

**CTCF, Lamin A/C und eine Histondeacetylase sind  
essentiell für die Positionierung des humanen  
CFTR-Gens an der Zellkernperipherie.**

Dissertation

an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von  
Joscha Sergej Muck  
Februar 2012

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Joscha Sergej Muck  
Schwalbach a.Ts., Februar 2012

**CTCF, Lamin A/C und eine Histondeacetylase sind essentiell für die  
Positionierung des humanen CFTR-Gens an der Zellkernperipherie.**

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität München

Vorgelegt von Dipl. Biochem. Joscha Sergej Muck

Dissertation vorgelegt am: 01.02.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012

Erstgutachter (extern):

Dr. Daniele Zink

Erstgutachter:

PD Dr. Steffen Dietzel

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Thomas Cremer

*Allein der Vortrag macht des Redners Glück;  
Ich fühl' es wohl, noch bin ich weit zurück.*

“Wagner“, Faust I;

Johann Wolfgang von Goethe  
(1749-1832)



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Radiale Zellkernarchitektur und Genpositionierung	7
1.2	Die radiale Positionierung von individuellen Genen	9
1.3	Proteinacetylierung und Trichostatin A	12
1.4	Histonacetylierung und der Histon-Code	14
1.5	Insulatoren und Chromatinschleifen formende Proteine	17
1.6	Konformation und Regulation des CFTR-Gens	20
1.7	Chromatininteraktionen an der Zellkernlamina	22
1.8	Actin und Myosin im Zellkern	25
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien und Lösungen	28
2.1.2	Stammlösungen und Medien	29
2.1.3	DNA-Chips	30
2.1.4	Kits	30
2.1.5	Farbstoffe, Auftragspuffer und Marker	30
2.1.6	Enzyme	31
2.1.7	Primäre Antikörper	31
2.1.8	Sekundäre Antikörper	33
2.1.9	Nukleotide, Nukleinsäuren	33
2.1.10	Oligonukleotide	34
2.1.11	DOP-PCR Markierungsprimer	41
2.1.12	siRNA	41
2.1.13	Lösungen und Puffer	42
2.1.14	Verbrauchsmittel	44
2.1.15	Hilfsmittel	45
2.1.16	Bakterien	45
2.1.17	Zelllinien	46
2.1.18	Geräte	48
2.1.19	Mikroskope	49
2.1.20	Kommerzielle Software	51
2.1.21	Freie Software	52
2.2	Methoden	53
2.2.1	Zellkultur	53
2.2.2	Methoden für die Erstellung von Präparaten für die Fluoreszenz- Mikroskopie	54
2.2.3	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	55
2.2.4	Zweidimensionale (2D) Erosionsanalyse	57
2.2.5	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) / Western Blot	59
2.2.6	Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP)	60
2.2.7	Design der DNA-Chips	62
2.2.8	Hybridisierung auf DNA-Chips	63
2.2.9	Scannen der DNA- Chips und Generierung der Rohdaten	64
2.2.10	Analyse der ChIP-chip-Daten	65
2.2.11	Regenerieren der DNA-Chips	69
2.2.12	Quantitative PCR (qPCR)	70

---

2.2.13	RNA-Interferenz.....	72
2.2.14	Ermittlung der Stichprobenverteilungen und Q-Q Plots .....	72
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
3.1	Kinetik der TSA-induzierten globalen Histonhyperacetylierung .....	74
3.2	Kinetik der TSA-induzierten CFTR-Repositionierung .....	78
3.3	Etablierung eines ChIP-chip-Protokolls und Bestimmung der Histonacetylierung im CFTR-Lokus .....	82
3.3.1	Chromatinfragmentierung .....	83
3.3.2	DNA-Amplifikation.....	84
3.3.3	Einfluss des DNA-Chip Scans auf die Ergebnisse.....	85
3.3.4	Einfluss der Hintergrundberechnung auf die Messwerte.....	86
3.4	Analyse der Acetylierungsmuster von Histon H3 und H4 in HeLa Zellen vor- und nach TSA-Behandlung und Vergleich mit den Acetylierungsmustern in Calu-3 Zellen.....	88
3.4.1	Histon H3 Acetylierungsmuster in HeLa und Calu-3 Zellen .....	90
3.4.2	Histon H4 Acetylierungsmuster in HeLa und Calu-3 Zellen .....	92
3.4.3	TSA-induzierte Änderungen der Histonacetylierung in HeLa Zellen .....	93
3.5	Validierung der ChIP-chip Daten mit ChIP-qPCR.....	101
3.5.1	H3ac in HeLa, HEK 293 und Calu-3 Zellen .....	102
3.5.2	H4ac in HeLa, HEK 293 und Calu-3 Zellen .....	104
3.6	RNA-Interferenz vermittelte Reduktion der CTCF-Konzentration .....	110
3.7	Test auf unspezifische Effekte der siRNA-Knockdowns auf die Genpositionierung.....	117
3.8	Pilotexperiment zur Untersuchung des Einflusses von Actin / Myosin auf die Repositionierung von CFTR.....	120
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>123</b>
4.1	Das zeitliche Verhältnis von TSA-induzierter globaler Histonacetylierung und der Repositionierung des CFTR-Lokus. ....	123
4.2	Analyse der lokalen Histonacetylierung mittels ChIP-chip und qPCR.....	124
4.2.1	Generelle Beobachtungen .....	124
4.2.2	Lokale Histonacetylierung und Genpositionierung .....	126
4.3	Die Rolle von CTCF und Histonacetylierungen in der Gen-positionierung.....	131
4.4	Knockdown von Kernlaminaproteinen.....	132
4.5	Der Einfluss von Myosin auf die Positionierung von CFTR.....	133
4.6	Zusammenfassung .....	134
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>136</b>
5.1	Datensätze.....	136
5.2	Literatur .....	137
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>162</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>167</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>168</b>

# 1 Einleitung

Genomische DNA und assoziierten Proteine werden als Chromatin bezeichnet. Im Zellkern liegt das Chromatin dicht gepackt vor. Die dabei resultierende Struktur des Chromatins wird in der Literatur häufig als "nicht zufällig" ("non-random" (Misteli, 2007; Schneider, *et al.*, 2007)) bezeichnet, was bedeutet, dass mehr Ordnung beobachtet wird, als man für eine zufällige Verteilung erwarten würde. Doch wie wird diese "Ordnung" erreicht und was bedeutet dieses für die Positionierung von individuellen Genen?

Das Spektrum von diskutierten, ordnenden Mechanismen reicht von einfachen Mischungs- und Entmischungsvorgängen aufgrund geringfügiger Affinitätsunterschiede von Proteinen ("molecular crowding" (Zimmerman, *et al.*, 1993)), zu Proteinkomplexen, welche die Konformation von Chromatin an definierten DNA-Bindungsstellen kontrollieren ("Master Weaver of the Genome" (Phillips, *et al.*, 2009)). Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über bekannte Phänomene und Mechanismen der Ordnung von Chromatin, und später zur Positionierung von individuellen Genen, gegeben.

## 1.1 Radiale Zellkernarchitektur und Genpositionierung

Bestimmte Eigenschaften des Chromatins, wie der GC-Anteil der DNA, transkriptionelle Aktivität und Replikationszeitpunkt korrelieren deutlich miteinander (siehe Tabelle 1), und Chromatin wird in Eu- und Heterochromatin klassifiziert. Als Euchromatin bezeichnet man den transkriptionell konstitutiv aktiven und früher replizierenden Teil des Chromatins (Lima-de-Faria, 1959). Heterochromatin wird weiter in fakultatives und konsitutives Heterochromatin unterteilt. Fakultatives Heterochromatin enthält Abschnitte mit gewebespezifischen Genen und kann daher zelltypspezifisch transkriptionell aktiv oder inaktiv sein. Dagegen setzt sich konstitutives Heterochromatin größtenteils aus repetitiven Sequenzen zusammen und ist konstitutiv inaktiv (beziehungsweise die Transkripte werden posttranskriptionell über RNA-Interferenzmechanismen abgebaut (Noma, *et al.*, 2004)).

Eu- und Heterochromatin erscheinen im Zellkern kompartmentalisiert. In Zelllinien menschlichen Ursprungs beobachtet man hierbei in den meisten untersuchten Fällen eine radiale Verteilung von Eu- und Heterochromatin, mit Euchromatin im "Inneren" und Heterochromatin am "Rand". Rand bedeutet in diesem Falle die Zellkernperipherie, sowie die Peripherie der Nukleoli (Cremer, *et al.*, 2003; Croft, *et al.*, 1999; Manuelidis, 1984; Sadoni, *et al.*, 1999; Tanabe, *et al.*, 2002) (Abb. 1). Im Interphasezellkern bildet zumindest ein Großteil der Masse des Chromatins der einzelnen Chromosomen individuelle Domänen (Chromosomen Territorien - CT) aus (Boveri, 1909; Cremer, *et al.*, 1982; Rabl, 1885; Stack, *et al.* 1977). Die räumliche Anordnung der CTs zueinander zeigt

Eigenschaft	Euchromatin	Heterochromatin
Position Im Zellkern <sup>1</sup>	Zellkerninnere*	Zellkernrand / Nukleoli*
Gendichte <sup>2</sup>	Hoch	Niedrig
GC-Anteil <sup>2</sup>	Hoch	Niedrig
Transkriptionelle Aktivität <sup>3</sup>	Hoch	Niedrig
Replikationszeitpunkt <sup>2</sup> in S-Phase	Früh	Mittel-Spät
Permeabilität (bzgl. Molmasse) <sup>4</sup>	Höher	Geringer

Tabelle 1: **Eigenschaften von Eu- und Heterochromatin.** \* Die Anordnung von Eu- und Heterochromatin variiert in verschiedenen Organismen und Zelltypen. Die hier angeführte Verteilung ist die normalerweise bei Zellkulturen von menschlichen Zellen beobachtete. 1: Ferreira, *et al.*, 1997 2: Cuny, *et al.*, 1981, Dimitrova, *et al.*, 2002, Dutrillaux, *et al.*, 1976, Kim, *et al.*, 1975, Nakayasu, *et al.*, 1989, O'Keefe, *et al.*, 1992, Zink, *et al.*, 1999 3: Verschure, *et al.*, 1999, Wansink, *et al.*, 1993 4: Gorisch, *et al.*, 2005, Verschure, *et al.*, 2003

dabei eine große Varianz (Bolzer, *et al.*, 2005), folgt dabei jedoch der Tendenz, dass sich kleinere Chromosomen wahrscheinlicher im Zellkerninneren und größere häufiger am Zellkernrand befinden (Cremer, *et al.*, 2001). Im Einklang mit der radialen Organisation von Eu- und Heterochromatin, finden sich gendichte Chromosomen bevorzugt im Zellkerninneren, und genarme am Zellkernrand (Boyle, *et al.*, 2001, Croft, *et al.*, 1999, Tanabe, *et al.*, 2002). Zusätzlich sind auch die individuellen CTs in sich polarisiert (Ferreira, *et al.*, 1997; Sadoni, *et al.*, 1999), mit euchromatischen Regionen weiter im Zellkerninneren und heterochromatischen am Zellkernrand.

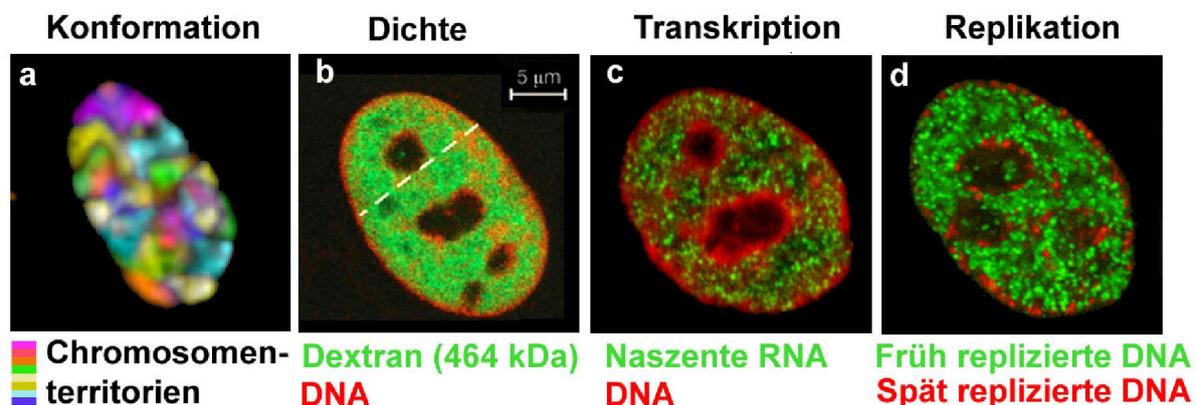


Abbildung 1: **Illustration der radialen Organisation von Eu- und Heterochromatin.** a) Dekonvulierte Fluoreszenzaufnahme eines Fibroblastenzellkerns (reproduziert aus Bolzer *et al.*, 2005). Die individuellen Chromosomen sind in verschiedenen Farben markiert. Sichtbar ist die Formierung von CTs. b) Lichtoptischer Schnitt durch einen HeLa S3 Zellkern (reproduziert aus Gorisch, *et al.*, 2005). Mikroinjiziertes, fluoreszenzmarkiertes Dextran ist in Grün dargestellt. DNA ist mit 4'6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt (rot). c) Lichtoptischer Schnitt durch einen

HeLa S3 Zellkern (reproduziert aus Martin, *et al.*, 2003). Synthetisierte RNA wurde durch das Nukleotidanalogs BrUTP markiert und durch Immunfärbung nachgewiesen (grün). Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt (rot). d) Lichtoptischer Schnitt durch einen HeLa S3 Zellkern (reproduziert aus Schermelleh, *et al.*, 2001), früh- (rot) und spät- (grün) replizierendes Chromatin ist mit unterschiedlichen Nukleotidanaloga markiert. Wie aus den Aufnahmen b/c/d ersichtlich, erscheinen größere Moleküle / Molekülkomplexe, Transkription und frühe Replikation an der Zellkernperipherie und der Peripherie der Nukleoli abgereichert. Maßstab (5  $\mu\text{m}$ )

Interessanterweise ist die hier aufgeführte radiale Organisation des Chromatins mit Heterochromatin am Rand und Euchromatin im Inneren keine aus der Komposition des Genoms (Anzahl der Basenpaare, GC Gehalt, Gendichte etc.) folgende Notwendigkeit. So können Zellen mit identischem Genom, im Laufe ihrer Differenzierung, diese beiden Fraktionen des Chromatins räumlich invertieren, wie zum Beispiel für murine Retinazellen gezeigt wurde (Solovei, *et al.*, 2009). Die hier aufgeführten Eigenschaften und die Verteilung des Chromatins sind soweit noch Korrelationen auf globaler Ebene. Wie aber stellt sich die Chromatinorganisation auf der Ebene der individuellen Gene dar?

## 1.2 Die radiale Positionierung von individuellen Genen

Wie in Abschnitt 1.1 dargelegt, zeigen verschiedene Kompartimente des Zellkerns eine unterschiedliche transkriptionelle Aktivität. Eine Frage ist daher, ob die Verteilung der individuellen Gene von ihrer transkriptionellen Aktivität abhängt, und ob Gene, deren Transkription sich ändert, auch von einem Kompartiment in ein anderes repositionieren. Wie in Abbildung 1 illustriert, scheint das Zellkerninnere, verglichen mit der Zellkernperipherie oder dem perinukleolären Kompartiment, die Transkription zu begünstigen. Für mehrere individuelle Gene sind entwicklungs- oder zelltypabhängige Änderungen der Transkription tatsächlich auch mit einer Veränderung ihrer radialen Positionierung im Zellkern verbunden. Beispiele sind der *Hämoglobin-beta*, *Immunglobulin H-Kette*-, *Immunglobulin kappa*-, und *Achaete Scute Complex 1 Homolog*-Lokus (Ragoczy, *et al.*, 2006; Kosak, *et al.*, 2002; Williams, *et al.*, 2006). Neben der radialen Positionierung spielt auch die relative Positionierung des Gens zu seinem CT eine Rolle. So zeigen die Grenzregionen der CTs tendenziell eine erhöhte transkriptionelle Aktivität gegenüber dem Inneren der CTs (Kurz, *et al.*, 1996; Niedojadlo, *et al.*, 2011; Verschure, *et al.*, 1999; Zirbel, *et al.*, 1993). Bei einer Reihe von Genen sind Veränderungen der transkriptionellen Aktivität mit einer Repositionierung relativ zu ihrem CT verbunden. Beispiele sind der *Major Histocompatibility Complex II*- und *Homeobox B*- und *D*-Lokus (Volpi, *et al.*, 2000; Chambeyron, *et al.*; 2004). Über welches "Auflösungsvermögen" die Genpositionierung verfügt, zeigt sich im Falle von benachbarten Genen mit

unterschiedlicher transkriptioneller Aktivität. Ein Beispiel dafür, welches hinsichtlich der radialen Positionierung untersucht wurde, ist der *Cystic-Fibrosis- Transmembrane-Conductance-Regulator (CFTR)* -Lokus. Dieser Lokus wurde deshalb für Studien zur radialen Genpositionierung verwendet, weil er eine Reihe von eng benachbarten Genen mit sehr unterschiedlichem Expressionsverhalten beherbergt (Abb. 2, Tabelle 2). Die radiale Positionierung des *CFTR*-Gens und der beiden flankierenden Gene *Ankyrin Repeat, SAM and Basic Leucine Zipper Domain Containing 1 (ASZ1)* und *Cortactin Binding Protein 2 (CTTNBP2)* unterscheidet sich deutlich in sieben untersuchten menschlichen Zelltypen/Zelllinien (Zink, *et al.*, 2004). Im inaktiven Zustand – dass heißt in Zelltypen, in denen sie nicht exprimiert werden - befinden sich die Gene *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2* bevorzugt an der Zellkernperipherie. In Zelltypen, in denen diese Gene exprimiert werden, lokalisieren sie bevorzugt im Zellkerninneren (Abb. 3).

Aufgrund dieser transkriptionsabhängigen Positionierung wurde das *CFTR*-Gen zu weiteren Untersuchungen des Mechanismus der Repositionierung herangezogen. Eine Reihe von Behandlungen mit unterschiedlichen Klassen von Wirkstoffen zeigte dabei, dass der Histon-Deacetylase inhibitor (HDACI) Trichostatin A (TSA) in *CFTR*-nichtexprimierenden Zellen eine deutliche Repositionierung des *CFTR*-Gens von der Zellkernperipherie in das Zellkerninnere bewirkt. In unbehandelten Zellen erscheinen Transkription und Genpositionierung im Falle von *CFTR* gekoppelt zu sein. TSA-Behandlung führte jedoch zu einer Entkoppelung dieser beiden Prozesse, da sie die Positionierung des *CFTR*-Gens verändert, ohne die Transkription des Gens zu induzieren (Zink, *et al.*, 2004). Generell beeinflusst TSA- Behandlung nur die Expression von relativ wenigen Genen (5-10% (de Ruijter, *et al.*, 2005; Ellis, *et al.*, 2008; Peart, *et al.*, 2005)).

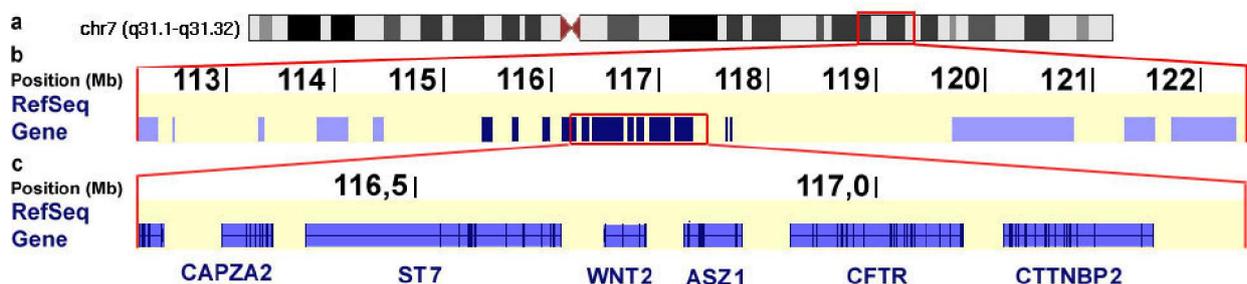


Abbildung 2: **Genomische Position des humanen *CFTR*-Lokus.** a) Der *CFTR*-Lokus befindet sich auf Chromosom 7. b) Er befindet sich in einer Gruppe von eng benachbarten Genen (dunkelblau), die von "Genwüsten" flankiert werden. Entferntere Gene sind hellblau dargestellt. c) Das *CFTR*-Gen bildet mit seinen flankierenden Genen *ASZ1* und *CTTNBP2* das telomerseitige Ende des Lokus. (Quelle: UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu> (Rhead, *et al.*, 2010) Die in dieser Arbeit verwendeten genomischen Koordinaten basieren auf der Genom-Assemblierung NCBI36/hg18, (März, 2006)

Abkürzung	Name	Funktion	Expression
<i>CAPZA2</i>	F-Actin Capping Protein Muscle Z-Line Alpha-2 Untereinheit	Bestandteil des Cap-Z Komplexes, schützt die Enden von Actin Filamenten	Ubiquitär
<i>ST7</i>	Suppression of Tumorigenicity 7	Möglicher Tumorsuppressor (Zenklusen, <i>et al.</i> , 2001)	Ubiquitär
<i>WNT2</i>	Wingless-Type MMTV Integration Site Familienmitglied 2	Sezerniertes Signalprotein	Gewebe - / Entwicklungsspezifisch
<i>ASZ1</i>	Ankyrin Repeat, SAM and Basic Leucine Zipper Domain Containing 1	Suppressor von Retrotransposons in der Keimbahn (Ma, <i>et al.</i> , 2009)	Keimbahn-spezifisch
<i>CFTR</i>	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	cAMP abhängiger Chlorid-Ionenkanal. Funktionsverlust verursacht Mukoviszidose (Riordan, <i>et al.</i> , 1989)	Respiratorischer - / Verdauungstrakt
<i>CTTNBP2</i>	Cortactin Binding Protein 2	Bestandteil eines mit Actin interagierenden Proteinkomplexes (Goudreault, <i>et al.</i> , 2009)	Gewebespezifisch

Tabelle 2: **Steckbrief der Gene der *CFTR*-Region.** Zusammengefasst sind Funktion und Expression von den Genen in der Nachbarschaft von *CFTR*, die Auflistung der Gene entspricht der Reihenfolge ihrer genomischen Anordnung. Die Expressionsdaten sind GeneNote ([http://bioinfo2.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote/home\\_page.pl](http://bioinfo2.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote/home_page.pl), Shmueli, *et al.*, 2003) entnommen.

Die TSA-Behandlung stellt damit einen möglichen Ansatzpunkt dar, um den Mechanismus der Genpositionierung von *CFTR* zu untersuchen. Aber was bewirkt die TSA-Behandlung auf molekularer Ebene?

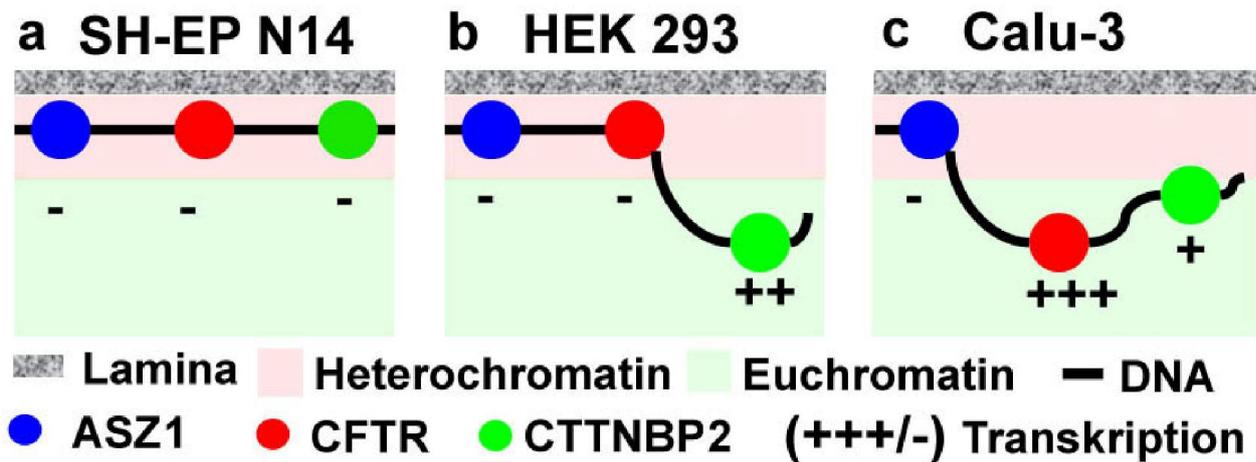


Abbildung 3: **Individuelle, transkriptionsabhängige Positionierung von Genen des CFTR-Lokus.** Schematische Darstellung der Daten aus Zink, *et al.*, 2004 a) SH-EP N14 Zellen. Die drei Gene *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2* sind transkriptionell inaktiv und lokalisieren an der Zellkernperipherie. b) HEK 293 Zellen. *CTTNBP2* ist transkriptionell aktiv (rund 5-10% der Expression von  $\beta$ -Actin, (Englmann, *et al.*, 2005 b) und befindet sich im Zellkerninneren; die inaktiven Gene *ASZ1* und *CFTR* befinden sich am Zellkernrand c) Calu-3 Zellen. *CFTR* und *CTTNBP2* sind transkriptionell aktiv (rund 70-85% bzw. 0,1-0,5% bezogen auf  $\beta$ -Actin). Das stärker exprimierte *CFTR*-Gen befindet sich im Zellkerninneren, das schwach exprimierte *CTTNBP2*-Gen näher an der Zellkernperipherie, jedoch weiter von dieser entfernt als das inaktive Gen *ASZ1*.

### 1.3 Proteinacetylierung und Trichostatin A

TSA beeinflusst die Acetylierung von Proteinen. Die Acetylierung von Lysinresten stellt möglicherweise eine der häufigsten postrationalen Modifikationen (PTMs) von Proteinen dar. Die Anzahl der bekannten Ziele dieser Modifikation ist dank großer Fortschritte der Proteomik in jüngster Zeit explosionsartig angestiegen. 2006 wurden in einer Studie 195 Proteine identifiziert (Kim, *et al.*, 2006). Zwei Studien des "Acetyloms" (Choudhary, *et al.*, 2009; Zhao, *et al.*, 2010), bei denen die letztere speziell cytoplasmatische Proteine untersuchte, identifizierten beziehungsweise 1758 beziehungsweise 1047 acetylierbare Proteine. Abzüglich der Überlappung kommen diese Studien bereits auf über 2200 acetylierbare Proteine. Aufgrund dieser Anzahl kommt der Proteinacetylierung daher möglicherweise eine ähnliche Bedeutung zu, wie der postrationalen Phosphorylierung, was bereits seit Längerem vermutet wird (Kouzarides, 2000).

Die Verfügbarkeit von Acetylcoenzym A (Ac-CoA) scheint dabei entscheidend für den Grad der globalen Acetylierung zu sein (Takahashi, *et al.*, 2006). Da zusätzlich alle bekannten, den Energiestoffwechsel betreffenden, Enzyme acetyliert, und damit potentiell

reguliert, werden können (Zhao, *et al.*, 2010), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Proteinacetylierung einen möglichen Energiesensor darstellt (Wang, *et al.*, 2010).

Die Übertragung der Acetyl-Gruppen von Ac-CoA auf Lysinreste der Zielproteine wird von Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) katalysiert. Unter Umständen werden auch länger-kettige Substrate (Propionyl-CoA, Butyryl-CoA) umgesetzt (Chen, *et al.*, 2007). Die bisher identifizierten HATs werden in die drei Familien MYST (benannt nach den Vertretern MOZ, Ybf2, SAS2, Tip60), GNAT (Gcn5-related acetyltransferases) und p300 unterteilt (Allis, *et al.*, 2007). Die Acetylierung eines Lysinrestes eliminiert die Basizität des primären Amins des Lysinrestes und damit effektiv eine positive Ladung. Das resultierende Amid ist chemisch sehr stabil. In vivo stellt die Acetylierung jedoch im Allgemeinen eine sehr dynamische Modifikation dar, mit einer – kontextabhängigen - Halbwertszeit der Modifikation im Minutenbereich (Jackson, *et al.*, 1975; Sealy, *et al.*, 1978; Waterborg, *et al.*; 2002).

Grund dafür sind die den HATs entgegenwirkenden Histon Deacetylasen (HDACs). Diese werden in vier Klassen eingeteilt (I-IV, siehe Tabelle 3). Während HDACs der Familien I, II und IV die Amidbindung mithilfe eines komplexierten Zinkatoms hydrolysieren, verwenden Sirtuine einen unterschiedlichen Mechanismus. Sirtuine verbrauchen stöchiometrische Mengen an Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, indem sie die Acetylgruppen von dem Lysinrest auf die Dinukleotidphosphatribose, unter Freisetzung von Nicotinamid, transferieren.

Gruppe	HDACs	Lokalisation
I	HDAC 1,2,3,8	Zellkern
II	HDAC 4,5,6,7,9,10	Zellkern / Cytosol
III (Sirtuine)	Sirt1-7	Zellkern / Cytosol
IV	HDAC 11	Zellkern

Tabelle 3: **HDAC-Gruppierungen, Vertreter und Lokalisation.** Zusammengefasst aus: de Ruijter, *et al.*, 2003 und Michishita, *et al.*, 2005

HATs und HDACs sind Bestandteile großer Proteinkomplexe. Genomweite Bindungsstudien zeigen desweiteren, dass chromatinbindende HATs und HDACs für gewöhnlich kolokalisieren (Wang, *et al.*, 2009).

TSA ist ein zellpermeabler, reversibler Inhibitor von HDAC der Klassen I, II und IV. Von allen bekannten HDAC-Inhibitoren (HDACI) weist TSA das breiteste Wirkungsspektrum auf und hemmt alle Vertreter der HDAC Klassen I und II in vitro mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration im nanomolaren Bereich (3,0-30 nM (Buggy, *et al.*, 2000; Furumai, *et al.*, 2001; Tatamiya, *et al.*, 2004; Vigushin, *et al.*, 2001)). Sirtuine werden aufgrund ihres sehr unterschiedlichen Wirkmechanismus nicht gehemmt. Die Behandlung

---

mit TSA führt zu einer globalen Zunahme der Proteinacetylierung (Yoshida, *et al.*, 1990) und einer Veränderung der Genpositionierung (Brown, *et al.*, 2008; Pickersgill, *et al.*, 2006; Zink, *et al.*, 2004). Das legt nahe, dass die Acetylierung von bestimmten Proteinen also zur Genpositionierung beiträgt. Doch welche Proteine eignen sich als Kandidaten? Unmittelbare Interaktoren mit der DNA sind die Proteine des Chromatins – im wesentlichen Histone und spezialisierte Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, Insulatoren und Remodellierer. Diese Proteine des Chromatins interagieren wiederum potentiell mit der Kernlamina, und möglicherweise mit Motorproteinen des Actin / Myosin-Systems. Bisher untersuchte Auswirkungen von Lysinacetylierung auf Proteine aus diesen Gruppen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

## 1.4 Histonacetylierung und der Histon-Code

Die Identifizierung von acetylierbaren Proteinen hat, wie bereits erwähnt, in jüngster Zeit bedeutende Fortschritte gemacht. Eine funktionelle Charakterisierung dieser Modifikationen ist derzeit jedoch noch auf vergleichsweise wenige Proteine beschränkt (Spange, *et al.*, 2009). Zu den bestuntersuchten Beispielen gehören die Histone, die einen der Hauptbestandteile des Chromatins darstellen. Oktamere aus jeweils zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 bilden zusammen die kanonischen Nukleosomen, die an den Großteil der DNA im Zellkern binden. Bei regulatorischen DNA-Elementen (Promotoren, Enhancer, Insulatoren) sind dagegen die Histone in den Nukleosomen tendenziell durch die Histonvarianten H2A.Z (statt Histon H2A) und H3.3 (statt Histon H3) ersetzt (Jin, *et al.*, 2009). Bei der Bindung von DNA an die Nukleosomen windet sich die DNA um den Kern des Nukleosoms, der von den C-terminalen Dönanen der Histone gebildet wird. Dabei sind durchschnittlich etwa 146 bp der DNA im direkten Kontakt mit dem Nukleosomenkern. Weitere 40-50 bp überbrücken die Distanz zu dem nächsten Nukleosom. Die N-terminalen Enden der Histone befinden sich an der Oberfläche der Nukleosomen, und können an mehreren Positionen posttranslational modifiziert werden (siehe Abb. 4). Bekannte Histonmodifikationen sind Acetylierung (Propionylierung, Butyrylierung), Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung, ADP-ribosylierung, Diminierung und Prolylisomerisierung, sowie zusätzliche Modifikationen mit unklarer biologischer Relevanz (Cuthbert, *et al.*, 2004; Levinger, *et al.*, 1982; Murray, 1964; Nelson, *et al.*, 2006; Nishizuka, *et al.*, 1968; Ord, *et al.*, 1966; Shio, *et al.*, 2003; Wondrak, *et al.*, 2000). Die daraus resultierende Kombinatorik wird unter dem Schlagwort "Histon-Code" (Strahl, *et al.*, 2000) zusammengefasst. Proteomische Untersuchungen von PTMs zeigen jedoch in zunehmendem Maße, dass eine derartige Kombinatorik von PTMs keine Ausnahme, sondern vermutlich eher die Regel für Proteine darstellt. Beispiele sind der "FoxO-Code"

(Calnan, *et al.*, 2008), “p53-Code“ (Espinosa, *et al.*, 2001), “HMG-Code“ (Reeves, *et al.*, 2001) und “HP-1 Code“ (LeRoy, *et al.*, 2009).

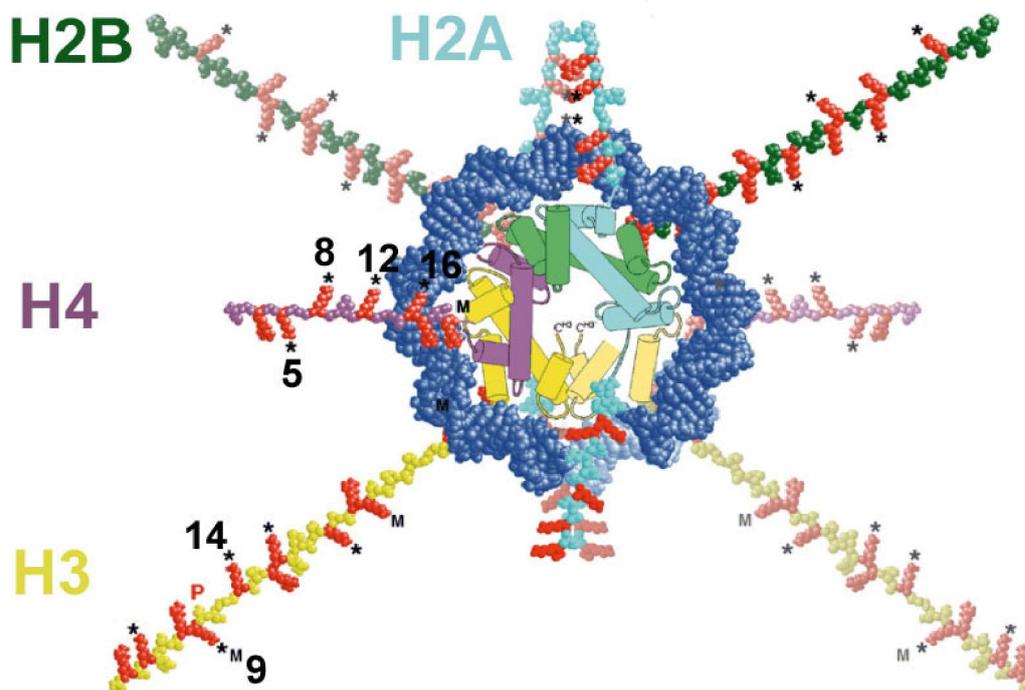


Abbildung 4: **Struktur und Modifikationen des Nucleosoms.** a) Das Nucleosom wird aus jeweils zwei Kopien von Histon H2A (hellblau), H2B (grün), H3 (gelb) und H4 (violett) gebildet. Von den C-terminalen Dömänen der Histone, die den Kern des Nucleosoms bilden, sind das Rückgrat und  $\alpha$ -Helices als Zylinder dargestellt. Die mit dem Kern assoziierte DNA ist raumfüllend in blau dargestellt. Die N-terminalen Enden der Histone sind raumfüllend dargestellt. Identifizierte modifizierbare Reste sind rot dargestellt. Verwendete Symbole: \*: Acetylierung; M: Methylierung; P: Phosphorylierung. Die in dieser Arbeit untersuchten Reste sind nummeriert. Reproduziert mit Modifikationen aus Wolffe, *et al.*, 1999.

