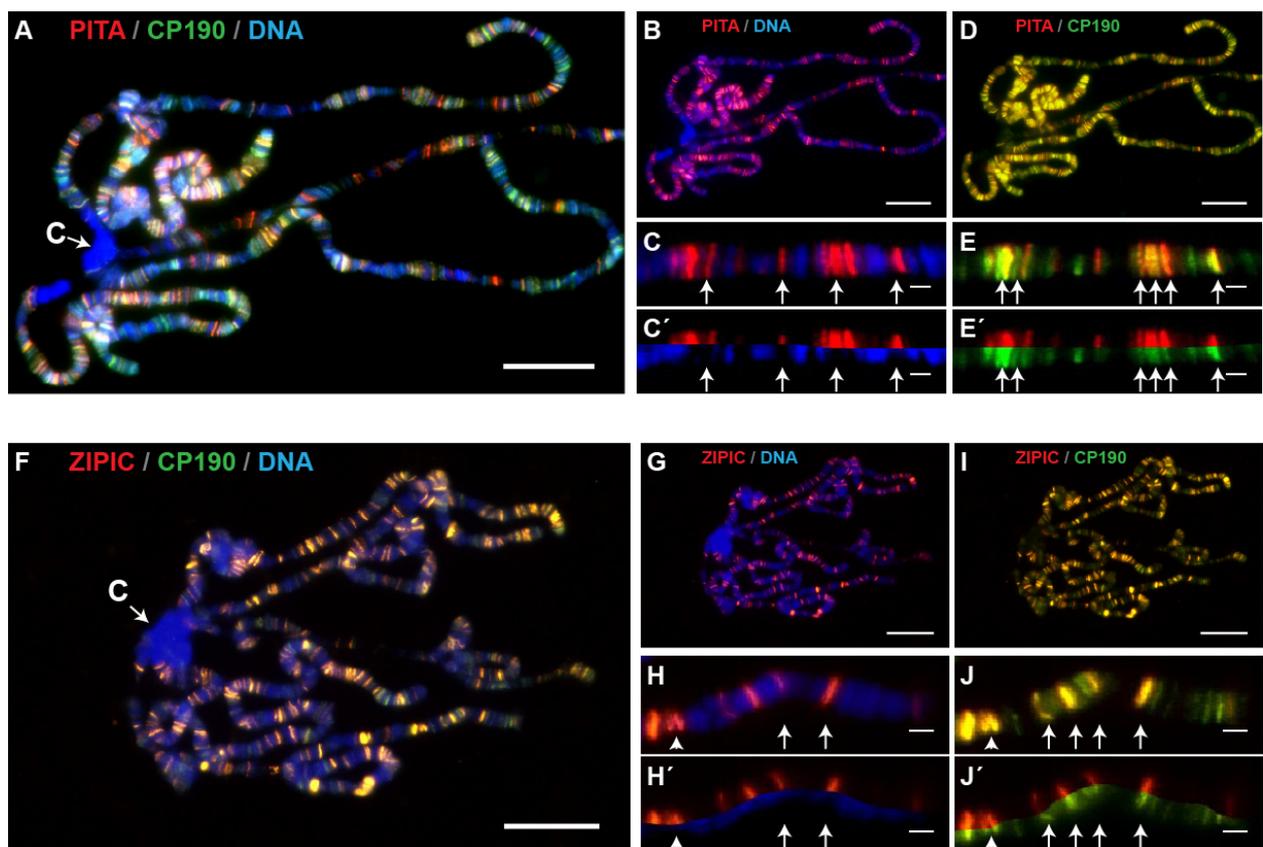


Abb. 2 Detektion von Isolatorproteinen an Interbanden und Übergängen zwischen Interbande/Bande

Immunfärbung an Polytäanchromosomen der Speicheldrüsen dritter Larven von *Drosophila melanogaster* mit Antikörper gegen PITA (rot)/ CP190 (grün) (**A-E'**) und ZIPIC (rot)/ CP190 (grün) (**F-J'**). Ganze Chromosomen, vergrößerte Ausschnitte und *splitview*-Darstellung sind abgebildet. DNA-Färbung erfolgte mit Hoechst33342 (blau). C = Chromozenter. Signale der Isolatorproteine PITA (**B**) und ZIPIC (**G**) sind gleichmäßig über die Arme der Polytäanchromosomen verteilt, wobei weniger ZIPIC-Signale detektiert werden können. PITA (**C, C'**) als auch ZIPIC (**H, H'**) binden an Interbanden oder Übergängen zwischen Interbanden/Banden und werden durch DNA-Banden, gefärbt mit Hoechst33342 (blau), flankiert (Pfeile in vergrößerter Darstellung eines Chromosomenarms; **C'** und **H'**). PITA Signale und ZIPIC Signale kolokalisieren mit CP190 Signalen (**D, I**). CP190 kann an fast allen PITA (**E, E'**) und ZIPIC (**J, J'**) Bindestellen detektiert werden (weiße Pfeile). Länge der Maßstabsbalken beträgt 10  $\mu\text{m}$  (**A, B, D, F, G, I**) bzw. 1  $\mu\text{m}$  (**C, C', E, E', H, H', J, J'**).

Sowohl PITA Signale als auch ZIPIC Signale sind über das gesamte Chromosom verteilt, wohingegen die heterochromatische Chromozenter-Region keine Immunfärbung der Proteine zeigte (Abb. 2B, G). Es lassen sich weniger ZIPIC-Signale als PITA-Signale auf dem Polytäanchromosom erkennen. Genauere Untersuchungen der Signale von PITA und ZIPIC in größerer Auflösung zeigten, dass beide Isolatorproteine in Interbanden und an Übergängen von Banden/ Interbanden detektiert werden konnten (2B-C, C', G-H, H'; Pfeile). Diese Positionen sind typisch für Isolatoren, da sie an der Grenze zwischen kompaktem (Bande) und aufgelockertem (Interbande) Chromatin liegen.

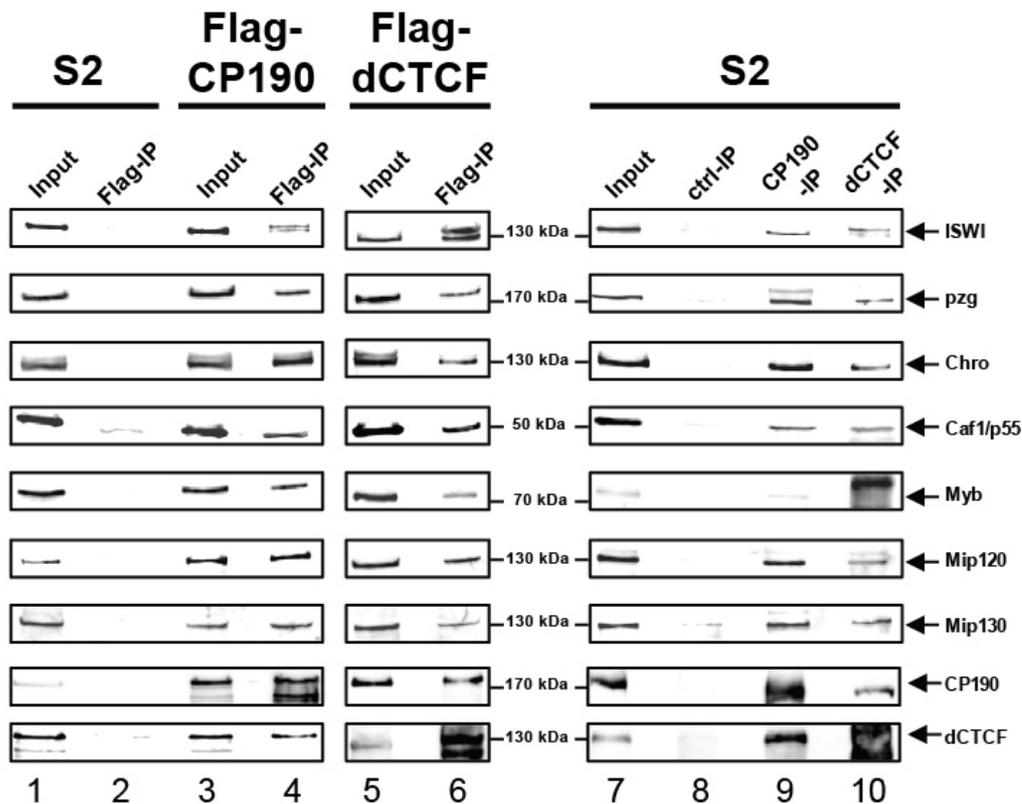
Die Isolatorproteine dCTCF, Su(Hw) und BEAF interagieren mit dem zentrosomalen Protein 190 (CP190). Für PITA und ZIPIC konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie *in vivo* und *in vitro* mit CP190 interagieren (Maksimenko et al., 2015). Sowohl PITA-Signale als auch ZIPIC-Signale zeigten einen Überlapp mit den ebenfalls über das gesamte Polytäanchromosom verteilten CP190 Signalen (Abb. 2D-E', I-J'). Höhere mikroskopische Auflösung ließ erkennen, dass CP190 an fast allen PITA- sowie ZIPIC-Bindestellen detektiert werden konnte (Abb. 2E-E', J-J', weiße Pfeile), was auf eine Interaktion von CP190 mit diesen Isolatorproteinen hindeutete.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen von *Drosophila* Polytäanchromosomen lieferten eine visuelle Darstellung der genomweiten Verteilung der Isolatorproteine PITA und ZIPIC. Darüber hinaus konnte eine Protein-Protein-Interaktion der Isolatorproteine mit CP190 im linearen Genom visualisiert werden.

### 5.1.2 NURF und dREAM Komponenten binden an CP190 und dCTCF

Die Befunde der Kolo-kalisierung der Isolatorproteine mit CP190 (s.o. und weitere Beispiele (Ali et al., 2016)) belegen, dass CP190 eine gemeinsame Funktion aller Isolatorproteine vermittelt. Diese Kolo-kalisation wirkt sich auf die Chromatin-Konformation aus. So konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Bindung des Isolatorproteins dCTCF und CP190 an dCTCF-Bindestellen stark mit nukleosomen-freien Regionen korreliert, wohingegen in Abwesenheit von CP190 kein Unterschied in der Besetzung von dCTCF –und nicht-dCTCF-Bindestellen durch Nukleosomen besteht (Bartkuhn et al., 2009). Um den möglichen molekularen Mechanismus hinter dieser Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden Funktionstest (RNAi Screen) und massenspektrometrische Analysen durchgeführt (Bohla et al., 2014). Diese Analysen dienten der Identifizierung von Kofaktoren von dCTCF und/oder CP190, die möglicherweise Histone und Nukleosomen modifizieren oder *remodelln*. Die durchgeführten Untersuchungen identifizierten Komponenten des *nucleosome remodelling factor* NURF und Komponenten des dREAM Komplexes als Interaktionspartner von dCTCF und CP190 (Bohla et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die durch RNAi Screen und Massenspektrometrie erzielten Daten mittels Co-Immünpräzipitationen (CoIPs) verifiziert (Abb. 3). Hierfür wurden S2-Zellen verwendet, die entweder Flag-CP190 oder Flag-dCTCF nach CuSO<sub>4</sub>-Induktion exprimieren (Bohla et al., 2014). Das über ein FLAG-tag präzipitierte Material wurde auf die Anwesenheit von NURF und dREAM-Komponenten untersucht (Abb. 3). Die Komponenten von NURF (ISWI und CAF-1/ p55) (Übersichtsartikel in Clapier and Cairns (2009)), sowie mit NURF interagierende Faktoren (pzg und Chro) (Hochheimer et al., 2002; Kugler and Nagel, 2010) waren sowohl nach Flag-CP190-Präzipitation als auch nach Flag-dCTCF-Präzipitation angereichert. Dies war ebenfalls für Komponenten des dREAM Komplexes (Myb, Mip120, Mip130 und CAF-1/ p55) (Übersichtsartikel in van den Heuvel and Dyson (2008)) der Fall.



**Abb. 3 Das Isolatorprotein dCTCF und dessen Kofaktor CP190 zeigen Protein-Protein-Interaktionen mit Komponenten von NURF und dREAM in S2-Zellen**

Kernextrakt von S2-Zellen (Spur 1-2, 7-10) und Kernextrakt von S2-Zellen, die CuSo<sub>4</sub>-induzierbar Flag-CP190 (Spur 3-4) und Flag-dCTCF (Spur 5-6) exprimieren, wurden mit Flag-Antikörper (Spur 2, 4, 6), CP190-Antikörper (Spur 9) und dCTCF-Antikörper (Spur 10) präzipitiert. Als Kontrolle diente unspezifisches IgG (Spur 8). Die für die Western Blots verwendeten Antikörper sind rechts angezeigt. Alle getesteten Proteine zeigen eine Interaktion mit Flag-CP190, Flag-dCTCF, sowie endogenem CP190 und dCTCF. Spur 1, 3, 5 und 7: 1 % Input.

Um diese Ergebnisse noch weiter zu bestätigen, wurden Co-IPs mit endogenem CP190 und dCTCF durchgeführt (Abb. 3). Für alle getesteten Antikörper konnten nach Präzipitation von CP190 und dCTCF Signale im Westerblot detektiert werden. Für die diese Co-IPs der endogenen Proteine dienten unspezifische IgG-Präzipitationen als Negativkontrolle.

Da die Interaktion von dCTCF mit CP190 bekannt ist (Mohan et al., 2007) wurden dCTCF und CP190 als Positivkontrollen in allen Co-IPs verwendet. Für beide Proteine

war im Western-Blot ein deutliches Signal sowohl nach Flag-IP (Abb. 3, Spur 4 und 6) als auch nach endogener IP (Abb. 3, Spur 9 und 10) zu erkennen.

Die Flag –als auch die endogenen Co-IPs konnten die massenspektrometrischen Analysen dahingegen bestätigen, dass NURF und dDREAM Komponenten Kofaktoren von CP190 und dCTCF sind.

## 5.2 Analyse der dreidimensionalen Anordnung von Isolatorproteinen

Um Genome in den limitierten Raum eines Zellkerns unterzubringen und das korrekte Ablaufen der Genexpression zu gewährleisten, sind Genome in einer komplexen Weise im dreidimensionalen Zellkern verpackt. Als eine Konsequenz dieser übergeordneten Organisation der Chromosome kommt es zwischen entfernt liegenden genomischen Regionen auf den gleichen oder verschiedenen Chromosomen zu *long-range* Interaktionen.

Die Bildung von *long-range* Chromatin-(Chromatin)-Interaktionen führt zur Bildung von Schleifenstrukturen, die physikalische, topologische und gen-regulatorische Domänen, zusätzlich zu Kontakten zwischen Promotoren und entfernt liegenden regulatorischen Elementen, darstellen. Chromatin-Isolatoren sind hierbei von besonderem Interesse, da sie durch Schleifenstrukturen eine weitreichende Rolle in der Chromatinstruktur und Kernfunktion spielen. Bislang ist jedoch unklar, welche Faktoren die physikalischen Interaktionen, die für die Bildung und Regulation von *long-range* Kontakten benötigt werden, unterstützt. Es wurde postuliert, dass Isolatoren durch Kontakte zwischen Isolatorproteinen mehrfache Chromatinschleifen bilden können, wobei sich diese Kontakte physikalisch als Isolator *bodies* zeigen (Labrador and Corces, 2002). Ausführlichere Details zu Isolator *bodies* bzw. *speckles* siehe Abschnitt 5.2.4.

Im Rahmen dieses Teiles der Arbeit wurde untersucht, ob Isolator *speckles*, über die noch sehr wenig bekannt ist, mit *long-distance* Chromatin-Interaktionsstellen assoziiert sind. Als Model für *long-distance* Interaktion dienten die *Drosophila Hox*-Gencluster Antennapedia Komplex (ANT-C) und Bithorax Komplex (BX-C). Es konnte mit Hilfe von 3D DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (DNA FISH) gezeigt werden, dass *Hox*-

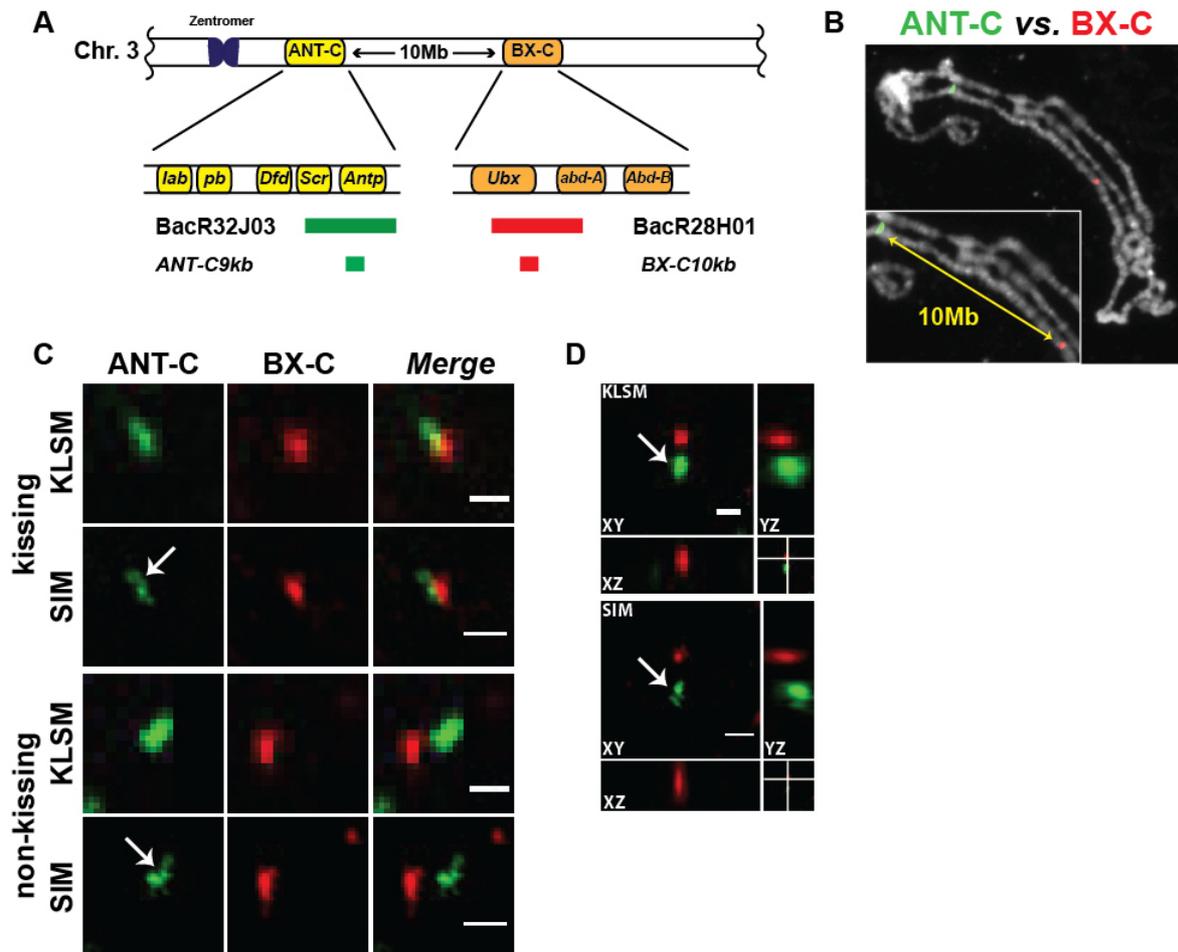
Gene des einen Komplexes mit *Hox*-Genen des anderen Komplexes interagieren können, was als *Hox gene kissing* bezeichnet wird (Bantignies et al., 2011). Darüber hinaus konnten diese *long-range* intrachromosomalen Kontakte mittels *Chromosome Conformation Capture* (3C-Assay), *Chromosome Conformation Capture on ChiP* (4C) und Hi-C (3C Abwandlung) validiert werden (Bantignies et al., 2011; Lanzuolo et al., 2007; Sexton et al., 2012).

DNA FISH ist die Methode der Wahl, um die genomische Organisation in einzelnen Zellen zu untersuchen (Bantignies and Cavalli, 2014). Mit DNA FISH und anschließender Immunfärbung ist es möglich die relative Anordnung von Genen mit nuklearen Sub-Kompartments wie etwa Polycomb *bodies* oder Isolator *speckles* zu untersuchen.

### **5.2.1 Structured Illumination Microscopy (SIM) detektiert Lücken in den hybridisierten BAC-Sonden**

Um *Hox gene kissing* detaillierter und in hoher Auflösung zu untersuchen, wurde DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (DNA FISH) durchgeführt und die daraus resultierenden Präparate vergleichend mit *Structured Illumination* Mikroskopie (SIM) und konfokaler Laserscan-Mikroskopie (KLSM) analysiert. Mit SIM, einer Hochauflösungs –Mikroskopie, wird eine zweifache Verbesserung in lateraler (XY) Auflösung (max. 120 nm Auflösung) gegenüber KLSM erzielt (Gustafsson, 2000).

Das *Hox gene kissing* wurde als visuelle Assoziation des *Antennapedia* (*Antp*) Genes, das im Antennapedia Komplex (ANT-C) lokalisiert ist, und des *Ultrabithorax* (*Ubx*) Genes des Bithorax Komplexes (BX-C) beschrieben (Bantignies et al., 2011). Die zwei Komplexe liegen auf dem rechten Arm von Chromosom 3 (3R) und sind von 10 Mb euchromatischen Sequenzen getrennt (Abb. 4A).



#### Abb.4 Lange DNA FISH Sonden werden mit *Structured Illumination* Mikroskopie (SIM) als nicht-zusammenhängende Signale detektiert

(A) Schematische Darstellung des Antennapedia Komplexes (ANT-C) und Bithorax Komplexes (BX-C) auf dem rechten Arm von Chromosom 3 (3R) von *Drosophila melanogaster*. Die zwei Hox-Gencluster sind linear durch 10 Mb DNA voneinander getrennt. Die verwendeten FISH Sonden, die Teile des ANT-C repräsentieren, sind in grün hervorgehoben. Die FISH Sonden, die spezifisch für den BX-C sind, sind rot dargestellt. Die farbigen Linien kennzeichnen die Lage der langen und kurzen FISH Sonden innerhalb der Komplexe. Für die genaue genomische Position jeder Sonde siehe Tabelle 1. (B) DNA FISH auf Polytäanchrosomen zeigt hohe Spezifität der verwendeten langen BAC-Sonden. Für die ANT-C Sonde als auch die BX-C Sonde ist jeweils nur eine Bande zu sehen. Wie in (A) beschrieben, sind die zwei Hox-Gencluster im linearen Genom 10 Mb voneinander getrennt (gelber Pfeil in vergrößerter Darstellung). (C) DNA FISH mit langen Sonden in Flügelimaginalscheiben zum einen mit *Structured Illumination* Mikroskopie (SIM) mikroskopiert, zum anderen mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie (KLSM). Die verbesserte laterale Auflösung von SIM offenbart ein strukturiertes und lückenhaftes Erscheinungsbild der

FISH Sonden im Falle von *kissing* und *non-kissing Hox*-Genen (weiße Pfeile). *Kissing* ist definiert als Distanz zwischen Intensitätsmittelpunkten der Sondenpaare kleiner als 350 nm (Bantignies et al., 2011). Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu$ m. **(D)** Die orthogonale Ansicht von DNA FISH in Flügelimaginalscheiben zeigt eine verbesserte laterale (XY) und axiale (XZ und YZ) Auflösung mit SIM im Vergleich zu KLSM. Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu$ m.

