

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
Lehrstuhl Molekularbiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. P. Becker

Angefertigt unter der Anleitung von
Prof. Dr. med. H.-G. Klobeck

**Untersuchung zur Funktion von DNase I hypersensitiven Bereichen an der
3`Grenze der I γ λ -Domäne im Sinne eines „Insulator/Boundary“ Elementes**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sebastian Nagel

Neuwied

München 2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Klobeck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg W. Bornkamm
Priv. Doz. Dr. Michael Albert

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2010

Für meinen Großvater

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Funktionelle Immunglobulingene entstehen durch V(D)J Rekombination....	7
1.2 Die Steuerung der Zugänglichkeit der Ig-Genloci ist Voraussetzung einer geordneten B-Zell-Entwicklung	11
1.3 Die Kontrolle der Zugänglichkeit eines Locus erfolgt über Modulation der Chromatinstruktur	13
1.4 Regulatorische Regionen im Igl λ -Locus zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber DNase-I	18
1.5 Chromatindomänen werden durch Insulator/Boundary – Elemente funktionell voneinander getrennt.....	22
1.6 Der multivalente CCCTC-Transkriptionsfaktor (CTCF).....	23
1.7 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	25
2. MATERIAL UND METHODEN.....	26
2.1 Reagenzien.....	26
2.1.1 Chemikalien.....	26
2.1.1.1 Feinchemikalien	26
2.1.1.2 Radiochemikalien.....	26
2.1.1.3 Biochemikalien	26
2.1.3 Enzyme und Proteaseinhibitoren.....	26
2.2 Geräte und sonstige Materialien	27
2.2.1 Kits	27
2.2.2 Längenstandards und Kompetitoren	27
2.2.3 Antikörper	28
2.2.4 DNA.....	28
2.2.5 Zelllinien und Zellkultur	28
2.2.6 Mikrobiologie	29
2.2.7 Computerprogramme.....	29
2.3 Methoden.....	30
2.3.1 Molekularbiologische Standardmethoden	30
2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	30

2.3.3	Gelelektrophorese	32
2.3.4	Fragmentisolierung aus Agarosegelen	33
2.3.5	Radioaktive Markierung der PCR Fragmente mit γ [³² P]-ATP	33
2.3.6	Zellkultur	34
2.3.7	Herstellung von Zellkernextrakten	34
2.3.8	Immundetektion / Westernblot	35
2.3.9	Expression von GST-CTCF Fusionsproteinen	38
2.3.9.1	Herstellung des Plasmid pGEX-4T1-CTCF hum	38
2.3.9.2	Retransformation der Plasmide in BL21	38
2.3.9.3	Expression des GST-CTCF-Fusionsproteins in BL21	39
2.3.9.4	Zellaufschluss durch Beschallung	40
2.3.9.5	Aufreinigung des GST-CTCF-Fusionsproteins	40
2.3.9.6	Nachweis des GST-CTCF-Fusionsproteins mittels Westernblot	41
2.4	“Electrophoretic mobility shift assays” (EMSA)	42
2.4.1	EMSA ohne Modifikation	42
2.4.1.1	Präparation des Gels	42
2.4.1.2	Vorbereiten der Bindungsreaktion	43
2.4.1.3	Elektrophoretische Auftrennung	44
2.4.1.4	Analyse des Gels	44
2.4.2	EMSA – Einsatz von Antikörpern: „Supershift Assay“	44
3.	ERGEBNISSE	45
3.1	Darstellung bekannter regulatorischer Funktionen von HSS-4, -5 und -6	46
3.2	“Electrophoretic mobility shift assays” – in vitro Nachweis von Protein-DNA Interaktionen	47
3.2.1	Auswahl geeigneter PCR Bereiche	52
3.2.1.1	Darstellung der PCR-Bedingungen	56
3.2.1.2	PCR der HSS-4, -5 und -6	57
3.2.1.3	Aufreinigung des PCR-Produktes	58
3.2.1.4	Radioaktive Endmarkierung der PCR-Produkte	59
3.2.2	Proteinquelle für die EMSA	59
3.2.2.1	Präparation von Zellkernextrakten	60
3.2.2.2	Nachweis von CTCF mit Hilfe von α -CTCF Antikörpern in verschiedenen Zellkernextrakten	61
3.2.3	Kontrollen bei der Durchführung der EMSA	62
3.2.3.1	CTCF-Bindungsstellen im Bereich des c-myc Promotorbereichs	63
3.2.3.2	Amplifikation von Myc A- und Myc B-Fragmenten mit Hilfe der PCR	64

3.3	Versuche zur Optimierung der EMSA-Bedingungen	65
3.3.1	Titration des Kompetitors Poly (dI-dC) als Versuch einer Reduktion der DNA-Protein Interaktionen	67
3.3.2	Versuch CTCF als GST-CTCF-Fusionsprotein rekombinant herzustellen.....	68
3.3.3	Etablierung von zwei spezifischen Kompetitoren: SP-1 und AP-2.....	70
3.3.4	Veränderter Bindungspuffer mit ZnSO ₄	72
3.3.5	Die Kompetitoren AP-2 und SP-1 reduzieren unerwünschte Protein-DNA-Interaktionen	72
3.3.6	Computerunterstützte Suche nach einer CTCF-Konsensussequenz im Bereich der HSS -4 bis -6	73
3.3.7	Fokussierung auf einen 72 bp großen Teilbereich der HSS-6.....	75
3.4	Supershift Assays – Die Verwendung spezifischer Antikörper führt zu einer reduzierten Wanderungsgeschwindigkeit im EMSA	78
3.4.1	Die Titration der Konzentration von Antikörper und Zellkernextrakt führt zur Ausbildung eines Präzipitats.....	79
3.4.2	Supershift Assay: Myc A- und HSS-6/18er-Fragment.....	81
3.4.3	Supershift Assay: Nachweis der CTCF-Bindung im Bereich eines 72 bp großen Teilbereiches der HSS-6	83
3.5	Bindungssequenzhomologien liefern Hinweise auf eine weitere CTCF-Bindungsstelle im Bereich der HSS-5	85
4.	DISKUSSION	86
4. 1	Darstellung methodischer Ansätze zur Validierung von CTS	86
4.1.1	Kritische Auseinandersetzung mit alternativen methodischen Ansätzen zur Validierung von CTCF-Bindungsstellen.....	89
4. 2	CTCF – Darstellung der heterogenen Funktionsweise	90
4. 3	Flussabwärts von HSS-4, -5 und -6 identifizierte Gene	93
4. 4	Bekannte Funktionen von HSS -4 bis -6.....	96
4. 5	Die Funktion eines Insulator-Elementes im Kontext von HSS-4, -5 und -6... 97	97
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
	LITERATURVERZEICHNIS	104
	DANKSAGUNG	117

1. EINLEITUNG

1.1 Funktionelle Immunglobulingene entstehen durch V(D)J Rekombination

Der Mensch ist gegenüber seiner Umwelt ständig physikalischen und biologischen Einflüssen ausgesetzt. Infektionserreger wie Bakterien und Viren, aber auch Parasiten und Pilze, gefährden Gesundheit und Leben des Menschen. Das Immunsystem des Menschen ermöglicht ein Überleben in dieser bedrohlichen mikrobiellen Umgebung (Übersicht: (Janeway and Travers, 1997)). Dabei lässt sich zwischen einem angeborenen, unspezifischen Abwehrsystem und einem adaptiven, spezifischen Teil des Immunsystems unterscheiden. Im spezifischen Abwehrsystem erfolgt eine weitere Unterteilung in einen zellulären und ein humoralen Abwehrmechanismus.

Träger der zellulären Immunität sind vor allem T-Lymphozyten. Ihre Bildung erfolgt ebenso wie die der B-Lymphozyten aus einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Träger der humoralen Immunität sind B-Lymphozyten. Ebenso wie T-Lymphozyten sind auch diese Zellen in der Lage eine hochvariable Anzahl verschiedener Antigene zu erkennen. Während der T-Zellrezeptor nur in einer membranständigen Form existiert, lassen sich beim B-Zellrezeptor sowohl eine sezernierte Form, als auch eine membranständige Form unterscheiden. In der membranständigen Form liegt er assoziiert mit zwei weiteren Proteinen, $Ig\alpha$ (CD 79a) und $Ig\beta$ (CD79b) vor, die auch im Prä-B-Zellrezeptor Aufbau verwendet werden. Im Gegensatz zum T-Zellrezeptor befähigt der B-Zellrezeptor auch zum Erkennen von in Serum oder Plasma gelösten Antigenen. Spezifisches Produkt der B-Lymphozyten sind sezernierte Antikörper. Der Aufbau eines Antikörpers erfolgt durch die Kombination von je zwei identischen schweren und leichten Ketten (siehe Abb. 1). Von den leichten Ketten existieren zwei Subtypen, die als Kappa - (κ) und Lambda - (λ) Ketten bezeichnet werden. Beim Menschen finden im Antikörperaufbau Leichtketten vom κ - Typ etwa doppelt so häufig Verwendung wie vom λ -Typ. Funktionelle Unterschiede zwischen Antikörpern des einen oder des anderen Subtyps ließen sich bisher nicht feststellen. Hat sich eine B-Zelle erst einmal auf einen leichten Ketten-Typ festgelegt, wird auch nur noch diese leichte Kette bei der Produktion ihres Antikörpers verwendet.

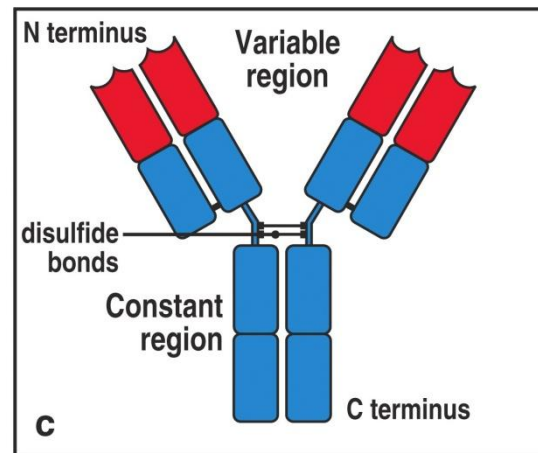


Figure 3-1 part 3 of 3 Immunobiology, 6/e, © Garland Science 2005

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers

Zu erkennen ist der schematische Aufbau eines Antikörpers aus leichten (L-Ketten) und schweren (H-Ketten) Ketten und die funktionelle Unterteilung in variable (rote) und konstante (blaue) Anteile.

Die Entdeckung des grundsätzlichen Aufbaus der Immunglobuline konnte jedoch nicht erklären, wie das menschliche Immunsystem in der Lage ist, mehr als 10^{11} verschiedene Antigene spezifisch zu erkennen. Eine Beantwortung dieser Frage wurde erst durch die Entdeckung des modularen Aufbaus der Immunglobulingene möglich (Tonegawa et al., 1978; Hozumi and Tonegawa, 1976).

Die Immunglobulingene liegen im Genom als Gensegmente vor (Abb. 2), die erst während der Entwicklung der B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen in einem spezifischen DNA-Rekombinationsprozess miteinander verknüpft werden. Erst dadurch kommt es zur Bildung einer funktionellen Transkriptionseinheit für eine leichte oder schwere Kette. Dabei wird aus einer Anzahl von V(variable)-Gensegmenten der leichten Ketten eines ausgewählt und mit einem von mehreren J(joining)-Elementen verknüpft. Dabei kann jedes V-Segment mit jedem J-Segment verknüpft werden (kombinatorische Diversität). Bei schweren Ketten wird die Diversität durch Beteiligung von zusätzlich vorhandenen D(diversity)-Segmenten weiter erhöht (Early et al., 1980) (siehe Abb. 2). Die Immunglobulinloci der beiden leichten Ketten-Typen (Ig κ und Ig λ) unterscheiden sich in ihrem Aufbau. Während im Ig κ -Locus auf 32 funktionelle V κ - und 5 J κ -Elemente nur ein weiteres C κ -Element folgt (Kawasaki et al., 2001), folgen im λ -Locus auf 29-30 funktionelle V λ -Elemente die J λ - und C λ -Elemente in Form amplifizierter JC-Einheiten (Kawasaki et al., 1997) (siehe Abb. 2).

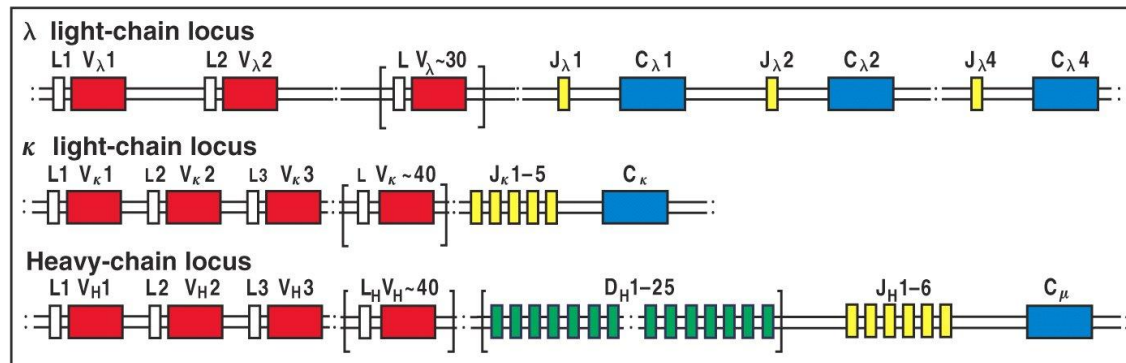


Figure 4-4 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abb. 2: Darstellung des modularen Aufbaus der Immunglobulingene

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass Igλ-, Igκ- und H-Ketten-Locus aus verschiedenen Gensegmenten bestehen. Diese Gensegmente werden erst während der B-Zellentwicklung zu einer funktionellen Transkriptionseinheit verknüpft. Dabei ist zu beachten, dass der H-Ketten-Locus zusätzlich über D(diversity)-Segmente verfügt und im Gegensatz zum Igκ-Locus beim Igλ-Locus die J_λ- und C_λ-Elemente in Form amplifizierter JC-Einheiten vorliegen.

Diese somatische Rekombination folgt bestimmten Regeln:

Es werden nur Gensegmente, die sich auf demselben Chromosom befinden, rekombiniert. Die Umlagerung der Gensegmente beginnt stets mit der variablen Domäne des IgH-Locus (Fugmann et al., 2000). Zu Beginn jeder Umlagerung werden dort die Gensegmente der D_H-Gruppe mit J_H-Elementen kombiniert (D-J Rekombination) um anschließend mit einem V_H-Element (V-(D)J) zusammengelagert zu werden (Jung et al., 2006). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über das V, (D), J-Repertoire des Menschen.

Wenn eine funktionelle schwere Kette fertiggestellt wurde, kommt es zur Bildung einer leichten Kette. Ist es dabei in einem ersten Versuch nicht möglich eine funktionelle Kette vom κ-Typ zu bilden, kommt es zur Aktivierung der Gene vom λ-Typ.

	H	κ	λ
V-Segmente	38-44	32	29-30
D-Segmente	27	-	-
J-Segmente	6	5	4
V x (D) x J	6156-7128	160	116-120
H x L $_{\kappa}$	9,8 – 11,4 x 10 ⁵		
H x L $_{\lambda}$	7,1 – 8,6 x 10 ⁵		
Σ H x L	1,7 – 2 x 10 ⁶		

Tab. 1: Unterschiedliche Anzahl der Gensegmente in den verschiedenen Ig- Loci des Menschen

Der Tabelle ist die Anzahl der verschiedenen Gensegmente zu entnehmen, die am Aufbau des jeweiligen Locus beteiligt sind. Daraus lässt sich eine Anzahl verschiedener Antikörper berechnen, die allein durch die Kombinationen der verschiedenen Gensegmente denkbar ist: $\Sigma H \times L = 1,7 - 2 \times 10^6$. Die Daten der Tabelle sind der Immunogenetics Database (<http://www.imgt.org/textes/IMGTrepertoire/>) entnommen.

Die Umlagerung sowohl der Immunglobulin-Loci in B-Zellen, als auch des Rezeptors der T-Zellen und dessen Gene auf Chromosom 7 und 14, erfolgt durch einen Multiproteinkomplex, dessen Hauptbestandteile RAG-1 und RAG-2 (*Recombination activating genes*) nur in diesen beiden Zelltypen exprimiert werden. Dieser Komplex ist in der Lage sequenzspezifisch an die DNA zu binden und Rekombinationssignalsequenzen (RSS) zu erkennen, welche die zu rekombinierenden Gensegmente flankieren (Gellert, 2002). Jede dieser RSS besteht dabei aus einer hochkonservierten 7 bp langen sog. Heptamer- und einer an Adenin reichen 9 bp langen Nonamer-Sequenz. Beide werden durch eine „Spacer“ Region getrennt, die entweder 12 bp (12-RSS) oder 23 bp (23-RSS) umfasst und somit zwei unterschiedliche RSS definiert. Rekombinationen sind nur zwischen Gensegmenten möglich, von denen eine über eine 12-RSS und die andere über eine 23-RSS verfügt. Man bezeichnet dies als 12/23 Regel (Sleckman et al., 1996; Fugmann et al., 2000; van Gent et al., 1996).

Dabei charakterisieren die schrittweise Umlagerung der Immunglobulingene und ihre Expression die verschiedene Stadien der B-Lymphozyten Entwicklung (Meffre et al., 2000).

1.2 Die Steuerung der Zugänglichkeit der Ig-Genloci ist Voraussetzung einer geordneten B-Zell-Entwicklung

Die Stadien der B-Lymphozyten Entwicklung müssen streng kontrolliert erfolgen. Regulatorische Faktoren lassen diese Schritte geordnet stattfinden (Busslinger et al., 2000; Busslinger, 2004) (siehe Abb. 3).

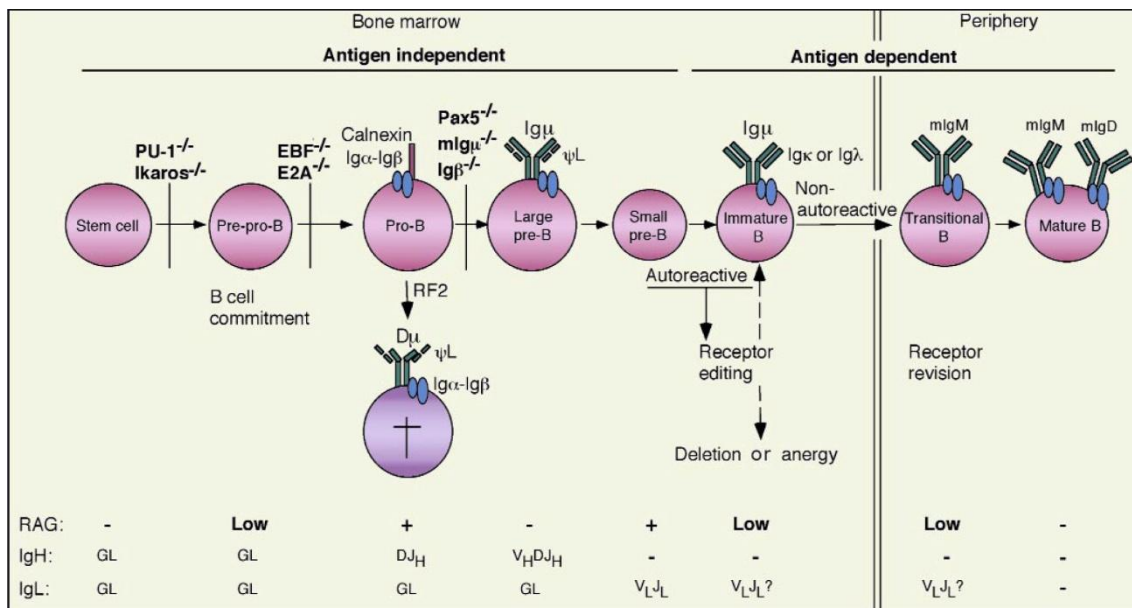


Abb. 3: Die Stadien der B-Zellentwicklung (übernommen aus Meffre et. al., 2000)

Bei der Entwicklung der B-Lymphozyten handelt es sich um einen streng regulierten Prozess. Die unterschiedlichen Stadien der B-Lymphozyten Entwicklung sind dabei durch die in der Abbildung zu erkennenden Oberflächenrezeptoren charakterisiert. Der Beginn der Entwicklung findet dabei im Knochenmark statt. Die letztendliche Reifung erfolgt in der Peripherie. Die Expression der RAG erfolgt wie dem Fuß der Abbildung durch „+“ und „-“ zu entnehmen stadienabhängig.

Alle Blutzellen stammen von gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Die Zelllinien trennen sich früh unter dem Einfluss hormonähnlicher Wachstumsfaktoren in lymphatische und myeloische Stammzellen (Übersicht: Janeway und Travers, Immunologie 1997). Am Anfang der B-Lymphozyten-Entwicklung stehen Pro-(Progenitor)-B-Zellen. Die Umlagerung der Immunglobulingene beginnt mit der Bildung einer H-Kette. Eine erfolgreich abgeschlossene D_H-J_H Verknüpfung charakterisiert das *frühe* Pro-B Stadium. Nach erfolgreicher V(D)J_H Verknüpfung bezeichnet man diese Zellen als *späte* Pro-B-Zelle. Dieser Zelltyp exprimiert jedoch

noch keinen Oberflächen-Immunglobulinrezeptor. Im folgenden Stadium der Prä-B-Zelle erfolgt die Expression eines Prä-B-Zellrezeptors in Form einer μ -H-Kette und einer Ersatz-Leichtkette, bestehend aus VpreB und $\lambda 5$. Assoziiert an diesen Rezeptor liegen die für die Signaltransduktion notwendigen Dimere aus $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Bindet dieser Prä-B-Zellrezeptor seinen entsprechenden Liganden, ermöglicht dies der *großen* Prä-B-Zelle in den Zellzyklus einzutreten und klonal zu expandieren. Folge ist die Bildung *kleiner* Prä-B-Zellen. Somit garantiert ein funktionierender Prä-B-Zellrezeptor ein erfolgreich abgeschlossenes Rearrangement der Gensegmente der schweren Kette. Der Prä-B-Zellrezeptor wird in diesem Stadium der Entwicklung internalisiert, die μ -Ketten finden sich intrazellulär im Zytoplasma und die kleine Prä-B-Zelle beginnt mit der Umlagerung der Gensegmente der leichten Kette. Kann keine funktionelle Leichtkette vom κ -Typ gebildet werden, kommt es zur Aktivierung der $Ig\lambda$ -Gene. Ist dieser Prozess abgeschlossen und exprimiert die B-Zelle ein intaktes IgM -Molekül auf ihrer Zelloberfläche, wurde das Stadium der *unreifen* B-Zelle erreicht. Dabei verliefen alle bisherigen Schritte ohne Antigenkontakt geschützt im Kompartiment des Knochenmarks. Bevor die unreifen B-Zellen in die Peripherie entlassen werden können, erfolgt durch Präsentation von Autoantigenen durch die umgebenden Stromazellen ein Test auf Selbsttoleranz. Ist dieser Test erfolgreich, verlassen *naive* oder *reife* B-Zellen das Knochenmark. Durch alternatives Spleißen, bei dem die schwere μ - gegen eine δ -Kette getauscht werden kann, präsentieren sie nun auf der Suche nach Fremd-Antigenen sowohl IgM als auch IgD auf ihrer Oberfläche. Bei der V(D)J-Rekombination der Antigen-Rezeptor-Gene handelt es sich um einen streng regulierten Prozess. Die für die Umlagerung der Gensegmente sowohl des T-Zellrezeptors als auch der Immunglobulingene notwendigen RAG-1 und RAG-2 werden in der lymphozytären Entwicklung bereits sehr früh exprimiert. Die RAG-Genexpression kommt in der späten Pro-B Zelle zum Erliegen und wird erst wieder zu dem Zeitpunkt gestartet, an dem die leichten Ketten-Gene umgelagert werden (im kleinen Prä-B-Zellstadium). Dabei werden die T-Zellrezeptor-Gene nur in T-Zellen und der Immunglobulin-Locus nur in B-Zellen umgelagert. Eine Kontrolle dieses Mechanismus erfolgt sehr wahrscheinlich über die beschränkte Zugänglichkeit für die beteiligten Multiproteinkomplexe an die DNA. Die „*accessibility*“ entscheidet demnach darüber, in welchen Zelllinien welche Gene umgelagert werden können. Unterstützt wird diese Vermutung durch Versuche, bei denen

in nicht-lymphatische-Zelllinien RAG-1 und RAG-2 transfiziert wurden. Dabei kam es dort nicht zum Rearrangement von Antigen Rezeptoren-Genen (Schatz et al., 1992; Schlissel and Stanhope-Baker, 1997). Anscheinend sind in diesen Zelllinien die entsprechenden Signalsequenzen (*recombination signal sequences* = RSS) für den Umlagerungskomplex unzugänglich (Sleckman et al., 1996).

Diese entsprechend *Accessibility*-Model genannte Überlegung postuliert, dass während der lymphozytären Entwicklung bestimmte Faktoren und Signale zu einer Öffnung der Chromatinstruktur des Immunglobulin-Locus führen (Nightingale et al., 2007; Baumann et al., 2003; McMurry and Krangel, 2000). Dies wiederum ermöglicht den Rekombinasen den Zugang zu den RSS (Roth and Roth, 2000; Golding et al., 1999).

Je nach Transkriptionsaktivität existieren unterschiedliche Verpackungstrukturen der DNA, die beteiligten Enzymen den Zugang zu der DNA ermöglichen oder verhindern.

1.3 Die Kontrolle der Zugänglichkeit eines Locus erfolgt über Modulation der Chromatinstruktur

Das menschliche Genom umfaßt circa drei Milliarden Basenpaare. Es codiert für geschätzte 40.000 Gene und befindet sich in Form der von Watson und Crick 1953 beschriebenen DNA-Doppelhelix im Zellkern. Dabei verteilt sich die genetische Information im menschlichen Zellkern auf 23 Chromosomenpaare. Ausgebreitet würde der DNA-Strang einer jeden Zelle in seiner Gesamtlänge die Länge von circa 1 Meter in Anspruch nehmen. Da aufgrund des Zellkerndurchmessers nur ca. 10^{-5} m an Platz zur Verfügung stehen, sind komplexe Verpackungsmechanismen notwendig, die zu einer ungefähr 20.000-fachen Verringerung des Platzbedarfes des DNA-Stranges führen (Langst and Becker, 2004; Becker and Horz, 2002; Babu et al., 2008) (siehe Abb. 4).

Bei der Basisverpackungseinheit der menschlichen DNA handelt es sich um die Nukleosomen (siehe Abb. 5). Die DNA-Doppelhelix windet sich in einem linksgängigen spiraligen Strang auf einer Länge von 147 bp in 1,65 Windungen um einen Kern aus 8 Histonproteinen. Diese Proteine bestehen aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen: einer globulären Domäne („Histonfold“), welche für die Organisation des Histonoktamers und der DNA-Bindung verantwortlich ist und einem N- und C-terminalem Schwanz, an dem zahlreiche posttranslationale Modifikationen stattfinden können (siehe Abb. 5). Diese können den chromosomalen

Verpackungszustand der DNA beeinflussen. In dem Histonoktamer bilden die Histonproteine H3 und H4 ein zentrales Tetramer der Struktur $(H3/H4)_2$. Zwei Dimere aus H2A/H2B assoziieren peripher. Die Einheit aus DNA und Histonoktamer bezeichnet man als Nukleosom. Sie stellt die grundlegende Verpackungseinheit der DNA dar. Ungefähr 80% des menschlichen Genoms sind nukleosomal verpackt.

DNA einschließlich der ihr assoziierten Histon- und Nichthiston-Proteine bezeichnet man als Chromatin. Ein weiteres Histon, das Histon H1, verschließt das Nukleosom an der Stelle, an dem die *linker* DNA zwischen den nukleosomalen Einheiten ein- und austritt. Die DNA bildet in dieser Verpackungsebene einen Strang von 10 nm Durchmesser, auf dem die Nukleosomen wie Perlen auf einer Schnur aufgereiht sind (siehe Abb. 4). Abhängig von den sie umgebenden ionischen Bedingungen erreichen diese 10 nm-Fasern wahrscheinlich spontan die nächst höhere Verpackungsebene: eine superspiralisierte Form, die sogenannte 30 nm-Faser.

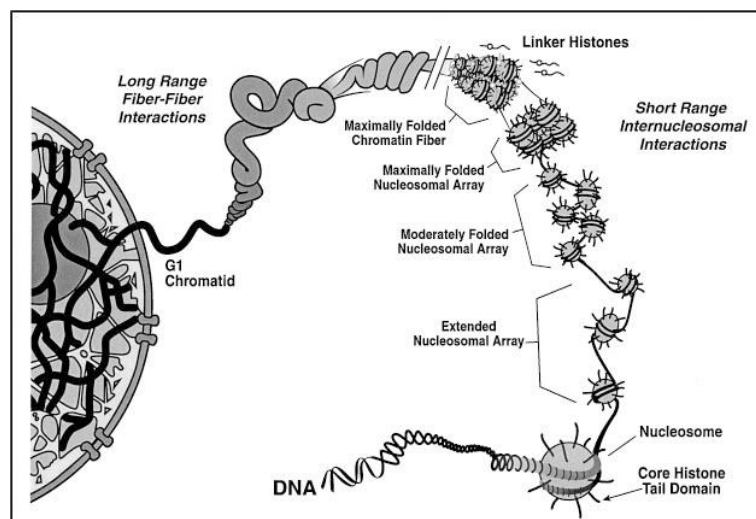


Abb. 4: Verpackungseinheiten der DNA (übernommen aus (Hansen, 2002))

Zu erkennen ist die hierarchische Abfolge unterschiedlicher DNA-Verpackungsebenen, die ihren Ursprung in der nukleosomalen Basisverpackungseinheit nehmen.

Über die weiteren Verpackungsstrukturen ist weniger bekannt. Man geht entsprechend einem Schleifen-Modell davon aus, dass die 30 nm-Fasern Chromatinschleifen bilden und diese im Metaphase Chromosom ihre ausgeprägteste kondensierte Struktur erreicht um dann lichtmikroskopisch als Chromosom sichtbar zu werden.

Neben der Weitergabe genetischer Information eines Individuums an seine Nachkommen, einem Prozess der Replikation und Rekombination von DNA beinhaltet, bestehen weitere Aufgaben in der Transkription von Information und nachfolgender Translation in Proteine zu kontrollierten Zeitpunkten. Dabei erfolgt die Expressionskontrolle von eukaryontischen Gene auf drei Hauptebenen (Babu et al., 2008; van Driel et al., 2003).

Auf der ersten Ebene erfolgt die Expressionskontrolle durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF's) an sogenannte TF-Bindungsstellen und damit abhängig von der DNA-Sequenz. Dies macht zugleich deutlich, dass es sich bei den Verpackungszuständen der DNA um einen dynamischen Zustand handeln muss. Für *trans*-aktive Faktoren wäre es ansonsten unmöglich, einen Zugang zu den entsprechenden regulatorischen *cis*-aktiven Elementen wie Promotoren, Enhancern und Silencern zu finden. Unterstützt werden diese Überlegungen durch die Beobachtung, dass die Chromatinstruktur im Umfeld aktiv transkribierter Gene stets aufgelockert ist und dieser Zustand anscheinend erst eine Realisierung genetischer Informationen im Sinne der Genexpression ermöglicht. Somit handelt es sich bei der dynamischen Entfaltung höher kondensierten Chromatins um eine weitere Ebene, auf der die Expression von eukaryontischen Genen gesteuert werden kann (Babu et al., 2008). Auf der letzten Ebene scheint zudem die Lokalisation der DNA im Zellkern selbst die Expression wesentlich zu beeinflussen. Dabei scheint es eine Rolle zu spielen ob sich das Chromosom im Bereich der Zellkernperipherie oder zentral in Kompartimenten des Nukleus befindet (Fraser and Bickmore, 2007). Anscheinend ist es möglich, die dichte DNA-Verpackung lokal aufzulockern, um Transkriptionsfaktoren einen Zugang zu der DNA zu ermöglichen (Eberharter et al., 2005). Eine solche Veränderung der DNA-Verpackungsebene nimmt ihren Ausgang an regulatorischen Schlüsselstellen. Das bereits angesprochene *Accessibility*-Modell bedient sich folgender Überlegungen: zelltyp- und stadienspezifisch lokal veränderte Chromatinstrukturen ermöglichen bestimmten Faktoren einen unmittelbaren Zugang zur nukleosomalen DNA bzw. den Histonschwänzen. Dies wiederum führt hier nach einer ersten Bindung entsprechend einem Schlüssel-Schloss-Prinzip zu einer Rekrutierung weiterer Faktoren und schließlich zu einer lokalen Öffnung der Chromatinstruktur (Eberharter et al., 2005).

Jedes der Histone des nukleosomalen Kernpartikels bildet an seinem Aminoende einen Schwanz, der aus dem Nukleosom herausragt und zahlreiche Arginin- und Lysinreste enthält (siehe Abb. 5). Die positiven Ladungen der basischen Aminogruppen dieser beiden Aminosäuren ermöglichen zum einen ausgeprägte Wechselwirkungen mit der negativen DNA, stellen zum anderen aber auch einen wirksamen und hochkomplexen Ausgangspunkt für Regulationsmechanismen zur Beeinflussung eben solcher Wechselwirkungen dar (Bartova et al., 2008). Möglichkeiten der Modifikation stellen die kovalenten Übertragungen von Acetyl-, Phosphat- und Methylgruppen, die Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung dar (siehe Abb. 5). Die Acetylierung durch sog. Histonacetyltransferasen führt dazu, dass aus positiv geladenen Amino- neutral geladene Amid Gruppen werden und damit die Stärke der Bindung zwischen Histonprotein und der sie umschlingenden DNA abnimmt. Die Acetylierung der aminoterminalen Domänen von Histon H3 und H4 stellt einen Marker für transkriptionelle Aktivität dar (Pogo et al., 1966). Inaktive Chromatinbereiche dagegen sind häufig in bestimmten Bereichen von Histon H3 trimethyliert (Allfrey et al., 1964).