Bisherige Analysen der Histonmodifikationen zeigen dabei, dass nur ein kleines Subset der theoretisch möglichen Kombinationen effektiv auftritt. Verschiedene Modifikationen sind demnach miteinander gekoppelt (Wang, *et al.*, 2008). Was die Analyse möglicher Funktionen der PTMs von Histonen deutlich erleichtert, ist die DNA-Bindung dieser Proteine. Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP, (Ren, *et al.*, 2000; Robertson, *et al.*, 2007 Solomon, *et al.*, 1988)) erlaubt es, die genomischen Bindungsstellen von modifizierten Histonen zu bestimmen. Die genomweite Auswertung des Vorkommens von Histonmodifikationen zeigt dabei sehr charakteristische Muster von bestimmten Modifikationen innerhalb von aktiven und inaktiven Genen (siehe Abb. 5), die zumindest teilweise in Eukaryonten konserviert erscheinen (Ha, *et al.*, 2011; Wang, *et al.*, 2010).

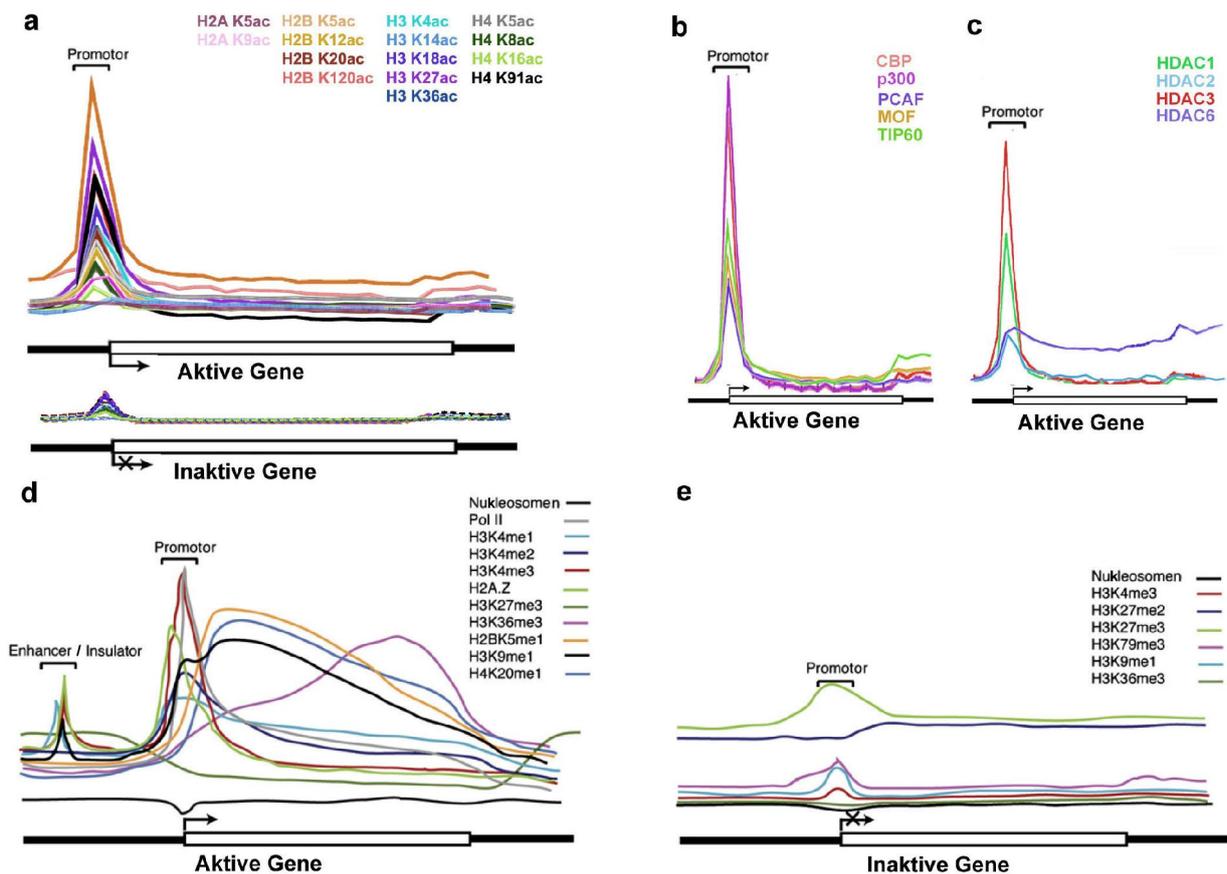


Abbildung 5: **Gemittelte Verteilung von Histonmodifikationen und Chromatin bindenden Proteinen in aktiven/inaktiven Genen aus genomweiten Bindungsstudien in humanen CD4 Zellen.** a) Die Bindung von acetylierten Histonen wurde Genomweit über ChIP mit anschließender Analyse der DNA durch Sequenzierung (ChIP-seq) bestimmt. Die Anreicherungen dieser Modifikationen wurden über die aktiven beziehungsweise inaktiven annotierten Gene gemittelt. In dieser Abbildung wurden die publizierten Diagramme überlagert und farbcodiert (verwendete Abkürzungen: H2A K5ac entspricht Histon H2A, acetyliert an Lysin 5). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, sind die Promotorregionen von aktiven Genen hyperacetyliert (oberes Diagramm). Im Gegensatz dazu sind inaktive Promotoren deutlich geringer acetyliert (unteres Diagramm). Zusammengestellt aus (Wang, *et al.*, 2008) b) Überlagerung von ChIP-seq Datensätzen zur Bindung von HATs in aktiven Genen. HATs zeigen eine deutliche Anreicherung in den Promotorregionen von aktiven Genen, und korrelieren damit mit den von Ihnen induzierten Histonacetylierungen. Inaktive Gene zeigen keine Anreicherung (nicht dargestellt) c) Überlagerung von ChIP-seq Datensätzen zur Bindung von HDACs. HDAC1-3 zeigen eine deutliche Anreicherung in den Promotorregionen von aktiven Genen und binden folglich in denselben Regionen wie die antagonistisch wirkenden HATs. HDAC6 zeigt eine gleichmäßigere Verteilung innerhalb der Gene. Inaktive Gene zeigen keine Anreicherung (nicht dargestellt). b,c zusammengestellt aus (Wang, *et al.*, 2009) d) Histonmethylierungen in aktiven Genen. e) Histonmethylierungen in inaktiven Genen. d,e reproduziert aus (Barski, *et al.*, 2007)

Histonacetylierung korreliert eng mit transkriptioneller Aktivität (Kurdistani, *et al.*, 2004; Pokholok, *et al.*, 2005; Roh, *et al.*, 2005; Wang, *et al.*, 2008). Bei Histonmethylierungen überwiegen die monomethylierten Formen innerhalb von transkriptionell aktiven Genen. Besondere Ausnahmen sind die höhermethylierten Histonmodifikationen, wie Histon H3, dimethyliert an Lysin 4 (H3K4me<sub>2</sub>) in Enhancerregionen, H3K4me<sub>3</sub> in Promotorregionen sowie H3K36me<sub>3</sub> innerhalb von aktiven Genen, zunehmend von 5' nach 3' (Barski, *et al.*, 2007; Berstein, *et al.*, 2002; Berstein, *et al.*, 2005; Berstein, *et al.*, 2007; Kim, *et al.*, 2005; Roh, *et al.*, 2006)

Im Falle von Heterochromatin sind die Korrelationen weniger eindeutig, aufgrund der uneinheitlichen Struktur des Heterochromatins auf Sequenzebene. Modifikationen, die typischerweise in Heterochromatin auftreten sind zum Beispiel Histon H3K27me<sub>3</sub> in inaktiven Genen, Histon H4K20me<sub>3</sub> in zentromerischen repetitiven Sequenzen und Histon H3K9me<sub>3</sub> (Boyer, *et al.*, 2006; Lee, *et al.*, 2006; Roh, *et al.*, 2006; Rosenfeld, *et al.*, 2009).

Die Trennung von Eu- und Heterochromatin spiegelt sich folglich zumindestens teilweise auch in den Histonmodifikationen wieder. Doch welchen Einfluss haben Histonmodifikationen auf das Chromatin? Neben den, durch die Modifikationen resultierenden direkten Änderungen der physikochemischen Eigenschaften der Histone selbst, stellen die modifizierten Reste der Histone Erkennungsstellen für chromatinbindende- und modifizierende Proteine dar. Aufgrund der beobachteten TSA-induzierten Repositionierung von *CFTR* wäre es denkbar, dass acetylierte Histone direkt, oder über Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen, die Positionierung von *CFTR* beeinflussen.

## 1.5 Insulatoren und Chromatinschleifen formende Proteine

Weitere Proteine mit einem möglichen Einfluss auf die radiale Genpositionierung könnten diejenigen sein, die die lokale Chromatinstruktur beeinflussen. Ein bedeutender Beitrag zur Chromatinorganisation ist die Ausbildung von Chromatinschleifen. Promotoraktivität beeinflussende Enhancer-DNA-Elemente sind zuweilen im Genom bis zu 500 kb von Promotoren entfernt, befinden sich jedoch dank Schlaufenbildung des Chromatins in direkter räumlicher Nachbarschaft. Methodische Neuentwicklungen wie "Chromosome Conformation Capture" (3C) (Dekker, *et al.*, 2002; Dostie, *et al.*, 2006; Simonis, *et al.*, 2006) und abgeleitete Methoden erlauben einen direkten Nachweis räumlicher Nähe auf der DNA-Sequenzebene.

Einsatz dieser Techniken für genomweite Studien in Hefe (Duan, *et al.*, 2010) und menschlichen Zellen (Lieberman-Aiden, *et al.*, 2009), mit derzeit noch geringer Auflösung auf Sequenzebene, deuten auf eine räumliche Nähe von DNA-Abschnitten innerhalb

derselben Chromosomen hin, und sind damit im Einklang mit der Organisation von Chromosomen in CTs. Detaillierte Studien zum Beispiel des  $\alpha$ -Globin- (Vernimmen, *et al.*, 2007),  $\beta$ -Globin-(Hou, *et al.*, 2010), Homeobox (HOX) A,B,C und D- (Ferraiuolo, *et al.*, 2010), Inhibitor of Cyclin-dependent Kinase 4A (INK4a)- (Kheradmand Kia, *et al.*, 2009) MHC II- (Masternak, *et al.*, 2003) und CFTR- Locus (Gheldof, *et al.*, 2010; Ott, *et al.*, 2009) zeigen ausgeprägte zelltypspezifische Schlaufenbildungen des Chromatins. Transkriptionell aktive Genloci tendieren dabei zur Bildung von kompakten Strukturen – sogenannten “Active Hubs“ (ACH (Carter, *et al.*, 2002, Tolhuis, *et al.*, 2002)). Regulatorische Elemente, die auf Sequenzebene über den gesamten Locus verteilt sind, befinden sich im aktiven Zustand in diesen ACHs in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft. Die Fähigkeit zur Ausbildung von Chromatinschlaufen wurde für verschiedene Transkriptionsfaktoren (TFs) nachgewiesen. Beispiele sind der Activator Protein 1 (AP1) Komplex (Chavanas, *et al.*, 2008), Special AT-rich Sequence-binding Protein 1 (SATB1) (Cai, *et al.*, 2006; Yasui, *et al.*, 2002), Specificity Protein 1 (Sp1) (Deshane, *et al.*, 2010) und Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) (Kheradmand Kia, *et al.*, 2009). Besondere Aufmerksamkeit bezüglich der Schlaufenbildung haben in jüngster Zeit der Insulator CCCTC-binding Factor (CTCF), sowie der Cohesin-Proteinkomplex erlangt.

CTCF ist der bisher einzige bekannte Insulator in menschlichen somatischen Zellen und wird ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert (Amouyal, 2010). Insulator bedeutet, daß eine Bindungsstelle von CTCF zwischen einem Enhancer und einem Promotor die Wirkung des Enhancers blockiert (Bell, *et al.*, 1999). CTCF markiert außerdem genomweit Grenzen zwischen Eu- und Heterochromatin (Cuddapah, *et al.*, 2009) und die Einfügung einer CTCF-Bindungsstelle blockiert die Ausbreitung von Heterochromatin (Defossez, *et al.*, 2002), die ansonsten zur Inaktivierung von Transgenen führen kann (Pikaart, *et al.*, 1998). CTCF verfügt über 11 Zinkfinger zur Bindung an DNA. Über genomweite Bindungsstudien konnte eine Konsensussequenz ermittelt werden, die etwa 95% der empirisch ermittelten CTCF-Bindungsstellen erklärt (Jothi, *et al.*, 2008). CTCF erscheint an der Bildung von intra- und interchromosomalen Schlaufen/Brückenstrukturen beteiligt. So zeigt ein zunehmender Prozentsatz an Stellen mit interchromosomalen Interaktionen Bindungsstellen von CTCF (Botta, *et al.*, 2010). Interessanterweise erscheinen die meisten DNA-Bindungsstellen von CTCF in verschiedenen Zelllinien invariant zu sein (Kim, *et al.*, 2007). Die von CTCF erzeugten Brückenstrukturen (Abb. 5b-f) zeigen dagegen eine deutliche Gewebespezifität (Hou, *et al.*, 2010). Die Funktion von CTCF kann potentiell durch eine Vielzahl an PTMs reguliert werden. So führt die Sumoylierung von CTCF zum Beispiel zur lokalen Dekondensation von Chromatin (Kitchen, *et al.*, 2010). Identifizierte PTMs von CTCF sind Acetylierung, Phosphorylierung, Polyadenosindinukleotid phosphatibosylierung (PARYlierung) und Sumoylierung (Abb. 5a). Die Konsensussequenz beinhaltet methylierbare CpG-Sequenzen und die Methylierung der CTCF-

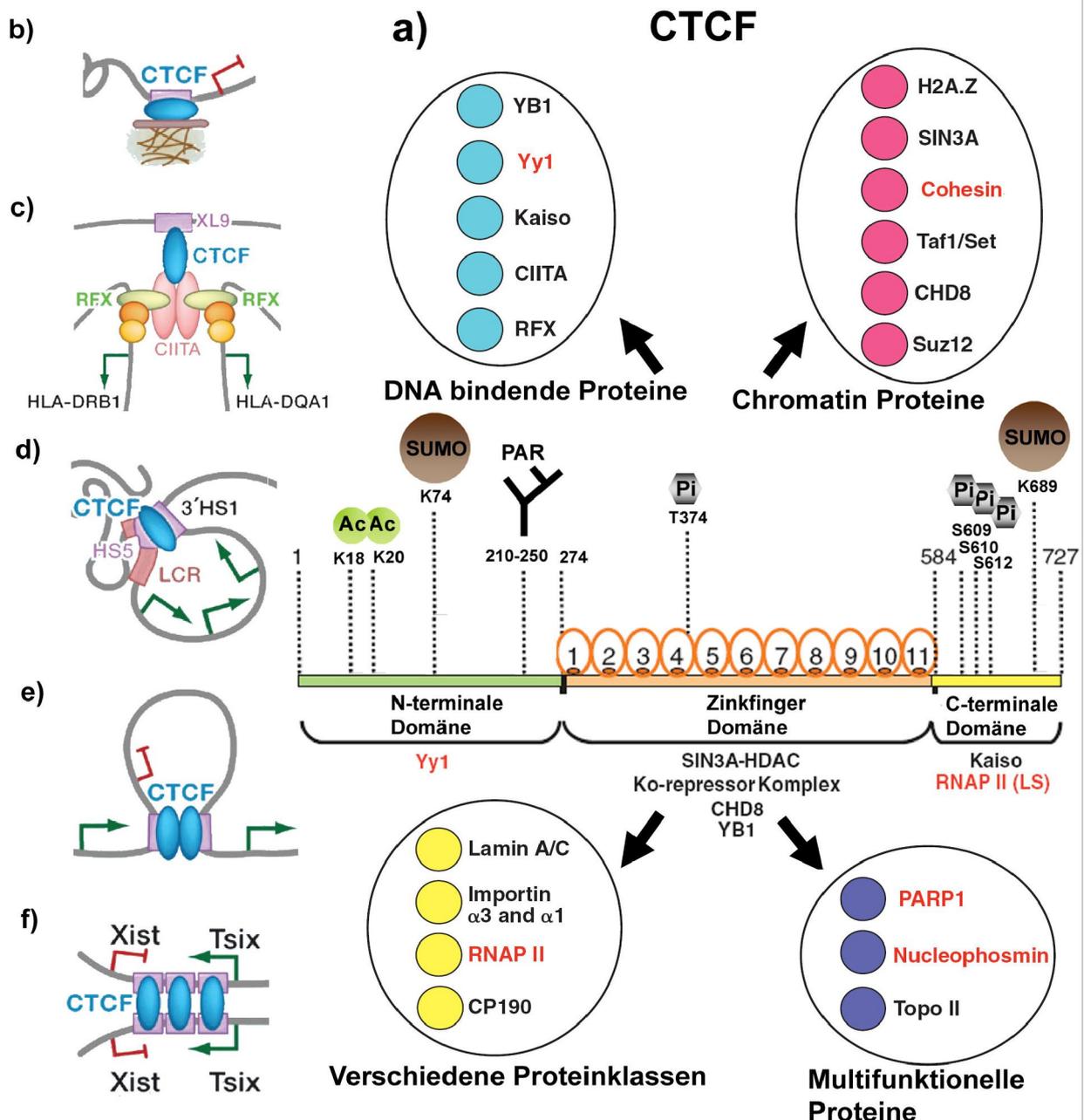


Abbildung 6: **Überblick über Struktur, Modifikationen und Funktionen von CTCF** a) CTCF lässt sich in eine N-terminale -, eine DNA-bindende Domäne mit 11 Zinkfingern und eine C-terminale Domäne unterteilen. Bekannte posttranslationale Modifikationen sind Sumoylierung (SUMO 1,2 oder 3, braun), PARylierung (PAR, schwarz), Phosphorylierung (Pi, grau) und Acetylierung (Ac, grün). CTCF interagiert mit einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen, hier klassifiziert als sequenzspezifische (DNA-bindende-), Chromatin-, multifunktionelle- und andere Proteine. CTCF trägt zur Konformation des Chromatins bei. b-f zeigen bekannte Mechanismen mit denen CTCF Chromatin verbrückt beziehungsweise verankert. b) Verankerung von Chromatin durch Bindung an die Kernlamina/Kernmatrix (z.B. Lamin A/C, Nucleophosmin) c) Quervernetzung von Chromatin

durch Bindung an Transkriptionsfaktoren d) Quervernetzung von Chromatin durch Bindung an zwei CTCF-Erkennungssequenzen in unterschiedlichen DNA-Strängen e) Quervernetzung von Chromatin durch Dimerisierung f) Quervernetzung von Chromatin durch den Mechanismus wie in d) in Tandemwiederholungen. Verwendete Abkürzungen: YB1: Y Box Binding Protein 1; Yy1: Yin-Yang-1; CIITA: class II, Major Histocompatibility Complex, Transactivator; RFX: Regulatory Factor X 1; SIN3A: SIN3 Homolog A, Transcription Regulator; Taf1/Set: TAF1 RNA Polymerase II, TATA Box Binding Protein (TBP)-Associated Factor; CHD8: Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 8; Suz12: Suppressor of Zeste 12 Homolog; RNAP II: RNA-Polymerase II; CP 190: Centrosomal Protein 190 kDa; PARP1: Poly (ADP-ribose) Polymerase 1; Topo II: Topoisomerase II; Xist: X-inactive Specific Transcript; Tsix: reverses Xist; HLA-DRB1/DQA1: Major Histocompatibility Complex, Class II, DR beta/DQ alpha 1; a) Reproduziert mit Modifikationen und Zusammengestellt aus Farrar, *et al.*, 2010; Klenova, *et al.*, 2001; Zlatanova, *et al.*, 2009 und (b-f) aus Phillips, *et al.*, 2009.

Konsensussequenz verhindert die CTCF-Bindung (Bell, *et al.*, 2000; Hark, *et al.*, 2000). Die C-terminale Domäne von gereinigtem CTCF erscheint unstrukturiert und dient vermutlich als Adapter für eine Vielzahl von Interaktionspartnern (Martinez, *et al.*, 2010). Im Hinblick auf die radiale Genpositionierung wurde gezeigt, daß CTCF-Bindung (zusammen mit Lamin A/C, siehe übernächster Abschnitt), essentiell für die Positionierung der Telomersequenz D4Z4 an der Zellkernperipherie ist (Ottaviani, *et al.*, 2009). Eine direkte Interaktion von CTCF mit Lamin A/C wurde über Immunpräzipitation gezeigt (Yusufzai, *et al.*, 2004).

## 1.6 Konformation und Regulation des *CFTR*-Gens

Schleifenbildung spielt auch bei der bei der Regulation von *CFTR* eine Rolle. So zeigen Untersuchungen mittels 3C im *CFTR*-Lokus sowohl in Zelllinien (Gheldof, *et al.*, 2010), als auch in primären Zellen (Ott, *et al.*, 2009), derartige Strukturen. Diesen Untersuchungen zufolge befindet sich Regionen an den Positionen -80 kb, -20,9 kb, +10 kb, +109 kb und +203 kb (relativ zum *CFTR*-Promotor, Abb. 7) in räumlicher Nachbarschaft von dem *CFTR*-Promotor. Alle diese Regionen weisen DNase hypersensitive Stellen (DHS), einen Indikator für regulatorische Elemente, auf (Nuthall, *et al.*, 1999 a; Nuthall, *et al.*, 1999 b; Ott, *et al.*, 2009; Phylactides, *et al.*, 2002; Smith, *et al.*, 1995; Smith, *et al.*, 1996; Smith, *et al.*, 2000) Vier dieser fünf Region enthalten außerdem Bindungsstellen für CTCF (Blackledge, *et al.*, 2007; Blackledge, *et al.*, 2009). Die einzige Ausnahme stellt die Region bei +109 kb dar. Durch die räumliche Nähe dieser regulatorischen Elemente wird ein ACH gebildet (Abb. 8). Die Ausbildung dieses ACH wird vermehrt – aber nicht ausschließlich -in *CFTR*-exprimierenden Zellen beobachtet (Gheldof, *et al.*, 2010). Im ACH kommen eine

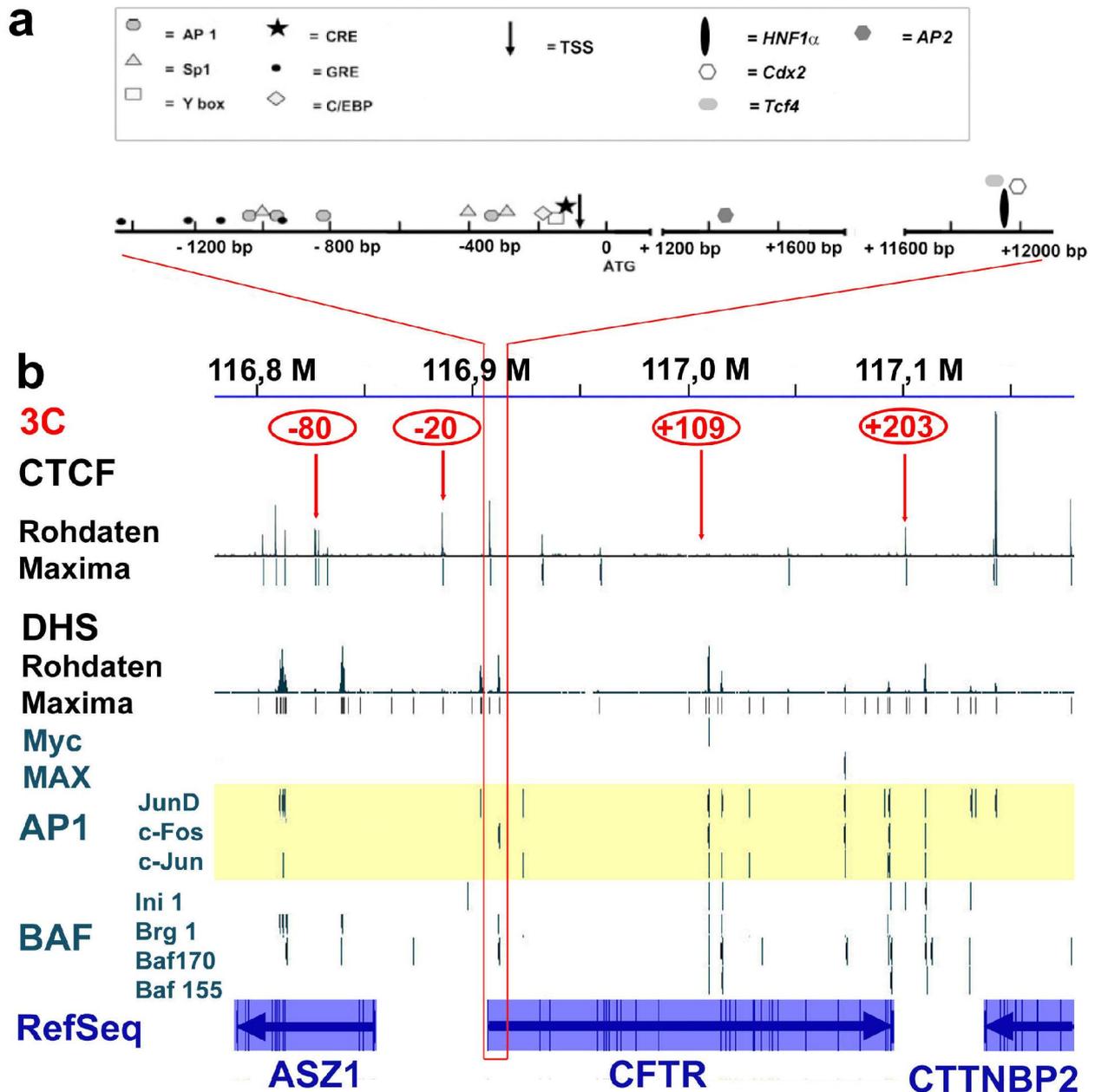


Abbildung 7: **Regulatorische Elemente des CFTR-Lokus.** a) Die Abbildung zeigt eine Zusammenstellung von experimentell über ChIP ermittelten Bindungsstellen von TFs in der CFTR-Promotorregion in CFTR-exprimierenden Zellen. Reproduziert aus (McCarthy, *et al.*, 2005). Neuere nachgewiesene Bindungsstellen wurden ergänzt (Paul, *et al.*, 2007). Die betreffenden Faktoren sind in der Legende kursiv gedruckt. Abkürzungen: AP1: Activator Protein 1; Sp1: Specificity Protein 1; CRE: cyclic Adenosine monophosphate Response Element; GRE: Glucocorticoid Response Element; TSS: Transcription Start Site; HNF1 $\alpha$ : Hepatic Nuclear Factor 1 homeobox A; Cdx2: Caudal Type Homeobox 2; Tcf4: Transcription Factor 4; AP2: Activating Enhancer binding Protein 2 Alpha. b) Experimentell nachgewiesene Bindungsstellen von CTCF, DNase hypersensitiven Stellen (DHS), TFs (c-Myc/Max; AP1), und Remodelierungskomplexe

(BAF-Komplex) in HeLa S3 Zellen (Quelle: UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu> (Rhead, *et al.*, 2010)). Die blauen horizontalen Pfeile geben Position und Transkriptionsrichtung der annotierten Gene an. Vertikale blaue Balken geben die Position der Exons, hellblaue die der Introns an (Quelle RefSeq). Die regulatorischen Elemente bei -80, -20, +203 und der Promotor (rot eingerahmt) enthalten CTCF-Bindungsstellen sowie DHS. Das regulatorische Element bei +109 kb zeigt eine deutliche DHS, und eine deutliche Bindung des Myc-, AP1- und BAF-Komplexes. Das CFTR-Gen wird von CTCF-Bindungsstellen flankiert. Prominente DHS finden sich in der Promotorregion, der mittleren Region und dem 3' Ende des Gens. Übereinstimmend zeigen das 5'- und 3'- Ende von CFTR, als auch die zentrale Region, eine deutlich erhöhte Konzentration an TF-Bindestellen.

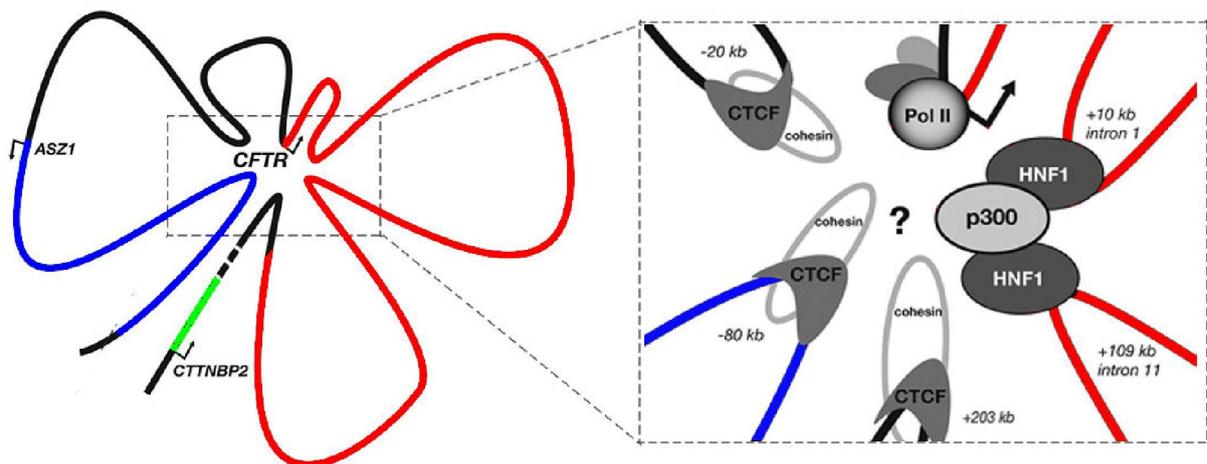


Abbildung 8: **Illustration des Active Hub im CFTR-Lokus.** Gezeigt ist die aus den bekannten räumlichen Interaktionen abgeleitete Schleifenstruktur des CFTR-Lokus. Angefärbt sind die Gene ASZ1 (blau), CFTR (rot) und CTTNBP2 (nicht maßstabsgerecht, grün). Der ACH wird über die Interaktion des -80 kb, -20 kb, Promotor, +10 kb, +109 kb und +203 kb Elements gebildet (Kasten auf der rechten Seite). CTCF, Cohesin und Pol II sind dabei ubiquitär, HNF1 und p300 (an dieser Position) dagegen nur bei CFTR-exprimierenden Zellen zu erwarten oder gefunden. Reproduziert mit Modifikationen aus Ott, *et al.*, 2010.

eine Vielzahl von TFs zusammen. Für die gewebespezifische Expression entscheidende TFs scheinen dabei Hepatic Nuclear Factor 1 homeobox A (HNF- $\alpha$ ) und Transcription Factor 4 (Tcf4) zu sein (Mouchel, *et al.*, 2004; Paul, *et al.*, 2007).

## 1.7 Chromatininteraktionen an der Zellkernlamina

Wie bereits beschrieben, befindet sich das transkriptionell inaktive CFTR-Gen, ebenso wie ein Großteil des transkriptionell inaktiven Heterochromatins, in den untersuchten Fällen in der Nähe der Kernlamina. Interaktionen mit der Kernlamina könnten daher potentiell eine

Rolle bei der Positionierung von *CFTR* spielen. Im Inneren des Zellkerns an der Kernmembran bilden faserhafte Lamine (Lamin A/C, Lamin B1, B2, B3) ein Proteingerüst, die sogenannte Kernlamina, welche dem Zellkern mechanische Rigidität verleiht. Desweiteren bilden Lamine Fasern im Inneren des Zellkerns. Porenförmigen Proteinkomplexe – die Kernporenkomplexe (Nuclear Core Complex, NPC)- durchsetzen sowohl die Kernmembran als auch die Kernlamina. Kernmembran und Lamina sind durch eine Reihe von laminbindenden integralen Transmembranproteinen verbunden. Mindestens 60 Vertreter dieser Klasse wurden bisher durch proteomische Studien identifiziert (Dreger, *et al.*, 2001; Schirmer, *et al.*, 2003; Schirmer, *et al.*, 2005) und eine weit größere Zahl wird vermutet (Wilson, *et al.*, 2010). Aufgrund ihrer Transmembrankomponente lokalisieren diese Proteine an der Zellkernperipherie. Zusätzlich zu der Bindung an Lamine verfügen einige integrale Proteine über Bindungsdomänen für chromatinbindende Komplexe (siehe Abb. 9). Durch die Wechselwirkung des integralen Membranproteins mit diesen Komplexen kann Chromatin an der Kernmembran verankert werden. So verfügen zum Beispiel die Kernmembranproteine Lamina-associated Polypeptide 2 (LAP2), Emerin und MAN1 über eine LEM-Domäne. Die Bindung an Chromatin erfolgt dabei entweder über das in hoher Kopienzahl vorliegende Protein Barrier-to-autointegration (BAF) (Furukawa, 1999; Haraguchi, *et al.*, 2001; Lee, *et al.*, 2001), welches wiederum an die Histone H3 und Histon H1.1 bindet (Montes de Oca, *et al.*, 2005), oder über das Protein Germ Cell-less (GCL) (Holaska, *et al.*, 2003, Mansharamani, *et al.*, 2005, Nili, *et al.*, 2001), welches an das Transkriptionsfaktorheterodimer E2F-DP (de la Luna, *et al.*, 1999) bindet. Eine weitere Verbindung von Kernmembran und Chromatin stellt die Bindung des Lamin-B Rezeptors (LBR) an Heterochromatisches Protein 1 (HP1) dar, welches an heterochromatische Histonmodifikationen (Nielsen, *et al.*, 2001), sowie das Histon H3 Rückgrat (Dialynas, *et al.*, 2006; Nielsen, *et al.*, 2001) bindet. Die Kernlamina trägt dabei offenbar zur Aufrechterhaltung von heterochromatischen Histonmodifikationen bei. Proteomische Untersuchungen von Emerin (Holaska, *et al.*, 2007) und LAP2 (Somech, *et al.*, 2005) zeigen eine Bindungen an histonmodifizierende Komplexe (speziell HDAC3) an. Eine künstliche Verankerung von Transgenen an die Kernperipherie führt im Einklang damit in manchen Fällen zu einer Unterdrückung der Transkription (Finlan, *et al.*, 2008, Reddy, *et al.*, 2008), jedoch ist dieses nicht in allen experimentellen Systemen der Fall (Kumaran, *et al.*, 2008).