Für die Untersuchungen wurden direkt-fluoreszenz markierte BAC-Sonden verwendet, die entweder die Sequenzen des ANT-C (BacR32J03) oder des BX-C (BacR28H01) beinhalteten. Diese BAC-Sonden umfassten 190 Mb bzw. 140 Mb der zwei Komplexe. Um die Spezifität dieser sich über einen großen Bereich erstreckenden Sonden zu testen, wurde DNA FISH auf Polytäanchrosomen dritter Larven von *Drosophila melanogaster* durchgeführt (Abb. 4B). Jede der verwendeten Sonden zeigte nur ein deutliches Signal, was die hohe Spezifität der Sonden bestätigte. Dieses Experiment ermöglichte auch, die Entfernung der beiden *Hox*-Gen-Cluster auf dem linearen Genom zu visualisieren (4B, gelber Pfeil in vergrößerter Darstellung). Im nächsten Schritt wurden mit den zuvor getesteten Sonden, Zellkerne von Flügelimaginalscheiben der dritten Larve von *Drosophila melanogaster* hybridisiert und mit SIM bzw. KLSM analysiert. Die durch SIM erzielte verbesserte Auflösung führte zu der Detektion von länglichen und nicht zusammenhängenden FISH Signalen (Abb. 4C, D, Pfeile). Im Hinblick darauf, dass in *Drosophila melanogaster* homologe Chromosomen grundsätzlich in allen somatischen Zellen während der Entwicklung gepaart vorliegen (Metz, 1916), würde man erwarten, dass jede FISH Sonde ein einzelnes Signal zeigt. Die Vermutung lag nahe, dass die verbesserte Auflösung durch SIM es ermöglichte, Unregelmäßigkeiten im Sonden-Labeling und/ oder Hybridisierung zu erkennen. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Länge der FISH Sonden verringert, um die Detektion von fehlerhaften bzw. fragwürdigen Signalen zu vermeiden. Die Länge der neu generierten Sonden betrug zwischen 8 kb und 14 kb (Details siehe Anhang). Auch hier wurden die Sonden zu Beginn der Analysen auf ihre Spezifität untersucht. Der DNA FISH an Polytäanchrosomen zeigte, dass alle Sonden spezifisch waren, da sie jeweils nur ein Signal zeigten (Abb. 5A, Pfeile und vergrößerte Darstellung).

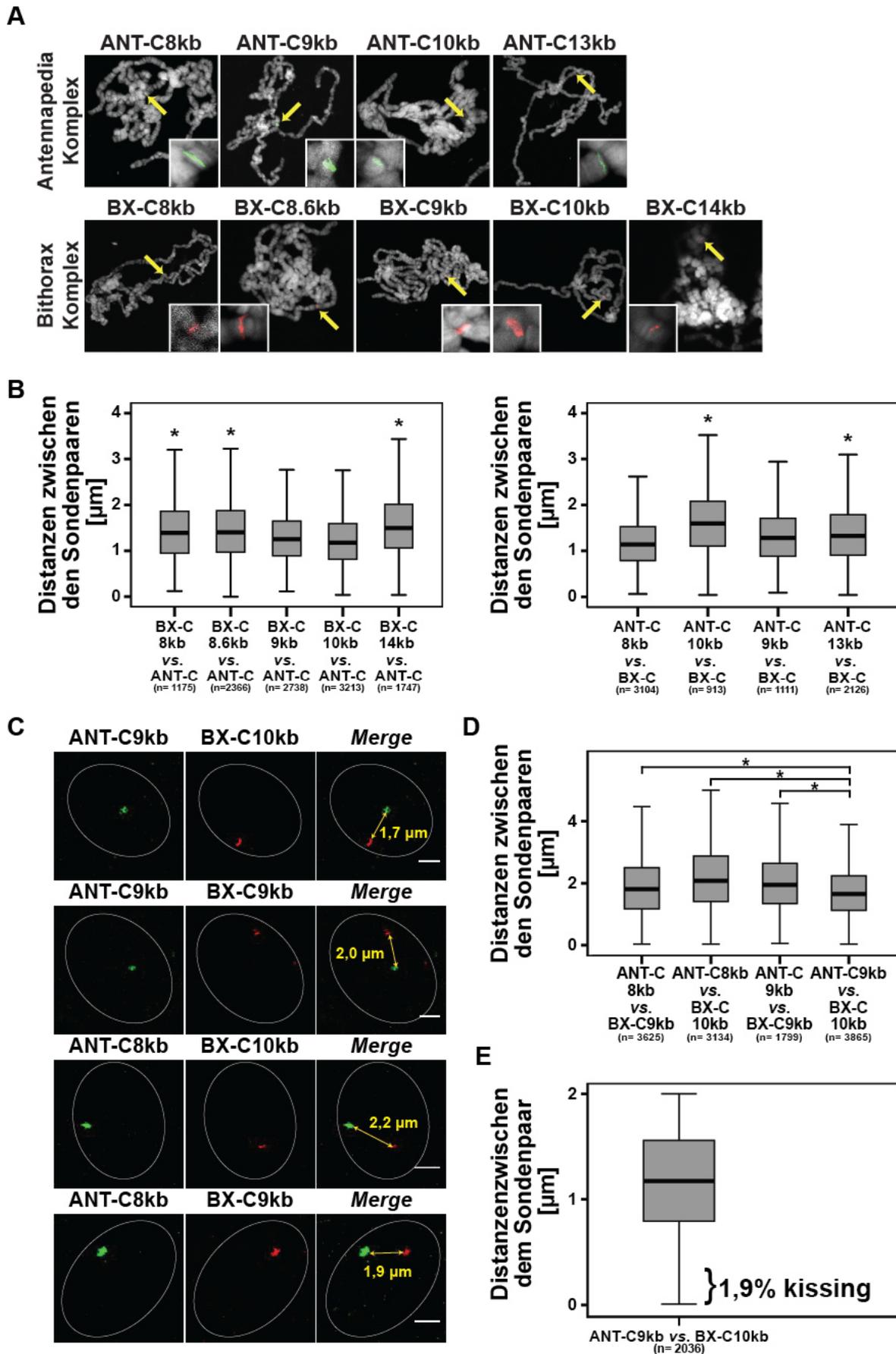


Abb. 5 Das Sondenpaar ANT-C9kb/ BX-C10kb weist die kürzeste Distanz zueinander auf

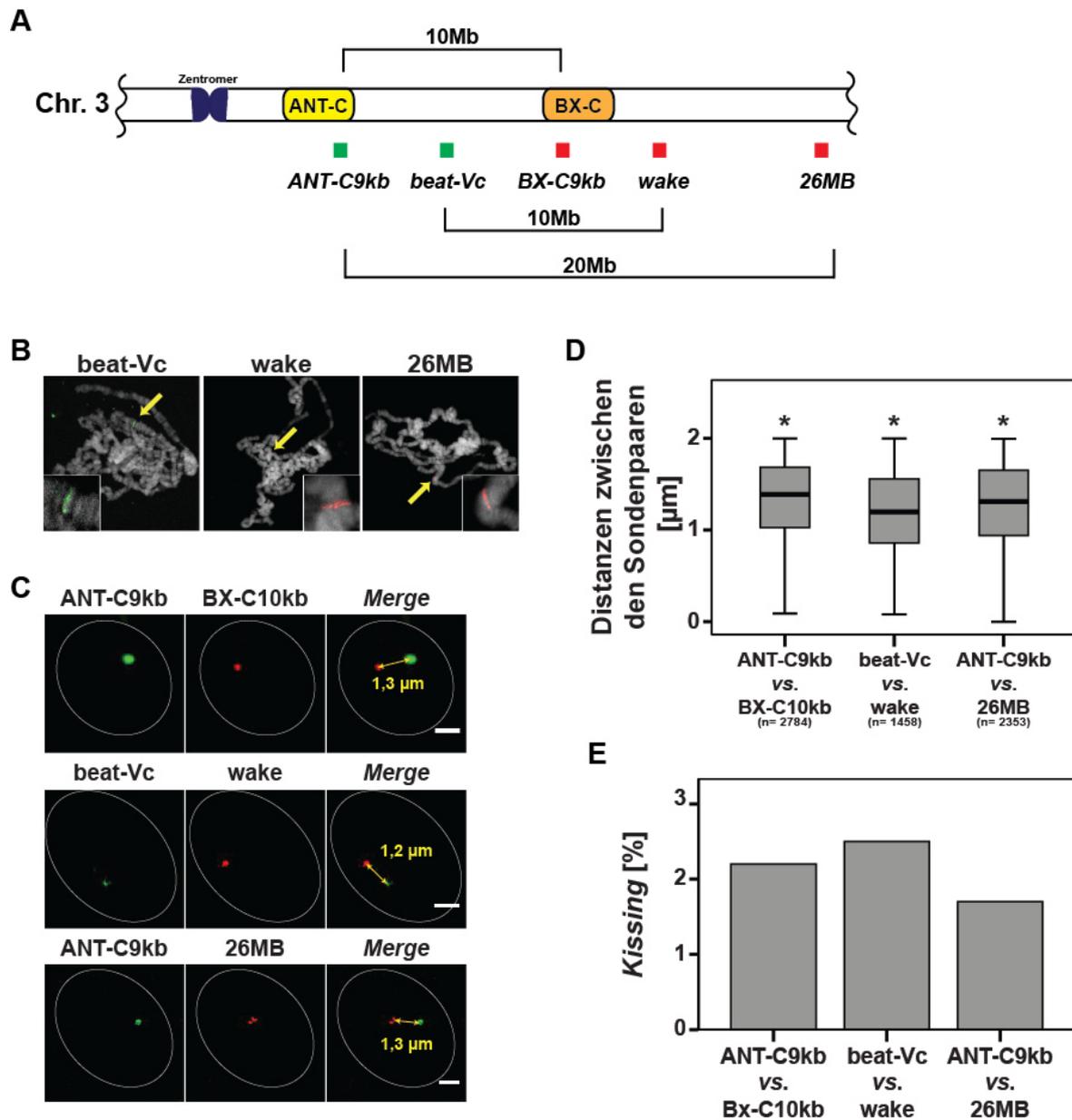
**(A)** DNA FISH auf Polytäanchrosomen bestätigt die hohe Spezifität der kurzen Sonden. Jede der Sonden zeigt ein einzelnes Signal, das deutlich in den eingefügten Vergrößerungen sichtbar wird. **(B)** Hybridisierung jeder einzelnen kurzen Sonde des einen *Hox*-Genclusters mit einer langen Sonde des zweiten *Hox*-Genclusters zeigt geringe, aber dennoch signifikante Unterschiede in der Distanz zwischen den unterschiedlichen Sondenpaaren. BX-C9kb und BX-C10kb sowie ANT-C8kb und ANT-C9kb besitzen die kürzesten Distanzen zu ihrer jeweiligen langen Sonde. Sondenpaare mit signifikant längeren Distanzen zueinander sind mit \* markiert. Für p-Werte der paarweisen Vergleiche der Distanzen siehe Tabelle 2. n = Anzahl untersuchter Zellkerne von Flügelimaginalscheiben. **(C)** Hybridisierung einer der kurzen ANT-C Sonden (ANT-C8kb bzw. ANT-C9kb) mit einer kurzen BX-C Sonde (BX-C9kb bzw. BX-C10kb). Exemplarische Darstellung der Durchschnittsdistanz zwischen den kurzen Sondenpaaren in Zellkernen von Flügelimaginalscheiben. Die mittleren Distanzen sind in der *Merge*-Ansicht dargestellt. Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu$ m. Mikroskopische Aufnahmen: SIM. **(C)** Die Mittelwerte des Boxplots zeigen, dass das Sondenpaar ANT-C9kb/BX-C10kb signifikant näher zueinander liegt (\*) als die anderen Paare. Für p-Werte der paarweisen Vergleiche der Distanzen siehe Tabelle 2. n = Anzahl untersuchter Zellkerne von Flügelimaginalscheiben. **(E)** Prozentuale Anzahl an Kolo-kalisation von ANT-C9kb und BX-C10kb in Zellkernen von Flügelimaginalscheiben. *Hox gene kissing* findet nur in 1,9 % der Zellkerne statt. n = Anzahl untersuchter Zellkerne von Flügelimaginalscheiben.

Angesichts der Tatsache, dass die unmittelbare Nähe der zwei *Hox*-Gencluster im dreidimensionalen Raum in der Beobachtung des *Hox gene kissing* (Bantignies et al., 2011) resultiert, mussten zuerst die Sequenzen bzw. Sonden identifiziert werden, die die geringste Distanz innerhalb des Interphase-Zellkerns zueinander haben. Hierfür wurde jede kurze Sonde mit der des jeweils anderen Locus korrespondierenden langen BAC-Sonde hybridisiert (Abb. 5B). Obwohl die Unterschiede in den Distanzen nicht dramatisch waren, zeigten jedoch zwei ANT-C Sonden (ANT-C8kb und ANT-C9kb) und zwei BX-C Sonden (BX-C9kb und BX-C10kb) signifikant kürzere Distanzen verglichen zu den anderen Sonden. Nun wurden diese Sonden in allen möglichen Kombinationen untereinander hybridisiert. Hieraus resultierend zeigte das Sondenpaar ANT-C9kb und BX-C10kb die kürzeste Distanz zueinander, wobei die mittlere Distanz bei 1,7  $\mu$ m lag (Abb. 5C, D). Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Analysen dieses Sondenpaar verwendet.

### **5.2.2 *Hox gene kissing* ist ein seltenes Ereignis in Interphase-Zellkernen der Flügelimaginalscheibe von *Drosophila melanogaster***

Um die Formation von Isolator *speckles* in der unmittelbaren Umgebung von in Kontakt tretenden (*kissing*) *Hox*-Genen zu untersuchen, wurde die Häufigkeit dieser *kissing* Ereignisse ermittelt. Für die Definition, ob es sich um *Hox gene kissing* oder *non-kissing Hox*-Gene handelt, wurde die in Bantignies et al. (2011) beschriebene Richtlinie angewandt. Hierzu heißt es, dass Sondenpaare als „*Hox gene kissing*“-positiv gewertet werden, wenn die Distanz zwischen den Signal-Intensitätszentren der Sonden weniger als 350 nm beträgt. Durch die Verwendung der kurzen FISH Sonden, in Kombination mit der verbesserten Auflösung der hochauflösenden SIM-Mikroskopie wurde eine, im Vergleich zu bereits publizierten Werten (8 % *Hox gene kissing* in Flügelimaginalscheiben, (Bantignies et al., 2011)), geringere Anzahl an *Hox gene kissing* Ereignissen erwartet. Die verbesserte Tiefenauflösung (z-Ebene) und die schmalen Bildebenen von SIM führten zu einer Abnahme der *Hox gene kissing* Ereignissen. Dies konnte mikroskopisch beobachtet und statistisch belegt werden (Abb. 5E). In nur rund 1,9 % aller Interphase-Zellkerne kommt es zum *long-range* Kontakt zwischen den zwei *Hox*-Genclustern.

Da das *Hox gene kissing* ein sehr seltenes Ereignis ist, stellte sich die Frage, ob die Häufigkeit dieser Interaktion sich von der Häufigkeit zufälliger Interaktionen unterscheidet. Um diese zu untersuchen, wurde DNA FISH mit Negativkontroll-Sonden durchgeführt. Es wurden Sondenpaare entwickelt, die nicht miteinander interagieren sollten. Eines dieser Sondenpaare war *beat-Vc* und *wake* (Bantignies et al., 2011), welches sich auch auf Chromosom 3R befindet und, wie ANT-C9kb/ BX-C10kb, 10 Mb auf dem Chromosom voneinander getrennt vorliegt (Abb. 6A). Sowohl *beat-Vc* als auch *wake* (CG17622) sind keine Polycomb-Zielgene und kolokalisieren in weniger als 5 % der Zellkerne (Bantignies et al., 2011). Das zweite Sondenpaar ANT-C9kb/ 26Mb war, anders als die bereits beschrieben, 20 Mb auf dem linearen Genom voneinander separiert, jedoch ebenfalls auf dem Chromosom 3R lokalisiert (Abb. 6A).



**Abb. 6 *Hox gene kissing* ist ein seltenes Ereignis in Interphase-Zellkernen von *Drosophila melanogaster***

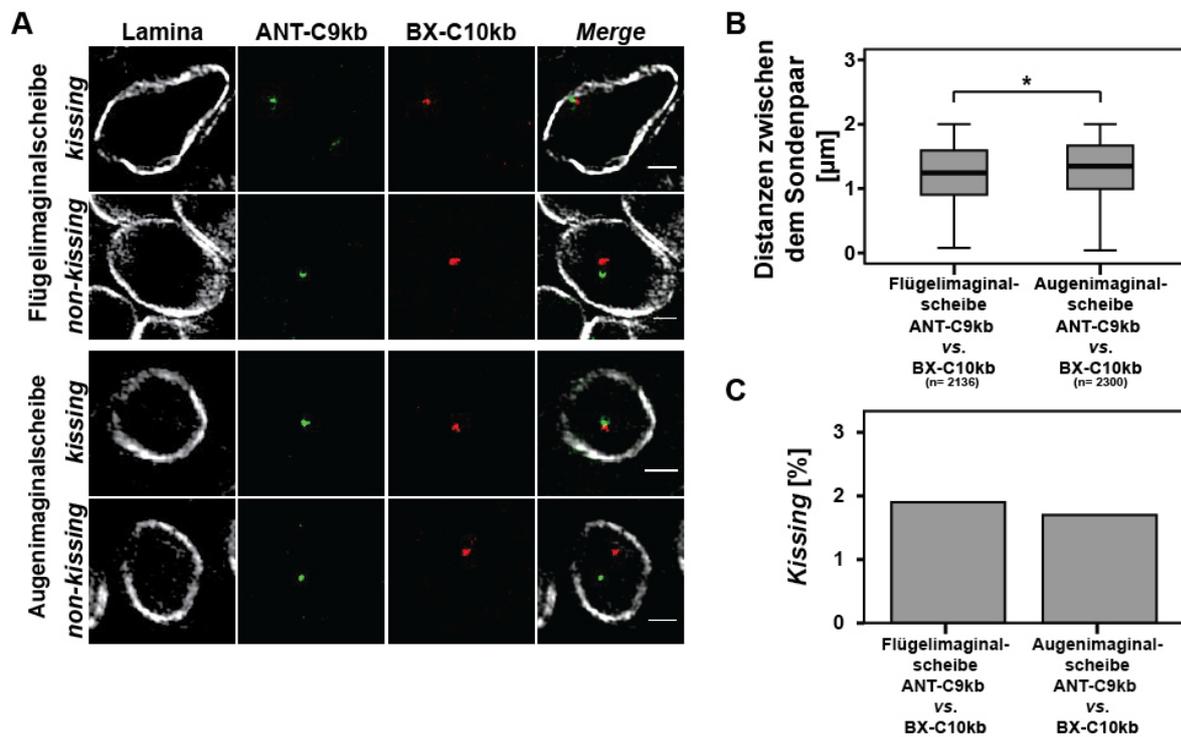
(A) Schematische Darstellung der Position der positiven und negativen Kontroll-Sonden auf Chromosom 3R. Die Farbe der dargestellten Sonden spiegeln auch die verwendeten Farben für die FISH Sonden wider. Beat-Vc und wake sind beschriebene *non-kissing* Stellen (Bantignies et al., 2011) und durch etwa 10 Mb voneinander getrennt. Die lineare Distanz zwischen dem zweiten Negativkontroll-Paar ANT-C9kb/ 26MB ist ungefähr zweimal so lang (20Mb). (B) DNA FISH auf Polyänchromosomen bestätigt die hohe Spezifität der Kontrollsonden. Jede der Sonden zeigt ein deutliches Einzelsignal (hervorgehoben durch gelbe Pfeile und vergrößerte Darstellung). (C) SIM-Aufnahmen von Zellkernen, die die mittlere Distanz zwischen den Sondenpaaren zeigt. Die durchschnittlichen Distanzen sind in den

*Merge*-Aufnahmen hervorgehoben und in (D) rechnerisch ermittelt. Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu\text{m}$ . (D) Geringe, jedoch signifikante Unterschiede in den Distanzen zwischen den Sondenpaaren. Die drei untersuchten Paare zeigen eine mittlere Distanz von 1,2 bzw. 1,3  $\mu\text{m}$ . Die p-Werte der paarweisen Vergleiche  $p < 0,05$ . n = Anzahl untersuchter Zellkerne von Flügelimaginalscheiben. (E) Kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Anzahl an *Hox gene kissing* zwischen dem positiven Sondenpaar ANT-C9kb/ BX-C10kb und dem negativen Paar beat-Vc/ wake sowie dem negativen Sondenpaar ANT-C9kb/ 26MB, welches die doppelte Distanz auf dem Chromosom zueinander besitzt. Das *Hox gene kissing* spielt sich in den drei untersuchten Fällen in einem Bereich von 1,5 % bis 2,5 % der Zellkerne ab.

Bevor die eigentlichen Distanzanalysen durchgeführt wurden, wurden die FISH Sonden auf Polytänochrosomen hybridisiert, um ihre Spezifität zu untersuchen. Alle Sonden zeigten nur ein Einzelsignal, was für eine hohe Spezifität spricht (Abb. 6B, Pfeile und vergrößerte Darstellung). Die Sonden konnten für die anschließenden Distanzmessungen eingesetzt werden. Alle drei Kombinationen, das spezifische Sondenpaar ANT-C9kb/ BX-C10kb, wie auch die Negativkontrollpaare beat-Vc/ wake und ANT-C9kb/ 26MB unterschieden sich untereinander signifikant in ihrer durchschnittlichen Distanz (Abb. 6C, D). Aus diesen Distanzwerten wurde der prozentuale Anteil an *Hox gene kissing* Ereignissen ermittelt (Abb. 6E). Das *kissing* lag in einem Bereich zwischen 1,8 % und 2,5 % der untersuchten Zellkerne und es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem spezifischen Sondenpaar ANT-C9kb/ BX-C10kb und den Negativkontrollpaaren.

### **5.2.3 Kein signifikanter Unterschied im Auftreten von *Hox gene kissing* zwischen Flügelimaginalscheibe und Augenimaginalscheibe**

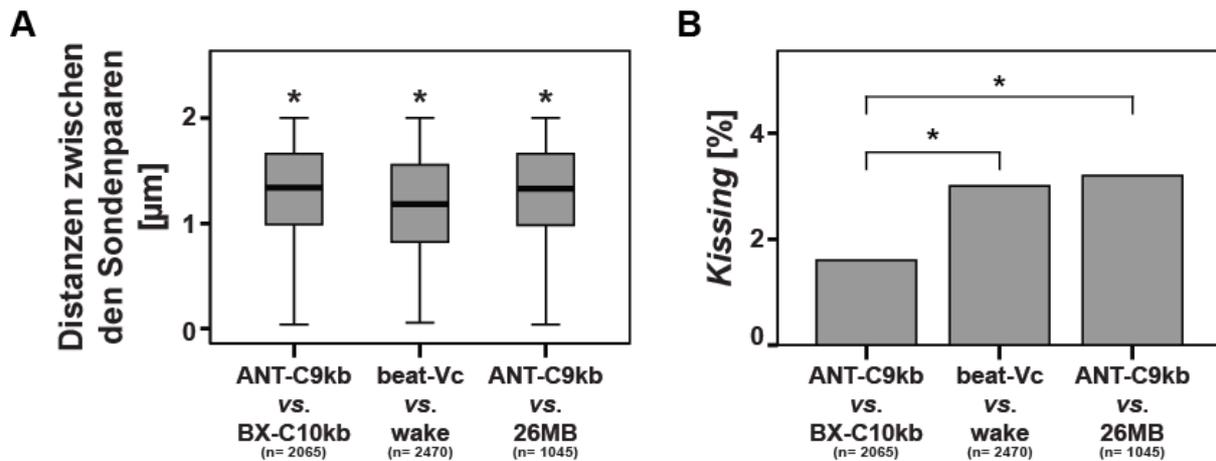
Um die oben gemachten Beobachtungen verallgemeinern zu können, wurden statt Flügelimaginalscheiben Augenimaginalscheiben verwendet. Für diese konnte unlängst deutlich häufiger ein *Hox gene kissing* Ereignis gezeigt werden (28 % vs. 8 %, Bantignies et al. (2011)). Aus diesem Grund wurden Augenimaginalscheiben mit ANT-C9kb/ BX-C10kb hybridisiert (Abb. 7A).