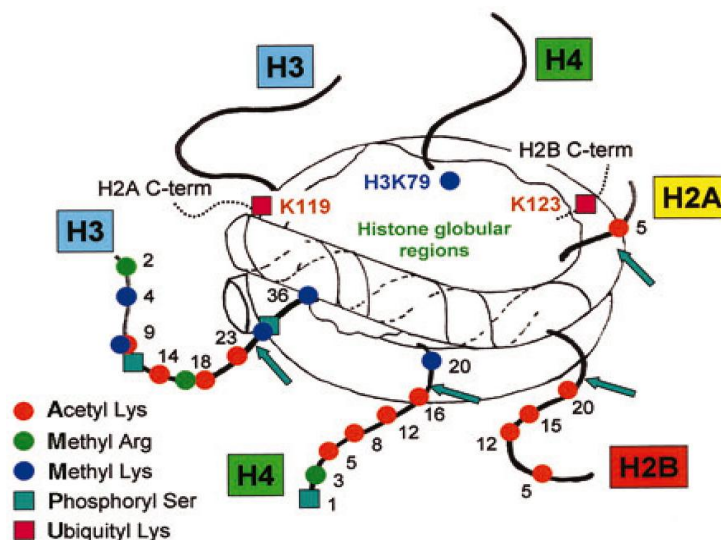


Abb. 5: Das Nukleosom und Möglichkeiten der Modifikation von Histonschwänzen

Gezeigt ist ein Nukleosomenkern mit darum herum gewundener DNA. Die N-Termini der Histone H3, H4, H2A und H2B ragen aus der kompakten Kernstruktur heraus und können an den angegebenen Positionen verschiedenartig modifiziert werden. Die Abbildung wurde von Turner B. M. übernommen (Turner, 2005).

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der DNA-Histon-Wechselwirkungen stellen *nucleosome-remodeling* Faktoren dar (Becker and Horz, 2002). In einem energieabhängigen Prozess verändern diese molekularen Maschinen unter Hydrolyse von ATP die Position der Nucleosomen auf der DNA, was wiederum dazu führt, dass der kondensierte Verpackungszustand des Chromatins lokal aufgelockert wird. In ihrem Aufbau handelt es sich um Multiproteinkomplexe, deren Funktion, Regulation und Aufbau Gegenstand aktueller Forschung sind (Eberharter and Becker, 2004; Hogan and Varga-Weisz, 2007). Gemeinsame Untereinheit dieser Remodeler scheint aber eine ATPase der Swi2/Snf2 Familie zu sein. Weiterhin spielen ISWI/SNF2L ATPasen, Mi-2 als Mitglied der CHD1 Familie, der INO80 Komplex und der Cockayne Syndrom B Faktor entscheidende Rollen bei der Verschiebung nucleosomaler Positionen auf dem DNA Strang.

Solche regulatorische Schlüsselstellen, an denen eine Chromatinöffnung initialisiert werden kann, lassen sich mit Hilfe einer molekularbiologischen Standardmethode entdecken: dem DNase I Verdau von Chromatin und der Kartierung DNase I hypersensitiver Bereiche, fortan als HSS bezeichnet (Nedospasov and Georgiev, 1980; Wu, 1980). Mit dieser Methode ist es möglich, regulatorische Elemente, die sich aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften als „nucleosomfreie“ Regionen darstellen, anhand ihrer erhöhten Zugänglichkeit für eine Nuklease *in vivo* zu kartieren. Dazu werden zuvor mit Lysolecithin permeabilisierte Zellen einem zeitlich beschränkten Verdau mit einer DNase ausgesetzt, was dazu führt, dass die DNase I die DNA nur an den für sie spontan am besten zugänglichen Stellen schneidet (den DNase I hypersensitiven Bereichen). Die DNA-Fragmente lassen sich danach elektrophoretisch anhand ihrer Größe auftrennen und HSS anhand des resultierenden Bandenmusters nach Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde lokalisieren. Solche DNase I hypersensitiven Bereiche wurden bereits vor einiger Zeit im Bereich des I γ -Locus kartiert (Asenbauer and Klobeck, 1996).

1.4 Regulatorische Regionen im Igl-Locus zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber DNase-I

Die Immunglobulin-Loci des Menschen liegen auf drei verschiedenen Chromosomen. Die Gene für die schweren Ketten befinden sich auf Chromosom 14 (Matsuda et al., 1998), die für die leichten Ketten vom λ -Typ auf Chromosom 22 und für die leichten Ketten vom κ -Typ auf Chromosom 2. Die Arbeitsgruppe H.G. Klobeck beschäftigt sich seit Jahren mit dem Igl-Locus des Menschen und dessen regulatorischer Kontrolle. Dieser Locus befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 22. Seine genaue Lokalisation bezeichnet 22q11.2 und er umfaßt einen Bereich von ca. 911 kb (Kawasaki et al., 1997). Hier befinden sich insgesamt 29-30 V(variable)-Elemente und 7 JC-Elemente (siehe Abb. 2), von denen allerdings nur 4 JC-Elemente bei der Bildung von Immunglobulinleichtenketten Verwendung finden (Combriato and Klobeck, 1991).

Aufgrund der gleichen Orientierung der V-Elemente sowohl untereinander als auch zu den JC-Elementen kann man davon ausgehen, dass die Gensegmentumlagerung im Rahmen der B-Zellentwicklung durch Deletion erfolgt. Dementsprechend wäre nach regulatorischen DNA-Elementen im 3' Bereich der JC-Einheiten zu suchen.

So beschäftigte sich Frau Hildegard Asenbauer schon 1991 im Rahmen ihrer Dissertation am Adolf von Butenandt Institut mit der Kartierung von DNase I hypersensitiven sites im Bereich des Igl-Locus (Asenbauer and Klobeck, 1996).

Flussabwärts der J-C λ -Elemente finden sich insgesamt sieben DNase I HSS's (siehe Abb. 6). Innerhalb der J-C λ -Elemente selbst finden sich keine weiteren DNase I hypersensitiven Bereiche. Alle HSS Bereiche wurden in der Reihenfolge ihrer Lage von 5' nach 3' fortlaufend nummerisch als HSS 1 bis 6 (Asenbauer and Klobeck, 1996) benannt und konnten teilweise auch schon hinsichtlich ihrer Funktion näher charakterisiert werden (Asenbauer et al., 1999).

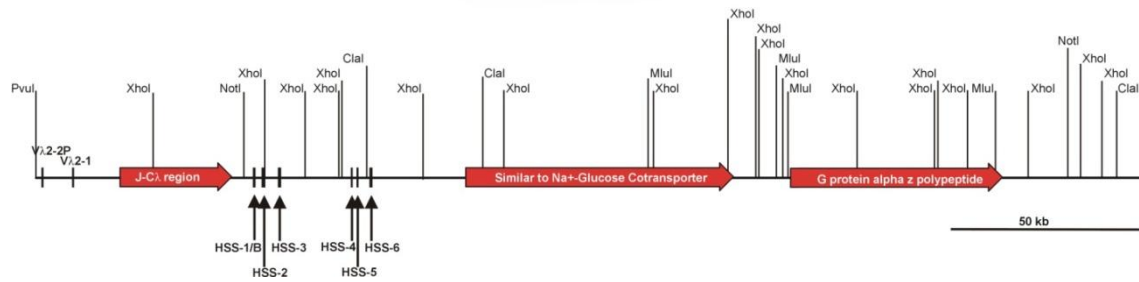


Abb. 6: Darstellung der Position von HSS-1 bis -6

Dargestellt ist die Region des $I\gamma\lambda$ -Locus im Bereich zwischen den J-C λ Einheiten und flussabwärts gelegenen Genen (jeweils rote horizontale Pfeile). Die Position der DNase I hypersensitiven sites (HSS) wurde mit vertikalen Pfeilen markiert. HSS-1/B, -2 und -3 sind B-Zellspezifisch und stellen den synergistischen Enhancer dar. Weiter flussabwärts befinden sich nicht B-Zellspezifische HSS-4 -5, und -6. Daran anschließend ein putatives Gen für einen Na⁺-Glucose Cotransporter und das Gen GNAZ. Ein weiteres in diesem Bereich befindendes Gen, RTDR1, wurde der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet.

Die Positionen von HSS-1 (in einer bestimmten Form spezifisch in B-Zellen), HSS-2 und HSS-3 (spezifisch in B-Zellen) befinden sich 5.8 kb, 9.2 kb und 12.9 kb flussabwärts von C λ 7. Ihre nähere Charakterisierung ergab, dass es sich um synergistisch wirkende Enhancer-Elemente handelt. HSS-3 stellt den eigentlichen $I\gamma\lambda$ -Enhancer dar, dessen Wirkung durch das Vorhandensein von HSS-1 und HSS-2 potenziert wird (Asenbauer et al., 1999). Flussabwärts der HSS-3 konnten in einem Abstand von ca. 18.7 kb drei weitere HSS identifiziert werden, die entsprechend ihrer Lage als HSS-4, -5 und -6 bezeichnet wurden. Diese lassen sich in sämtlichen bisher daraufhin untersuchten Zelllinien identifizieren und werden somit ubiquitär exprimiert (siehe Abb. 7). Sie befinden sich 32.1 kb, 33.3 kb und 36.7 kb flussabwärts von C λ 7 (Daten H.-G. Klobeck, persönliche Mitteilung). Bemerkenswert ist, dass sich die HSS-1/B, HSS-2/1, HSS-2/2 und HSS-3 nur in B-Zellen finden lassen.

Im Rahmen ihrer Promotionsarbeit am Adolf-Butenandt-Institut konnte H. Asenbauer HSS-4, -5 und -6 in verschiedenen B- und T-Zelllinien nachweisen. Der Arbeitsgruppe um H.-G. Klobeck gelang es schließlich auch die Existenz von HSS-4, -5 und -6 in einigen nicht lymphozytären Zelllinien, nachzuweisen (siehe Tab. 2).

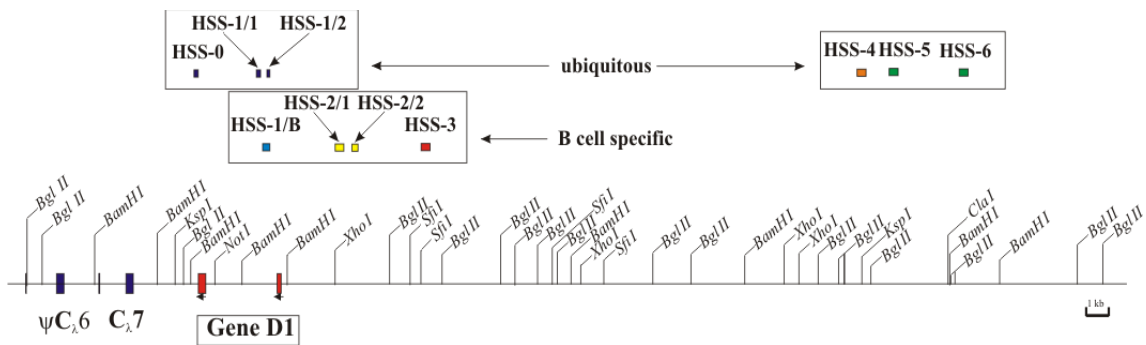


Abb. 7: Zelltypspezifische Expression DNase I hypersensitiver Bereiche flussabwärts von C_λ7

Dargestellt ist der Bereich flussabwärts des C_λ7 Gensegmentes über einen Bereich von ungefähr 50 kb. Hier befinden sich sieben HSS, deren Position als farbige Kästchen markiert wurde. Sie werden, wie in der Abbildung bezeichnet, zum Teil ubiquitär (HSS-0, -1/1, -1/2, -4, -5, -6), zum Teil aber auch nur in B-Zellen (HSS-1/B, -2/1, -2/2, -3) exprimiert. Der Abbildung ist ebenfalls die Position zweier Exons in Form der beiden vertikalen roten Striche zu entnehmen. Es handelt sich dabei um das Gen D1. Bei den dünnen vertikalen schwarzen Strichen handelt es sich um Spaltstellen von bezeichneten Restriktionsendonukleasen.

Frau Priska Kraißer beschäftigte sich im Rahmen ihrer Dissertation vor allem mit der näheren Charakterisierung und Eingrenzung von HSS-2 und konnte zeigen, dass sehr wahrscheinlich ein Masterfaktor existiert, der entwicklungsstadienabhängig und zelltypspezifisch eine aktive Chromatinstruktur zu etablieren vermag (Kraißer, 2002; Smale and Fisher, 2002). Demgegenüber finden sich HSS-0, HSS-1/1, HSS-1/2 und HSS-4, -5 und -6 in allen daraufhin untersuchten Zelllinien (siehe Abb. 7).

Nachdem im Rahmen einer Diplomarbeit in unserem Institut gezeigt werden konnte, dass von den drei letztgenannten HSS weder eine Promotoraktivität noch eine Enhanceraktivität ausgeht (Svoboda, 1999), liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um die eigentliche 3' Grenze des Igλ-Locus handelt. Untermauert wird diese Vermutung durch eine Analyse der Ergebnisse des Human Genome Projekts, nach der HSS-4 bis -6 zwischen der ehemals postulierten Grenze des Igλ-Locus, dem Enhancer HSS-3 und weiteren neu detektierten Genen liegen, deren Expression sicherlich unabhängig von derjenigen der Leichtketten erfolgt.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Igλ-Enhancer um einen sehr starken Enhancer handelt. In Reportergenkonstrukten vermag er orientierungsunabhängig die Aktivität verschiedener Reportergenkonstrukte und ihrer

unterschiedlichen Promotoren um bis zu 700 fach zu steigern. Dies lässt vermuten, dass die flussabwärts gelegenen Gene irgendwie vor den Einflüssen des B-Zellspezifischen Enhancers abgeschirmt werden. Eine solche Funktion würde ein Insulator, ein spezifisches regulatorisches DNA-Element, übernehmen (Burgess-Beusse et al., 2002).

Zelllinie	Ursprung der Zelllinie	Beschreibung der Zelllinie	HSS-4	HSS-5	HSS-6
Nalm-6	ALL, Prä-B-Zelle	(Hurwitz et al., 1979)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
380	ALL, Prä-B-Zelle	(Pegoraro et al., 1984)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
BV-173	CML Blastenkrise, Prä-B-Zelle	(Pegoraro et al., 1983)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
REH	ALL, Prä-B-Zelle	(Rosenfeld et al., 1977)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
697	ALL, Prä-B-Zelle	(Findley-HW et al., 1982)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
MN-60	B-Zell Leukämie, B-Zelle	(Roos et al., 1982)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
GM02132	Multiples Myelom, B-Zelle	(Matsuoka et al., 1967)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
CCRF-CEM	ALL, T-Zelle	(Foley et al., 1965)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
MOLT-4	ALL, T-Zelle	(Minowada et al., 1972)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
HL-60	AML, Myeloische Zelle	(Collins et al., 1977)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
K562	CML, Myeloische Zelle	(Lozzio and Lozzio, 1975)	+ (a)	+ (a)	+ (a)
HeLa	Cervix Carcinom, Adenocarcinom	(SCHERER et al., 1953)	+ (b)	+ (b)	+ (b)
HepG2	Hepatocelluläres Carcinom	(Aden et al., 1979), (Knowles et al., 1980)	+ (b)	+ (b)	+ (b)
293T	embryonale Nierenzellen	(Graham et al., 1977)	+ (b)	+ (b)	+ (b)
SNB19	Glioblastom	(Gross et al., 1988)	+ (b)	+ (b)	+ (b)
Kelly	Neuroblastom	(Schwab et al., 1983)	+ (b)	+ (b)	+ (b)

Tab. 2: Nachweis der HSS-4, -5 und -6 in verschiedenen Zelllinien

Die Versuche zum Nachweis der DNase I hypersensitiven Bereiche wurden von H. Asenbauer (a) und H.-G. Klobeck (b) durchgeführt.

1.5 Chromatindomänen werden durch Insulator/Boundary – Elemente funktionell voneinander getrennt

Die Chromosomen höherer Eukaryonten sind in funktionelle Domänen unterteilt, welche die Expression von Genen entweder ermöglichen oder verhindern (Babu et al., 2008). So sind aktive oder potentiell zu transkribierende Gene in locker gepacktem Chromatin, dem sogenannten Euchromatin, organisiert. Dieser Verpackungszustand zeigt zum einen signifikant erhöhte Nucleasesensitivität, zum anderen eine typischerweise reduzierte Anzahl des Linker Histon H1. Außerdem finden sich in diesen Bereichen typische biochemische Modifikationen, z.B. Acetylierungen der N-Termini des Histonoktamerkerens (Burgess-Beusse et al., 2002). Im Gegensatz dazu findet man inaktives oder auch kondensiertes Chromatin im Bereich transkriptionell inaktiver Bereiche. Typischerweise finden sich hier ausgedehnte Bereiche hypoacetylierter Histone und methylierter DNA. Entlang der Chromosomen finden sich nun je nach Zelltyp und Entwicklungsstadien unterschiedlich gestreute Bereiche in denen sich Regionen mit Euchromatin und kondensiertem Chromatin unmittelbar benachbart gegenüber stehen (Felsenfeld et al., 2004). Die Grenzen zwischen solchen unterschiedlichen Domänen bezeichnet man als Boundaries (Capelson and Corces, 2004). Es handelt sich dabei um spezifische DNA-Sequenz-Elemente, welche benachbarte Gene unterschiedlicher Expressionmuster vor der gegenseitigen Beeinflussung schützen (Wallace and Felsenfeld, 2007). Zahlreiche solcher Boundaries oder auch Insulator genannten DNA-Elemente wurden mittlerweile beschrieben und näher charakterisiert. Sie finden sich in Hefen, bei *Drosophila* (Maeda and Karch, 2007), beim Huhn sowie bei Säugetieren (Wallace and Felsenfeld, 2007). Diesen Boundaries lässt sich jeweils eine von zwei möglichen Funktionen zuordnen, welche diese Art regulatorischer DNA-Elemente charakterisieren. In der einen Funktionsweise sind sie in der Lage einen Promotor vor den Einflüssen eines benachbarten Enhancers zu schützen. Dies setzt voraus, dass sie zwischen beiden *cis*-aktiven Elementen positioniert sind. Man spricht in diesem Fall von „Enhancer blocking Insulation“. Die Funktion sowohl des Enhancers als auch des Promotors bleibt dabei unbeeinflusst, allein die Interaktion zwischen diesen beiden wird verhindert. Bei der anderen Funktion eines solchen Insulators handelt es sich um die sogenannte „barrier“ Funktion. Dies bedeutet, dass die Ausdehnung des kondensierten Verpackungszustandes

transkriptionell inaktiver Bereiche auf benachbarte transkriptionell aktive Bereiche verhindert wird.

Bei dem ersten beschriebenen Insulator handelt es sich um das Hühner β -globin 5`HS 4 Element (Chung et al. 1993). Die Funktion dieses Insulators kommt vor allem durch Beeinflussung der Methylierungs- und Acetylierungsmuster unterschiedlicher DNA Bereiche zustande (Burgess-Beusse et al., 2002). So schützt der HS4 Insulator offensichtlich CpG Inseln im Promotorbereich vor der Methylierung. Gleichzeitig werden hohe Acetylierungslevel der Nukleosomen über den aktiven DNA Abschnitten aufrecht erhalten. Bei der Methylierung von CpG handelt es sich um einen Mechanismus, der auch dazu dient, virale DNA, typischerweise reich an Cytosin und Guanin, im Wirtsgenom zu inaktivieren. Während bei *Drosophila* fünf verschiedenen Proteine, Su(Hw), Zw5, BEAF-32, GAGA-Faktor und dCTCF die Enhancer blockierende Funktion eines Insulators vermitteln können, scheint bei Vertebraten allein für dCTCF (CCCTC binding factor) ein konserviertes homologes Protein mit vergleichbarer Funktion zu existieren (Bell et al., 1999; Ohlsson et al., 2001; Moon et al., 2005; Mohan et al., 2007). Dabei handelt es sich um CTCF, welches für diese Funktion in Vertebraten als verantwortlicher Faktor identifiziert und näher charakterisiert worden ist.

1.6 Der multivalente CCCTC-Transkriptionsfaktor (CTCF)

Bei CTCF handelt es sich um ein evolutionär hochkonserviertes Zinkfingerphosphoprotein, welches ubiquitär in sämtlichen daraufhin untersuchten Zelllinien exprimiert wird (Lobanekov et al., 1990). Es hat eine Länge von 727 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 82 kDa. In der SDS-Gel-Elektrophorese zeigt sich jedoch ein abweichendes Wanderungsverhalten entsprechend einer näherungsweise Größe von 130 kDa (Klenova et al., 1997). Seine DNA bindende Domäne besteht aus 11 Zinkfingern (ZF), von denen 10 zur C₂H₂ Klasse (1-10), der 11. C-terminale ZF zur C₂HC Klasse gehört (Ohlsson et al., 2001) (siehe Abb. 8).

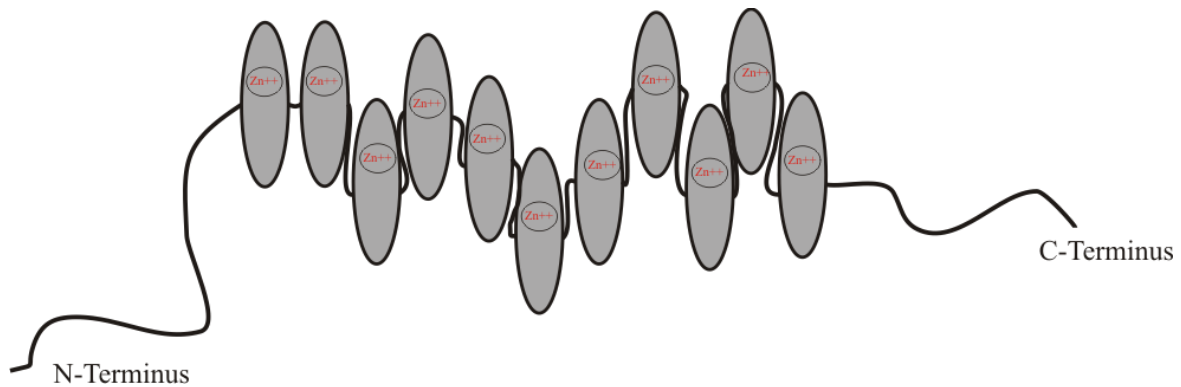


Abb. 8: Schematischer Struktur des Zinkfingerproteins CTCF

Dargestellt ist die Struktur des Proteins CTCF. Zu erkennen sind zum einen seine DNA Bindungsdomäne, bestehend aus den 11 Zinkfinger Motiven und zum anderen die N- und C-terminalen Bereiche, an denen in vivo zahlreiche Modifikationen stattfinden können. Die Zinkfinger werden je nach Bindungsmotiv unterschiedlich kombinatorisch eingesetzt.

Dieses Protein wurde erstmals als einer derjenigen Faktoren, die an der regulatorischen Kontrolle des *c-myc*-Gens beteiligt sind, beschrieben (Filippova et al., 1996). Renkawitz und seine Arbeitsgruppe fanden schließlich heraus, dass es sich bei NeP1 (negative Protein1), welches an das F1-Element des *Lysozym Gen Silencer Elementes* von Hühnern bindet (Kohne et al., 1993), um ein mit CTCF identisches Protein handelt (Burcin et al., 1997). Mittlerweile konnten weitere Studien Schlüsselfunktionen von CTCF bei transkriptioneller Repression und Aktivierung, eine zentrale Funktion bei Insulatoren von Vertebraten und beim Imprinting, beispielsweise des H19/Igf2 Locus, aufzeigen (Bell et al., 1999; Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Vostrov and Quitschke, 1997; Vostrov et al., 2002). Durch den hochvariablen, unterschiedlich kombinatorischen Einsatz seiner 11 Zinkfinger (ZF) ist es diesem Protein möglich an ~10-30 bp lange Zielsequenzen zu binden. Entsprechend ist es aufgrund der großen Vielfalt an dadurch möglichen divergierenden Bindungssequenzen nicht möglich, allein anhand der entsprechenden DNA-Sequenz eine Voraussage über eine potentielle Bindung in vivo oder in vitro zu treffen (Filippova et al., 1996). Wie dieses Protein über die Bindung an seine Zielsequenz letztendlich sowohl die barrier Funktion bzw. die Enhancer blockierende Funktion zu vermitteln vermag, ist immer noch nicht abschließend geklärt. Dies hängt sicherlich zum einen mit dem unzufrieden stellenden Wissen über die genaue Art und Weise der generellen Interaktion eines Enhancers mit seinem jeweiligen Promotor zusammen. Auch hierüber existieren verschiedene

Modellüberlegungen. Zu nennen wären beispielsweise *linking model*, *tracking-looping model* und *looping model*, die alle unterschiedliche mögliche Interaktionsweisen solcher regulatorischer Elemente denkbar erscheinen lassen (Ohlsson et al., 2001). Zum anderen stellt die noch sehr große Unwissenheit über die Interaktionspartner von CTCF an seinen Insulatorelementen in vivo ein weiteres Problem für die Entschlüsselung seiner Funktionsweise dar. Dem heutigen Wissensstand entsprechend stellt das Protein CTCF selbst den einzigen Weg dar, um potentielle Bindungsstellen in vitro und in vivo zu entschlüsseln und zu verifizieren.

1.7 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob CTCF im Bereich der DNase I HSS-4 bis -6 an die DNA bindet. Falls sich dies zeigen ließe, wäre das ein erster Schritt zu einer näheren Eingrenzung und Charakterisierung einer neuen Bindungsstelle von CTCF. Der letztendliche Beweis, dass eine CTCF Interaktion zur Etablierung eines Insulator/Boundary Element führt, ließe sich nachfolgend durch Reporterassays oder *colony-forming assays* bestätigen oder widerlegen. Dies wäre Teil einer geplanten nachfolgenden Arbeit. Zur Überprüfung der CTCF-Bindung in vitro war es beabsichtigt, Gelretardierungsassays (EMSA) durchzuführen. Dafür war es nötig, HSS-4, -5 und -6 mittels PCR zu amplifizieren und in einem weiteren Schritt die PCR-Produkte radioaktiv zu markieren. Als Bindungspartner in den Gelretardierungsassay sollten Zellkernextrakte eingesetzt werden. Die Überprüfung, ob CTCF in diesen Extrakten vorhanden ist, sollte mittels Westernblot erfolgen. Für die Präparation der Zellkernextrakte standen im Labor verschiedene B- und T-Zelllinien aus vorherigen Arbeiten zur Verfügung. Diese sollten nach aktuellem Kenntnisstand CTCF konstitutiv exprimieren. Im Verlauf der Arbeit wurde versucht, CTCF in Form eines GST-Proteins herzustellen. Dies erfolgte in der Absicht, das rekombinante Protein als Bindungspartner in den EMSA einzusetzen. Falls die Gelretardierungsversuche einen Hinweis auf die Bindung von CTCF erbringen würden, war es geplant, die Gelretardierungsassays im Sinne eines Supershift Assays zu modifizieren. Falls sich eine spezifische Bande im Gelretardierungsassay durch einen gegen CTCF gerichteten Antikörper in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verzögern ließe, würde dies den definitiven Beweis für eine in vitro Bindung von CTCF darstellen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

2.1.1.1 Feinchemikalien

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	
Glutathion-Sepharose Beads	Amersham Pharmacia, Freiburg
dNTP`s (Deoxynucleoside-Triphosphate Set)	Roche Diagnostics, Mannheim
BlueSlick	ServaGmbH, Heidelberg
Rotiphorese 30%	Roth, Karlsruhe
alle übrigen organischen und anorganischen Feinchemikalien	Merck, Darmstadt

2.1.1.2 Radiochemikalien

ATP, γ [32 P], > 6000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia, Freiburg
--	------------------------------

2.1.1.3 Biochemikalien

Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloramphenicol	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto Agar, Bacto Trypton, Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA

2.1.3 Enzyme und Proteaseinhibitoren

T4-Polynukleotidkinase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
PMSF, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim

2.2 Geräte und sonstige Materialien

Fuji Medical X-Ray Film	Fuji Photo, Düsseldorf
GeneAmp PCR system 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp PCR system 2700	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp PCR system 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Kodak Scientific Imaging Film	Integra Bioscience, Fernwald
Multi-Guard-Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern (0,1-10 µl, 5-200 µl, 100-1000 µl)	Roth, Karlsruhe
Multi-Pipettenspitzen (0,1-10 µl, 5-200 µl, 100-1000 µl)	Roth, Karlsruhe
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	peqLab Biotechnologie, Erlangen
Polyvinylidene fluoride-Membran	Millipore, Billerica, USA
Quick Spin Columns (G-25, G-50)	RocheApplied Science, Indianapolis
Branson Digital Sonifier 250-D	Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA

2.2.1 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Enhanced Chemi-Luminescence Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.2.2 Längenstandards und Kompetitoren

Längenstandards:

PeqGold Protein-Marker IV (prestained)	peqLab Biotechnologie, Erlangen
--	---------------------------------

Kompetitoren:

Poly dI-dC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SP-1 Oligos	MWG Biotech, Ebersberg
AP-2 Oligos	MWG Biotech, Ebersberg

2.2.3 Antikörper

CTCF (E-14), polyklonaler Ziegenantikörper, 200 µg/ml.

CTCF (C-20), polyklonaler Ziegenantikörper, 200 µg/ml

CTCF (E-14) X, polyklonaler Ziegenantikörper, 200 µg/0.1 ml

CTCF (C-20) X, polyklonaler Ziegenantikörper, 200 µg/0.1 ml

CTCF (N-17) X, polyklonaler Ziegenantikörper, 200 µg/0.1 ml

NFκB p50 (N-19) X, polyklonaler Ziegenantikörper, 200 µg/0.1 ml

Sämtliche Antikörper von Santa Cruz. Biotechnology, Inc., Heidelberg

Klonname 6G9, anti-GST monoklonaler Rattenantikörper, von E. Kremmer (GSF),

2.2.4 DNA

Längenstandards:

DNA Molecular Weight Marker XIV

Roche Diagnostics, Mannheim

Oligonukleotide/PCR-Primer

MWG Biotech, Ebersberg

Die Cosmid-Klone cos 2132/39 und cos 2132/16 wurden von H. Asenbauer isoliert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Zelllinien und Zellkultur

Zelllinie	Ursprung der Zelllinie	Beschreibung der Zelllinie
REH	ALL, Prä-B-Zelle	(Rosenfeld et al., 1977)
MN-60	B-Zell Leukämie, B-Zelle	(Roos et al., 1982)
BJAB	EBV-negative Burkitt's lymphoma cell line	(Clements et al., 1975)
CCRF-CEM	ALL, T-Zelle	(Foley et al., 1965)
HeLa	Cervix Carcinom, Adenocarcinom	(SCHERER et al., 1953)

Tabelle 3: Übersicht über die für die Präparation von Zellkernextrakten verwendeten Zelllinien

Fötale Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin, Glutamin, RPMI 1640-Medium	c.c.pro, Heidelberg

2.2.6 Mikrobiologie

E. coli BL21: E. coli B F⁻, ompT, hsdS (r_B⁻, m_B⁻), gal, dcm.
pGEX-4T1-CTCF hum

2.2.7 Computerprogramme

Word 2007 student version	Microsoft Corporation Inc.
Reference Manager	The Thomson Corporation
CorelDraw Graphics Suite X4	Corel Corporation Inc.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, gemäß Sambrook durchgeführt (Sambrook, 1989). Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt. Alle Experimente, bei deren Durchführung nicht explizit die Reaktionstemperaturen angegeben sind, wurden bei Raumtemperatur auf Eis durchgeführt.

2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase Kettenreaktion, im Folgenden als PCR bezeichnet, handelt es sich um ein Verfahren, bei dem spezifische DNA-Bereiche in einem zyklischen Prozess amplifiziert werden können (Saiki et al., 1988). Dabei verläuft die Amplifikation exponentiell. Die Durchführung erfordert drei wesentliche Komponenten:

- eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase
- ein DNA Abschnitt / Plasmid, welches der DNA Polymerase als Matrize dient
- zwei Oligonukleotide, die komplementär zu den flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden Bereichs sind und die den Startpunkt für die DNA Polymerase darstellen

Zur Durchführung wurden eine Taq-DNA Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) und die mitgelieferte PCR-Pufferlösung eingesetzt. Die Primersequenzen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Primer für HSS 4	1. 5' - AGC TGT GGA TCC AGT GGC TCT TGG - 3' 2. 5' - AAA GCA AGA TCT CGC CGC GGT GGC - 3'
Primer für HSS 5:	1. 5' - GGT GGG GAT CCT AAT TTG TAG CAT - 3' 2. 5' - CCA TGC AGA TCT ACC CCA GCT GCC - 3'
Primer für HSS 6	1. 5' - AAG TGT GGA TCC TTG TAA AGC AGT - 3' 2. 5' - AAG GCC AGA TCT AGA GAC TTT AAA - 3'
Primer für HSS 6/5→6/18	1. 5' - CAA GGC AGT CCA TGT GAA AT - 3' 2. 5' - ATT ATC TGT ACA TGC TGG C - 3'
Primer für Myc A	1. 5' - AGC CGG TTT TCG GGG CTT - 3' (Myc-11) 2. 5' - GCT CGT CTC GAC GCG ACG CCC - 3' (Myc-8)
Primer für Myc B	1. 5' - TAA TGC GAG GGT CTG GAC - 3' (Myc-9) 2. 5' - GGA CGG AGC TCT TCC CGT - 3' (Myc-10)

Tab. 4: Bei PCR's verwendete Primersequenzen

Ein PCR-Reaktionsansatz enthielt 25 µl 2x Pufferlösung, je 1 µM der benötigten Primer sowie zum Starten der Reaktion 5 U Taq Polymerase. Es wurden jeweils circa 200 pg der DNA als Template eingesetzt (cos 2132/39 bzw. cos 2132/16) und mit aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 50 µl ergänzt.

10xPCR Puffer:

100 mM Tris-HCL, pH 9.0

15 mM MgCl₂

500 mM KCl

1% Triton X-100

Je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Als Matrize für HSS-4,-5 und -6 diente das Cosmid cos 2132/39. Als Matrize für die Myc-Fragmente fand das Cosmid cos 2132/16 Verwendung. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Zyklenzahl von 35 PCR-Zyklen und eine Annealing Temperatur von 55°C bei den HSS Fragmenten, bzw. von 60°C bei den Myc-Fragmenten bei ebenfalls 35 Zyklen ein optimales Ergebnis liefern.

Das Zyklusprofil der PCR-Reaktion gibt Tabelle 5 wieder.

Phase	Zeit	Temperatur
I	5 Minuten	95 °C
II	20 Sekunden	94 °C
	20 Sekunden	60/55 °C
	60 Sekunden	72 °C
III	5 Minuten	72 °C

Tab. 5: PCR-Zyklusprofil

Zyklus II wurde 35fach durchlaufen

Zur Überprüfung der Ergebnisse des PCR-Erfolges und zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde jeweils im Anschluss an die PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt.

2.3.3 Gelelektrophorese

Bei einer Elektrophorese handelt es sich um die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten in einem Gel durch Anlage eines elektrischen Feldes. Dabei korreliert die Wanderungsgeschwindigkeit unmittelbar mit der Länge der eingesetzten DNA. Die Größe der eingesetzten DNA kann dabei über einen parallel aufgetragenen Längenstandard, den sogenannten Marker, bestimmt werden.