Eine mögliche Erklärung ist die Inhomogenität der Zellkernlamina. So formen Lamin A/C und Lamin B1 lichtmikroskopisch unterscheidbare Domänen (Shimi, *et al.*, 2008) mit einer breiteren Heterochromatinschicht um die Lamin B1-Domänen. Genomweite Bindungsstudien (Guelen, *et al.*, 2008; Pickersgill, *et al.*, 2006) von Lamin B1 und Emerin zeigen beinahe identische Bindungsstellen für die beiden Proteine. Beide Proteine binden Chromatin in breiten Domänen mit einer Länge von 0,1-10 Mb (Median 553 kb), welche

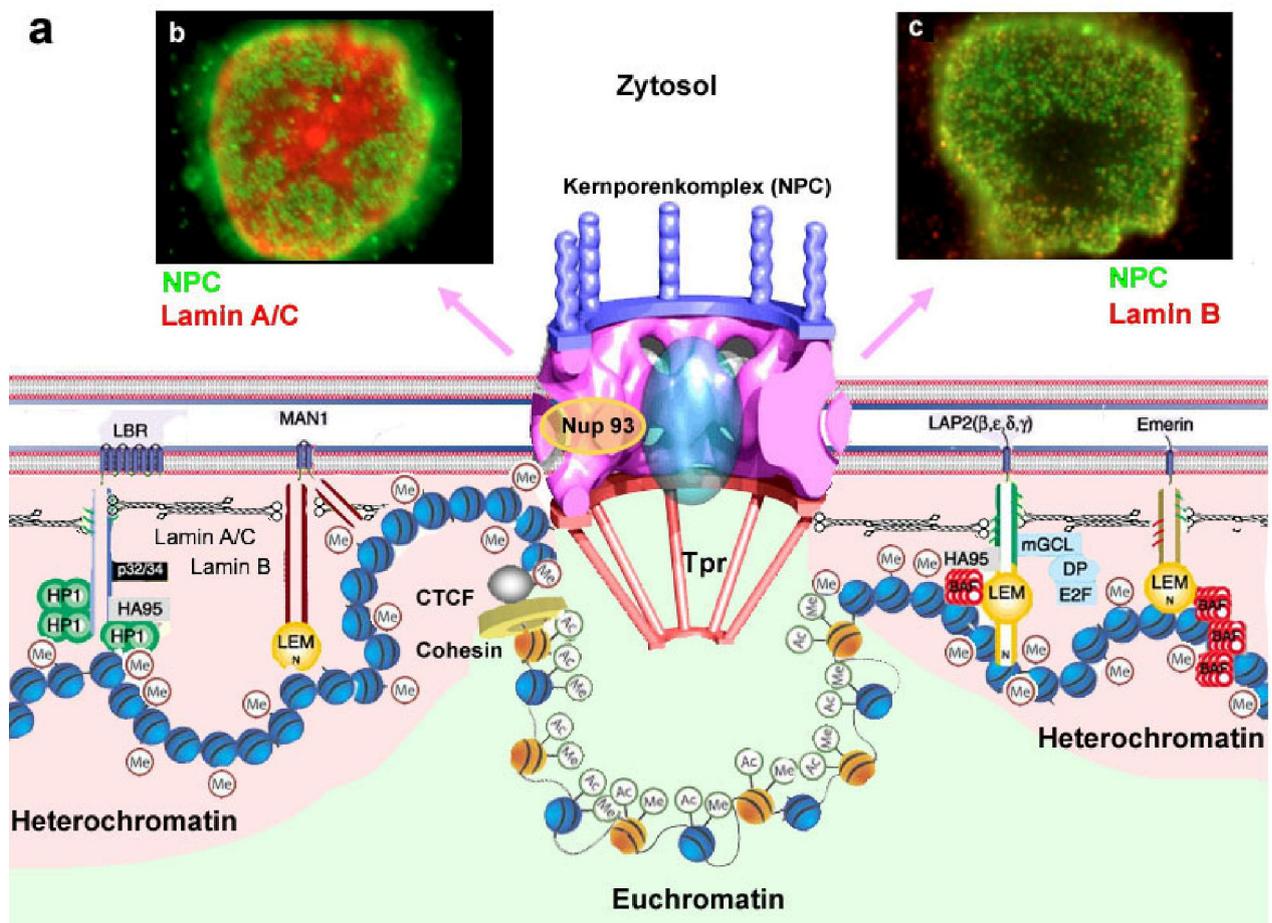


Abbildung 9: **Interaktionen an der Zellkernperipherie.** a) Schematische Darstellung von Interaktionen an der Zellkernperipherie, zusammengestellt aus Abbildungen aus Brown, *et al.*, 2008, Foisner, 2001, Guelen, *et al.*, 2008, Hinshaw, *et al.*, 1992, Pante, *et al.*, 1996. Dargestellt sind heterochromatische (hellrot unterlegt) und euchromatische (hellgrün unterlegte) Domänen. Heterochromatin ist angereichert an charakteristischen Histonmethylierungen (zum Beispiel H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3; "Me", rot eingrahmt). Transmembranproteine vermitteln eine Bindung an Heterochromatin. Aufgeführt sind die LEM-Domäne enthaltenden Proteine MAN1, LAP-2 und Emerin. Diese binden über die LEM-Domäne (gelb) über das Protein BAF (rot) oder GCL/E2F-DP (hellblau), beziehungsweise potentiell auch direkt an Chromatin. LBR vermittelt seine Bindung über HP1, (grün). An den Grenzen zwischen Hetero- und Euchromatin findet sich häufig der Proteinkomplex CTCF / Cohesin (grau, gelb). Die filamentartigen Fortsätze des NPC, zum Teil gebildet von Tpr, formen Heterochromatin freie Regionen (Krull, *et al.* 2010). Der NPC bindet an Chromatin. Die Bindung erfolgt von Tpr erfolgt möglicherweise bevorzugt an Euchromatin (gezeigt in Drosophila Vaquerizas, *et al.*, 2010), während Nup93 bevorzugt an heterochromatisches Chromatin bindet (Brown *et al.* 2008). Die Kernlamina verbindet Transmembranproteine und Kernporen. b) Die Proteine der Lamina (Lamin A/C, Lamin B1 und NPCs) formen Domänen an der

---

Zellkernoberfläche. Lichtoptische Schnitte an der Oberfläche von HeLa S3 Zellkernen. NPCs (grün) und Lamin A/C (rot) sind über Immunofluoreszenz nachgewiesen. NPCs erscheinen abgereichert in Lamin A/C Domänen. c) Wie (b), NPCs und Lamin B1 sind über Immunofluoreszenz nachgewiesen. NPCs erscheinen in Lamin B1 Domänen angereichert. b,c) aus Maeshima, *et al.*, 2006

etwa 40% des Genoms abdecken. Chromatin in diesen Domänen besitzt tendenziell heterochromatische Eigenschaften (siehe Tab. 1) und Histonmodifikationen, während die ungebundenen Regionen tendenziell euchromatische Eigenschaften besitzen. Die Lamin B1-Bindedomänen zeigen dabei für bestimmte Gene eine Reorganisationen während der Differenzierung von Zellen (Peric-Hupkes, *et al.*, 2010). Eine genomweite Bindungsstudie der NPC-Proteine Nup153 und Megator in *Drosophila melanogaster* identifizierte ebenfalls ausgedehnte Bindedomänen dieser beiden Proteine, die etwa 40% des Genoms abdecken (Vaquerizas, *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den Lamin B1-Bindedomänen erscheinen die Nup153 und Megator Bindedomänen angereichert an aktiven Genen und euchromatischen Histonmodifikationen. Eine weitere genomweite Bindungsstudie des NPC Proteins Nup93 (Brown, *et al.*, 2008) in HeLa Zellen identifizierte dagegen vergleichsweise kurze Bindestellen in eher heterochromatischen Regionen. Behandlung mit TSA führt dieser letzten Studie zufolge zu einer Reorganisation der Bindestellen. Interessanterweise befindet sich dieser Studie zufolge eine Nup93-Bindestelle innerhalb des *CFTR*-Gens. TSA-Behandlung hebt diese Bindung auf. Interaktionen mit der Zellkernlamina spielen möglicherweise auch im Falle der Positionierung des *CFTR*-Lokus eine Rolle, da ein siRNA vermittelter Knockdown sowohl von Lamin A/C, als auch LAP2 und Emerin – bei *CFTR*-nichtexprimierenden HeLa Zellen - zu einer Repositionierung des *CFTR*-Lokus in das Zellkerninnere führte (Englmann, 2005a). Ebenso führte ein über small interfering RNA (siRNA) vermittelter Knockdown der NPC-Komponente *Translocated Promotor Region* (*TPR*, Rybakina, 2006) zu einer Repositionierung des *CFTR*-Lokus in das Zellkerninnere. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten in dieser Arbeit durch weitere Experimente überprüft werden.

## 1.8 Actin und Myosin im Zellkern

Wie bereits beschrieben, wurde bei mehreren Genen eine Repositionierung im Zellkern beobachtet, wenn sich ihre transkriptionelle Aktivität ändert. Doch bewegen sich Gene passiv von einem Bindungspartner zum anderen ("Brownsche Ratsche") oder nutzt die Zelle aktive Prozesse?

So führt zum Beispiel ein Abfall des ATP-Spiegels zu einer globalen Kondensation des Chromatins (Martin, *et al.*, 2007). Untersuchungen der Genpositionierung an einem

fluoreszenzmarkierten, induzierbaren Transgenen in CHO DG44 C6 Zellen (C6, Tumber, *et al.*, 2001), zeigen eine sehr schnelle, gerichtete Repositionierung dieses Transgens (Chuang, *et al.*, 2006), welches auf eine mögliche Involvierung von Motorproteinen schließen lässt.

Im Gegensatz zu Actin im Cytoplasma formt Actin im Zellkern keine Phalloidinfärbbare Filamente (Gonsior, *et al.*, 1999; Grzanka, *et al.*, 2004; Schoenenberger, *et al.*, 2005). Damit übereinstimmend ist die Konzentration des Actin sezernierenden Faktors Cofilin im Kernplasma deutlich erhöht (Chhabra, *et al.*, 2005; Nishida, *et al.*, 1987; Pendleton, *et al.*, 2003). Eine alternative Konformation für Actinfilamente im Kernplasma – sogenanntes T-Actin (T von "tilted") wurde vorgeschlagen (Egelman, 2003), ist bisher aber noch unbewiesen. Dagegen wurden (F-Actin)-Filamente in der Kernlamina in Oozyten des Krallenfroschs direkt mittels Elektronenmikroskopie visualisiert (Kiseleva, *et al.*, 2004; Walther, 2008). Proteine der Kernlamina, darunter Lamin A, Lamin B und Emerin sowie die Kernmembran durchspannende Komplexe wie Nesprin können die Bildung von Actinfilamenten initiieren (Zhang, *et al.*, 2001; Holaska, *et al.*, 2004). Biochemische Fraktionierungen deuten auf eine strukturelle Funktion von Actin hin. So sind zum Beispiel eine Reihe von HDAC enthaltenden Komplexen über Actin an die nukleare Matrix gebunden (Andrin, *et al.*, 2004). Actin und mit Actin verwandte Proteine ("Actin Related Proteins" –ARPs) stellen Komponenten zahlreicher Proteinkomplexe im Zellkern, darunter die Chromatinremodellierer, und architekturelle Komplexe an der Zellkernlamina (für eine Zusammenfassung siehe Clapier, *et al.*, 2010).

Eine Beteiligung von Actin an der Positionierung von mehreren Genen wurde indirekt nachgewiesen. Experimente mit dem C6-Transgen zeigen dabei, daß eine nicht polymerisierbare Actinmutante (Actin G13R) die Repositionierung dieses Transgens verlangsamt, während eine Filamentstabilisierende Actinmutante (Actin S14C) die Repositionierung beschleunigt (Chuang, *et al.*, 2006). Dieselbe nicht polymerisierbare Actinmutante (Actin G13R) unterdrückt auch die Bewegung des *U2 snRNA*-Gens (Dundr, *et al.*, 2007). Inhibitoren der Actinpolymerisierung (Latrunculin A, Phalloidin-Oleat), unterdrücken die Repositionierung von Chromosomen (Mehta, *et al.*, 2010).

Von den mit Actin interagierenden Myosin-Motorproteinen wurden verschiedene Isoformen im Zellkern nachgewiesen. Gezeigt wurde dieses für Myosin V, NMI. Actin und Myosin sind essentiell für die Transkription – sowohl der RNA Polymerase I (Ye, *et al.*, 2008) als auch II (Wu, *et al.*, 2006; Yoo, *et al.*, 2007). Sowohl die Inhibitoren 2,3-Butandion-2-Monoxime (BDM), als auch eine nichtfunktionelle NMI Mutante verlangsamen die Repositionierung des C6-Transgens (Chuang, *et al.*, 2006).

## 1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgehend von dem Befund, dass TSA-Behandlung zu einer Veränderung der Positionierung des *CFTR*-Gens führt, sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob Histonhyperacetylierung für diese Repositionierung verantwortlich ist. Dazu sollte zuerst die Kinetik der globalen TSA-induzierten Histonhyperacetylierung durch Westernblotting ermittelt werden. Außerdem sollte die Kinetik der *CFTR*- Repositionierung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Zeitreihen ermittelt werden. Sollte die TSA-induzierte Histonhyperacetylierung der Auslöser für die Repositionierung des *CFTR*-Lokus sein, dann sollte die Histonhyperacetylierung vor- oder zumindest gleichzeitig mit der Repositionierung auftreten. Bei einer Übereinstimmung dieser Kinetiken sollte weiter getestet werden, ob die TSA-Behandlung auch zu einer lokalen Zunahme der Histonacetylierung innerhalb der *CFTR*-Region führt. Diese Analyse sollte mittels ChIP durchgeführt werden. Durch die Analyse der TSA-induzierten Histonhyperacetylierungsmuster innerhalb der *CFTR*-Region sollte ermittelt werden, ob bestimmte Regionen von besonderer Bedeutung für die Positionierung sein könnten. Um ein möglichst vollständiges Bild der TSA-induzierten Veränderungen der Histonacetylierung in der *CFTR*-Region zu erlangen, sollte die Analyse der mittels ChIP gewonnenen DNA auf DNA-Mikroarrays (Chips) erfolgen (ChIP-chip). Als Strategie zur Identifizierung der für die Repositionierung kritischen Elemente, war dabei vorgesehen, verschiedene *CFTR*-nichtexprimierende Zelllinien vor- und nach TSA-Behandlung zu vergleichen, in denen das *CFTR*-Gen von der Peripherie nach TSA-Behandlung in das Zellkerninnere repositioniert. Auch sollten *CFTR*-exprimierende Zellen (ohne TSA-Behandlung) für den Vergleich herangezogen werden, bei denen sich das *CFTR*-Gen im Zellkerninneren befindet. Die Hypothese war dabei, dass die Histone in den Regionen, die für die Positionierung des Gens kritisch sind, immer dann hochacetyliert sein sollten, wenn sich das Gen im Zellkerninneren befindet, und relativ deacetyliert, wenn es sich an der Kernperipherie befindet. Nach Identifikation derartiger Regionen sollten TFs, die in diesen Regionen binden, mittels siRNA vermitteltem Knockdown auf eine mögliche Rolle bei der radialen Genpositionierung getestet werden.

Knockdowns von Komponenten der Zellkernlamina hatten in vorausgegangenen Arbeiten einen Einfluss auf die Positionierung von *CFTR* gezeigt. Um mögliche unspezifische Effekte der Knockdowns ausschließen zu können, sollten zusätzliche Knockdowns von mutmaßlich nicht an der Genpositionierung beteiligten Proteinen als negative Kontrolle durchgeführt werden.

Schließlich legen Untersuchungen mit Mutanten von Actin und Myosin eine Beteiligung dieser beiden Proteine an der Genpositionierung nahe. Eine mögliche Bedeutung dieser beiden Komponenten für die Positionierung des *CFTR*-Lokus sollte durch Behandlung mit dem Myosininhibitor BDM getestet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Lösungen:

Chemikalie / Lösung	Hersteller
2,3-Butanedione 2-Monoxime (BDM)	Merck, Whitehouse Station, USA
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua Ultra Pure	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deoxycholat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dextransulfat	Pharmacia, Braunschweig, Deutschland
Dimethyl-Adipimidat (DMA)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid	Merck, Whitehouse Station, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Whitehouse Station, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 500 mM	1st Base, Singapur, Singapur
Essigsäure	Merck, Whitehouse Station, USA
Ethanol Abs. p.a.	Merck, Whitehouse Station, USA
Formaldehyd stabilisiert	Merck, Whitehouse Station, USA
Formamid	Merck, Whitehouse Station, USA
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Harnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hefe Extract	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Merck, Whitehouse Station, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Whitehouse Station, USA

Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Whitehouse Station, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Whitehouse Station, USA
Methanol	Merck, Whitehouse Station, USA
Natriumacetat	Merck, Whitehouse Station, USA
Natriumchlorid	Merck, Whitehouse Station, USA
Natrium-Citrat Dihydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pepton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (37%)	Merck, Whitehouse Station, USA
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	Merck, Whitehouse Station, USA
Trypton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Merck, Whitehouse Station, USA
Vectashield	Vector, Burlingame, USA

### 2.1.2 Stammlösungen und Medien

Stammlösungen /Medien	Hersteller
Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer Set	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Aminosäuren, nicht essentiell 100x	Invitrogen, Carlsbad, USA
DME (4,5g Glucose/l)	Biopolis Shared Facilities, Singapur
EDTA (500 mM)	1st Base, Singapur, Singapur
Fötale Kälberserum, EU zertifiziert, inaktiviert	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage MES SDS Puffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE SDS MES Laufpuffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Opti-MEM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10%	1st Base, Singapur, Singapur
Trishydroxymethylaminomethane (TRIS) 1 M pH 8,0 / pH 8,8	1st Base, Singapur, Singapur

Trypsin-EDTA Lösung mit HEPES, 1x	Invitrogen, Carlsbad, USA
-----------------------------------	---------------------------

### 2.1.3 DNA-Chips

Typ	Hersteller
Agilent Custom Microarray 4x44K	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

### 2.1.4 Kits

Kits	Hersteller
Agilent Oligo aCGH/ChIP-Chip Hybridization Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dynabeads Protein A / G	Invitrogen, Carlsbad, USA
KAPA Sybr Fast qPCR Kit	Kapa Biosystems, Woburn, USA
KAPA Sybr qPCR Universal Kit	Kapa Biosystems, Woburn, USA
LabelIT Labeling Kit Cy3/Cy5	Mirus, Madison, USA
Large Construct Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Minelute PCR Cleanup Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Protease Inhibitor Set (Complete mini)	Roche, Basel, Schweiz
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAiMAX	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperSignal West Femto	Thermo Scientific, Waltham, USA
GenomePlex Complete® Whole Genome Amplification Kit (WGA2)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 2.1.5 Farbstoffe, Auftragspuffer und Marker

Farbstoff / Auftragspuffer / Marker	Hersteller
DAPI (4'6'-Diamidino-2'-Phenylindol) (2mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNA marker	Fermentas, Burlington, Kanada

LDS NuPAGE Sample Buffer (4 x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Loading Buffer Pack (5x, incl. DTT)	Fermentas, Burlington, Kanada
Loading Dye 6x	Fermentas, Burlington, Kanada
Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid (NBT) / 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat p- Toluidine Salz (BCIP)-Tabletten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pageruler	Fermentas, Burlington, Kanada
SybrGreen I	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alu I	Fermentas, Burlington, Kanada
Pdm I	Fermentas, Burlington, Kanada
Protease K	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase A	Roche, Basel, Schweiz
Taq DNA Polymerase	Roche, Basel, Schweiz

### 2.1.7 Primäre Antikörper

Epitop	Wirt	Typ	Katalog Nr.	Hersteller
$\beta$ -Actin	Maus	Monoklonal	ab 8224	Abcam, Cambridge, UK
CTCF	Kaninchen	Polyklonal	2899	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Emerin	Kaninchen	Polyklonal	sc 15378	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Histon H3 K27 trimethyliert	Kaninchen	Polyklonal	07-449	Millipore, Billerica, USA

Histon H3 K36 trimethyliert	Kaninchen	Polyklonal	ab 9050	Abcam, Cambridge, UK
Histon H3 K4 trimethyliert	Kaninchen	Polyklonal	ab 1012	Abcam, Cambridge, UK
Histon H3 K9 trimethyliert	Kaninchen	Polyklonal	ab 8898	Abcam, Cambridge, UK
Histon H3 K9/14 acetyliert	Kaninchen	Polyklonal	06-599	Millipore, Billerica, USA
Histon H3 Pan	Kaninchen	Polyklonal	ab 1791	Abcam, Cambridge, UK
Histon H4 K5/8/12/16 acetyliert	Kaninchen	Polyklonal	06-866	Millipore, Billerica, USA
Histon H4 K8 acetyliert	Kaninchen	Polyklonal	ab 15823	Abcam, Cambridge, UK
Lamin A/C	Maus	Monoklonal	sc 636	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Lamin B (Hauptsächlich Lamin B1)	Ziege	Polyklonal	sc 6216	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
LAP2 (Alle Isoformen)	Ziege	Polyklonal	sc 19783	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
NUP 93	Ziege	Polyklonal	sc 74768	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
PML	Maus	Monoklonal	-	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Roel van Driel, Univ. Amsterdam, Niederlande

### 2.1.8 Sekundäre Antikörper

Epitop	Wirt	Markierung	Katalog Nr.	Hersteller
Kaninchen IgG	Esel	Meerettich-Peroxidase (HRP)	V795A	Promega, Madison, USA
Kaninchen IgG	Ziege	Alkalische-Phosphatase (AP)	sc 2007	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Kaninchen IgG	Ziege	Texas Red	T2767	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa 488	11008	Invitrogen, Carlsbad, USA
Maus IgG	Schaf	HRP	NA931V	GE Healthcare
Maus IgG	Ziege	AP	sc-2008	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Maus IgG	Ziege	Texas Red	T6390	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ziege IgG	Kaninchen	HRP	ab 6741	Abcam, Cambridge, UK

### 2.1.9 Nukleotide, Nukleinsäuren

Nukleotide, Nukleinsäuren	
Chromosom 7 Painting Sonde	Zur Verfügung gestellt von PD Dr. Stefan Müller, Univ. München, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche, Basel, Schweiz
Fluorescein-12-dUTP	Roche, Basel, Schweiz
Humane COT-1 DNA	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lachssperma DNA	Applied Biosystems, Foster City, USA

## 2.1.10 Oligonukleotide

Position	Name F=Vorwärts R=Revers	Sequenz 5' → 3'	Bindungsstelle auf Chromosom 7
1	NVAL1F	CCCAAGCCATAATTAC AGCCA	116205430-116205450
1	NVAL1R	GCGGAGCCAGGAACA CTAT	116205489-116205507
2	NVAL2F	CACAGAACTTTGGCTT CCTCA	116220104-116220124
2	NVAL2R	TGTACTTGGTTACAATC CTGTGATG	116220145-116220169
3	NVAL3F	TACCCTGCCTTTGTTG CTTG	116237168-116237187
3	NVAL3R	AAGGCTTCCTCCCACT GAAG	116237223-116237242
4	NVAL4F	GTACAAATCTGTGGCA CGGG	116247454-116247473
4	NVAL4R	CCAGGTGGCAAAAATG GAAC	116247500-116247519
5	NVAL5F	GCTTCACTGGGGTGAG TTAGTTT	116262692-116262714
5	NVAL5R	GACCAAGCAGAGGCC AGTTA	116262741-116262760
6	NVAL6F	GCTGCAGTATAGTAAC TGAATAGGAGG	116276448-116276474
6	NVAL6R	AGACACGTGTTCTGTT CACCAA	116276487-116276508
7	NVAL7F	GGGTTGGAAATGTCCA CTCTT	116290991-116291011
7	NVAL7R	TCCTGCACTGGCTTTG AAAT	116291036-116291055

8	NVAL8F	GTCTCAGACAGTTGAT GGGCAG	116309802-116309823
8	NVAL8R	TCCAAAATACATGTGA GCCCTG	116309840-116309861
9	NVAL9F	CGTCAAAGTAGGTAAG ACTGTGGG	116330997-116331020
9	NVAL9R	TTGGTCTGGTGCAAAT CCTC	116331050-116331069
10	NVAL11F	TGCTACCCTCCAAGAC TTATGC	116462272-116462293
10	NVAL11R	TCATGTTGCGACACCA CAGT	116462312-116462331
11	NVAL12F	GCTACACGTTTCTTTG CTCCC	116502718-116502739
11	NVAL12R	GCTGTGCTGAGAGGCT GAAC	116502775-116502794
12	NVAL13F	AGACAGCCTTCTTAAT GCAGCTT	116514305-116514325
12	NVAL13R	TCTTCTGAGGAAAATC TGCCC	116514348-116514368
13	NVAL14F	TGTGTCTCTGAAGTTTT CCCTGTT	116529289-116529311
13	NVAL14R	TGGAGCCACTTTCTAC AGGGTC	116529337-116529358
14	NVAL15F	TCCAAAATATGATGTTG CAGGG	116553147-116553170
14	NVAL15R	GTCCAGACTGCCCGAC TCTT	116553197-116553216
15	NVAL16F	TGAGAAACAAACGGAA AAGGAA	116585541-116585562
15	NVAL16R	GCATTTATGCACAGCC CAAC	116585585-116585604
16	NVAL17F	ACTGTTTTGCAGAGTC AGCATGT	116603800-116603821

16	NVAL17R	AGGCCTTGGGAAATAA GCAAG	116603848-116603868
17	Primer 33F	AGGGCATTCAAAGAAA AGCA	116827301-116827320
17	Primer 33R	AGACCAACCATTTTAC CCCA	116827390-116827409
18	NVAL18F	GAAAAAGTTCTGTTGG GATCCTG	116863280-116863302
18	NVAL18R	TCTCCAAAAGAGACAA CTAATCTCACT	116863327-116863353
19	NVAL19F	TGACTGTGGGCTGATA ATTCAGA	116872540-116872562
19	NVAL19R	GGATCTGCTGGTAGGA ATTGG	116872595-116872615
20	H3acNewF2	TACGCCAATCCTAACT CACAGGC	116886276-116886298
20	H3acNewR2	CAGATTAATTTGCCATC ATATTATCC	116886343-116886365
21	Primer 11F	GCCATTTGGTCATTTT CTTC	116886872-116886891
21	Primer 11R	TCCATCACATCCCATTT GAG	116886968-116886987
22	NVAL20F	TGTTTTGCGTGTTTTCT TCTTTC	116888855-116888877
22	NVAL20R	GGCCAAGGCCTCAGAT TAAC	116888904-116888923
23	H3 K9 Primer 10F	TGGCATTGACCTTCT GTACC	116900501-116900500
23	H3 K9 Primer 10R	GTGCCTCAGGAAAGAC CCTA	116900637-116900657
24	Primer 24F	GAAACCTGGCAGGGT GACTA	116904044-116904063
24	Primer 24R	TGCTGGGTGCTTCTTA CAAA	116904113-116904132

25	Primer 22F	AATTGTGCAACTTGCTT GGG	116904386-116904405
25	Primer 22R	AACACCTTCATGGGAC AGGA	116904468-116904487
26	H3acNewF3	TATGAGCTATCATTGA GCAGCATG	116904592-116904615
26	H3acNewR3	CAATGTGGCTTAAGG TCATGATTG	116904707-116904730
27	H3acNewF4	CCACCCTTGAGTTCA CTCACC	116906555-116906576
27	H3acNewR4	AGCGCTTCCTTTGCGT GTCGG	116906611-116906632
28	H3acNewF5	AGTTAATCCTGGA CCGGTGC	116908446-116908468
28	H3acNewR5	GAGCTCTCCTTCAAGG GCCAAC	116908481-116908503
29	Primer 1F	TCCACCTTTTGTTACTC CACC	116908565-116908585
29	Primer 1R	CTGGTTGGCATTAGG TTCC	116908685-116908704
30	H3acNewF6	CTATTTATAGGAACTGA CAATCACC	116908992-116909016
30	H3acNewR6	CTACTAAACAGTAGAT GTAGGATCTG	116909160-116909184
31	H3K9 Primer 3F	TGTGTGAACTGATGAG CAACTG	116943811-116943832
31	H3K9 Primer 3R	CGCCACCCTCACTGAT AAC	116943877-116943895
32	Primer 10F	ACCAGGGAGCTGGAA AACAT	116998556-116998575
32	Primer 10R	CCCAAATGCTGCCTAA AATG	116998676-116998695
33	Primer 9F	TCAGAAAGAAAATAAT CATCCCC	117005192-117005214

33	Primer 9R	GAGCTTGATTCCTATC ATTCACTATT	117005254-117005279
34	Primer 38F	TTCCTTCCCTAAATCCC TCA	117010053-117010072
34	Primer 38R	TCCAAAGACCAGAAAC AGCC	117010147-117010166
35	H3acNewF8	AGGGCTGTTTCTGGTC TTTGGAG	117010144-117010166
35	H3acNewR8	TCAGGCTTTGCACACT CAGATCG	117010185-117010207
36	H3K9 Primer 12F	GCCCGTATCTTGGTGT CAGT	117015251-117015250
36	H3K9 Primer 12R	AGTGGCAGGGTCTATG ATGG	117015449-117015469
37	NVAL21F	TGTGCCCGTATCTTGG TGTC	117015334-117015353
37	NVAL21R	GCAGAATCCTAGAGTT TTCCATTTG	117015388-117015412
38	H3acNewF9	GAGGGAGAGAATTAAG AACAGAGTG	117016494-117016518
38	H3acNewR9	TATGCAAGAGCTACAT AATGGATCC	117016548-117016572
39	NVAL22F	AGCAGTTTCCTGGTTC TTTTGA	117027660-117027681
39	NVAL22R	ACAGGATCTTCAGATA TTCCAGTCA	117027705-117027729
40	Primer 12F	ATGTGGAAACCGTGAG GAAA	117028257-117028276
40	Primer 12R	GCCAACATTCTTTGAA GGTGA	117028368-117028388
41	NVAL23F	TGGGAGATATCAAATG CGACC	117072421-117072441
41	NVAL23R	TGAGTGAGAACTGCTA CACTGCTG	117072474-117072497

42	Primer 5F	AAGGCGGTTTCATAAAG GGTC	117073013-117073032
42	Primer 5R	CTGGCATCCTGGAATA CCC	117073115-117073139
43	Primer 6F	ATGGGATTTGGAGCCT TGTT	117073657-117073676
43	Primer 6R	TTGCTTTCTTAACTAGG ATACCTGC	117073724-117073742
44	H3acNewF11	CAGAGTATCAAAGGA GTTGACTG	117087124-117087147
44	H3acNewR11	GCTGTATTCTGGAATG TTATTATGG	117087252-117087275
45	H3acNewF12	CCAAGTCATACAAAAT ACTCTACTG	117093133-117093157
45	H3acNewR12	TAATACCATAAATCAGA CTGTAAGAC	117093239-117093263
46	H3acNewF13	G TTCAGGCTTTTGAGC CTCCTGG	117093592-117093614
46	H3acNewR13	CATGGCAGGGCAAGA GGTTGTG	117093696-117093718
47	H3acNewF16	TCAACCTGAACAAGCC AAGGAGG	117093770-117093792
47	H3acNewR16	CCTCTTCCACAGTGAT CTGAAGC	117093837-117093859
48	Primer 2F	TTCTGTCCCTGCTCTG GTCT	117094134-117094153
48	Primer 2R	ACTGCCGCACTTTGTT CTCT	117094206-117094225
49	Primer 3F	TTCTGTCCCTGCTCTG GTCT	117094134-117094153
49	Primer 3R	GCTCCTCTCGTTCAGC AGTT	117094241-117094260
50	Primer 4F	TAAGACAGCCAGTGCC AACA	117101367-117101386

50	Primer 4R	GTGCCCCAAACTATT CAGG	117101476-117101495
51	Primer 34F	GGTGTCCTGAATGCCC TTTA	117110171-117110190
51	Primer 34R	CCAGATGTCCTTCAGT GCG	117110291-117110309
52	Primer 36F	TACCTCCAATCAAAGG GCAG	117110823-117110842
52	Primer 36R	TGAGAGATCAAAGCC GACC	117110897-117110916
53	H3acNewF15	CCTTACTGTTAGAGCA GTGAGGAG	117142971-117142994
53	H3acNewR15	CCTGCAACCATCATTA TCTGTTGG	117143041-117143064
54	Primer 15F	GCATCAGCCAGTCAAG GTTT	117143226-117143245
54	Primer 15R	AGTCTTCTCTCCCTTTG CCC	117143352-117143371
55	Primer 3.3F	GCCCAGATAGTATAAA AGGACTCG	117143449-117143472
55	Primer 3.3R	TCACTAGACCATATTG AGTTGCTAC	117143552-117143576
56	H3acNewF14	CTCCTGGCCCCTTCCA CTGAC	117143705-117143725
56	H3acNewR14	CTCCTGGCCCCTTCCA CTGAC	117143770-117143790
57	NVAL24F	AGCCATGCTTTTCTTCA CAGG	117143992-117144012
57	NVAL24R	GGGAGTGGGAATTTAC ACGG	117144048-117144067
58	NVAL25F	TGTTGAAGGTTGAAAG GAAGGC	117185438-117185459
58	NVAL25R	ATCCCTCCTATGGGCT GCTT	117185482-117185501

59	NVAL26F	TGCACTACAGTGCTCC TGGC	117187352-117187371
59	NVAL26R	TGCTTTTGC GCAAGTA CTGAA	117187400-117187420
60	NVAL27F	GTCCTCAGCTTCTGCC CAAA	117256645-117256664
60	NVAL27R	CCTTGCCTAAACCAAC ACTTCC	117256697-117256718
61	NVAL28F	ACAGGGCACCCTTTC TTCT	117256645-117256664
61	NVAL28R	AGGATAAAAACACCCT GGCG	117256693-117256712
62	NVAL29F	CAATGCCCTCTTCATC ACAAAA	117301206-117301227
62	NVAL29R	AAGCACCTACCTGATT GTGAAGC	117301252-117301274
63	NVAL30F	GCTCAAATCCTCAACA AATAAGCA	117361784-117361807
63	NVAL30R	TGGAGGAAATTTGGAG ATGTCA	117361836-117361857

### 2.1.11 DOP-PCR Markierungsprimer

Name	Sequenz	Hersteller
6MW	CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG	Metabion, Martinsried, Deutschland

### 2.1.12 siRNA

Name	Katalog Nr.	Hersteller
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo for lipid transfection	# 2013	Invitrogen, Carlsbad, USA