**Abb. 7 Kein Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von *Hox gene kissing* in Zellkernen von Flügelimaginalscheiben und Augenimaginalscheiben**

(A) SIM-Aufnahmen von Zellkernen von Flügelimaginalscheiben und Augenimaginalscheiben nach Hybridisierung mit dem Sondenpaar ANT-C9kb/ BX-C10kb und darauffolgender Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Lamin (Lamina). Die Zellkerne wurden eingeteilt in *kissing* und *non-kissing Hox*-Gene. Länge der Maßstabsbalken beträgt 1 μm. (B) Geringer, aber dennoch signifikanter Unterschied in der mittleren Distanz zwischen ANT-C9kb und BX-C10kb in Flügelimaginalscheiben und Augenimaginalscheiben. Die Distanzen sind in Flügelimaginalscheiben kürzer als in Augenimaginalscheiben. Der p-Wert ist < 0,05. (C) Die prozentuale Anzahl an *Hox gene kissing* ist in einem Bereich zwischen 1,7 % und 1,9 % und nicht signifikant unterschiedlich in den zwei Geweben.

Im Vergleich zu Interphase-Zellkernen von Flügelimaginalscheiben ist die mittlere Distanz zwischen dem Sondenpaar in Augenimaginalscheiben signifikant größer (Abb. 7B). In den daraus resultierenden prozentualen *Hox gene kissing* Häufigkeiten konnte kein Unterschied zwischen Flügel –und Augenimaginalscheibe ermittelt werden (Abb. 7C). Für beide Gewebe lag die Häufigkeit bei unter 2 %.



### Abb. 8 *Hox gene kissing* ist auch in Augenimaginalscheiben ein seltenes Ereignis

**(A)** Geringe, jedoch signifikante Unterschiede in den Distanzen zwischen den Sondenpaaren. Die drei untersuchten Paare zeigen eine mittlere Distanz von 1,2 bzw. 1,3  $\mu\text{m}$ . Die p-Werte der paarweisen Vergleiche  $p < 0,05$ .  $n$  = Anzahl untersuchter Zellkerne von Augenimaginalscheiben. **(B)** Signifikanter Unterschied in der prozentualen Anzahl an *Hox gene kissing* zwischen dem positiven Sondenpaar ANT-C9kb/ BX-C10kb und dem negative Paar beat-Vc/ wake sowie dem negativen Sondenpaar ANT-C9kb/ 26MB ( $p < 0,05$ ). Das positive Sondenpaar ANT-C9kb/ BX-C10kb zeigt die geringste prozentuale Anzahl an *Hox gene kissing* (1,6 % vs. 3,0 bzw. 3,2 %).  $n$  = Anzahl untersuchter Zellkerne von Flügelimaginalscheiben.

Anders als in Flügelimaginalscheiben konnte in Augenimaginalscheiben ein signifikanter Unterschied zwischen positiven Sondenpaar und negativen Kontrollpaaren in Bezug auf *Hox gene kissing* Häufigkeiten gezeigt werden (Abb. 8B). Wider den Erwartungen zeigten die Negativkontrollpaare signifikant häufiger *kissing* Ereignisse als das positive Sondenpaar (3,0 bzw. 3,2 % vs. 1,6 % *Hox gene kissing*). Die mittleren Distanzen der drei Kombinationen unterschieden sich, wie auch bei den Flügelimaginalscheiben untereinander gering, aber dennoch signifikant (Abb. 8A).

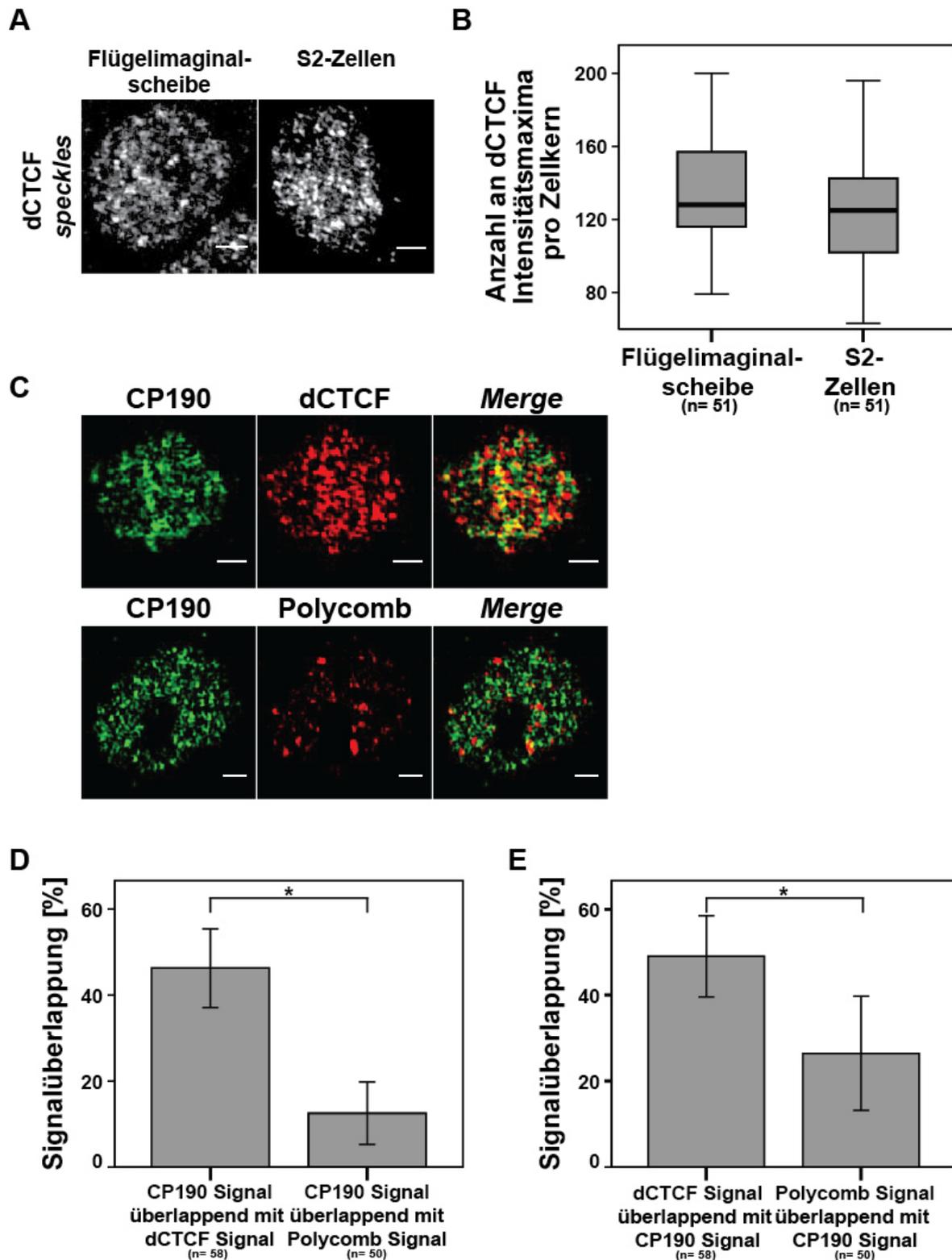
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die detaillierte FISH Analyse mit hochauflösender SIM Mikroskopie in Flügel –und Augenimaginalscheiben kein vermehrtes Zusammenkommen der weit voneinander entfernt liegenden *Hox*-Gencluster zeigt. Trotz der geringen Häufigkeit des *Hox gene kissing* wurde im Folgenden eine potentielle Assoziation mit Isolator *speckles* untersucht.

## 5.2.4 Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* sind unterschiedliche Strukturen

*Drosophila* Isolator *bodies* sind große Strukturen in Interphase-Zellkernen, in denen Isolatorproteine kolokalisieren. Frühere Publikationen legten nahe, dass Isolator *bodies* große Kernstrukturen von fünf bis 25 *bodies* pro Zellkern sind, gekennzeichnet durch die Isolatorproteine Su(Hw), Mod(mdg4)67.2 (Gerasimova et al., 2000; Gerasimova and Corces, 1998), CP190 (Pai et al., 2004) und dCTCF (Gerasimova et al., 2007). Darüber hinaus zeigten diese Ergebnisse, dass Isolatorproteine zusammen wirken, um Isolator *bodies* zu formen. Es wird postuliert, dass Isolator *bodies* als Kontaktstellen von funktionellen Isolatoren im dreidimensionalen Raum des Interphase-Zellkerns dienen (Gerasimova et al., 2007).

Diese Ergebnisse werden jedoch kontrovers diskutiert. Golovnin et al. (2008, 2012) konnte zeigen, dass Isolator *bodies* nicht als Kontaktstelle von Isolatoren fungieren sondern eher als aggregierte Proteine. Für Isolator *bodies* konnte des Weiteren gezeigt werden, dass diese Strukturen sich als Reaktion auf Osmosestress durch die Vereinigung von diffus verteilten *speckles* in Isolator *bodies* (Schoborg et al., 2013) bilden. Im Gegensatz zu den großen Isolator *bodies*, sind die deutlich feineren Strukturen von Isolator *speckles* bis jetzt nicht gut charakterisiert. Es ist lediglich bekannt, dass die Aggregation von diffus verteilten Isolator *speckles* einerseits und die funktionelle Aktivität der Isolatorproteine andererseits von CP190 und SUMO abhängig ist (Golovnin et al., 2012) und EAST mit CP190 und Mod(mdg4)-67.2 interagiert und die Aggregation in nukleare *speckles* reguliert (Golovnin et al., 2015).

Mit Hilfe der hochauflösenden SIM-Mikroskopie wurden die Eigenschaften und Merkmale von Isolator *speckles* erneut analysiert. Hierfür wurden Interphase-Zellkerne von Flügelimaginalscheiben bzw. S2-Zellen mit Antikörper gegen dCTCF gefärbt. Die Anzahl an *speckles* wurde durch das Zählen der Anzahl an Intensitätsmaxima der Färbung ermittelt. Es wurden im Mittel 136 dCTCF *speckles* in den Interphase-Zellkernen von Flügelimaginalscheiben gezählt und durchschnittlich 128 dCTCF *speckles* in S2-Zellen (Abb. 9A, B).

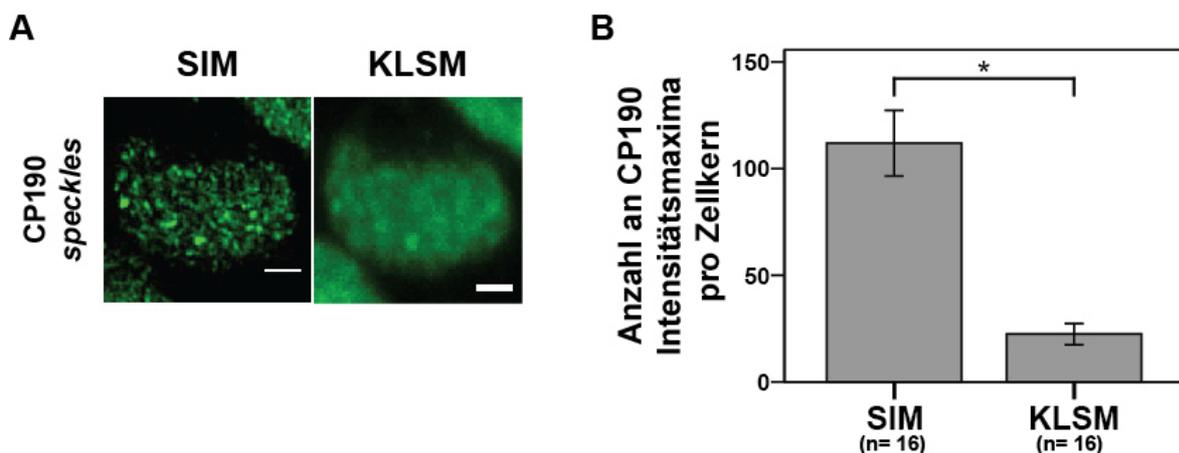


**Abb. 9 Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* sind unterschiedliche Kernstrukturen**

(A) Interphase-Zellkerne von *Drosophila melanogaster* Flügelimaginalscheiben und S2-Zellen nach Immunfärbung von dCTCF und SIM-Analyse. Die dCTCF *speckles* sind über den ganzen Zellkern verteilt und in Größe/Dichte in beiden Zellkern-Typen ähnlich. Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu$ m. (B) Beide Zelltypen enthalten etwa die gleiche Anzahl an

dCTCF Isolator *speckles* (136 *speckles* vs. 128 *speckles*). **(C)** S2 Zellkerne gefärbt mit Antikörper gegen dCTCF und CP190 (obere Aufnahmen) und gegen CP190 und Polycomb (untere Aufnahmen). In den *Merge*-Aufnahmen sind überlappende Signale zuerkennen (gelbe Signale). Mikroskopische Aufnahmen: SIM. Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu\text{m}$ . **(D)** Der prozentuale Anteil an CP190 Signalen, der mit dCTCF Signalen überlappt, ist signifikant größer als der prozentuale Anteil an CP190 Signalen, der mit Polycomb Signalen überlappt.  $n$  = Anzahl untersuchter Zellkerne von S2-Zellen. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an ( $p < 0,05$ ). **(E)** Vergleich der dCTCF Signale, die mit CP190 Signalen überlappen und Polycomb Signale, die mit CP190 Signalen überlappen. Untersucht wurden dieselben Zellkerne wie in (D). Es traten signifikant häufiger überlappende Signale von dCTCF/ CP190 auf ( $p < 0,05$ ).

Auch hier lag die Vermutung nahe, dass diese hohe Anzahl an *speckles* innerhalb der Zellkerne aus der verbesserten Auflösung der SIM-Mikroskopie resultierte. Dies konnte auch durch vergleichende Analysen bestätigt werden, da sich zeigte, dass mit KLSM nur etwa 22 CP190 *speckles* detektiert werden konnten, wohingegen mit SIM im Mittel 112 CP190 *speckles* pro Zellkern gezählt wurden (Abb. 10).



**Abb. 10** Der Vergleich zwischen SIM -und KLSM-Aufnahmen zeigt eine deutliche Zunahme an CP190 *speckles*

**(A)** Interphase-Zellkerne von *Drosophila melanogaster* Flügelimaginalscheiben nach Immunfärbung von CP190. Die gleichen Zellkerne wurden mit SIM sowie mit KLSM

mikroskopiert. Die verbesserte Auflösung mit SIM führte zu einer vermehrten Detektion von CP190 *speckles*. Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu\text{m}$ . **(B)** Direkter Vergleich von Zellkernen aufgenommen mit SIM und KLSM zeigt einen signifikanten Unterschied in der Anzahl von CP190 *speckles* pro Zellkern (112 *speckles* vs. 22 *speckles*). Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an ( $p < 0,05$ ).  $n$  = Anzahl untersuchter Zellkerne von Flügelimaginalscheiben.

Im nächsten Schritt wurde genauer untersucht, ob es in der Anzahl und der Morphologie der *speckles* Unterschiede zwischen Gewebe und Zellkultur gab. Zwischen den zwei untersuchten Zelltypen, Zellkerne von Flügelimaginalscheiben und S2-Zellen, gab es weder in der Morphologie noch in der Anzahl an dCTCF *speckles* signifikante Unterschiede. Die *speckles* waren in beiden Fällen über den ganzen Zellkern verteilt, mit einer durchschnittlichen Anzahl von 128 dCTCF *speckles* in S2-Zellen und 136 dCTCF *speckles* in Flügelimaginalscheiben (Abb. 9A, B).

Um die Isolator *speckles* weiter zu charakterisieren, wurde untersucht, ob der Isolator-Kofaktor CP190 (Centrosomales Protein 190) mit den dCTCF *speckles* kolokalisiert und ob sich Isolator *speckles* von anderen Kernstrukturen, wie z.B. den Polycomb *bodies*, unterscheiden. Eine mögliche Verbindung zwischen Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* kann darin gesehen werden, dass Isolatorproteine, und nicht Polycomb *bodies*, für *long-range* Interaktion von Polycomb-Zielen benötigt werden (Li et al., 2011). Aus diesem Grund war es vorstellbar, dass Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* gemeinsame Strukturen darstellen. Um dies zu beantworten, wurde zuerst die Überlappung zwischen CP190 *speckles* und dCTCF *speckles* sowie der Überlapp zwischen CP190 *speckles* und Polycomb *bodies* untersucht (Abb. 9C-E). Wie von den Interaktionspartnern CP190 und dCTCF (Mohan et al., 2007) zu erwarten, kolokalisierten fast 50 % aller CP190 Signale mit dCTCF Signalen und umgekehrt. Im Vergleich dazu war die Überlappung von CP190 Signalen mit Polycomb Signalen signifikant geringer (Abb. 9D) und lag bei etwa 26 %. Diese geringere Kolokalisation konnte auch durch den Vergleich der Überlagerungen (*Merge*-Aufnahmen - gelbe Signale) der CP190/ dCTCF-Färbung und CP190/ Polycomb-Färbung visualisiert werden (Abb. 9C). Um herauszufinden, ob die geringere Kolokalisation nicht durch die Tatsache begründet ist, dass es deutlich weniger Polycomb *bodies* als Isolator *speckles* gibt, wurde die prozentuale Überlappung an dCTCF Signal mit CP190 Signal sowie die prozentuale Überlappung an Polycomb Signal mit CP190 Signal ermittelt

(Abb. 9E). Obwohl die Anzahl an Polycomb *bodies* deutlich unter der Anzahl an dCTCF *speckles* liegt, zeigten nur 26 % aller Polycomb Signale einen Überlapp mit CP190 wohingegen 46 % aller dCTCF *speckles* mit CP190 *speckles* überlappten.

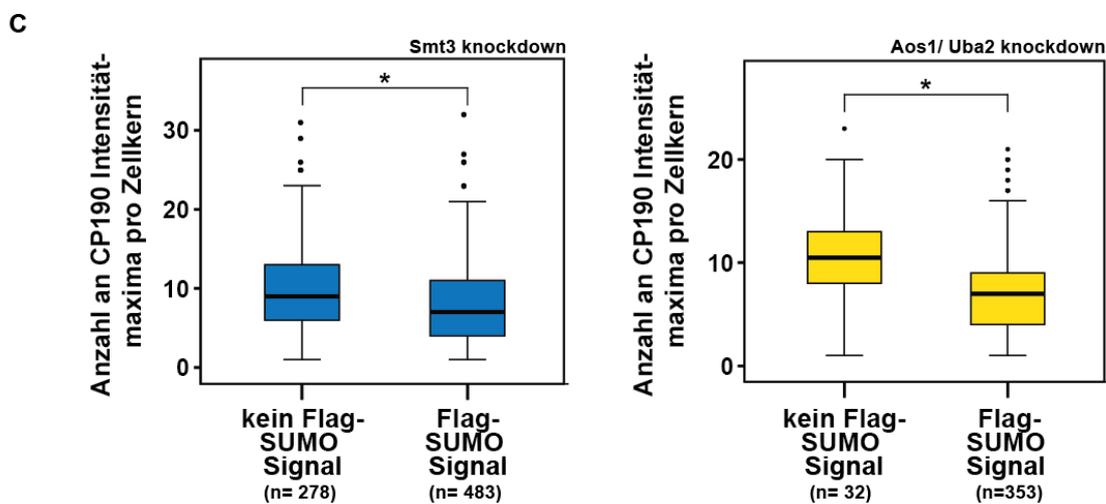
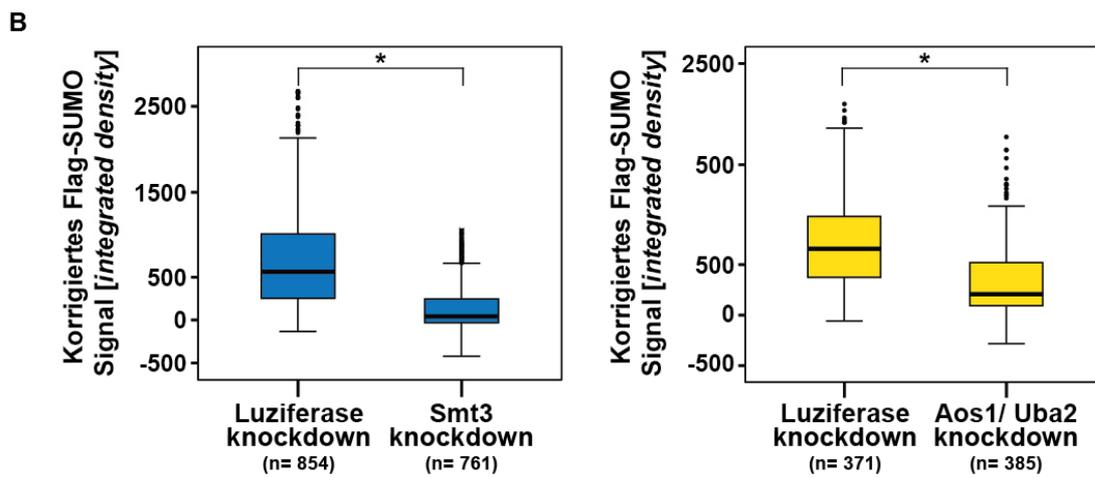
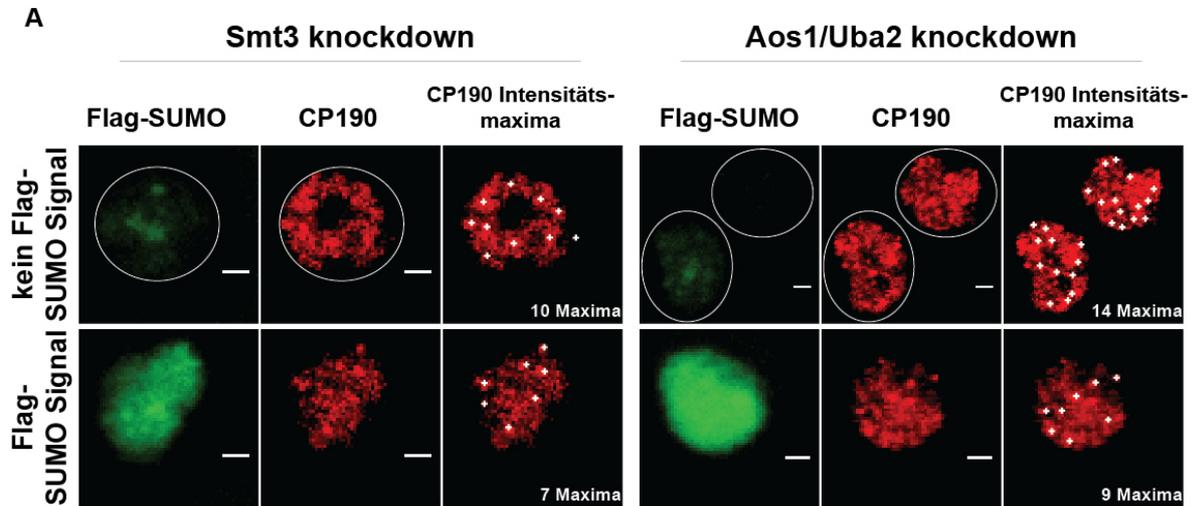
### 5.2.5 Flag-SUMO hat einen negativen Effekt auf die Bildung von Isolator *speckles*

Im Gegensatz zu den großen Isolator *bodies*, sind die deutlich feineren Strukturen von Isolator *speckles* bis jetzt unzureichend untersucht. Ein Aspekt, der kaum beschrieben wurde, ist der Einfluss von post-translationelle Modifizierungen auf die Bildung von Isolator *speckles*. SUMOylierung stellt eine mögliche Modifikation dar, die einen Einfluss auf Isolator *speckles* haben könnte. Sumoylierung von Proteinen ist für eine Reihe von Vorgängen in der Zellen essentiell, wie etwa die Regulation der Transkriptionsaktivität, die sub-nukleare Zielbestimmung und die Bildung von nuklearen Kompartimenten, wie z.B. PML *bodies*.