Die Elektrophorese wurde von uns sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken durchgeführt. Wir verwendeten 1,4% Agarosegele. Die Konzentration der Agarosegele orientierte sich dabei an der zu erwartenden Fragmentgröße und Erfahrungswerten. Zur Herstellung der Gele wurden entsprechende Agarosemengen in TAE-Laufpuffer unter Aufkochen gelöst und anschließend die Gele auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Ermöglichung einer späteren Visualisierung der DNA unter UV-Licht (254 nm) war dem Laufpuffer und auch den Gelen Ethidiumbromid beigefügt (50 µg/l) worden.

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden 50 µl des PCR-Produktes mit 5 µl 10x Auftragungspuffern gemischt und in die Tasche eines 1,4% Agarosegels pipettiert. In einer Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 80 Volt entsprechend ~ 250 mA angelegt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit Handschuhen aus der Apparatur entnommen. Die DNA-Banden konnten nun aufgrund der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromid in der Dunkelkammer unter UV-Licht auf Abgrenzbarkeit und Schärfe kontrolliert und fotografisch dokumentiert werden.

TAE-Laufpuffer für Agarosegele:

40 mM Tris

20 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

CH₃COOH ad pH 7,4

50 µl/l Ethidiumbromid

10x Auftragungspuffer für Agarosegele:

0.1% Bromphenolblau

50% Saccharose

50 mM EDTA

2.3.4 Fragmentisolierung aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung war es möglich, die Banden unter visueller Kontrolle mit einem Skalpell aus dem Gel zu schneiden. Anschließend konnte die DNA mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kit, entsprechend dem beiliegenden Protokoll von QIAquick, aus den Gelfragmenten extrahiert werden. Die gereinigten PCR Produkte konnten in TE Puffer aliquotiert und im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.3.5 Radioaktive Markierung der PCR Fragmente mit γ [³²P]-ATP

Bei Gelretardierungsversuchen werden radioaktiv markierte DNA-Fragmente verwendet. Die Markierung erfolgt mit γ [³²P]-ATP unter Zuhilfenahme einer T4-Polynukleotidkinase (PNK). Ziel der radioaktiven Markierung ist es, die Lokalisation der DNA in dem Gel nach der Elektrophorese (siehe 2.4) autoradiographisch bestimmen zu können.

Polynukleotidkinase Reaktion:

2 μ l DNA

1 μ l γ [³²P]-ATP

1 μ l Polynukleotidkinase (10 U)

14 μ l H₂O

2 μ l 10fach Puffer Kinase (500 mM Tris-HCL, 100 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidine, pH 8.2 bei 25°C)

Das Reaktionsgemisch wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde im Wärmeblock bei 37°C wurde das Reaktionsgemisch auf Quick Spin Columns aufgetragen. Durch Zentrifugation wurden die markierten Oligonukleotide mit 50 μ l ddH₂O eluiert.

Anschließend konnte die Aktivität der Oligonukleotide im Čerenkov-Zähler bestimmt werden. Die gemessenen Werte lagen versuchsabhängig zwischen 20.000 und 40.000 Cpm/ μ l.

2.3.6 Zellkultur

Alle in Tabelle 3 unter Punkt 2.2.5 genannten Zelllinien waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Diese Zelllinien wuchsen in Suspensionskultur im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 92% Luftfeuchtigkeit. Das Medium für die Zellkulturzellen (für normales Wachstum) enthielt RPMI1640-Medium, 15% Fötale Kälberserum und 4 mM Glutamin. Die Arbeiten mit den Zellkulturzellen erfolgten unter sterilen Bedingungen.

PBS:

8 g/l NaCl

0.2 g/l KCl

2.1 g/l Na₂HPO₄·12H₂O

0.2 g/l KH₂PO₄

Zellkulturmedium für normales Wachstum:

RPMI 1640-Medium

15% fötales Kälberserum

4 mM Glutamin

2.3.7 Herstellung von Zellkernextrakten

Für die Präparation der Zellkernextrakte orientierten wir uns an den Protokollen von Schreiber, E. et al. (Schreiber et al., 1989). Diese Methode ist schnell und mit geringen Ausgangszellzahlen durchführbar. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung dienten die Zelllinien BJAB, HELA, Mn60, REH und CCRF-CEM (siehe Tab.2).

Zur Ernte der Zellen wurden 10 ml Zellkulturmedium mit ca. 10⁶ Zellen / ml durch 10-minütiges Zentrifugieren (Zentrifugentyp: Heraeus, 1100 rpm, 10 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem PBS resuspendiert und wiederum (1100rpm, 10 min, RT) pelletiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, verworfen und das Pellet in 6 ml PBS resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten im Kühlraum bei 4°C.

Das gewonnene Material wurde in Reaktionsgefäßen zu je 500 µl aliquotiert und weitere 15 Sekunden in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert.

Ziel dieser Reinigungsschritte war es, die Zellpellets weitestgehend vom Zellkulturmedium zu befreien. Der Überstand wurde dementsprechend nach jedem Waschschrift sorgfältig abpipettiert und verworfen.

Die verbliebenen Pellets wurden in je 400 µl kaltem Puffer A resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl einer 10% NP-40 Lösung wurden die

Zellen für zehn Sekunden gründlich gemischt und anschließend eine Minute in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Diese Schritte dienen der Fragmentierung der Zytoplasmamembran.

Der Überstand aus Zytoplasmabestandteilen und RNA wurde abpipettiert und verworfen. Das verbliebene Pellet aus Zellkernen wurde in 50 µl kaltem Puffer C resuspendiert und 15 Minuten in einem Schüttler gemischt. Darauf folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C. Der den Zellkernextrakt enthaltende Überstand (ca. 55 µl) wurde in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Das verbliebene Pellet aus Chromatin, RNA und Zellkernmembranen wurde verworfen.

Puffer für die Kernextraktion nach Schreiber (Schreiber et al., 1989):

Puffer A:

10 mM Hepes, pH 7.9

10 mM KCL

0.1 mM EGTA

0.1 mM EDTA

1 mM DTT

0.5 mM PMSF

Puffer C:

20 mM Hepes, pH 7.9

0.4 mM NaCl

1 mM EGTA

1 mM EDTA

1 mM DTT

1 mM PMSF

25% Glycerin

10% Nonidet P40

2.3.8 Immundetektion / Westernblot

Der Westernblot gehört zu den immundetektiven Verfahren. Diesen ist gemeinsam, dass sie das Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip zum Auffinden eines gesuchten Proteins nutzen. Mit Hilfe von Primärantikörpern lassen sich einzelne Proteine in einem Proteinextrakt oder Gewebeextrakt nachweisen. Dementsprechend handelt es sich um eine sehr sensitive Nachweismethode für gesuchte Proteine.

Dazu wird das Proteingemisch durch Aufkochen denaturiert und anschließend zusammen mit einem Auftragungspuffer in einer SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt.

3x Probenauftragungspuffer (Lämmli):

4% SDS
300 mM DTT
30% Glycerin
150 mM Tris/HCL (pH 6.8)
0.3% Bromphenolblau

10x SDS Running buffer / Elektrodenpuffer (pH 8.3):

0.25 M Tris/HCl
1.92 M Glycerin
1% SDS

5% Sammelgel (2ml):

5% Acrylamid
0.25 ml 1.0 M Tris (pH 6.8)
0.02 ml 10% SDS
0.02 ml 10% Ammoniumpersulfat
0.002 ml TEMED
1.4 ml H₂O

10% Trenngel (5 ml):

10% Acrylamid
1.3 ml 1.5 M Tris (pH 6.8)
0.05 ml 10% SDS
0.05 ml 10% Ammoniumpersulfat
0.002 ml TEMED
1.9 ml H₂O

Danach wurden die Proteine durch Anlage einer Spannung unter Zuhilfenahme von BioRad „Wet Blot Systemen“ auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert und dort fixiert. Hierzu wurde das Gel auf die PVDF-Membran, die zuvor mit Western Transfer buffer benetzt worden war, gelegt. Gel und Membran wurden nun zwischen zwei ebenfalls zuvor mit Transfer buffer gesättigten Whatman-Papieren platziert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte durch Anlage einer konstanten Spannung (400 mA, 1.5 Stunden, RT).

Western Transfer buffer

25 mM Tris/HCL
192 mM Glycerin
20% Methanol

Die Kühlung der Transfer-Reaktion wurde mit Hilfe eines Eisblockes in der Transferkammer ermöglicht. Nach dem Transfer wurde die Protein-beladenen PVDF-Membran für eine Stunde mit Blocking Solution inkubiert, um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren.

Es folgte eine Inkubation mit geeigneter Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers. Dazu wurden die Membranen in Plastikschaalen gelegt und auf einem horizontalen Schüttler im Kühlraum über Nacht, dabei vollständig bedeckt mit dem in Blocking Solution verdünnten Antikörper, inkubiert.

Die PVDF-Membranen wurden drei Mal mit PBS/0.1% Tween 20 (jeweils 10 min / RT) gewaschen und danach eine weitere Stunde mit Meerrettich-Peroxidase (HRP=horseradish peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS/0.1% Tween 20 (jeweils 10 min / RT), erfolgte die Visualisierung der Antikörper-Proteinkomplexe mit Hilfe von Enhanced Chemi-Luminescence Kits (ECL, Amersham) und die Autoradiographische Darstellung entsprechend den Herstellerangaben.

Expositionszeiten von 30 Sekunden bis zu einer Minute Dauer waren in der Regel ausreichend.

Blocking solution:

1xPBS

0.1% Tween 20

5% Milchpulver

Washing solution:

1xPBS

0.1% Tween 20

2.3.9 Expression von GST-CTCF Fusionsproteinen

2.3.9.1 Herstellung des Plasmid pGEX-4T1-CTCF hum

Das Plasmid pGEX-4T1-CTCF hum wurde von H.-G. Klobeck hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Aus revers transkribierter mRNA der Zelllinie Molt-4 (Minowada et al., 1972) wurde mit Hilfe der PCR ein Vollängentranskript des CTCF-Gens des Menschen isoliert und als 2,217 kb EcoRI-SalI Fragment in den Expressionsvektor pGEX-4T1 (GE Healthcare, Freiburg; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>, Accession U13853) als Fusionsgen mit dem Gen der Glutathion S-Transferase (GST) kloniert (s. S. 69, Abb. 18). Der Lac-Repressor (lacIq-Gen auf dem Plasmid) bindet ohne Induktor an den Promotor des GST-CTCF Fusionsgens und verhindert dessen Transkription in *E. coli* Wirtsbakterien. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid) erfährt der Repressor eine allosterische Strukturveränderung, löst sich von der DNA und die Transkription des Fusionsgens beginnt.

2.3.9.2 Retransformation der Plasmide in BL21

Nach der Plasmidpräparation erfolgte die Retransformation der Plasmide in den *E. coli* BL21 Stamm (*E. coli* B F⁻, ompT, hsdS (r_B⁻, m_B⁻), gal, dcm). Diese Zelllinie muss kompetent zur Aufnahme der Plasmide gemacht werden (Inoue et al., 1990). Hierzu wurden 0.5 μ l der Plasmidlösung und 80 μ l der kompetenten BL21 zusammenpipettiert und 30 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Darauf folgte ein 1-minütiger Hitzeschock von 42°C mit anschließender Abkühlung auf Eis (30 Sekunden). 80.5 μ l des Suspendats wurden nun zu 500 μ l LB-Medium gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Hiervon wurden 150 μ l auf einer Agarplatte (Amp⁺, Chlor⁺) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Agarplatten:

5 g/l NaCl
10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
13 g/l Agar
150 mg/l Ampicillin
150 mg/l Chloramphenicol

LB-Medium:

5 g/l NaCl
10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt

2.3.9.3 Expression des GST-CTCF-Fusionsproteins in BL21

Nachdem die Platte o/n bebrütet worden war, konnten am nächsten Tag 500 ml LB-Medium (mit je 500 µl Ampicillin, +500 µl Chloramphenicol) mit transfizierten Zellen angeimpft werden. Dazu wurden mit einer Impföse großzügig Bakterienkolonien von der Platte abgestrichen und in einem Falcon in 10 ml LB-Medium durch Vortexen resuspendiert. Mit jeweils 10 ml des LB-Mediums wurden weitere 500 ml LB-Medium (mit je 500 µl Ampicillin, +500 µl Chloramphenicol) in einem Erlenmeyerkolben angeimpft. Eine Wachstumsphase über einige Stunden bei 37°C bis zur OD₆₀₀ von 0.6-0.7 folgte. Nach Abschluss dieser Wachstumsphase erfolgte die Entnahme eines Aliquots von 100 µl zwecks Dokumentation. Das Aliquot wurde in 200 µl 6× Proteinladepuffer aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

Nun erfolgte die Induktion der Plasmidexpression mittels 250 µl 1 M IPTG pro 500 ml Zellkulturausgangmedium entsprechend 0.5 mM IPTG je Flüssigkultur. Nun schloss sich eine weitere Wachstumsphase o/n bei 18°C an, in der die Proteinexpression erfolgen sollte. Im Anschluss an diese Expressionsphase wurde das Bakterien-Suspendat (20 min, 4000 rpm) zentrifugiert. Das Pellet konnte jetzt je Liter vorausgegangener Zellkultur mit jeweils 20 ml Columnbuffer und Proteaseinhibitoren (PMSF, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin) resuspendiert werden.

Column buffer:

500 mM NaCl
20 mM Tris pH 8.0
0.5 mM EDTA pH 8.0
0.5% NP40

2.3.9.4 Zellaufschluss durch Beschallung

Zur Gewinnung des GST-Fusionsproteins mussten die Zellen auf Eis sonifiziert werden. Dies erfolgte über drei mal 20 Sekunden, wobei jeder Sonifizierungsphase eine Pause von zwei Minuten folgte, um ein Überhitzen zu verhindern. Die Amplitude wurde auf 50% eingestellt. Nach dem Eröffnen der Zellmembranen konnte das Suspendat zentrifugiert werden (10.000 rpm, 20 Minuten).

2.3.9.5 Aufreinigung des GST-CTCF-Fusionsproteins

Der abpipettierte Überstand konnte mit zuvor in Columnbuffer äquilibrierter Glutathion-Sepharose über Nacht im Tischrüttler aufbewahrt werden. Dies sollte der Glutathion-Sepharose die Bindung an das GST-Fusionsprotein ermöglichen. Am folgenden Tag konnten die Glutathion-Sepharosepartikel (1000 rpm, 1 Minute) abzentrifugiert werden und standen nun für die nachfolgenden Wasch- und Elutionsschritte zur Verfügung. Dazu erfolgte ein drei maliges Waschen der Beads in 5 ml Wash Puffer I und anschließend drei maligen Waschen in Wash Puffer II. Jedem Schritt folgte eine Zentrifugation (1000 rpm, 1min.). Daran schlossen sich zwei Elutionsschritte mit 1x Elutionspuffer ohne GSH an. Schließlich erfolgte eine Elution über 1 h mit Elutionspuffer, dem zuvor 30 mM Glutathion beigelegt worden waren. Dieser Schritt wurde im Anschluss über Nacht wiederholt. Von sämtlichen Wasch- und Elutionsschritten wurden Proben aliquotiert, in 2x Lämmli Proteinauftragungspuffer (siehe 2.3.8) aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Dies erfolgte, um nach dem Auftragen auf ein Proteingel nachverfolgen zu können, in welchem Kompartiment sich das gesuchte Protein zu welchem Zeitpunkt befand. Der Elutionspuffer mit 30 mM Glutathion, der in den letzten beiden Elutionsschritten Verwendung fand, wurde vollständig aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Wash buffer I:

1 M NaCl
20 mM Tris pH 8.0
0.5 mM EDTA pH 8.0
1% NP 40

Wash buffer II:

500 mM NaCl
20 mM Tris pH 8.0
0.5 mM EDTA pH 8.0
0.5% NP 40

Elution buffer :

200 mM NaCl

200 mM Tris pH 8.0

0.5 mM EDTA pH 8.0

0.1% NP 40

12% Glycerin

20-40 mM Gluthation

Allen Puffern wurde vor Gebrauch 1 M DTT (ad 1 mM) und 0.001 Vol. verschiedene Proteaseinhibitoren (0.2 M PMSF, 1 mg/ml Aproptinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0.7 mg/ml Pepstatin) hinzugefügt.

2.3.9.6 Nachweis des GST-CTCF-Fusionsproteins mittels Westernblot

Die Durchführung des Westernblots erfolgte wie in 2.3.8 beschrieben.

Als 1. Antikörper wurde ein monoklonaler α -GST Rattenantikörper von E. Kremmer (GSF) Klonname 6G9, in 1 zu 100 Verdünnung, als 2. Antikörper ein HRP gekoppelter α -Ratten Antikörper in 1 zu 10 000 Verdünnung verwendet (siehe 3.3.2, Seite 70, Abb. 19).

2.4 “Electrophoretic mobility shift assays” (EMSA)

Bei „Electrophoretic mobility shift assays“ handelt es sich um Gelretardierungsassays. Ähnlich der Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten nutzt man auch hier das unterschiedliche Wanderungsverhalten von DNA-Fragmenten nach Bindung von Proteinen in einem elektrischen Feld zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Masse aus. Im Fall des EMSA werden radioaktiv markierte DNA-Fragmente in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Hierbei handelt es sich um eine geeignete Methode, DNA-Bindungsproteine aufzuspüren (Hellman and Fried, 2007).

2.4.1 EMSA ohne Modifikation

Das Vorgehen bei den EMSA's lässt sich in vier Schritte einteilen. Die Vorgehensweise erfolgte wie nachfolgend geschildert:

2.4.1.1 Präparation des Gels

Die Glasplatten wurden durch Waschen und anschließende Behandlung mit BlueSlick (ServaGmbH, Heidelberg) vorbereitet. Durch eine Hydrophobisierung der Glasoberfläche sollten Anheftungen des Gels am Glas verhindert und ein beschädigungsfreies Ablösen des Gels nach Abschluss der Elektrophorese ermöglicht werden.

Am Rand wurden einen Millimeter dicke Spacer eingesetzt und die gesamte Apparatur mit Klebeband sorgfältig verklebt, sodass ein Auslaufen des unpolymerisierten Gels vermieden wurde. Jeweils 180 µl APS-Lösung (100 mg/ml) und 24 µl TEMED wurden zu 30 ml Gelmischung hinzupipettiert. Dies erfolgte auf Eis, um den Polymerisationsvorgang zu verlangsamen. Nach dem Mischen folgten das Gießen des Gels und das Eindrücken eines Gelkammes. Den Gelen wurde mehr als 24 h Zeit gelassen, um zu Polymerisieren. Dazu wurden sie bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt. Bei Gebrauch eines Gels wurden diese in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die Kammern mit 1x Tris-Glycinlaufpuffer gefüllt. Wir ließen die Gele 30 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt vorlaufen.

5% Gel:

22 ml H₂O
5 ml Rotiphorese 30%
3 ml 10xTris Glycin Puffer (pH 8.3)
180 µl APS
24 µl TEMED

10x Tris-Glycinlaufpuffer:

30.28 g Tris
142.7 g Glycin
3.92 g EDTA auf 1 l ddH₂O

2.4.1.2 Vorbereiten der Bindungsreaktion

Für die Bindungsreaktion wurden 20-40 fmol radioaktiv markierter DNA Probe, entsprechend 10.000 bis 20.000 Cpm, Bindungspuffer, 2 µl Zellkernextrakt und die Kompetitoren (100 µg/ml Poly dI-dC, SP-1, AP-2) auf Eis zusammen pipettiert. Das Gesamtvolumen wurde auf 20 µl mit ddH₂O ergänzt. Die Bindungsreaktion fand, soweit nicht anders beschrieben, über 30 Minuten bei Raumtemperatur statt (Magdinier et al., 2004).

Bindungspuffer nach Felsenfeld (Magdinier et al., 2004):

20 mM HEPES (pH 7.9)
150 mM KCL
5 mM MgCL₂
1 mM DTT
5% Glycerol
1% NP40 (modifiziert)

Bindungspuffer nach Lobanenkov (Pugacheva et al., 2005):

1xPBS
0.1 mM ZnSO₄
1 mM DTT
5 mM MgCL₂
0.1% NP40
10% Glycerol

2.4.1.3 Elektrophoretische Auftrennung

Vor dem Auftragen in die Taschen des Gels wurden jedem Reaktionsansatz 2 μ l Bromphenolblau-Lösung beigefügt. Dies diente zum einem der Überprüfung des Füllungszustandes der Taschen, zum anderen um dem Verlauf der Elektrophorese verfolgen zu können. Die Elektrophorese wurde mit 20 mA in TG-Puffer durchgeführt. Die Zeitdauer variierte je nach Größe und damit der Wanderungsgeschwindigkeit des markierten DNA-Fragmentes und wurde beendet, sobald die DNA, kenntlich gemacht durch das wandernde Bromphenolblau, ungefähr zehn Zentimeter gelaufen war.

Bromphenolblau-Lösung:

50 mM EDTA

50% Saccharose

0.5% Bromphenolblau

2.4.1.4 Analyse des Gels

Zur Analyse wurde das Gel unter Anlage eines Vakuums bei 80°C über zwei Stunden auf Whatmann Papier getrocknet. Falls nicht anders beschrieben, erfolgte die Exposition über Nacht bei Raumtemperatur. In der Regel wurde auf den Einsatz von Verstärkerfolien verzichtet, um die Abbildungsschärfe der Banden zu erhalten. Falls die Exposition unter einer Verstärkerfolie erfolgte, verkürzte sich die Autoradiographiezeit auf 2-3 h und erfolgte bei -80°C im Gefrierschrank.

2.4.2 EMSA – Einsatz von Antikörpern: „Supershift Assay“

Für die Supershift Assays verwendeten wir drei verschiedene CTCF-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Inc. (siehe 2.2.3). Dabei handelte es sich um affinitätsgereinigte polyklonale Ziegenantikörper gegen verschiedene Peptidanteile des humanen CTCF. Dabei war der C-20 Antikörper gegen C-terminale und der N-17 Antikörper gegen N-terminale Epitope von CTCF gerichtet. Die Epitope der E-14 Antikörper liegen im Bereich der Zinkfingerdomäne von CTCF. Der EMSA erfolgte wie in 2.4.1 beschrieben. Im Unterschied zu den unmodifizierten EMSA wurden nun im Anschluss an die 30 Minuten dauernde 1. Phase der Bindungsreaktion jeweils 2 μ l Antikörper hinzugefügt. Es folgte eine 2-stündige Inkubationsphase bei 4°C, in der dem Antikörper Zeit gelassen wurde, an sein Epitop zu binden.

3. ERGEBNISSE

Die Arbeitsgruppe H.-G. Klobeck beschäftigt sich seit den 1980er Jahren vor allem mit der Suche nach regulatorischen Elementen, die an der Kontrolle des $Ig\lambda$ -Locus beteiligt sind. Besonderes Augenmerk bisheriger Arbeiten war dabei auf die Charakterisierung potentiell regulatorische Elemente gerichtet, die mit Hilfe des limitierten DNase I Verdauus genomischer DNA gefunden werden können (Nedospasov and Georgiev, 1980; Wu, 1980).

Auf diese Weise entdeckte die Arbeitsgruppe H.-G. Klobeck insgesamt sieben DNase I HSS's im 3' Bereich des $Ig\lambda$ -Locus (siehe Abb.7) (Asenbauer and Klobeck, 1996).

Bei dem bisher am besten charakterisierten regulatorischen Elementen dieses Genortes handelt es sich um den $Ig\lambda$ -Enhancer (Blomberg et al., 1991), der sich synergistisch aus HSS-1, -2 und -3 zusammensetzt (Asenbauer and Klobeck, 1996; Combriato and Klobeck, 2002).

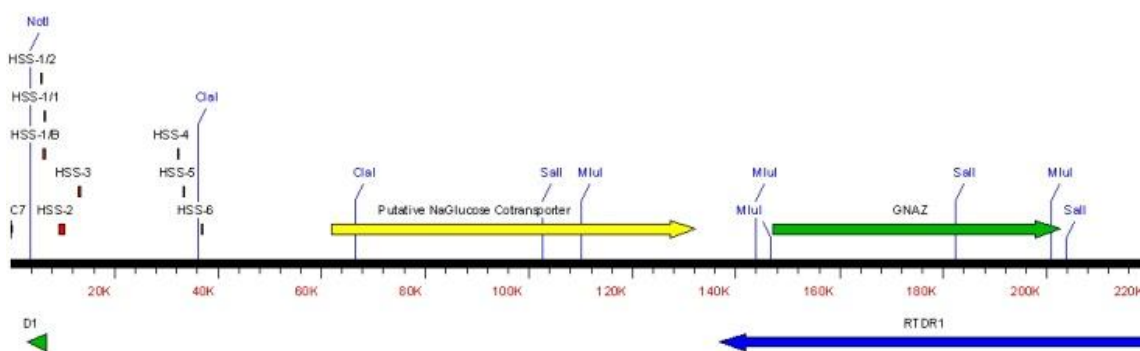


Abb. 9: Der Bereich flussabwärts von $C_{\lambda}7$

Dargestellt ist ein circa 220 kb umfassender Bereich flussabwärts des Gensegment $C_{\lambda}7$. Zu erkennen sind als rote Kästchen über der Basislinie die HSS 1-6. Bei den nachfolgenden farbigen Pfeilen handelt es sich um die flussabwärts gelegenen Gene. Gelb eingezeichnet die Lokalisation des Na^{+} -Glucose-Cotransporters, blau des RTDR1-Gens und grün des GNAZ-Gens. Die Pfeilorientierung gibt zugleich die Transkriptionsrichtung an.

Etwas weiter flussabwärts von diesen finden sich drei weitere DNase I-hypersensitive sites, die möglicherweise die eigentliche 3' Grenze des $Ig\lambda$ -Locus darstellen. Hierbei könnte es sich um drei Insulator/Boundary Elemente handeln. Grund für diese Vermutung liefert uns das Wissen um drei weitere unmittelbar flussabwärts gelegene

Gene: GNAZ, RTDR1 und ein putatives Gen für einen Na⁺-Glucose Cotransporter (siehe Abb. 26). Alle drei Gene werden sicherlich unabhängig von den Immunglobulinen exprimiert und müssen somit vor den Einflüssen des Igλ-Enhancers geschützt sein. Eine solche Aufgabe im Genom würde ein Insulator/Boundary Element übernehmen. Fände sich in dem Bereich von HSS-4 bis -6 ein solches Element, müsste nach heutigem Wissenstand über Insulatoren bei Vertebraten die Bindung von CTCF nachweisbar sein (Bell et al., 1999; Felsenfeld et al., 2004). Allein aufgrund einer DNA-Sequenz kann jedoch noch keine Voraussage über die Bindung dieses Proteins getroffen werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es CTCF möglich ist, unterschiedliche Kombinationen seiner Zinkfinger für die DNA-Bindung zu nutzen und sich in Folge dessen selbst die wenigen bisher charakterisierten Bindungsstellen in ihrer Sequenz deutlich unterscheiden (Filippova et al., 1996).

3.1 Darstellung bekannter regulatorischer Funktionen von HSS-4, -5 und -6

Zu dem Zeitpunkt, an dem diese Arbeit aufgenommen wurde, war es anhand bisher vorliegender Versuchsergebnisse nicht möglich, abschließend zu beurteilen, welche regulatorischen Aufgaben diese drei DNase I-hypersensitiven Bereiche übernehmen.

Die in ihrer Expression sicherlich unabhängig regulierten Gene RTDR1 und GNAZ werden aber irgendwie vor den Einflüssen des Immunglobulin-λ Enhancers geschützt. Die von Frau S. Svoboda (Svoboda, 1999) im Verlauf ihrer Versuche beobachtete Expressionsabnahme des Reportergens auf ein Drittel des Ausgangswertes bei Klonierung von HSS-3, -4, -5 und -6 in Originalorientierung in einen Vektor stützen diese Aussage. Neben einer Funktion als Silencer-Element wäre es aber auch durchaus vorstellbar, dass sich in diesem Bereich ein Insulator/Boundary Element befindet (siehe 1.5). Ein solches regulatorisches Element wäre ebenfalls in der Lage, flussabwärts gelegene Gene vor den Einflüssen des proximalen Igλ-Enhancers zu schützen (Burgess-Beusse et al., 2002). Zur experimentellen Überprüfung des Vorhandenseins eines solchen regulatorischen Insulator-Elementes würde die in-vitro-Testung einer möglichen CTCF-Bindungsstelle den ersten Schritt darstellen (Bell et al., 1999).

Zwei Gründe sind für eine solche Vorgehensweise ausschlaggebend:

Den ersten Grund stellt die Tatsache dar, dass an allen bisher bei Vertebraten beschriebenen Insulator/Boundary Elementen CTCF direkt über eine DNA-Bindung beteiligt ist (Bell et al., 1999). Den zweiten entscheidenden Grund stellt die Tatsache dar, dass es allein über die Kenntnis einer DNA-Sequenz nicht möglich ist, verlässliche Aussagen über eine tatsächliche CTCF-Bindung *in vitro* oder gar *in vivo* zu treffen (Filippova et al., 1996). Methode der Wahl zur Überprüfung einer solchen CTCF-Bindungsstelle stellt der “*electrophoretic mobility shift assay*“ (EMSA) dar, eine Technik die dazu genutzt wird Proteinkomplexe auf DNA und RNA zu untersuchen (Hellman and Fried, 2007).

Dabei handelt es sich um eine der einfachsten, schnellsten und sensitivsten Möglichkeiten überhaupt, um die DNA-Bindungsfähigkeit bestimmter Proteine oder an eine bekannte DNA-Sequenz gebundene Proteine zu untersuchen.

3.2 “Electrophoretic mobility shift assays” – *in vitro* Nachweis von Protein-DNA Interaktionen

Ein DNA-Abschnitt definierter Größe wandert in Gegenwart von Proteinen umso weiter pro Zeiteinheit im Gel, je weniger Interaktionen er mit Proteinen eingegangen ist.

Grund hierfür stellt die Tatsache dar, dass jedes bindende Protein zu einer Vergrößerung des gesamten wandernden Komplexes und damit seiner molaren Masse führt (zur Durchführung siehe 2.4). Dementsprechend wandert die freie radioaktiv markierte DNA weiter, als ein DNA-Protein-Komplex und dieser wiederum wandert weiter, als ein DNA-Protein-Antikörper Komplex. Uns interessierte vor allem, ob CTCF im Bereich der HSS-4, -5 und -6 bindet. Kommt es zur Rekrutierung weiterer Protein-Bindungspartner, wird dies ebenfalls über eine Molekulargewichtszunahme zu weiteren Banden oder aber einer generellen Retardierung der Wanderungsgeschwindigkeit des Komplexes führen, was beides autoradiographisch sichtbar wird.

So stellen die Bereitschaft der beteiligten Proteine zur Interaktion, als auch die Fragmentlänge des zu untersuchenden DNA-Abschnittes kritische Punkte zur Beurteilung der Ergebnisse der von uns gewählten Methode dar. Der Umfang an spezifisch und unspezifisch stattfindenden Bindungen wird unmittelbar in einer unterschiedlichen Anzahl und Trennschärfe der Banden im Gel resultieren.

Spezifität dieser Methode

Aufgrund der eingesetzten Zellkernextrakte und der dadurch verwendeten Mischungen unterschiedlicher Proteine war es nötig, einige Spezifizierungen am ursprünglichen Versuchsaufbau vorzunehmen. Um die Anzahl der unspezifischen Bindungen zu reduzieren und somit die Spezifität der Versuche zu erhöhen, kamen unterschiedliche Kompetitoren zum Einsatz. Wir benutzten standardmäßig bei jedem durchgeführten Shift Poly (dI-dC). Zwei weitere Kompetitoren, SP1 und AP2 (siehe 3.3.3.), führten zu einer weiteren Reduzierung unerwünschter Interaktionen und damit der Bandenanzahl. Die Wahl der DNA-Länge, die zur Bindung in den Shifts angeboten wird, hat ebenfalls Einfluss auf die Anzahl der DNA-Protein-Wechselwirkungen.

Goldstandard zur Charakterisierung einer bestimmten Bande in der Gelretardierung, stellt letztendlich der „Supershift“ dar. Hierbei kommen gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper zum Einsatz. Dies führt, aufgrund einer Molekulargewichtszunahme des neu entstandenen Komplexes, zu einem divergierenden Wanderungsverhalten und damit einer noch weiter retardierten Wanderungsgeschwindigkeit einer zuvor beobachteten Bande.

Sensitivität dieser Methode

Die Sensitivität dieser Gelretardierungsversuche zu erhöhen, bedeutet zu verhindern, dass DNA-Protein-Wechselwirkungen in den Gelretardierungsversuchen übersehen werden. Dabei ist entscheidend zu vermeiden, dass aufgrund ungeeigneter Pufferbedingungen oder Reagenzien in der Versuchskette, ein spezifisches Protein daran gehindert wird, zu interagieren. Dies bedeutet, dass eine nicht vorhandene Bande im Gel fälschlicherweise als physiologisch nicht stattfindende Bindung interpretiert wird.

Planung und Durchführung des EMSA

Die Durchführung eines EMSA erfolgt in drei wesentlichen Schritten:

- PCR von Teilbereichen genomischer DNA oder eines Plasmids
- Radioaktive Endmarkierung der PCR-Produkte
- Durchführung der Gelretardierungsversuche - Wahl der EMSA Technik

Den ersten Schritt zur Durchführung des EMSA stellt die *Auswahl einer geeigneten DNA Sequenz* dar, die auf ihre Proteinbindungsfähigkeit hin überprüft werden soll.

Bei der Auswahl der DNA-Fragmentgröße, d.h. der Bindungsplattform, ist zu überlegen, dass umso größer das DNA-Fragment ist, umso höher wird die Anzahl der stattfindenden spezifischen und unspezifischen Proteinbindungsreaktionen sein. Ist der gewünschte DNA Bereich definiert, besteht mit Hilfe der PCR eine einfach durchzuführende Technik, um diesen Teilbereich zu amplifizieren (siehe 2.3.2).

Den zweiten Schritt stellt die *radioaktive Endmarkierung* der zuvor amplifizierten DNA-Abschnitte dar (siehe 2.3.5). Zu diesem Zweck wird das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.3.3). Die resultierende Bande kann unter einer UV-Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten werden (siehe 2.3.4). Dies erfolgt, um zu verhindern, dass DNA-Abschnitte divergierender Länge in den nachfolgenden Versuchsschritten verwendet werden. Die DNA kann nun aus dem Gel extrahiert und in nachfolgenden Schritten mit 32 P radioaktiv markiert werden (siehe 2.3.5).

Den dritten Schritt stellt die eigentliche *Durchführung des Gelretardierungsversuches* in Abhängigkeit von der Wahl eines bestimmten EMSA Protokoll und die Festlegung bestimmter Variablen dar. Dies sind die Schritte, welche die meiste strategische Planung erfordern. So kann man sagen, dass kein Protokoll existiert, welches optimal für alle Proteine funktioniert. Desweiteren bestehen zahlreiche Variable, deren Veränderung zu einer Beeinflussung der Bindungsbedingungen für ein bestimmtes Protein führen kann.