CTCF Stealth Select RNAi™ siRNA (3 Oligos)	# 1299003 HSS116455, HSS116456, HSS173820	Invitrogen, Carlsbad, USA
TMPO (Lap-2) <i>Silencer</i> ® Select siRNA	AM16810 s14233	Applied Biosystems, Foster City, USA
PML <i>Silencer</i> ® Select siRNA	AM16810 s10715	Applied Biosystems, Foster City, USA
Lamin A/C <i>Silencer</i> ® Select siRNA	AM16810 s8221	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.1.13 Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
“Phosphate Buffered Saline“ (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCL 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)	Invitrogen, Carlsbad, USA
“Radio-Immunprecipitation-Assay“ (RIPA-)	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,25 % Deoxycholat 1% Triton X-100	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
ChIP Puffer	RIPA- 1 Tablette “Complete, Mini“ / 10ml	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
ChIP Puffer mit SDS	ChIP Puffer 0,03 % SDS 3 mM EDTA	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
20x “Saline-Sodium Citrate“ (SSC)	(1x) 150 mM NaCl 15 mM Na Citrat (pH 7,0)	1st Base, Singapur, Singapur

Fixativ für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung(FISH)	75% (v,v) Methanol 25% (v,v) Essigsäure	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
Denaturierungslösung (FISH)	70% Formamid 2x SSC	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
SSC + Tween (SSCT)	4x SSC 0,2% Tween 20	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
Agilent Oligo aCGH/ChIP- on-Chip Wash Buffer 1 und 2	Geheim	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
P1	50 mM Tris·Cl, (pH 8.0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A	Qiagen, Hilden, Deutschland
P2	200 mM NaOH, 1% SDS	Qiagen, Hilden, Deutschland
P3	3.0 M Kaliumacetat (pH 5.5)	Qiagen, Hilden, Deutschland
NuPAGE MES SDS Puffer (20x)	(1x): 50 mM MES 50 mM Tris (pH 7.3) 0.1% SDS 1 mM EDTA	Invitrogen, Carlsbad, USA
50x TAE	(1x) 40 mM Tris-Acetat (pH 8,0) 1 mM EDTA	1st Base, Singapur, Singapur
DPBS (10x)	(1x) 137 mM NaCl 8,5 mM Natrium Phosphat 1,5 mM Kalium Phosphat (pH 7,4)	Biopolis Shared Facilities, Singapur
PB	Geheim (Guanidinium- HCl Isopropanol)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PE	Geheim (80% Ethanol)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2	Geheim	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Hybridisierungspuffer (FISH)	70% Formamid 2x SSC 10% Dextransulfat	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
Hybridisierungspuffer (CGH)	Geheim	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Puffer D ( <i>LabelIT</i> )	3 M NaOH	Mirus, Madison, USA
Puffer N ( <i>LabelIT</i> )	3 M HCl 1 M Tris	Mirus, Madison, USA
Puffer A ( <i>LabelIT</i> )	Geheim	Mirus, Madison, USA
Mikroarray Regenerierungspuffer	70% Formamid 6 M Harnstoff 1 mM NaOH	- Chemikalien siehe Tabelle 2.1.1
“Stabilization and Drying” Lösung	Geheim (Antioxidant in Acetonitril)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

### 2.1.14 Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Hersteller
Deckgläser	Assistent, Sondheim, Deutschland
iBlot Transfer Stack PVDF	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mikrozentrifugenbehälter, PCR-Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg Axygen, Union City, USA
NuPage 8-12% Bis-Tris Gradientengele	Invitrogen, Carlsbad, USA
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Sterilfilter	Nalge Nunc, Rochester, USA
Zellkulturflaschen (75 und 175 cm <sup>2</sup> ) Zentrifugenröhrchen steril (15 ml / 50ml) Zellkultur Behälter, Petrischalen, Reaktionsgefäße, Multiperm	Nalge Nunc, Rochester, USA

**2.1.15 Hilfsmittel**

Hilfsmittel	Bezugsquelle
Diamantstift	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Fixogum	Marabu, Tamm, Deutschland
Glasküvetten	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Kimwipes Science (fusselfrei)	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Laborhandschuhe Safeskin	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Metallbox	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Nagellack (klar, farblos)	Drogeriehandel, Deutschland
Parafilm	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pinzetten	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pipettierhilfen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vectashield	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Whatman Papier	BioRad, Hercules, USA

**2.1.16 Bakterien**

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
P1-derived Artificial Chromosome (PAC) CF1 (RP CIP 704F2220)	CFTR (Exon 1-9), 138 kb	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), weitergeführt durch Imagenes GmbH, Berlin, Deutschland

**2.1.17 Zelllinien****2.1.17.1 SH-EP N14**

Organismus	Mensch
Bezeichnung	SH-EP N14
Gewebe	Nervengewebe
Zelltyp	Neuroblastomzellen, epithelial, SK-N-SH Derivat, stabil transfiziert mit N-Myc
Alter	4
Geschlecht	weiblich
Karyotyp	hyperdiploid (47 Chr.), Chromosom 17;22 Translokation Trisomie Chromosom 7 und 11
Kulturmedium	DME, 10% FBS
Einfriermedium	Kulturmedium mit 7% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Verdopplungszeit	≈ 24 h
Referenz	Ross, <i>et al.</i> , 1983, Wenzel, <i>et al.</i> , 1991
Bezugsquelle	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Schwab, DKFZ Heidelberg, Deutschland

**2.1.17.2 HEK 293**

Organismus	Mensch
Bezeichnung	Human Embryonic Kidney (HEK) 293
Gewebe	Niere
Zelltyp	embryonale Nierenzellen, fibroblastoid, Adenovirus Typ 5 transformiert
Alter	fetal
Karyotyp	hypotriploid (ca. 64 Chr.), Trisomie Chromosom 7; Translokation Chr. 7 (ohne CFTR)

Kulturmedium	DME, 10% FBS
Einfriermedium	Kulturmedium mit 7% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Verdopplungszeit	≈ 24 h
Referenz	Graham, <i>et al.</i> , 1977
Bezugsquelle	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

### 2.1.17.3 HeLa S3

Organismus	Mensch
Bezeichnung	Henrietta Lacks, Subklon S3 (HeLa S3)
Gewebe	Zervikalschleimhaut
Zelltyp	Zervixkarzinom, epithelial, HPV-18 Virus-Sequenzen
Alter	31 Jahre
Geschlecht	weiblich
Karyotyp	hypertriploid (ca. 82 Chr) metazentrische Marker-Chr. Trisomie Chromosom 7
Kulturmedium	DME, 10% FBS
Einfriermedium	Kulturmedium mit 7% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Verdopplungszeit	≈ 24 h
Referenz	Scherer, <i>et al.</i> , 1954
Bezugsquelle	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

### 2.1.17.4 Calu-3

Organismus	Mensch
Bezeichnung	Lung Carcinoma (Calu-3)
Gewebe	Lunge
Zelltyp	Adenokarzinomzellen, epithelial

Alter	25 Jahre
Geschlecht	männlich
Karyotyp	hypotriploid, teilweise instabil, 2-4 Kopien von Chromosom 7
Kulturmedium	DME, 15% FBS
Einfriermedium	Kulturmedium mit 7% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Verdopplungszeit	≈ 72 h
Referenz	Fogh, <i>et al.</i> , 1977, Fogh, <i>et al.</i> , 1977
Bezugsquelle	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

### 2.1.18 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Chemische Werkbank	Captair Chem	Erlab, Rowley, USA
CO <sub>2</sub> Inkubator	1) NU-5510E 2) Forma SterCycle	1) Nuair, Plymouth, USA 2) Thermo Scientific, Waltham, USA
DNA Gelelektrophorese Kammer	1) Flashgel 2) Hoefer HE33	1) Lonza, Basel, Schweiz 2) Hoefer, Holliston, USA
Elektrophorese Spannungsgerät	Consort E831	Hoefer, Holliston, USA
Feinwaage		Ohaus, Pine Brook, USA
Geldokumentationsanlage	ChemiDoc XRS	BioRad, Hercules, USA
Lightcycler	1) 7500 Fast Real Time PCR System 2) StepOne Plus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Microarray Scanner	Axon Genepix 4200 Autoloader, 594 nm, 635 nm Laser	MDS, Toronto, Kanada
Photometer	Nanodrop	Nanodrop Products, Wilmington, USA

Rotationsofen	Hybridization Oven	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SDS-PAGE Kammer	XCell SureLock	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sonifier	HTU Soni130	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Steril Werkbank	NU437-400E	Nuaire, Plymouth, USA
Thermocycler	1) Primus 2) MyCycler	1) MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland 2) BioRad, Hercules, USA
Thermoschüttler	Thermoshaker RIO	Q Instruments, Jena, Deutschland
Western Blot Transfereinheit	iBlot	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zentrifugen	1) Mikro 200R 2) miniSpin plus	Hettich, Beverley, USA Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.1.19 Mikroskope

Mikroskop / Typ	Typenbezeichnung	Hersteller
Axiovert 135 TV	<p>Epifluoreszenz</p> <p>Objektive: Plan-Apochromat 63x, NA: 1.4, Ölimmersion 40x, NA: 1.3, Ölimmersion</p> <p>Filtersätze: DAPI: (BP 365; FT 395; LP 420 nm*) FITC: (BP 450-490; FT 510; LP 515-565 nm*) TRITC: (BP 546; FT 560; LP 575-640 nm*)</p>	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

	<p>(* Anregungsfilter; Farbteiler; Sperrfilter)</p> <p>CCD Kamera: MicroMAX Pixelgröße: 6,8 µm x 6,8 µm</p>	
iMacs	Epifluoreszenz (Konfokal – Nipkow Scheibe)	TILL Photonics, Graefelfing, Deutschland
Olympus IX70	<p>Epifluoreszenz</p> <p>Objektive: Super-Apochromat 63x, NA: 1.35, Ölimmersion 40x, NA: 1.3, Ölimmersion 20x, NA:</p> <p>Filtersätze: DAPI: (BP 360-370; FT 400; LP 420-460 nm*) FITC: (BP 460-490; FT 505; LP 510-550 nm*) TRITC: (BP 510-560; FT 565; LP 570-645 nm*) (* Anregungsfilter; Farbteiler; Sperrfilter)</p> <p>CCD Kamera: CoolSNAP HQ<sup>2</sup> Pixelgröße: 6,45 µm x 6,45 µm</p>	Olympus, Tokyo, Japan
Olympus IX81	<p>Epifluoreszenz (Konfokal – Nipkow Scheibe)</p> <p>Objektive: Super-Apochromat 63x, NA: 1.35, Ölimmersion 40x, NA: 1.3, Ölimmersion 20x, NA:</p> <p>Filtersätze: DAPI: (BP 360-370; FT 400;</p>	Olympus, Tokyo, Japan

	LP 420-460 nm*) FITC: (BP 460-490; FT 505; LP 510-550 nm*) TRITC: (BP 510-560; FT 565; LP 570-645 nm*) (* Anregungsfilter; Farbteiler; Sperrfilter)  CCD Kamera: CoolSNAP HQ <sup>2</sup> Pixelgröße: 6,45 µm x 6,45 µm	
Olympus CKX41	Phasenkontrast	Olympus, Tokyo, Japan

### 2.1.20 Kommerzielle Software

Software	Hersteller	Verwendung
7500 Software v 2.0.3	Applied Biosystems, Foster City, USA	Steuerung der qPCR Maschinen, Quantifizierung
GenePix Pro 6.0	Molecular Devices, Sunnyvale, USA	Steuerung des Microarray Scanners, Bildaufnahme und Quantifizierung
Metamorph 4.6 / 7.6	Molecular Devices, Sunnyvale, USA	Steuerung der Mikroskope, Bildaufnahme
MS Office 2003 / 2007	Microsoft, Redmond, USA	Text- / Datenverarbeitung
Photoshop 7.0 / CS 3	Adobe, San Jose, USA	2D Erosionsanalyse, Bildbearbeitung
QuantityOne 4.6.7	BioRad, Hercules, USA	Steuerung der Geldokumentationsanlage, Quantifizierung
Vektor NTI Advance 9	Invitrogen, Carlsbad, USA	Primergenerierung

**2.1.21 Freie Software**

<b>Software</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Verwendung</b>
eARRAY	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	DNA Chip Design
ChIPOTle	Buck, <i>et al.</i> , 2005	ChIP-chip Datenanalyse
USCS Genome Bioinformatics	Center for Biomolecular Science & Engineering, Santa Cruz, USA	Darstellung genomischer Daten (Genome Browser), Vergleich mit Datenbank (Encode), Primer Lokalisation (BLAT)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Auftauen

Kryobehälter mit eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad erwärmt und so schnell wie möglich aseptisch in Zellkulturbehälter mit vorgewärmtem Medium überführt.

#### 2.2.1.2 Kultivierung

Zellen wurden in DME (4,5 g/l Glucose, pH 6,8) mit 10% -15% FBS kultiviert (Zelltypabhängig, siehe 2.1.17).

#### 2.2.1.3 Trypsinisierung

Zum Ablösen der Zellen wurde das Zellkulturmedium durch Trypsin-EDTA Lösung ersetzt (etwa 1 ml Trypsin Lösung pro 75 cm<sup>2</sup> kultivierte Fläche). Die benötigte Inkubationszeit bis zur Ablösung der Zellen ist zelltypabhängig. HEK 293 Zellen lösen sich instantan und wurden direkt überführt. Für Calu-3, HeLa S3 und SH-EP N14 Zellen ist eine weitere Inkubation im Brutschrank erforderlich, die minütlich unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde in diesem Falle mechanisch durch Klopfen an den Behälter herbeigeführt und die Zellen anschliessend in gewünschten Proportionen überführt. Die Zellsuspension in Trypsin Lösung wurde dabei im Minimum 1 / 10 in Zellkulturmedium verdünnt, um das Trypsin zu deaktivieren. Experimente wurden im Falle von schnell wachsenden HeLa S3, HEK 293 und SH-EP N14 Zellen jeweils einen Tag nach der Überführung in einen neuen Zellkulturbehälter durchgeführt.

#### 2.2.1.4 Aussähen

Deckgläschen wurden durch Immersion in Ethanollösung sterilisiert und in Quadri-/ Oktaperms luftgetrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurden Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und entsprechend der gewünschten Zelldichte (mindestens auf 1:20) in Zellkulturmedium verdünnt. Die die Deckgläschen enthaltenden Sektoren der Quadri- / Oktaperms wurden mit Zellsuspension mit eingestellter Zellzahl befüllt. Experimente wurden jeweils am folgenden Tag durchgeführt.

### **2.2.1.5 Einfrieren**

Trypsinierte Zellen wurden 1:10 in Zellkulturmedium verdünnt und bei 800 g eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in Gefriermedium (Zellkulturmedium mit 7% DMSO) auf eine Dichte von etwa 20 Millionen Zellen pro Milliliter resuspendiert und so schnell wie möglich bei -80°C in Kryobehältern gelagert. Zellen für die Langzeitaufbewahrung wurden am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

### **2.2.1.6 Mycoplasmentest**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen reagieren sehr empfindlich auf Mycoplasmainfektionen. Vor jedem experimentellen Set wurden auf Deckgläschen ausgesähte Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit DAPI gefärbt (siehe 2.2.2.1 - Formaldehydfixierung und 2.2.2.3 - DAPI) und auf die Anwesenheit von sichtbarer DNA außerhalb der Zellkerne untersucht.

## **2.2.2 Methoden für die Erstellung von Präparaten für die Fluoreszenz-Mikroskopie**

### **2.2.2.1 Formaldehydfixierung**

Formaldehydlösung wurde dem Zellkulturmedium zu einer finalen Konzentration von 3,7 % zugegeben. Nach Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Formaldehydlösung entfernt und die Zellen 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen.

### **2.2.2.2 Immunfärbung**

Fixierte Zellen wurden mit dem primärem Antikörper in 5 % BSA in RIPA Puffer (ohne SDS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in RIPA Puffer für jeweils 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper in 5 % BSA in RIPA bei 4°C über Nacht. Nach abermals dreimaligem Waschen in RIPA für jeweils 5 Minuten erfolgte die DNA-Gegenfärbung (siehe DAPI-Färbung).

### **2.2.2.3 DAPI-Färbung**

Zur Gegenfärbung der DNA wurden mit Formaldehyd fixierte Zellen durch 5-minütige Behandlung mit RIPA Puffer permeabilisiert (bei zuvoriger Immunfärbung entfiel dieser Schritt). Die Zellen wurden 5 Minuten mit DAPI-Lösung gefärbt und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden luftgetrocknet und auf einen Objektträger

mit 5 µl Vectashield aufgelegt. Vectashield füllt dabei den Spalt zwischen Deckgläschen und Objektträger. Die Ränder der Deckgläschen wurden mit Nagellack versiegelt und die Deckgläschen damit auf den Objektträgern fixiert.

## 2.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

### 2.2.3.1 Herstellung von Sonden für die FISH

Für diese Arbeit wurden FISH-Sonden innerhalb der Gene *CFTR*, *ASZ1* und *CTTNB2* generiert. Für *CFTR* wurde dafür der genomische Klon CF1 verwendet. Die Sonden für *ASZ1* und *CTTNBP2* stammten dagegen von PCR-Produkten.

#### 2.2.3.1.1 Gewinnung von "P1-derived Artificial Chromosome" (PAC)-DNA (CFTR-Sonde)

Die Gewinnung von PAC-DNA erfolgte mit dem QIAfilter MAXI-Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit den folgenden Modifikationen: Für jede Präparation wurden 500 ml Kulturmedium verwendet (entsprechend einem "Low Copy" Plasmid). Die Zellen wurden mit 70 µg/ml Kanamycin kultiviert. Der Elutionsschritt erfolgte mit auf 65°C vorgewärmtem Elutionspuffer QF.

Die gewonnene DNA wurde über Nacht mit den Enzymen Alu I und Pdm I verdaut, und anschließend mit Kieselgelsäulen (PCR Cleanup-Kit) nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt.

#### 2.2.3.1.2 Gewinnung von *ASZ1*- und *CTTNBP2*-spezifischer DNA

PCR-Produkte, generiert von Dr. Andreas Englmann (Englmann, 2005a) wurden mit dem "Whole Genome Amplifikation Kit (WGA2)" nach Angaben des Herstellers amplifiziert und mit dem PCR Cleanup-Kit gereinigt.

### 2.2.3.2 Fluoreszenzmarkierung und Präparation der FISH-Sonden

Die Sonden-DNA wurde mit dem *LabelIT* Cy3 Kit nach Angaben des Herstellers (Mirus, Madison, USA) markiert, mit der folgenden Modifikation. Für 3 µg der jeweiligen DNA wurde 1 µl *LabelIT* Cy3-Färbelösung verwendet. Die Markierung erfolgte über Nacht bei 37°C. Nach Deaktivierung von reaktivem Farbstoff durch Behandlung mit Puffer D (Natronlauge) und Neutralisierung mit Puffer N wurden 20 µg COT-1 und 100 µg Lachssperma-DNA sowie insgesamt 2,5 Volumina Ethanol zugegeben und die Sonde

durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 17.000g und 4°C gefällt. Nach Waschung mit 70% Ethanol wurde die DNA kurz luftgetrocknet und in Hybridisierungspuffer (10% Dextransulfat, 2x SSC, 70% Formamid) gelöst.

### 2.2.3.3 Fluoreszenzmarkierung des Chromosom 7 Paints

Als Kontrolle, ob die generierte CFTR Sonde in der Tat auf Chromosom 7 bindet, wurde Chromosom 7 für eine Testhybridisierung fluoreszenzmarkiert. Der Chromosom 7 Paint wurde mittels "degenerative oligonucleotide primer PCR" (DOP-PCR) mit dem degenerierten Primer 6MW unter Verwendung von fluoresceinmarkiertem Deoxyuridin amplifiziert und markiert.

PCR Pipettierschema und Programm:

Komponente	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	31,2
10x PCR Mix	5
Primer (50 µM)	4
dATP/dGTP/dCTP (5 mM)	2
dTTP (5 mM)	1,3
FITC-dUTP (1 mM)	3,5
Chr. 7 Paint DNA	2
Taq DNA Polymerase	1
Total	50

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min	1
2	95°C	1 min	5
	32°C	1 min	
	72°C	3 min	
3	95°C	1 min	35
	62°C	1 min	
	72°C	3 min	
4	72°C	5 min	1

Nach der Markierungsreaktion erfolgte die Ethanol-fällung und Resuspension in Hybridisierungspuffer analog zu den anderen FISH-Sonden (mit Zugabe von COT-1 und Lachssperma-DNA, vergl 2.2.2.6).

### 2.2.3.4 Methanoleisessigfixierung

Zellen wurden direkt mit Methanol/Essigsäure fixiert (Hepperger, *et al.*, 2007). Dazu wurden Deckgläschen mit darauf kultivierten Zellen in auf -30°C vorgekühlte Fixierlösung (Methanol/Essigsäure im Verhältnis 3:1) überführt und bei -30°C mindestens 2 Stunden gelagert. Eine Lagerung über mehrere Tage hinweg ist möglich.

### 2.2.3.5 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurden die Zellpräparate der Fixierlösung entnommen und vollständig luftgetrocknet. Die Sondenlösung wurde 7 Minuten bei 75°C denaturiert und anschliessend für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Parallel mit etwas Verzögerung - abhängig von der Anzahl der Zellpräparate - wurden die Zellpräparate in auf 75 °C erhitzte Denaturierungslösung versenkt und nach exakt 3 Minuten Denaturierung sofort in -30 °C kalten 70%igen Ethanol überführt. Nach einer Ethanolserie (70%, 90% 100% Ethanol für jeweils 3 Minuten bei -30°C) wurden die Präparate luftgetrocknet.

5 µl der Sonde wurden auf einen Objektträger (pro Präparat) aufgetropft und die getrockneten Zellpräparate auf die Tropfen aufgelegt, so dass die Sondenlösung den Spalt zwischen Deckgläschen und Objektträger füllt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 2.2.3.6 Waschung und DNA-Gegenfärbung

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Zellpräparate vorsichtig von den Objektträgern abgestreift und dreimal mit auf 60°C vorgewärmter 0,1x SSC Lösung gewaschen. Anschliessend erfolgte die DNA-Gegenfärbung mit 5 µg/ml DAPI in 4x SSC über 30 Minuten (Methanol:Essigsäure-precipitierte DNA färbt sich langsamer als Formaldehyd-fixierte DNA). Nach einmaligem Waschen mit 4x SSC wurden die Präparate vollständig luftgetrocknet und anschliessend wie unter 2.2.2.3 beschrieben auf Objektträgern fixiert.

## 2.2.4 Zweidimensionale (2D) Erosionsanalyse

In der 2D-Erosionsanalyse werden die radialen Positionen der FISH-Signale im Zellkern bestimmt. Die 2D-Erosionsanalyse betrachtet die Projektion der FISH-Signale in der äquatorialen Ebene des Zellkerns. Sie erfordert daher nur eine Aufnahme der zu untersuchenden Zellkerne, im Gegensatz zur 3D-Erosionsanalyse, die einen ganzen Stapel von Aufnahmen benötigt, um den Zellkern dreidimensional rekonstruieren zu können.

2D-Erosionsanalyse bietet den Vorteil, dass im selben Zeitraum deutlich mehr Signale ausgewertet werden können. Desweiterem lässt sich die Methanoleisessigfixierung unkomplizierter durchführen als Fixierung unter Erhalt der dreidimensionalen Struktur (Formaldehydfixierung) und es ist kein konfokales Laserscanningmikroskop für die Fluoreszenzaufnahmen erforderlich.

Vergleiche von 2D- und 3D-Erosionsanalysen zeigten eine klare qualitative Übereinstimmung der beiden Methoden (Englmann, 2005a, Englmann, *et al.*, 2005b, Sadoni, *et al.*, 2008, Zink, *et al.*, 2004).

Für die hier durchgeführten Erosionsanalysen wurden jeweils pro FISH-Präparat rund 30-50 Aufnahmen der DAPI- und Cy3-Fluoreszenz aus verschiedenen Regionen mit Epifluoreszenzmikroskopen aufgenommen und mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop ausgewertet (siehe Abb. 10).

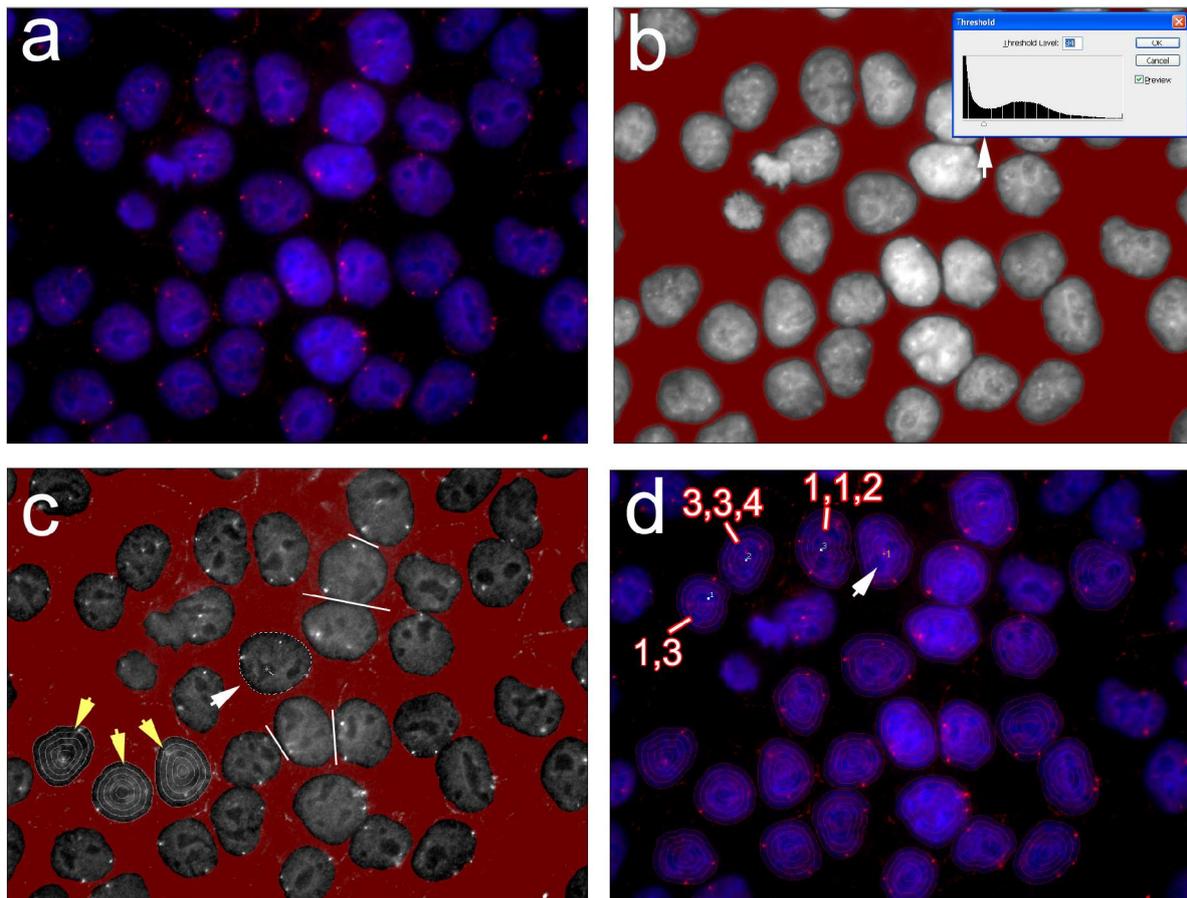


Abbildung 10: **Illustration des hier angewendeten Verfahrens zur 2D-Erosionsanalyse.** a) Rohdaten: Lichtoptische Aufnahme der überlagerten DAPI- (DNA) und Cy3-Fluoreszenz (CFTR) b) Definition der Fläche des Zellkerns: Sichtbar ist die Aufnahme der DAPI-Fluoreszenz. Das Fenster oben rechts zeigt das Histogramm der Grauwerte der Aufnahme. Durch Justierung des Reglers (weißer Pfeil) wird ein Grenzwert für die Grauwerte so gewählt, dass die rote Fläche, die den Bereich der Pixel unter dem Grenzwert anzeigt, den gesamten Bereich ausserhalb der Zellkerne überdeckt. c) Zu sehen ist die Aufnahme der Cy3-Fluoreszenz (CFTR-Sonde) sowie die Fläche außerhalb der Zellkerne (rot, wie b). Einzelne Zellkerne werden mit dem "Zauberstab" markiert (der weiße Pfeil zeigt einen markierten Zellkern) und durch Auslösen des Skriptes (siehe

Text) mittels "Hotkey" in fünf konzentrische Schalen unterteilt (gelbe Pfeile zeigen Zellkerne mit bereits erfolgter Unterteilung). Zellkerne, deren Flächen sich berühren, können ggf. durch manuelles Einzeichnen einer Trennlinie (entlang der weißen Linien) voneinander getrennt werden. d) Überlagerte DAPI- und Cy3-Fluoreszenz (a) sowie die Schalen aus Schritt c. Nach erfolgter Unterteilung werden die Signale den Schalen zugeordnet. Zur Übersicht werden bereits gezählte Zellkerne mit dem "Zähltool" markiert (weißer Pfeil). Rot eingerahmte Zahlen zeigen exemplarisch das Ergebnis für drei Zellkerne mit 1: äußerste Schale bis 5: innerste Schale.

Das hier angewendete Verfahren wurde von Dr. Nicolas Sadoni (Zink, *et al.*, 2004) eingeführt und in dieser Arbeit geringfügig modifiziert. Das Verfahren arbeitet halbautomatisch. Für jeden Zellkern (bzw. einmalig für die gesamte Aufnahme) wird ein Grenzwert für die Intensität eingestellt, um DAPI-Fluoreszenz von Hintergrund zu trennen. Auf diese Weise erhält man die Fläche des Zellkerns. Das Skript macht infolge nur die Umrandung dieser Fläche sichtbar und kopiert sie 5-mal übereinander. Über Skalieren der Kopien auf 80%, 60%, 40% und 20% ihrer Originalgröße erzeugt es 5 konzentrische Schalen. Durch Vergleich mit dem Cy3-Kanal ordnet man die FISH- Signale den sie beinhaltenden Schalen zu. Bei den Aufnahmen betrug der Durchmesser eines Kerns etwa 140 Pixel (1 Pixel entspricht etwa 100 nm), und der Abstand zwischen den Schalengrenzen damit etwa 14 Pixel.

Für das ursprüngliche Verfahren wurden die Zellkerne aus den jeweiligen Aufnahmen zuerst vereinzelt, um den Grenzwert für jeden Zellkern individuell einstellen zu können. Bei starken und relativ gleichmässigen DAPI-Signalen mit hohem Signal zu Rauschen Verhältnis lässt sich jedoch ein Grenzwert für die gesamte Aufnahme mit mehreren Zellkernen definieren. Ein Hinweis auf die Gültigkeit dieser Annahme gibt das in Abb. 10b eingeblendete Histogramm. Zeigt dieses einen glatten Verlauf mit zwei klaren Maxima (mit Grauwert 0 als das erste Maximum), so lässt sich die Zellkernfläche für die gesamte Aufnahme durch Einstellen des Grenzwertes auf das lokale Minimum (zwischen den beiden Maxima) definieren.

### **2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) / Western Blot**

Für jede zu untersuchende Bedingung wurden etwa eine Million Zellen kultiviert und dem jeweiligen Experiment entsprechend behandelt. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal kurz mit PBS-Lösung (37°C) gewaschen. Anschliessend wurde 1 ml Lysis-Puffer (1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,0), vorgewärmt auf 75°C, zugegeben. Die resultierende hochviskose Lösung wurde in 1,5 ml Mikrozentrifugenbehälter überführt und eine Minute bei 40% Leistung sonifiziert. Die Konzentrationsmessung erfolgte bei 230/260/280 nm. Dabei sollte das Verhältnis der

Absorptionen bei diesen Wellenlängen für alle Präparationen gleich sein (für denselben Zelltyp). Zu vergleichende Lysate wurden auf die gleiche optisch Dichte gebracht und mit 4x Nupage Probenpuffer gemischt. SDS-PAGE erfolgte nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, USA; 35 Minuten Laufzeit für Histone, 45 Minuten für CTCF bei 200V). Der Transfer auf PVDF Membranen erfolgte mit dem iBlot System nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Die PVDF Membranen wurden 3 Stunden mit 5% BSA in RIPA (ohne SDS) geblockt. Inkubation mit dem primärem und - nach dreimaligem Waschen mit RIPA (ohne SDS) für 5 Minuten - mit sekundärem Antikörper erfolgte jeweils über Nacht bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit RIPA (ohne SDS) für jeweils 10 Minuten und einmaligen Waschen mit RIPA (mit 0,03% SDS) für eine Minute wurde die Membran dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Detektion erfolgte in einer Geldokumentationsanlage (ChemiDoc XRS, Biorad, Hercules, USA). Die densitometrische Messung wurde mit der Software QuantityOne (Version 4.6.7) durchgeführt.

## 2.2.6 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

### 2.2.6.1 ChIP von Histonmodifikationen

Für jede zu untersuchende Bedingung wurden jeweils etwa 50 Millionen Zellen, verteilt auf drei 150 cm<sup>2</sup> Petrischalen mit je 30 ml Zellkulturmedium, eingesetzt. Nach (eventuell) erfolgter TSA-Behandlung wurden jeder Petrischale 1,2 ml 37% Formaldehyd Lösung zugegeben. Nach 6 Minuten Inkubation wurde die Formaldehydlösung durch Abgießen entfernt und durch 20 ml 125 mM Glycin-Neutralisierungslösung ersetzt. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Schalen einmalig mit PBS gewaschen (4°C). Die Zellen von drei zusammengehörenden Schalen wurden mittels Zellschaber abgelöst und in insgesamt 1,5 ml ChIP-Puffer in 2 ml Mikrozentrifugenbehälter mit konischem Boden vereinigt.

Die Zellsuspension wurde unter Kühlung im Eisbad sonifiziert. Einstellungen: Sonifizierung für jeweils 3 Sekunden mit jeweils 6 Sekunden Pause bei 80% der maximalen Amplitude. Die kumulierte Sonifikationszeit betrug 20 Minuten (das entspricht 400 Zyklen). Inklusive der Pausen dauert dieser Schritt somit 1 Stunde. Das gescherte Chromatin wurde anschliessend 10 Minuten bei 17.000g und 4 °C zentrifugiert.

Parallel wurden pro Immunpräzipitation und Bedingung (unbehandelt / TSA-behandelt) 25 µl Protein A und 25 µl Protein G Dynabeads mit ChIP-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl ChIP-Puffer mit 5 µl spezifischem Antiserum bzw. 5 µg gereinigtem Antikörper unter langsamer Rotation rund 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Dynabeads in ChIP-Puffer einmal 5 Minuten

gewaschen und in frischem ChIP-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde auf mehrere 2 ml Mikrozentrifugenbehälter verteilt (ein Behälter für jedes zu untersuchende Antigen pro Zeitpunkt).

Der Überstand des sonifizierten Chromatins wurde nun auf die Mikrozentrifugenbehälter mit den an Dynabeads gebundenen Antikörpern verteilt (der ChIP-Puffer von dem Transfer der Dynabeads wurde direkt vorher abgenommen). Da Gesamthiston H3 in deutlich höherer Konzentration vorliegt als spezifisch modifizierte Histone, wurde für die Histon H3pan-Immunpräzipitationen jeweils nur ein Fünftel der für die anderen Modifikationen verwendeten Chromatinmenge zugegeben.

Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4°C mit langsamer Rotation. Zum Waschen wurden der Chromatinüberstand entfernt und die Dynabeads wurden zweimal 2 Minuten mit jeweils 1 ml ChIP-Puffer pro Reaktionsgefäß unter Rotation gewaschen. Der finale Waschschrift erfolgte mit 1 ml ChIP-Puffer mit 0,03% SDS und 3 mM EDTA für 1 Minute. Die Dynabeads wurden anschließend in 100 µl PBS mit 10 µl 5 M NaCl-Lösung resuspendiert und 6 Stunden bei 65°C inkubiert.

Die DNA-Reinigung erfolgte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit mit folgenden Modifikationen: Dynabeads wurden magnetisch separiert und der Überstand aus den ChIP-Reaktionen (ungefähr 120 µl) mit 600 µl Puffer PB gemischt. Nach der DNA-Bindung an die Kieselgelsäulen erfolgten zwei Waschungen mit Puffer PE (bei geringen DNA Konzentrationen spielt Streulicht im Eluat eine deutliche Rolle – durch die doppelte Waschung konnte dieses jedoch reduziert werden). Die Elution erfolgte mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O nach 2 Minuten Inkubation auf der Säule.

Die Menge der gereinigten DNA wurde photometrisch durch die Absorption bei 260 nm quantifiziert.

### 2.2.6.2 Amplifikation

Pro Amplifikationsreaktion wurden 30 ng DNA aus den ChIP-Präparationen in 11 µl Volumen eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit dem "Whole Genome Amplification Kit (WGA2)" nach Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) unter Auslassung des Fragmentierungsschrittes. Sofern nur quantitative PCR (qPCR)-Reaktionen geplant waren, wurde die Amplifikationsreaktion auf die halbe Menge herunterskaliert.

Die DNA wurde nach der Reaktion mit dem Qiaquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt.

### 2.2.6.3 DNA-Markierung mit Cy3/Cy5 für die Hybridisierung

Auf DNA-Chips können zwei Präparate -markiert mit Cy3 und Cy5 - gegeneinander aufgetragen werden. Die Markierung erfolgte mit dem Mirus *LabelIT* Cy3/Cy5 Kit. Da die

Markierungsreaktionen wesentlich zu den Kosten des Experiments beitragen, wurde versucht, die zu markierende DNA-Menge so gering wie möglich zu halten. Gleichzeitig durfte die Menge auch nicht zu gering gewählt werden, da bei der Reinigung Verluste an DNA unvermeidlich sind. Für zusammenhängende Zeitserien müssen die DNA-Mengen für die Zeitpunkte balanciert sein, so dass die Präparation mit der geringsten DNA-Ausbeute begrenzend ist.

Pro Sektor und Fluoreszenzfarbstoff wurden 7 µg DNA eingesetzt und entweder 5 µl Cy3- oder 10 µl Cy5-Färbelösung zugegeben. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 120 µl in Puffer A über Nacht bei 37°C. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit jeweils 12 µl Puffer D und N für jeweils 5 Minuten.

#### 2.2.6.4 Ethanolfällung

Da eine genaue Quantifizierung der DNA-Menge und Markierungseffizienz erforderlich ist, wurde kein Kopräzipitans zugegeben. Die Ethanolpräzipitation von dicht markierter DNA erscheint jedoch schwieriger zu sein als von unmarkierter DNA. Für eine höhere Ausbeute wurde eine größere Menge Ethanol als üblich sukzessive zugegeben (sukzessive um eine zu schnelle Nukleation und damit die Bildung eines zu feinen Präzipitates zu verhindern). Zuerst wurden 450 µl Ethanol zugegeben und 10 Minuten bei 17.000g und 4°C zentrifugiert. Sukzessive wurden zweimal 200 µl Ethanol zugegeben und jeweils zentrifugiert. Anschließend wurde das Präzipitat mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschliessend wurde die markierte DNA in 20 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und ihre Menge, Reinheit und Markierungseffizienz photometrisch bestimmt.

#### 2.2.7 Design der DNA-Chips

Die hier verwendeten DNA-Chips enthalten 4 identische Sektoren mit jeweils 45.220 Sonden. Das Design der DNA-Chips erfolgte mithilfe der online Software eArray (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) des Herstellers (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Regionen können entweder nach einem bestimmten Muster mit DNA Sonden abgedeckt werden; zum Beispiel mit einem konstanten Abstand (sog. "Tilling Array"). Alternativ – und für diese Arbeit bevorzugt - bietet eArray eine Bibliothek von für Hybridisierung validierten DNA-Sequenzen an. Die resultierenden Sonden sind isothermal (haben eine relativ ähnliche Hybridisierungstemperatur). Nach Angabe der gewünschten Region werden alle validierten Proben innerhalb der gewählten Region als Datensatz zur Verfügung gestellt. Auf den hier verwendeten Mikroarrays wurden die folgenden Typen von Sonden verwendet:

### 2.2.7.1 Sonden in der CFTR-Region:

Validierte Sonden aus der Agilent Sonden Bibliothek innerhalb der Basenpaare 116.200.000-117.400.000 (Genomassemblierung hg18) auf Chromosom 7. Das hier verwendete Design enthält 9.968 individuelle Sonden aus dieser Region, die pro Sektor in vierfacher Ausführung vorliegen. Die ausgesuchten Sonden wurden zufällig auf dem DNA-Chip verteilt um die Auswirkungen von möglichen größeren Defekten, wie ungleichmäßige Hybridisierungen und Fluoreszenz von Fremdpartikeln, die mehrere Sonden im Umkreis betreffen, möglichst gering zu halten.

### 2.2.7.2 Agilent Kontrollen

Agilent bietet mehrere Typen von Kontrollen an. Die Kontrollen kommen als komplettes Set. Diese erfüllen unterschiedliche Funktionen. In dieser Arbeit wurden Sonden mit der Bezeichnung (-)3xSLv1 als Negativkontrollen zur Berechnung des Hintergrundes genutzt. Die Sequenzen dieser Sonden zeigen keine komplementäre Sequenzen im menschlichen Genom.

(-)3xSLv1 Sequenz:

```
5-GCTAGCGAAAGCTAGCTTTTCGATCGGAAACGATCGTTTTCCAGTGACGAAAGT  
CACTGG-3
```

Das Kontrollset enthält 153 Kopien dieses Sondentyps pro Sektor mit einer zufälligen Verteilung. Die übrigen Sonden auf den DNA-Chips stellen verschiedene Kontrollen, die für diese Arbeit nicht verwendet wurden.

## 2.2.8 Hybridisierung auf DNA-Chips

Die Hybridisierung auf die DNA-Chips erfolgte nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). In Kürze: Es wurden jeweils 4.2 µg fluoreszenzmarkierte DNA pro Sektor pro Farbstoff eingesetzt und mit Hybridisierungspuffer und COT-1 DNA in einem Gesamtvolumen von 110 µl gemischt. Die Präparationen wurden denaturiert und nach Blockierung von repetitive Sequenzen ("preannealing") auf die Sektoren des DNA-Chips aufgetragen. Die Sektoren wurden in Agilent Hybridisierungskammern versiegelt und die DNA-Chips 25 Stunden bei 65°C in einem Rotationsofen hybridisiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Hybridisierungskammern in CGH-Waschpuffer 1 entfernt (um Kreuzkontamination zu vermeiden) und die DNA-Chips 5 Minuten mit CGH-

Waschpuffer 1 gewaschen. Der stringente Waschschrift erfolgte in CGH Puffer 2 für 6 ½ Minuten bei 31°C.

Da eine sehr schnelle Ozondegradation des Cy5- Farbstoffes während des Scannens beobachtet wurde, wurde eine weitere Behandlung mit dem "Stabilization and Drying" Kit von Agilent durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Chips direkt von CGH Puffer 2 nach der Beendigung des stringenten Waschschriftes 10 Sekunden in Acetonitril und konsekutiv 30 Sekunden in "Stabilization and Drying" Lösung (Antioxidant in Acetonitril) getaucht. Nach kurzer Trocknung waren die DNA-Chips fertig für das Scannen.

### 2.2.9 Scannen der DNA- Chips und Generierung der Rohdaten

Kleine Regionen des DNA-Chips wurden zuerst mit einem Axon GenePix 4200 Autoloader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) mit einer Auflösung von 10 µm gescannt (Abb.11 a,b). Der elektronische Verstärkungsgrad wurde so eingestellt, dass Sonden mit starker Fluoreszenz nicht überbelichtet und Sonden mit schwacher Fluoreszenz noch erfasst wurden. Der Hintergrund der DNA-Chipfläche sollte gerade noch sichtbar sein. Die überwiegende Anzahl der Sonden weist im Vergleich zu den Sonden mit maximaler Signalintensität nur eine relativ schwache Signalintensität auf. Es war daher eine wichtige Frage, ob die DNA-Chips mit einer einzigen Einstellung gescannt werden können, oder ob ein Scan mit hoher Verstärkung für die schwachen Signale und einer mit geringer Verstärkung für die Stärkeren erforderlich sind. Vergleiche zwischen Scans, die die stärksten Signale erfassen, und solchen mit höherer Signalverstärkung, welche für die Sonden mit geringerer Intensität eingestellt waren, zeigten jedoch eine gute Übereinstimmung (siehe Abschnitt 3.3.3). Somit wurden die meisten DNA Chips mit nur einer Einstellung gescannt (modernere Scanner teilen den Strahlengang und erstellen automatisch einen Scan mit hoher und niedriger Intensität und erweitern somit den dynamischen Bereich). Der eigentliche Scan erfolgte mit einer Auflösung von 10 µm und einer Mittelung über 2 Scans (eine höhere Mittelung konnte hier wegen eines Gerätefehlers nicht durchgeführt werden).

## 2.2.10 Analyse der CHIP-chip-Daten

### 2.2.10.1 Filtern der Sonden-Signale

Das Auslesen der Signalintensitäten erfolgte mit der Software Genepix 4.0. Die zum DNA-Chip gehörige Datei mit den Positionsinformationen der Sonden (*DesignID.GAL*) wurde geladen und mit den Signalen automatisch zur Deckung gebracht (Abb. 11 c) In seltenen Fällen war eine manuelle Korrektur erforderlich.

Für jede Sonde wurden die Signalintensitäten berechnet und die gemittelten Signalintensitäten der jeweils 3 nächstgelegenen Negativkontrollen (Sonden mit der Bezeichnung (-)3xSLv1) zur Berechnung des Hintergrundes eingesetzt. Nach erfolgter Berechnung wurden nun Kriterien definiert, um unzuverlässige Sonden zu entfernen.

Die hier verwendeten Kriterien für nicht eliminierte Sonden waren:

- Signal zu Rauschen mindestens 3 in beiden Kanälen:  
Entfernt Sonden mit einem schwachem Signal verglichen zum Hintergrund.
  
- Nicht mehr als 10 Prozent Pixel im Sättigungsbereich:  
Entfernt gegebenenfalls. Sonden mit übersättigtem Signal
  
- Arithmetisches Mittel der Sondenintensität ist nicht mehr als 1,2 mal so groß wie Median:  
Bei Sonden mit sehr ungleichem Signal - verursacht z.B. durch Fremdpartikel - verzerren wenige sehr intensive Pixel deutlich das arithmetische Mittel der Signalintensität, während der Median der Signalintensität relativ unbeeinflusst bleibt. Der Faktor von 1,2 wurde hier empirisch ermittelt. Dieses Kriterium entfernte sehr effizient Sonden unter dem Einfluss von Kratzern und Partikeln.  
Sonden, die mindestens eines dieser Kriterien nicht erfüllten, erhielten eine Markierung ("Flag"). In allen Fällen wurde zusätzlich eine visuelle Inspektion der gescannten Bilder vorgenommen um nicht erfasste fehlerhafte Regionen manuell zu entfernen.  
Für die weitere Prozessierung der Daten wurde MS Excel verwendet. Das hier verwendeten DNA-Chip-Design verfügt über jeweils 4 technische Replikate. Für die weiteren Analysen wurden die Fluoreszenzintensitäten der technischen Replikate für die beiden Farbkanäle gemittelt anschliessend das Verhältnis gebildet. Technische Replikate mit einer Flag-Markierung wurden von dieser Analyse ausgeschlossen.

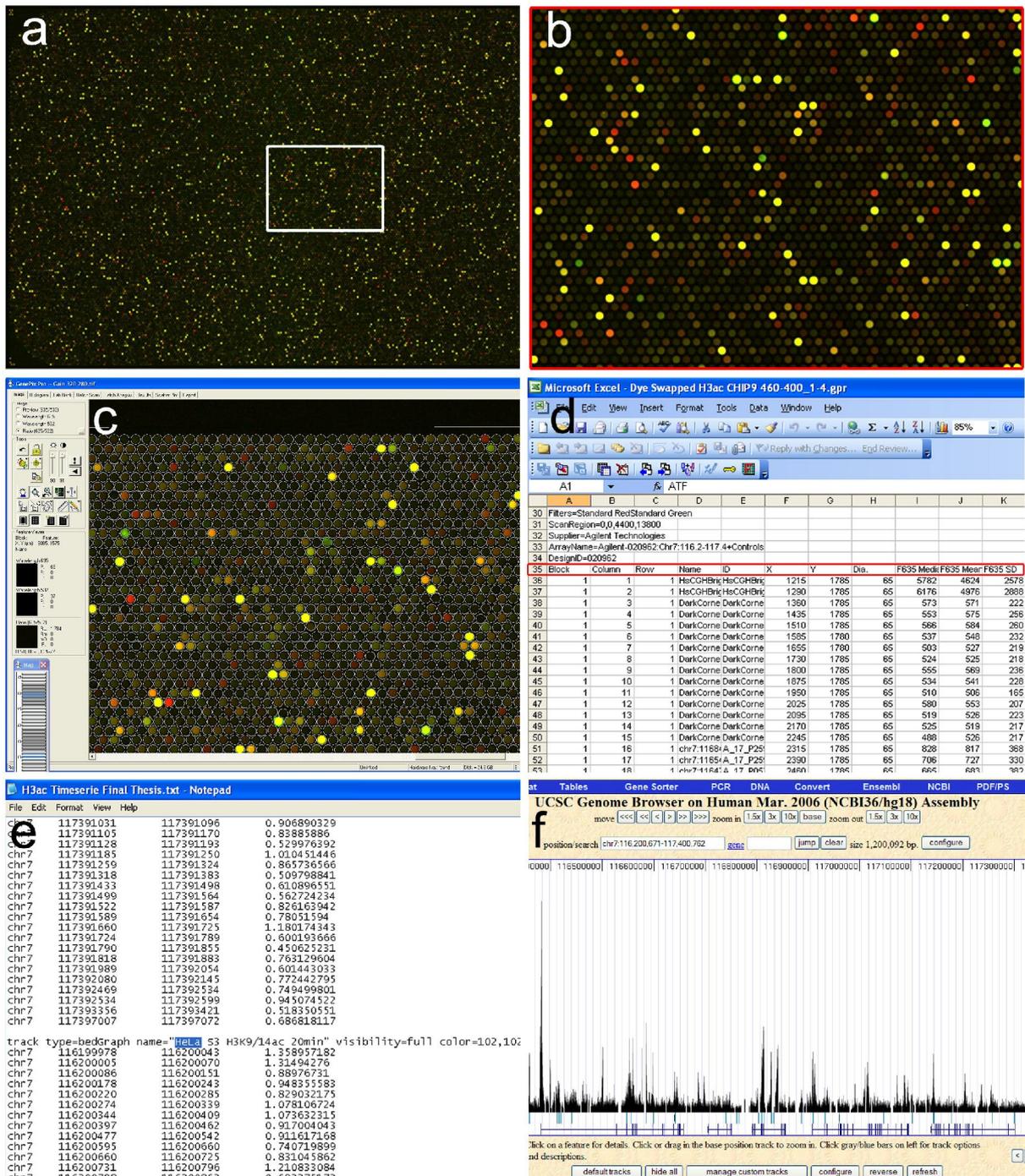


Abbildung 11: Illustration des hier angewendeten Verfahrens zur Quantifizierung und Visualisierung von DNA-Chip-Hybrisierungsexperimenten. a) Zweifarben-Scan eines DNA-Chip-Sektors (die hier verwendeten DNA-Chips besitzen jeweils 4 Sektoren). Der weiß eingerahmte Bereich ist vergrößert dargestellt in b. c) eine mithilfe der Designdatei erstellte Maske wird mit den Sondenpositionen semi-automatisch zur Deckung gebracht. Eine recht gute Übereinstimmung kann automatisch ermittelt werden, muss jedoch manuell überprüft und

gegebenenfalls korrigiert werden. d) Die aus den Intensitäten und ihren Verteilungen (Beispiele: Gleichförmigkeit, Durchmesser, Signal zu Rauschen) abgeleiteten Informationen (rot eingerahmt) werden den Sonden zugeordnet und können zum Beispiel als MS Excel-kompatible Dateien gespeichert werden. e) Nach Prozessierung der Daten in MS Excel werden die genomischen Positionen/Intensitäten als Tabulatur separierten Werte gespeichert und mit zusätzlichen Information in der Kopfzeile (zum Beispiel: Name, Spurbreite, Farbe) versehen. f) Nach dem Hochladen der Daten (aus e) in den UCSC-Genombrowser können die Datensätze visualisiert und mit publizierten Datensätzen verglichen werden.

### 2.2.10.2 Kalibrierung der Datensätze (Normalisierung)

ChIP-chip Datensätze bestehen aus Signal und überlagertem Rauschen. Für die Logarithmen der Signalverteilung erwartet man dabei ein normalverteiltes Signalrauschen. Die Rauschverteilung und Intensität können ausgenutzt werden, um verschiedene miteinander zu vergleichende Datensätze zu kalibrieren. Für direkt zu vergleichende Datensätze sollte der Schwerpunkt und die Streuung des Rauschens übereinstimmen (Buck, *et al.*, 2004, Lieb, *et al.*, 2001).

Praktisch wurde von jedem Datensatz ein Histogramm der gemessenen logarithmierten Signalintensitäten erstellt (siehe Abb. 12a). Die Kurven wurden so verschoben, dass das Maximum der Intensitätsverteilung - das heißt der Schwerpunkt des Rauschens (Abb. 12 b) – auf die Nulllinie fiel.

### 2.2.10.3 Auffinden von signifikant angereicherten Regionen mittels ChiPOTle

Zum Auffinden von statistisch signifikant angereicherten Regionen wurde das Excel Makro ChiPOTle eingesetzt (Buck, *et al.*, 2005). Das Makro läßt ein gleitendes Fenster von definierbarer Länge (hier 1000 bp) über die zu untersuchende Region in definierbaren Schrittweiten (hier 250 bp) wandern. Die logarithmierten Anreicherungen der Sonden innerhalb dieses Fensters werden gemittelt. Dieser gemittelte Wert wird mit dem Grad des Rauschens des Datensatzes verglichen. Für eine Abschätzung des Rauschens bietet das Makro ein parametrischen und einen nichtparametrischen Ansatz. Bei dem hier eingesetzten parametrischen Ansatz wird ein normalverteiltes Rauschen über den größten Teil des Datensatzes angenommen (Diese Annahme gilt umso besser, je geringer der Anteil an angereicherten Elementen ist. Als Richtwert sollten nicht mehr als 20% der Sonden angereichert sein, siehe 12 b zur Verteilung des Rauschens). Sonden mit negativer Anreicherung (Abreicherung) stellen diesem Modell zufolge Rauschen dar, während Sonden mit positiver Anreicherung Signal und überlagertes Rauschen darstellen. Das Makro verwendet nur die negativen Anreicherungen des Datensatzes, um die Standardabweichung des Datensatzes zu errechnen (Grad des Rauschens). Die gemittelten Anreicherungen innerhalb des gleitenden Fensters werden mit dieser

Standardabweichung verglichen, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieser gemittelten Wahrscheinlichkeit zu berechnen. Für die multiplen Vergleiche (Fenster) verwendet das Makro die Bonferroni-Korrektur um den p-Wert zu anzupassen.

Für den Einsatz des Makros werden die Sondenbezeichnungen, die normalisierten und logarithmierten Anreicherungen, sowie die Positionen (Chromosom, Start- und Stoppositionen) in fünf Spalten angeordnet. Die hier verwendeten Parameter für das Makro sind eine Fensterlänge von 1000 bp, eine Schrittweite von 250 bp, ein parametrischer Test und ein p-Wert von 0.001 (vor der Bonferroni-Korrektur).

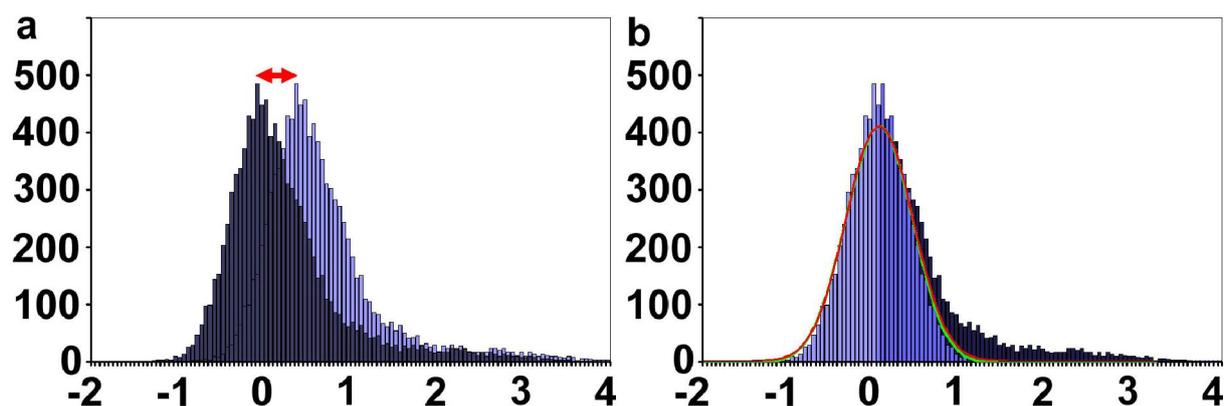


Abbildung 12: **Illustration der Normalisierung und der statistischen Auswertung mittels ChIPOTle:** a) Histogramme der logarithmierten Verhältnisse von Histon H3ac gegenüber Histon H3pan in HeLa Zellen nach 20 Minuten TSA-Behandlung. Aufgetragen ist Anzahl der Sonden, die die auf der x-Achse spezifizierten (logarithmierten) Anreicherungen zeigen. Das Histogramm in Hellblau zeigt die unmittelbar gemessenen Verhältnisse. Für die Normalisierung wird ein fester Wert zu den logarithmierten Verhältnissen addiert. Dieser Wert wird so gewählt, dass das Maximum der Verteilung auf den Wert 0 fällt. Das Verteilung in Dunkelblau zeigt den normalisierten Datensatz. b) Illustration für die Annahme von angereicherten Regionen und überlagertem, normalverteiltem Rauschen. Der hellblau markierte Teil des Histogramms (aus a) zeigt die negativen, logarithmierten Verhältnisse. Der mittelblau markierte Teil zeigt die gespiegelten negativen logarithmierten Verhältnisse. Diese beiden Teile des Histogramms stellen dem Modell Buck, *et al.*, 2005 zufolge das "Rauschen" der Messung dar. Die Kurve in Rot zeigt die über 10 Datenpunkte gemittelte Verteilung des Rauschens. Zum Vergleich ist eine simulierte Normalverteilung in Grün angezeigt (mit einer Streuung von 0,4). Der dunkelblau markierte Teil des Histogramms zeigt die Verhältnisse, die das Rauschen übertreffen. Dieser Anteil stellt dem Modell zufolge das echte "Signal".

#### 2.2.10.4 Darstellung der Daten im University of California Santa Cruz (UCSC) Genombrowser

Für eine Darstellung der Datenpunkte und der angereicherten Regionen wurde der UCSC-Genombrowser verwendet. Datensätze wurden dazu als Tabulatur separierte Textdateien gespeichert (Abb. 11 e) und in den USCS-Genombrowser hochgeladen. Die Benutzung des Genombrowsers erlaubt es, die Daten synchron mit publizierten Datensätzen anzuzeigen (Abb. 11 f).

#### 2.2.11 Regenerieren der DNA-Chips

Die folgende Methode erlaubt es, die gebundene markierte DNA zu entfernen und den DNA-Chip wiederzuverwenden (Abb. 13). Allerdings ist die Datenqualität potentiell schlechter, weshalb sich regenerierte Mikroarrays vorzugsweise für ChIP-chip Pilotexperimente mit nicht zuvor für diese Applikation getesteten Antikörpern anbieten.

Hierzu wurden die DNA Chips 2 Stunden bei 65°C in etwa 300 ml einer Mischung aus 70% Formamid und 30% 6 M Harnstoff in 1mM NaOH unter Rühren inkubiert und anschliessend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

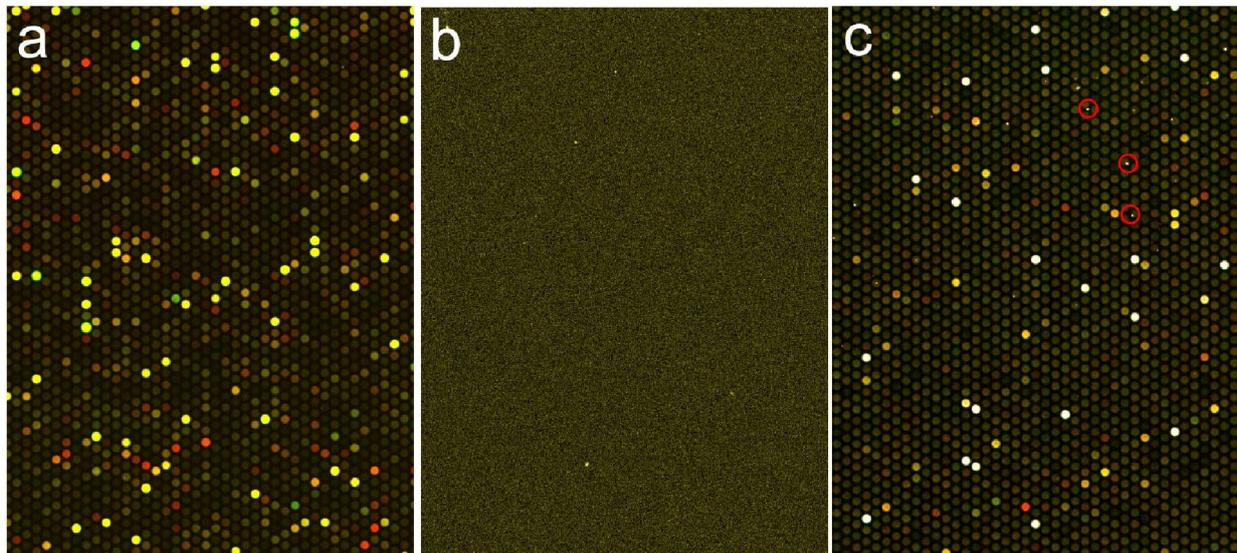


Abbildung 13: **Regeneration und Wiederverwendung eines DNA-Chips.** a) Zweifarbenscan eines hybridisierten DNA-Chips (vergl. Abb 11 b) b) Zweifarbenscan des gleichen Bereichs nach Anwendung der beschriebenen Regenerierungsprozedur. Die elektronische Verstärkung wurde höher eingestellt um Spuren von verbliebenem Signal zu ermitteln. c) Zweifarbenscan nach erneuter Hybridisierung gegen eine unterschiedliche ChIP-Präparation. Bei der hier gezeigten Rehybridisierung traten vereinzelte Defekte auf (Beispiele sind rot eingerahmt).

## 2.2.12 Quantitative PCR (qPCR)

### 2.2.12.1 Primerdesign

Die qPCR Reaktionen dienen im Wesentlichen der Validierung der DNA-Chip Daten. Um die Daten so vergleichbar wie möglich zu halten, sollten die Positionen der Amplikons der qPCR so gut mit den Sonden der DNA-Chips übereinstimmen wie möglich. Dazu wurden die Sequenzen der zu validierenden Sonde auf dem DNA-Chip (kürzer als 60 bp) sowie die jeweils flankierenden genomischen 70 bp (zusammen 200 bp) in das frei verfügbare Online Hilfsmittel Primerblast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) eingefügt. Primerblast führt zusätzlich zu den Standardregeln der Primererstellung einen Spezifitätstest für das menschliche Genom durch. Von den vorgeschlagenen Primerpaaren wurde diejenigen, welche den Positionen der Sonden am nächsten kamen, ausgewählt. Die Amplikongröße betrug dabei zwischen 60-100 bp.

### 2.2.12.2 Durchführung der qPCR

Für qPCR Reaktionen wurden sowohl der KAPA SybrGreen Universal Kit als auch später der KAPA SybrFast Kit verwendet. Die Reaktionen erfolgten auf qPCR Platten mit 96 Vertiefungen. Von jedem unabhängigen Experiment (ChIP) wurden pro Modifikation, Behandlung und Position 3 technische Replikate erstellt. Die Reaktionen erfolgten dabei im 20 µl Format mit jeweils 10 ng ChIP-DNA und einer Primerkonzentration von 250 µM. Für jede ChIP wurde eine Stammlösung mit dem Farbstoff ROX als passive Referenz erstellt. Diese Stammlösungen wurden dann auf den qPCR Platten vorgelegt und die entsprechenden Primer hinzu pipettiert. Alle Experimente zu demselben Primerpaar wurden dabei auf derselben qPCR Platte durchgeführt (im Gegensatz zu alle Primerpaare zu demselben Experiment). Dieses Verfahren erlaubt den direkten Vergleich zwischen den Amplifikationskurven der einzelnen Experimente, so dass bei einer sehr guten Übereinstimmung der Experimente effektiv mehr Replikate zur Verfügung stehen. Dieses erleichtert damit die Bestimmung von etwaigen Ausreißern.

Die qPCR Reaktionen wurden in einem Applied Biosystems 7500 Fast qPCR Gerät nach den folgenden Protokollen durchgeführt.

PCR Programm: KAPA SybrGreen Universal Mix:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Min:Sek)
Hitze-Aktivierung	95	10:00
Temperaturprogramm (40x)	95	0:03
	55	0:20
	60	0:40

PCR Programm: KAPA SybrGreen FAST

Schritt	Temperatur	Dauer [Min:Sek]
Hitze-Aktivierung	95	3:00
Temperaturprogramm (40x)	95	0:03
	58	0:30

Um die Spezifität der Primer zu ermitteln, wurde für jedes Primerpaar einmalig eine Schmelzkurve nach Standardeinstellungen erstellt. Desweiteren mussten alle Amplifikationskurven die gleiche Steigung (Effizienz der Amplifikation) aufweisen. Nur Primerpaare, die ein einziges Produkt und die gleiche Steigung der Amplifikationskurve lieferten wurden für weitere Analysen verwendet.

Die Bestimmung der  $C_T$ -Werte erfolgte mit der ABI 7500 Software. Dabei wurde derselbe Schwellenwert (siehe Abb. 14) der Fluoreszenzintensität für alle Primer verwendet.

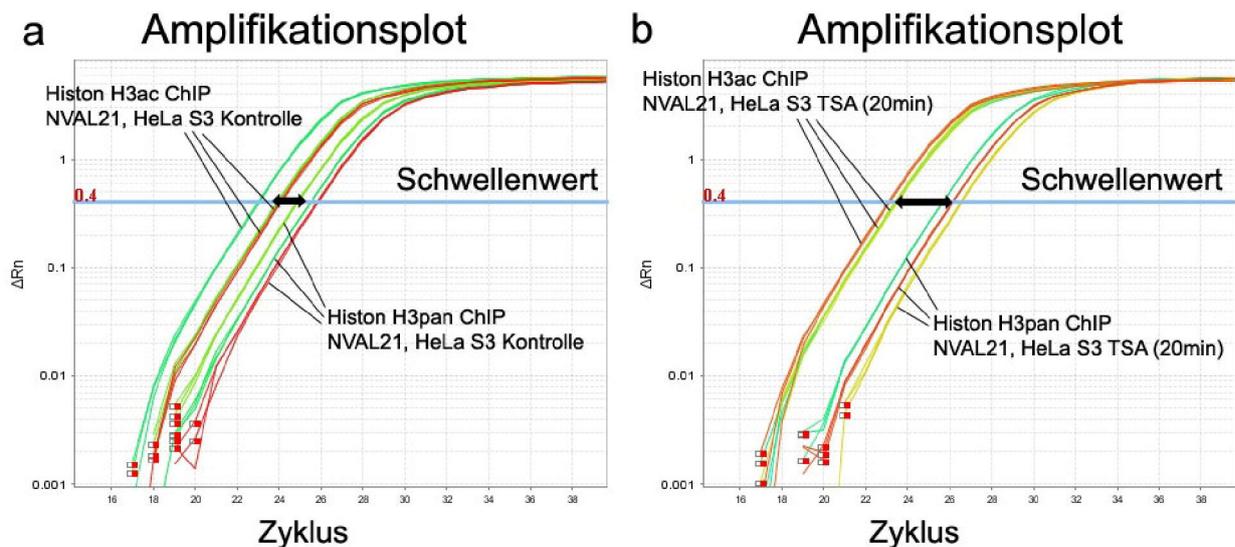


Abbildung 14: **Relative Quantifizierung von DNA Sequenzen mittels qPCR.** Die gemessene Intensität der SybrGreen I Fluoreszenz ( $\log_{10}$ , y-Achse) ist in diesen Amplifikationsplots gegen die

PCR-Zykluszahl aufgetragen. Exemplarisch gezeigt sind Amplifikationskurven für das Primerpaar NVAL21 für ChIP-WGA, gewonnen mit Antikörpern gegen Histon H3ac und Histon H3pan in HeLa S3 Zellen vor (a) und nach (b) 20 min TSA-Behandlung. Aufgetragen sind dabei 3 unabhängige Experimente mit jeweils 3 technischen Replikaten (die technischen Replikate sind in der selben Farbe dargestellt). Wie hier illustriert sind die Abweichung zwischen den technischen Replikaten gegenüber den Abweichungen zwischen den unabhängigen Experimenten vernachlässigbar. Zur Quantifizierung werden die Zykluszahlen ( $C_t$ ) bestimmt, bei denen die Amplifikationskurven den Schwellenwert (blaue Linie) erreichen. Die relative Anreicherung ( $\Delta C_t$ ) der H3 Acetylierung entspricht der Differenz der mittleren  $C_t$ -Werte für H3ac und H3pan (visualisiert durch die schwarzen Doppelpfeile).

Die Anreicherungen einer ChIP gegenüber der Referenz-ChIP wurden als relative Quantitäten (RQ) angegeben. Für die Amplifikation wurde eine Effizienz von 100% angenommen. Ein PCR- Zyklus entspricht somit einer Verdoppelung der PCR Produktmenge und die Umrechnung ergibt sich folglich zu

$$RQ = 2^{(C_t(\text{Referenz}) - C_t(\text{Modifikation}))}$$

### 2.2.13 RNA-Interferenz

Für die RNA-Interferenz-Experimente wurden Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von etwa 60% herangezogen. Das Kulturmedium wurde mit 15 ml Opti-MEM ohne FBS ersetzt. Parallel wurden 900 pmol spezifische oder Kontroll siRNA mit 1,5 ml Opti-MEM und 120 µl RNAiMAX ebenfalls mit 1,5 ml OptiMEM gemischt und beiden Lösungen vereinigt. Nach 10 Minuten Inkubation wurde die komplexierte RNAi dem Kulturmedium zugegeben. Nach 6 Stunden wurde das Kulturmedium durch DME mit 10% FBS ersetzt. Nach 3 Tagen Inkubation wurden Zellen für Western Blot, Immunfärbung und FISH ausplattiert. Am folgenden Tag wurden Immunfärbung und Western Blot parallel durchgeführt und Zellen für die FISH fixiert.