Es konnte gezeigt werden, dass CP190 und Mod(mdg4)2.2, zwei Komponenten des *gypsy* Isolators, *in vivo* und *in vitro* sumoyliert vorliegen (Capelson and Corces, 2006). Gegenwärtig wird der Einfluss von Sumoylierung in der Organisation von Isolator *speckles* bzw. Isolator *bodies* kontrovers diskutiert. Zum einen gibt es den Bericht, dass SUMO essentiell für die Vereinigung von Isolatorproteinen in Isolator *speckles* ist (Golovnin et al., 2012). Der Knockdown von SUMO führte zu einer diffusen Verteilung der Isolatorproteine innerhalb der Zellkerne von S2-Zellen. Gegenteilig dazu konnte gezeigt werden, dass Sumoylierung die Bildung von Isolator *bodies* behindert. Sumoylierung von CP190 und Mod(mdg4)2.2 interferiert mit deren Selbst-Interaktionen und resultiert in der fehlenden Bildung von Isolator *bodies* (Capelson and Corces, 2006).

Um die Rolle von SUMO in der Organisation von Isolator *speckles* zu beurteilen, wurden Immunfärbungen nach Knockdown von SUMO bzw. SUMO-aktivierender Enzyme durchgeführt. Die RNA-Interferenz (RNAi) Assays ermöglichten es, den Einfluss durch das Fehlen bzw. die Reduzierung von SUMO auf die Bildung von Isolator *speckles* zu untersuchen. Der Knockdown von Smt3 (*Drosophila* SUMO), als auch der Doppel-Knockdown von Aos1 (SUMO-aktivierendes Enzym 1)/ Uba2

(SUMO-aktivierendes Enzym 2) führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Reduzierung des, gegen den *background* korrigierten, Flag-SUMO Signals (Abb. 11A).



**Abb. 11 Sumoylierung führt zur Abnahme an Isolator speckles innerhalb von Interphase-Zellkernen von S2-Zellen**

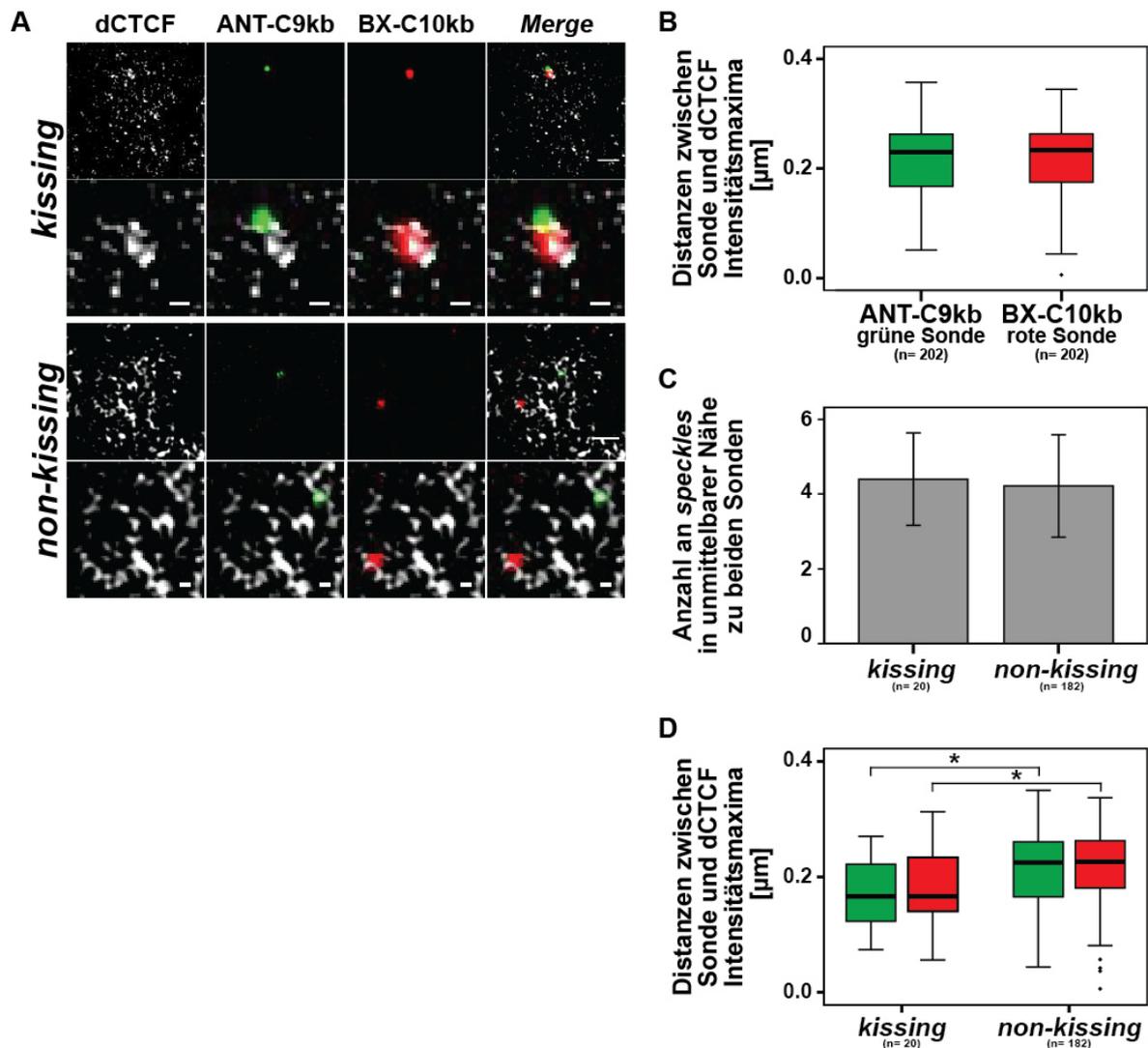
**(A)** Immunfärbung von Interphase-Zellkerne von S2-Zellen, die permanent Flag-SUMO exprimieren, nach Knockdown (Kd) von Luziferase, Smt3 und Doppel-knockdown (Dkd) von Aos1/ Uba2 mit Antikörper gegen Flag und CP190. Die Zellkerne wurden in „Flag-SUMO Signal“ und „kein Flag-SUMO Signal“ innerhalb der jeweiligen knockdown-Experimente eingeteilt. Das Fehlen bzw. sehr geringe Menge an Flag-SUMO Signal führt zur vermehrten Detektion von CP190 *speckles* in Smt3 Kd bzw. Aos1/ Uba2 Dkd Zellen (CP190 Intensitätsmaxima, weiße Punkte). Länge der Maßstabsbalken beträgt 1  $\mu\text{m}$ . Mikroskopische Aufnahmen: KLSM. **(B)** Sowohl nach Kd von Smt3 (blauer Boxplot), als auch nach Dkd von Aos1/ Uba2 (gelber Boxplot) ist signifikant weniger Flag-SUMO Signal detektierbar, was für einen erfolgreichen Knockdown spricht (p-Wert < 0,05). n = Anzahl untersuchter Zellkerne **(C)** Das Nicht-Vorhandensein von Flag-SUMO im Zellkern führt sowohl nach Smt3 Kd als auch nach Aos1/ Uba2 Dkd zu einem signifikanten Anstieg an CP190 *speckles* (p-Wert < 0,05) im Vergleich zu Zellkernen mit Flag-SUMO Signal (von 8 auf 10 *speckles* bzw. 7 auf 10 *speckles*). n = Anzahl untersuchter Zellkerne.

Die Zellkerne wurden nun in 2 Kategorien eingeteilt, nämlich diejenigen, die ein „Flag-SUMO Signal“ und „kein Flag-SUMO Signal“ aufweisen. Anschließend wurde die Anzahl an CP190 *speckles* für beide Fälle in den jeweiligen Knockdown-Experimenten ermittelt. Sowohl nach Smt3 Kd als auch nach Aos1/ Uba2 Dkd führt das Fehlen von Flag-SUMO Signal zu einem signifikanten Anstieg an CP190 *speckles* (im beiden Fällen von durchschnittlich 7 *speckles* auf 10 *speckles*) gegenüber Zellkernen, die Flag-SUMO Signal zeigten (Abb. 11B, C). Wie bereits beschrieben, lässt sich die Diskrepanz in der Anzahl an Isolator *speckles* pro Zellkern durch die Verwendung verschiedener Mikroskope (KLSM bzw. SIM) erklären (Abb. 10).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Vorhandensein von Flag-SUMO einen negativen Effekt auf die Bildung von Isolator *speckles* hat.

### 5.2.6 Isolator *speckles* sind in der direkten Nähe von *Hox gene kissing* Ereignissen lokalisiert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* unterschiedliche Strukturen darstellen, wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob Isolator *speckles* an genomischen Isolatoren detektiert werden können und inwieweit sich diese Lokalisation zwischen *Hox gene kissing* und *non-kissing* Fällen unterscheidet. Würden sich *Hox gene kissing* und *non-kissing* Fälle dahingegen unterscheiden, dass dCTCF *speckles* signifikant dichter an interagierenden Kontakten (*kissing*) detektiert werden können, so würde es für eine Assoziation von dCTCF *speckles* und *Hox gene kissing* sprechen. Zu Beginn wurde die Distanz zwischen ANT-C9kb bzw. BX-C10kb und dem am dichtesten zu der jeweiligen Sonde liegenden dCTCF *speckle* bestimmt (Abb. 12A, B).



**Abb. 12 dCTCF speckles liegen näher an *kissing* Sondenpaaren als an *non-kissing* Paaren**

Hybridisierung von Flügelimaginalscheiben mit ANT-C9kb/ BX-C10kb und anschließender Immunfärbung von dCTCF. Die Zellkerne wurden in zwei Gruppen eingeteilt: *kissing* (Distanz zwischen dem Sondenpaar  $\leq 350$  nm) und *non-kissing* (Distanz zwischen dem Sondenpaar  $> 350$  nm). **(A)** Beispiele für *kissing* (obere Aufnahmen) und *non-kissing* (untere Aufnahmen) Sondenpaaren. Länge der Maßstabsbalken beträgt in den unterschiedlichen Gruppen in der oberen Reihe 1  $\mu\text{m}$ , wohingegen die Länge der Maßstabsbalken in den jeweiligen unteren, stark vergrößerten Aufnahmen, 0,2  $\mu\text{m}$  beträgt. **(B)** Es wurde die Distanz zwischen Intensitätsmittelpunkt der FISH Sonde und dem Intensitätsmittelpunkt des am nächsten zur Sonde gelegenen dCTCF speckles ermittelt. Hier wurde nicht zwischen *kissing* und *non-kissing* unterschieden, sondern zwischen ANT-C9kb und BX-C10kb. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der mittleren Distanz zwischen dCTCF speckles und ANT-C9kb

bzw. dCTCF *speckles* und BX-C10kb (0,21  $\mu\text{m}$  bzw. 0,22  $\mu\text{m}$ ). **(C)** Die Anzahl an dCTCF *speckles* ist identisch in der *kissing*-Gruppe und der *non-kissing*-Gruppe. Die durchschnittliche Anzahl von vier *speckles* befindet sich innerhalb von 350 nm um das Sondenpaar. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an ( $p < 0,05$ ). **(D)** Es wurde, wie in (B), die Distanz zwischen Intensitätsmittelpunkt der FISH Sonde und dem Intensitätsmittelpunkt des am nächsten zur Sonde gelegenen dCTCF *speckles* ermittelt. Es wurde nun zwischen *kissing* und *non-kissing* unterschiedenen. dCTCF *speckles* sind signifikant näher an *kissing* Sondenpaaren als an *non-kissing* Paaren ( $p < 0,05$ ).  $n$  = Anzahl untersuchter Fälle.

Bei diesen Analysen wurde vorerst nicht zwischen *kissing* und *non-kissing* Ereignissen unterschieden, sondern die Gesamtheit der ANT-C9kb-Sonde (grüne Sonde) und BX-C10kb-Sonde (rote Sonde) untersucht. Ohne eine Unterteilung in *kissing* und *non-kissing* wurde untersucht, ob dCTCF *speckles* generell dichter an einem der beiden *Hox*-Gencluster detektiert werden kann. Die Intensitätszentren der FISH Sonden hatten eine durchschnittliche Distanz zum nächstgelegenen dCTCF *speckle* von 0,21  $\mu\text{m}$  für ANT-C9kb und 0,22  $\mu\text{m}$  für BX-C10kb, wobei dieser Unterschied zwischen den Distanzen nicht signifikant war. Im nächsten Schritt wurde die Anzahl an dCTCF *speckles* ermittelt, die sich in einer Umgebung von  $\leq 350$  nm um jede FISH Sonde befand. Hierzu wurde die Gesamtanzahl an dCTCF *speckles* gezählt, die sich um die ANT-C9kb und BX-C10kb als Sondenpaar befanden. Für diese Analyse wurde sich auf die Summe an dCTCF *speckles* bezogen, da im Falle von einem *kissing*-Sondenpaar die *speckles* keiner Sonde mit Sicherheit zugeordnet werden könnten. Die *speckles*-Zählung wurde für *kissing* und *non-kissing* Sondenpaare durchgeführt (Abb. 12C). In beiden Fällen (*kissing* und *non-kissing*) wurden durchschnittlich vier dCTCF *speckles* in unmittelbarer Nähe der Sonden ermittelt (Distanz  $\leq 350$  nm). Dies deutete darauf hin, dass sich die Anzahl an *speckles* in unmittelbarer Nähe einer genomischen Stelle im Falle eines *long-range* Kontaktes (*kissing*) im Vergleich zu nicht interagierenden Stellen nicht verändert.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simulation gezeigt werden, dass die Anzahl an *speckles* in unmittelbarer Nachbarschaft der Häufigkeit entsprach, wie man sie für eine zufällige Verteilung im Kern erwarten würde (durchgeführt von AG Houtsmuller, Erasmus MC, Rotterdam).

Abschließend wurde untersucht, ob sich eventuell die Distanz zwischen dCTCF *speckle* und FISH Sonde zwischen *kissing* und *non-kissing* Ereignissen unterscheidet. Es könnte möglich sein, dass die Distanz zwischen dCTCF *speckle* und *kissing* Sonde kürzer ist als bei nicht-interagierenden Sondenpaaren. Diese Hypothese konnte auch bestätigt werden, da die Distanz zwischen dem am dichtesten gelegenen dCTCF *speckle* und den *kissing* Sonden signifikant kürzer war als zwischen dCTCF *speckles* und *non-kissing* Ereignissen (0,17  $\mu\text{m}$  und 0,18  $\mu\text{m}$  für *kissing* ANT-C9kb/ BX-C10kb bzw. 0,21  $\mu\text{m}$  und 0,22  $\mu\text{m}$  für *non-kissing* ANT-C9kb/ BX-C10kb) (Abb. 12D).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das seltene Ereignis des *Hox gene kissing* durch das Vorhandensein von dCTCF *speckles* innerhalb eines Abstands von durchschnittlich 180 nm begleitet wird.

## 6 Diskussion

### 6.1 Analyse der eindimensionalen Anordnung von Isolatorproteinen

Interphase-Chromatin ist in strukturelle und funktionelle Domänen organisiert. Die unterschiedliche Kondensation des Chromatins spielt eine wichtige Rolle in vielen genetischen Prozessen, wie der Transkription, Replikation, Reparatur und Rekombination (Luger et al., 2012). Diese Kondensation kann z.B. in *Drosophila* Polytäanchrosomen als ein sich wiederholendes Muster von dicht Banden und weniger dichten Interbanden direkt beobachtet werden.

#### 6.1.1 Die Isolatorproteine PITA und ZIPIC binden an Interbanden und Übergängen zwischen Banden/ Interbanden

Auf zytologischer Ebene erscheint Chromatin als dunkel gefärbtes Heterochromatin, das am häufigsten in der Peripherie von Interphase-Zellkernen lokalisiert ist, und leicht angefärbtes Euchromatin, das sich wiederum im Inneren des Zellkerns befindet. Die Verpackung des Interphase-Genoms in Heterochromatin und Euchromatin lässt sich am besten durch das Bandenmuster von *Drosophila* Polytäanchrosomen beobachten, was durch einen Wechsel von Banden und Interbanden gekennzeichnet ist (Balbiani, 1881; Flemming, 1882). Polytäanchrosomen kommen in Zellen von dipteren Larven vor und entstehen durch mindestens zehn Runden an DNA Replikation ohne Endomitosen, während die dicht ausgerichteten Schwesterchromatiden zusammenbleiben und homologe Chromosome sich paaren (Urata et al., 1995). Bereits mit einem Lichtmikroskop sind Polytäanchrosomen gut sichtbar (Agard and Sedat, 1983; Urata et al., 1995). Die größere Dichte in Banden reflektiert einen erhöhten DNA-Gehalt und eine stabile Chromatin-Kondensation (Beermann, 1972). Trotz ihrer ungewöhnlichen Struktur können Polytäanchrosomen als Interphase-Chromosomen angesehen werden, die transkriptionell aktiv sind und auf Hormone und andere Umgebungssignale reagieren.

Die visuelle Untersuchung des Chromatins und z.B. die Bindung von Chromatin-assoziierten Proteinen auf zytologischer Ebene ist innerhalb von Interphase-

Zellkernen nahezu unmöglich. Mittels Immunfärbungen lassen sich lediglich die Lage und Verteilung von Kernproteinen visualisieren.

Gerade kürzlich konnten mit Hilfe von Polytänchromosomen zum ersten Mal *topologically associating domains* (TADs) direkt visualisiert werden (Eagen et al., 2015). Chromatin-Faltung wurde bislang auf molekularem Level mit Chromosome Confirmation Capture (3C) untersucht und es bestand kein direkter Bezug zur Chromosomen-Kondensation. 3C beruht auf der chemischen Vernetzung von chromosomalen Material, gefolgt von Fragmentierung, Ligation und DNA-Sequenzanalysen (Dekker et al., 2002). TADs (Nora et al., 2012), auch bekannt als *physical domains* (Hou et al., 2012; Sexton et al., 2012) und *topological domains* (Dixon et al., 2012), sind Domänen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie in der Interphase das Genome unterteilen. Des Weiteren bilden diese Domänen *long-range* Interaktionen mit Loci anderer TADs (Nora et al., 2012).

In *Drosophila* haben TADs eine durchschnittliche Länge von 107 kb (Cubenas-Potts and Corces, 2015) und es wurde postuliert, dass TADs, entweder durch eine Bildung oder eine Verhinderung von schleifen-bildenden Interaktionen, eine Rolle in der Regulation der Genexpression spielen (Gibcus and Dekker, 2013; Nora et al., 2012; Shen et al., 2012).

Auf Polytänchromosomen entsprechen Interbanden Regionen zwischen TADs, die einen stabilen Zustand von dekondensiertem Chromatin widerspiegelt, Banden entsprechen TADs (Eagen et al., 2015). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Domängrenzen von TADs bzw. *physical domains* als Isolatoren definiert sind, die mit den Isolatorproteinen dCTCF, BEAF-32 und CP190 assoziiert sind (Sexton et al., 2012). Für einige *Drosophila* Isolatorproteine konnte auf Polytänchromosomen gezeigt werden, dass sie an Interbanden oder an Übergängen zwischen Banden/ Interbanden lokalisiert sind (Capelson and Corces, 2005; Gerasimova et al., 2007; Kurshakova et al., 2007; Mohan et al., 2007; Zhao et al., 1995).

Wie für Isolatorproteine zu erwarten war, binden die untersuchten Proteine an Interbanden und Übergängen von Banden/ Interbanden, die in biochemischen Studien als Domängrenzen von TADs identifiziert wurden und durch das Vorhandensein von Isolatoren gekennzeichnet sind. Die Anwesenheit von PITA und ZIPIC Signalen in Interbanden, den Regionen zwischen TADs, lässt sich dadurch erklären, dass auch viele sequenz-spezifische Bindestellen für andere Isolatorproteine, wie dCTCF und

Su(Hw) nicht im direkten Zusammenhang mit *physical domain* Grenzen stehen (Sexton et al., 2012).

Auch die Kolokalisations-Studien, die durch einen deutlichen Überlapp zwischen PITA/CP190-Signalen und ZIPIC/CP190-Signalen auf Polytänchromosomen gekennzeichnet sind, visualisierten die zuvor erbrachten Ergebnisse, dass PITA und ZIPIC *in vivo* und *in vitro* mit CP190 interagieren (Maksimenko et al., 2015).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Isolatorproteine PITA und ZIPIC an Interbanden und Übergängen zwischen Banden/ Interbanden lokalisiert sind, was in Interphase-Zellkernen eine Assoziation mit Regionen zwischen TADs und an TAD-Grenzen darstellt. Darüber hinaus kolokalisieren die untersuchten Isolatorproteine mit CP190, einem Kofaktor dieser Proteine, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit PITA und ZIPIC interagiert (Maksimenko et al., 2015).

Um weitere Einblicke in Isolatorproteine und mögliche Kofaktoren bzw. assoziierte Proteine zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Immunpräzipitation bzw. Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Mit dieser Methode kann das zu untersuchende DNA-bindende Protein und jeder Komplex, den es innerhalb der Zelle formt, mit Reagenzien hoher Affinität (z.B. Antikörpern) gewonnen werden kann, ohne Berücksichtigung der dreidimensionalen Struktur der DNA oder des Chromatins innerhalb des Zellkerns.

### **6.1.2 CP190 und dCTCF zeigen Protein-Protein-Interaktionen mit Komponenten des NURF und dREAM Komplexes**

Neben dem Isolatorprotein dCTCF existieren in *Drosophila* noch sieben weitere Isolatorproteine (Übersichtsartikel Ali et al. (2016)), die für Isolator-Aktivität an spezifischen Stellen im Genom verantwortlich sind. Es gibt genomische Bereiche, die von mehr als nur einem Protein gebunden werden, jedoch gibt es auch Bindestellen, die spezifisch für das ein oder andere Proteine sind (Negre et al., 2010; Schwartz et al., 2012; Van Bortle et al., 2012). Eine gemeinsame Konstante dieser Isolatorproteine scheint CP190 darzustellen (Bartkuhn et al., 2009; Negre et al., 2010; Schwartz et al., 2012; Van Bortle et al., 2012). Etwa 80 % der rund 6000 CP190 Bindestellen zeigen

auch Bindung zumindest eines der Isolatorproteine, wohingegen 20 % keine Bindung mit einem der bekannten Proteine zeigt. Da CP190 nicht in der Lage ist, DNA direkt zu binden und eine DNA-bindende bzw. DNA-assoziierte Komponente, deutet die Fraktion der CP190-Bindestellen ohne bekannte Bindepartner darauf hinweisen, dass eine Bindung von CP190 durch ein anderes Protein oder Proteinkomplex vermittelt werden könnte.