Zentrale Variable, die am Basisprotokoll verändert werden können, stellen dar:

- das Design des DNA-Fragments
- die Bindungsreaktionsbedingungen
- die Auswahl geeigneter Kompetitoren
- die Gelelektrophoresebedingungen

Zum *Design des DNA-Fragments* siehe den ersten Schritt der strategischen Planung.

Die *Bindungsreaktionsbedingungen* werden beispielsweise beeinflusst von der Wahl des Bindungspuffers und somit von Ionenstärke und pH-Wert, in dem die DNA-Protein-Bindung stattfindet. Wird ein Proteinextrakt verwendet, können auch die Puffer die zur Herstellung des Extrakts verwendet wurden, die für die Bindungsreaktion benötigten Salz-, Puffer- und pH-Bedingungen dahingehend verändern, dass sich das Ergebnis ändert. Einige Proteine sind auf die Anwesenheit bestimmter Ionen angewiesen, beispielsweise wie in unserem Fall das Zinkfingerprotein CTCF auf die Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen.

Die *Auswahl geeigneter Kompetitoren* stellt einen ganz wesentlichen Punkt dar. So existieren zahlreiche spezifische und unspezifische Kompetitoren, die es letztendlich erst ermöglichen, dass definierte Banden in der autoradiographischen Darstellung des EMSA-Gels sichtbar werden. Klassische unspezifische Kompetitoren stellen Poly (dI-dC) und aus Lachssperma gewonnene DNA dar. Je nach Fragestellung und Interaktionsfreude des untersuchten Proteinextraktes ist die Verwendung dieser klassischen Kompetitoren jedoch nicht ausreichend und erfordert den Einsatz von Kompetitoren, die je nach Proteinquelle und Proteinbindungsstrukturen auf dem verwendeten DNA-Fragment neu bestimmt werden müssen. Die *Gelelektrophoresebedingungen* stellen einen weiteren kritischen Punkt dar. Hierbei zu beachten sind die Konzentration des verwendeten Polyacrylamidgels (4% bis 5%), das Acrylamid-Bisacrylamid Verhältnis, die Polymerisationszeit des Gels (>24h), die gewählten Laufpufferbedingungen und angelegte Spannung und Laufdauer der Elektrophorese. So kann man sagen, dass zwar ein Basisprotokoll für die Durchführung des EMSA existiert, die Möglichkeiten der Variation allerdings hoch sind und jeweils individuell

definiert werden müssen. Das Basisprotokoll erlaubt Aussagen über die Höhe der Affinität, Häufigkeit und Bindungsspezifität von DNA-bindenden Proteinen an eine bestimmte DNA-Sequenz. Daneben existieren verschiedene Abwandlungen des Basisprotokolls, die der Beantwortung weiterer Fragestellung dienen.

Etablierte Modifikationen des Basisprotokolls stellen dar:

- Kompetitor Assay
- Antikörper „Supershift“ Assay

Der *Kompetitor Assay* dient der Beantwortung der Frage, ob eine Protein-DNA-Bindung spezifisch oder unspezifisch stattfindet. Den wohl geeignetsten Kompetitor stellen mit der verwendeten DNA-Probe identische DNA-Fragmente dar, in denen die DNA-Sequenz der Proteinbindungsstelle in einzelnen Basen gezielt mutiert wurde. Durch Verwendung dieses Kompetitors mit gezielt mutierter Bindungsstelle sollten alle Proteinbindungen, mit Ausnahme der gezielt untersuchten Protein-DNA-Bindung, abgefangen werden. Eine weitere sinnvolle Modifikation des Basisprotokolls stellt die Durchführung eines Antikörper-„*Supershift*“-Assay dar. Er dient vor allem dazu, Proteine die an einem Protein-DNA-Komplex beteiligt sind, zu identifizieren. Die Durchführung des EMSA mit Antikörpern kann abhängig von dem Zeitpunkt der Zugabe des Antikörpers mehrere Konsequenzen haben:

- Das Protein, welches von dem Antikörper erkannt wird, ist nicht an der Ausbildung des Komplexes beteiligt. Folglich hat die Zugabe des Antikörpers keinen Einfluss auf das Wanderungsverhalten.
- Der Antikörper erkennt ein bereits an die DNA gebundenes Protein und führt zu einer Retardierung der Wanderungsgeschwindigkeit einer oder mehrerer Banden.
- Der Antikörper erkennt das noch ungebundene Protein und beeinflusst die Protein-DNA-Interaktion möglicherweise dahingehend, dass eine nachfolgende DNA Bindung verhindert wird.

Mit Hilfe des Antikörper „Supershift“ Assay sind letztendlich die aussagekräftigsten Aussagen, ob ein bestimmtes Protein an der Ausbildung eines beobachteten Protein-DNA-Komplexes beteiligt ist, möglich. Entsprechenden der getroffenen Aussagen sind neben der Planung einige Vorarbeiten für die Durchführung der EMSA's notwendig.

3.2.1 Auswahl geeigneter PCR Bereiche

Aus methodischen Gründen ist es sehr schwer, eine genaue Eingrenzung des Beginns und des Endes einer DNase I-hypersensitiven Region relativ zur DNA-Sequenz eines bestimmten DNA-Abschnittes zu bestimmen. Deshalb verlängert man den durch Vergleich der Wanderungstrecken der Fragmente nach DNase I-Spaltung mit einem Längenstandard erhaltenen Bereich auf beiden Seiten um 60-100 bp. Dadurch wird verhindert, dass kleinere Fehler, wie sie bei Vergleichen der elektrophoretischen Auftrennung von derartigen Fragmentgemischen (die als DNase I HSS erst durch Hybridisierung innerhalb eines Kontinuums von genomischen Fragmenten sichtbar gemacht werden können) mit einem definierten DNA-Längenstandard auftreten können, sich auf anschließende funktionelle Tests auswirken. Diesen Überlegungen wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Auswahl der Oligonukleotide für die PCR Rechnung getragen (siehe Abb. 10). Zusätzlich musste darauf geachtet werden, dass jeweils beide in einer PCR eingesetzten Oligonukleotide eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen, um PCR-Artefakte zu vermeiden. Dabei ergaben sich die in Abbildung 10 eingezeichneten Oligonukleotide, die eine Region von 339 bp (HSS-4), 472 bp (HSS-5) beziehungsweise 610 bp (HSS-6) amplifizieren. HSS-6 besteht aus zwei durch circa 150 bp getrennten Bereichen. Für die ersten Versuche wurden beide Bereiche als zusammengehörend betrachtet und als ein 610 bp großes Fragment amplifiziert.

HSS-5

88081 TAAACTGCCTGAGCCTTAGTTTCCCAATCCTTGTCATTAAATGGTCACTGTGCCACTGG 88140
 ATTTGACGGACTCGGAATCAAAGGGTTAGGAACAGTAATTTACCAGTGACACGGGTGACC

HSS-5/1

88141 TGTGCTGGGAAAAGTTAACAACATAACAGAGTAGCAAGGGCGGTGGGAGTCCTAATTTGT 88200
 ACACGACCCTTTTCAAATTGTTGATTGTCTCATCGTTCCCGCCACCCTCAGGATTAACA

88201 AGCATTGCCCATTTCATGGTATAAATAATCCCACCATGGCTGATTTCAAGCTACCAAG 88260
 TCGTAAACGGGTAAAGGTACCATATTTATTAGGGTGGTACCAGTAAAGTTCGATGGTTC

88261 GTGCCCCACTGAACACAGAGTTGGGAAGAGATGCTCTTAAATCATCAGCTCTCCTGAGCT 88320
 CACGGGGTGACTTGTGTCTCAACCCTTCTCTACGAGAATTTAGTAGTCGAGAGGACTCGA

HSS-5

88321 GGTGCAAGCCAGTTGCGGGACACCCTGGGCTTTTTGCAACCCTGTTTCTTAATTCTCAG 88380
 CCACGTTTCGGTCAACGCCCTGTGGTGACCCGAAAAACGTTGGGACAAAGAATTAAGAGTC

88381 TTCTGGGCAGGCTGTAGTCGCCTCCCGTGCTTCTGTACAAGTAGACAGCGACATCTGGT 88440
 AAGACCCGTCGACATCAGCGGAGGGGCACGAAGACATGTTTCATCTGTCGCTGTAGACCA

HSS-5

88441 GGCAAAGTCAAGCAAATCCCAGACCATGTAGAGAAGGGCCTAGAGTATGGGAAAACAAGA 88500
 CCGTTTCAGTTCGTTTAGGGTCTGGTACATCTCTTCCCGGATCTCATACCCTTTTGTCT

88501 AACACCCTCTTCTCCACCAGCACCCCCACGAAAGGTTCCGTGCCTCTTCCTCAACCAA 88560
 TTGTGGGGAGAAGAGGGTGGTCGTGGGGTGCTTTCCAAGGACAGGAGAAGGAGTTGGTT

88561 CCCTGGGACCCATCAACTCCAGCAAAAACCTCAATGCCTGGGGAGTTCTACATGGGCAGC 88620
 GGGACCCTGGGTAGTTGAGGTCGTTTTTGTAGTTACGGACCCCTCAAGGATGTACCCGTCG

88621 CTGCAGGTCTCCCTTCCCTGTGGCAGCTGGGGTAGAGTGGCATGGCTCCTGGTGTGGAAAT 88680
 GACGTCCAGAGGGAAGGACACCGTCGACCCCATCTCACCGTACCGAGGACCACAACCTTA

HSS-5/2

88681 AAGCAGTGACCTCGTACAGCAGTCATTTCCACTGCCTGCCTGCAGACCCCTTGCCCTTACC 88740
 TTCGTCACCTGGAGCATGTCGTGAGTAAGGGTGACGGACGGACGTCCTGGGAAACGGAATGG

HSS-6

91501 ATGCCAGCCAACAGCCTGTGGACATGGATGCAGATTGACTATTCCAGCCCCCTCAGTGAAC 91560
TACGGTTCGGTTGTTCGGACACCTGTACCTACGTCTAACTGATAAGGTCGGGGAGTCACTTG

HSS6/1

91561 AAGCTCCAAGTGTGTTTCCTTGTAAGCAGTTATACAGGTCAAAAATCACTTCATCACAA 91620
TTCGAGGTTACACAAAGGAACATTTTCGTCAATATGTCCAGTTTTTAGTGAAGTAGTGTT

91621 ATGAAATACGGTCAAACCTACCACAAAACACAGGGCTAAAATATCTCATCACCGGAGGGTG 91680
TACTTTATGCCAGTTTGATGGTGTGTTTGTGTCCCGATTTTATAGAGTAGTGGCCTCCAC

91681 CCAGAGACCACCAAATATAATCCAGATTCAAGGCAGTCCATGTGAAAATGCCCACCAGG 91740
GGTCTCTGGTGGTTTATATTAGGTCTAAGTTCGGTCAGGTACACTTTTAACGGGTGGTCC

HSS-6

91741 TGGCGGAAATGCAGGGAGACGGCCAGCATGTACAGATAAATTTGTTTCCCGGGTCCACACA 91800
ACCGCCTTTACGTCCCTCTGCCGGTCTGACATGTCTATTAACAAGGGCCAGGTGTGT

HSS-6

91801 TTATCTGATGAGAGTGAATCTGACCCTAGAAGAGAACTACACAACACTTGGTTGCATTA 91860
AATAGACTACTCTCACTTAGACTGGGATCTTCTCTTGATGTGTTGATGAACCAACGTAAT

91861 GGGTTCAACAAGACTGTGCAGCTCCAAAAATTTCTCAAAAAGGTCAAATCCAAGTAACAA 91920
CCCAAGTTGTTCTGACACGTGCGAGGTTTTTAAGAGTTTTTCCAGTTTAGGTTTCATTGTT

91921 GGGTTTTAGCCTATGAACCAAGGTGTGGCTAGAGAAAAGATTGTTTGAATTTGAAAAGAA 91980
CCCAAAATCGGATACTTGGTTCCACACCGATCTCTTTTCTAACAACCTTAACTTTTCTT

HSS-6

91981 GCTAGGAGGTTGACTCACTGGGGCATCTATCCTTGAGTCTTCTGTCAGTGGGAGGCAGAG 92040
CGATCCTCCAACCTGAGTGACCCCGTAGATAGGAACCTCAGAAGGACGTCACCCTCCGTCTC

92041 TGAGCGGTGAGCTGGGCATCCACATCTAGAGTGTGAAAACCTCCTGGGGGTGGAGACGG 92100
ACTCGCCAGTCGACCCGTAGGTGTAGATCTCACAACCTTTGGAGGACCCCCACCTCTGCC

HSS-6

92101 GGGACTTCCACTTCCAGAATGGGCAATGTGTGTGTGTATAAAATATTTAAGATATATGT 92160
CCCTGAAGGTGAAGTCTTACCCGTTAACACACACACATATTTATAAATTCTATATACA

92161 ATTTATTTAAAGTCTCTAGAAATGGCCTTAGGGCATAACAGCAAATAAAAAACATTTAAT 92220
TAAATAAATTTAGAGATCTTTACCGGAATCCCGTATGTCGTTTATTTTTTGTAAATTA

HSS6/2

Zu Beginn dieser Arbeit wurden für die Gelretardierungsversuche als DNA-Proben die gesamten HSS-4, -5 und -6 verwendet. Größe und DNA-Sequenz der entsprechenden DNA-Proben, sowie die verwendeten Primer, sind der Abbildung 10 zu entnehmen. Erst im Verlauf der Versuche wurde das Interesse auf einen Teilbereiche der HSS-6, das HSS-6/18er Fragment fokussiert.

3.2.1.1 Darstellung der PCR-Bedingungen

Für einen interpretierbaren EMSA ist es unerlässlich, ein homogenes Ausgangsmaterial (DNA) zu haben, da nach der radioaktiven Markierung selbst kleinere Fragmente im Autoradiogramm sichtbar werden und die Interpretation der retardierten Bande unmöglich machen können. Normalerweise trägt man dem durch die Benutzung synthetischer Oligonukleotide (Strang und Gegenstrang) definierter Länge Rechnung. Dies ist bei einer wie hier geplanten Untersuchung nur mit erheblichem Aufwand und Kosten möglich. Benutzt man allerdings PCR-Fragmente, die man nach der Amplifikation radioaktiv endmarkiert, so müssen einige Vorkehrungen getroffen werden, um das Entstehen von Artefakten durch Abbruchbanden zu verhindern.

Bei der Durchführung der PCR gingen wir generell nach der Warmstart Methode vor. Dies bedeutet, dass erst nachdem der Reaktionsansatz im PCR-Gerät eine Temperatur von 94°C erreicht hatte, die 2,5 U Taq-DNA Polymerase dem Reaktionsansatz beigefügt wurden. So sollte vermieden werden, dass Primer, die sich bei niedrigeren Temperaturen eventuell nicht exakt komplementär zu ihrer eigentlichen Zielsequenz angelagert haben, artifiziell als Elongationsursprung genutzt werden. Das Risiko einer unspezifischen Amplifikation ließ sich dadurch deutlich reduzieren.

Bei der Auswahl geeigneter PCR-Bedingungen waren einige Parameter zu beachten:

- Anlagerungstemperatur der Primer
- Denaturierungszeit
- Extensionszeit
- Zykluszahl
- Template (Matrize)

Die *Anlagerungstemperatur* sollte zwischen 55°C und 70°C liegen.

Grund hierfür ist vor allem ein Vermeiden unspezifischer Primeranlagerung an nicht hinsichtlich ihrer Sequenz exakt komplementäre DNA-Bereiche. Ebenfalls sollte vermieden werden, dass der Temperaturbereich schon im Temperaturoptimum des arbeitenden Enzyms liegt. Dieser wäre mit 72°C für die Taq-DNA Polymerase erreicht und entspricht der Extensionstemperatur.

Als Orientierungshilfe war uns folgende Faustformel behilflich, welche die optimale Anlagerungstemperatur aus dem G/C und A/T Verhältnis berechnet:

Anlagerungstemperatur = $4x$ (Summe der G- und C-Reste) + $2x$ (Summe der A- und T-Reste) [°C].

Die *Denaturierungszeit* sollte möglichst kurz sein, vor allem um eine Schädigung des Enzyms zu vermeiden.

Die *Extensionszeit* ist vor allem von der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Bereichs abhängig.

Die *Zykluszahl* liegt standardgemäß zwischen 25 und 35 Zyklen.

Bei zu geringen Zykluszahlen besteht die Möglichkeit einer zu geringen Ausbeute an PCR-Produkt. Dahingegen erhöhen zu hohe Zykluszahlen die Gefahr, dass sich Artefakte anhäufen.

Als *Template* (DNA-Matrize) für die PCR wurde nicht genomische DNA, sondern zuvor in der Arbeitsgruppe klonierte Plasmide verwendet. Dies sollte die Artefaktbildung, wie sie bei der Benutzung von genomischer DNA als Ausgangsmaterial für die PCR auftreten würde, weiter reduzieren.

3.2.1.2 PCR der HSS-4, -5 und -6

Als Matrize für HSS-4, -5 und -6 diente das Cosmid cos 2132/39. Dies stand schon zu Beginn dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe bereit. Als Enzym für die Replikation wurde eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase verwendet. Diese DNA-Polymerase wurde ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert.

Das PCR-Profil der HSS-4, -5 und -6 wurde mit einer Zykluszahl von 35 Zyklen durchgeführt. Die Suche nach geeigneten Primerpaaren für die gesamten HSS-Bereiche war durch Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe deutlich erleichtert. Die Bestimmung einer geeigneten Annealingtemperatur erfolgte durch Ausprobieren unterschiedlicher Temperaturbereiche und Begutachtung des jeweiligen Resultates. Ein optimales

Ergebnis lieferte eine Anlagerungstemperatur von 55 °C. Parameter zur Beurteilung des Erfolges der durchgeführten PCR waren vor allem Schärfe und Intensität der Bande und das Nichtvorhandensein von weiteren artifiziellen Banden im Agarosegel.

Die weitere erfolgreiche Durchführung der Gelretardierungsversuche hängt in ganz wesentlichem Maße davon ab, ob es möglich ist, DNA-Fragmente exakt einer Länge aus den Agarosegelen zu isolieren. Dies ist somit nur möglich, wenn geeignete PCR-Bedingungen gewählt worden sind und sich dementsprechend nur eine Bande der erwarteten Größe unter UV-Licht abbildet, die dann ausgeschnitten werden kann (siehe Abb. 11).

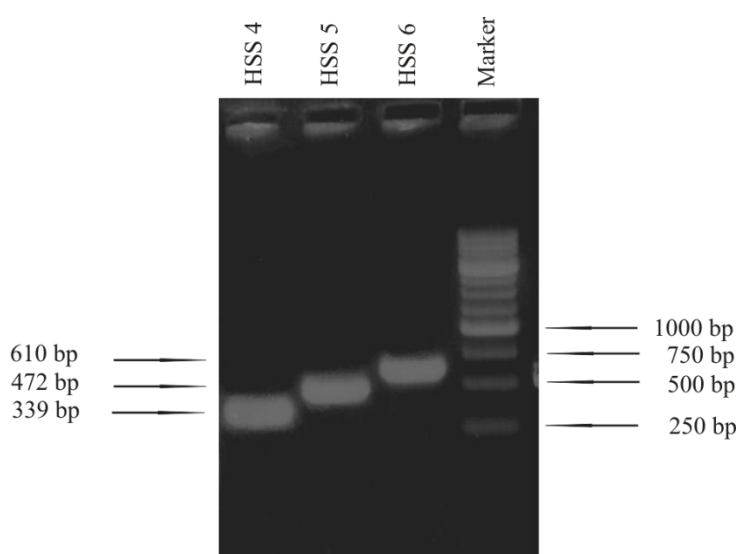


Abb. 11: PCR der HSS-4, -5 und -6

Zu erkennen sind von links nach rechts die HSS-4, -5 und -6. Ganz rechts außen läuft der 250 bp Marker.

3.2.1.3 Aufreinigung des PCR-Produktes

Bei der PCR kann es zu einer Reihe von Artefakten kommen, die eine verlässliche Durchführung eines EMSA behindern können. Gründe hierfür können nicht optimale Anlagerungstemperaturen sein. Dies kann beispielsweise nach irregulärem Startpunkt (inkorrekt, nicht komplementär angelagertes Oligonukleotid) zu in ihrer Länge divergierenden, artifiziellen DNA-Fragmenten führen.

Um zu vermeiden, dass auch diese fehlerhaften PCR-Produkte mittels Polynukleotidkinase markiert werden und das Ergebnis der Gelelektrophorese verfälschen, wurden die PCR-Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel

ausgeschnitten und aufgereinigt. Das exakte Ausschneiden wurde durch die Anwesenheit des Interkalans Ethidiumbromid ermöglicht. Dies war sowohl in dem Laufpuffer als auch den Gelen selbst vorhanden und lagert sich während der Elektrophorese in die DNA ein. Dies ermöglicht unter UV Licht eine exakte Bestimmung der Position der DNA im Gel. Mit Hilfe eines QIAquick Gel Extraktion Kit konnte die DNA nun entsprechend dem Anwenderprotokoll aus den Gelfragmenten extrahiert werden. Zusätzlich führte dies zur Entfernung von noch vorhandenen Primerresten und nicht eingebauten Nukleotiden aus dem ursprünglichen PCR-Reaktionsansatz.

Um sicher zu sein, dass vergleichbare quantitative Mengen DNA in den verschiedenen EMSA's zum Einsatz kommen und um zu vermeiden, dass nach jeder PCR und nachfolgender Fragmentaufreinigung Kompetitoren und Zellkernextrakt neu titriert werden müssen, wurde die Konzentration der DNA durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

3.2.1.4 Radioaktive Endmarkierung der PCR-Produkte

Zur radioaktiven Markierung der gereinigten PCR-Fragmente verwendeten wir eine T4-Polynukleotidkinase (PNK) (zur Durchführung siehe 2.3.5). Dieses Enzym katalysiert den Transfer terminaler Phosphatgruppen von ATP (γ [32 P]; > 6000 Ci/mmol) auf das 5'-OH-Ende der DNA. Nicht gebundene Nukleotide konnten mittels Sephadex G-25 Säulen (Roche Diagnostics) entfernt werden. Die so erfolgte radioaktive Markierung ist wiederum Voraussetzung, um die Position der DNA-Proben in den nachfolgenden Versuchen autoradiographisch sichtbar machen zu können.

3.2.2 Proteinquelle für die EMSA

Prinzipiell können für die Durchführung von EMSA sowohl gereinigte Proteine als auch Proteingemische, beispielsweise aus Zellkernextrakten (NE), verwendet werden. Die Herstellung von Zellkernextrakten stellt dabei sicherlich einen vor allem schnellen und einfachen Weg dar, um zu einem bestimmten Protein zu gelangen. Voraussetzung für die Eignung der Methode ist natürlich, dass die zur Verfügung stehende Zelllinie das gewünschte Protein exprimiert.

3.2.2.1 Präparation von Zellkernextrakten

Es ist bekannt, dass CTCF in allen bisher daraufhin untersuchten Zelllinien konstitutiv exprimiert wird (Lobanenkov et al., 1990). So sollte es möglich sein, durch die Herstellung von Zellkernextrakten aus jeder der zur Verfügung stehenden Zelllinien, an ausreichende Mengen des Proteins zu gelangen.

Für die Herstellung von Zellkernextrakten orientierten wir uns an der Schnellmethode nach Schreiber (Schreiber et al., 1989) (siehe 2.3.7). Maßgeblich bei der Wahl der Methode war, dass sie relativ einfach und schnell durchzuführen sein musste und dass dafür relativ geringe Zellmengen benötigt werden. Bei Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Gelretardierungsversuche erfolgreich mit solchermaßen präparierten Zellkernextrakten durchgeführt werden können. So konnte die Arbeitsgruppe H.-G. Klobeck NFκB-Bindungsstellen im Bereich des humanen Immunglobulin-λ Enhancers (HSS-1,-2 und -3) mit Zellkernextrakten nach Schreiber et al. und Gelretardierungsversuchen identifizieren (Combriato and Klobeck, 2002). Einen kritischen Punkt bei der Bewertung der ausgewählten Methode stellt die Möglichkeit dar, dass bei der Präparation eine Kontamination durch zytosolische Proteine möglich ist. Einen weiteren kritischen Punkt stellt die fehlende Aufreinigung des Proteins dar. So handelt es sich um eine Vielzahl unterschiedlicher nukleärer Proteine, die am Ende für die nachfolgenden Gelretardierungsversuche (EMSA) verwendet werden. Desweiteren ist es möglich, dass ein großes und aus unterschiedlichen Domänen bestehendes Protein wie CTCF durch endogene Proteasen anverdaut oder gänzlich abgebaut wird. So erfolgte die Herstellung der Zellkernextrakte im Kühlraum bei 4°C auf Eis und die Aufbewahrung der Zellkernextrakte aliquotiert in Eppendorfgläsern bei -70°C. Der Schritt des Abpipettierens zytosolischer Bestandteile erfolgte ausgesprochen sorgfältig, um den Anteil an zytosolischen Proteinen, die in späteren Versuchen unerwünscht interagieren könnten, möglichst gering zu halten. Dass eine „Kontamination“ mit unerwünschten Proteinen und entsprechende nachfolgende Interaktionen aufgrund dieses Protokolls trotz sorgfältigsten Arbeitens nicht vollständig vermieden werden können, wurde toleriert. Für die Herstellung der Zellkernextrakte standen uns in der Arbeitsgruppe aus vorherigen Arbeiten bereits unterschiedliche Zelllinien zur Verfügung (siehe 2.2.5). Ebenfalls waren die Arbeit und der Umgang mit Zelllinien in der Arbeitsgruppe bereits etabliert.

3.2.2.2 Nachweis von CTCF mit Hilfe von α -CTCF Antikörpern in verschiedenen Zellkernextrakten

Zum Nachweis von CTCF in den verschiedenen Zellkernextrakten führten wir Westernblots durch. Dabei setzten wir den CTCF-Antikörper (C-20) von Santa Cruz Biotechnology, Inc. als Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/0.1% Tween 20/5% Milchpulver ein (zur Durchführung des Westernblots siehe 2.3.8). Bei dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper handelte es sich um ein gegen Ziegenantikörper gerichteten Affen-Antikörper der IgG-Klasse. Diesen setzten wir in einer Verdünnung von 1:10 000 ebenfalls in PBS/0.1% Tween 20/5% Milchpulver ein. Hierdurch ließ sich zeigen, dass in Zellkernextrakten aus sämtlichen verwendeten Zelllinien (MN 60, REH und CCRF-CEM) CTCF nachweisbar war (siehe Abb. 12).

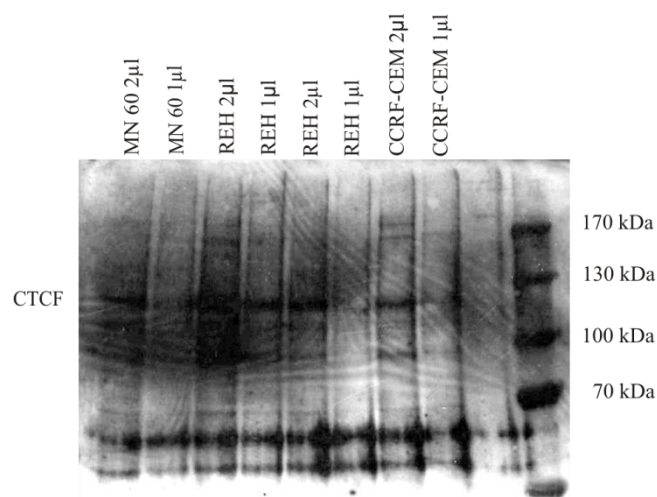


Abb. 12: Nachweis von CTCF in Zellkernextrakten aus verschiedenen Zelllinien

Zur Darstellung kommt ein Westernblot, bei dem der Nachweis von CTCF in Zellkernextrakten aus MN60, REH und CCRF-CEM Zellen gelang. Bei dem detektierenden Primärantikörper handelt es sich um einen CTCF-Antikörper (C-20) von Santa Cruz Biotechnology, Inc. Die CTCF-Bande befindet sich in einem Größenbereich von ungefähr 130 kDa. Aufgetragen wurden jeweils 2 und 1 μ l Zellkernextrakt.

In weiteren durchgeführten Westernblots ließ sich in den aus BJAB-Zellen angefertigten Zellkernextrakten ebenfalls die Anwesenheit von CTCF nachweisen (siehe Abb. 13). Dabei fand sowohl ein (C-20)-, als auch ein (N-17)-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Inc. Verwendung.

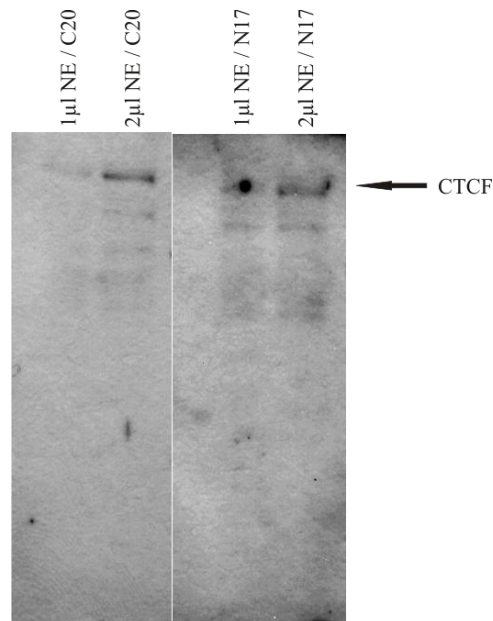


Abb. 13: Nachweis von CTCF in BJAB-Zellkernextrakt

Zur Darstellung kommt ein Westernblot, bei dem der Nachweis von CTCF in Zellkernextrakten aus BJAB erfolgte. Bei dem detektierenden Antikörper handelt es sich bei den linken zwei Bahnen um den CTCF (C-20)-, bei den rechten zwei Bahnen um den CTCF (N-17)-Antikörper von Santa Cruz. Biotechnology, Inc.. In der pro verwendeten Antikörper jeweils linken Bahn wurde 1 µl Zellkernextrakt aufgetragen. Die CTCF-Bande wird erst bei 2 µl aufgetragenem Zellkernextrakt gut erkennbar.

3.2.3 Kontrollen bei der Durchführung der EMSA

Als Kontrolle für die Durchführung der Gelretardierungsversuche war es geplant, mindestens ein DNA-Fragment mit bereits charakterisierter CTCF-Bindungsstelle in den Versuchen einzusetzen. Dabei erschien es notwendig, dass diese DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe ungefähr den PCR-Fragmente des HSS-4 bis -6 Bereiches entsprachen. Dies aus dem Grund, dass somit zu erwarten war, dass die eingesetzten Mengen an Kompetitoren und Zellkernextrakten übertragbar sein würden und die Wanderungsgeschwindigkeit ungefähr den DNase-I HSS's entspräche.

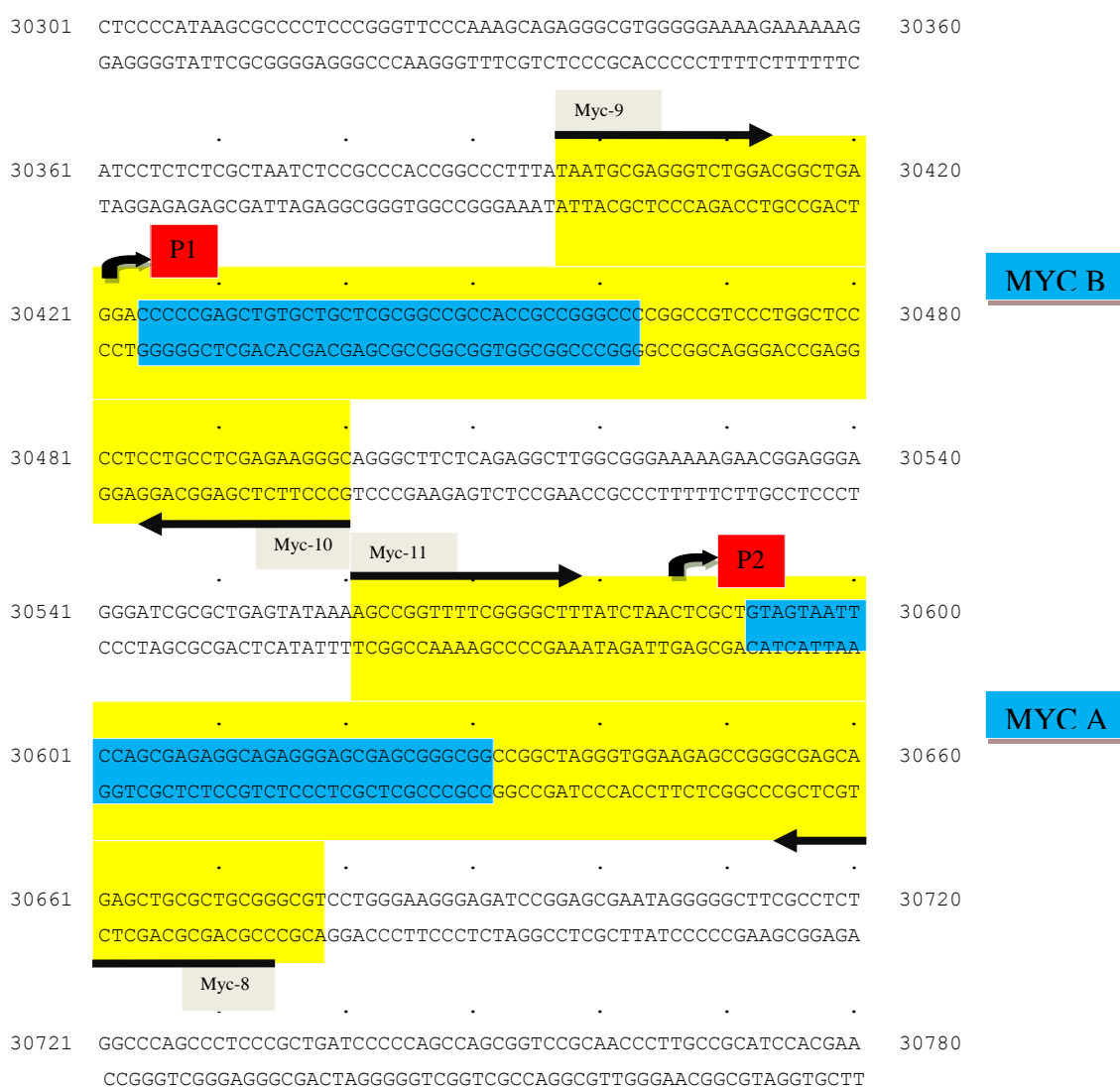
Somit boten sich zwei DNA-Fragmente aus dem c-myc Promotorbereich an: das Myc A- und das Myc B-Fragment. Mit einer Größe von 105 (Myc B) bzw. 115 bp (Myc A) entsprachen sie dem Anforderungsprofil (siehe Abb. 14). Beide sollten als Positivkontrolle bei der Durchführung der Gelretardierungsversuche mitgeführt werden.