### 2.2.14 Ermittlung der Stichprobenverteilungen und Q-Q Plots

Für die Ermittlung der Stichprobenverteilung wurden zuerst die Messwerte der Einzelreplikate durch den Mittelwert aller Replikate geteilt. Für Lognormal verteilte Messwerte (Western-Blot, ChIP) wurden für diesen Schritt die logarithmierten Messwerte verwendet. Die Bildung dieser relativen Messwerte (bezogen auf den ihren jeweiligen Mittelwert) soll es ermöglichen, die Stichprobenverteilungen von Experimenten mit

unterschiedlichen Mittelwerten zusammenzufassen. Alle relativen Messwerte zu der jeweiligen Messmethode (FISH, Western-Blot, CHIP) wurden zusammengefasst, und entsprechend ihrer Größe sortiert. Mit MS Excel wurde eine gleiche Anzahl an normalverteilten Zufallszahlen generiert. Diese wurden ebenfalls nach ihrer Größe sortiert. Die relativen Messwerte und die Zufallszahlen wurden zur Erstellung der Q-Q-Plots gegeneinander geplottet. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in der Gebrauchsanleitung des ChIPOTle Excel-Makros (<http://chipotle-perl.sourceforge.net/> Datei: ChIPOTle\_Readme\_v1.0).

### 3 Ergebnisse

Zuerst sollte getestet werden, ob die Histonacetylierung grundsätzlich an der Repositionierung des *CFTR*-Lokus beteiligt sein könnte. Sollte die Hyperacetylierung von Histonen die Repositionierung des *CFTR*-Lokus auslösen, dann sollte sie im selben Zeitrahmen wie die Repositionierung auftreten. Daher wurde zuerst der zeitliche Verlauf der globalen Histonhyperacetylierung mittels Western-Blot, und der zeitliche Verlauf der *CFTR*-Repositionierung mittels 2D-FISH-Zeitserien bestimmt.

#### 3.1 Kinetik der TSA-induzierten globalen Histonhyperacetylierung

Um erste aussagekräftige Ergebnisse zu dem zeitlichen Verlauf der TSA-induzierten Histonhyperacetylierung zu erhalten, wurden Antikörper verwendet, die acetylierte Isoformen von Histon H3ac und H4ac erkennen.

Der Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 wurde mit Histon-H3-Peptiden, acetyliert an Position K9 und K14, erzeugt (<http://www.millipore.com/catalogue/item/06-599#>). Tests des Herstellers (Millipore, Billerica, USA) zeigen, dass dieser Antikörper keine unacetylierten Histone erkennt. Peptidkompetitionstests (Koch, *et al.*, 2007) bestätigen die Bindung an diacetyliertes Histon H3K9/14ac. Monoacetyliertes Histon H3K9ac lässt sich in Zelllysaten nachweisen, monoacetyliertes Histon H3K14ac dagegen kaum (Zhang, *et al.*, 1998). Monoacetyliertes Histon H3K14ac scheint auch *in vivo* in geringeren Mengen vorzuliegen als monoacetyliertes Histon H3K9ac (Taverna, *et al.*, 2007). Die in Zelllysaten mit dem Histon H3ac Antikörper detektierten Mengen an acetyliertem Histon H3 stellen daher vermutlich hauptsächlich ein Gemisch aus monoacetyliertem Histon H3K9ac und diacetyliertem Histon H3K9/14ac dar.

Der Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 wurde anhand von Histon-H4-Peptiden, acetyliert an den Positionen K5, K8, K12 und K16, erstellt (<http://www.millipore.com/catalogue/item/06-866#>). Untersuchungen mit Triton-Essigsäure-Harnstoff-Gelen haben gezeigt, dass dieser Antikörper sowohl mono-, di-, tri- als auch tetraacetyliertes Histon H4, jedoch nicht die unacetylierte Form, erkennt (Lin, *et al.*, 1989).

Es war bereits gezeigt worden, dass der *CFTR*-Lokus nach TSA-Behandlung von einer Kernregion mit geringer in eine Region mit hoher Konzentration an Histon H4K8ac repositioniert (Englmann, 2005, Zink, *et al.*, 2004). Der in jener Arbeit eingesetzte Antikörper (Turner, *et al.*, 1989) war nicht mehr verfügbar. Als Ersatz wurde ein Antikörper von Millipore (Billerica, USA) eingesetzt, dessen Spezifität von dem Hersteller über Peptidkompetitionstests gezeigt worden war (<http://www.millipore.com/catalogue/item/07-328#>). Der Antikörper bindet an Histon H4 Peptide, acetyliert an K8, jedoch nicht an solche ohne Acetylierung, beziehungsweise mit Acetylierung an den Positionen K5, K12 oder

K16. Auch tetraacetylierte Histon H4 Peptide (K5, K8, K12, K16) erkennt er nicht. Dieser Antikörper erwies sich bei CHIP-chip Experimenten als problematisch und wurde daher nur für Western-Blots verwendet.

Um den zeitlichen Verlauf der globalen Histonacetylierung nach TSA-Behandlung zu untersuchen, wurden HeLa S3 (im Folgenden mit HeLa bezeichnet) Zellen mit TSA behandelt, und die globalen Mengen an acetylierten Histonisoformen zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Western-Blot (siehe 2.2.4) ermittelt. Visuelle Inspektion zeigt eine deutliche Zunahme der Acetylierung von Histon H4K8 während der ersten 60 Minuten der TSA-Behandlung (Abb.15 a). Für Histon H3ac und H4ac ist ein starker Anstieg nach 20 Minuten TSA-Behandlung deutlich (Abb. 15 b). Änderungen nach diesem Zeitpunkt sind dagegen weniger offensichtlich.

Für eine quantitative Auswertung wurden die Western-Blots densitometrisch ausgewertet. Der densitometrischen Messung (Abb.16) zufolge zeigen Histon H3 und Histon H4 einen schnellen Anstieg der Acetylierung innerhalb von 20 Minuten TSA-Behandlung (in beiden Fällen auf das etwa 2,5-3-fache der Ausgangsmenge). Während die Histon-H3-Acetylierung danach etwa auf demselben Niveau bleibt, zeigt die Histon-H4-Acetylierung einen weiteren Anstieg auf das etwa 4-fache der Ausgangsmenge innerhalb von 100 Minuten.

Im Gegensatz dazu zeigt Histon H4K8ac einen etwa linearen Anstieg über 60 Minuten TSA-Behandlung. Der Anstieg fällt dabei deutlich geringer aus als für Histon H4ac. So wird im Falle von Histon H4K8ac etwa das 2-fache der Ausgangsmenge nach 60 Minuten erreicht. Spätere Zeitpunkte wurden in diesem Fall nicht mehr gemessen.

Um die Signifikanz der Änderungen zu ermitteln, wurden abschließend statistische Tests durchgeführt. Um zu testen, ob die Messwerte normalverteilt sind, wurden Quantile-Quantile (Q-Q) Plots (siehe 2.2.13) erstellt. Die Quantilen der Verteilung der individuellen Messwerte um den Mittelwert wurden dabei gegen die Quantilen einer simulierten Normalverteilung mit einer empirisch angeglichenen Standardabweichung geplottet. Die hier durchgeführten Messungen zeigten annähernd eine Lognormalverteilung, das heißt die logarithmierten Messwerte sind normalverteilt (Abb. 17). Ob die Varianz für alle Zeitpunkte vergleichbar ist, ließ sich anhand der wenigen Messungen pro Zeitpunkt der TSA-Behandlung nicht empirisch bestimmen. Die leichten systematischen Abweichungen der Stichprobenverteilung von der Normalverteilung legen allerdings eine Varianzheterogenität der Messungen nahe. Daher wurde der Welch's t-Test auf die logarithmierten Messwerte angewendet.

Sowohl für Histon H3ac als auch H4ac ist der Anstieg nach 20 Minuten TSA-Behandlung signifikant (ungepaarter t-Test, Histon H3ac:  $p = 4 \times 10^{-7}$ ; Histon H4ac:  $p = 0,036$ ). Für Histon H3ac ist kein weiterer signifikanter Anstieg zu beobachten. Für Histon H4ac dagegen sind weitere signifikante Anstiege zu späteren Zeitpunkten zu beobachten

(ungepaarter t-Test<sub>(20 Minuten/40 Minuten)</sub>:  $p = 0,016$ ; ungepaarter t-Test<sub>(40 Minuten/80 Minuten)</sub>:  $p=0,02$ ). Bei Histon H4K8ac ist die Zunahme signifikant nach 50 Minuten (ungepaarter t-Test<sub>(0 Minuten / 50 Minuten)</sub>:  $p = 0,01$ ).

Zusätzlich wurden die hier aufgeführten Experimente zur globalen TSA-induzierten Histonhyperacetylierung parallel auch von Dr. Karthikeyan Kandasamy (Research Scientist, Institute of Bioengineering and Nanotechnology (IBN), Singapur) durchgeführt. Seine Ergebnisse stimmen mit den hier erzielten überein.

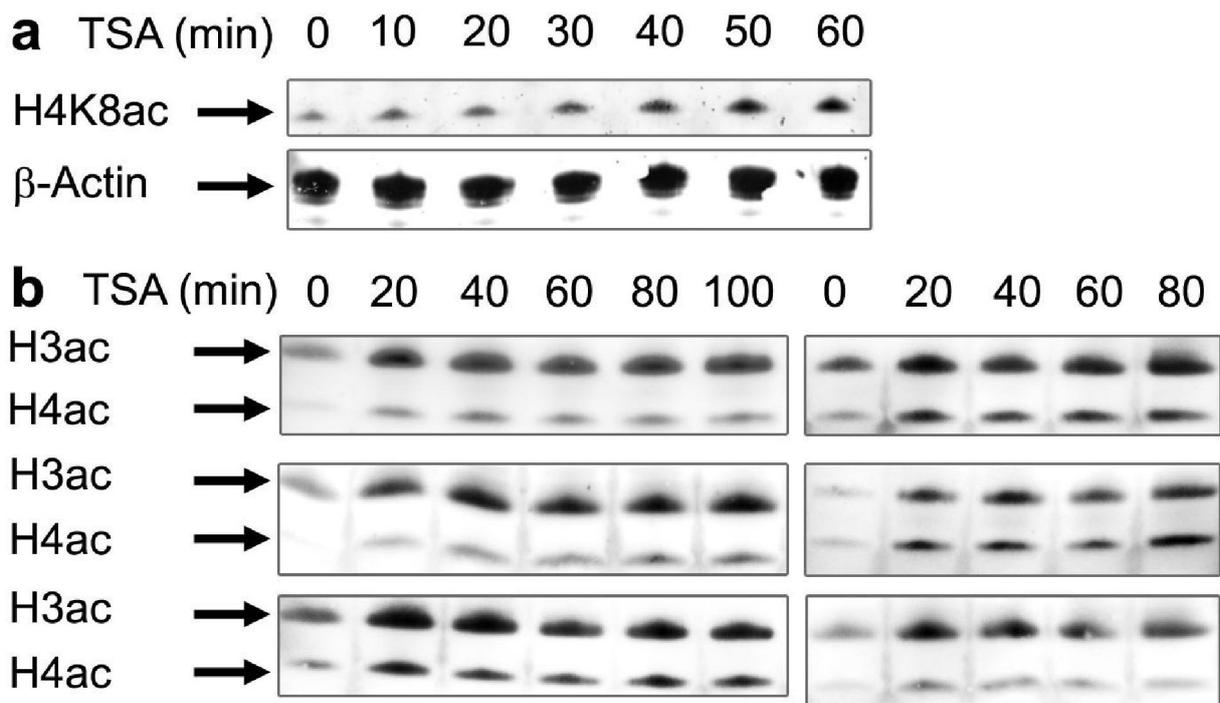


Abbildung 15: **Beispiele für den immunologischen Nachweis (Western-Blot) von TSA-induzierter Histonhyperacetylierung.** HeLa Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit TSA behandelt (Überschrift der Bahnen) und die am linken Rand angegebenen Proteine / Histonisoformen wurden im Zelllysat immunologisch nachgewiesen. a) Beispiel für eine Detektion von Histon H4K8ac und β-Actin (Ladungskontrolle). b) Detektion von Histon H3ac und Histon H4ac. Drei unabhängige Experimente (mit jeweils zwei technischen Replikaten – rechte/linke Spalte) sind gezeigt.

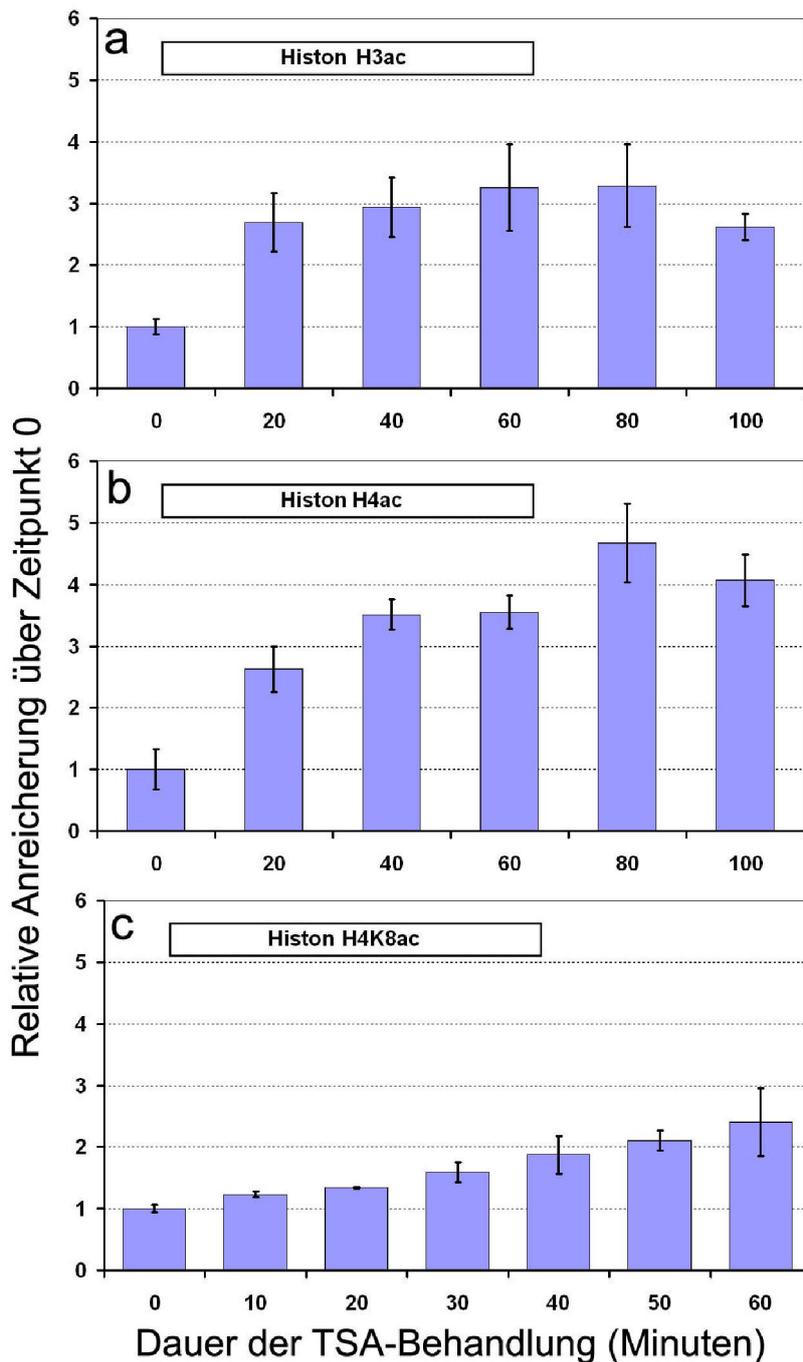


Abbildung 16: **Densitometrische Quantifizierung der Western-Blots zur Messung der Kinetik der TSA-induzierten Histonhyperacetylierung.** Die Diagramme zeigen die relativen Mengen an detektierten acetylierten Histonisofomen (bezogen auf die Histonacetylierung zum Zeitpunkt 0; der Zeitpunkt 0 ist auf den Wert 1 gesetzt) in HeLa Zellysaten. Die X-Achse zeigt die Länge der Behandlungszeit der Zellen mit 10 ng/ml TSA (in Minuten). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei bis acht unabhängigen Experimenten ( $\pm$  Standardfehler (SE)). a) Histon H3ac b) Histon H4ac c) Histon H4K8ac

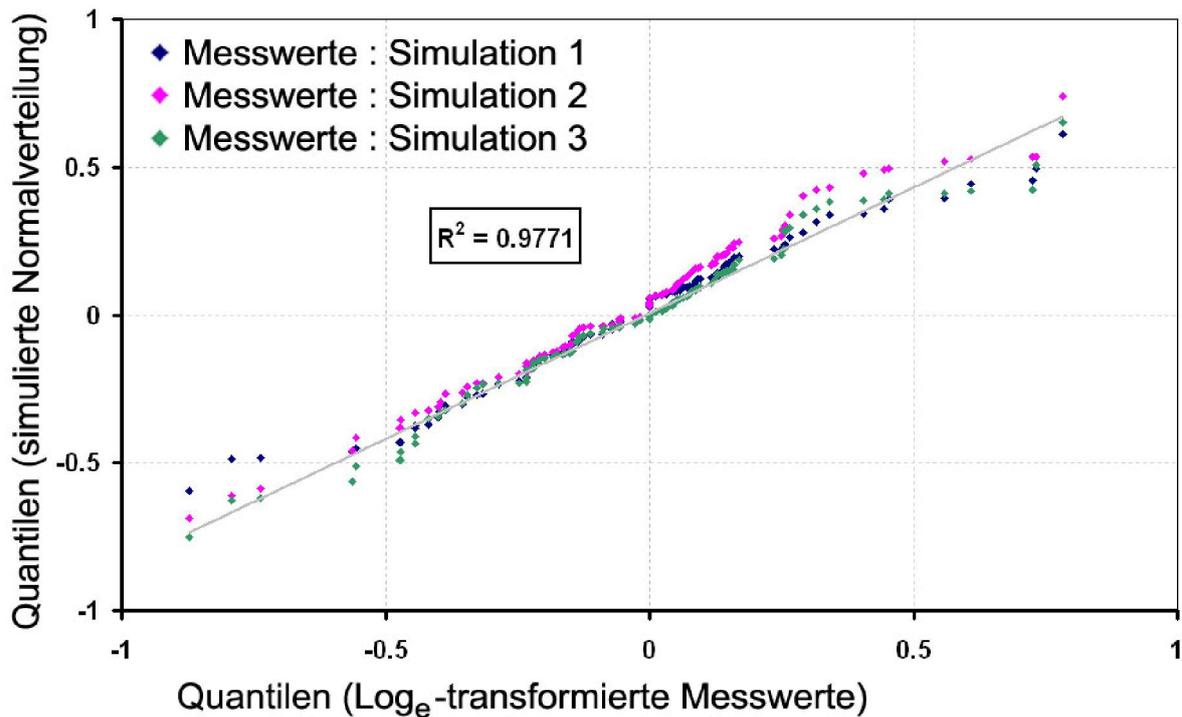


Abbildung 17: **Quantile-Quantile-Plot zur Evaluierung der Stichprobenverteilung der Western-Blot Messungen.** Die Verteilung der Einzelmessungen um den Mittelwert ( $\text{Einzelmessung}_{(\text{Zeitpunkt } x)}/\text{Mittelwert}_{(\text{Zeitpunkt } x)}$ ) wurde bestimmt (siehe 2.2.13). Diese ermittelten Verhältnisse wurden entsprechend ihrer Größe sortiert und logarithmiert (Basis e, Skala auf x-Achse). Anschließend wurden sie gegen die gleiche Anzahl von normalverteilten Zufallszahlen (Mittelwert = 0, Streuung = 0.25), ebenfalls sortiert nach ihrer Größe, geplottet (Skala auf y-Achse). Um statistische Schwankungen abzuschätzen, wurden drei Sets von normalverteilten Zufallszahlen erstellt. Die Plots der Messwerte gegen diese drei Simulationen sind in verschiedenen Farben dargestellt (Simulation 1: blau, Simulation 2: pink, Simulation 3: grün). Das Gros der Messwerte im Zentrum zeigt eine recht gute Übereinstimmung mit der Normalverteilung. Die Enden zeigen systematische Abweichungen, deren Magnitude sich jedoch deutlich in den unterschiedlichen Simulationen unterscheidet. Die graue Linie zeigt die Regressionsgerade für Simulation 3, mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0.98. Der Plot wurde anhand von insgesamt 104 Einzelmessungen erstellt.

### 3.2 Kinetik der TSA-induzierten CFTR-Repositionierung

Als nächstes sollte der zeitliche Verlauf der Histonhyperacetylierung mit dem der CFTR-Repositionierung verglichen werden. Dazu wurde der zeitliche Verlauf der CFTR-Repositionierung ermittelt. Dieses geschah über FISH-Zeitserien mit 2D-Erosionsanalyse

(siehe 2.2.2.4 und 2.2.3 (Croft, *et al.*, 1999, Englmann, *et al.*, 2005, Sadoni, *et al.*, 2008, Zink, *et al.*, 2004)) in HeLa Zellen (Abb. 18). Diese Daten wurden zusammen mit Herrn Martin Günther (Hochschule für Technik und Wirtschaft, Berlin, Deutschland; Masterarbeit am IBN, Singapur) unter meiner Anleitung erhoben. Die erhaltenen, zusammengefassten Daten sind in Tabelle 4 aufgeführt und in Abbildung 19 grafisch dargestellt.

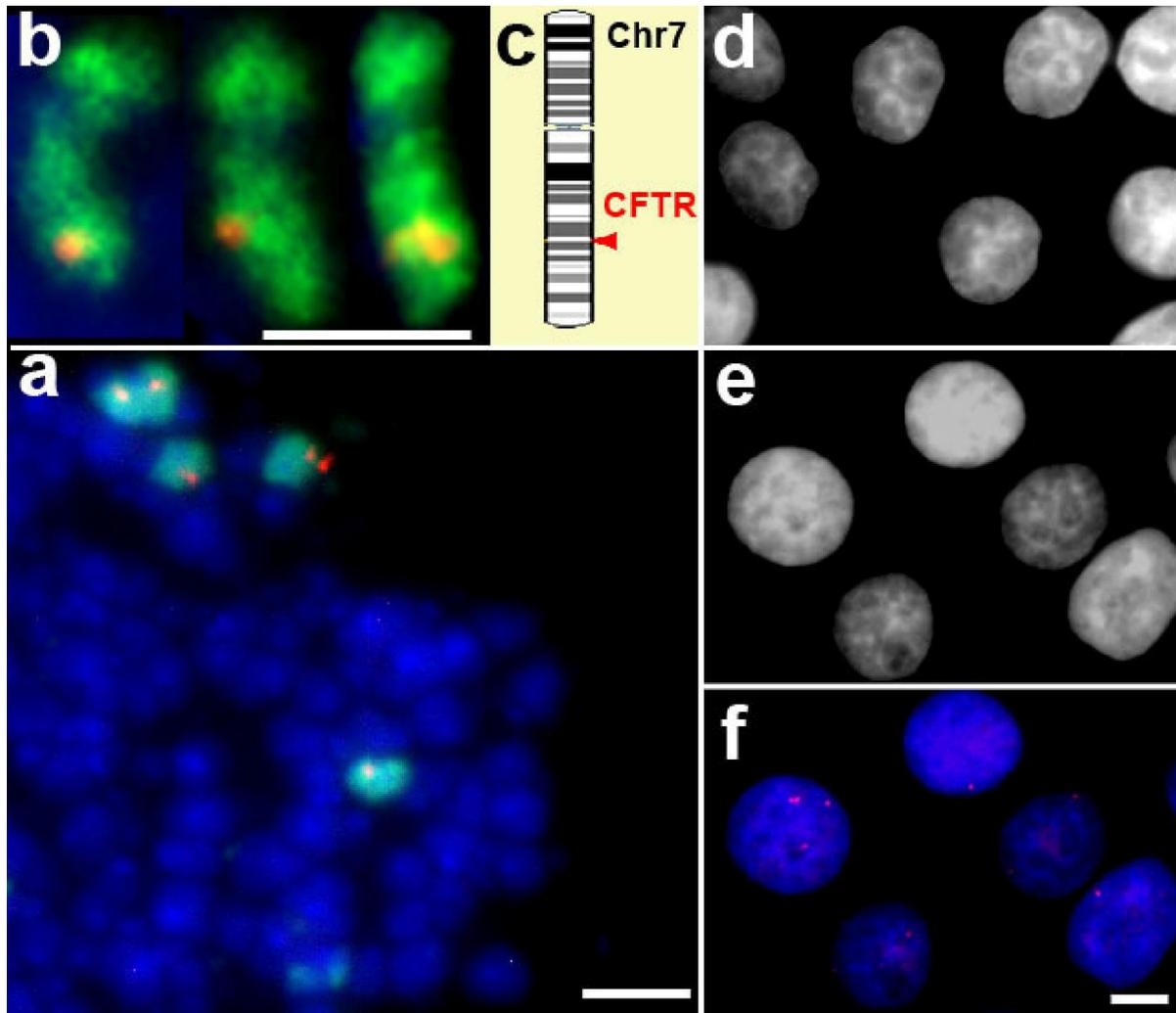


Abbildung 18: **Test der verwendeten *CFTR*-Sonde und des 2D-FISH-Protokolls.** a) Die Abbildung zeigt Methanol/Eisessig fixierte Metaphasen-Chromosomen aus HeLa Zellen. DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau), und Chromosom 7 (grün) sowie *CFTR* (rot) mittels FISH markiert. b) Drei vergrößerte Darstellungen von Chromosom 7. c) Als Vergleich ist ein Ideogramm mit der Position des *CFTR*-Gens (rot) auf Chromosom 7 dargestellt (Quelle: <http://www.ensembl.org>). d) Die Aufnahme zeigt formaldehydfixierte HeLa-Zellkerne, als Kontrolle für die Wiedergabetreue der Chromatinstruktur durch die FISH-Prozedur. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. e) HeLa-Zellkerne nach der FISH. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. f) Überlagerung der DAPI-Färbung (blau) mit den FISH-Signalen (rot). Maßstäbe: 5  $\mu$ m.

Die gemittelte Aufenthaltswahrscheinlichkeit des *CFTR*-Lokus in der äußersten Schale nimmt in zwei Schritten, einmal zwischen 10 und 20 Minuten und ein zweites Mal zwischen 40 und 50 Minuten ab. Nach 50 Minuten läßt sich keine deutliche Änderung bis einschließlich 10 Stunden TSA-Behandlung feststellen.

Behandlungs-Dauer	0 Minuten (negative Kontrolle)		10 Minuten		20 Minuten		30 Minuten	
Schale	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
1	43,5	0,8	42,8	1,2	39,4	1,2	38,3	1,4
2	26,6	0,5	28,1	0,5	28,4	0,6	28,3	0,5
3	16,6	0,9	15,4	0,4	15,7	0,2	17,9	1,0
4	9,7	0,9	10,3	1,0	11,5	0,3	11,3	0,9
5	3,5	0,6	3,4	0,3	5,0	1,6	4,2	0,7
Behandlungs-Dauer	40 Minuten		50 Minuten		60 Minuten		75 Minuten	
Schale	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
1	39,8	1,1	35,3	2,6	35,1	0,9	33,4	2,3
2	27,1	0,8	29,6	1,7	29,6	0,7	31,8	2,3
3	18,2	1,3	19,0	1,0	17,3	0,8	22,1	2,0
4	10,8	0,9	12,4	0,6	12,8	1,0	10,4	1,5
5	4,2	0,5	3,7	0,4	5,3	0,5	2,4	0,7
Behandlungs-Dauer	120 Minuten		270 Minuten		480 Minuten		600 Minuten (positive Kontrolle)	
Schale	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
1	32,3	4,5	32,8	2,6	32,6	2,5	35,4	0,5
2	33,1	0,1	30,0	2,6	35,2	0,1	30,6	0,7
3	19,0	1,8	19,2	1,0	16,7	2,0	18,1	1,7
4	10,6	3,3	13,0	1,9	12,4	1,8	11,5	1,1
5	5,0	0,7	5,1	0,4	3,2	0,9	4,4	1,0

Tabelle 4: **Ergebnisse der 2D-Erosionsanalyse für den *CFTR*-Lokus in HeLa Zellen nach Behandlung mit 10 ng/ml TSA über die angegebenen Zeiträume.** Angegeben sind die Mittelwerte (MW) der Anteile (in %) von FISH-Signalen in den Schalen 1 (Peripherie) bis 5 (Zentrum), sowie der Standardfehler (SE). Pro Zeitpunkt wurden jeweils 2-7 unabhängige Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt.

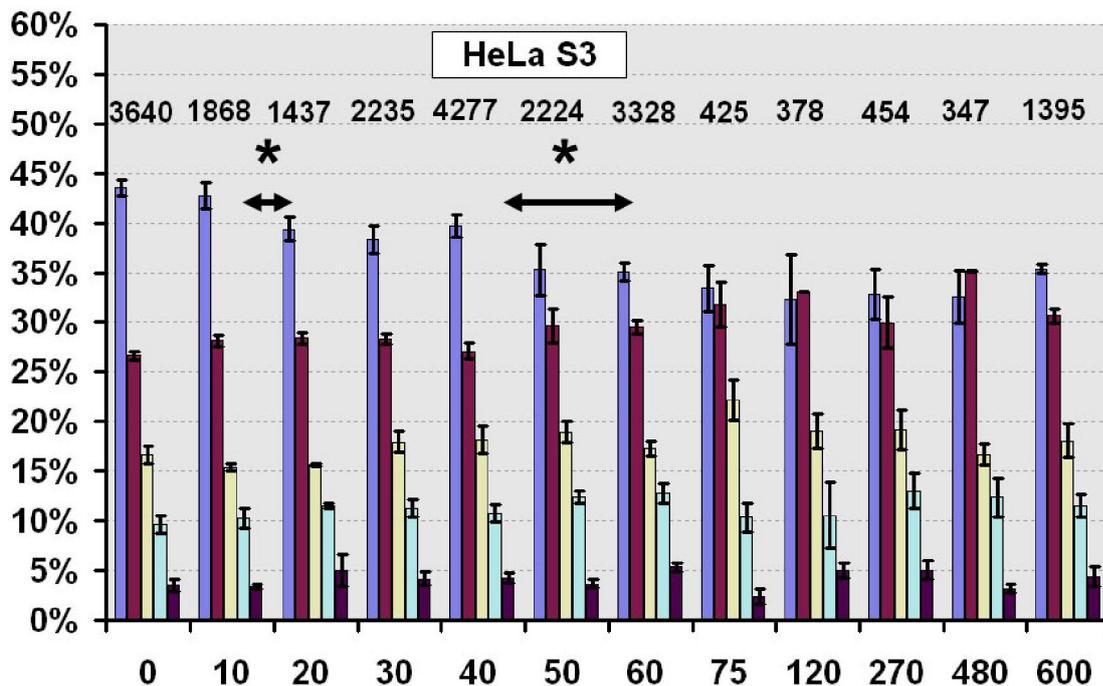


Abbildung 19: **Grafische Darstellung der Daten aus Tabelle 4.** Gezeigt ist die Verteilungen der FISH-Signale des *CFTR*-Lokus in Abhängigkeit von der Dauer der TSA-Behandlung (in Minuten). Die Balken zeigen die Mittelwerte der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der *CFTR*-Loci innerhalb der in 5 konzentrische Schalen unterteilten Zellkerne (+/-SE). Schale 1 (dunkelblau) befindet sich an der Peripherie, Schale 5 (purpur) liegt im Zentrum des Zellkerns. Die Zahlen oberhalb der jeweiligen Verteilung geben die Anzahl der ausgewerteten FISH-Signale an. Sterne (\*) kennzeichnen signifikante Veränderungen der Verteilungen in der 1. Schale in den mit Doppelpfeilen gekennzeichneten Zeitintervallen. Die Daten wurden erhoben von: Martin Günther (10, 20, 600 Minuten), Joscha Muck (75, 120, 270, 480 Minuten), beziehungsweise von beiden Experimentatoren (0, 30, 40, 50, 60 Minuten).

Um die Signifikanz dieser Änderungen in der ersten Schale zu testen, wurde zuerst ermittelt, ob die Messwerte der unabhängigen Experimente normalverteilt vorliegen. Für die Abschätzung wurden Q-Q Plots der Messwerte, aufgetragen gegen die Normalverteilung, erstellt (Abb. 20). Den Q-Q Plots zufolge sind die Messwerte normalverteilt. Da die Varianz der Messwerte erwartungsgemäss für die unterschiedlichen Zeitpunkte voneinander abweichen sollte (unterschiedlicher Grad der Asymetrie der zugrundeliegenden Multinomialverteilung), wurde der Welch's t-Test eingesetzt.

Die Änderungen zwischen 10 und 20 Minuten, sowie zwischen 40 und 60 Minuten sind demzufolge signifikant (ungepaarter t-Test<sub>(10 Minuten-20 Minuten)</sub>:  $p=0,03$ ; ungepaarter t-Test<sub>(40 Minuten-60 Minuten)</sub>:  $p=0,002$ ).

Da die Umverteilung der Signale auf mehrere der inneren Schalen erfolgt, sind die in diesen Schalen beobachteten Änderungen jeweils deutlich geringer. In der zweiten Schale

ist die Änderung ab 60 Minuten gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant. Ausnahmen sind die Zeitpunkte 75 und 270. Bei den Schalen 3-5 kann keine statistisch signifikante Änderung nachgewiesen werden.