Das Augenmerk in diesem Teil der Arbeit lag auf der Validierung von zuvor durch Massenspektrometrie und genomweitem RNA Interferenz Screen (RNAi Screen) identifizierter potentieller CP190 und auch dCTCF Interaktionspartner mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) (Bohla et al., 2014). Im Fokus lagen Proteinen, die an Modifikationen oder dem *Remodelling* von Histonen und Nukleosomen beteiligt sind, da Chromatin-Analysen gezeigt haben, dass insbesondere CP190-gebundene Isolatoren durch geöffnete und Nukleosomen-freie Bereiche gekennzeichnet sind (Bartkuhn et al., 2009).

Die hier durchgeführten Co-IPs konnten sowohl von Flag-CP190 bzw. Flag-dCTCF als auch von endogenem CP190 bzw. dCTCF den Nukleosomen Remodelling Faktor NURF und Komponenten des Transkriptionsrepressor dREAM identifizieren. Alle durchgeführten Immunpräzipitationen zeigen im Western-Blot spezifische Signale, die im Bereich von 1 % des Input-Materials liegen. Die Negativkontrollen, d.h. FLAG-IP in Wildtyp-Zellen oder IgG-IP zeigen keine Signale im Western-Blot, was für eine hohe Spezifität der Co-IPs aber auch für eine Spezifität der FLAG- und IgG Antikörper spricht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Flag-CP190 und Flag-dCTCF bzw. endogenes CP190 und endogenes dCTCF Protein-Protein-Interaktionen mit Komponenten des NURF und dREAM Komplexes zeigen. Da CP190 selbst nicht in der Lage ist DNA direkt zu binden, könnte es möglich sein, dass CP190 an dCTCF oder anderen DNA-bindenden Isolatorfaktoren bindet und als Plattform für enzymatisch aktive Komplexe, wie den NURF und dREAM Komplex, dient. Diese Rekrutierung verursacht Chromatin-Modifikationen wie die Depletion von Nukleosomen, wie man sie an Bindestellen von Isolatorproteinen beobachten kann. Die Protein-Protein-Interaktionen zwischen CP190 und NURF bzw. CP190 und dREAM könnten somit potentiell CP190-abhängige Chromatineffekte vermitteln.

## 6.2 Analyse der dreidimensionalen Anordnung von Isolatorproteinen

Chromosomen, die physikalischen Träger der genetischen Information, nehmen äußerst organisierte, nicht-zufällige Strukturen an und besetzen separate Territorien mit bevorzugten Positionen innerhalb des Zellkerns (Lanctot et al., 2007). Die Chromosomen-Konformationen reflektieren und regulieren die zugrunde liegenden biologischen Prozesse (Sexton et al., 2007). Es deutet daraufhin, dass sie als Gerüst für die Entstehung der epigenetischen Organisation dienen, wie der Regulation der Genomfunktion und der epigenetischen Vererbung verschiedener Zellzustände. Die *higher-order* Chromatinstrukturen können somit als strukturelle und funktionelle Regulatoren des Genoms angesehen werden.

Ein Teil dieses Prozesses ist die Bildung von *long-range* Kontakten zwischen genomischen Stellen, die auf dem linearen Genom weit voneinander entfernt liegen. Durch diese Kontakte entstehen Schleifenstrukturen, die physikalische, topologische und gen-regulatorische Domänen zusätzlich zu erleichterten Kontakten zwischen Promotoren und entfernt liegenden regulatorischen Elementen (Cubenas-Potts and Corces, 2015) bilden. Chromatin-Isolatoren sind in der Organisation und Funktion des Genoms von besonderem Interesse, da Isolatorproteine die Fähigkeit besitzen, die Formation von *long-range* Kontakten zwischen DNA-Sequenzen zu ermöglichen. Aus *long-range* Kontakten resultieren dreidimensionalen Schleifen, die in allen Ebenen der Chromatin-Organisation auftreten. Die Länge der Schleifen variiert von kb-Größe bis hin zu großen intra-chromsomalen Schleifen (Cavalli, 2007; Fraser and Bickmore, 2007; Misteli, 2007). Bislang ist jedoch unklar, welche Faktoren die physikalischen Interaktionen, die für die Bildung und Regulation von *long-range* Kontakten benötigt werden, unterstützt. Es gibt ein Modell, das zeigt, dass Isolatorproteine Chromatinschleifen bilden können und diese Kontaktstellen sich physikalisch als Isolator *bodies* zeigen (Labrador and Corces, 2002).

Es existieren eine Reihe von Hinweisen, dass die *Hox*-Gencluster Antennapedia Komplex (ANT-C) und Bithorax Komplex (BX-C) signifikant häufig miteinander interagieren (Bantignies et al., 2011; Cleard et al., 2006; Comet et al., 2006; Lanzuolo et al., 2007; Li et al., 2013; Sexton et al., 2012). Diese Komplexe sind im linearen Genom 10 Mb voneinander getrennt und liegen koreprimiert vor.

Die Interaktion des ANT-C und BX-C, die als *Hox gene kissing* bezeichnet wurde (Bantignies et al., 2011), wurde mit biochemischen Methoden, sowie mit DNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (DNA FISH) gezeigt. Sowohl *Chromosome Conformation Capture* (3C) (Lanzuolo et al., 2007), als auch *Chromosome Conformation Capture on ChiP* (4C) (Bantignies et al., 2011) wie auch Hi-C (abgewandeltes 3C) (Sexton et al., 2012) konnten zeigen, dass die zwei *Hox*-Gencluster miteinander interagieren. Die Hi-C-Methode konnte darüber hinaus im Vergleich zu den vorherigen Analysen eine 10-fache Anreicherung der Kontaktfrequenz der *Hox*-Gencluster über die flankierenden Regionen detektieren (Sexton et al., 2012). Der Nachteil dieser biochemischen/ bioinformatischen Analysen besteht jedoch darin, dass diese Methoden auf einer Zellpopulation basieren und daher nicht die Häufigkeit der Interaktionen innerhalb von Einzelzellen aufdeckt. Diese Einzelzellen können jedoch mit der FISH Methode untersucht werden, da es diese Methode erlaubt, die Häufigkeit an Zellen, die positiv für eine Interaktion sind, festzustellen. Die FISH Methode ihrerseits beruht auf dem Auflösungsvermögen des verwendeten Mikroskops, was dazu führen könnte, dass mit höherer Auflösung eventuell die Häufigkeit an *Hox gene kissing* Ereignissen abnimmt. Generell liegt ein *Hox gene kissing* Ereignis vor, wenn zwei Sonden-Signale überlappen oder die Distanz der Intensitätszentren der Signale  $\leq 350$  nm beträgt (Bantignies et al., 2011). Durch die verbesserte Auflösung kann es jedoch möglich sein, dass sich die Intensitätszentren der Signale derart verschieben, dass die Definition nicht mehr zutreffend ist.

Um *long-distance* Interaktionen (*Hox gene kissing*), Isolator *speckles* und eine mögliche Assoziation zwischen *Hox gene kissing* und Isolator *speckles* detailliert und in hoher Auflösung zu untersuchen, wurde DNA FISH mit anschließender Immunfärbung durchgeführt und mit Hilfe von Structured Illumination Microscopy (SIM) untersucht. SIM ist eine Mikroskopie-Methode, die es ermöglicht, über die maximale Auflösung eines optischen Systems hinaus (Abbes Gesetz) biologische Fragestellungen zu untersuchen (Gustafsson, 2000).

Die durchgeführten FISH Analysen ließen eine Diskontinuität der BAC-Sonden mit SIM erkennen. Die zweifache Verbesserung der Auflösung von SIM im Vergleich zu KLSM, deckten deutliche Unterschiede im Erscheinungsbild der hybridisierten BAC-Sonden auf. Entgegen den Erwartungen zeigten die BAC-Sonden in Flügelimaginalscheiben mit SIM ein verlängertes, lückenhaftes Erscheinungsbild. Für die überwiegende Anzahl

an Zellkernen war zu erwarten, dass jede Sonde eines Sondenpaares einen Spot zeigt, was die KLSM-Aufnahmen auch zeigten. Das Auftreten nur eines Spots je Sonde trotz eines diploiden Genoms von *Drosophila* lässt sich dadurch erklären, dass in *Drosophila* homologe Chromosomen in allen somatischen Zellen gepaart vorliegen (Metz, 1916) und somit nur ein Spot für beide Chromosomen detektiert werden kann. Für das abweichende Erscheinungsbild der Sonden, die mit SIM untersucht wurden, könnte es drei mögliche Erklärungen geben, die natürlich primär auf der hohen Auflösung beruhen: 1) Es könnte möglich sein, dass das SIM separierte homologe Chromosomen oder Sonden-freie chromosomale Regionen detektiert, die durch 2) eine reduzierte Effizienz in der Hybridisierung von Teilbereichen der Sonde oder 3) ineffizientes Markieren der direkt fluoreszent-markierten FISH Sonden darstellen. Diese Möglichkeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Stattdessen wurde sich dafür entschieden, die Länge der Sonden deutlich zu reduzieren, was zur Detektion präziser Sonden-Spots ohne Lücken führte und die nachfolgenden Analysen deutlich vereinfachte.

Angesichts der Tatsache, dass die unmittelbare Nähe der zwei *Hox*-Gencluster im dreidimensionalen Raum in der Beobachtung des *Hox gene kissing* (Bantignies et al., 2011) resultiert, mussten zuerst die Sequenzen innerhalb von ANT-C und BX-C identifiziert werden, die die geringste Distanz innerhalb des Interphase-Zellkerns zueinander haben. Aus den BAC-Klonen wurden vier kurze ANT-C-Sonden bzw. fünf kurze BX-C-Sonden generiert. Die kurzen Sonden deckten eine Länge von durchschnittlich 10 kb des jeweiligen *Hox*-Genclusters ab, was etwa 1/20 der BAC-Sonden entsprach. Die Hybridisierung der kurzen Sonden mit der korrespondierenden langen BAC-Sonde ergab signifikante Unterschiede in den Distanzen untereinander. Bei genauerer Untersuchung der ermittelten Distanzen lässt sich jedoch erkennen, dass die statistisch signifikanten Unterschiede mikroskopisch keine nennenswerten Unterschiede machen. Distanz-Unterschiede, die kleiner als 120 nm sind, liegen unterhalb des Auflösungsvermögens von SIM und sind mikroskopisch nicht unterscheidbar. Die Vermutung liegt nahe, dass je nach Zellzyklus ein anderer (kurzer) Bereich des ANT-C bzw. BX-C in engen Kontakt mit dem jeweiligen anderen Komplex kommt, was erklären würde, dass die ermittelten mittleren Distanzen in allen Hybridisierungen ähnlich sind.

Trotz der nicht dramatischen Unterschiede wurden je *Hox*-Gencluster zwei kurze Sonden ausgewählt, die signifikant kurze Distanzen aufwiesen (ANT-C8kb/ ANT-C9kb

und BX-C9kb/ BX-C10kb). Diese kurzen Sonden wurden anschließend in allen möglichen Kombinationen untereinander hybridisiert und die durchschnittlichen Distanzen ermittelt. Wiederum konnten statistisch signifikante Unterschiede beobachtet werden. Allerdings war das Ausmaß der Unterschiede wiederum nur sehr gering. Das Sondenpaar ANT-C9kb und BX-C10kb zeigte rechnerisch die kürzeste Distanz zueinander und aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Analysen dieses Sondenpaar verwendet.

### **6.2.1 *Hox gene kissing* ist ein seltenes Ereignis in Flügelimaginalscheiben von *Drosophila melanogaster***

DNA FISH mit dem kurzen Sondenpaar zeigte deutlich, dass die Anzahl des *Hox gene kissing* in Interphase-Zellkernen unter Verwendung von SIM ein seltenes Ereignis ist. In nur 1,9 % der Zellkerne von Flügelimaginalscheiben konnten diese *long-range* Kontakte detektiert werden. Die Diskrepanz zwischen den publizierten 8 % *Hox gene kissing* (Bantignies et al., 2011) und den mit SIM ermittelten 1,9 % in Flügelimaginalscheiben liegt an den verwendeten Mikroskopen. Dies wird bei einem genauen Vergleich der publizierten mittleren Distanzen und *Hox gene kissing* Häufigkeiten mit den hier ermittelten Daten deutlich wird. Die veröffentlichten Daten wurden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop mit einer 0,5 µm hohen Bildebene gewonnen. Diese Höhe ist jedoch sub-optimal für die akkurate Bestimmung der Intensitätszentren der DNA Sonden in der z-Ebene und der daraus resultierenden z-Koordinaten, die für die anschließenden Distanzmessungen benötigt werden. Die präzise Lokalisation von Intensitätszentren sehr kleiner Objekte kann deutlich besser bestimmt werden, als die tatsächliche Auflösung des Mikroskops, dies benötigt jedoch dünnere z-Ebenen als in Bantignies et al. (2011) beschrieben. Da die Zellkerne von *Drosophila* Flügelimaginalscheiben eher flach sind, wurden nur vier bis fünf Bildebenen aufgenommen und es wurde nicht deutlich beschrieben, wie die z-Koordinaten der DNA-Sonden für die Distanzmessungen ermittelt wurden. Angesichts der limitierten Tiefenauflösung des KLSM (im Vergleich zu SIM), können zwei Sonden-Spots häufig in derselben Bildebene detektiert werden. Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass die Mehrheit (aber nicht alle) Messungen in derselben Ebene durchgeführt wurden. Verglichen mit KLSM hat die SIM-Technik eine zweifach bessere

Auflösung in der xy-Ebene und auch in der z-Ebene (350-400 nm vs. 800-1000 nm). Die in dieser Arbeit erzielten Aufnahmen haben nicht nur den Vorteil der hochauflösenden SIM-Technik, sondern die Bildebenen waren zudem kleiner. Sie umfassten 105 nm und ermittelten deutlich präziser die z-Ebene, in der die Sonden-Spots ihre höchste Signalintensität aufwiesen, wodurch die Tiefengenaugigkeit der Messungen deutlich gesteigert wurde. Die erneute Analyse der publizierten Daten und der in dieser Arbeit erzielten Daten zeigten, dass sich die Ergebnisse annähern, wenn die Tiefeninformation aus den Berechnungen herausgenommen wird. So nähern sich die veröffentlichten Distanzen zwischen den Sonden eines Paares den hier ermittelten Distanzen tendenziell an, wobei sie durch die verbesserte Auflösung in der xy-Ebene nicht identische sind. Der prozentuale Anteil an *Hox gene kissing* Ereignissen entsprechen jedoch den veröffentlichten (8 % für Flügelimaginalscheiben (Bantignies et al., 2011) (Abb. S1).

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem positiven Sondenpaar und *kissing*-negativen Kontrollpaaren gezeigt werden können.

Diese Kontrollsonden waren, wie auch ANT-C9kb und BX-C10kb auf den rechten Arm von Chromosom 3 lokalisiert und die Sondenpaare waren deutlich voneinander getrennt. Das Sondenpaar beat-Vc und wake war auf dem linearen Genom 10Mb voneinander getrennt, wohingegen die Distanz zwischen ANT-C9kb und 26Mb bei 20Mb lag. Es konnte, wider den Erwartungen, nicht gezeigt werden, dass das 20Mb voneinander entfernt liegende Sondenpaar eine signifikant größere Distanz zueinander aufweist und daraus resultierend signifikant seltener interagiert. Für Chromatin-Interaktionen ist bekannt, dass sie mit zunehmender linearen genomischen Distanz abnehmen (Dixon et al., 2012; Hou et al., 2012; Lieberman-Aiden et al., 2009; Sexton et al., 2012). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei dem *Hox gene kissing* um ein seltenes Ereignis. Trotz des seltenen Auftretens wird jedoch spekuliert, dass *Hox gene kissing* ein spezifisches Ereignis im Interphase-Zellkern ist, da diese Interaktion zuvor durch eine ganze Reihe biochemischer Methoden und zytologische Untersuchungen (DNA FISH) gezeigt werden konnte (Bantignies et al., 2011; Cleard et al., 2006; Comet et al., 2006; Lanzuolo et al., 2007; Li et al., 2013; Sexton et al., 2012).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse diese Arbeit, dass *Hox gene kissing* innerhalb des Interphase-Zellkerns genauso häufig ist wie *non-kissing* Interaktionen ungeachtet der Distanz im linearen Genom. Jedoch liegt durch bereits erhobene Daten

(Bantignies et al., 2011; Cleard et al., 2006; Comet et al., 2006; Lanzuolo et al., 2007; Li et al., 2013; Sexton et al., 2012) die Vermutung nahe, dass das seltene *Hox gene kissing* spezifisch ist.

Um in den Experimenten die *Hox gene kissing* Häufigkeit zu erhöhen und daraus resultierend mehr Fälle für die „Isolator speckle/ *long-range* Kontakt“-Analyse zu haben, wurde DNA FISH in *Drosophila* Augenimaginalscheiben durchgeführt. Für dieses Gewebe konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Flügelimaginalscheibe deutlich mehr Zellkerne (28 %) positiv für *Hox gene kissing* sind (Bantignies et al., 2011). Die in dieser Arbeit durch DNA FISH ermittelten Häufigkeiten an *Hox gene kissing* Ereignissen weichen jedoch erheblich von den publizierten Daten ab. Wie auch im Falle der Flügelimaginalscheiben ist in Augenimaginalscheiben das *Hox gene kissing* ein seltenes Ereignis und der Vergleich der Gewebe zeigte keine signifikanten Unterschiede. Auch hier lässt sich die Diskrepanz zwischen publizierten Daten und ermittelten Häufigkeiten durch die Verwendung der hochauflösenden SIM-Technik und der Verarbeitung der Daten erklären. Da keine Unterschiede ermittelt werden konnten, wurden die im Folgenden diskutierten Daten in Flügelimaginalscheiben durchgeführt.

### **6.2.2 Funktionelle Unterschiede zwischen Polycomb Group Proteinen und Isolatorproteinen in *long-range* Interaktionen**

Um zu testen, ob *Hox gene kissing* in Kernstrukturen stattfindet, die mit Isolatorproteinen angereichert sind, wurde das Auftreten von Isolator *speckles* neu charakterisiert. Einige bislang erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass Isolator *bodies* aggregierte Proteine sind (Golovnin et al., 2008), die nicht an Isolation beteiligt sind (Golovnin et al., 2012). Isolator *bodies* dienen als Depot für sumoylierte Proteine, die an Isolation beteiligt sind und die Formation von Isolator-Komplexen vermittelt, jedoch nicht essentiell für die Isolatorfunktion sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich Isolator *bodies* als Antwort auf osmotischen Stress bilden (Schoborg et al., 2013). So zeigte sich, dass sowohl in S2-Zellen als auch in *Drosophila* Gewebe, wie etwa Flügelimaginalscheiben, sich Isolator *bodies* unter Hyperosmolarität aus diffus, über den ganzen Zellkern verteilten feinen Isolator *speckles* bilden.

Unter Verwendung von Structured Illumination Microscopy (SIM) war es möglich, diese feinen und über den gesamten Interphase-Zellkern von S2-Zellen bzw.

Flügelimaginalscheiben verteilten Isolator *speckles* genauer zu analysieren. Ohne osmotischen Stress konnten zwischen 130 und 140 dCTCF und CP190 Isolator *speckles* mit SIM identifiziert werden. Diese hohe Anzahl an *speckles* lässt sich, wie auch zuvor bei dem länglichen und lückenhaften Erscheinungsbild der hybridisierten DNA Sonden, durch die Verwendung hochauflösender Mikroskopie-Technik erklären. Vergleichende Analysen zwischen SIM und Konfokaler Laserscan Mikroskopie (KLSM) zeigen einen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Isolator *speckles* dahingehend, dass mit SIM signifikant mehr *speckles* detektiert werden können. Mit der zweifach verbesserten Auflösung können auch kleine Strukturen erfasst werden, die im KLSM dem maximalen Auflösungsvermögen unterliegen und nicht als einzelne Strukturen wahrgenommen werden können. Im Hinblick auf die Anzahl und Verteilung der *speckles* innerhalb der Zellkerne der verschiedenen Zelltypen lässt sich kein signifikanter Unterschied ausmachen. Unter osmotischem Stress (gesteigerte NaCl-Konzentration) konnte in Anlehnung an Schoborg et al. (2013) die Bildung von Isolator *bodies* auch im Rahmen dieser Arbeit induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu Isolator *speckles* reagieren Polycomb *bodies* nicht signifikant auf Osmosestress (Schoborg et al., 2013). Polycomb *bodies* sind Kernstrukturen (Alkema et al., 1997; Messmer et al., 1992), die an *long-range* Genregulation beteiligt sein könnten (Bantignies et al., 2011; Grimaud et al., 2006; Sexton et al., 2007). Sie beinhalten stillgelegtes Chromatin, das aus Polycomb-Komplexen besteht, welche an *cis*-regulatorische Elemente namens *Polycomb response elements* (PREs) (Muller and Vrijzer, 2009; Schuettengruber et al., 2007) binden. Es wurde gezeigt, dass der Bithorax Komplex (BX-C) und *Antp* des Antennapedia Komplexes (ANT-C) innerhalb Polycomb *bodies* in Geweben kolokalisieren, in denen beide Komplexe inaktiv vorliegen (Grimaud et al., 2006). Einzelne Gene der *Hox*-Gencluster können in Polycomb *bodies* interagieren, wobei dies nur in Geweben stattfindet, in denen sie ko-reprimiert sind. Diese Kolokalisation nimmt während der Entwicklung zu und ist abhängig von Polycomb Proteinen (Bantignies et al., 2011). Studien weisen jedoch darauf hin, dass wohl eher Isolatorproteine anstelle von Polycomb *bodies* an der *long-range* Interaktion von Polycomb-Zielen beteiligt sind (Li et al., 2011; Li et al., 2013). So konnte gezeigt werden, dass Isolatoren, die im ANT-C als auch im BX-C vorliegen, essentiell für die Kolokalisation der beiden Komplexe sind. Darüber hinaus zeigt die Abwesenheit von Isolatorproteinen eine deutliche Reduzierung im Auftreten von Polycomb *bodies* (Li et al., 2013).

SIM-Aufnahmen von Immunfluoreszenz-gefärbten S2-Zellen konnten zeigen, dass Polycomb *bodies* und Isolator *speckles* Strukturen sind, die deutlich voneinander unterschieden werden können, mit einem Überlapp zwischen Polycomb *bodies* und CP190-Isolator *speckles* von nur 26 %. Im Gegensatz dazu zeigen dCTCF-Isolator *speckles* und CP190-Isolator *speckles* einen Überlapp von fast 50 %, was zu erwarten war, da CP190 ein Kofaktor von dCTCF ist (Bartkuhn et al., 2009; Mohan et al., 2007). Im Zuge dieser Analyse stellte sich die Frage, ob die generell geringere Anzahl an Polycomb *bodies* innerhalb des Zellkernes Grund für die geringe Überlapp zwischen CP190 *speckles* und Polycomb *bodies* ist. Diese geringe Anzahl ist auch übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Zahlen von rund 30 Polycomb *bodies* pro Zellkern, die mit KLSM untersucht wurden (Ficz et al., 2005; Grimaud et al., 2006). In diesem Fall ist die Anzahl an Polycomb *bodies*, die mit SIM und KLSM erhoben wurden, vergleichbar, da der „Out of Focus-Licht“-Effekt bei wenigen, im Zellkern verstreut vorliegenden Fluoreszenz-Signalen keine großen Auswirkungen zeigt. Generell wird Fluoreszenz durch Anregungslicht im ganzen Präparat angeregt. Hierdurch entsteht Fluoreszenzlicht, das außerhalb der Fokusebene ist und unscharf abgebildet wird. Dieses Streulicht beeinträchtigt vor allem Präparate, die eine hohe Anzahl an Fluoreszenzsignalen haben, da Signale überlagern und eine präzise z.B. Anzahlbestimmung von nuklearen *bodies* schwierig macht.