3.2.3.1 CTCF-Bindungsstellen im Bereich des c-myc Promotorbereichs

Bei den Myc A- und Myc B-Fragmenten (Abb. 14) handelt es sich um zwei Abschnitte des c-myc Promotorbereichs, auf denen sich zwei CTCF-Bindungsstellen befinden (Lobanenkov et al., 1990; Lobanenkov et al., 1986; Klenova et al., 1993; Krumm et al., 1992; Gombert et al., 2003).

Abb. 14: c-myc Promotorbereiche

Dargestellt ist die aus zwei Bereichen bestehende DNA-Sequenz des c-myc-Promotorbereichs. Die CTCF-Bindungsstellen im jeweiligen Promotorbereich sind dabei mit blauen Kästen hinterlegt. Die gelb markierten Bereiche wurden in den Gelretardierungsversuchen als DNA-Probes verwendet. Lage und Orientierung der Primerpaare wurde durch schwarze Pfeile und Kästen gekennzeichnet.



Um diese beiden DNA-Fragmente als Kontrolle bei der Durchführung von Gelretardierungsversuchen verwenden zu können, mussten beide Bindungsstellen zuvor mittels PCR amplifiziert und in nachfolgenden Schritten aufgereinigt und radioaktiv markiert werden.

3.2.3.2 Amplifikation von Myc A- und Myc B-Fragmenten mit Hilfe der PCR

Als Matrize für die PCR der Myc-Bindungsstellen diente cos 2132/16. Dieses Cosmid war ebenfalls bereits aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die dabei verwendeten Primersequenzen sind Tab. 4 (siehe 2.3.2) und Abb. 14 zu entnehmen.

Die Auswahl der entsprechenden Oligos führte zu einer Größe des amplifizierten Myc A-Fragmentes von 115 bp. Das amplifizierte Myc B-Fragment ist mit einer Größe von 105 bp etwas kleiner (siehe Abb. 15). Bei der Auswahl der Oligonukleotide für die PCR wurde in Voraussicht auf die erforderliche Anlagerungstemperatur auf einen annähernd gleichen GC-Gehalt geachtet. Die Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur erfolgte, wie schon zuvor bei den HSS-Fragmenten, solange über ein Ausprobieren verschiedener Temperaturbereiche, bis ein optimales Ergebnis hinsichtlich Bandenschärfe und Intensität erreicht worden war. Es zeigte sich, dass eine Zykluszahl von 35 Zyklen und eine Anlagerungstemperatur von 60°C zu einem optimalen Ergebnis führten. Die Isolierung des PCR-Produktes aus dem Gel, die Aufreinigung und radioaktive Endmarkierung erfolgten wie bereits zuvor beschrieben (siehe 3.2.1.3 und 3.2.1.4).

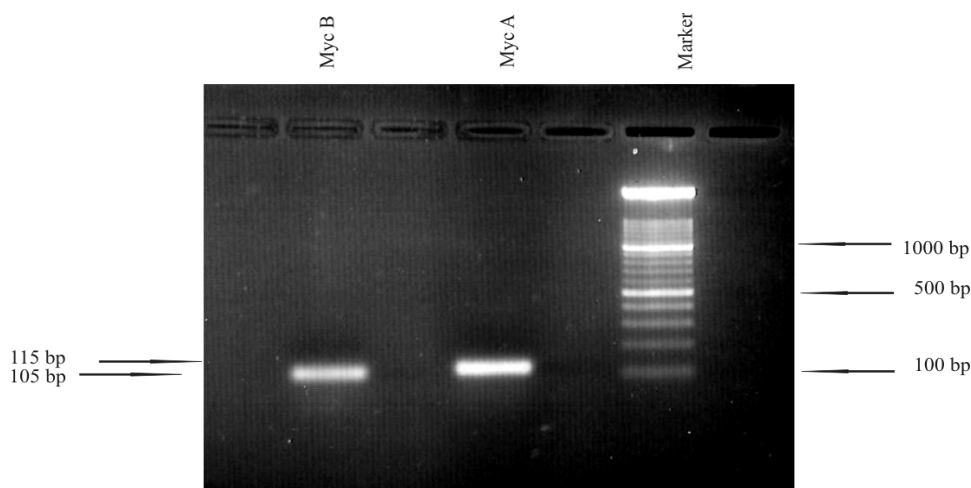


Abb. 15: PCR des Myc A- und Myc B-Fragmentes

In der Abbildung links ist das Myc B-Fragment mit einer Größe von 105 bp zu erkennen. Daneben rechts das Myc A-Fragment mit einer Größe von 115 bp. Ganz rechts wurde der 100 Bp-Marker aufgetragen.

3.3 Versuche zur Optimierung der EMSA-Bedingungen

HSS-4 hat eine Größe von 339 bp. Die HSS-5 ist 472 bp lang und HSS-6 besteht aus zwei getrennten, ungefähr 150 bp voneinander entfernt liegenden, hypersensitiven Bereichen mit einer Gesamtlänge von 610 bp. Dementsprechend handelt es sich jeweils um mehrere hundert Basenpaare große DNA-Fragmente, auf denen mit Gelretardierungsversuchen mögliche CTCF-Bindungsstellen identifiziert werden sollten. In einem ersten Schritt sollten anhand ansteigender Konzentrationen von Zellkernextrakten optimale Konzentrationsverhältnisse der Bindungspartner zueinander bestimmt werden. Bei Erreichen eines optimalen DNA-Protein-Verhältnisses sollten sich in der nachfolgenden autoradiographischen Darstellung die einzelnen Protein-DNA-Interaktionen als definierbare Banden abzeichnen lassen.

Die Vielfalt der stattfindenden Protein-DNA Interaktionen verhindert eine sinnvolle Interpretation der Versuchsergebnisse

Zu Beginn der Gelretardierungsversuche wurden jeweils die gesamten HSS-4, -5 und -6 als DNA-Probe eingesetzt. Als unspezifischen Kompetitor wurde Poly (dI-dC) verwendet und die Bindungsreaktion fand in dem Bindungspuffer nach Felsenfeld (Magdinier et al., 2004) statt (siehe 2.4.1.2). Bei den als Bindungspartner eingesetzten Proteinen handelt es sich um ein Gemisch aus zahlreichen nukleären Proteinen.

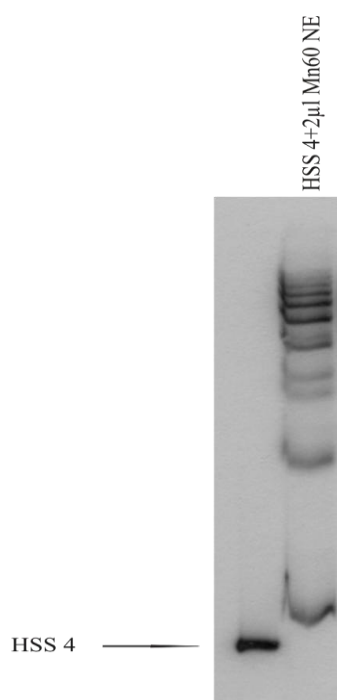


Abb. 16: Darstellung der Bandenvielfalt anhand eines EMSA mit der HSS-4

Der Gelretardierungsassay wurde mit der gesamten HSS-4 (339 bp), 2 µl Zellkernextrakt und 0.2 µg Poly (dI-dC) durchgeführt. Auf der Abbildung sind zahlreiche Protein-DNA-Banden zu erkennen.

Bei diesen Protein-DNA-Interaktionen handelt es sich möglicherweise um spezifische Bindungen, zu vermuten aufgrund der Schärfe und Reproduzierbarkeit des Bandenmusters. Eine Abgrenzung zu unspezifischen Interaktionen konnte von uns nicht getroffen werden. Links ist die freie DNA-Probe zu erkennen.

Dies führte dazu, dass eine sehr hohe Anzahl an DNA-Protein Interaktionen stattfand (siehe Abb. 16). Im Resultat führte dies zu einer sehr hohen Bandenanzahl.

Dies war sicherlich zum einen Folge der Größe der eingesetzten DNA-Fragmente, zum anderen der Entscheidung, Zellkernextrakte für die Gelretardierungsversuche zu verwenden. Die Größe von mehreren hundert Basenpaaren je HSS führt dazu, dass dem nukleären Proteingemisch eine sehr große Bindungsplattform angeboten wird, auf der sowohl spezifische als auch unspezifische DNA-Protein-Bindungen stattfinden können. Desweiteren könnte CTCF selbst zu der Bandenvielfalt beitragen, da dieses Protein mit zahlreichen nukleären Proteinen spezifisch interagiert (Wallace and Felsenfeld, 2007; Yusufzai et al., 2004; Chernukhin et al., 2000). Diese befinden sich sicherlich auch in dem zur Bindung angebotenen Zellkernextrakt. Einen dieser zentralen direkten Interaktionspartner stellt beispielsweise das Protein SIN3A dar (Lutz et al., 2000). Dabei handelt es sich um ein Protein, das wiederum selbst als Plattform für weitere Interaktionspartner funktioniert. Dabei dient SIN3A zum einen selbst als Korepressor, zum anderen verfügt es über die Möglichkeit, den Aufbau eines Histondeacetylasekomplexes zu initialisieren (Knoepfler and Eisenman, 1999). Eine weitere mögliche Erklärung für die Bandenanzahl könnte ein stattfindender proteolytischer Abbau von CTCF darstellen. Dabei würde ein Verlust des N- bzw. C-Terminus seine Funktion in einem biologischen System, aber möglicherweise nicht die DNA-Bindung in den Gelretardierungsassays beeinflussen, da diese Interaktion über eine zentrale DNA-Bindungsdomäne stattfindet. Würde der proteolytische Abbau weiter fortschreiten, könnte allerdings auch die DNA-Bindungsdomäne betroffen sein. Dies könnte ebenfalls zu weiteren Molekulargewichtsänderungen und somit einer veränderten Wanderungsgeschwindigkeit des Komplexes führen. Dies müsste aber nicht zwangsläufig die DNA-Bindung beeinflussen, da je nach Bindungsmotiv nicht sämtliche Zinkfinger benötigt werden. Falls die Bandenanzahl aufgrund eines Proteinüberschusses unspezifische Proteinbindungen widerspiegelt oder aber als Resultat der Interaktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren auftritt, müsste es möglich sein, durch die Auswahl und Titration geeigneter Kompetitoren und eine Optimierung der Bindungsbedingungen für CTCF die Bandenanzahl zu verringern oder letztendlich auf eine einzelne Bande zu reduzieren. Dementsprechend wurde das weitere Vorgehen bei den Versuchen gestaltet.

3.3.1 Titration des Kompetitors Poly (dI-dC) als Versuch einer Reduktion der DNA-Protein Interaktionen

Da die Banden zumindest zum Teil Folge unspezifischer Protein-DNA Interaktion sein könnten, wurde versucht dahingehend den Versuchsaufbau zu optimieren. Dazu wurde eine Titration mit ansteigenden Konzentrationen des unspezifischen Kompetitors Poly (dI-dC) durchgeführt (siehe Abb. 17). Bei Poly (dI-dC) handelt es sich um ein synthetisches Kopolymer, welches Proteinen eine unspezifische Bindungsplattform anbietet und damit verhindern soll, dass diese Proteine an die eigentliche DNA-Probe binden. Nachdem schon zu Beginn der Gelretardierungsversuche 2 μ l einer Poly (dI-dC) Stammlösung (100 μ g/ml) eingesetzt worden waren, wurde nun durch Titration dieses Kompetitors versucht die Bandenanzahl weiter zu reduzieren.

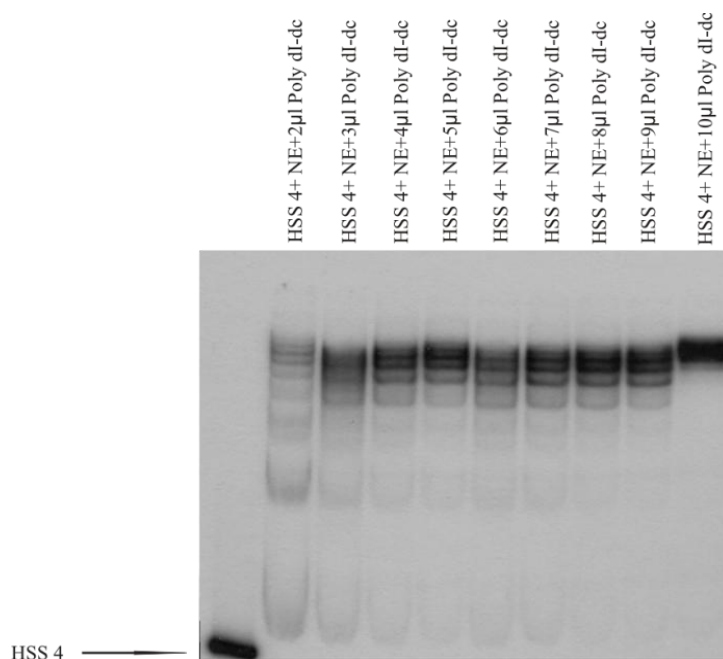


Abb. 17: Titration des Kompetitors Poly (dI-dC)

Dargestellt ist ein EMSA, in dem HSS-4 mit konstanten Konzentrationen eines Zellkernextraktes aufgetragen wurde. Die Menge des Kompetitors Poly (dI-dC) steigt nach rechts in 0.1 μ g Schritten an. Dies hat jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl der Banden. Die ganz linke Bahn zeigt die freie DNA-Probe. In der ganz rechten Bahn wird von der Abbildung der Eindruck erweckt, als ob eine Reduktion auf eine einzelne Bande stattgefunden hätte. Auf dem Original-Film ist jedoch zu erkennen, dass es lediglich zu einer Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit aller abgebildeten Banden bei konstanter Bandenanzahl gekommen ist.

Zur Durchführung wurde der Bindungsansatz auf Eis zusammenpipettiert und nach zehn Minuten das radioaktiv markierte DNA-Fragment, in diesem Versuch HSS-4, hinzugefügt. Nach 30 Minuten auf Eis wurde das Reaktionsgemisch aufgetragen und die Elektrophorese durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch, dass ansteigende Poly (dI-dC)-Konzentrationen zu keiner signifikanten Reduktion der Bandenzahl führen (siehe Abb. 17). Die Titration hatte ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf Schärfe und Abgrenzbarkeit der Banden.

3.3.2 Versuch CTCF als GST-CTCF-Fusionsprotein rekombinant herzustellen

Die Titration des Kompetitors Poly (dI-dC) mit dem Ziel einer Reduktion der Bandenzahl hatte nicht den gewünschten Erfolg gezeigt. Möglicherweise war die Verwendung von Zellkernextrakten bei den Gelretardierungsversuchen für die Bandenzahl ausschlaggebend. Bei den Extrakten handelt es sich um Proteingemische unterschiedlicher nukleärer Proteinfractionen, von denen einige anscheinend über direkte Interaktionen mit bereits an die DNA gebundenem CTCF, oder aber auch durch unspezifische und spezifische Interaktionen mit den DNA-Proben die Protein-DNA-Banden verursachen. So wurde versucht einen Weg zu finden, CTCF in isolierter Form bereit zu stellen. Tatsächlich besteht bei einigen Proteinen die Möglichkeit, diese rekombinant herzustellen. Die Voraussetzung hierfür besteht darin, dass die genetische Information über den Aufbau eines bestimmten Proteins über einen Vektor, beispielsweise in Form eines Plasmids, in ein neues Zellsystem eingeschleust werden kann. Dadurch wird es möglich, durch Ausnutzung des Proteinsynthese-Apparates eines fremden Organismus, das gewünschte Protein synthetisieren zu lassen. Hierfür wurde ein Plasmid konstruiert (siehe Abb. 18), welches zusätzlich zu dem Gen für das humane CTCF zwei weitere wesentliche Informationen enthielt. Zum einen die genetische Information über eine Ampicillinresistenz, welches die spätere Selektion der tatsächlich transformierten Zellen ermöglichen sollte. Zum anderen die genetische Information für die Glutathionyl-S-Transferase (GST), welches die Aufreinigung des Proteins aus dem Zelllysats über GST-Sepharosepartikel ermöglicht.

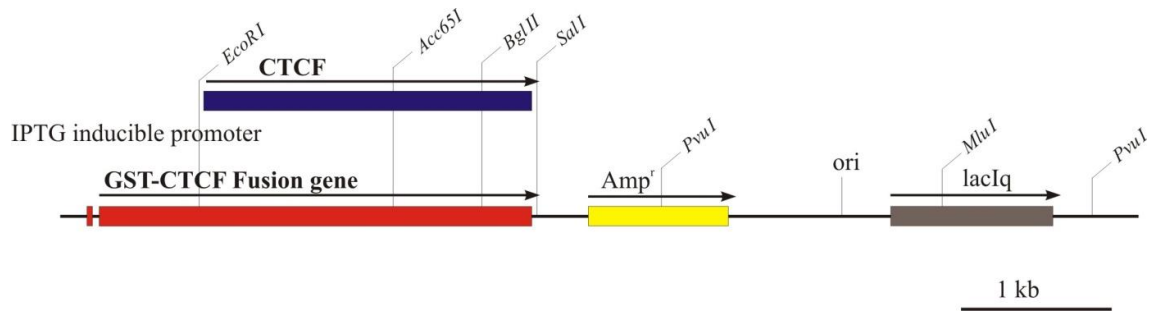


Abb. 18: Darstellung des Plasmids pGEX-4T1-CTCF

Zu erkennen ist, dass das Plasmid über ein GST-CTCF Fusionsgen (roter Balken), ein Gen für eine Ampicillinresistenz (gelber Balken) und den Lac-Repressor verfügt.

Die Steuerung der Proteinexpression kann bei solchen Konstrukten über die Induktion mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) erreicht werden. Dies war möglich, da dieses Plasmid zusätzlich über ein *lac*-Operon verfügte. IPTG wirkt hierbei als Aktivator des *lac*-Operons, indem es an den Repressor LacI bindet und damit dessen Wechselwirkung mit dem Operator inhibiert. Dadurch wird die Transkription des Plasmids initiiert. Außerdem wird IPTG im Gegensatz zur Laktose nicht im natürlichen Metabolismus von Bakterien verstoffwechselt. Dies gewährleistet zudem, dass seine Konzentration nach einmaliger Induktion während der Versuche konstant und das Gen in einem aktiven Zustand verbleibt. Als Zellsystem für Transfektion und Proteinexpression sollte der *E. coli* (*Escherichia coli*) Stamm BL-21 genutzt werden. Als wesentliches Problem bei der Herstellung von CTCF als GST-Fusionsprotein in *E. coli* stellte sich jedoch der hochgradige Abbau dar (siehe Abb. 19). Dieser erfolgte anscheinend schon intrazellulär und nicht erst während der Isolierung und Aufreinigung des Proteins. Dies wurde als wahrscheinliche Intoleranz des gewählten Organismus gegenüber dem Fremdprotein gewertet. Möglicherweise handelte es sich jedoch auch um zytotoxische Nebenwirkungen der in dem Organismus induzierten unphysiologischen CTCF-Konzentrationen. Dennoch wurden EMSA's mit isoliertem GST-CTCF Protein durchgeführt, zeigten jedoch keine Retardierung der Wanderungsgeschwindigkeit, was wahrscheinlich auf einen proteolytischen Abbau des Fusionsproteins zurückzuführen ist. Bei der Isolierung von GST-Fusionsproteinen mit GST-Sepharosepartikeln wurden möglicherweise hauptsächlich Fragmente aus dem N-Terminus von CTCF gereinigt, die aber keine Bindungsaktivität besitzen, da ihnen die Zinkfinger fehlen. Dies führte dazu, dass der Versuch CTCF rekombinant herzustellen,

nicht weiter verfolgt wurde. Stattdessen wurde versucht durch eine weitere Optimierung der Bindungspuffer und den Einsatz von spezifischen Kompetitoren die Zahl der Banden zu reduzieren.

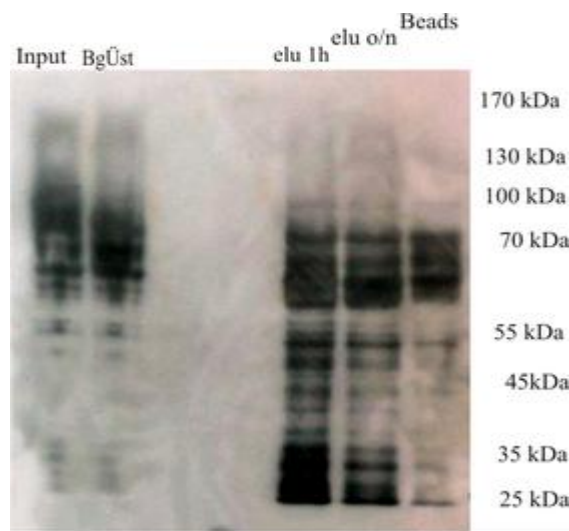


Abb. 19: Abbau des GST-CTCF-Fusionsproteins

In den Bahnen des dargestellten Wester-Blots sind Extrakte aus den verschiedenen Aufreinigungsschritten aufgetragen worden. Die Detektion erfolgte durch einen anti-GST-Antikörper. „Input“ bezeichnet dabei die Zellsuspension vor Zugabe der GST-Sepharosepartikel, BgÜst den Bindungsüberstand nach Zentrifugation der GST-Partikel. Zusätzlich wurde nach 1h („elu 1h“) und über nacht (elu o/n) eluiert und letztendlich auch die GST-Sepharosepartikel selbst aufgetragen.

3.3.3 Etablierung von zwei spezifischen Kompetitoren: SP-1 und AP-2

Seit Beginn der Gelretardierungsversuche war der Kompetitor Poly (dI-dC) eingesetzt worden. Durch Titration dieses Kompetitors ließ sich jedoch die Anzahl der auftretenden Banden nicht wesentlich reduzieren (siehe 3.3.1). Daher wurde entschieden, bei nachfolgenden Gelretardierungsversuchen zwei weitere Kompetitoren zu testen (Pugacheva et al., 2005) (siehe 3.3.3). Dabei handelte es sich um Oligonukleotide (Tab.6), die für die ubiquitären Transskriptionsfaktoren SP-1 und AP-2 Bindungsplattformen darstellten. Die Herstellung des SP-1-Kompetitors erfolgte durch das Zusammenfügen äquimolarer Mengen an einzelsträngigen SP-1 Oligo A und komplementären SP-1 Oligo B in jeweils 1 M Tris (pH 7.7). Eine Inkubation über 5 Minuten bei 95°C sollte falsch zusammengelagerte Oligos aufschmelzen und die Einzelsträngigkeit der vorliegenden DNA garantieren. Anschließend wurde der Reaktionsmix auf 4°C abgekühlt, was ein Zusammenfügen komplementärer SP-1

Oligos ermöglichte. Entsprechend wurde bei der Herstellung des AP-2 Kompetitors vorgegangen.

SP1-A	5' – ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC – 3'
SP1-B	5' –CGGGCTCGCCCCGCCCCGATCG – 3'
AP2-A	5' –ATTGATCGAACTGACCGCCCCGCGGCCCGT – 3'
AP2-B	5' –CGGACGGGCCCGCGGGCGGTTCAGTTCGATC – 3'

Tabelle 6: Sequenz der komplementären Oligonukleotide SP-1 und AP-2

Familie der SP-1-Transkriptionsfaktoren

SP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an das Konsensus-Motiv 5'-GGGGCGGGGC-3' bindet. Die Sequenzspezifität für diese GC-Boxen ist durch seine Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne vorgegeben. SP-1 gehört zu einer Gruppe von Faktoren, die nach Phosphorylierung an bestimmte Promotorbereiche binden (Kadonaga et al., 1987). Weitere Mitglieder dieser SP-Transkriptionsfaktorfamilie sind Sp-2, Sp-3 und Sp-4. Als Kompetitor für SP-1 setzten wir sein Konsensus-Motiv 5'-GGGGCGGGGC-3' in 10-100-fachem molarem Überschuss ein.

Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren

Das *activating enhancer-binding protein 2* (AP-2) wurde als ein 52 kDa großes DNA-Bindeprotein identifiziert, welches spezifisch an die DNA-Konsensus-Sequenz 5'-CCCCAGGC-3' bindet. Ursprünglich wurde es als Interaktionspartner von humanem Metallothionin IIa und von Promotorelementen des *simian virus 40* (SV 40) beschrieben (Mitchell et al., 1987). Es konnten bisher fünf Mitglieder der AP-2 Familie identifiziert werden: AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ , AP-2 δ und AP-2 ϵ (Oulad-Abdelghani et al., 1996; Buettner et al., 1994; Zhao et al., 2003; Werling and Schorle, 2002; Wang et al., 2004; Tummala et al., 2003). AP-2 Proteine regulieren eine Vielzahl unterschiedlicher Gene, unter anderem solche, die an Zellzyklusregulation und Zelldifferenzierung beteiligt sind. Als Kompetitor setzten wir GC-reiche DNA-Sequenzen (siehe Tab. 6) in 10-100-fachem molarem Überschuss ein (Hilger-Eversheim et al., 2000).

3.3.4 Veränderter Bindungspuffer mit ZnSO₄

Eine weitere Veränderung stellte die Durchführung der Bindungsreaktion mit einem veränderten Bindungspuffer dar (Pugacheva et al., 2005). Im Gegensatz zu dem bisher verwendeten Puffersystem verfügt dieser neue Bindungspuffer über 0.1 mM ZnSO₄ (siehe 2.4.1.2).

3.3.5 Die Kompetitoren AP-2 und SP-1 reduzieren unerwünschte Protein-DNA-Interaktionen

Bei den nun durchgeführten Gelretardierungsassays mit dem Myc A-Fragment ließ sich zeigen, dass die Verwendung des neuen ZnSO₄-haltigen Bindungspuffers und die Verwendung der neuen Kompetitoren zu einer Reduktion der Bandenzahl führen. Dabei war, wie bei den bisherigen Versuchen, in jedem Bindungsansatz Poly (dI-dC) bereits vorhanden und zusätzlich, wie Abbildung 20 zu entnehmen, entweder SP-1 oder AP-2 in jeweils 100-fachem molarem Überschuss. Diese Veränderungen führten dazu, dass sich letztendlich eine einzige Bande hoher Dichteintensität zeigte. Eine Bestätigung bzw. Widerlegung der Vermutung, dass es sich hierbei um die Folge der CTCF-DNA-Interaktion handelt, sollte in nachfolgenden Supershift Assays möglich sein.

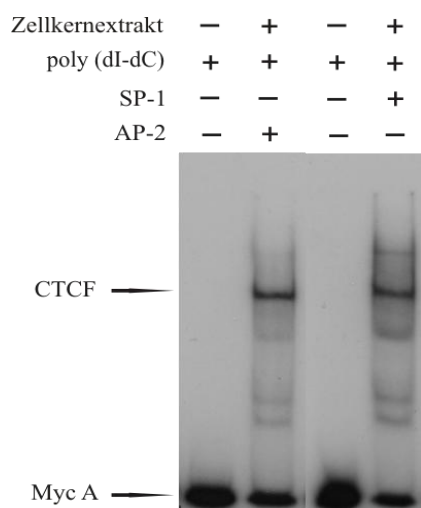


Abb. 20: EMSA des Myc A-Fragmentes in Anwesenheit von SP-1 und AP-2

Dargestellt ist ein Gelretardierungsversuch, bei dem das Myc A-Fragment in Anwesenheit entweder des SP-1- oder des AP-2- Kompetitors mit Zellkernextrakt interagiert. Die Kompetitoren SP-1 und AP-2 kommen dabei unverdünnt zum Einsatz. Die Konzentration des Kompetitors Poly (dI-dC) (0.2 µg/20 µl) bleibt unverändert. Der Einsatz der beiden neuen Kompetitoren führt zur Fokussierung der bisherigen Bandenvielzahl auf eine einzelne Bande (mit CTCF gekennzeichnet). Dabei sollte es sich um die CTCF-Bande handeln.

3.3.6 Computerunterstützte Suche nach einer CTCF-Konsensussequenz im Bereich der HSS -4 bis -6

Als die vorliegende Arbeit im Sommer 2005 aufgenommen wurde, war es nach damaligem Wissensstand nicht möglich, allein über die Kenntnis einer bestimmten humanen DNA-Sequenz verlässliche Aussagen über die DNA-Bindung von CTCF zu treffen. Bis dahin waren wenige CTCF-Bindungsstellen im menschlichen Genom entdeckt und charakterisiert worden, diese zeigten auf DNA-Ebene aber nur geringe Sequenzhomologien (Filippova et al., 1996; Moon et al., 2005). Anhand der Daten ging man jedoch davon aus, dass CTCF an ungefähr 50 bp lange DNA-Sequenzen bindet (Ohlsson et al., 2001). Über das Genom von *Drosophila* war lange Zeit bekannt, dass dort eine ganze Reihe verschiedener Proteine eine Insulator-Funktion vermitteln. Diese sind dort vor allem für eine korrekte embryologisch-anatomische Entwicklung von Bedeutung. Allerdings war davon auszugehen, dass kein korrespondierendes Gegenstück für humanes CTCF in *Drosophila* existiert. Im Jahr 2005 jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Annahme falsch und dCTCF bei *Drosophila* die Funktion des FAB-8-Insulators vermittelt (Moon et al., 2005). Ebenfalls konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass dCTCF und hCTCF im Aufbau nahezu identisch sind und höchstwahrscheinlich auch ihre Funktionsweise konserviert wurde.

Während CTCF bei Vertebraten mittlerweile viel Aufmerksamkeit geschenkt worden war, war die Datenlage über dCTCF-Bindungsstellen im Genom von *Drosophila* sehr viel schlechter. Hier war erst eine einzige Bindungsstelle, der Fab-8-Insulator im Bereich des Abdominal-B-Locus des Bithorax-Komplexes (BX-C), näher charakterisiert worden. Im Jahr 2007 konnten im Genom von *Drosophila* eine ganze Reihe weiterer CTCF-Bindungsstellen entdeckt und charakterisiert werden (Holohan et al., 2007). Dadurch wurde es möglich, eine konservierte CTCF-Konsensussequenz mit einer Länge von annähernd 20 bp zu entschlüsseln (siehe Abb. 21). Ein Abgleich dieser Konsensussequenz mit bisher bekannten CTCF-Bindungsstellen bei Vertebraten führte zu der überraschenden Erkenntnis, dass entgegen der bisherigen Meinung auch bei Vertebraten sehr wohl eine Konsensussequenz der CTCF-Bindungsstellen existiert und dass sich beide Sequenzen, Konsensussequenz von hCTCF und von dCTCF, sehr ähnlich sind (Holohan et al., 2007).

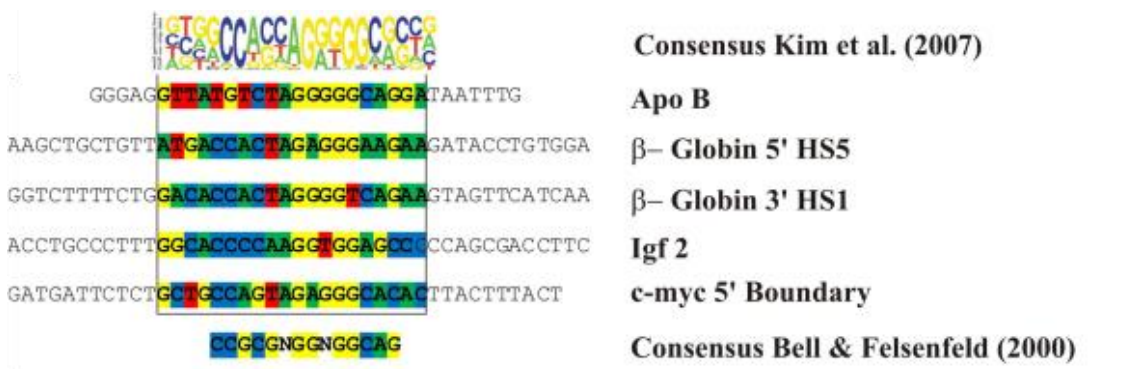


Abb. 21: Darstellung einer möglichen Konsensussequenz

Dargestellt zum einen die von Kim et al. 2007 formulierte CTCF-Konsensussequenz. Dabei demonstrieren die Nukleotidbuchstabengrößen die unterschiedliche Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein an der jeweiligen Bindungsstellen-Position. Zusätzlich zum Vergleich einige bereits charakterisierte CTCF-Bindungsstellen. Bereits 2000 versuchten Bell und Felsenfeld eine solche Konsensussequenz zu definieren.

Die neuen Publikationsergebnisse waren insofern für diese Arbeit wegweisend, da mit Hilfe der neu entdeckten Konsensussequenz die gesamte HSS-4, -5 und -6 auf das Vorhandensein einer solchen CTCF-Konsensussequenz hin untersucht werden konnten. Im Rahmen einer Zusammenarbeit (Institut für Genetik, Justus-Liebig-Universität Giessen) wurde die Region 3' der Immunglobulin-Gensegmente von M. Bartkuhn auf das Vorhandensein von möglichen CTCF-Bindungsstellen abgesucht (siehe Tab. 7).

NAME	STRAND	START	P-VALUE	SITES
FII	+	1	1.06e-06	CCGCTAGGGGGCAGC
hAPP	+	1	1.64e-06	CCGCTAGGGGTCCT
mDMD7	+	1	1.64e-06	CCGCGTGGTGGCAGT
igglambda6	+	5	2.51e-06	TTGC CCACCAAGGTGGCGGA AATG
myC	+	1	4.47e-06	CCGCGAGGGGGCGGC
mDMD4	+	1	9.81e-06	CCGCGCGGTGGCAGC
F1	+	1	1.77e-05	CCAGTAGAGGTCCTCA

Tabelle 7: CTCF-Konsensussequenz

Dargestellt sind die DNA-Sequenzen verschiedener CTCF-Bindungsstellen. In grauen Kästchen sind die Basen hinterlegt, an denen sich die Suche mit Hilfe der CTCF-Konsensussequenz im Wesentlichen orientiert. Die Suche nach einer CTCF-Bindungsstelle durch Sequenzhomologievergleiche führt mit einem p-Wert von 2.51 zu einer möglichen CTCF-Bindungsstelle im Bereich der HSS-6 (igglambda6). Zum Vergleich wurden einige weitere bereits charakterisierte Bindungssequenzen aufgetragen.