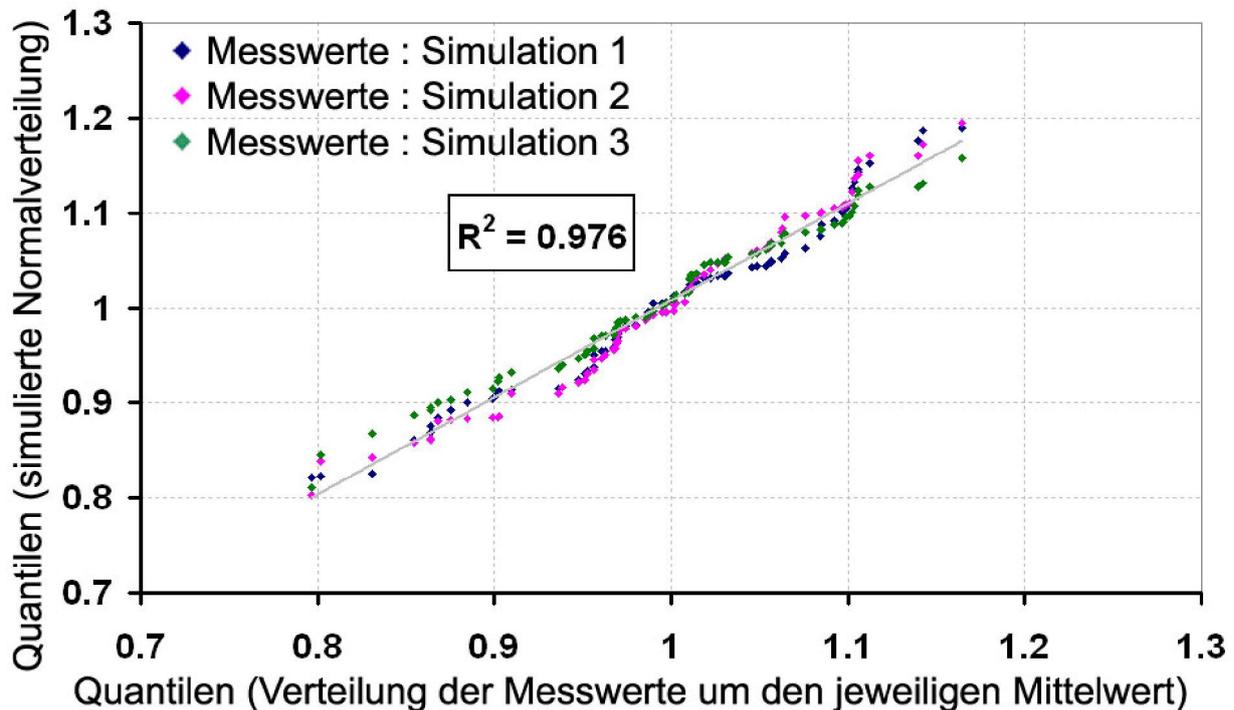


Abbildung 20: **Quantile-Quantile-Plot der Stichprobenverteilung der Messungen der FISH-Signale in der ersten Schale gegen die Normalverteilung.** Die in den unabhängigen Experimenten (Replikaten) gemessenen Prozentsätze von FISH-Signalen in der 1. Schale (Zellkernperipherie) wurden durch den Mittelwert der Replikate des jeweiligen Zeitpunktes der TSA-Behandlung geteilt. Die ermittelten Verhältnisse wurden entsprechend ihrer Größe sortiert und gegen die gleiche Anzahl von normalverteilten Zufallszahlen (Mittelwert = 1, Streuung = 0.08), ebenfalls sortiert nach ihrer Größe, geplottet. Um zufällige Abweichungen zu identifizieren wurden drei Sets von Zufallszahlen generiert. Die Plots der Messwerte gegen diese drei Simulationen sind in verschiedenen Farben dargestellt (Simulation 1: blau, Simulation 2: pink, Simulation 3: grün). Die graue Linie zeigt die Regressionsgerade der gemittelten Simulationen mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0.98$ . Die Plots wurden anhand von insgesamt 78 Einzelmessungen erstellt.

### 3.3 Etablierung eines CHIP-chip-Protokolls und Bestimmung der Histonacetylierung im *CFTR*-Lokus

Sowohl die *CFTR*-Positionierung als auch die globale Histonacetylierung zeigen signifikante Änderungen nach 20 Minuten TSA-Behandlung. Diese Koinzidenz steht im Einklang mit der Vermutung, dass diese Vorgänge etwas miteinander zu tun haben

könnten. Daher wurden die Zusammenhänge weiter untersucht. Als nächstes sollte nun getestet werden, ob und wie sich die lokale Histonacetylierung im *CFTR*-Lokus nach TSA-Behandlung ändert. Diese sollte mittels ChIP-chip (siehe 2.2.5-2.2.10) nach 0, 20, 40 und 60 Minuten TSA-Behandlung bestimmt werden.

Um den Acetylierungsgrad der Histone im *CFTR*-Lokus zu bestimmen, wurde die Dichte der acetylierten Histonisoformen mit der Dichte der Gesamthistone (unabhängig von deren Modifikationen) in Relation gesetzt. Zur Bestimmung der Gesamthistone mittels ChIP wurde ein Antikörper gegen Histon H3(pan) von Abcam (Cambridge, UK) eingesetzt. Dieser Antikörper wurde mit Peptiden, die dem C-terminalen (unmodifizierten) Ende von Histon H3 entsprechen, erzeugt (<http://www.abcam.com/Histone-H3-antibody-ChIP-Grade-ab1791.html>). Der Antikörper erkennt Histon H3, vermutlich unabhängig von seinen Modifikationen.

Für die erfolgreiche Durchführung der ChIP und speziell der ChIP-chip Experimente, mussten zuerst eine Reihe von experimentellen Bedingungen getestet werden.

### 3.3.1 Chromatinfragmentierung

Der Fragmentierungsschritt wurde hier mechanisch mit einem HTU Soni 130 Ultraschallhomogenisierer (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) durchgeführt (siehe 2.2.5.1). Ziel war es, möglichst kurze Chromatinfragmente zu erzeugen, ohne die zu untersuchenden Antigene durch Überhitzung und/oder Schaumbildung zu stark zu schädigen. Idealerweise sollte das Chromatin vollständig in einzelne Nukleosomen mit der jeweils gebundenen DNA fragmentiert werden. Dieses erfordert jedoch sehr lange Homogenisierungen. Die hier verwendeten Einstellungen stellen daher einen Kompromiss von Fragmentierungs- und Zeiteffizienz dar. Zur Bestimmung der Fragmentgrößenverteilung wurde die DNA aus dem sonifizierten Chromatin extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 21a). Die Auswertung erfolgte densitometrisch (Abb. 21 b). Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Einstellungen lag etwa 60% der DNA (bezogen auf die Masse) mit einer Fragmentlänge von etwa 200 bp vor. Insgesamt 80% der Fragmente zeigten eine Länge von unter 1000 bp.

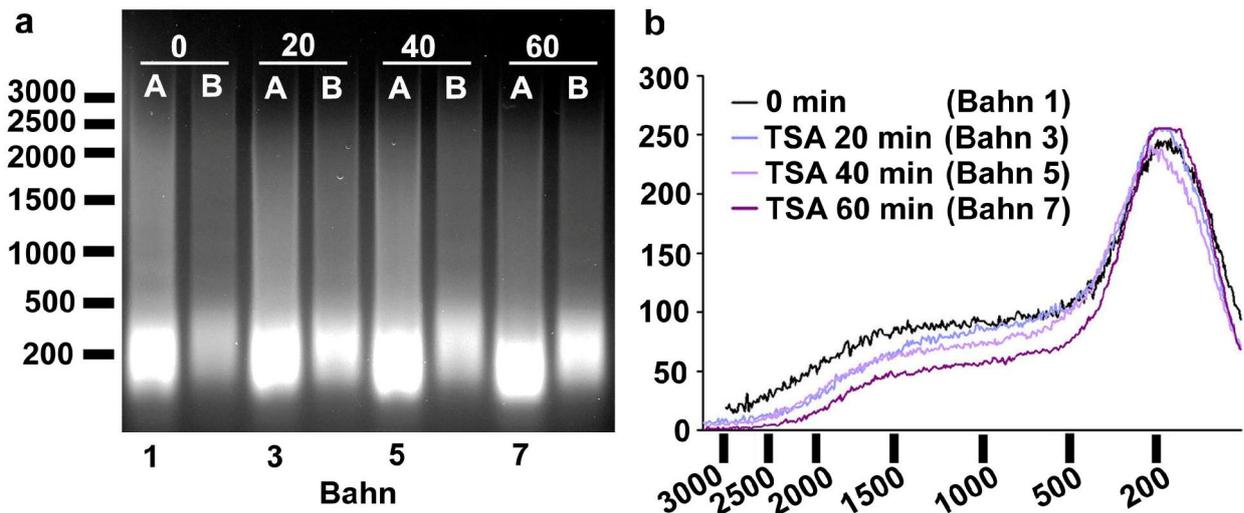


Abbildung 21: **Effizienz und Reproduzierbarkeit der Chromatinfragmentierung.** SybrGreen I-Signal von elektrophoretisch aufgetrennter DNA (A = 1 µg / B = 0,5 µg Auftragsmenge), isoliert aus sonifiziertem Chromatin von HeLa Zellen nach 0, 20, 40 und 60 Minuten TSA-Behandlung. a) Aufnahme eines DNA-Agarosegels ( 0,8% ). Die Markierungen am linken Rand zeigen die Größe (in bp) und Laufstrecke des als Referenz verwendeten DNA-Markers. b) Intensitäts-verteilung der SybrGreen I-Fluoreszenz entlang der Bahnen 1, 3, 5 und 7 aus a. Die Markierungen auf der x-Achse zeigen die Fragmentgröße (entsprechend y-Achse aus a). Die y-Achse zeigt die 8-Bit Grauwerte der Aufnahme.

### 3.3.2 DNA-Amplifikation

Die durch die ChIP-Prozedur isolierte DNA-Menge hängt von den für die Experimente eingesetzten Antikörpermengen ab. So isolierte der hier eingesetzte Antikörper gegen Histon H3ac ungefähr 40 ng DNA pro 1 µl eingesetztes Antiserum und der Antikörper gegen Histon H3pan sogar 400 ng. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Chips (Agilent Custom Microarray, 4 identische Sektoren mit je 45.220 Sonden, Agilent Technologies, Santa Clara, USA, siehe 2.2.6) erfordert eine DNA-Markierungsreaktion für eine Hybridisierung jedoch deutlich größere Mengen an DNA (etwa 7 µg pro Sektor). Die nach der ChIP-Prozedur gereinigte DNA (ChIP-DNA) wurde daher mit dem „Whole Genome Amplifikation Kit“ (WGA, siehe 2.2.5.2) amplifiziert, da dieses Amplifikationsverfahren eine relativ gute Repräsentation des eingesetzten Startmaterials liefert (O'Geen, *et al.*, 2006). Um die Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der Amplifikation zu überprüfen, wurde DNA, extrahiert aus fragmentiertem Chromatin (INPUT), in zwei voneinander unabhängigen Reaktionen amplifiziert (WGA1 und WGA2). Die INPUT-DNA, sowie die WGA1- und WGA2-DNA aus den beiden Amplifikationen

wurden mit Cy3 fluoreszenzmarkiert und auf verschiedene Sektoren desselben DNA-Chip hybridisiert. Der direkte Vergleich von unamplifizierter DNA und amplifizierter DNA (INPUT/WGA1) ist in Abbildung 22a dargestellt. Idealerweise sollten alle Datenpunkte auf der Diagonalen liegen. Die Amplifikation zeigt jedoch deutliche Ungleichmäßigkeiten (relative Standardabweichung (SD)  $\pm$  30%). Die in zwei Experimenten unabhängig amplifizierte DNA (WGA1/WGA2) zeigt dagegen untereinander eine bessere Übereinstimmung mit einer SD von etwa 7% (Abb. 22 b). Der Fehler aufgrund der Amplifikation ist also größtenteils systematisch. Sein Einfluss auf die Resultate kann dadurch minimiert werden, dass man ausschließlich zuvor amplifizierte DNA miteinander vergleicht.

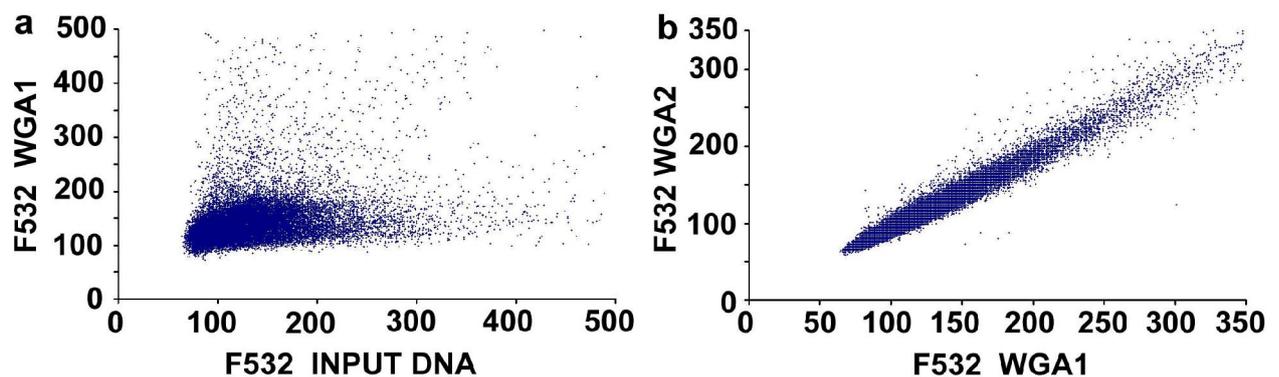


Abbildung 22: **Linearität und Reproduzierbarkeit der Genomamplifikation mittels WGA.** Streudiagramm der Cy3-Fluoreszenzintensitäten (F532) der DNA-Chip Sonden nach Hybridisierung mit den angegebenen DNA-Präparationen. a) Sondenintensitäten nach Hybridisierung mit unamplifizierter DNA (INPUT DNA, x-Achse) gegen Sondenintensität nach Hybridisierung mit amplifizierter DNA (WGA1, y-Achse) b) Sondenintensitäten nach Hybridisierung mit amplifizierter DNA (WGA1, x-Achse) gegen Sondenintensität nach Hybridisierung mit unabhängig davon amplifizierter DNA (WGA2, y-Achse)

### 3.3.3 Einfluss des DNA-Chip Scans auf die Ergebnisse

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Chips zeigten die DNA-Sonden nach der Hybridisierung einen großen Fluoreszenzintensitätsbereich. Wurde die elektronische Verstärkung beim Scannen für die Fluoreszenzintensität des Gros der Sonden optimiert, waren einige Prozent der Sonden überbelichtet. Für die hier durchgeführten Scans stellte sich nun die Frage, ob die DNA-Chips zweimal bei unterschiedlichen Verstärkungsgraden gescannt werden sollten, oder ein einziger Scan bei niedriger Verstärkung ausreicht. Abbildung 23 zeigt den Vergleich von Scans desselben DNA-Chips bei hoher und

niedriger Verstärkung. Die gute Übereinstimmung ließ den Schluss zu, dass ein einzelner Scan bei niedriger Verstärkung ausreicht.

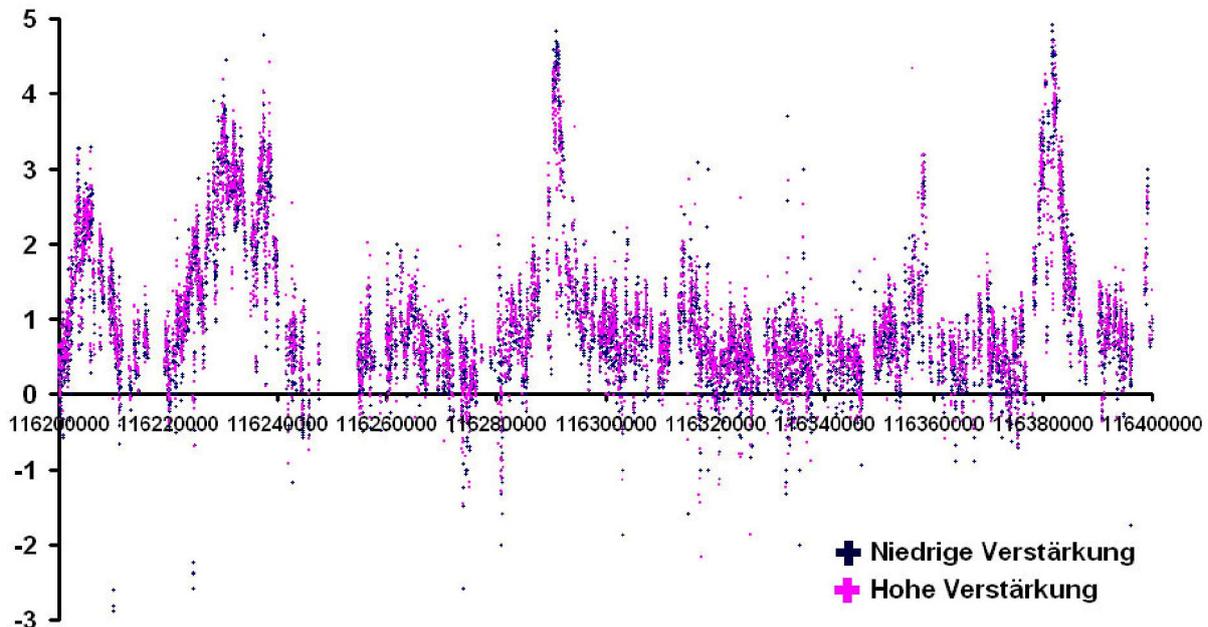


Abbildung 23: **Einfluss der elektronischen Verstärkung auf die Messung der Anreicherungen.** Die x-Achse zeigt die genomischen Positionen der SONDENSEQUENZEN. Die y-Achse zeigt die gemessenen  $\log_2$ -transformierten Verhältnisse der Signalintensitäten der Cy5- (Histon H3ac ChIP-WGA) und Cy3- (Histon H3pan ChIP-WGA) Fluoreszenz. Es wurden zwei Scans des selben DNA-Chipsektors mit unterschiedlichen Verstärkungsgraden vorgenommen. Datenpunkte in Blau zeigen die Ergebnisse eines Scans mit geringer elektronischer Verstärkung, Datenpunkte in Pink die Ergebnisse mit höherer Verstärkung.

### 3.3.4 Einfluss der Hintergrundberechnung auf die Messwerte

Das Design der hier verwendeten DNA-Chips enthält Sonden, welche als negative Kontrollen zur Berechnung des Hintergrundes verwendet werden können (siehe 2.2.9.1). Die Sequenz dieser Sonden tritt nicht im menschlichen Genom auf (siehe 2.2.6.2). Alternativ kann die lokale Umgebung der Sonden für die Abschätzung des Hintergrundes verwendet werden. Um zu untersuchen, wie robust sich die Datensätze gegenüber der Methode der Hintergrundberechnung verhalten, wurde ein direkter Vergleich durchgeführt (Abb. 24). Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, ist der Unterschied für unterschiedliche

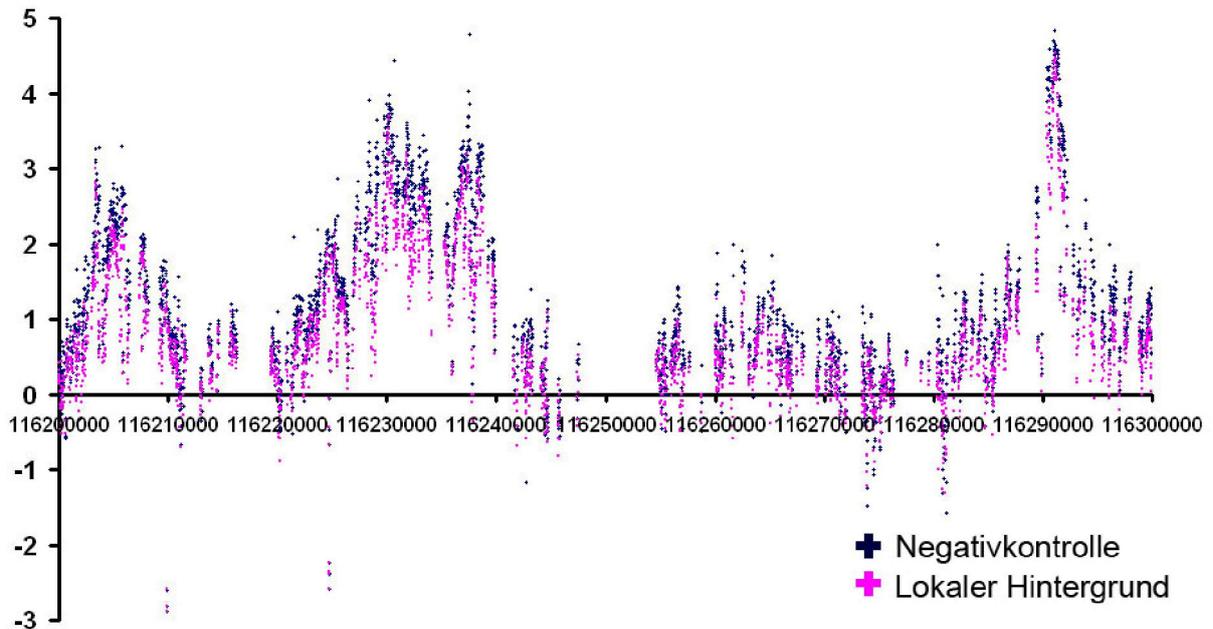


Abbildung 24: **Einfluss der Hintergrundberechnung auf die errechneten Anreicherungen.** Die x-Achse zeigt die genomischen Positionen der SONDENSEQUENZEN. Die y-Achse zeigt die gemessenen  $\text{Log}_2$ -transformierten Verhältnisse der Signalintensitäten der Cy5- (Histon H3ac ChIP-WGA) und Cy3- (Histon H3pan ChIP-WGA) Fluoreszenz. Es wurden zwei verschiedene Methoden der Hintergrundberechnung auf die selben Messwerte angewendet. Bei den Datenpunkten in Blau wurden Sonden, deren Sequenz nicht im menschlichen Genom auftreten, als negative Kontrollen für die Hintergrundberechnung verwendet. Bei den Datenpunkten in Pink wurde die lokale Umgebung der Sonden für die Hintergrundberechnung verwendet.

Methoden der Hintergrundberechnung nur marginal und führt im Wesentlichen zu einer Verschiebung der Basislinie – eine Abweichung, die in der folgenden Normalisierung (siehe 2.2.9.2) verschwindet. Für die Erstellung der folgenden Datensätze wurden die negativen Kontrollen für die Hintergrundberechnung eingesetzt.

### 3.4 Darstellung und Analyse der Acetylierungsmuster von Histon H3 und H4 in HeLa Zellen vor- und nach TSA-Behandlung und Vergleich mit den Acetylierungsmustern in Calu-3 Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die TSA-induzierte Repositionierung des *CFTR*-Gens von einer Zunahme der globalen Histon H3- und H4- Acetylierung begleitet ist. Als Nächstes sollte untersucht werden, ob sich auch die lokale Histonacetylierung innerhalb der *CFTR*-Region während der Repositionierung des Gens ändert. Daher wurden die Histonacetylierungsmuster in der *CFTR*-Region in unbehandelten und TSA-behandelten Zellen mittels ChIP-chip bestimmt. Da bereits nach 20 Minuten TSA-Behandlung eine signifikante Repositionierung des *CFTR*-Gens beobachtet werden kann, müssen folglich potentielle, diese Repositionierung auslösende Proteinmodifikationen zu diesem Zeitpunkt bereits ausgebildet sein. Datensätze nach 40 und 60 Minuten erscheinen nahezu identisch mit denen für 20 Minuten (Abb. 25, Anhang). In der weiteren Arbeit werden daher nur die Datensätze für unbehandelte Zellen und für Zellen nach 20-Minuten TSA-Behandlung präsentiert. Für HeLa Zellen wurden fünf unabhängige ChIP-Experimente für Histon H3ac und vier unabhängige ChIP-Experimente für Histon H4ac, jeweils vor und nach 20 Minuten TSA-Behandlung, durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der ChIP zu überprüfen, wurde sowohl für Histon H3ac als auch H4ac jeweils die ChIP-WGA eines individuellen Experiments separat von den übrigen Experimenten auf einem DNA-Chip Sektor hybridisiert. Ein DNA-Chip Sektor enthält dabei 4 identische Kopien eines Sondensatzes (siehe 2.2.6.1). Die ChIP-WGA der zusätzlichen Experimente zur jeweiligen Histonisoform und der jeweiligen Behandlung wurden gemischt und auf jeweils drei weitere DNA-Chip Sektoren hybridisiert. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der Einzelexperimente mit denen der kombinierten Experimente (gepoolte ChIP-WGA) ist in Abbildung 26 (Anhang) dargestellt. Die Datensätze dieser insgesamt vier Hybridisierungen pro Histonisoform und Bedingung wurden anschließend gemittelt und sind in Abbildung 27 dargestellt (HeLa Histon H3ac: Spur 1; HeLa Histon H4ac: Spur 3). Die Datensätze, die vor und nach TSA-Behandlung erhalten wurden, sind in dieser Darstellung überlagert (unbehandelt: schwarz, TSA-Behandlung: pink). Die Darstellung erfolgte mithilfe des University of California, Santa Cruz (UCSC)-Genombrowsers (<http://genome.ucsc.edu/>).

Zusätzlich sollten die TSA-induzierten Veränderungen in den Acetylierungsmustern in HeLa Zellen mit den Acetylierungsmustern in unbehandelten Calu-3 Zellen verglichen werden. In Calu-3 Zellen wird das *CFTR*-Gen exprimiert und befindet sich konstitutiv im Zellkerninneren. Sollte Histonhyperacetylierung an bestimmten Stellen die Genpositionierung im Zellkern kontrollieren, dann sollten diese Stellen in Calu-3 Zellen hyperacetyliert sein. Für Calu-3 Zellen wurden jeweils drei unabhängige ChIP-Experimente für Histon H3ac und Histon H4ac durchgeführt. Analog zu HeLa Zellen,

wurde jeweils ein unabhängiges Experiment, sowie die kombinierte ChIP-WGA der beiden zusätzlichen Experimente, auf getrennte DNA-Chip Sektoren hybridisiert. Die Messwerte dieser beiden Datensätze wurden gemittelt (Abb. 27, Histon H3ac: Spur 2; Histon H4ac: Spur 4).

Neben der visuellen Inspektion der Anreicherungsdaten wurde das Microsoft Excel Makro ChIPOTle (Buck, *et al.*, 2005) eingesetzt, um Regionen zu ermitteln, die eine signifikante Anreicherung von H3ac oder H4ac zeigen (siehe 2.2.9.3). ChIPOTle mittelt die gemessenen logarithmierten Anreicherungen innerhalb eines gleitenden genomischen Fensters von in diesem Falle 1 kb Länge. Es vergleicht diesen gemittelten Wert mit der Stärke des Rauschens des jeweiligen Datensatzes. Um das Rauschen des Datensatzes abzuschätzen, benutzt das Makro die Verteilung der im Datensatz auftretenden negativen logarithmierten Anreicherungen. Anhand dieses Vergleichs ermittelt das Makro die Wahrscheinlichkeit des Auftretens des jeweiligen Wertes der gemittelten Anreicherung innerhalb des genomischen Fensters. Genomische Fenster mit einem p-Wert  $< 0,001$  (korrigiert für mehrfache Vergleiche mit der Bonferroni-Korrektur) sind in Abbildung 27 dargestellt. Genomische Fenster mit signifikanter Anreicherung gegenüber dem restlichen Datensatz wurden für die ChIP-chip Datensätze von unbehandelten HeLa und Calu-3 Zellen ermittelt. Diese Stellen sind in schwarz unter den jeweiligen Datensätzen angezeigt. Desweiteren sollten Stellen identifiziert werden, in denen die Acetylierung in HeLa Zellen signifikant nach TSA-Behandlung ansteigt. Dazu wurden die Differenzen der jeweiligen logarithmierten Datensätze nach TSA-Behandlung und für die unbehandelte Zellen gebildet ("TSA-Kontrolle"). Signifikant angereicherte Stellen in diesen Differenzdatensätzen wurden mithilfe des ChIPOTle Makros identifiziert. Diese Stellen mit signifikanter Zunahme der Histonacetylierung nach TSA-Behandlung sind in Pink unter den zugehörigen ChIP-chip Datensätzen dargestellt (Abb. 27, Spur 1 und 3). Desweiteren sollten Stellen identifiziert werden, in denen Calu-3 Zellen einen höheren H3 beziehungsweise H4 Acetylierungsgrad aufweisen als unbehandelte HeLa Zellen. Diese Stellen wurden analog, anhand der Differenzdatensätze von Calu-3 und HeLa Zellen, bestimmt ("Calu-3-HeLa"). Diese Regionen sind in Rot unter den zugehörigen Datensätzen von Calu-3 Zellen dargestellt.

In den folgenden Abschnitten werden zuerst die Acetylierungsmuster von Histon H3 und H4 in unbehandelten HeLa und Calu-3 Zellen verglichen. Dann werden die Auswirkungen der TSA-Behandlung in HeLa Zellen und deren Gemeinsamkeiten zu Calu-3 Zellen analysiert. Diese Positionen werden dann zu bekannten Bindungstellen von Transkriptionsfaktoren in Relation gesetzt.

### 3.4.1 Histon H3 Acetylierungsmuster in unbehandelten HeLa und Calu-3 Zellen

Acetyliertes Histon H3 war in unbehandelten HeLa Zellen innerhalb der hier untersuchten Region an einigen Stellen bis zu etwa 30-fach angereichert (gegenüber H3pan). Stellen mit über 15-facher (halbmaximaler) Anreicherung werden hier im Folgenden als hochangereichert bezeichnet. Regionen mit etwa 2-facher oder höherer Anreicherung sind in der hier gewählten Darstellung visuell klar erkennbar und werden hier als deutlich angereichert bezeichnet. Daneben zeigen eine Reihe von Stellen eine geringere, jedoch gegenüber dem Datensatz immer noch statistisch signifikant erhöhte Anreicherung. Diese Positionen werden hier als signifikant angereichert bezeichnet. Unbehandelte HeLa Zellen zeigen eine hohe Anreicherung in H3ac an den 5'-Enden (Promotorregionen) von *CAPZA2* (etwa 15-fache Anreicherung) und *ST7* (etwa 25-fache Anreicherung) (Abb. 27, Spur 1, schwarz). Eine Reihe weiterer Regionen zeigen deutliche Anreicherungen. Besonders auffallend sind dabei das 3'-Ende von *MET* und die angrenzende intergenische Region, wo sich eine deutliche bis zu 4-fache Anreicherung über eine breitere Region (etwa 20 kb) zeigt. Eine weitere Region mit einer deutlichen, bis zu 4-fachen Anreicherung an einer Stelle, und einer immer noch signifikanten Anreicherung der Acetylierung über eine breite Region (etwa 20 kb), befindet sich etwa im Zentrum des *ST7*-Gens (ungefähre Position: 116.550.000), nahe einer Exongruppe. Das *ASZ1*-Gen zeigt eine deutliche Anreicherung (bis zu 4-fach) an 3 benachbarten Regionen. Die Region mit der höchsten Anreicherung deckt dabei eine Exongruppe ab. Im Gegensatz zu dieser deutlichen Anreicherung von H3ac innerhalb des Gens, erscheint der Promotor von *ASZ1* nicht hyperacetyliert zu sein.

In *CFTR* lassen sich Regionen mit deutlicher Anreicherung (etwa 2-fach) an dem 5'-Ende, nahe dem Zentrum, sowie an dem 3'-Ende des Gens erkennen. Zwischen diesen Regionen können einige zusätzliche Stellen mit signifikanter, aber sehr geringfügiger Anreicherung (weniger als 2-fach), identifiziert werden. Das *CTTNBP2*-Gen zeigt eine deutliche Anreicherung von H3ac nahe seinem (*CFTR*-zugewandten) 3'-Ende, während der Promotor kaum hyperacetyliert erscheint.

Insgesamt decken Stellen mit signifikanter Anreicherung von H3ac in HeLa Zellen etwa 22% der gesamten untersuchten Region ab. Diese signifikant angereicherten Stellen sind in der Region von *MET* bis einschließlich *ST7* stärker konzentriert. Hier decken sie etwa 37% der Region ab. Das relativ kurze *ASZ1*-Gen zeigt ebenfalls insgesamt eine hohe Dichte an deutlich angereicherten Stellen. Im Gegensatz dazu erscheint das *CTTNBP2*-Gen, und die an *CTTNBP2* in 5'-Richtung angrenzende "Genwüste", verhältnismäßig gering angereichert in H3ac.

In Calu-3 Zellen können für Histon H3ac bis etwa 20-fache Anreicherungen beobachtet werden (Abb. 27, Spur 2, schwarz). Stellen mit über 10-facher Anreicherung werden hier

als hochangereichert bezeichnet. Das Signal zu Rauschen Verhältnis ist für den gemittelten Datensatz von H3ac in Calu-3 Zellen niedriger als in dem für HeLa Zellen. CHIPOTle identifiziert in diesem Falle daher nur Stellen mit einer in Abbildung 27 deutlich sichtbaren Anreicherung (etwa 3-fach) als signifikant gegenüber dem restlichen Datensatz angereichert. Regionen mit einer hohen Anreicherung sind wiederum die Promotorregionen von *CAPZA2* und *ST7* (etwa 15-fache Anreicherung) sowie zusätzlich die Promotorregion von *CFTR* (bis zu 18-fache Anreicherung). Das 5'-Ende von *CFTR* erscheint dabei über eine breitere Region in H3ac angereichert, mit einer deutlichen Acetylierung über eine Region von etwa 20 kb. Neben diesen hochacetylierten Stellen zeigen Calu-3 Zellen eine deutlich erhöhte Anreicherung in dem von den DNA-Chips abgedeckten Teil des *MET*-Gens und der angrenzenden intergenischen Region (bis zu 8-fach), in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR*, sowie an dem 5'- und 3'-Ende von *CTTNBP2* (jeweils rund 8-fache Anreicherung). In *CFTR* finden sich zusätzliche, schwächer angereicherte Stellen (etwa 3-fach) im Zentrum, sowie in der Nähe des 3'-Endes des Gens. Daneben finden sich noch einige weitere Stellen mit geringer aber signifikanter Anreicherung von H3ac (zum Beispiel in *ASZ1*).

Der Vergleich der Histon H3 Acetylierungsmuster von unbehandelten Calu-3 und HeLa Zellen zeigt eine höhere Anreicherung in dem von den DNA-Chips abgedeckten Teil des *MET*-Gens in Calu-3 Zellen (Abb. 27, Spur 2, "Calu-3 – HeLa", rot). Von dem 3'-Ende des *MET*-Gens bis einschließlich *ST7* erscheinen die Acetylierungsmuster in beiden Zelllinien dagegen sehr ähnlich. Die drei Gene *MET*, *CAPZA2* und *ST7* werden anderen Arbeiten zufolge in beiden Zelllinien exprimiert (Ma, *et al.*, 2004, Shimabukuro, *et al.*, 2001, Gene Expression Atlas 2.0.1 (<http://www.ebi.ac.uk>)). Der *WNT2*-Promotor ist in Calu-3 Zellen deutlich angereichert in H3ac. Dieses Gen wird in Calu-3 Zellen (Levay-Young, *et al.*, 1992), sowie in HeLa Zellen (kein Subklon spezifiziert) exprimiert (GeneNote: [http://bioinfo2.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote/home\\_page.pl](http://bioinfo2.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote/home_page.pl)). In *ASZ1* überlappen zwei der signifikant angereicherten Stellen in Calu-3 Zellen und HeLa Zellen innerhalb des Gens, während der Promotor in beiden Fällen nicht angereichert erscheint. Das *ASZ1*-Gen ist in beiden Zelllinien inaktiv (Englmann, *et al.*, 2005, Zink, *et al.*, 2004). Zwei Regionen in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR* sind in Calu-3 Zellen signifikant höher angereichert als in HeLa Zellen (Abb. 27, Spur 2, rot). Einen deutlichen Unterschied bezüglich der Anreicherung von H3ac zeigt auch das *CFTR*-Gen. Das aktive Gen in Calu-3 Zellen zeigt eine hohe Anreicherung in seiner Promotorregion. In HeLa Zellen, wo *CFTR* inaktiv ist, finden sich keine vergleichbare Anreicherung von H3ac in der Promotorregion. Dagegen finden sich überlappende Stellen mit leicht erhöhter Anreicherung in beiden Zelllinien im mittleren Bereich sowie im 3'-Bereich des Gens. Für das Gen *CTTNBP2* erscheinen sowohl der Promotor, als auch das 3'-Ende in Calu-3 Zellen deutlich angereichert, während in HeLa Zellen im Wesentlichen nur das 3'-Ende eine signifikante (deutlich geringere) Anreicherung zeigt. *CTTNBP2* wird in Calu-3 Zellen gering exprimiert

(Englmann, 2005, Zink, *et al.*, 2004) und ist in HeLa Zellen (kein Subklon spezifiziert) inaktiv (Gene-Note).