Weitere Analysen konnten zeigen, dass die Anzahl an Polycomb *bodies* keinen Einfluss auf den Überlapp von CP190 *speckles* und Polycomb *bodies* hat. So überlappen nur 23 % der Polycomb Signale mit CP190 Signalen wobei 46 % aller dCTCF Signale mit CP190 Signalen überlappen.

Eine Schlussfolgerung könnte sein, dass die funktionellen Unterschiede zwischen Polycomb Group Proteinen (PcGs) und Isolatoren in der Vermittlung von *long-range* Interaktionen auf das zytologische Level übertragbar sind. Diese Unterschiede spiegeln sich in separaten Polycomb und Isolator *foci* wider.

Zusätzlich zu den funktionellen Unterschieden von PcGs und Isolatorproteinen und deren zueinander unterschiedlichen Verteilung im Kern ist auch die Distanz von Isolatorproteinen zu *Hox gene kissing* Ereignissen verschieden. Die Distanzen zwischen Isolatorproteinen und *Hox gene kissing* sind signifikant kürzer als in Fällen, in denen die FISH Sonden nicht kolokalisieren.

Diese unterschiedlichen Distanzen steht im Gegensatz zu Polycomb *bodies*, die mit PREs der *Hox*-Gene unabhängig von deren Interaktion kolokalisieren (Li et al., 2011). Die Anzahl an Isolator *speckles* in der direkten Nähe von *Hox gene kissing* Ereignissen ist ebenso gering wie die Anzahl dieser Ereignisse an sich. Dies stützt das Ergebnis, dass es nur einen kleinen Überlapp zwischen Isolator *speckles* und Polycomb *bodies*, die immer binden, gibt.

Daraus kann man folgern, dass es sich bei Isolator *speckles* und Polycomb *bodies* um voneinander verschiedene Strukturen des Interphase-Zellkerns von *Drosophila melanogaster* handelt.

### **6.2.2.1 Sumoylierung behindert die Bildung von Isolator *speckles* in *Drosophila* S2-Zellen**

Ein kaum untersuchter Aspekt von Isolator *speckles* ist der Einfluss von post-transkriptionellen Modifizierungen auf deren Bildung. Für das Proteine zentrosomale Protein 190 (CP190) und den Modifier of *mdg4* (Mod(*mdg4*)2.2), zwei Komponenten des *gypsy* Isolators, ist beschrieben, dass sie *in vivo* und *in vitro* sumoyliert vorliegen (Capelson and Corces, 2006). Sumoylierung reguliert die Aktivität einer Reihe von Kernfaktoren (Johnson, 2004; Meulmeester and Melchior, 2008; Ulrich, 2008), die für zahlreiche Vorgänge in der Zelle bedeutsam sind. Dazu zählen unter anderem die Regulation der Transkription und sub-nukleares Zielbestimmung (Gill, 2005; Riising et al., 2008; Stielow et al., 2008).

Gegenwärtig wird der Einfluss von Sumoylierung in der Organisation von Isolator *speckles* bzw. Isolator *bodies* kontrovers diskutiert. So wird angenommen, dass SUMO essentiell für die Vereinigung von Isolatorproteinen in Isolator *speckles* ist. Sumoylierung von Isolatorproteinen sorgt für die Aufrechterhaltung dieser Proteine in *bodies* (*speckles*). So führte die Inaktivierung von SUMO zu einer diffusen Verteilung der Isolatorproteine innerhalb des Zellkerns von *Drosophila* (Golovnin et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnten Capelson und Corces (2006) den gegenteiligen Effekt von SUMO auf die Funktion und sub-nukleare Lokalisation von Isolatoren beobachten. Sumoylierung von CP190 und Mod(*mdg4*)2.2 verhindert die Selbst-Interaktionen und resultiert in der fehlenden Bildung von Isolator *bodies* (Capelson and Corces, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SUMO bzw. Flag-SUMO einen negativen Einfluss auf die Bildung von Isolator *speckles* hat. Sowohl nach Knockdown von Smt3, das Gen, welches für SUMO kodiert, als auch nach Doppelknockdown von Aos1/ Uba2, zwei SUMO-aktivierenden Enzymen, nimmt die Anzahl an CP190 *speckles* signifikant zu. Da für diese Untersuchungen kein geeigneter SUMO-Antikörper zur Verfügung stand, der zur Kontrolle eines erfolgreichen Knockdowns eingesetzt werden konnte, wurde mit Zellen gearbeitet, die Flag-SUMO permanent exprimieren. Ein Knockdown von Smt3 bzw. AOS1/Uba2 konnte so durch eine Reduktion der FLAG-SUMO Kernintensität beobachtet werden. Es lässt sich an dieser Stelle jedoch nicht ausschließen, dass die Knockdown-Experimente nur einen Einfluss auf FLAG-SUMO hatten und die endogene SUMO-Konzentration sich kaum änderte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, anders als von Golovnin et al. (2012) postuliert, Sumoylierung die Bildung von Isolator *speckles* behindert.

### **6.2.3 Isolator *speckles* sind mit *long-distance* Chromatin-Kontakten assoziiert**

Seit langem besteht eine Diskussion über die Struktur, Funktion und die dynamische Etablierung von nuklearen *bodies*, wie Polycomb *bodies* und Isolator *speckles* (Cheutin and Cavalli, 2014; Golovnin et al., 2015; Grimaud et al., 2006; Li et al., 2011; Li et al., 2013; Mao et al., 2011; Mitchell and Fraser, 2008; Schoborg et al., 2013). Nuklear *bodies* liegen durch den ständigen Fluss von Molekülen in die *bodies* und aus ihnen heraus im Gleichgewichtszustand vor (Dundr and Misteli, 2010) Sie reagieren dynamisch auf die unterschiedlichsten physiologische Prozesse, wie auch auf verschiedene Formen von Stress, veränderte metabolische Bedingungen und Veränderungen im zellularen Signalkaskaden. Für z.B. die Bildung von *nuclear bodies* werden gegenwärtig drei Modelle postuliert: 1) das stochastische oder 2) das geordnete Zusammenfügen sowie ein 3) *seeding* Modell (Übersichtsartikel (Mao et al., 2011)). Die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse, die in diesem Kontext erzielt wurden, werden durch die potentielle Kombination aus verschiedenen Eigenschaften sehr kompliziert.

Innerhalb der Vielzahl an Varianten, sollte man sich in der Interpretation der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auf zwei Hypothesen zum Wirkmechanismus von

nuklearen *bodies* fokussieren: 1) die lokale Konzentrationen der PcGs oder Isolatorproteine sind Stellen von *long-distance* Chromatin-Interaktion; 2) *long-distance* Interaktion verursacht entweder die lokale Konzentration der PcGs und Isolatorproteine oder die lokale Proteinkonzentration vermittelt die *long-distance* Interaktion. Für Polycomb *bodies* konnte gezeigt werden, dass diese lokale Konzentration von PcGs an interagierenden als auch an nicht-interagierenden PREs der *Hox*-Gencluster ANT-C und BX-C detektiert werden kann (Grimaud et al., 2006). Daraus kann man folgern, dass diese Interaktion unabhängig von dem Vorhandensein von Polycomb *bodies* ist. Darüber hinaus wurden Isolatoren identifiziert, die durch Polycomb reprimierte Gene in Polycomb *bodies* leiten (Li et al., 2011; Li et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den Polycomb *bodies* Isolator *speckles* immer innerhalb einer maximalen Distanz von 350 nm von den Isolator-Sequenzen gefunden werden können. Die Besonderheit daran ist, dass im Falle einer *long-distance* Interaktion (*Hox gene kissing*), die Isolator *speckles* signifikant dichter an den interagierenden Sequenzen lokalisiert sind.

Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass zusätzlich zur Bindung von CP190 und anderen Proteinen (Golovnin et al., 2015; Golovnin et al., 2012), *long-distance* Interaktionen Isolator *speckles* formen.

## 6.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe von Immunfärbungen auf Polytäanchrosomen von *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass die Isolatorproteine PITA und ZIPIC an Interbanden und Übergängen zwischen Banden/ Interbanden lokalisiert sind und mit CP190 ko-lokalisiert. Bislang ist bekannt, dass PITA und ZIPIC direkt mit CP190 interagieren und viele Funktionen in der Organisation der Chromosomen-Architektur haben könnten (Maksimenko et al., 2015).

Darüber hinaus ist jedoch nicht bekannt, ob PITA und ZIPIC auch Isolator *speckles* bilden und wie diese Strukturen im Interphase-Zellkern organisiert sind. Des Weiteren fehlen Daten über eine Beteiligung von PITA und ZIPIC in *long-range* Chromatin-Interaktionen. Biochemische Analysen wie Hi-C sowie DNA FISH Experimente könnten Einblicke in eine mögliche Beteiligung in *long-range* Interaktionen bringen.

Co-Immunpräzipitations-Analysen in dieser Arbeit konnten Daten verifizieren, die zeigten, dass Komponenten des NURF Komplexes und dREAM Komplexes mit CP190 und dCTCF Protein-Protein-Interaktionen eingehen.

Es konnte in der Weiterführung dieser Erkenntnisse gezeigt werden, dass NURF und dREAM über dCTCF/ CP190 an Chromatin rekrutiert werden, wobei die funktionelle Konsequenzen daraus weitestgehend unklar sind (Bohla et al., 2014). Dies wäre ein interessanter Aspekt zur näheren Untersuchung. Darüber hinaus besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass NURF und dREAM über andere Isolatorfaktoren an Chromatin rekrutiert werden, was das Ziel einer weiteren Untersuchung darstellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der hoch-auflösenden Structured Illumination Microscopy gezeigt werden, dass Isolator *speckles* mit *long-distance* Chromatin-Kontakten assoziiert sind. Die Distanz zwischen dCTCF *speckles* und *Hox gene kissing* ist signifikant kürzer verglichen zu dCTCF *speckles* und nicht-interagierenden *Hox*-Genclustern.

Die durchgeführten dreidimensionalen Analysen sind, verglichen mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie, bereits deutlich präziser und detaillierter, jedoch gibt es die Möglichkeit, noch weiter ins Detail zu gehen. Mit der *direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (dSTORM) wäre man in der Lage, im *Single-Molecule* – Bereich die Assoziation von dCTCF *speckles* mit *Hox gene kissing* zu visualisieren. Das dSTORM nutzt konventionelle photoschaltbare Fluorophore, die reversibel

zwischen Fluoreszenz und dunklem Status durch die Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlängen wechseln können (Heilemann et al., 2008). Das Auflösungsvermögen dieser Mikroskopie-Technik liegt bei rund 30 nm in der xy-Ebene und 140 nm in der z-Ebene (Schermelleh et al., 2010). Mit dieser Technik wäre man in der Lage die tatsächlichen Zustände innerhalb eines Zellkerns zu visualisieren.

Die ersten Testaufnahmen wurden mit dieser Mikroskopie-Technik bereits durchgeführt und es traten Probleme auf, die bislang noch nicht gelöst werden konnten. So ist ein großes Problem von dSTORM die gleichzeitige Verwendung von nur zwei Fluorophoren (Alexa488 und Alexa647). Für den DNA FISH mit anschließender Immunfärbung müsste der Versuchsaufbau so gestaltet werden, dass mit zwei Fluorophoren indirekt, über verschiedene Zwischenschritte, die Assoziation von dCTCF *speckles* und *Hox gene kissing* untersucht wird. Ein weiteres Problem ist die „Dicke“ der Flügelimaginalscheiben. Die Testaufnahmen zeigten, dass die Eindringtiefe der dSTORM Methode nicht ausreicht um das gesamte Gewebe zu durchdringen. Aus diesem Grund müsste man für diese Untersuchungen auf Zellkultur umstellen oder auf Gewebsschnitte zugreifen. Auch hierzu wurden bereits erste Versuche durchgeführt. Flügelimaginalscheiben wurden in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom in 10 µm dicke Präparate geschnitten. Leider war diese Methode nicht erfolgreich, da die Flügelimaginalscheiben zu klein für diese Schnitttechnik waren. Es besteht jedoch noch die Möglichkeit mit Hilfe von schockgefrorenen Gewebe Kryoschnitte anzufertigen.

Um super-hochauflösende Aufnahmen von dCTCF *speckles* und *Hox gene kissing* zu erstellen, müssten somit noch einige methodische Problembereiche gelöst werden, um letztlich die Frage zu klären, wie genau Isolator *speckles* in der *long-range* Chromatin-Interaktionen involviert sind. Es könnte möglich sein, dass Isolatorproteine immer in einer gewissen Orientierung mit der DNA oder dem Chromatin als Isolator *speckles* assoziiert sind, die man mit SIM im Rahmen dieser Arbeit nicht analysieren konnte.

## 7 Literaturverzeichnis

Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1983). Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature* **302**, 676-681.

Akam, M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* **101**, 1-22.

Ali, T., Renkawitz, R., and Bartkuhn, M. (2016). Insulators and domains of gene expression. *Current opinion in genetics & development* **37**, 17-26.

Alkema, M.J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., van 't Veer, L.J., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1997). Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. *Genes & development* **11**, 226-240.

Arner, E., Daub, C.O., Vitting-Seerup, K., Andersson, R., Lilje, B., Drablos, F., Lennartsson, A., Ronnerblad, M., Hrydziuszko, O., Vitezic, M., *et al.* (2015). Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science* **347**, 1010-1014.

Balbani E.G. (1881) Surla structure du noyau des celluler cellulaires chezles larvas de Chironomus. *Zool. Anz.* **4** : 637-641.

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.

Bantignies, F., and Cavalli, G. (2014). Topological organization of *Drosophila* Hox genes using DNA fluorescent in situ hybridization. *Methods in molecular biology* **1196**, 103-120.

Bantignies, F., Roure, V., Comet, I., Leblanc, B., Schuettengruber, B., Bonnet, J., Tixier, V., Mas, A., and Cavalli, G. (2011). Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell* **144**, 214-226.

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. *The EMBO journal* **28**, 877-888.

Beall, E.L., Manak, J.R., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J.S., and Botchan, M.R. (2002). Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication. *Nature* **420**, 833-837.

Beermann, W. (1972). Chromomeres and genes. Results and problems in cell differentiation **4**, 1-33.

Berger, A.B., Cabal, G.G., Fabre, E., Duong, T., Buc, H., Nehrbass, U., Olivo-Marin, J.C., Gadal, O., and Zimmer, C. (2008). High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nature methods* **5**, 1031-1037.

- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Blanton, J., Gaszner, M., and Schedl, P. (2003). Protein:protein interactions and the pairing of boundary elements in vivo. *Genes & development* 17, 664-675.
- Bohla, D., Herold, M., Panzer, I., Buxa, M.K., Ali, T., Demmers, J., Kruger, M., Scharfe, M., Jarek, M., Bartkuhn, M., *et al.* (2014). A functional insulator screen identifies NURF and dREAM components to be required for enhancer-blocking. *PLoS one* 9, e107765.
- Bolte, S., and Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy* 224, 213-232.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Muller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., *et al.* (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS biology* 3, e157.
- Bornfleth, H., Edelmann, P., Zink, D., Cremer, T., and Cremer, C. (1999). Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophysical journal* 77, 2871-2886.
- Bridges, C.B., Morgan, T.H. (1923). The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Publs Carnegie Instn* 327: 1--251.
- Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H., and Arndt-Jovin, D.J. (1998). The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: impact on models for silencing. *The Journal of cell biology* 141, 469-481.
- Buchner, K., Roth, P., Schotta, G., Krauss, V., Saumweber, H., Reuter, G., and Dorn, R. (2000). Genetic and molecular complexity of the position effect variegation modifier *mod(mdg4)* in *Drosophila*. *Genetics* 155, 141-157.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* 112, 195-203.
- Capelson, M., and Corces, V.G. (2005). The ubiquitin ligase dTopors directs the nuclear organization of a chromatin insulator. *Molecular cell* 20, 105-116.
- Capelson, M., and Corces, V.G. (2006). SUMO conjugation attenuates the activity of the gypsy chromatin insulator. *The EMBO journal* 25, 1906-1914.
- Cavalli, G. (2007). Chromosome kissing. *Current opinion in genetics & development* 17, 443-450.
- Chetverina, D., Aoki, T., Erokhin, M., Georgiev, P., and Schedl, P. (2014). Making connections: insulators organize eukaryotic chromosomes into independent cis-regulatory networks. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36, 163-172.

- Cheutin, T., and Cavalli, G. (2012). Progressive polycomb assembly on H3K27me3 compartments generates polycomb bodies with developmentally regulated motion. *PLoS genetics* 8, e1002465.
- Cheutin, T., and Cavalli, G. (2014). Polycomb silencing: from linear chromatin domains to 3D chromosome folding. *Current opinion in genetics & development* 25, 30-37.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* 78, 273-304.
- Cleard, F., Moshkin, Y., Karch, F., and Maeda, R.K. (2006). Probing long-distance regulatory interactions in the *Drosophila melanogaster* bithorax complex using Dam identification. *Nature genetics* 38, 931-935.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6499-6503.
- Comet, I., Savitskaya, E., Schuettengruber, B., Negre, N., Lavrov, S., Parshikov, A., Juge, F., Gracheva, E., Georgiev, P., and Cavalli, G. (2006). PRE-mediated bypass of two Su(Hw) insulators targets PcG proteins to a downstream promoter. *Developmental cell* 11, 117-124.
- Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews Genetics* 2, 292-301.
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *The Journal of cell biology* 145, 1119-1131.
- Cubenas-Potts, C., and Corces, V.G. (2015). Architectural proteins, transcription, and the three-dimensional organization of the genome. *FEBS letters* 589, 2923-2930.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., and Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science* 295, 1306-1311.
- Dietzel, S., Niemann, H., Bruckner, B., Maurange, C., and Paro, R. (1999). The nuclear distribution of Polycomb during *Drosophila melanogaster* development shown with a GFP fusion protein. *Chromosoma* 108, 83-94.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376-380.
- Duncan, I. (1987). The bithorax complex. *Annual review of genetics* 21, 285-319.
- Dundr, M., and Misteli, T. (2010). Biogenesis of nuclear bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000711.

- Durfee, T., Hansen, A.M., Zhi, H., Blattner, F.R., and Jin, D.J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *190*, 1084-1096.
- Eagen, K.P., Hartl, T.A., and Kornberg, R.D. (2015). Stable Chromosome Condensation Revealed by Chromosome Conformation Capture. *Cell* *163*, 934-946.
- Elgin, S.C., and Reuter, G. (2013). Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *5*, a017780.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* *421*, 448-453.
- Flemming, W. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (1882). F. C. W. Vogel, Leipzig
- Ficz, G., Heintzmann, R., and Arndt-Jovin, D.J. (2005). Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living *Drosophila*. *Development* *132*, 3963-3976.
- Frasch, M., Glover, D.M., and Saumweber, H. (1986). Nuclear antigens follow different pathways into daughter nuclei during mitosis in early *Drosophila* embryos. *Journal of cell science* *82*, 155-172.
- Fraser, P., and Bickmore, W. (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* *447*, 413-417.
- Fullwood, M.J., Liu, M.H., Pan, Y.F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y.B., Orlov, Y.L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P.H., *et al.* (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* *462*, 58-64.
- Galiova, G., Bartova, E., and Kozubek, S. (2004). Nuclear topography of beta-like globin gene cluster in IL-3-stimulated human leukemic K-562 cells. *Blood cells, molecules & diseases* *33*, 4-14.
- Gan, M., Moebus, S., Eggert, H., and Saumweber, H. (2011). The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes, a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10. *Journal of biosciences* *36*, 425-438.
- Gaszner, M., Vazquez, J., and Schedl, P. (1999). The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes & development* *13*, 2098-2107.
- Gerasimova, T.I., Byrd, K., and Corces, V.G. (2000). A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Molecular cell* *6*, 1025-1035.
- Gerasimova, T.I., and Corces, V.G. (1998). Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* *92*, 511-521.
- Gerasimova, T.I., Lei, E.P., Bushey, A.M., and Corces, V.G. (2007). Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *Molecular cell* *28*, 761-772.

- Ghosh, D., Gerasimova, T.I., and Corces, V.G. (2001). Interactions between the Su(Hw) and Mod(mdg4) proteins required for gypsy insulator function. *The EMBO journal* 20, 2518-2527.
- Gibcus, J.H., and Dekker, J. (2013). The hierarchy of the 3D genome. *Molecular cell* 49, 773-782.
- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Current opinion in genetics & development* 15, 536-541.
- Golovnin, A., Melnikova, L., Shapovalov, I., Kostyuchenko, M., and Georgiev, P. (2015). EAST Organizes Drosophila Insulator Proteins in the Interchromosomal Nuclear Compartment and Modulates CP190 Binding to Chromatin. *PloS one* 10, e0140991.
- Golovnin, A., Melnikova, L., Volkov, I., Kostyuchenko, M., Galkin, A.V., and Georgiev, P. (2008). 'Insulator bodies' are aggregates of proteins but not of insulators. *EMBO reports* 9, 440-445.
- Golovnin, A., Volkov, I., and Georgiev, P. (2012). SUMO conjugation is required for the assembly of Drosophila Su(Hw) and Mod(mdg4) into insulator bodies that facilitate insulator complex formation. *Journal of cell science* 125, 2064-2074.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U., and Cavalli, G. (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* 124, 957-971.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., *et al.* (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453, 948-951.
- Gustafsson, M.G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy* 198, 82-87.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* 166, 557-580.
- Handoko, L., Xu, H., Li, G., Ngan, C.Y., Chew, E., Schnapp, M., Lee, C.W., Ye, C., Ping, J.L., Mulawadi, F., *et al.* (2011). CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nature genetics* 43, 630-638.
- Harding, K., Wedeen, C., McGinnis, W., and Levine, M. (1985). Spatially regulated expression of homeotic genes in Drosophila. *Science* 229, 1236-1242.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schuttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie* 47, 6172-6176.

Heintzmann, R., Jovin, T.M., and Cremer, C. (2002). Saturated patterned excitation microscopy--a concept for optical resolution improvement. *Journal of the Optical Society of America A, Optics, image science, and vision* 19, 1599-1609.

Hernandez-Munoz, I., Taghavi, P., Kuijl, C., Neefjes, J., and van Lohuizen, M. (2005). Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Molecular and cellular biology* 25, 11047-11058.

Hochheimer, A., Zhou, S., Zheng, S., Holmes, M.C., and Tjian, R. (2002). TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature* 420, 439-445.

Holohan, E.E., Kwong, C., Adryan, B., Bartkuhn, M., Herold, M., Renkawitz, R., Russell, S., and White, R. (2007). CTCF genomic binding sites in *Drosophila* and the organisation of the bithorax complex. *PLoS genetics* 3, e112.

Hou, C., Li, L., Qin, Z.S., and Corces, V.G. (2012). Gene density, transcription, and insulators contribute to the partition of the *Drosophila* genome into physical domains. *Molecular cell* 48, 471-484.

Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry* 73, 355-382.

Kaufman, T.C., Lewis, R., and Wakimoto, B. (1980). Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *DROSOPHILA MELANOGASTER*: The Homoeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84a-B. *Genetics* 94, 115-133.

Kaufman, T.C., Seeger, M.A., and Olsen, G. (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Advances in genetics* 27, 309-362.

Kind, J., and van Steensel, B. (2010). Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Current opinion in cell biology* 22, 320-325.

Klein, T. (2008). Immunolabeling of imaginal discs. *Methods in molecular biology* 420, 253-263.

Kugler, S.J., and Nagel, A.C. (2010). A novel PzG-NURF complex regulates Notch target gene activity. *Molecular biology of the cell* 21, 3443-3448.