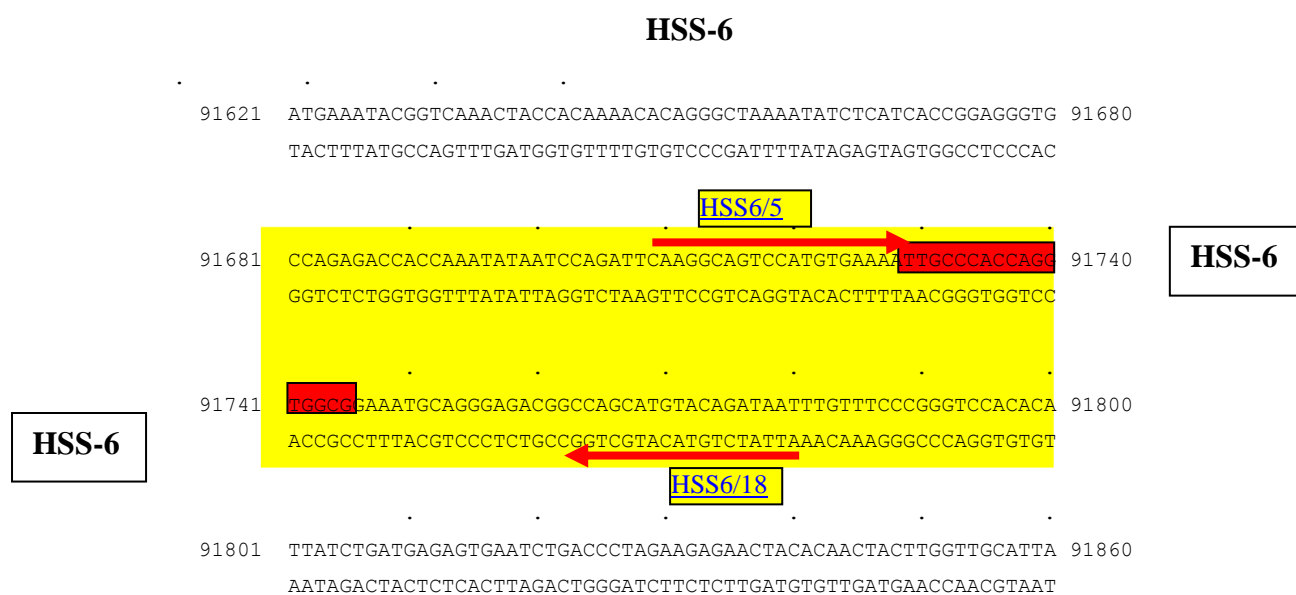
Diese Suche zeigte, dass sich mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit (P-Value 2.51) im Bereich der HSS-6 zumindest eine potentielle CTCF-Bindungsstelle befinden könnte (siehe Tab. 7). Der p-Wert (p-value) beschreibt in der Überprüfung einer statistischen Hypothese die Wahrscheinlichkeit, dass ein erwartetes Ergebnis mindestens so extrem ausfällt, wie das aktuell Beobachtete, in der Annahme, dass die Nullhypothese wahr ist (SELLKE Thomas et al., 2001). Vorsichtig formuliert: Je kleiner der p-Wert, umso eher kann die Nullhypothese verworfen werden.

3.3.7 Fokussierung auf einen 72 bp großen Teilbereich der HSS-6

Diese Entdeckung ermöglichte es nun, die Aufmerksamkeit speziell auf einen Teilbereich der HSS-6 zu fokussieren. Abbildung 22 zeigt die Position der neuen Oligonukleotide. Entsprechend der getroffenen Auswahl zur Amplifikation dieses Teilbereiches der HSS-6 wird das 72 bp große DNA-Fragment als HSS-6/18er-Fragment bezeichnet (siehe Abb. 22).

Abb. 22: Das HSS-6/18er-Fragment

Dargestellt ist ein Teilbereich der HSS-6, das HSS-6/18er-Fragment. Als gelber Kasten ist der erste Teilbereich der HSS-6 hinterlegt. Die roten horizontalen Pfeile markieren die Position und Orientierung der Oligonukleotide für die PCR eines Teilbereichs, des 72 bp großen als HSS-6/18er-Fragment bezeichneten DNA-Fragments. Rot hinterlegt in der DNA-Sequenz die vermutete CTCF-Bindungsstelle.



Mit einer Größe von 72 bp betrug dessen Größe ungefähr 10% der ursprünglichen Größe der HSS-6. Als Matrize für das 6/18er-Fragment diente wie zuvor das Cosmid cos 2132/39 und das PCR-Profil wurde ebenfalls mit einer Zykluszahl von 35 Zyklen und einer Anlagerungstemperatur von 55°C durchgeführt (siehe Abb. 23).

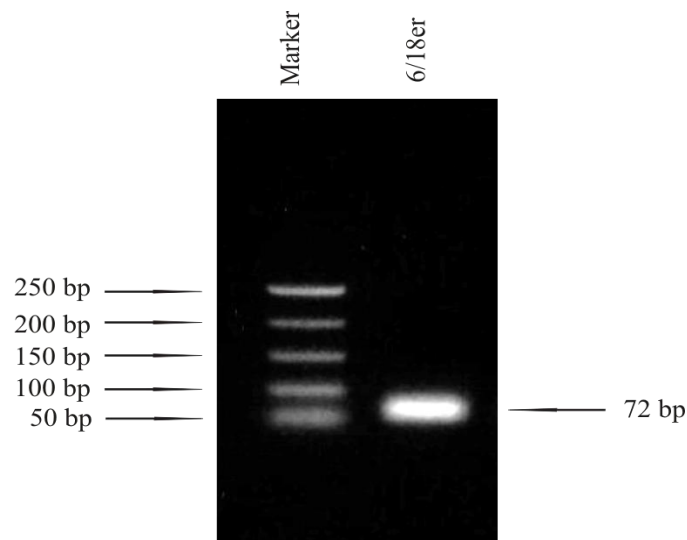


Abb. 23: PCR des 72 bp großen 6/18er-Fragments

Zu erkennen ist links der aufgetragenen 50 Bp-Marker und rechts daneben das 72 bp große 6/18er-Fragment.

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der Kompetitoren SP-1 und Ap-2 mit dem Myc A-Fragment zu einer Reduktion der Bandanzahl auf eine einzige Bande mit hoher Dichteintensität führen. Bei dieser Bande könnte es sich um die Folgen der CTCF-DNA-Interaktion handeln. Nun wurde versucht dieses Ergebnis auf das HSS-6/18er-Fragment zu übertragen. Dazu erfolgte die Durchführung des EMSA mit dem HSS-6/18er-Fragment und den SP-1 und AP-2 Kompetitoren in 10- und 100-fachem molarem Überschuss. Dies führte auch in diesen Versuchen zu einer deutlichen Reduktion der Dichteintensität von zwei zuvor beobachteten Banden (I und III) und einer Intensitätszunahme der Bande II. Die Größe der Bande II liegt aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem Größenbereich zwischen den beiden erstgenannten (siehe Abb. 24).

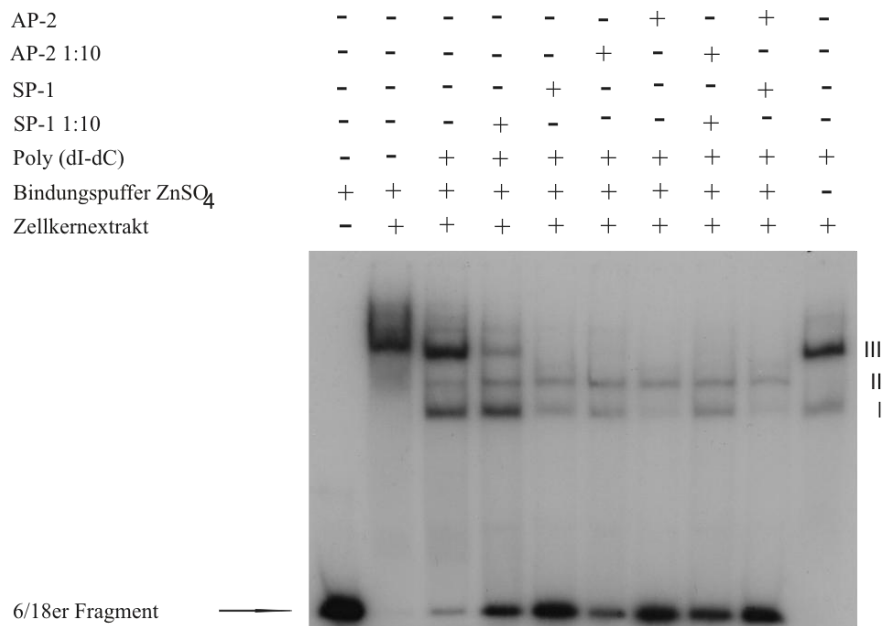


Abb. 24: Titration verschiedener Kompetitoren anhand des HSS-6/18er-Fragments

Links in der Abbildung ist die freie DNA-Probe mit einem Pfeil markiert. Danach folgen rechts Banden, in denen jeweils 2 µl Zellkernextrakt (REH) und eine Auswahl an verschiedenen Kompetitoren zur Ausbildung von Protein-DNA-Interaktionen führen. Dabei wurde in allen Bindungsansätzen der ZnSO₄ haltige Bindungspuffer verwendet. Allein in der ganz rechten Bande wurde der Bindungspuffer nach Felsenfeld verwendet. Die spezifischen Banden wurden am rechten Bildrand mit I-III bezeichnet.

Interpretation dieser Ergebnisse

Bei der am weitesten gewanderten Proteinbande I könnte es sich um die Folgen der Interaktion von SP-1 bzw. AP-2 mit der DNA-Probe handeln (siehe Bande I). Dies lässt sich vermuten, da Bande I durch Konkurrenz mit den entsprechenden Oligos beinahe verschwindet. Dies trifft ebenfalls auf Bande III zu, die ebenfalls nach Zugabe der SP-1 und AP-2 Kompetitoren verschwindet. Aufgrund des Wanderungsverhaltens dieser Banden und damit in Folge ihrer entsprechenden Größe, scheint allerdings noch ein weiteres Protein an der Ausbildung der Bande III beteiligt zu sein. Dabei könnte es sich um CTCF handeln (siehe Abb. 24).

Zu erkennen ist ebenfalls, dass die Bande II mit dem bisher verwendeten Bindungspuffer nach Felsenfeld nicht zur Ausbildung gekommen ist (hierzu Vergleich der ganz rechten Bahn und der dritten Bahn von links in Abb. 24).

Die Titration der neuen Kompetitoren SP-1 und AP-2 Oligos führt zu einer Intensitätsabnahme der Banden I und III, wohingegen die Intensität der DNA-Protein-Bande II zunimmt.

Bei Bande II könnte es sich um eine ausschließlich durch die Bindung von CTCF verursachte Bande handeln. Dass möglicherweise weitere, bisher unbekannte und nicht kompetitierte Interaktionspartner an dieser Proteinbande beteiligt sind, kann nicht ausgeschlossen werden. Eine Bestätigung bzw. Widerlegung der Vermutung, dass es sich hierbei um eine durch CTCF-Bindung verursachte Bande handelt, sollte in nachfolgen Supershift Assays untersucht werden.

3.4 Supershift Assays – Die Verwendung spezifischer Antikörper führt zu einer reduzierten Wanderungsgeschwindigkeit im EMSA

Durch den Vergleich der DNA-Sequenz von HSS-4, -5 und -6 mit einer CTCF-Konsensussequenz war es möglich geworden, die Suche nach CTCF-Bindungsstellen auf einen Teilbereich der HSS-6, das HSS-6/18er-Fragment, zu fokussieren. Durch die Veränderung der Kompetitoren und Pufferbedingungen war es gelungen, die in den Gelretardierungsversuchen initial auftretenden zahlreichen Banden, sowohl bei dem Myc A- als auch dem HSS-6/18er-Fragment auf eine einzelne Bande erhöhter Dichteintensität zu reduzieren. Nachdem sich in Gelretardierungsversuchen mit diesen DNA-Fragmenten zeigen ließ, dass hier Protein-DNA-Bindungen stattfinden, stellt die Modifikation der EMSA im Sinne eines Supershift Assays den nächsten Schritt dar, um die Beteiligung von CTCF an diesen Interaktionen zu überprüfen (siehe 3.2).

Zur Durchführung der Supershift Assays wurden drei käuflich erworbene polyklonale CTCF-Ziegenantikörper von Santa Cruz. Biotechnology, Inc. (siehe 2.2.3) verwendet. Dabei handelte es sich um gegen den N-Terminus (N-17), C-Terminus (C-20) und gegen Epitope im Bereich der DNA-Bindungsdomäne (E-14) von CTCF gerichtete Antikörper. Zur Kontrolle war der Einsatz eines NFκB-Antikörpers geplant.

3.4.1 Die Titration der Konzentration von Antikörper und Zellkernextrakt führt zur Ausbildung eines Präzipitats

In den ersten durchgeführten Supershift Assays, in denen die Myc A- und Myc B-Fragmente als DNA-Probe verwendet wurden, war es durch den Einsatz der Antikörper beabsichtigt gewesen, einzelne DNA-Protein-Banden in ihrer Mobilität zu verlangsamen. Dies erfolgte noch vor der Etablierung der SP-1 und AP-2 Oligos und vor Verwendung des ZnSO₄-haltigen Bindungspuffers. Dementsprechend geschah dies zu einem Zeitpunkt, wo es noch nicht möglich gewesen war, die Bandenzahl zu reduzieren. Ziel bei der Durchführung dieser Versuche war es, den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse der Zellkernextrakte gegenüber einer konstanten Antikörperkonzentration zu untersuchen. Dies sollte vor allem in Hinblick auf Wanderungsgeschwindigkeits-Verzögerungen der zu diesem Zeitpunkt noch zahlreichen DNA-Protein-Banden erfolgen.

Als DNA-Probe bei den Supershift Assays kam entsprechend den bezeichneten Abbildungen entweder das Myc A- oder das Myc B-Fragment zum Einsatz. Bindungspuffer und DNA wurden auf Eis zusammen pipettiert und zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des Zellkernextrakts 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2 µl des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt und der Bindungsansatz weitere 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in die Taschen eines 5% Gels aufgetragen und die Elektrophorese durchgeführt.

Das Resultat dieser Versuche ist auf den Abbildungen 25a/b zu erkennen. Sowohl bei Einsatz des CTCF-(C-20)- als auch des (N-17)-Antikörpers kommt es zur Ausbildung eines Präzipitats aus DNA, Proteinen und Antikörper, welches anscheinend nicht mehr in das Gel einwandert (siehe roter Pfeil in Abb. 25a/b). Überraschenderweise scheint jedoch der (E-14)-Antikörper keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Protein-Komplexe zu haben.

Gründe für diese Beobachtung könnten sein:

- Durch die DNA-Bindung könnten die Epitope von CTCF im Bereich seiner DNA-Bindungsdomäne nicht mehr für den CTCF (E-14) Antikörper erreichbar sein.
- entgegen seiner Beschreibung erkennt der E-14 Antikörper sein Epitop nicht.

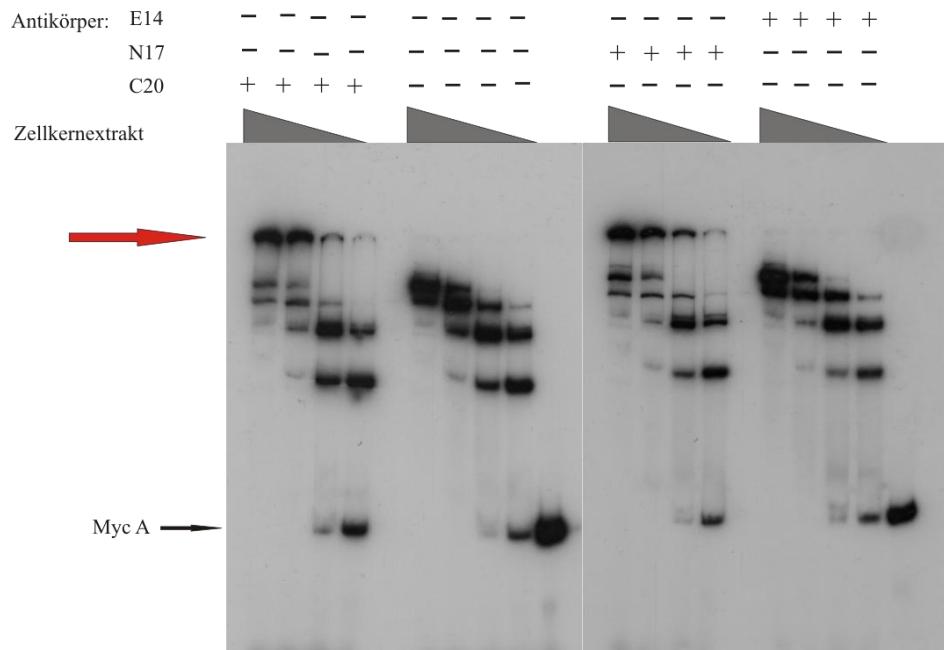
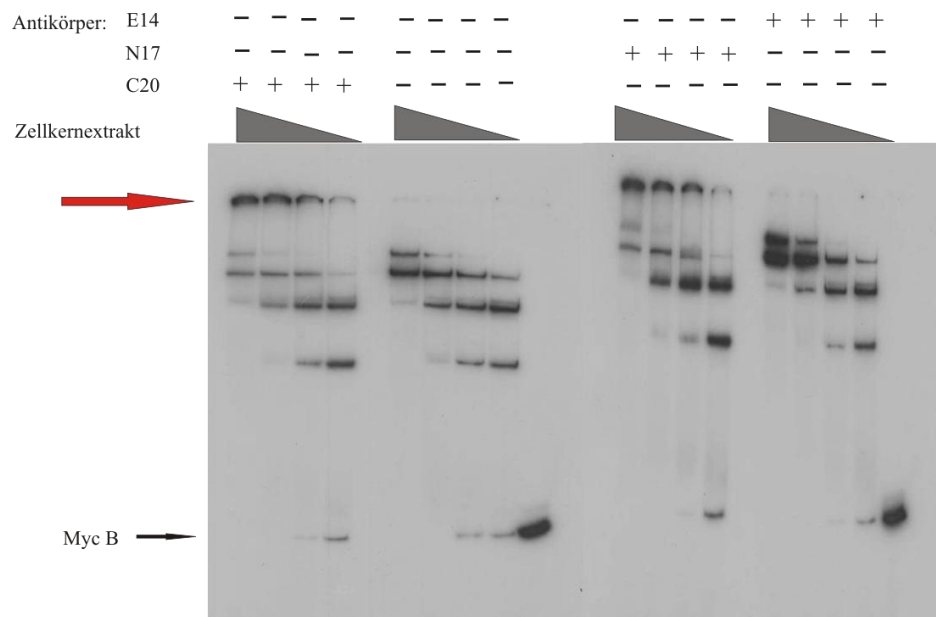
Abb. 25a:**Abb. 25b:**

Abb. 25a/b: Titration des Konzentrationsverhältnisses von Antikörper und Zellkernextrakt anhand des Myc-A und Myc-B Fragmentes

Um das optimale Antikörper-Protein-Verhältnis zu bestimmen, führten wir den Versuch wie dargestellt mit unterschiedlichen Konzentrationen des Zellkernextraktes (REH) durch. Aufgetragen wurde in 1 μ l-Schritten jeweils 1-4 μ l Zellkernextrakt, wobei die Konzentration in den Bahnen von links nach rechts abfiel. Die Konzentration des Antikörpers (2 μ l) blieb dabei unverändert. Das Präzipitat aus Antikörper, Protein und DNA, welches nicht mehr in das Gel einwandert, wurde durch rote Pfeile kenntlich gemacht.

An diesem Punkt der Arbeit war es somit möglich, mit Hilfe von Supershift Assays zu zeigen, dass CTCF im Bereich der Myc A- und Myc B-Fragmente bindet.

Der Einsatz zweier Antikörper in den Gelretardierungsversuchen führte allerdings nicht zur Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit einer einzelnen Protein-DNA-Bande, sondern vielmehr zur Ausbildung eines Präzipitats, welches nicht ins Gel einwanderte. Eine Reduktion der Bandenanzahl und die dadurch mögliche Mobilitätsverzögerung einer einzelnen Bande durch den Einsatz von Antikörpern würden die Aussagekraft dieser Versuche hinsichtlich ihrer Spezifität noch erhöhen.

3.4.2 Supershift Assay: Myc A- und HSS-6/18er-Fragment

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde bei der Durchführung der Supershift Assays der Bindungspuffer ohne $ZnSO_4$ und als Kompetitor nur Poly (dI-dC) verwendet.

Hiermit war es in Supershift Assays gelungen zu zeigen, dass CTCF an die Bindungsstelle im Myc A- und Myc B-Promotorbereich bindet (siehe Abb. 25a/b). Die Optimierung der EMSA-Bedingungen, die später durchgeführt wurde, ermöglichte eine erfolgreiche Reduktion der bisherigen Bandenanzahl und schaffte somit neue Ausgangsbedingungen für die Durchführung der Supershift Assays (siehe Abb. 26).

Die Verwendung der Myc B-Bindungsstelle würde keine weiteren Informationen liefern, weshalb dieses Fragment nicht mehr in weiteren Gelretardierungsversuchen verwendet wurde. Da die spezifischen Kompetitoren, die SP-1 und AP-2 Oligonukleotide, eingeführt worden waren, war es beabsichtigt den Supershift Assay mit jedem dieser beiden Kompetitoren separat durchzuführen, um eventuelle Unterschiede hinsichtlich der Antikörper-Kompetitor-Interaktion besser beurteilen zu können. Hierzu wurde den Bindungsansätzen aus Bindungspuffer, Zellkernextrakten und Kompetitor, SP-1 beziehungsweise AP-2, 2 μ l Antikörper hinzugefügt.

Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde das radioaktiv markierte DNA-Fragment hinzupipettiert und der Ansatz 2 h bei 4°C inkubiert (siehe Abb. 26). Wir veränderten auch die Versuchsbedingungen, indem in den folgenden Versuchen zuerst Zellkernextrakt und das radioaktiv markierte DNA-Fragment zusammenpipettiert und 2h bei 4°C inkubiert wurden, um dann für weitere 30 min Antikörper bei Raumtemperatur hinzuzufügen (siehe Abb. 27). Die weitere Auswertung der Versuche erfolgte wie in 2.4.1 beschrieben. Wie aus der Abbildung 26 zu entnehmen, führte

sowohl der (C-20) als auch der (N-17) Antikörper im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen ohne Antikörper zu einer deutlichen Abnahme der Bandenintensität. Dahingehend veränderten die (E-14) Antikörper die Bandenintensität nur unwesentlich. Dies korreliert mit den Beobachtungen, die bei den Versuchen mit den Myc A- und Myc B-Fragment und der Titration des Antikörper-Fragment Verhältnisses gemacht worden waren (siehe Abb. 25a/b). Auch hier schien der (E-14) Antikörper keine Auswirkungen auf die Intensität oder Lokalisation der Banden zu haben. Allerdings kam es unter diesen Versuchsbedingungen bei keinem Antikörper zu einem tatsächlichen Supershift einer Proteinbande.

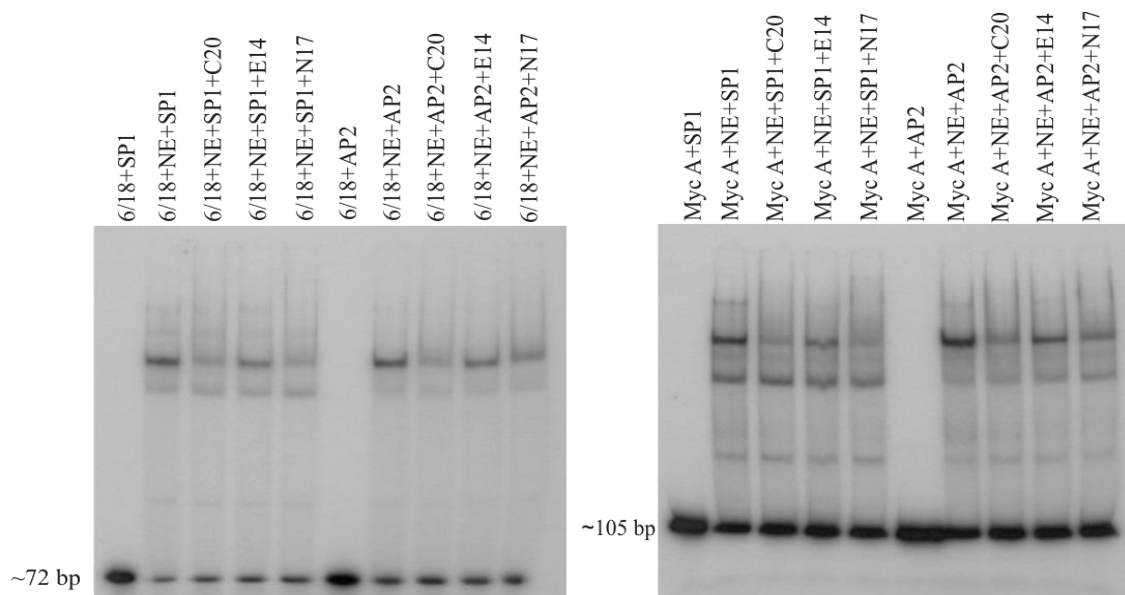


Abb. 26: Vergleich der Kompetitoren SP-1 und AP-2 beim Supershift Assay

Getrennte Darstellung des HSS-6/18er-Fragments und der Myc A-Bindungsstelle. Mit beiden Fragmenten wurden mit Zellkernextrakt und Antikörpern und den SP-1 und AP-2 Oligos Gelretardierungsversuche durchgeführt. Zu erkennen ist eine deutliche Intensitätsabnahme der markierten Bande bei (C-20) und (N-17) Antikörpern im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen ohne Antikörper. Zuerst wurden Zellkernextrakt und Antikörper zusammenpipettiert und 2h bei 4°C inkubieren gelassen. Dann wurde zum Schluss für weitere 30 min das radioaktiv markierte DNA-Fragment bei Raumtemperatur hinzugefügt.

3.4.3 Supershift Assay: Nachweis der CTCF-Bindung im Bereich eines 72 bp großen Teilbereiches der HSS-6

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl das HSS-6/18er-Fragment als auch das Myc A-Fragment unter geeigneten Bindungsbedingungen und geeigneter Kompetitorauswahl in den Gelretardierungsversuchen eine deutliche singuläre Proteinbande zeigen. Deren Intensität konnte durch den Einsatz eines CTCF-Antikörpers spezifisch abgeschwächt werden (siehe Abb. 26). Dass mit dieser Bande jedoch kein Supershift möglich war, könnte an zu geringen Antikörperkonzentrationen liegen. Möglicherweise verhinderte aber auch die Vorinkubation der Zellkernextrakte mit den Antikörpern die Protein-DNA Interaktion. Außerdem war bisher keine Antikörper-Negativkontrolle durchgeführt worden. Daher wurde der nachfolgende Gelretardierungsversuch unter kombinatorischem Einsatz aller bisher verwendeten Kompetitoren durchgeführt und die Konzentration der verwendeten Antikörper titriert. Außerdem wurde die Reihenfolge, in der die Bindungspartner zusammen pipettiert wurden, geändert.

Zur Negativkontrolle wurde ein NF κ B-Antikörper in den Versuchen mitgeführt. Aufgrund seines ganz anderen Zielproteins und des Fehlens einer NF κ B- Bindungsstelle innerhalb der HSS-4 bis -6 Bereiches, sollte sein Einsatz in den Gelretardierungsversuchen weder zu einer Abschwächung der Bandenintensität noch zu einem veränderten Wanderungsverhalten der Ausgangsbande führen.

Wie aus der Abbildung 27 zu entnehmen, führte die Titration mit α -CTCF (C-20) und α -CTCF (N-17) Antikörpern zu einer verringerten Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinbande im Sinne eines Supershifts. Als NF κ B-Antikörper wurde ein käuflich erworbener α -NF κ B-p50 (N-19) Antikörper verwendet. Hierbei handelte es sich um einen polyklonalen Ziegenantikörper. Der Einsatz dieses NF κ B-Antikörpers und von α -CTCF (E-14) Antikörpern hatten keine Auswirkungen auf die Intensität oder Mobilität der Ausgangsbande. Somit konnte über Interaktion spezifischer Antikörper der *in vitro* Nachweis erbracht werden, dass CTCF in einem Teilbereich der HSS-6, dem 72 bp großen HSS-6/18er-Fragment, bindet.

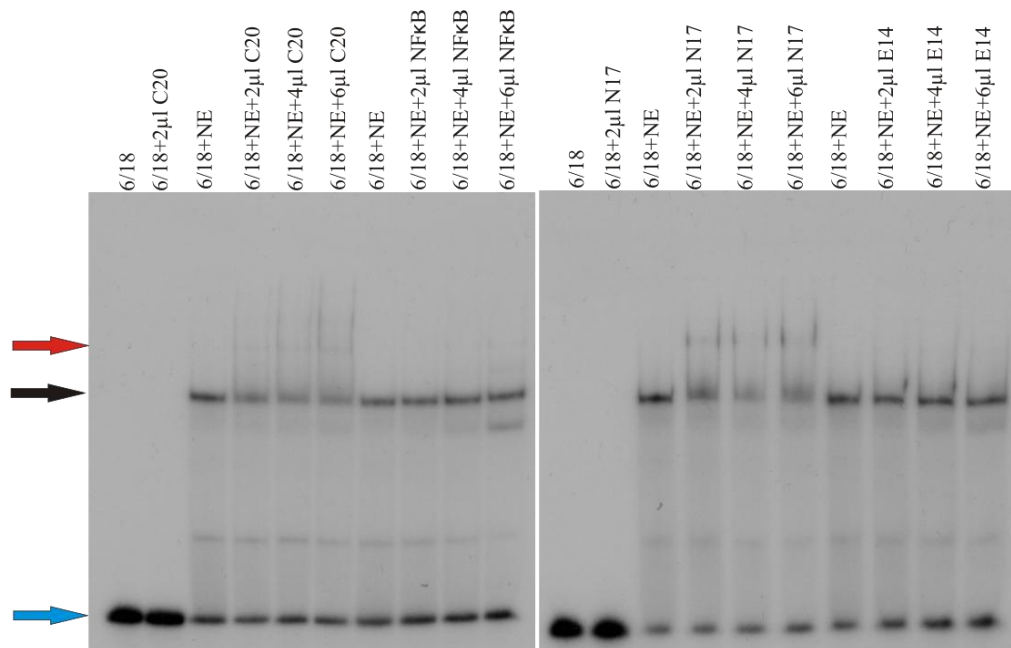


Abb. 27: Supershift der CTCF Bande

Dargestellt ist ein Gelretardierungsversuch mit dem HSS-6/18er-Fragment (blauer Pfeil) und Zellkernextrakt aus BJAB-Zellen. Der Einsatz des CTCF (N-17) Antikörper führte zu einem deutlichen Supershift (roter Pfeil) der Ausgangsbände (schwarzer Pfeil). Ebenso in schwächerer Form verhält sich der CTCF (C-20) Antikörper. Dahingegen führen der CTCF (E-14) als auch der NFκB-Antikörper zu keiner Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit der Ausgangsbände. Zuerst wurden Zellkernextrakt und radioaktiv markiertes DNA-Fragments zusammenpipettiert, 2h bei 4°C inkubiert und dann für weitere 30 min der Antikörper bei Raumtemperatur hinzugefügt.

3.5 Bindungssequenzhomologien liefern Hinweise auf eine weitere CTCF-Bindungsstelle im Bereich der HSS-5

Die Suche nach CTCF-Bindungsstellen im Bereich der HSS-6 konnte durch den Vergleich der DNA-Sequenz mit einer ursprünglich in *Drosophila* entdeckte CTCF-Konsensussequenz, auf einen Abschnitt von wenigen Basenpaaren fokussiert werden. Dies machte es möglich mit diesem Bereich, dem HSS-6/18er-Fragment, gezielt Gelretardierungsversuche durchzuführen. Durch eine weitere Modifikation des EMSA, die Verwendung von Antikörpern im Sinne eines Supershift Assay (siehe 3.4.3), gelang es zu beweisen, dass CTCF an einen 72 bp großen Teilbereich der HSS-6 in vitro bindet (siehe Abb. 27). Die Kenntnis der Bindungssequenz von CTCF im Bereich der HSS-6 ermöglichte es, nach Sequenzhomologien im Bereich der HSS-4, -5 und -6 zu suchen. Dabei gelang es, eine weitere putative CTCF-Bindungssequenz im Bereich der HSS-5 zu entdecken (siehe Abb. 28).

CCAT	TG	TGAAA	ATT	TGCC	CCACCAGG	TGG	CG	GAA	ATGCAGG	GA	HSS-6
ATT	TG	CTTGA	CTT	TGCC	CCACCAG	ATG	TCG	CTG	TCTACT	TGT	HSS-5

Abb. 28: Sequenz der CTCF-Bindungsstellen im Bereich von HSS-5 und -6

Es konnten zwei Bindungsstellen für CTCF im Bereich HSS-4, -5 und -6 ermittelt werden. Die Bindungsstelle im Bereich der HSS-6 konnte durch Supershift Assay experimentell bestätigt werden. Das Auffinden der Bindungsstelle im Bereich der HSS-5 gelang durch Sequenzhomologievergleiche. Für diese zweite potentielle Bindungsstelle wurde bisher kein in vitro Nachweis erbracht.

Zwischen beiden Bindungsstellen besteht eine Sequenzhomologie von 65% (13/20 Basen). Dies lässt es als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass sich auch im Bereich der HSS-5 eine weitere CTCF-Bindungsstelle befindet. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Daten von Ren und Kollegen, die ungefähr zum Zeitpunkt des Abschlusses des experimentellen Teiles dieser Arbeit einen in vivo Hinweis auf die zwei hier beschriebenen CTCF-Bindungsstellen erbringen konnten (Kim et al., 2007).

4. DISKUSSION

Das Zinkfingerprotein CTCF ist ein von der Fruchtfliege bis zum Menschen hoch konservierter multivalenter Transkriptionsfaktor, der in eine ganze Reihe von Gen-Regulationsvorgängen involviert ist (Ohlsson et al., 2001; Moon et al., 2005; Dunn and Davie, 2003). Unter anderem ist dieses multivalente Protein bei der Etablierung von Boundaries bei Vertebraten ein unverzichtbarer Bestandteil (Bell et al., 1999; Felsenfeld et al., 2004). Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen über die Fähigkeit dieses Proteins, an bestimmte Bereiche innerhalb der HSS-4, -5 und -6 zu binden. Dadurch wäre es auch an diesem Ort möglich, über die Etablierung von Insulator/Boundary Elementen die Wirkung des $Ig\lambda$ -Enhancers auf flussabwärts gelegene unabhängig regulierte Gene zu blockieren und die 3' Grenze des $Ig\lambda$ -Locus zu definieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse zur genaueren Charakterisierung von zwei neuen CTS (CTCF target sites), die im Rahmen dieser Arbeit entdeckt wurden, diskutiert.

4.1 Darstellung methodischer Ansätze zur Validierung von CTS

Zu Beginn dieser Arbeit war es allein anhand einer bekannten DNA-Sequenz nicht möglich verlässliche Voraussagen über CTS und damit die Möglichkeit des Vorhandenseins eines Insulator/Boundary Elementes zu treffen. Grund hierfür ist die Tatsache, dass es diesem Transkriptionsfaktor möglich ist, durch unterschiedliche Kombinationen seiner Zinkfinger an in ihrer Sequenz unterschiedliche DNA-Bereiche zu binden (Filippova et al., 1996). Die schrittweise Vorgehensweise bei der Suche nach einem Insulator-Element musste sich daher an der Tatsache orientieren, dass an allen bisher bei Vertebraten beschriebenen Insulator-Elementen das Zinkfingerprotein CTCF über seine DNA-Bindung beteiligt ist (Bell et al., 1999). Bisher wurde nur eine einzige Ausnahme von dieser Regel bei einem Insulator im Bereich des Peg 3-Gens der Maus beschrieben. Hier ist es dem evolutionär ebenfalls hochkonservierten Transkriptionsfaktor YY1 in Abhängigkeit von dem Methylierungszustand seiner Bindungsstelle nur möglich an das paternale, unmethylierte Allel zu binden. Die maternale, methylierte Bindungsstelle verhindert jedoch die Bindung von YY1 (Kim et al., 2003). Eine computergestützte Suche nach dem Vorliegen einer YY1-Konsensussequenz (5' **GGCGCCATCTT** 3') (Kim et al., 2003) innerhalb von HSS-4,

-5 und -6 ergab hier jedoch keinerlei Sequenzhomologien. Als Werkzeuge für die Suche nach solch einem Insulator standen somit nur experimentelle Nachweismethoden zur Verfügung. So könnte man *in vivo* die bekannten Eigenschaften von CTCF als „enhancer blocker“ oder Vermittler einer Insulator-Funktion ausnutzen und untersuchen, ob HSS-4, -5 oder -6 in der Lage sind solche Eigenschaften zu vermitteln. Dies allein ließe aber nur einen indirekten Rückschluss zu, da selbst ein Nachweis solcher Eigenschaften der HSS nicht beweisen könnte, dass tatsächlich CTCF ursächlich daran beteiligt ist. Zudem verhindert die für menschliche B-Zellen charakteristische extrem niedrige Transfektions-Effizienz eine experimentelle Untersuchung in B-Zellen. *In vitro* kann mit Gelretardierungsassays (EMSA) eine CTCF-DNA-Bindung nachgewiesen werden (Pugacheva et al., 2005; Hellman and Fried, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Herangehensweise zur Suche nach CTS gewählt, da der genomische Bereich in dem gesucht werden sollte, bereits klar definiert war: aufgrund der Chromatinstruktur war der Arbeitsgruppe bereits bekannt, welche Regionen wahrscheinlich regulatorische Funktionen haben (HSS-4 bis -6). Dabei handelt es sich um drei genomische Abschnitte, die sich mit einer Größe von 339 bp, 472 bp und 610 bp bereits am unteren Auflösungsvermögen der Chromatin-Immunpräzipitations Methode befinden. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIp) oder die Kombination dieser Methode mit DNA-Microarrays (ChIp-on-chip) stellen Möglichkeiten dar, allerdings *in vivo*, DNA-Protein Bindungen nachzuweisen (Pillai and Chellappan, 2009; Kim and Ren, 2006). Das Prinzip dieser Methoden besteht darin, an die DNA gebundene Proteine an dem Ort ihrer Bindung zuerst mit Hilfe von Formaldehyd zu fixieren. Im Anschluss kann das Chromatin in Bruchstücke von einigen hundert Basenpaaren zerlegt und die Bruchstücke mit Hilfe eines geeigneten Antikörpers immunpräzipitiert werden. In der Regel beläuft sich das maximal erreichbare „Auflösungsvermögen“ dieses experimentellen Ansatzes auf circa 200 bp. Diese Methode eignet sich somit vor allem zum Absuchen großer DNA-Bereiche oder gar des gesamten Genoms einer Spezies. Abschnitte auf denen sich eine oder mehrere CTS befinden, lassen sich dann nachfolgend amplifizieren und sequenzieren. Eine Weiterentwicklung der ChIp-Versuche stellen ChIp-on-Chip-Versuche dar (siehe Abb. 29). Dabei werden die immunpräzipitierten DNA-Fragmente zuerst von formaldehydfixierten Proteinen befreit. Anschließend erfolgt eine Ligierung der DNA-

Enden mit Linker-DNA, was es ermöglicht, diese immunpräzipitierten DNA-Fragmente unter Verwendung eines universellen Oligonukleotidprimers zu amplifizieren. Nun ist es möglich diese PCR-Fragmente mit einer Fluoreszenz, beispielsweise Cy-3 oder Cy-5, zu markieren. Die aufgereinigte und in Einzelstränge denaturierte, markierte DNA wird nun zu DNA-Mikroarrays gegeben. Dabei handelt es sich um eine Plattform, einen „Chip“, auf dem sich DNA-Abschnitte oder das gesamte Genom einer Spezies in einzelsträngiger, fragmentierter Form fixiert befinden. Dies erlaubt es der markierten einzelsträngigen DNA zu einem Doppelstrang an einem bestimmten Ort auf dem Chip komplementär zu hybridisieren. Die Identifikation des Ortes der komplementären Anlagerung ist danach durch die zuvor erfolgte Fluoreszenzmarkierung möglich. Den letzten Schritt stellt letztendlich die statistische Auswertung der potentiellen Bindungsstellen dar.

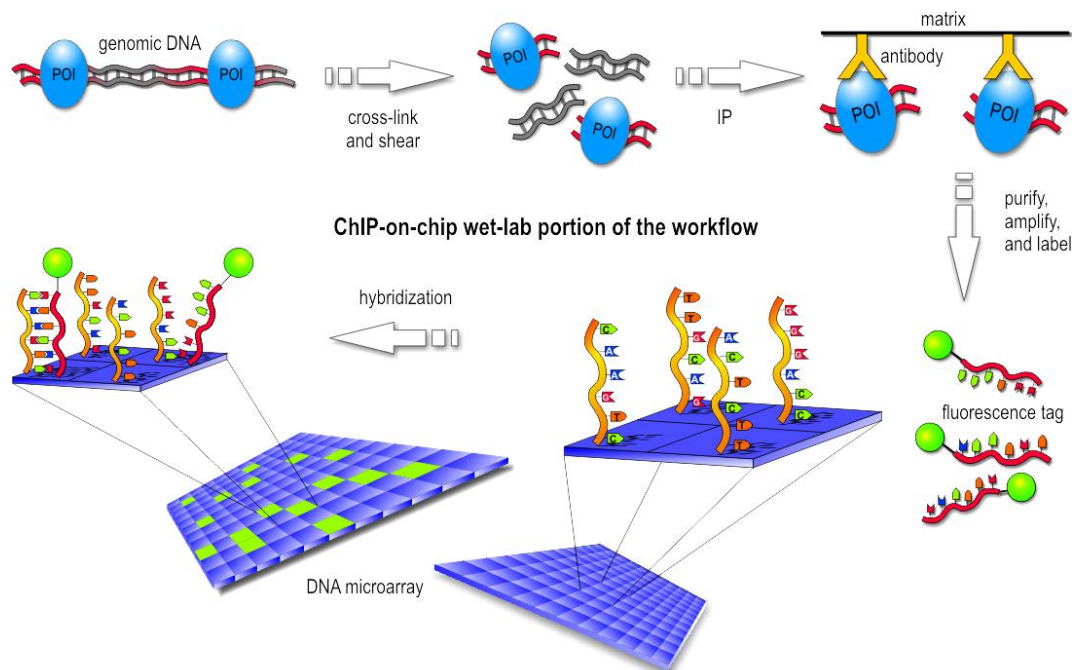


Abb. 29: ChIp-on-chip

In einem ersten Schritt werden alle Proteine an ihren DNA-Bindungsstellen mit Hilfe von Formaldehyd fixiert. In einem zweiten Schritt wird die DNA mechanisch in doppelsträngige DNA-Bruchstücke gespalten. Mit Hilfe von an eine Matrix fixierten Antikörpern lassen sich nun die DNA-Fragmente anreichern, an die das zu untersuchende Protein (POI = protein-of-interest) gebunden hat. An Aufreinigungs-, Denaturierungs- und Amplifizierungsschritten schließt sich die Fluoreszenzmarkierung der einzelsträngigen DNA-Fragmente an. Diese Fragmente lagern sich nun mit einzelsträngiger DNA, welche den gesamten genomisch interessanten Bereich widerspiegeln sollte und auf einem DNA-Mikroarray fixiert wurde, wieder zu einem Doppelstrang zusammen. Wo die Hybridisierungen stattfinden, lässt sich durch die Fluoreszenzmarkierung sichtbar machen. Darstellung dankbar übernommen von Thomas Hentrich.

4.1.1 Kritische Auseinandersetzung mit alternativen methodischen Ansätzen zur Validierung von CTCF-Bindungsstellen

Mit ChIp und Chip-on-Chip Experimenten lassen sich relativ schnell große Datenmengen über die Bindungsstellen eines bestimmten Protein in vivo durch das Absuchen von relativ großen DNA-Abschnitten oder auch des gesamten Genoms einer Spezies rekrutieren. Für das Auflösungsvermögen der Chromatin-Immunpräzipitation stellt die in den meisten Laboratorien verwendete Sonifikation den limitierenden Faktor dar, da die DNA aktuell in minimal 200 bp große DNA-Fragmente aufzutrennen und dementsprechend zu präzipitieren ist.

Eine Aussage über die Sequenz einer Bindungsstelle ist nicht möglich. Aufgrund des geringen Auflösungsvermögens von einigen Hundert Basenpaaren bei den ChIp und ChIp-on-chip Experimenten, müssen sich für jede genauere Charakterisierung einer CTS in vitro weitere Versuche anschließen: beispielsweise DNA-Protein Assays oder Supershift Assays.

Einen kritischen Punkt stellen sicherlich die enormen Kosten dar, die durch Durchführung und vor allem die Wiederholung der DNA-Mikroarray-Versuche verursacht werden. Eine deutlich kostengünstigere und schnellere Methode stellt die Software unterstützte Suche nach CTS dar. Seit Charakterisierung der ersten entdeckten CTS bei Drosophila und Vertebraten wurde versucht ein gemeinsames Sequenzmotiv in den CTCF-Bindungsstellen zu finden. Dies würde es ermöglichen, eine Konsensussequenz zu definieren, welche die Suche nach CTS deutlich erleichtern könnte. Bereits 2000 konnten Bell and Felsenfeld zeigen, dass gewisse Sequenzhomologien bei CTS evolutionär konserviert werden (Bell and Felsenfeld, 2000). Allerdings unterscheidet sich die von Ihnen daraufhin vorgeschlagene Konsensussequenz tatsächlich deutlich von derjenigen, die Ren und Kollegen sieben Jahre später postulierten (Kim et al., 2007). Ihnen war es möglich mit Hilfe von ChIp-on-chip Versuchen und den damit gewonnenen Datenmengen über CTCF-Bindungsstellen eine 20-mer Konsensussequenz zu formulieren, die sich in 6 von 20 Nukleotidpositionen von der von Bell formulierten Bindungssequenz unterscheidet (siehe Seite 74, Abb. 21). Allerdings werden auch mit Hilfe dieser Konsensussequenz ~20% der in vivo CTCF Bindungsstellen übersehen. Insgesamt konnten durch diesen

Versuchsansatz 13.804 CTS in vivo in humanen Fibroblastenzellen identifiziert werden (Kim et al., 2007).

Davon befinden sich fünf in einem 150 kb umfassende Bereich flussabwärts des Gensegments $C_{\lambda}7$. Zwei von diesen fünf CTS stimmen mit den beiden von uns beschriebenen CTS im Bereich von HSS-5 und HSS-6 überein. Ren und Kollegen konnten im Bereich zwischen HSS-3 und HSS-4 eine weitere CTS beschreiben.

Alle genannten experimentellen Ansätze helfen lediglich bei der Suche nach CTS. Sie sagen nichts über die Funktion der CTS in dem jeweiligen physiologischen Kontext aus, da die Funktionsweise einer CTS je nach Lokalisation ganz unterschiedlich sein kann. Letztendlich entscheidend für die Charakterisierung der Funktion eines potentiellen Insulator-Kandidaten ist die Durchführung von Versuchen, mit denen die Enhancer-blockierende Funktion oder der Schutz eines Gens vor Positionseffekten nachgewiesen werden kann. Dies kann zum Beispiel durch Reporter-Gen Assays oder Colony-forming assays erfolgen. Erst dadurch lassen sich Aussagen darüber treffen, welche Funktion einer solchen CTCF-Bindungsstelle tatsächlich zukommt.

Tatsächlich ist die Anzahl der aktuell durch in vitro Versuche verifizierten CTS an der Gesamtheit der mit Hilfe von ChIp-on-chip Versuchen gesammelten Daten sehr gering (<http://insulatordb.utmem.edu/>).

4.2 CTCF – Darstellung der heterogenen Funktionsweise

Die Funktion einer CTS kann sehr heterogen sein. Enhancer-blockierende-Funktion und Barriere-Funktion scheinen klar zu differenzierende und dynamische Funktionen zu sein. Klar zu differenzierende Funktion bedeutet, dass einige Insulatoren allein über eine Enhancer-blockierende-Funktion verfügen, andere wiederum nur über die Barriere-Funktion (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Nur ein Teil der Insulatoren verfügt über beide Funktionen. Für die Bestimmung dieser beiden unterschiedlichen Funktionsweisen stehen verschiedene experimentelle Ansätze zur Verfügung (siehe 4.1). Dynamisch in diesem Zusammenhang bedeutet, dass die Enhancer blockierende Insulator-Funktion keine starre Funktion darstellen muss, sondern durch äußere Einflüsse modulierbar sein kann. Einen solch modulatorischen Einfluss stellt beispielsweise die Methylierung von CTCF-Bindungsstellen dar (Kanduri et al., 2002; Holmgren et al., 2001; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000; Kim et al., 2003).

Ein klassisches Beispiel für die vom Methylierungszustand abhängige Bindungsfähigkeit an eine bestimmte Region stellt die ICR (*imprinting control region*) des Igf2/H19-Locus dar (Hark et al., 2000). In diesem Bereich zwischen den beiden Genen befinden sich einige CTCF-Bindungsstellen. Im maternal vererbten Allel liegen die CpG-Inseln unmethyliert vor, was CTCF eine Bindung ermöglicht und damit die Etablierung der Insulator-Funktion erlaubt. Im paternal vererbten Allel kann CTCF an die methylierten CpG-Inseln jedoch nicht binden. Dies ermöglicht die Expression allein des paternalen Allels von Igf2 (Bell and Felsenfeld, 2000). Zum einen handelt es sich bei diesem Vorgang um ein Beispiel für genomisches Imprinting, was bedeutet dass die Expression eines Gens davon abhängt, ob das Allel maternal oder paternal vererbt wurde. Zum anderen handelt es sich um das erste beschriebene Beispiel der regulatorischen Beeinflussung eines Insulator/Boundary Elementes im Genom von Vertebraten.

Die regulatorische Beeinflussung von Insulatoren kann über spezifische Interaktionspartner erfolgen. Einen davon stellt das Protein *Kaiso* dar. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der über seine POZ-Domäne mit dem C-Terminus von CTCF interagiert. Gilson und Kollegen konnten in unmittelbarer Nachbarschaft zu der CTCF-Bindungsstelle im Bereich des 5'HS4 β -Globin Insulator eine Bindungsstelle für dieses Protein entdecken und zeigen, dass *Kaiso* die Enhancer-blockierende-Funktion des Insulator-Elementes negativ beeinflusst (Defossez et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Enhancer-blockierenden-Funktion besteht über die häufig angetroffene unmittelbare Nachbarschaft von Schilddrüsenhormonrezeptor (TR) und CTS (Lutz et al., 2003; Lutz et al., 2000; Burke et al., 2002). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer hormonsensitiven Enhancer-Blockade. Der Schilddrüsenhormonrezeptor bindet als Transkriptionsfaktor entweder als Monomer oder Dimer im Promotorbereich einiger Gene an sogenannte *Thyroid hormone response elements* (TRE). Diese Bindung erfolgt häufig zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), einem weiteren Mitglied dieser Kern-Hormon Rezeptorfamilie. Die TRE's wiederum lassen sich in negative und positive Elemente einteilen. Die Abwesenheit des Rezeptor-Bindungspartners, also beispielsweise des Schilddrüsenhormons T3, führt zu einer verminderten Expression eines Gens, dessen Promotor eine solche positive TRE enthält. Zugabe von Schilddrüsenhormon führt

jedoch zur Wirkungsumkehr und Expressionszunahme des Gens (Baniahmad et al., 1990). Eine unmittelbare Nachbarschaft von CTCF-Bindungsstelle und TRE finden sich auch im Bereich der humanen *c-myc* Gene und des Lysozymgens beim Huhn (Lobanenkov et al., 1990; Baniahmad et al., 1990). Die Arbeitsgruppe Renkawitz konnte in beiden Fällen zeigen, dass die Enhancer-blockierende-Funktion der dort vorhandenen Insulatoren durch An- und Abwesenheit der TRE-Liganden modulierbar ist. So führt in beiden Fällen die Zugabe von T3 zu einer synergistischen Aktivierung, die Abwesenheit jedoch zu einer Repression des Zielgens. Zusätzlich wird der Verlust der Enhancer-blockierenden-Funktion durch die Schilddrüsenhormongabe von einem Anstieg des Acetylierungslevel des Histon H4 im Bereich von CTS, Promotor und Enhancer begleitet (Lutz et al., 2003).

Klassisches Beispiel für eine konstitutive Insulator/Boundary Region, die zugleich über Enhancer-blockierende Funktion wie auch über Barriere-Funktion verfügt, stellt die 5' HS4-Grenze des β -Globin-Locus des Huhns dar (siehe Abb. 30). Dabei handelt es sich um den ersten bei Vertebraten beschriebenen Insulator (Chung et al., 1993; Chung et al., 1997).

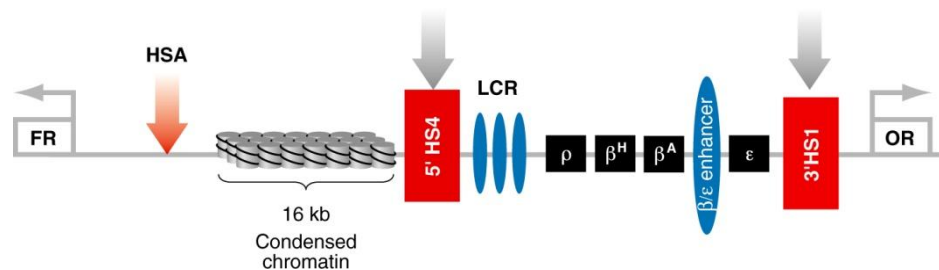


Abb. 30: Schematische Darstellung des β -Globin-Locus des Huhns

β -Globin-Gencluster (schwarze Kästen) und LCR (drei kleine blaue Ovale) werden durch zwei Insulator-Elemente flankiert (5'HS4 und 3'HS1, vertikale graue Pfeile). Das β -Globin-Enhancer-Element (großes blaues Oval) befindet sich innerhalb des β -Globin-Genclusters. Flussaufwärts befinden sich kondensierte Chromatinbereiche. Flussabwärts die OR. Darstellung übernommen aus (Valenzuela and Kamakaka, 2006).

Bei dem β -Globin-Locus des Huhns werden das β -Globin-Gencluster und die *Locus control region* (LCR) nach 5' und nach 3' jeweils von einem Insulator-Element flankiert. Außerhalb dieser Insulator-Elemente befindet sich flussaufwärts kondensiertes

Chromatin und flussabwärts die *chicken olfactory receptor genes* (OR). Dabei schützt die bereits angesprochene 5'HS4 zum einen außerhalb gelegene Gene vor den Einflüssen des β -Globin-Enhancer-Elementes, zum anderen die β -Globin-Gene vor einer unkontrollierten Ausdehnung kondensierter Chromatinbereiche. Das 3' gelegene Insulator-Element schützt die flussabwärts gelegenen unabhängig regulierten ORs vor den Einflüssen des β -Globin-Enhancers, verfügt jedoch über keine Barriere-Funktion (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Dass der Funktionsweise von CTCF im menschlichen Genom eine viel übergreifendere Rolle zukommen könnte als bisher angenommen, zeigten nun Corces und Philips in einem Übersichtsartikel (Phillips and Corces, 2009). Ihre Datenanalyse unterstützt die Vermutung, dass CTCF bei der Organisation der gesamten chromosomalen Architektur einer Zelle über inter- und intrachromosomale Kontakte als Hauptakteur beteiligt sein könnte. CTCF würde ihrer Ansicht nach eine vererbare Schlüsselfunktion in einem epigenetischen System darstellen und hier die verschiedenen komplexen Interaktionen die über DNA-Methylierungsmuster, Chromatinstruktur und entwicklungsphasenabhängige Genexpression beeinflusst werden, steuern (Phillips and Corces, 2009).

4.3 Flussabwärts von HSS-4, -5 und -6 identifizierte Gene

Im Verlauf der Arbeit an dem Genomprojekt des Menschen wurde auch die genomische Sequenz des humanen Chromosom 22 entschlüsselt (Dunham et al., 1999; Venter et al., 2001; Lander et al., 2001). Mit der Kenntnis der gesamten genomischen DNA Sequenz war es nun möglich, bis dato unbekannte Gene zu identifizieren. Mit Programmen wie GRAIL (Uberbacher and Mural, 1991) und GENSCAN (<http://CCR-081.mit.edu/GENSCAN.html>) lassen sich potentielle Exons in der nun bekannten DNA-Sequenz aufspüren. So ließen sich auch in unmittelbarer Nachbarschaft des $Ig\lambda$ -Locus flussabwärts in einem Bereich von ca. 150 kb drei Gene identifizieren: GNAZ, RTDR1 und ein putatives Gen für einen Na^+ -Glucose Cotransporter (siehe Abb.31).

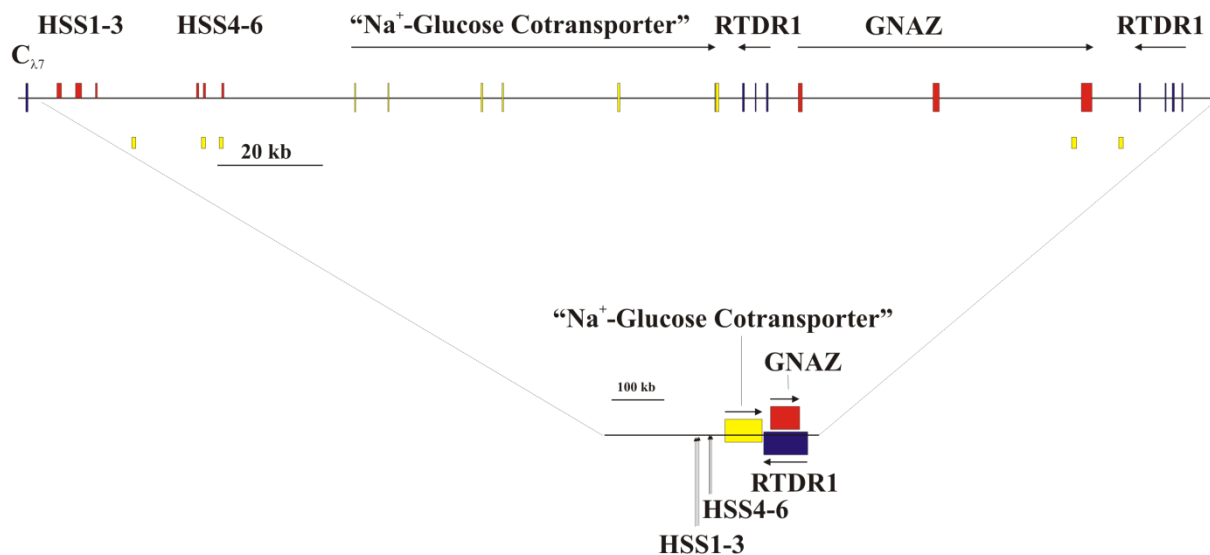


Abb. 31: Die Gene flussabwärts von HSS-4,-5 und -6

Dargestellt ist ein circa 150 kb umfassende Bereich flussabwärts des Gensegment $C_{\lambda 7}$. Zu erkennen sind als rote Kästchen über der Basislinie die HSS 1-6. Bei den nachfolgenden vertikalen Kästchen handelt es sich um die Exons der bezeichneten Gene. Gelb eingezeichnet sind die Exons des Na⁺-Glucose Cotransporters, blau die Exons des RTDR1-Gens und als rot die drei Exons des GNAZ-Gens. Die schwarzen Pfeile beschreiben die Transkriptionsrichtung der zugehörigen Gene. Die fünf gelben Kästchen beschreiben die Lokalisation der in diesem DNA-Bereich von Ren und Kollegen mit Hilfe von ChIp-on-chip Experimenten identifizierte CTCF-Binding sites (CTS) (Kim et al., 2007).

Bei dem ersten flussabwärts gelegenen Gen, bestehend aus 6 Exons, handelt es sich DNA-Sequenzvergleichen zufolge wahrscheinlich um ein Gen für einen Na⁺-Glucose Cotransporter. Die Expression dieses Gens konnte bisher jedoch in keinem Zelltyp nachgewiesen werden, weshalb man von einem putativen Gen sprechen sollte. Die Startposition des codierenden Bereichs dieses putativen Gens befindet sich 61.8 kb flussabwärts von $C_{\lambda 7}$. In Relation zu den DNase I hypersensitiven Bereichen befindet es sich somit 24.6 kb flussabwärts von HSS-6 und 48.4 kb entfernt von HSS-3, dem Igl_λ-Enhancer. Weiter flussabwärts auf dem Gegenstrang und dort einen Bereich von 81.5 kb genomischer Sequenz umfassend, finden sich sieben weitere Exons (Zhou et al., 2000). Sie gehören zu einem Gen, welches die Bezeichnung RTDR1 trägt. Aufgrund der Entdeckung, dass in Rhabdomyosarkomzellen Deletionen in diesem Bereich gehäuft auftreten (Biegel et al., 1996), erfolgte die Bezeichnung dieses Genes als *rhabdoid tumor deletion region 1*. Mutationen der Aminosäuresequenz dieses Gens ließen sich bei rhabdoiden Tumoren nicht nachweisen, allerdings scheinen Polymorphismen zu

existieren, die ein familiär gehäuftes Auftreten bestimmter Tumorentitäten erklären könnten (Zhou et al., 2000).

Durch Analyse der cDNA konnte gezeigt werden, dass die Exons für ein 348 Aminosäuren großes Protein codieren (Zhou et al., 2000). Es hätte demnach eine abschätzbare ungefähre Größe von ~38 kDa. Sequenzhomologievergleiche zeigen, dass eingeschränkte (27%) Homologien nur zu einem bekannten Gen, dem VAC8 Gen der Hefe, bestehen (Wang et al., 1998). Bei der Hefe ist dieses Protein für den Transport einer Aminopeptidase vom Zytoplasma in bestimmte Vakuolen verantwortlich. Die Bedeutung dieses Proteins für den Menschen liegt jedoch im Unklaren. Exon 7 befindet sich 136.8 kb 3' von C λ 7 und somit 123.4 kb vom Ig λ -Enhancer entfernt.

Bei dem dritten flussabwärts des Ig λ -Locus entdeckten Gen handelt es sich um GNAZ (*guanine nucleotide binding protein (G Protein), alpha z polypeptide*). Dieses Gen codiert für die α Untereinheit (G α) einer Subfamilie der G-Proteine, die gegenüber Pertussis Toxinen unempfindlich ist (Matsuoka et al., 1990). G-Proteine stellen eine Gruppe unterschiedlicher GTP-bindender Proteine dar, die aus jeweils drei Untereinheiten bestehen: der α , β und γ Untereinheit. Die α Untereinheit enthält dabei die Guanin-Nukleotid-Bindungsstelle und ist spezifisch für die jeweilige G-Protein Subfamilie. Dahingehend sind β und γ Untereinheit innerhalb der G-Protein Subfamilien relativ austauschbar. G-Proteine sind beispielsweise an zahlreichen Prozessen der transmembranösen Signaltransduktion beteiligt. Die G-Protein Subfamilie, von der GNAZ die α Untereinheit darstellt, wird in Gehirn und Retina exprimiert und spielt eine kritische Rolle bei der Ionenverteilung von Perilymphe und Endolymphe im Innenohr (Magovcevic et al., 1995). Das Gen besteht aus drei Exons und zwei Introns und umfaßt einen Bereich von circa 60 kb. Wie aus der Abbildung zu entnehmen, befindet sich das Gen auf dem gegenläufigen Strang und in gegenläufiger Orientierung wie RTDR1, allerdings in etwa gleicher Entfernung zu dem Ig λ -Locus. Der Beginn von Exon 1 befindet sich 147.2 kb flussabwärts von C λ 7 und 133.9 kb entfernt von der HSS-3. Die Darstellung der flussabwärts von HSS-4 bis -6 gelegenen Gene und der ihnen nach aktuellem Wissenstand zuzuweisenden Funktionen zeigt, dass hier sicherlich keinerlei Co-Expression mit den Ig λ -Genen möglich ist.

4.4 Bekannte Funktionen von HSS -4 bis -6

Frau S. Svoboda versuchte im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Svoboda, 1999) am Adolf-Butenandt-Institut die Funktion dieser drei DNase I hypersensitiven Bereiche HSS-4, -5, -6 näher zu charakterisieren. Dazu führte sie Klonierungen und transiente Transfektionsversuche durch, bei denen die Aktivität verschiedener Reporter-genkonstrukte gemessen wurde. Als Reporter-gen diente das Luciferase-Gen von *Photinus pyralis*. Mit diesen Versuchen konnte weder für HSS-4, -5 oder -6 eine Promotortätigkeit nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Enhancer/Silencer Funktion wurden die HSS-4, -5 und -6 einzeln und in verschiedenen Kombinationen in Vektoren kloniert, die entweder über einen B-zellspezifischen Enhancer bzw. über den ubiquitären SV40-Promotor verfügten. Es konnte gezeigt werden, dass keine dieser HSS's in diesem Fall einen Einfluss auf die Expression des Reporter-gens hat (Svoboda, 1999). Die HSS wurden wie folgt kloniert: in beiden Orientierungen und in allen möglichen Kombinationen gemäß ihrer natürlichen Orientierung und Reihenfolge. Alle diese Konstrukte zeigten eine Expressionserniedrigung des Reporter-gens. Noch eindrucksvoller war die Expressionserniedrigung, wenn in die Konstrukte mit B-Zellspezifischem Promotor bzw. SV40 Promotor und jeweils HSS-4,-5 und -6 in Originalorientierung zusätzlich die als Enhancer bekannte HSS-3 kloniert wurde. Diese Konstrukte mit allen vier HSS zeigten eine Expressionserniedrigung der Luciferase auf ein Drittel des Ausgangswertes, der mit Plasmiden erreicht wurden, die nur das Enhancer Element HSS-3 enthielten. Entsprechend dieser Versuchsergebnisse könnte man annehmen, dass es sich bei HSS-4, -5 und -6 um ein Silencer Element handelt. Deren Vorhandensein in der B-Zelle in einer solchen Lokalisation als negativer Regulator der stattfindenden massiven Expression von Antikörpern wäre durchaus zu erwarten. Zumal beim Huhn Silencer Elemente beschrieben wurden, die an der negativen Kontrolle des I γ -Locus beteiligt sind (Lauster et al., 1993).

Einen anderen Erklärungsversuch für diese Expressionserniedrigung würde auch die Tatsache liefern, dass sich im Bereich der HSS-4 bis -6 Insulator/Boundary Elemente befinden.

4.5 Die Funktion eines Insulator-Elementes im Kontext von HSS-4, -5 und -6

Im Aufbau des β -Globin-Locus des Huhns und des $Ig\lambda$ -Locus sind einige Parallelen zu erkennen. Bei beiden Loci befinden sich an der Grenze eines Genclusters CTCF-Bindungsstellen. Im Falle des β -Globin-Locus schützt ein sich dort befindendes Insulator/Boundary-Element im Bereich der HS4 benachbarte Gene vor dem β -Globin Enhancer und bewahrt zugleich das β -Globin-Gencluster vor einer Ausdehnung des kondensierten Verpackungszustandes seiner Umgebung (siehe Abb. 30). Im 3' Bereich befindet(n) sich die CTCF Bindungsstelle(n) zwischen dem β -Globin-Enhancer und den CORs, beziehungsweise zwischen $Ig\lambda$ -Enhancer und drei weiteren Genen. Bei den COR's des β -Globin-Locus handelt es sich um Gene für einen Geruchsrezeptor, im Falle des $Ig\lambda$ -Locus um die Gene: GNAZ, RTDR1 und einem putativen Gen für einen Na^+ -Glucose Cotransporter. In beiden Fällen werden diese Gene sicherlich unabhängig reguliert und vor den Einflüssen eines jeweils 5' gelegenen Enhancers geschützt.

Bei dem gesamten flussabwärts der $C\lambda 7$ -Gene des $Ig\lambda$ -Locus gelegenen Bereich findet sich eine über Speziesgrenzen hinaus weitestgehend konservierte DNA-Sequenz. So fand eine nahezu exakte Konservierung der Konstellation von $Ig\lambda$ -Gensegmenten, DNase I hypersensitiven Bereichen und weiter flussabwärts gelegenen Genen RTDR1 und GNAZ bei Mensch, Alt- und Neuweltaffen bis hin zum Haushund statt (H.-G. Klobeck, persönliche Mitteilung). Diese Konservierung spricht zusätzlich dafür, dass es sich hierbei sicherlich nicht um eine zufällige Anordnung regulatorischer DNA-Elemente und Gene handelt.

Wie dieser Schutz beim β -Globin Locus erfolgt, konnte in Reportergergen Assays gezeigt werden. Bei dem $Ig\lambda$ -Locus war dies bisher unklar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei CTCF-Bindungsstellen entdeckt werden. Eine mit Hilfe von Gelretardierungsassays im Bereich der HSS-6 und eine über Sequenzhomologievergleiche im Bereich der HSS-5. So lässt sich auch in diesem Bereich zwischen $Ig\lambda$ -Enhancer und anderen Genen ein Insulator/Boundary-Element postulieren (siehe Abb. 32). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Ren und Kollegen. Sie konnten mit Hilfe von ChIp-on-chip und computergestützten Analysen zeigen, dass sich in vivo im Bereich von HSS-5 und-6 zwei CTCF-Bindungsstellen befinden (Kim et al., 2007) (siehe Abb. 31). Natürlich ist der Nachweis einer CTCF-Bindungsstelle nicht unmittelbar mit einer bestimmten Funktion verknüpft.