Kurshakova, M., Maksimenko, O., Golovnin, A., Pulina, M., Georgieva, S., Georgiev, P., and Krasnov, A. (2007). Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Molecular cell* 27, 332-338.

Kurz, A., Lampel, S., Nickolenko, J.E., Bradl, J., Benner, A., Zirbel, R.M., Cremer, T., and Lichter, P. (1996). Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *The Journal of cell biology* 135, 1195-1205.

- Kyrchanova, O., and Georgiev, P. (2014). Chromatin insulators and long-distance interactions in *Drosophila*. *FEBS letters* 588, 8-14.
- Labrador, M., and Corces, V.G. (2002). Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell* 111, 151-154.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature reviews Genetics* 8, 104-115.
- Lanzuolo, C., Roure, V., Dekker, J., Bantignies, F., and Orlando, V. (2007). Polycomb response elements mediate the formation of chromosome higher-order structures in the bithorax complex. *Nature cell biology* 9, 1167-1174.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Lewis, E.B., Pfeiffer, B.D., Mathog, D.R., and Celniker, S.E. (2003). Evolution of the homeobox complex in the Diptera. *Current biology : CB* 13, R587-588.
- Lewis, R.A., Wakimoto, B.T., Denell, R.E., and Kaufman, T.C. (1980). Genetic Analysis of the Antennapedia Gene Complex (Ant-C) and Adjacent Chromosomal Regions of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. II. Polytene Chromosome Segments 84A-84B1,2. *Genetics* 95, 383-397.
- Li, G., and Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current opinion in genetics & development* 21, 175-186.
- Li, H.B., Muller, M., Bahechar, I.A., Kyrchanova, O., Ohno, K., Georgiev, P., and Pirrotta, V. (2011). Insulators, not Polycomb response elements, are required for long-range interactions between Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology* 31, 616-625.
- Li, H.B., Ohno, K., Gui, H., and Pirrotta, V. (2013). Insulators target active genes to transcription factories and polycomb-repressed genes to polycomb bodies. *PLoS genetics* 9, e1003436.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., *et al.* (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289-293.
- Lobanenkov, 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.

- Luger, K., Dechassa, M.L., and Tremethick, D.J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 436-447.
- Lupianez, D.G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J.M., Laxova, R., *et al.* (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 161, 1012-1025.
- Maeda, R.K., and Karch, F. (2006). The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* 133, 1413-1422.
- Mahy, N.L., Perry, P.E., Gilchrist, S., Baldock, R.A., and Bickmore, W.A. (2002). Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *The Journal of cell biology* 157, 579-589.
- Maksimenko, O., Bartkuhn, M., Stakhov, V., Herold, M., Zolotarev, N., Jox, T., Buxa, M.K., Kirsch, R., Bonchuk, A., Fedotova, A., *et al.* (2015). Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome research* 25, 89-99.
- Mandel, M., and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology* 53, 159-162.
- Mao, Y.S., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends in genetics : TIG* 27, 295-306.
- Messmer, S., Franke, A., and Paro, R. (1992). Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes & development* 6, 1241-1254.
- Metz, C.W. (1916). Mutations in Three Species of *Drosophila*. *Genetics* 1, 591-607.
- Meulmeester, E., and Melchior, F. (2008). Cell biology: SUMO. *Nature* 452, 709-711.
- Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128, 787-800.
- Mitchell, J.A., and Fraser, P. (2008). Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes & development* 22, 20-25.
- Moehrle, A., and Paro, R. (1994). Spreading the silence: epigenetic transcriptional regulation during *Drosophila* development. *Developmental genetics* 15, 478-484.
- Mohan, M., Bartkuhn, M., Herold, M., Philippen, A., Heinl, N., Bardenhagen, I., Leers, J., White, R.A., Renkawitz-Pohl, R., Saumweber, H., *et al.* (2007). The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *The EMBO journal* 26, 4203-4214.

- Moon, H., Filippova, G., Loukinov, D., Pugacheva, E., Chen, Q., Smith, S.T., Munhall, A., Grewe, B., Bartkuhn, M., Arnold, R., *et al.* (2005). CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO reports* 6, 165-170.
- Moshkin, Y.M., Chalkley, G.E., Kan, T.W., Reddy, B.A., Ozgur, Z., van Ijcken, W.F., Dekkers, D.H., Demmers, J.A., Travers, A.A., and Verrijzer, C.P. (2012). Remodelers organize cellular chromatin by counteracting intrinsic histone-DNA sequence preferences in a class-specific manner. *Molecular and cellular biology* 32, 675-688.
- Muller, J., and Verrijzer, P. (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Current opinion in genetics & development* 19, 150-158.
- Murawska, M., and Brehm, A. (2012). Immunostaining of *Drosophila* polytene chromosomes to investigate recruitment of chromatin-binding proteins. *Methods in molecular biology* 809, 267-277.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-113.
- Negre, N., Brown, C.D., Shah, P.K., Kheradpour, P., Morrison, C.A., Henikoff, J.G., Feng, X., Ahmad, K., Russell, S., White, R.A., *et al.* (2010). A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLoS genetics* 6, e1000814.
- Noordermeer, D., de Wit, E., Klous, P., van de Werken, H., Simonis, M., Lopez-Jones, M., Eussen, B., de Klein, A., Singer, R.H., and de Laat, W. (2011). Variegated gene expression caused by cell-specific long-range DNA interactions. *Nature cell biology* 13, 944-951.
- Nora, E.P., Lajoie, B.R., Schulz, E.G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Pilot, T., van Berkum, N.L., Meisig, J., Sedat, J., *et al.* (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* 485, 381-385.
- Ohtsuki, S., and Levine, M. (1998). GAGA mediates the enhancer blocking activity of the *eve* promoter in the *Drosophila* embryo. *Genes & development* 12, 3325-3330.
- Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-332.
- Page, A.R., Kovacs, A., Deak, P., Torok, T., Kiss, I., Dario, P., Bastos, C., Batista, P., Gomes, R., Ohkura, H., *et al.* (2005). Spotted-dick, a zinc-finger protein of *Drosophila* required for expression of *Orc4* and S phase. *The EMBO journal* 24, 4304-4315.
- Pai, C.Y., Lei, E.P., Ghosh, D., and Corces, V.G. (2004). The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Molecular cell* 16, 737-748.

- Parkhurst, S.M., Harrison, D.A., Remington, M.P., Spana, C., Kelley, R.L., Coyne, R.S., and Corces, V.G. (1988). The *Drosophila su(Hw)* gene, which controls the phenotypic effect of the gypsy transposable element, encodes a putative DNA-binding protein. *Genes & development* 2, 1205-1215.
- Paro, R. (2008). Mapping protein distributions on polytene chromosomes by immunostaining. *CSH protocols 2008*, pdb prot4714.
- Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S.W., Solovei, I., Brugman, W., Graf, S., Flicek, P., Kerkhoven, R.M., van Lohuizen, M., *et al.* (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular cell* 38, 603-613.
- Pickersgill, H., Kalverda, B., de Wit, E., Talhout, W., Fornerod, M., and van Steensel, B. (2006). Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nature genetics* 38, 1005-1014.
- Pirrotta, V. (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Current opinion in genetics & development* 7, 249-258.
- Radloff, R., Bauer, W., and Vinograd, J. (1967). A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57, 1514-1521.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., *et al.* (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Riising, E.M., Boggio, R., Chiocca, S., Helin, K., and Pasini, D. (2008). The polycomb repressive complex 2 is a potential target of SUMO modifications. *PLoS one* 3, e2704.
- Roberts, R.J., and Macelis, D. (1992). Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic acids research* 20 *Suppl*, 2167-2180.
- Saurin, A.J., Shiels, C., Williamson, J., Satijn, D.P., Otte, A.P., Sheer, D., and Freemont, P.S. (1998). The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *The Journal of cell biology* 142, 887-898.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology* 190, 165-175.
- Scheuermann, M.O., Tajbakhsh, J., Kurz, A., Saracoglu, K., Eils, R., and Lichter, P. (2004). Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei. *Experimental cell research* 301, 266-279.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676-682.

- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology* 27, 353-365.
- Schoborg, T., Rickels, R., Barrios, J., and Labrador, M. (2013). Chromatin insulator bodies are nuclear structures that form in response to osmotic stress and cell death. *The Journal of cell biology* 202, 261-276.
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., *et al.* (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nature genetics* 42, 53-61.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128, 735-745.
- Schwartz, B.E., Werner, J.K., and Lis, J.T. (2004). Indirect immunofluorescent labeling of *Drosophila* polytene chromosomes: visualizing protein interactions with chromatin in vivo. *Methods in enzymology* 376, 393-404.
- Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Nix, D.A., Li, X.Y., Bourgon, R., Biggin, M., and Pirrotta, V. (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics* 38, 700-705.
- Schwartz, Y.B., Linder-Basso, D., Kharchenko, P.V., Tolstorukov, M.Y., Kim, M., Li, H.B., Gorchakov, A.A., Minoda, A., Shanower, G., Alekseyenko, A.A., *et al.* (2012). Nature and function of insulator protein binding sites in the *Drosophila* genome. *Genome research* 22, 2188-2198.
- Sexton, T., Schober, H., Fraser, P., and Gasser, S.M. (2007). Gene regulation through nuclear organization. *Nature structural & molecular biology* 14, 1049-1055.
- Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A., and Cavalli, G. (2012). Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell* 148, 458-472.
- Shen, Y., Yue, F., McCleary, D.F., Ye, Z., Edsall, L., Kuan, S., Wagner, U., Dixon, J., Lee, L., Lobanenkov, V.V., *et al.* (2012). A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* 488, 116-120.
- Sofueva, S., Yaffe, E., Chan, W.C., Georgopoulou, D., Vietri Rudan, M., Mira-Bontenbal, H., Pollard, S.M., Schroth, G.P., Tanay, A., and Hadjur, S. (2013). Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture. *The EMBO journal* 32, 3119-3129.
- Southern, E.M. (1979). Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* 100, 319-323.

- Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Kruger, I., and Suske, G. (2008). SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO reports* 9, 899-906.
- Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J., and Grunstein, M. (2001). Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Molecular cell* 8, 473-479.
- Sun, F.L., and Elgin, S.C. (1999). Putting boundaries on silence. *Cell* 99, 459-462.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Tyler, J.K., Bulger, M., Kamakaka, R.T., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1996). The p55 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Molecular and cellular biology* 16, 6149-6159.
- Ulianov, S.V., Khrameeva, E.E., Gavrillov, A.A., Flyamer, I.M., Kos, P., Mikhaleva, E.A., Penin, A.A., Logacheva, M.D., Imakaev, M.V., Chertovich, A., *et al.* (2016). Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome research* 26, 70-84.
- Ulrich, H.D. (2008). The fast-growing business of SUMO chains. *Molecular cell* 32, 301-305.
- Urata, Y., Parmelee, S.J., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1995). A three-dimensional structural dissection of *Drosophila* polytene chromosomes. *The Journal of cell biology* 131, 279-295.
- van Bemmelen, J.G., Pagie, L., Braunschweig, U., Brugman, W., Meuleman, W., Kerkhoven, R.M., and van Steensel, B. (2010). The insulator protein SU(HW) fine-tunes nuclear lamina interactions of the *Drosophila* genome. *PloS one* 5, e15013.
- Van Bortle, K., Nichols, M.H., Li, L., Ong, C.T., Takenaka, N., Qin, Z.S., and Corces, V.G. (2014). Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome biology* 15, R82.
- Van Bortle, K., Ramos, E., Takenaka, N., Yang, J., Wahi, J.E., and Corces, V.G. (2012). *Drosophila* CTCF tandemly aligns with other insulator proteins at the borders of H3K27me3 domains. *Genome research* 22, 2176-2187.
- van den Heuvel, S., and Dyson, N.J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 713-724.
- Verschure, P.J., van Der Kraan, I., Manders, E.M., and van Driel, R. (1999). Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *The Journal of cell biology* 147, 13-24.

Volpi, E.V., Chevret, E., Jones, T., Vatcheva, R., Williamson, J., Beck, S., Campbell, R.D., Goldsworthy, M., Powis, S.H., Ragoussis, J., *et al.* (2000). Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *Journal of cell science* *113* ( Pt 9), 1565-1576.

Wasser, M., and Chia, W. (2003). The *Drosophila* EAST protein associates with a nuclear remnant during mitosis and constrains chromosome mobility. *Journal of cell science* *116*, 1733-1743.

Williams, R.R., Broad, S., Sheer, D., and Ragoussis, J. (2002). Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Experimental cell research* *272*, 163-175.

Yusufzai, T.M., Tagami, H., Nakatani, Y., and Felsenfeld, G. (2004). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Molecular cell* *13*, 291-298.

Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology* *20*, 259-266.

Zhao, K., Hart, C.M., and Laemmli, U.K. (1995). Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell* *81*, 879-889.

## 8 Anhang

### 8.1 Genomische Position der verwendeten Sonden

**Tabelle 1** Position der verwendeten Sonden innerhalb des Genoms

Sonde	Länge	Genomischen Position
BacR32J03	190.641 bp	3R:6,833,039..7,023,680
BacR28H01	148.641 bp	3R:16,666,042..16,814,683

Kurze ANT-C Sonden – aus BacR32J03 kloniert:

Sonde	Länge	Genomische Position
ANT-C8kb	8747 bp	3R:6,856,153..6,864,899
ANT-C9kb	9029 bp	3R:6,908,291..6,917,319
ANT-C10kb	10349 bp	3R:6,967,991..6,978,339
ANT-C13kb	12957 bp	3R:6,997,378..7,010,334

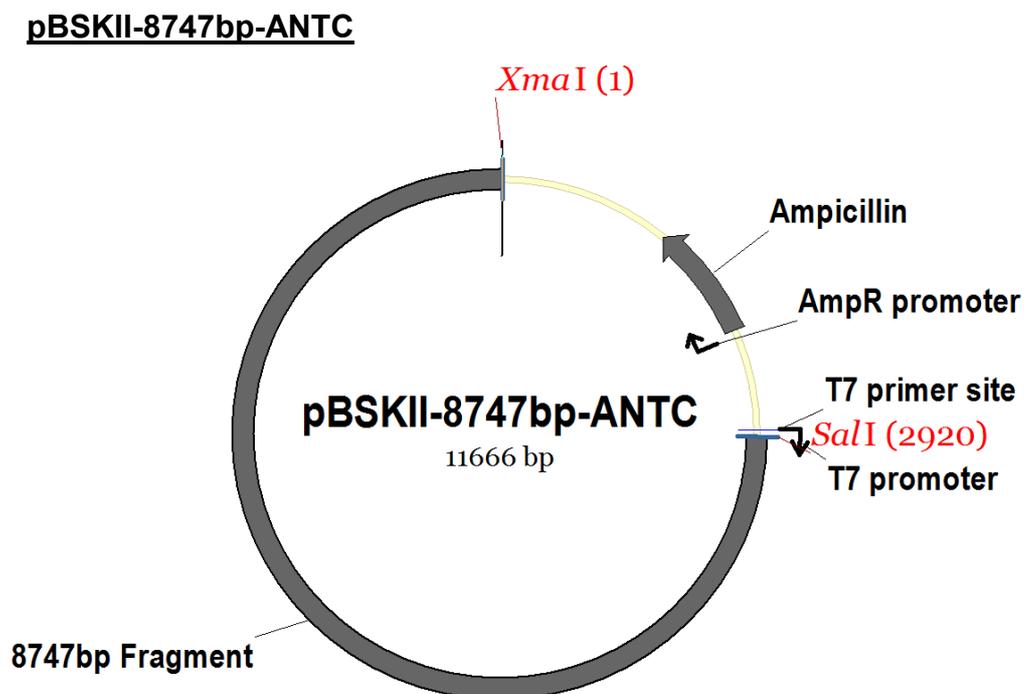
Kurze BX-C Sonden – aus BacR28H03 kloniert:

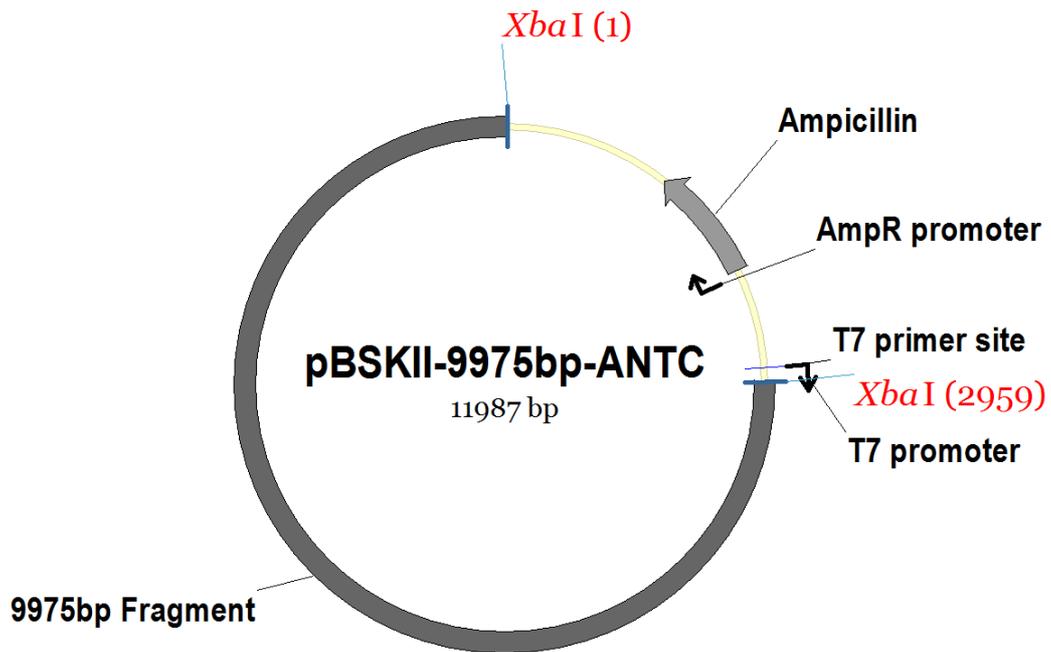
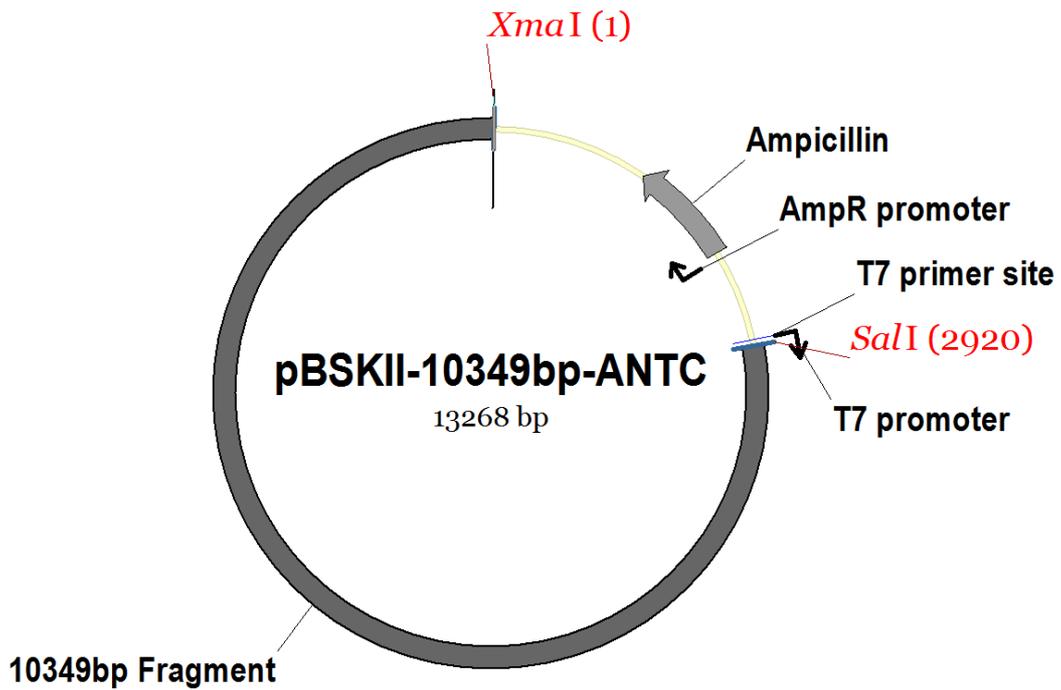
Sonde	Länge	Genomische Position
BX-C9kb	9305 bp	3R:16,680,737..16,690,041
BX-C10kb	11209 bp	3R:16,717,918..16,729,126
BX-C8.6kb	8644 bp	3R:16,729,127..16,737,770
BX-C8kb	8106 bp	3R:16,747,132..16,755,237
BX-C14kb	14363 bp	3R:16,773,166..16,787,528

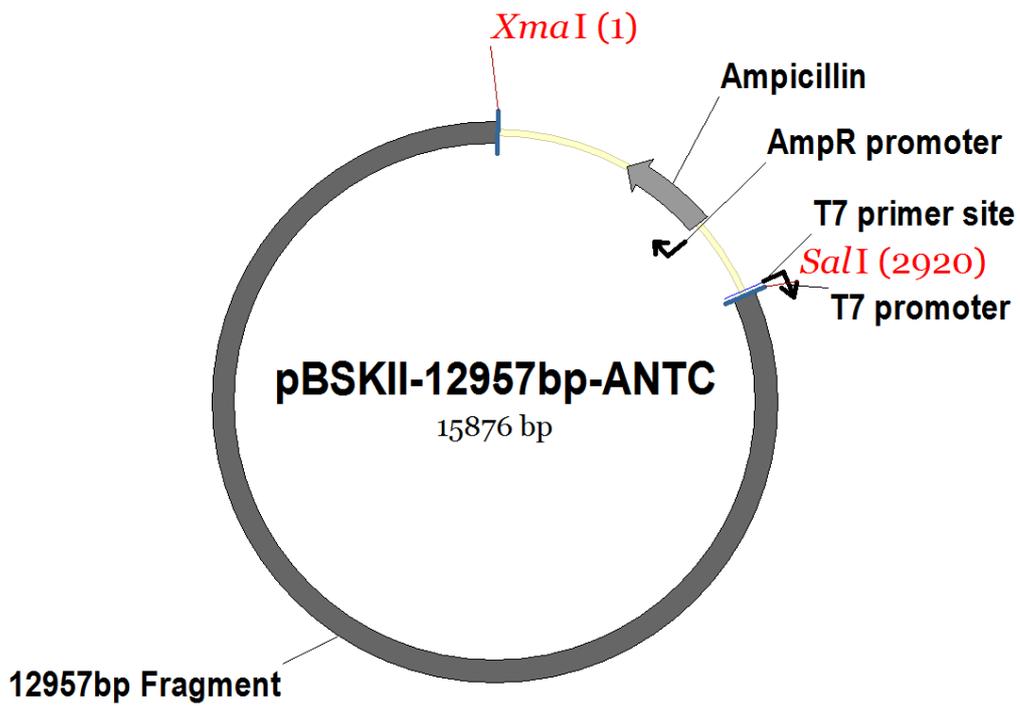
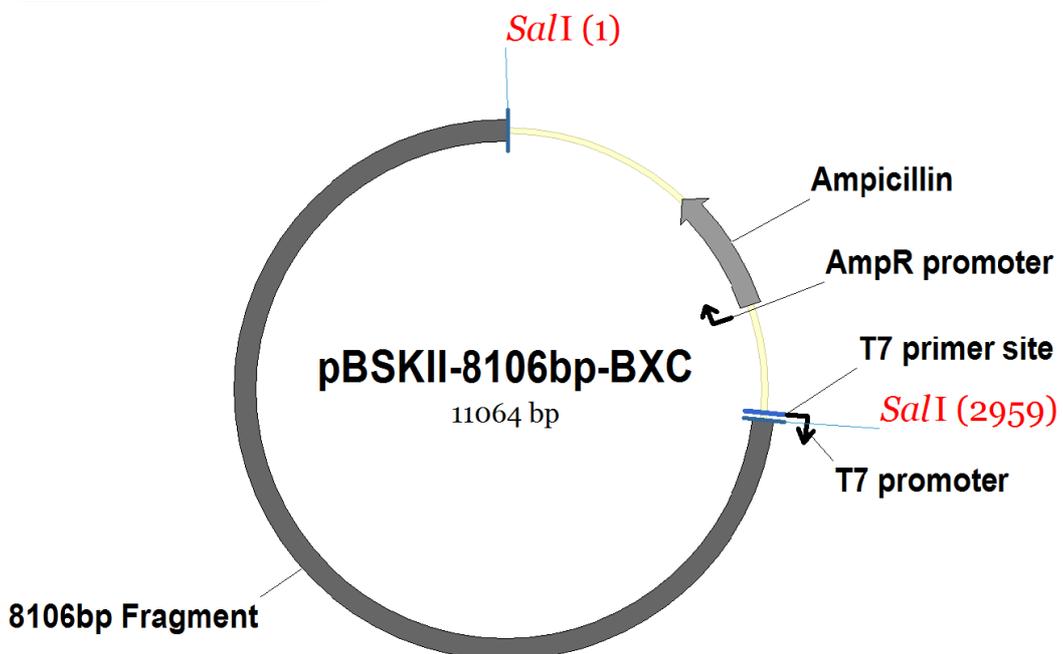
Sonde	Länge	Genomische Position	PCR amplifiziert – Primer
wake	9997 bp	3R:22,653,558..22,663,555	5'- GAGTCTCAGAGGCCAAGTGT- 3' 5'- CGTCTCTTTTCGCGGAACAAT- 3'
beat-Vc	9091 bp	3R:12,749,756..12,758,847	5'- AACACTTTCCCCGCATTTC- 3' 5'- CATGCCAGAAAACAAGCCCT- 3'
26MB	12913 bp	3R:26,177,792..26,190,705	5'- GAAATTTGCTGTGCCGCTTG- 3' 5'- TGGGGTTTCGACAATACGGA- 3'