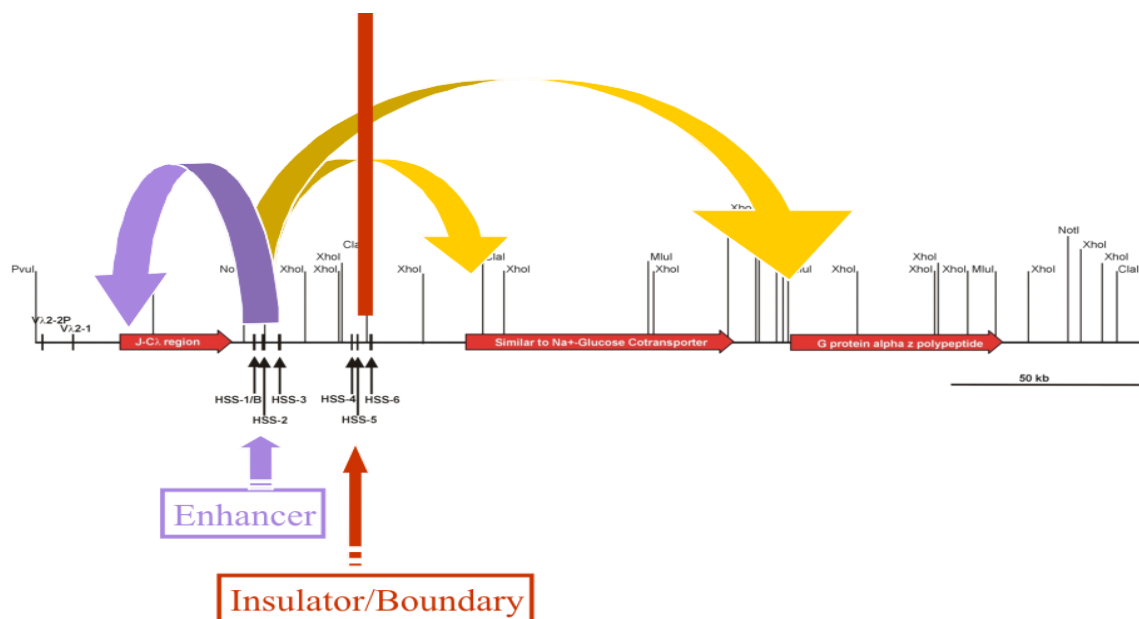


Abb. 32: Darstellung der möglichen Funktionsweise eines Insulator/Boundary-Elementes im 3' Bereich des $Ig\lambda$ -Locus

Dargestellt sind die regulatorischen Elemente und Gene in dem Bereich flussabwärts zwischen der J-C λ Region (horizontaler roter Pfeil) und zwei weiteren Genen (ebenfalls zwei horizontale rote Pfeile).

Die regulatorischen Einflüsse des $Ig\lambda$ -Enhancers auf seine Umgebung sind ebenfalls durch Pfeile dargestellt. Der Abschirmung flussabwärts gelegenen Gene (roter Balken) vor den Einflüssen des $Ig\lambda$ -Enhancers (blaue Pfeile) wurde ebenfalls stilisiert dargestellt.

Um zu zeigen, dass CTCF in diesem Bereich die weiter flussabwärts gelegenen Gene vor den Einflüssen des $Ig\lambda$ -Enhancers schützt, wäre es möglich, die als CTCF-Bindungsstellen identifizierte Teilbereiche der HSS-5 und -6 in Reporterger Assays auf ihre Funktion hin zu überprüfen. In einem geeigneten experimentellen Ansatz könnte beispielsweise der Einfluss dieser CTS auf ein Reporterger und dessen Abschirmung gegen die Einflüsse eines Enhancer überprüft werden. Die Durchführung dieser Versuche ist bereits für nachfolgende Arbeiten in der Arbeitsgruppe H.-G. Klobeck geplant.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeitsgruppe H.G. Klobeck beschäftigt sich seit Jahren mit dem Ig λ -Locus des Menschen und dessen regulatorischer Kontrolle. Dieser Locus befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 22. Flussabwärts der J-C λ -Elemente finden sich mehrere DNase I hypersensitive Bereiche (HSS`s). Diese wurden in der Reihenfolge ihres Auftretens nummerisch von 5' nach 3' fortlaufend als HSS 1 bis 6 benannt (Asenbauer and Klobeck, 1996). Dabei stellt die in diesem Bereich gelegene DNase I HSS-3 einen mit HSS-2 und HSS-1 auf die Immunglobulingene synergistisch wirkenden Enhancer dar (Asenbauer et al., 1999), der eine Einschränkung seiner Wirkung auf die unabhängig exprimierte flussabwärts gelegenen Gene erfahren muss. Eine solche „Enhancer blockierende Funktion“ würde(n) ein Insulator/Boundary Element(e) übernehmen (Burgess-Beusse et al., 2002; Felsenfeld et al., 2004) (siehe Abb. 32). Nach aktuellem Wissensstand müssten dann innerhalb der regulatorischen Elemente auch CTCF-Bindungsstellen (CTS) nachweisbar sein (Bell et al., 1999; Phillips and Corces, 2009). Die Suche nach solchen CTCF-Bindungsstellen war Ausgangspunkt dieser Arbeit.

In vorherigen Arbeiten war es zwar bereits gelungen, eine Eingrenzung der Funktionsweise von HSS-4, -5 und -6 vorzunehmen, im Detail blieb die genaue Funktion jedoch im Unklaren (Svoboda, 1999; Kraißer, 2002). Erst im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es mit Hilfe von EMSA und Supershift Assays in vitro tatsächlich innerhalb eines 72 bp großen Teilbereichs der HSS-6 eine CTCF-Bindungsstellen zu identifizieren. Sequenzhomologievergleiche dieser CTS mit der bekannten DNA-Sequenz von HSS-4 und -5 lieferten Hinweise auf eine weitere CTCF-Bindungsstelle im Bereich der HSS-5. Diese Ergebnisse stimmten mit denen von einer anderen Arbeitsgruppe mit Hilfe von ChIP-on-chip gesammelten Daten weitestgehend überein (Kim et al., 2007). Eine Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit lässt die Aussage zu, dass Insulator/Boundary Elemente im Bereich der HSS-5 und HSS-6 die weiter flussabwärts gelegenen Genen vor den inadäquaten Einflüssen des Ig λ -Enhancer schützen und dass es sich bei diesen beiden CTS um die neu zu definierende tatsächliche 3' Grenze des Ig λ -Locus handelt.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers

Abb. 2: Darstellung des modularen Aufbaus der Immunglobulingene

Abb. 3: Die Stadien der B-Zellentwicklung

Abb. 4: Verpackungseinheiten der DNA

Abb. 5: Das Nukleosom und Möglichkeiten der Modifikation von Histonschwänzen

Abb. 6: Darstellung der Position von HSS-1 bis -6

Abb. 7: Zelltypspezifische Expression DNase I hypersensitiver Bereiche flussabwärts von $C_{\lambda}7$

Abb. 8: Schematischer Struktur des Zinkfingerproteins CTCF

Abb. 9: Der Bereich flussabwärts von $C_{\lambda}7$

Abb. 10: DNA-Sequenz von HSS-4, -5 und -6

Abb. 11: PCR der HSS-4, -5 und -6

Abb. 12: Nachweis von CTCF in Zellkernextrakten aus verschiedenen Zelllinien

Abb. 13: Nachweis von CTCF in BJAB-Zellkernextrakt

Abb. 14: c-myc Promotorbereiche

Abb. 15: PCR des Myc A- und Myc B-Fragmentes

Abb. 16: Darstellung der Bandenvielfalt anhand eines EMSA mit der HSS-4

Abb. 17: Titration des Kompetitors Poly (dI-dC)

Abb. 18: Darstellung des Plasmids pGEX-4T1-CTCF

Abb. 19: Abbau des GST-CTCF-Fusionsproteins

Abb. 20: EMSA des Myc A-Fragmentes in Anwesenheit von SP-1 und AP-2

Abb. 21: Darstellung einer möglichen Konsensussequenz

Abb. 22: Das HSS-6/18er-Fragment

Abb. 23: PCR des 72 bp großen 6/18er-Fragments

Abb. 24: Titration verschiedener Kompetitoren anhand des HSS-6/18er-Fragments

Abb. 25a/b: Titration des Konzentrationsverhältnisses von Antikörper und Zellkernextrakt anhand des Myc-A und Myc-B Fragmentes

Abb. 26: Vergleich der Kompetitoren SP-1 und AP-2 beim Supershift Assay

Abb.27: Supershift der CTCF Bande

Abb.28: Sequenz der CTCF-Bindungsstellen im Bereich von HSS-5 und -6

Abb.29: ChIp-on-chip

Abb.30: Schematische Darstellung des β -Globin-Locus des Huhns

Abb.31: Die Gene flussabwärts von HSS-4,-5 und -6

Abb.32: Darstellung der möglichen Funktionsweise eines Insulator/Boundary-Elementes im 3' Bereich des Ig λ -Locus

TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1: Unterschiedliche Anzahl der Gensegmente in den verschiedenen Ig- Loci des Menschen

Tab.2: Nachweis der HSS-4, -5 und -6 in verschiedenen Zelllinien

Tab.3: Übersicht über die für die Präparation von Zellkernextrakten verwendeten Zelllinien

Tab.4: Bei PCR's verwendete Primersequenzen

Tab.5: PCR-Zyklusprofil

Tab.6: Sequenz der komplementären Oligonukleotide SP-1 und AP-2

Tab.7: CTCF-Konsensussequenz

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel [Zerfall/sec]
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Gensegment für den konstanten Teil einer Immunglobulinkette ("constant")
ChIp	Chromatin-Immunopräzipitation
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i> (CCCTC-Bindefaktor)

C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTS	CTCF <i>target site</i> (CTCF-Bindungsstelle)
D	Ein Gensegment für den variablen Teil einer Immunglobulinkette ("diversity")
Da	Dalton [g/Mol]
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure ("deoxyribonucleid acid")
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP (s)	Desoxyribonucleosid-Triphosphat(e)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
GE	Gelelektrophorese
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde(n)
H	Schwere Immunglobulinkette ("heavy")
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyetyl)-1-piperazinethan-Sulfonsäure
HMT	Histonmethyltransferase
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSS	Hypersensitiver Bereich ("hypersensitive site")
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
J	Ein Gensegment für den variablen Teil einer Immunglobulinkette ("joining")
k	kilo [10 ³]
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Leichte Immunglobulinkette
LCR	Locus control region
m	milli [10 ⁻³]
M	Molar [mol/l]
MAR	<i>nuclear matrix attachment region</i> (Kernmatrix-angelagerte Regionen)
min	Minute
MW	Molekulargewicht
μ	mikro [10 ⁻⁶]
n	nano [10 ⁻⁹]
NE	nuclear extract / Zellkernextrakt
NP40	Nonidet P40; Ethylenphenyl-Polyethylenglycol

N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORs	<i>(chicken) olfactory receptor genes</i>
p	pico [10^{-12}]
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSS	<i>recombination signal sequences</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV40	Simian-Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',n`-Tetramethyldiamin
TRE	<i>Thyroid hormone response elements</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
Tween 80	Polyoxyethylensorbitan-monooleat
u	<i>unit</i> (Einheit)
UV	Ultraviolettes Licht (Wellenlänge < 340 nm)
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt (Spannung)
(v/v)	Volumenanteile
W	Watt (Leistung)
(w/v)	Masse pro Volumen
(w/w)	Massenanteile
V	ein Gensegment für den variablen Teil einer Immunglobulinkette ("variable")

LITERATURVERZEICHNIS

- Aden,D.P., Fogel,A., Plotkin,S., Damjanov,I., and Knowles,B.B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-616.
- Allfrey,V.G., Faulkner,R., and Mirsky,A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 51, 786-794.
- Asenbauer,H., Combriato,G., and Klobeck,H.G. (1999). The immunoglobulin lambda light chain enhancer consists of three modules which synergize in activation of transcription. *Eur. J. Immunol.* 29, 713-724.
- Asenbauer,H. and Klobeck,H.G. (1996). Tissue-specific deoxyribonuclease I-hypersensitive sites in the vicinity of the immunoglobulin C lambda cluster of man. *Eur. J. Immunol.* 26, 142-150.
- Babu,M.M., Janga,S.C., de,S., I, and Pombo,A. (2008). Eukaryotic gene regulation in three dimensions and its impact on genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 571-582.
- 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.
- Bartova,E., Krejci,J., Harnicarova,A., Galiova,G., and Kozubek,S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 711-721.
- Baumann,M., Mamais,A., McBlane,F., Xiao,H., and Boyes,J. (2003). Regulation of V(D)J recombination by nucleosome positioning at recombination signal sequences. *EMBO J.* 22, 5197-5207.
- Becker,P.B. and Horz,W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 247-273.
- Bell,A.C. and Felsenfeld,G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405, 482-485.
- Bell,A.C., West,A.G., and Felsenfeld,G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387-396.
- Biegel,J.A., Allen,C.S., Kawasaki,K., Shimizu,N., Budarf,M.L., and Bell,C.J. (1996). Narrowing the critical region for a rhabdoid tumor locus in 22q11. *Genes Chromosomes. Cancer* 16, 94-105.

- Blomberg,B.B., Rudin,C.M., and Storb,U. (1991). Identification and localization of an enhancer for the human lambda L chain Ig gene complex. *J. Immunol.* *147*, 2354-2358.
- Buettner,R., Moser,M., Pscherer,A., Imhof,A., Bauer,R., and Hofstaedter,F. (1994). [Molecular cloning of a new AP-2 transcription factor, AP-2beta, and its function in cell differentiation]. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* *78*, 38-42.
- Burcin,M., Arnold,R., Lutz,M., Kaiser,B., Runge,D., Lottspeich,F., Filippova,G.N., Lobanenkova,V.V., and Renkawitz,R. (1997). Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol. Cell Biol.* *17*, 1281-1288.
- Burgess-Beusse,B., Farrell,C., Gaszner,M., Litt,M., Mutskov,V., Recillas-Targa,F., Simpson,M., West,A., and Felsenfeld,G. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99 Suppl 4*, 16433-16437.
- Burke,L.J., Zhang,R., Lutz,M., and Renkawitz,R. (2002). The thyroid hormone receptor and the insulator protein CTCF: two different factors with overlapping functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *83*, 49-57.
- Busslinger,M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 55-79.
- Busslinger,M., Nutt,S.L., and Rolink,A.G. (2000). Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 151-158.
- Capelson,M. and Corces,V.G. (2004). Boundary elements and nuclear organization. *Biol. Cell* *96*, 617-629.
- Chernukhin,I.V., Shamsuddin,S., Robinson,A.F., Carne,A.F., Paul,A., El-Kady,A.I., Lobanenkova,V.V., and Klenova,E.M. (2000). Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF. *J. Biol. Chem.* *275*, 29915-29921.
- Chung,J.H., Bell,A.C., and Felsenfeld,G. (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 575-580.
- Chung,J.H., Whiteley,M., and Felsenfeld,G. (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* *74*, 505-514.
- Clements,G.B., Klein,G., and Povey,S. (1975). Production by EBV infection of an EBNA-positive subline from an EBNA-negative human lymphoma cell line without detectable EBV DNA. *Int. J. Cancer* *16*, 125-133.
- Collins,S.J., Gallo,R.C., and Gallagher,R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* *270*, 347-349.

- Combriato,G. and Klobeck,H.G. (1991). V lambda and J lambda-C lambda gene segments of the human immunoglobulin lambda light chain locus are separated by 14 kb and rearrange by a deletion mechanism. *Eur. J. Immunol.* *21*, 1513-1522.
- Combriato,G. and Klobeck,H.G. (2002). Regulation of human Ig lambda light chain gene expression by NF-kappa B. *J. Immunol.* *168*, 1259-1266.
- Defosseze,P.A., Kelly,K.F., Filion,G.J., Perez-Torrado,R., Magdinier,F., Menoni,H., Nordgaard,C.L., Daniel,J.M., and Gilson,E. (2005). The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *J. Biol. Chem.* *280*, 43017-43023.
- Dunham,I., Shimizu,N., Roe,B.A., Chissoe,S., Hunt,A.R., Collins,J.E., Bruskiwich,R., Beare,D.M., Clamp,M., Smink,L.J., Ainscough,R., Almeida,J.P., Babbage,A., Bagguley,C., Bailey,J., Barlow,K., Bates,K.N., Beasley,O., Bird,C.P., Blakey,S., Bridgeman,A.M., Buck,D., Burgess,J., Burrill,W.D., O'Brien,K.P., and . (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* *402*, 489-495.
- Dunn,K.L. and Davie,J.R. (2003). The many roles of the transcriptional regulator CTCF. *Biochem. Cell Biol.* *81*, 161-167.
- Early,P., Huang,H., Davis,M., Calame,K., and Hood,L. (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* *19*, 981-992.
- Eberharter,A. and Becker,P.B. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J. Cell Sci.* *117*, 3707-3711.
- Eberharter,A., Ferreira,R., and Becker,P. (2005). Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. *Biol. Chem.* *386*, 745-751.
- Felsenfeld,G., Burgess-Beusse,B., Farrell,C., Gaszner,M., Ghirlando,R., Huang,S., Jin,C., Litt,M., Magdinier,F., Mutskov,V., Nakatani,Y., Tagami,H., West,A., and Yusufzai,T. (2004). Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *69*, 245-250.
- Filippova,G.N., Fagerlie,S., Klenova,E.M., Myers,C., Dehner,Y., Goodwin,G., Neiman,P.E., Collins,S.J., and Lobanenkov,V.V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell Biol.* *16*, 2802-2813.
- Findley-HW,J., Cooper,M.D., Kim,T.H., Alvarado,C., and Ragab,A.H. (1982). Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. *Blood* *60*, 1305-1309.
- Foley,G.E., Lazarus,H., Farber,S., Uzman,B.G., Boone,B.A., and McCarthy,R.F. (1965). Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* *18*, 522-529.

- Fraser,P. and Bickmore,W. (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447, 413-417.
- Fugmann,S.D., Lee,A.I., Shockett,P.E., Villey,I.J., and Schatz,D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 495-527.
- Gaszner,M. and Felsenfeld,G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 7, 703-713.
- Gellert,M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 101-132.
- Golding,A., Chandler,S., Ballestar,E., Wolffe,A.P., and Schlissel,M.S. (1999). Nucleosome structure completely inhibits in vitro cleavage by the V(D)J recombinase. *EMBO J.* 18, 3712-3723.
- Gombert,W.M., Farris,S.D., Rubio,E.D., Morey-Rosler,K.M., Schubach,W.H., and Krumm,A. (2003). The c-myc insulator element and matrix attachment regions define the c-myc chromosomal domain. *Mol. Cell Biol.* 23, 9338-9348.
- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Gross,J.L., Behrens,D.L., Mullins,D.E., Kornblith,P.L., and Dexter,D.L. (1988). Plasminogen activator and inhibitor activity in human glioma cells and modulation by sodium butyrate. *Cancer Res.* 48, 291-296.
- Hansen,J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 361-392.
- Hark,A.T., Schoenherr,C.J., Katz,D.J., Ingram,R.S., Levorse,J.M., and Tilghman,S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486-489.
- Hellman,L.M. and Fried,M.G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* 2, 1849-1861.
- Hilger-Eversheim,K., Moser,M., Schorle,H., and Buettner,R. (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260, 1-12.
- Hogan,C. and Varga-Weisz,P. (2007). The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors. *Mutat. Res.* 618, 41-51.
- Holmgren,C., Kanduri,C., Dell,G., Ward,A., Mukhopadhyay,R., Kanduri,M., Lobanenkova,V., and Ohlsson,R. (2001). CpG methylation regulates the Igf2/H19 insulator. *Curr. Biol.* 11, 1128-1130.

- 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. Genet.* 3, e112.
- Hozumi,N. and Tonegawa,S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73, 3628-3632.
- Hurwitz,R., Hozier,J., LeBien,T., Minowada,J., Gajl,P.K., Kubonishi,I., and Kersey,J. (1979). Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int. J. Cancer* 23, 174-180.
- Inoue,H., Nojima,H., and Okayama,H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Janeway, Ch. A and Travers, P. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1-1-1997.
Ref Type: Generic
- Jung,D., Giallourakis,C., Mostoslavsky,R., and Alt,F.W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 541-570.
- Kadonaga,J.T., Carner,K.R., Masiarz,F.R., and Tjian,R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-1090.
- Kanduri,C., Fitzpatrick,G., Mukhopadhyay,R., Kanduri,M., Lobanekov,V., Higgins,M., and Ohlsson,R. (2002). A differentially methylated imprinting control region within the *Kcnq1* locus harbors a methylation-sensitive chromatin insulator. *J. Biol. Chem.* 277, 18106-18110.
- Kanduri,C., Pant,V., Loukinov,D., Pugacheva,E., Qi,C.F., Wolffe,A., Ohlsson,R., and Lobanekov,V.V. (2000). Functional association of CTCF with the insulator upstream of the *H19* gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr. Biol.* 10, 853-856.
- Kawasaki,K., Minoshima,S., Nakato,E., Shibuya,K., Shintani,A., Asakawa,S., Sasaki,T., Klobeck,H.G., Combriato,G., Zachau,H.G., and Shimizu,N. (2001). Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the *Vkappa* genes. *Eur. J. Immunol.* 31, 1017-1028.
- Kawasaki,K., Minoshima,S., Nakato,E., Shibuya,K., Shintani,A., Schmeits,J.L., Wang,J., and Shimizu,N. (1997). One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res.* 7, 250-261.
- Kim,J., Kollhoff,A., Bergmann,A., and Stubbs,L. (2003). Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, *Peg3*. *Hum. Mol. Genet.* 12, 233-245.

Kim, T.H., Abdullaev, Z.K., Smith, A.D., Ching, K.A., Loukinov, D.I., Green, R.D., Zhang, M.Q., Lobanekov, V.V., and Ren, B. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128, 1231-1245.

Kim, T.H. and Ren, B. (2006). Genome-wide analysis of protein-DNA interactions. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7, 81-102.

Klenova, E.M., Nicolas, R.H., Paterson, H.F., Carne, A.F., Heath, C.M., Goodwin, G.H., Neiman, P.E., and Lobanekov, V.V. (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell Biol.* 13, 7612-7624.

Klenova, E.M., Nicolas, R.H., U S, Carne, A.F., Lee, R.E., Lobanekov, V.V., and Goodwin, G.H. (1997). Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. *Nucleic Acids Res.* 25, 466-474.

Knoepfler, P.S. and Eisenman, R.N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-450.

Knowles, B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.

Kohne, A.C., Baniahmad, A., and Renkawitz, R. (1993). NeP1. A ubiquitous transcription factor synergizes with v-ERBA in transcriptional silencing. *J. Mol. Biol.* 232, 747-755.

Kraißer, P. Charakterisierung von HSS-2, einer B-zell-spezifischen, regulatorischen DNA-Sequenz im Bereich des Ig lambda-Enhancers des Menschen. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. 2002.

Ref Type: Generic

Krumm, A., Meulia, T., Brunvand, M., and Groudine, M. (1992). The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev.* 6, 2201-2213.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T.,

Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la, B.M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korfi, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrino, A., Morgan, M.J., de, J.P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., and Chen, Y.J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Langst, G. and Becker, P.B. (2004). Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim. Biophys. Acta* 1677, 58-63.

Lauster, R., Reynaud, C.A., Martensson, I.L., Peter, A., Bucchini, D., Jami, J., and Weill, J.C. (1993). Promoter, enhancer and silencer elements regulate rearrangement of an immunoglobulin transgene. *EMBO J.* 12, 4615-4623.

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.

Lobanenkov, V.V., Nicolas, R.H., Plumb, M.A., Wright, C.A., and Goodwin, G.H. (1986). Sequence-specific DNA-binding proteins which interact with (G + C)-rich sequences flanking the chicken c-myc gene. *Eur. J. Biochem.* 159, 181-188.

Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.

- Lutz,M., Baniahmad,A., and Renkawitz,R. (2000). Modulation of thyroid hormone receptor silencing function by co-repressors and a synergizing transcription factor. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 386-389.
- Lutz,M., Burke,L.J., LeFevre,P., Myers,F.A., Thorne,A.W., Crane-Robinson,C., Bonifer,C., Filippova,G.N., Lobanenkova,V., and Renkawitz,R. (2003). Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor. *EMBO J.* 22, 1579-1587.
- Maeda,R.K. and Karch,F. (2007). Making connections: boundaries and insulators in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 394-399.
- Magdinier,F., Yusufzai,T.M., and Felsenfeld,G. (2004). Both CTCF-dependent and -independent insulators are found between the mouse T cell receptor alpha and *Dad1* genes. *J. Biol. Chem.* 279, 25381-25389.
- Magovcevic,I., Khetarpal,U., Bieber,F.R., and Morton,C.C. (1995). GNAZ in human fetal cochlea: expression, localization, and potential role in inner ear function. *Hear. Res.* 90, 55-64.
- Matsuda,F., Ishii,K., Bourvagnet,P., Kuma,K., Hayashida,H., Miyata,T., and Honjo,T. (1998). The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J. Exp. Med.* 188, 2151-2162.
- Matsuoka,M., Itoh,H., and Kaziro,Y. (1990). Characterization of the human gene for Gx alpha, a pertussis toxin-insensitive regulatory GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265, 13215-13220.
- Matsuoka,Y., Moore,G.E., Yagi,Y., and Pressman,D. (1967). Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125, 1246-1250.
- McMurry,M.T. and Krangel,M.S. (2000). A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science* 287, 495-498.
- Meffre,E., Casellas,R., and Nussenzweig,M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 1, 379-385.
- Minowada,J., Onuma,T., and Moore,G.E. (1972). Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 891-895.
- Mitchell,P.J., Wang,C., and Tjian,R. (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847-861.
- Mohan,M., Bartkuhn,M., Herold,M., Philippen,A., Heintz,N., Bardenhagen,I., Leers,J., White,R.A., Renkawitz-Pohl,R., Saumweber,H., and Renkawitz,R. (2007). The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *EMBO J.* 26, 4203-4214.

- Moon,H., Filippova,G., Loukinov,D., Pugacheva,E., Chen,Q., Smith,S.T., Munhall,A., Grewe,B., Bartkuhn,M., Arnold,R., Burke,L.J., Renkawitz-Pohl,R., Ohlsson,R., Zhou,J., Renkawitz,R., and Lobanenkoy,V. (2005). CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep.* 6, 165-170.
- Nedospasov,S.A. and Georgiev,G.P. (1980). Non-random cleavage of SV40 DNA in the compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 532-539.
- Nightingale,K.P., Baumann,M., Eberharter,A., Mamais,A., Becker,P.B., and Boyes,J. (2007). Acetylation increases access of remodelling complexes to their nucleosome targets to enhance initiation of V(D)J recombination. *Nucleic Acids Res.* 35, 6311-6321.
- Ohlsson,R., Renkawitz,R., and Lobanenkoy,V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* 17, 520-527.
- Oulad-Abdelghani,M., Bouillet,P., Chazaud,C., Dolle,P., and Chambon,P. (1996). AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 225, 338-347.
- Pegoraro,L., Matera,L., Ritz,J., Levis,A., Palumbo,A., and Biagini,G. (1983). Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J. Natl. Cancer Inst.* 70, 447-453.
- Pegoraro,L., Palumbo,A., Erikson,J., Falda,M., Giovanazzo,B., Emanuel,B.S., Rovera,G., Nowell,P.C., and Croce,C.M. (1984). A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 7166-7170.
- Phillips,J.E. and Corces,V.G. (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137, 1194-1211.
- Pillai,S. and Chellappan,S.P. (2009). ChIP on chip assays: genome-wide analysis of transcription factor binding and histone modifications. *Methods Mol. Biol.* 523, 341-366.
- Pogo,B.G., Allfrey,V.G., and Mirsky,A.E. (1966). RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 55, 805-812.
- Pugacheva,E.M., Tiwari,V.K., Abdullaev,Z., Vostrov,A.A., Flanagan,P.T., Quitschke,W.W., Loukinov,D.I., Ohlsson,R., and Lobanenkoy,V.V. (2005). Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* 14, 953-965.

Roos,G., Adams,A., Giovanella,B., Lundgren,E., Nilsson,K., Nordenson,I., and Sundstrom,C. (1982). Establishment and characterization of a human EBV-negative B cell line (MN 60). *Leuk. Res.* *6*, 685-693.

Rosenfeld,C., Goutner,A., Choquet,C., Venuat,A.M., Kayibanda,B., Pico,J.L., and Greaves,M.F. (1977). Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* *267*, 841-843.

Roth,D.B. and Roth,S.Y. (2000). Unequal access: regulating V(D)J recombination through chromatin remodeling. *Cell* *103*, 699-702.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-491.

Sambrook, J Fritsch E. F. and Maniatis T. *Molecular cloning* 2nd edition. Cold Spring Harbour Press, New York, USA. 1-1-1989.

Ref Type: Generic

Schatz,D.G., Oettinger,M.A., and Schlissel,M.S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 359-383.

Scherer,W.F., Syverton,J.T., and Gey,G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* *97*, 695-710.

Schlissel,M.S. and Stanhope-Baker,P. (1997). Accessibility and the developmental regulation of V(D)J recombination. *Semin. Immunol.* *9*, 161-170.

Schreiber,E., Matthias,P., Muller,M.M., and Schaffner,W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* *17*, 6419.

Schwab,M., Alitalo,K., Klempnauer,K.H., Varmus,H.E., Bishop,J.M., Gilbert,F., Brodeur,G., Goldstein,M., and Trent,J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* *305*, 245-248.

Sellke Thomas , Bayarri M.J., and Berger James O. Calibration of p values for testing precise null hypotheses. *The American statistician*. 2001.

Ref Type: Generic

Sleckman,B.P., Gorman,J.R., and Alt,F.W. (1996). Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 459-481.

Smale,S.T. and Fisher,A.G. (2002). Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 427-462.

Svoboda, S. Regulatorische Elemente im Immunglobulin-Lambda-Locus des Menschen. Diplomarbeit der Fachhochschule Weihenstephan, Fachbereich Biotechnologie, durchgeführt am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München. 1999.
Ref Type: Generic

Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N., and Pirrotta, V. (1978). Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42 Pt 2, 921-931.

Tummala, R., Romano, R.A., Fuchs, E., and Sinha, S. (2003). Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene* 321, 93-102.

Turner, B.M. (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 110-112.

Uberbacher, E.C. and Mural, R.J. (1991). Locating protein-coding regions in human DNA sequences by a multiple sensor-neural network approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 11261-11265.

Valenzuela, L. and Kamakaka, R.T. (2006). Chromatin insulators. *Annu. Rev. Genet.* 40, 107-138.

van Driel, R., Fransz, P.F., and Verschure, P.J. (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J. Cell Sci.* 116, 4067-4075.

van Gent, D.C., Ramsden, D.A., and Gellert, M. (1996). The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* 85, 107-113.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., bu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di, F., V, Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S.,

Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratts,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M., Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B., Scott,R., Sitter,C., Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T., Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H., Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N., and Nodell,M. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Vostrov,A.A. and Quitschke,W.W. (1997). The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 272, 33353-33359.

Vostrov,A.A., Taheny,M.J., and Quitschke,W.W. (2002). A region to the N-terminal side of the CTCF zinc finger domain is essential for activating transcription from the amyloid precursor protein promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 1619-1627.

Wallace,J.A. and Felsenfeld,G. (2007). We gather together: insulators and genome organization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 400-407.

Wang,H.V., Vaupel,K., Buettner,R., Bosserhoff,A.K., and Moser,M. (2004). Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon. *Dev. Dyn.* 231, 128-135.

Wang,Y.X., Catlett,N.L., and Weisman,L.S. (1998). Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *J. Cell Biol.* 140, 1063-1074.

Werling,U. and Schorle,H. (2002). Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol. Cell Biol.* 22, 3149-3156.

Wu,C. (1980). The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* 286, 854-860.

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

Zhao,F., Lufkin,T., and Gelb,B.D. (2003). Expression of Tfap2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2 delta, during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns.* 3, 213-217.

Zhou,J., Fogelgren,B., Wang,Z., Roe,B.A., and Biegel,J.A. (2000). Isolation of genes from the rhabdoid tumor deletion region in chromosome band 22q11.2. *Gene* 241, 133-141.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.-G. Klobeck für seine Unterstützung und engagierte Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Adolf-Butenandt-Institutes für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Dabei gilt ein ganz besonderer Dank Irene Vetter und Maren Eckey für die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) bedanken, welche die finanziellen Rahmenbedingungen für die Durchführung dieser Arbeit geschaffen haben.

Nicht zu vergessen alle Freunde, die mich beim Schreiben dieser Arbeit moralisch unterstützt haben.

Meiner Familie und Jenny möchte ich für die Unterstützung, Geduld und Motivationshilfe in den letzten Jahren ganz besonders danken.

Persönliche Daten

Name: Sebastian Nagel
Geburtstag: 10.01.1979
Geburtsort: Neuwied
Nationalität: deutsch
Eltern:
Vater: Friedrich Nagel, Lehrer
Mutter: Waltraud Nagel, Lehrerin

Schulausbildung

1986 bis 1990 Grundschole in Andernach
1990 bis 2000 Kurfürst Salentin Gymnasium Andernach
Abschluss: Abitur

Zivildienst

09/1999-09/2000 Zivildienst im AWO Seniorenzentrum in 56575
Weißenthurm

Sonstiges

02/2001 Ausbildung zum Rettungssanitäter beim DRK
im Kreis Mayen – Koblenz

Einsatz als Rettungssanitäter beim DRK im
Kreis Mayen – Koblenz

Studium

seit 04/2002 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München (LMU)

04/2004 I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12/2008 II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

02/2005 Famulatur im Klinikum Großhadern (Hämatookologie)
09/2005 Famulatur im Klinikum München Schwabing (Infektiologie)
04/2006 Famulatur im Max-von-Pettenkofer Institut (Mikrobiologie)
09/2006 Famulatur im radiologischen Institut Schiller et. al. (Koblenz)

Experimentelle Dissertation

seit WS 04/05

Teilnahme am Promotionsstudiengang
„Molekularbiologie“

seit SS 05

Promotionsarbeit im Adolf -Butenandt Institut
Medizinische Fakultät der LMU,
Molekularbiologie**Promotionsthema:**„Untersuchung zur Funktion von DNase I
hypersensitiven Bereichen an der 3`Grenze der Igl-
Domäne im Sinne eines „Insulator/Boundary“
Elementes“**Praktisches Jahr:**

06/2007-10/2007

I. Tertial: Innere Medizin - Medizinische Klinik und
Poliklinik I Großhadern

10/2007-01/2008

II. Tertial: Allgemeine Chirurgie - Kreisklinik Altötting

02/2008-06/2008

III. Tertial: Frauenheilkunde - Kreisklinik Altötting

Beruf:

Seit 07/2009

Assistenzarzt Chirurgie – Kreiskliniken Altötting
Burghausen