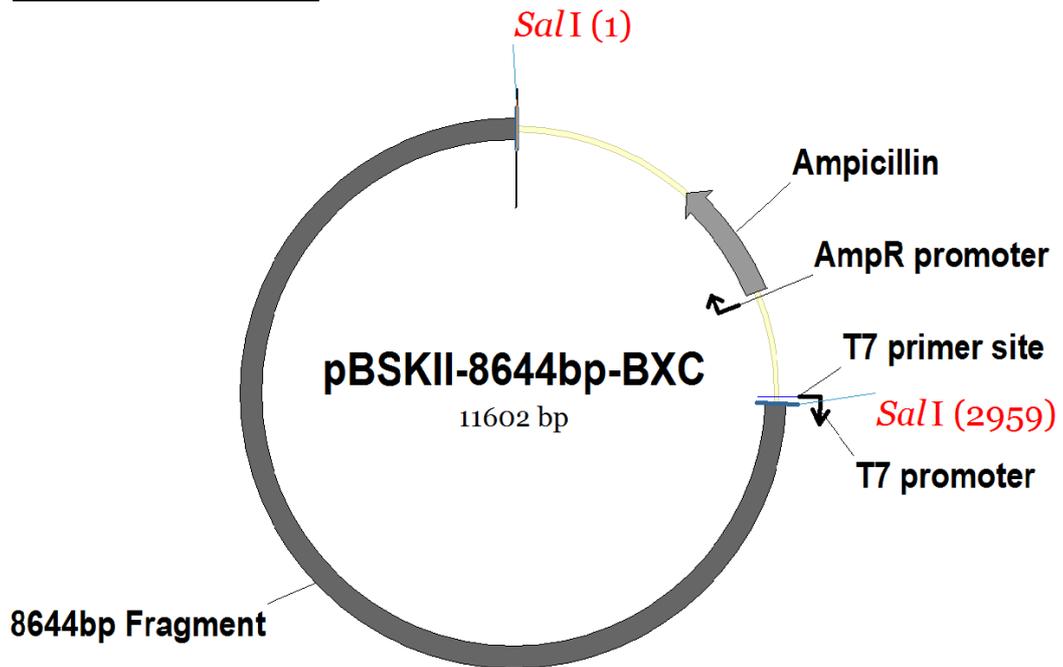
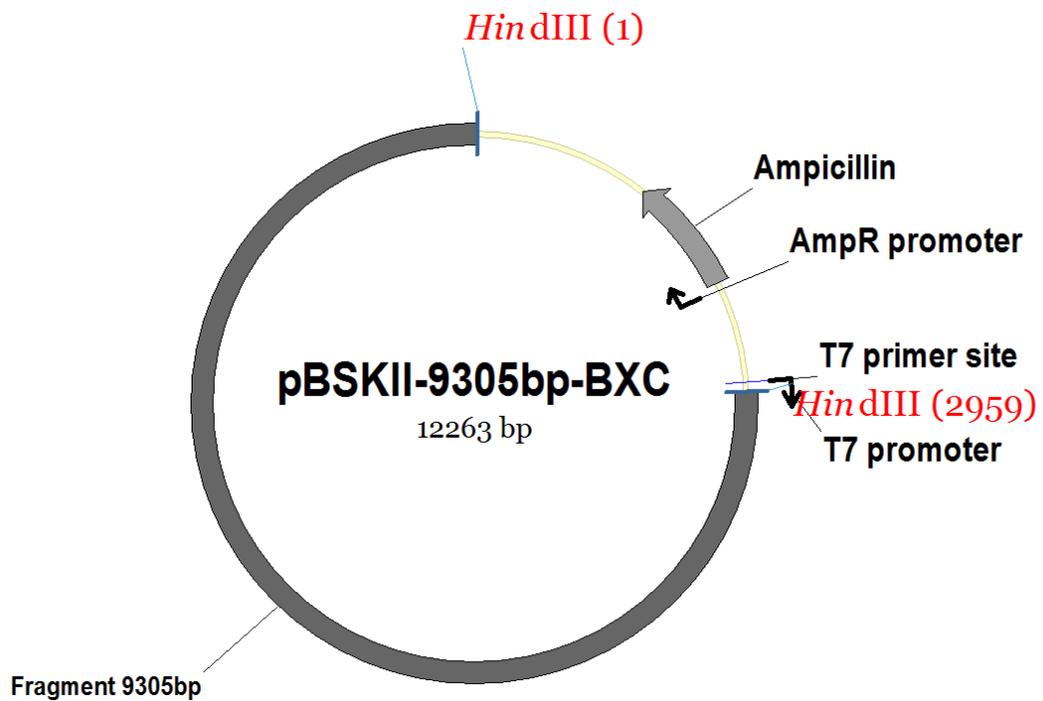
## 8.2 DNA-Konstrukte

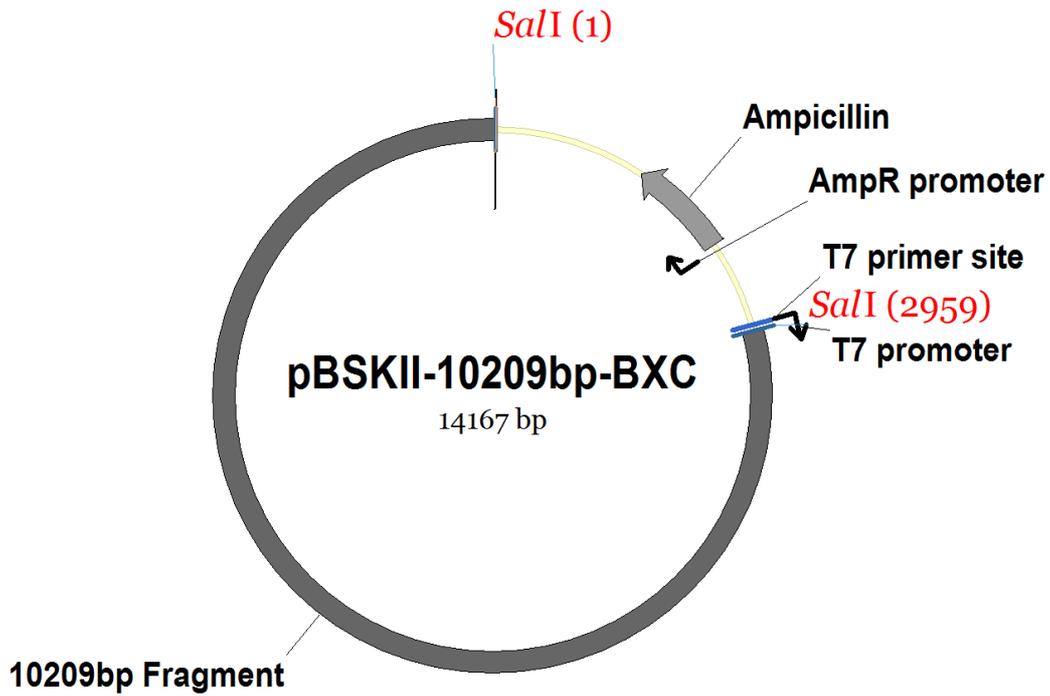
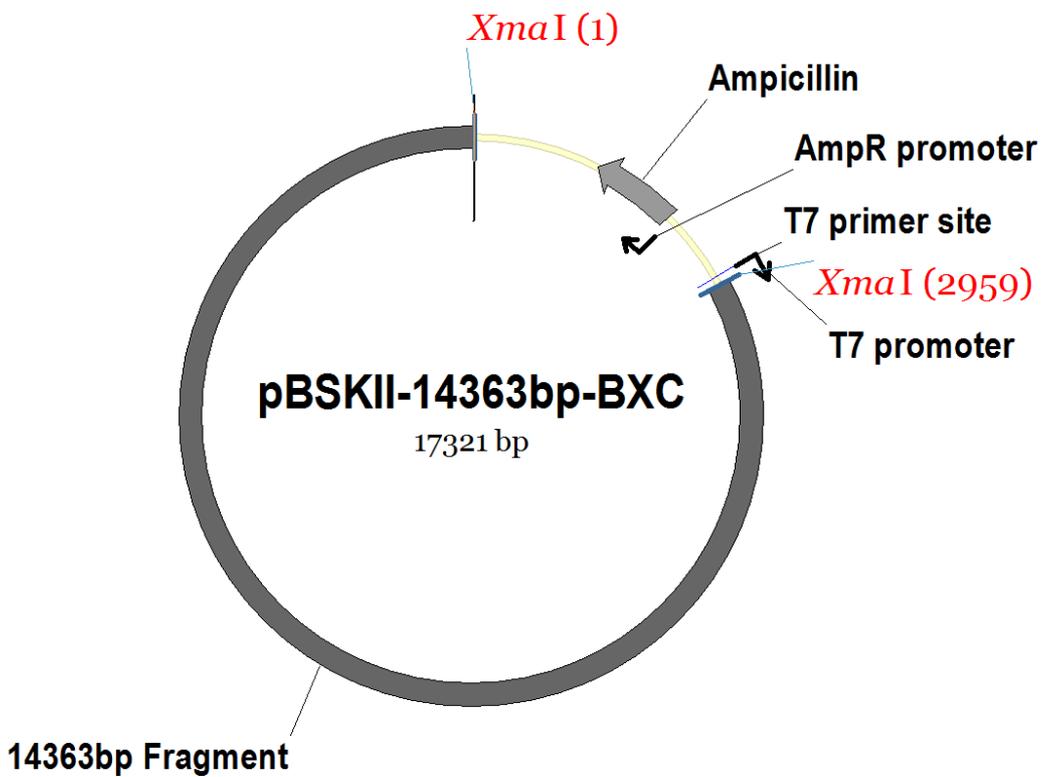
Die in der vorliegenden Arbeit klonierten DNA-Konstrukte dienten zur direkten Fluoreszenz-Markierung mittels Nick Translation (siehe 4.3.3). Die in pBSKII (+) klonierten Fragmente wurden zuvor aus dem BacR32J03 bzw. BacR28H01 mit verschiedenen Restriktionsenzymen herausgeschnitten. Die verwendeten Restriktionsenzyme können den DNA-Konstrukten entnommen werden.



**pBSKII-9975bp-ANTC****pBSKII-10349bp-ANTC**

**pBSKII-12957bp-ANTC****pBSKII-8106bp-BXC**

**pBSKII-8644bp-BXC****pBSKII-9305bp-BXC**

pBSKII-10209bp-BXCpBSKII-14363bp-BXC

## 8.3 Oligonukleotide

### Testprimer zur Überprüfung der Richtigkeit der bestellten BAC-DNA

BacR28H01	5'- GCTCCTCCTTCTTGTGCAAC- 3'
	5'- CCTGGTTTTGGCATACGAGT- 3'
BacR32J03	5'- GCCATATCCTGGATTCGAGA- 3'
	5'- GTGCGATTGTATTGGTGTGC- 3'
BacR02L12	5'- CATGTGCGCTGCTTACTCAT- 3'
	5'- ACAGATGGGATTGCCTGGAA- 3'
BacR09O13	5'- TTTTCACTCGCCTCGCAAAA- 3'
	5'- GCGAACTGTAGCACCTAACG- 3'
BacR08N16	5'- ACCAACTAGAGTGTGCAGCT- 3'
	5'- AACTCTACATGGACGTGGCA- 3'

### Testprimer zur Überprüfung der Richtigkeit der Inserts

Insert ANT-C.8kb	5'- TATGCGACAGCTTTCCCTCT- 3'	880bp
	5'- GGACCAGGTTCCAGAGATCA- 3'	
Insert ANT-C.9kb	5'- ATTACAGGAGTGCACACCGA-3'	403bp
	5'- GTGTTTTGTCCACTGCGAGT- 3'	
Insert ANT-C.10kb	5'- TTCATCTGTTGCCGTTGATT- 3'	1204bp
	5'- TTGTGACATTTCCACGCAAT- 3'	
Insert ANT-C.13kb	5'- CAACAGTCCCGCTTTAGCTC- 3'	827bp
	5'- CCGGCACAGGTTGACTTATT- 3'	
Insert BX-C.9kb	5'- CGGCAATAACAATGTGCAAC- 3'	360bp
	5'- AACAGCTGCAGCGAATTTTT- 3'	
Insert BX-C.10kb	5'- CCGTCTCTCTGCTGCTCT- 3'	444bp
	5'- GATTGGATGGGATGGTATCG- 3'	
Insert BX-C.8.6kb	5'- AACCCGCAGTTTTGTTTTTG- 3'	485bp
	5'- CTGCAACAAGCTACCGATGA- 3'	
Insert BX-C.8kb	5'- CTCCACCCGCTGTTGTATTT- 3'	451bp
	5'- AAAGCGGACCAGAGTTGAGA- 3'	
Insert BX-C.14kb	5'- TGCGAAGGCACAGAATGTAG- 3'	478bp
	5'- TGTGGCGACATTGTTTTTGT- 3'	

**Primer für *long expand* PCR**

wake	5'- GAGTCTCAGAGGCCAAGTGT- 3'	9997bp
	5'- CGTCTCTTTTCGCGGAACAAT- 3'	
beat-Vc	5'- AACACTTTCCCCGCATTTCC- 3'	9091bp
	5'- CATGCCAGAAAACAAGCCCT- 3'	
26MB	5'- GAAATTTGCTGTGCCGCTTG- 3'	12913bp
	5'- TGGGGTTTCGACAATACGGA- 3'	

**Sequenzierprimer**

T7                                    5'- TAATACGACTCACTATAGGG- 3'

**RNAi-Primer**

Luciferase    5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGATTTTGTGCCAGAGTCC- 3'  
                   5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCCATATCCTTGCCTGATA- 3'

Smt3            5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCACCAGTCTGCTGCTG- 3'  
                   5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGATGACGAAAAGAAGGGAGGTG- 3'

Aos1            5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGCAAAGTAGAACCCGAAG- 3'  
                   5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGAAGCTGCTGGATGACAA- 3'

Uba2            5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCATTTGGTCTAAGTCGGG- 3'  
                   5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGGCAAGCTGTTCAACAAGT- 3'

## 8.4 Zweiseitiger Mann-Whitney-U Test

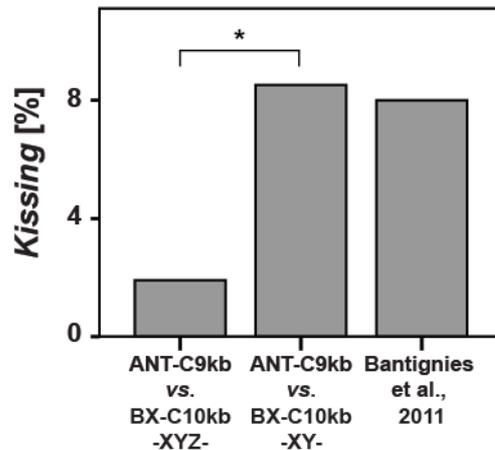
**Tabelle 2** p-Werte des paarweisen Vergleichs der FISH Sonden, Zweiseitiger Mann-Whitney-U Test

	BX-C8kb vs. ANT-C	BX-C8.6kb vs. ANT-C	BX-C9kb vs. ANT-C	BX-C10kb vs. ANT-C	BX-C14kb vs. ANT-C
BX-C8kb vs. ANT-C	-	6.69	<0.001	<0.001	<0.001
BX-C8.6kb vs. ANT-C	6.69	-	<0.001	<0.001	<0.001
BX-C9kb vs. ANT-C	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001
BX-C10kb vs. ANT-C	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
BX-C14kb vs. ANT-C	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-

	ANT-C8kb vs. BX-C	ANT-C9kb vs. BX-C	ANT-C10kb vs. BX-C	ANT-C13kb vs. BX-C
ANT-C8kb vs. BX-C	-	<0.001	<0.001	<0.001
ANT-C9kb vs. BX-C	<0.001	-	<0.001	<0.001
ANT-C10kb vs. BX-C	<0.001	<0.001	-	<0.001
ANT-C13kb vs. BX-C	<0.001	<0.001	<0.001	-

	ANT-C8kb vs. BX-	ANT-C8kb vs. BX-	ANT-C9kb vs. BX-	ANT-C9kb vs. BX-
ANT-C8kb vs. BX-C9kb	-	<0.001	<0.001	<0.001
ANT-C8kb vs. BX-C10kb	<0.001	-	<0.001	<0.001
ANT-C9kb vs. BX-C9kb	<0.001	<0.001	-	<0.001
ANT-C9kb vs. BX-C10kb	<0.001	<0.001	<0.001	-

## 8.5 Vergleich der Berechnungen der *Hox gene kissing* Häufigkeiten mit und ohne z-Ebene



**Abb. S1** Ohne Berücksichtigung der Z-Ebene steigt die *Hox gene kissing* Häufigkeit signifikant an

Der Vergleich der *Hox gene kissing* Häufigkeit mit und ohne Einbezug der z-Ebene zeigt einen signifikanten Unterschied (1,9 % vs. 8,5 %). Die ohne z-Ebene ermittelte Anzahl an *Hox gene kissing* stimmt mit den veröffentlichten Daten überein (Bantignies et al., 2011).

## 8.6 Distanzmessungen

Die folgenden Tabellen werden als Excel-Dateien in Form einer CD der Arbeit beigelegt:

**Tabelle 3** Flügelimaginalscheibe: Distanzen zwischen langen ANT-C Sonden und kurzen BX-C Sonden

**Tabelle 4** Flügelimaginalscheibe: Distanzen zwischen langen BX-C Sonden und kurzen ANT-C Sonden

**Tabelle 5** Flügelimaginalscheibe: Distanzen zwischen den kurzen Sonden

**Tabelle 6** Flügelimaginalscheibe: Distanzen zwischen Kontrollsonden

**Tabelle 7 Flügelimaginalscheibe und Augenimaginalscheibe: Distanzen zwischen ANT-C9kb und BX-C10kb**

**Tabelle 8 Augenimaginalscheibe: Distanzen zwischen Kontrollsonden**

**Tabelle 9 Flügelimaginalscheiben: Distanzen zwischen dCTCF *speckles* und Sonden**

**Tabelle 10 Smt3 Knockdown: Korrigierte Flag-SUMO Signalintensität und Ermittlung der Anzahl an CP190 *speckles* pro Zellkern**

**Tabelle 11 Aos1/ Uba2 Doppelknockdown: Korrigierte Flag-SUMO Signalintensität und Ermittlung der Anzahl an CP190 *speckles* pro Zellkern**

**Tabelle 12 CP190/ dCTCF und CP190/ Polycomb Ko-Lokalisationsanalysen unter Verwendung des Manders' Coefficients**

dCTCF Signal überlappt CP190 Signal <b>M1</b>	CP190 Signal überlappt dCTCF Signal <b>M2</b>	dCTCF Signal überlappt CP190 Signal <b>M1</b>	CP190 Signal überlappt dCTCF Signal <b>M2</b>	dCTCF Signal überlappt CP190 Signal <b>M1</b>	CP190 Signal überlappt dCTCF Signal <b>M2</b>
0.727	0.402	0.515	0.431	0.373	0.525
0.468	0.412	0.449	0.487	0.462	0.489
0.427	0.341	0.577	0.524	0.54	0.499
0.277	0.415	0.438	0.349	0.469	0.361
0.426	0.47	0.396	0.32	0.37	0.323
0.401	0.431	0.557	0.492	0.486	0.413
0.495	0.639	0.57	0.533	0.691	0.55
0.604	0.572	0.584	0.581	0.353	0.509
0.484	0.576	0.56	0.505	0.591	0.593
0.367	0.437	0.6	0.429	0.44	0.458
0.51	0.361	0.43	0.491	0.478	0.498
0.46	0.461	0.504	0.574	0.571	0.242
0.396	0.392	0.391	0.388	0.547	0.447
0.49	0.362	0.411	0.612	0.506	0.356
0.411	0.506	0.51	0.519	0.612	0.529
0.379	0.44	0.493	0.456	0.677	0.705
0.394	0.439	0.422	0.55	0.442	0.303
0.705	0.476	0.406	0.516	0.562	0.554
0.577	0.494	0.432	0.377		
0.475	0.354	0.561	0.371		

Polycomb Signal überlappt CP190 Signal <b>M1</b>	CP190 Signal überlappt Polycomb Signal <b>M2</b>	Polycomb Signal überlappt CP190 Signal <b>M1</b>	CP190 Signal überlappt Polycomb Signal <b>M2</b>	Polycomb Signal überlappt CP190 Signal <b>M1</b>	CP190 Signal überlappt Polycomb Signal <b>M2</b>
0.331	0.223	0.106	0.261	0.108	0.062
0.169	0.048	0.256	0.119	0.219	0.058
0.33	0.053	0.078	0.229	0.164	0.072
0.43	0.292	0.262	0.051	0.244	0.129
0.529	0.237	0.266	0.134	0.237	0.051
0.352	0.237	0.337	0.214	0.443	0.147
0.487	0.118	0.248	0.063	0.4	0.085
0.461	0.176	0.145	0.073	0.278	0.101
0.159	0.099	0.169	0.02	0.146	0.012
0.158	0.159	0.089	0.112	0.231	0.044
0.329	0.127	0.601	0.058	0.388	0.174
0.168	0.137	0.247	0.181	0.152	0.039
0.061	0.25	0.169	0.02	0.285	0.088
0.304	0.254	0.089	0.112	0.393	0.09
0.401	0.168	0.029	0.221	0.302	0.107
0.064	0.123	0.386	0.131	0.383	0.086
0.344	0.154	0.302	0.064		

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Datum und Ort

Unterschrift