### 3.4.2 Histon H4 Acetylierungsmuster in unbehandelten HeLa und Calu-3 Zellen

Die in Bezug auf H4ac gewonnenen Daten zeigen generell schwächere Anreicherungen, und damit ein geringeres Signal zu Rauschen Verhältnis, als die Datensätze für H3ac. Das ChIPOTle Makro identifiziert daher deutlich weniger signifikant angereicherte Stellen in unbehandelten HeLa Zellen (Abb. 27, Spur 3, schwarz). In unbehandelten HeLa Zellen können für Histon H4ac bis zu 10-fache Anreicherungen gegenüber H3pan beobachtet werden. Regionen mit mehr als 5-fachen Anreicherungen werden hier als hochangereichert bezeichnet. Regionen mit über 3-facher Anreicherung werden hier als deutlich angereichert bezeichnet. Regionen mit geringerer, aber statistisch signifikanter Anreicherung, werden wiederum als signifikant angereichert bezeichnet. In unbehandelten HeLa Zellen sind nach dieser Einteilung das 3'-Ende von *MET* und die angrenzende intergenische Region (bis zu 6-fache Anreicherung), sowie das 5'-Ende von *ST7* (10-fache Anreicherung) hochangereichert in H4ac. Das 5'-Ende von *CAPZA2* erscheint dagegen relativ schwach (gegenüber *MET* und *ST7*) angereichert zu sein (bis zu 5-fach). Wie schon bezüglich H3ac sind auch im Falle von Histon H4ac die zentrale Region von *ST7* (Position 116.550.000), sowie drei Stellen in *ASZ1* deutlich acetyliert. ChIPOTle identifiziert weitere Stellen mit geringer, aber signifikanter Anreicherung (weniger als 3-fach) in der Mitte und am 3'-Ende von *CFTR*, an dem 3'-Ende von *CTTNBP2*, sowie an einigen anderen Stellen. In Calu-3 Zellen zeigt Histon H4ac eine hohe Anreicherung (mehr als 5-fach) in der 5'-Region von *ST7* (bis zu 8-fach), der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR* (bis zu 8-fach), sowie dem 3'-Ende von *CTTNBP2* (bis zu 5-fache Anreicherung). Eine deutliche Anreicherung (3-5 fach) findet sich an dem 3'-Ende von *MET* und der angrenzenden intergenischen Region, dem 5'-Ende von *CAPZA2*, einer Stelle in *ASZ1* und dem 5'-Ende von *CFTR*.

Verglichen mit unbehandelten HeLa Zellen zeigen Calu-3 Zellen bezüglich Histon H4ac eine höhere Anreicherung innerhalb des *MET*-Gens (Abb. 27, Spur 4, rot), während das 3'-Ende von *MET* und die angrenzende intergenische Region, sowie das 5'-Ende von *ST7* einen vergleichbaren Anreicherungsgrad haben. Die signifikant, aber schwächer angereicherten Regionen in *ST7* stimmen dagegen kaum überein, und speziell die erhöhte Anreicherung nahe der Exongruppe in *ST7* findet sich nur in HeLa Zellen. Im Falle von *CFTR* und Umgebung zeigen Calu-3 Zellen gegenüber HeLa Zellen eine signifikant erhöhte Anreicherung in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR* sowie an dem 5'-Ende von *CFTR*. Dagegen ist in HeLa Zellen die zentrale Stelle innerhalb des

*CFTR*-Gens nahe einer Exongruppe höher angereichert. Das Gen *CTTNBP2* zeigt eine signifikant erhöhte Acetylierung in Calu-3 Zellen an etlichen Stellen einschließlich des 3'-Ende und 5'-Endes. Wie bereits erwähnt werden *CFTR* und *CTTNBP2* in Calu-3, aber nicht in HeLa Zellen, exprimiert.

Um die verhältnismäßig zahlreichen Anreicherungsstellen von Histon H3ac und H4ac in unbehandelten HeLa Zellen zu vergleichen, sind die mittels ChIPOTle identifizierten Stellen für HeLa Zellen in Abbildung 26 a gegenübergestellt. Stellen mit signifikanter Anreicherung der acetylierten Isoformen gegenüber H3pan (schwarz) sind für unbehandelte HeLa Zellen in Spur 1 (Histon H3ac) und Spur 2 (Histon H4ac) dargestellt. Spur 3 zeigt die übereinstimmenden Stellen (rot). Etwa 90 % der von ChIPOTle identifizierten Stellen mit signifikant erhöhter Anreicherung von H4ac zeigen auch eine signifikante Anreicherung von H3ac. Speziell die höher angereicherten Stellen erscheinen, wie bereits beschrieben, in den meisten Fällen für Histon H3ac und H4ac übereinzustimmen. Übereinstimmend angereicherte Stellen befinden sich an dem 3'-Ende des *MET*-Gens und der angrenzenden intergenischen Region, sowie an den Promotoren von *CAPZA2* und *ST7*. Daneben befinden sich Stellen, die signifikant angereichert sind in H3ac und H4ac, direkt oberhalb von und teilweise überlapend mit Exonclustern, die ausgedehnten Introns folgen, innerhalb von *ST7*, *ASZ1* und *CFTR*. Desweiteren befinden sich Stellen, die in H3ac und H4ac angereichert sind, in den 3'-Enden von *ST7*, *WNT2*, *CFTR* und *CTTNBP2*, sowie an einigen anderen Stellen. Die Tatsache, dass ChIPOTle deutlich mehr Stellen identifiziert hat, die signifikant angereichert sind in H3ac (im Vergleich zu H4ac) ist wahrscheinlich zumindest zum Teil durch das bessere Signal zu Rauschen Verhältnis in diesem Datensatz zu erklären.

Auch bei Calu-3 Zellen zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Stellen, die eine signifikante Anreicherung von sowohl H3ac als auch H4ac besitzen (Abb. 27). Viele dieser Stellen stimmen mit Stellen überein, die auch in unbehandelten HeLa Zellen eine signifikante Anreicherung von H3ac und H4ac zeigen. Solche Stellen befinden sich an dem 3'-Ende des *MET*-Gens und der angrenzenden intergenischen Region, sowie an den Promotoren von *CAPZA2* und *ST7* (alle 3 Gene werden in beiden Zelllinien exprimiert).

Stellen, die nur in Calu-3 Zellen aber nicht in HeLa Zellen in H3ac und H4ac angereichert sind, befinden sich in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR*, an dem *CFTR*-Promotor, sowie am Promotor von *CTTNBP2* (Abb. 27). *CFTR* und *CTTNBP2* werden, wie beschrieben, nur in Calu-3 Zellen, aber nicht in HeLa Zellen exprimiert.

### 3.4.3 TSA-induzierte Änderungen der Histonacetylierung in HeLa Zellen

TSA-Behandlung führt in HeLa Zellen im Falle von Histon H3ac zu einem signifikanten Anstieg der Anreicherung an zahlreichen Stellen (Abb. 27, Spur 1, pink). Für eine grobe

Einteilung in hoch, deutlich und signifikant angereicherte Stellen wird hier dieselbe Definition verwendet, wie für unbehandelte HeLa Zellen. Stellen, die nach TSA-Behandlung die höchsten Anreicherungen zeigen, sind die 5'-Enden von *CAPZA2* (Anstieg von ~15-facher auf nahezu 30-fache Anreicherung) und *ST7* (Anstieg von ~25-facher auf ~35-fache Anreicherung). Diese Stellen zeigen schon vor TSA-Behandlung die höchste Anreicherung. Eine weitere Region mit einem deutlichen Anstieg der Anreicherung, und stellenweise hoher Anreicherung nach TSA-Behandlung, ist die 3'-Region von *MET*, sowie die angrenzende intergenische Region (Anstieg von ~5-facher auf bis zu 15-fache Anreicherung). Stellen mit einem deutlichen Anstieg der Anreicherung sind eine Region in *ST7* nahe der Exongruppe an Position 116.550.000 (bis 12-fache Anreicherung), drei Stellen in *ASZ1* (bis zu 10-fache Anreicherung), die 5'- und eine zentrale Region von *CFTR* nahe einer Exongruppe (bis zu 8-fache Anreicherung). TSA-Behandlung führt zu einem signifikantem, aber meist geringfügigeren Anstieg (Anreicherung unter 3) an zusätzlichen Stellen. Zahlreiche dieser Stellen finden sich in der Region von *MET* bis *ST7*. In dem *CFTR*-Gen erscheinen derartige Stellen, zusammen mit den bereits erwähnten höher acetylierten Stellen, in bestimmten Abschnitten des Gens konzentriert. Diese werden hier als Regionen A-D bezeichnet werden (Abb. 27, gelb unterlegt). Diese befinden sich am 5'-Ende (Region A), dem Zentrum (Region B), sowie am 3'-Ende des Gens (Regionen C und D). Region E befindet sich am 3'-Ende von *CTTNBP2*. Von der gesamten, von den DNA-Chips abgedeckten Region, machen Stellen mit einem signifikanten Anstieg der Anreicherung von H3ac nach TSA-Behandlung, etwa 23% aus. Speziell die Gene *MET*, *CAPZA2*, *ST7*, *ASZ1* und *CFTR* sind dabei dichter abgedeckt (etwa 30%).

Im Falle von Histon H4ac führt die TSA-Behandlung ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Anreicherung an mehreren Stellen (Abb. 27, Spur 3, pink). Die mit Abstand höchste Anreicherung zeigt wiederum die *ST7*-Promotorregion (20-fach). Stellen, die eine deutliche Anreicherung (weniger als 10-fach) erreichen, sind das 3'-Ende von *MET* sowie die angrenzende intergenische Region, die Promotorregion von *CAPZA2*, zwei Stellen in *ST7* nahe der Exongruppe, eine Stelle in der intergenischen Region von *ST7* und *WNT2*, eine Stelle in *ASZ1*, sowie jeweils eine Stelle in Region B und D in *CFTR*. ChIPOTie identifiziert zahlreiche zusätzliche Stellen mit geringerer, aber signifikanter Anreicherung. Insgesamt machen Stellen mit signifikantem Anstieg der Anreicherung von H4ac etwa 10% der gesamten, von den DNA-Chips abgedeckten Region, aus. Diese Stellen sind dabei in dem Abschnitt von *MET* bis *ST7*, sowie in *ASZ1* dichter als in *WNT2*, *CFTR* und *CTTNBP2*. Innerhalb von *CFTR* sind Stellen, an denen die Anreicherung von H4ac nach TSA-Behandlung signifikant zunimmt, dabei fast ausschließlich auf die Regionen A-D beschränkt.

Um die TSA-induzierten Veränderungen der Acetylierung von Histon H3 und Histon H4 gegenüber unbehandelten HeLa Zellen besser vergleichen zu können, sind die mittels

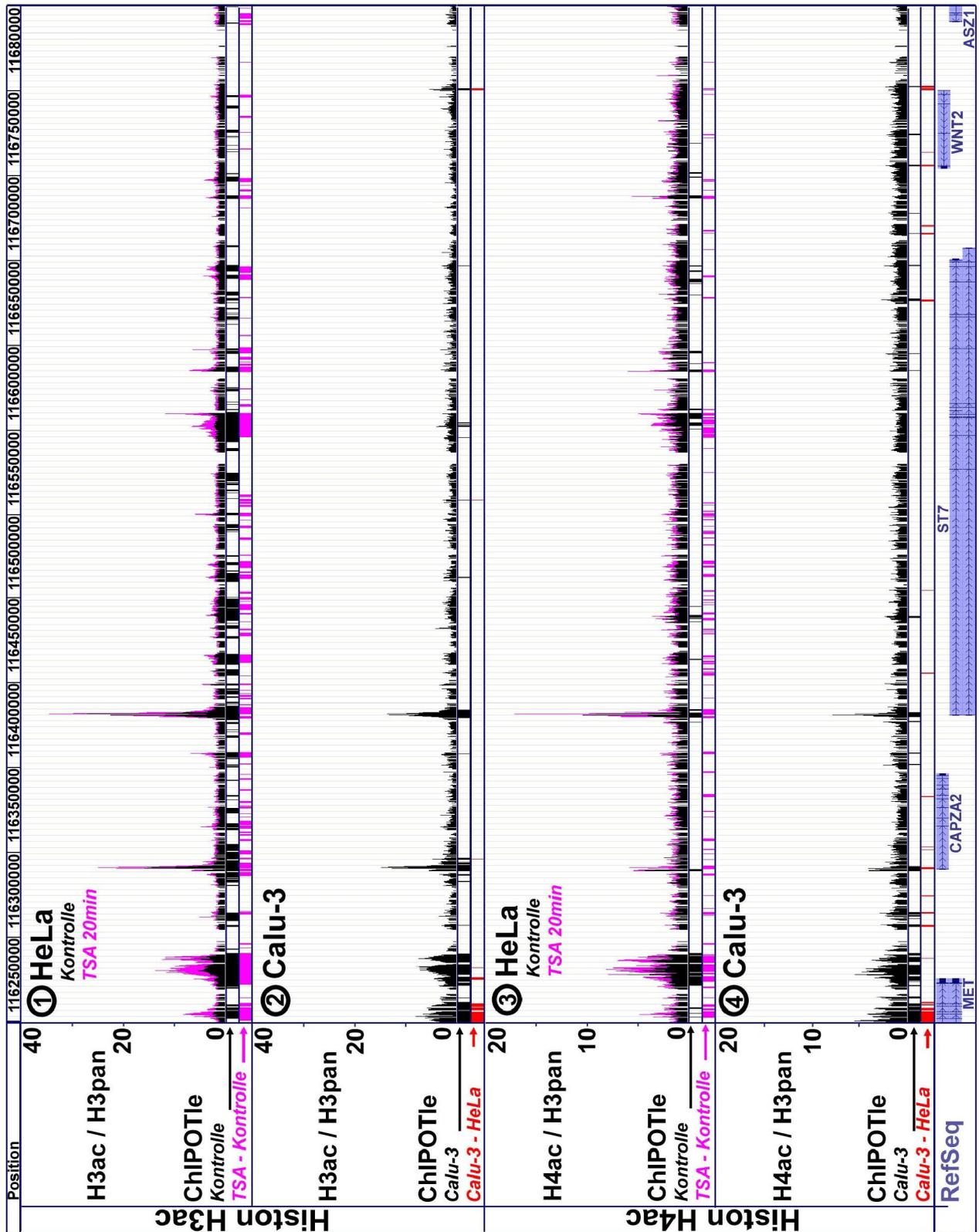
ChIPOTle identifizierten, nach TSA-Behandlung signifikant angereicherten Regionen, in Abbildung 28 a in Spur 4 und 5 (pink) gegenübergestellt. Überlappende Regionen sind in Spur 6 (rot) angezeigt. Insgesamt zeigen etwa 70% der Stellen mit TSA-induzierter Zunahme der Anreicherung von H4ac ebenfalls eine Zunahme der Acetylierung für Histon H3 (bei einer zufälligen Verteilung sind 23% erwartet).

Bezüglich der Repositionierung von *CFTR* sind speziell die Stellen von besonderem Interesse, die sowohl in Calu-3 Zellen, als auch in HeLa Zellen nach TSA-Behandlung höher acetyliert sind als in unbehandelten HeLa Zellen (*CFTR* befindet sich in Calu-3 Zellen und TSA-behandelten HeLa Zellen im Zellkerninneren, aber nicht in unbehandelten HeLa Zellen). Für einen direkten Vergleich sind Stellen, die nach TSA-Behandlung eine signifikante Zunahme der Anreicherung zeigen ("TSA-Kontrolle") und Stellen, die in Calu-3 Zellen signifikant höher angereichert sind als in unbehandelten HeLa Zellen ("Calu-HeLa"), in Abbildung 28 b gegenübergestellt. Wie bereits beschrieben, führt TSA-Behandlung im Falle von Histon H3ac zu einem signifikanten Anstieg der Anreicherung an relativ vielen Stellen (Abb. 28 b, Spur 1), wobei der Anreicherungsgrad in den meisten Fällen gering ist. Dagegen erscheinen Calu-3 Zellen in H3ac nur an verhältnismäßig wenigen Stellen höher angereichert zu sein als unbehandelte HeLa Zellen (Abb. 28 b, Spur 2, schwarz). Übereinstimmungen (Abb. 28 b, Spur 3, rot) ergeben sich für *CFTR* und angrenzende Regionen an einer intergenischen Position zwischen *ASZ1* und *CFTR*, innerhalb der Regionen A,B,C und E, sowie einer weiteren Position zwischen Region B und C. Besonders breite Gruppierungen übereinstimmender Positionen befinden sich in der Promotorregion von *CFTR* in Region A. Für Histon H4ac korrelieren die Stellen mit TSA-induzierter Zunahme der Anreicherung (Abb. 28 b, Spur 4, pink), wie beschrieben, in HeLa Zellen mit denen von Histon H3ac. Calu-3 Zellen zeigen für Histon H4ac an relativ wenigen Stellen eine höhere Anreicherung gegenüber HeLa Zellen. Diese finden sich in *CFTR* und Umgebung sowohl in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR*, sowie zusätzlich in den Regionen A,B und E (Abb. 28 b, Spur 5, schwarz). Übereinstimmungen (Spur 6, rot) ergeben sich nur an 4 Stellen. Diese sind in der intergenischen Region von *ASZ1* und *CFTR*, in der Region A (2 Stellen) und in Region E. Es bleiben insgesamt drei Stellen, die beide Bedingungen – eine höhere Acetylierung in Calu-3 Zellen als in unbehandelten HeLa Zellen und einen Anstieg nach TSA-Behandlung in HeLa Zellen – sowohl für Histon H3ac als auch H4ac - erfüllen. Diese sind zwei dicht benachbarte Stellen an dem 5'-Ende von *CFTR* (Region A) sowie eine an dem 3'-Ende von *CTTNBP2* (Region E). Diese Positionen sind in Abbildung 28 grün eingerahmt.

Diese Befunde sollten im Folgenden mittels qPCR überprüft werden. Dazu wurden Primerpaare für Stellen generiert, bei denen zumindestens eine acetylierte Histonisoform sowohl in unbehandelten Calu-3 Zellen, als auch in HeLa Zellen, nach TSA-Behandlung höher angereichert ist als in unbehandelten HeLa Zellen. Die Positionen dieser Primerpaare, sowie zusätzliche positive- und negative Kontrollen (siehe Abschnitt 3.5) sind

in Spur 7 (Abb. 28 b, blau) dargestellt. Stellen, an denen keine geeigneten Primerpaare gefunden werden konnten, sind in Spur 8 (Abb. 28 b, grau) dargestellt.

Die Stellen mit TSA-induzierter Histonhyperacetylierung wurden mit experimentell nachgewiesenen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren verglichen. Alle Transkriptionsfaktorbindestellen, die in HeLa Zellen in den Regionen A-E identifiziert wurden, sind in Abbildung 27 angezeigt (Pfeile, Quelle: <http://genome.ucsc.edu/>). Der c-Myc/Max- Komplex bindet dabei an einer Stelle in Region B und einer weiteren Stelle in Region C. Beide Stellen werden nach TSA-Behandlung hyperacetyliert. Der AP-1 Komplex bindet an mehreren Stellen mit TSA-induzierter Hyperacetylierung von H3, und an manchen Stellen von H4, in den Regionen A-E. Der Insulator CTCF bindet zusammen mit AP-1 an zwei der Stellen, die die deutlichsten Änderungen der Histon H3 Acetylierung nach TSA-Behandlung, und eine höhere Acetylierung in Calu-3 Zellen für Histon H3 und H4 zeigen (Region A und E). CTCF bindet weiteren Stellen in Region A und D. Die CTCF-Bindungsstelle an dem 5'-Ende von *CFTR*, sowie in der Region E, sind dabei die Stellen, an denen sowohl Histon H3 und H4 in Calu-3 und TSA-behandelten HeLa Zellen höher acetyliert sind, als in unbehandelten HeLa Zellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TSA-Behandlung zu einer deutlichen Zunahme der Histon H3 und H4 Acetylierung an mehreren definierten Stellen führt (Abb. 27, Spur 1 und 3). Die Stellen mit einer höheren Zunahme der Acetylierung nach TSA-Behandlung stimmen für Histon H3 und H4 weitestgehend überein (Abb. 28 a, Spur 3 und 6). Innerhalb des *CFTR*-Gens und Umgebung finden sich Stellen mit TSA-induzierter Zunahme der Histon H3 und H4 Acetylierung gehäuft in bestimmten Regionen (Abb. 27 und 28, Regionen A-E). Nahezu alle von den Stellen mit deutlich erhöhter Histonacetylierung nach TSA-Behandlung innerhalb des *CFTR*-Gens sind experimentell identifizierte Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (Abb. 27, Pfeile). Diese in HeLa Zellen identifizierten Regionen A-E zeigen auch in in Calu-3 Zellen eine signifikante Anreicherung von H3ac und H4ac (Abb. 27, Spur 2 und 4), mit den deutlichsten Übereinstimmungen in den Regionen A und E (Abb. 28b, Spur 3,6 und 7). Diese mittels DNA-Chips erzielten Resultate sollten im Folgenden mittels quantitativer PCR (qPCR) validiert werden.



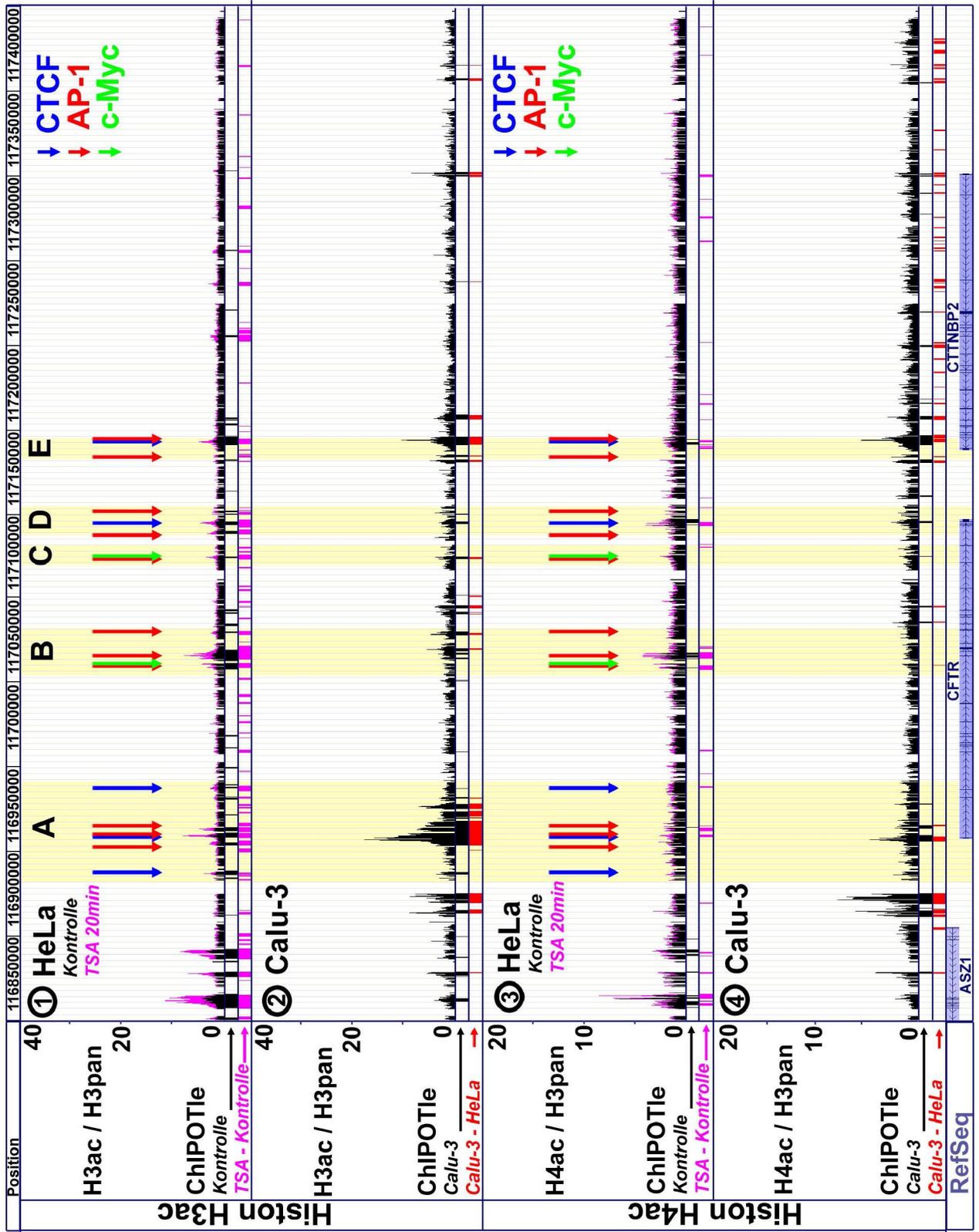


Abbildung 27: (Seiten 97 - 98): **Acetylierungsmuster von Histon H3 und H4 in der CFTR-Region**. Die Abbildung zeigt eine modifizierte UCSC-Genombrowser Darstellung der Datensätze der ChIP-chip Experimente, angeordnet entsprechend der genomischen Positionen der SONDENSEQUENZEN. Die auf den hier verwendeten DNA-Chips enthaltenen Sonden decken einen Teil des menschlichen Chromosoms 7 ab (Basenpaare: 116.200.000-117.400.000; verwendete Genomassemblierung: hg18/NCBI 36, März 2006). Die Abbildung ist unterteilt in Basenpaare 116.200.000-116.800.000 (Seite 97) und Basenpaare 116.800.000-117.400.000 (Seite 98). Die y-Achse zeigt die Skala für die gemessenen Anreicherungen von H3ac oder H4ac im Verhältnis zu H3pan. Für die bei dieser Auflösung zusammenfallende Messwerte (Auflösung: 4096 Pixel, Gesamtzahl Sonden: 9968, aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung also effektiv rund 2-4 Sonden) sind die Mittelwerte angezeigt. Spur 1 zeigt die überlagerten Datensätze für Histon H3ac/H3pan für unbehandelte (schwarz) und TSA-behandelte (pink) HeLa Zellen. Darunter sind die mittels ChIPOTIe identifizierten Stellen mit signifikanter Anreicherung von H3ac angezeigt. "Kontrolle" (schwarz) zeigt Stellen mit signifikanter Anreicherung von Histon H3ac gegenüber dem Hintergrund in unbehandelten HeLa Zellen, "TSA-Kontrolle" zeigt Stellen mit signifikanter Zunahme der Anreicherung von Histon H3ac nach TSA-Behandlung (gegenüber unbehandelten HeLa Zellen). Spur 2 zeigt die Anreicherungen von Histon H3ac gegenüber H3pan in unbehandelten Calu-3 Zellen (schwarz). Darunter angezeigt sind die mittels ChIPOTIe identifizierten Stellen mit signifikant erhöhter Anreicherung. "Calu-3" (schwarz) zeigt Stellen mit signifikant erhöhter Anreicherung von Histon H3ac gegenüber dem Hintergrund in Calu-3 Zellen. "Calu-3 – HeLa" (rot) zeigt Stellen, an denen Histon H3ac in Calu-3 Zellen signifikant höher angereichert ist als in unbehandelten HeLa Zellen. Spur 3 zeigt die überlagerten Datensätze für Histon H4ac/H3pan in HeLa Zellen vor (schwarz) und nach TSA-Behandlung (pink). Die ChIPOTIe-Datensätze unter Spur 3 zeigen die mittels ChIPOTIe identifizierten Stellen mit signifikant erhöhter Anreicherung von H4ac gegenüber dem Hintergrund. "Kontrolle" (schwarz) zeigt Stellen mit signifikanter Anreicherung von Histon H4ac in unbehandelten HeLa Zellen. "TSA-Kontrolle" (pink) zeigt Stellen mit signifikanter Zunahme der Anreicherung von Histon H4ac nach TSA-Behandlung (gegenüber unbehandelten HeLa Zellen). Spur 4 zeigt das Verhältnis von Histon H4ac/H3pan in Calu-3 Zellen (schwarz). Unter dieser Spur sind die mittels ChIPOTIe ermittelten Stellen mit signifikant gegenüber dem Hintergrund erhöhter Anreicherung angezeigt. "Calu-3" (schwarz) zeigt Stellen mit signifikant erhöhter Anreicherung von Histon H4ac in Calu-3 Zellen. "Calu-3 – HeLa" (rot) zeigt Stellen, an denen Histon H4ac in Calu-3 Zellen signifikant höher angereichert ist als in unbehandelten HeLa Zellen. Spur 5 zeigt die Positionen der Exons (dunkelblaue, vertikale Linien) und Introns der annotierten Gene (blaue Balken) an. Pfeile in den horizontalen Balken zeigen die Transkriptionsrichtung an. Quelle: National Center for Biotechnology Information Reference Sequence (NCBI RefSeq). Die Regionen A, B, C, D und E sind gelb unterlegt. Für diese Regionen (A-E) sind die publizierten Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren angegeben (Quelle: UCSC-Genombrowser). Angezeigt sind die Bindungsstellen von CTCF, sowie der Komplexe AP-1 und c-Myc/Max. Lücken in den Datensätzen entsprechen Regionen mit einem hohen Anteil an repetitiven Sequenzen, für die keine eindeutigen Sonden erstellt werden können.

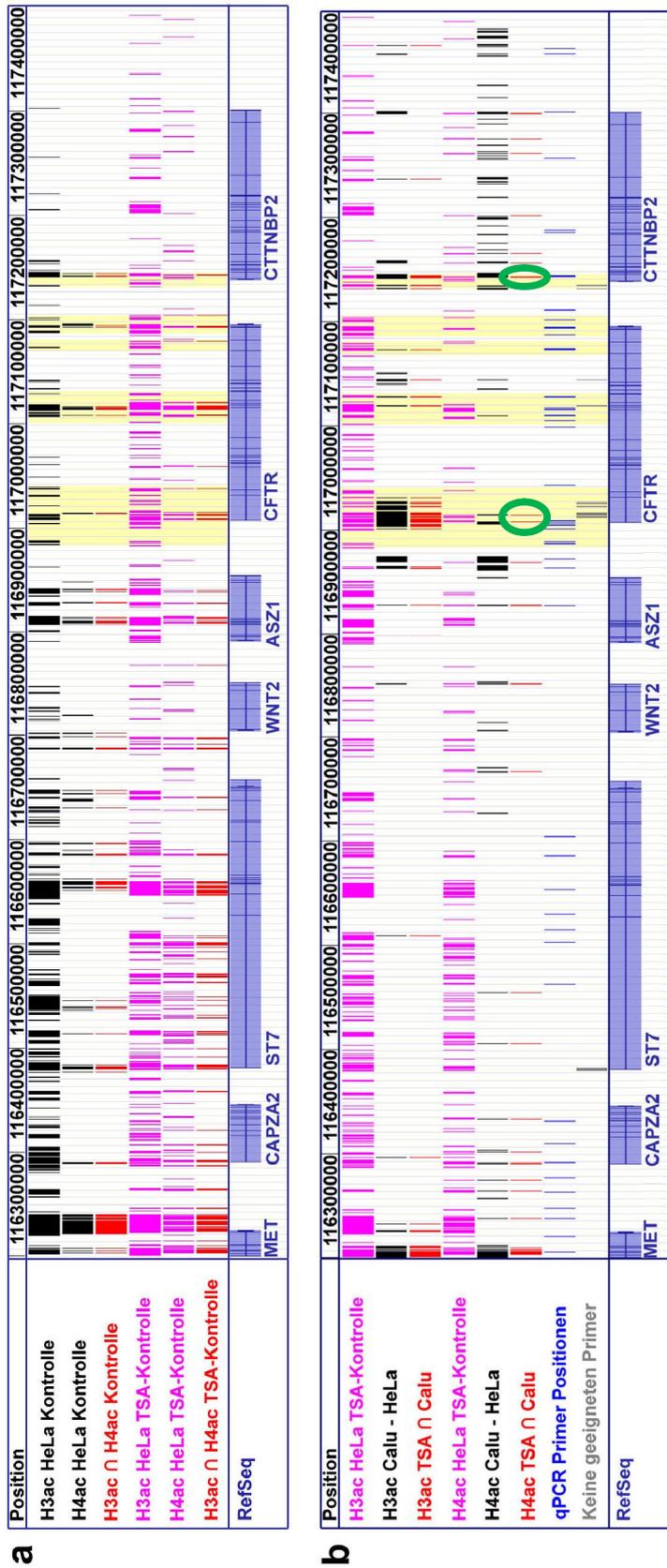


Abbildung 28: **Vergleich der Stellen mit signifikant erhöhter Anreicherung von H3ac und H4ac.** a) Spur 1 (schwarz) zeigt die Stellen mit signifikanter H3ac Anreicherung in unbehandelten HeLa Zellen. Spur 2 (schwarz) zeigt die Stellen mit signifikanter H4ac Anreicherung in unbehandelten HeLa Zellen. Spur 3 (rot) zeigt übereinstimmende Stellen aus Spur 1 und 2. Spur 4 (pink) zeigt Stellen mit einem signifikanten Anstieg der Histon H3 Acetylierung in HeLa Zellen nach TSA-Behandlung. Spur 5 (pink) zeigt Stellen mit einem signifikanten Anstieg der Histon H4 Acetylierung in HeLa Zellen nach TSA-Behandlung. Spur 6 (rot) zeigt übereinstimmende Stellen aus Spur 4 und 5. Spur 7 zeigt die annotierten Gene (Quelle: NCBI RefSeq). Blaue horizontale Balken zeigen die Position der Gene und vertikale Streifen die Positionen der Exons. Die Regionen A-E sind gelb unterlegt. b) Spur 1 (pink) zeigt die Stellen mit signifikanter Zunahme der Histon H3ac Anreicherung nach TSA-Behandlung in HeLa Zellen (identisch mit Spur 4 in a). Spur 2 (schwarz) zeigt übereinstimmende Stellen aus Spur 1 und Calu-3 Zellen signifikant höher ist als in unbehandelten HeLa Zellen. Spur 3 (rot) zeigt übereinstimmende Stellen aus Spur 1 und 2. Spur 4 (pink) zeigt Stellen mit einer Zunahme der Histon H4ac Anreicherung in HeLa Zellen nach TSA-Behandlung (identisch mit Spur 5 in a). Spur 5 (schwarz) zeigt die Stellen, an denen Histon H4ac in Calu-3 Zellen höher angereichert ist als in unbehandelten HeLa Zellen. Spur 6 (rot) zeigt die Stellen, an denen Spur 4 und 5 übereinstimmen. Positionen, an denen Spur 3 (H3ac) und Spur 6 (H4ac) übereinstimmen sind grün eingerahmt. Spur 7 zeigt Stellen, für die Primerpaare für quantitative PCR erstellt wurden. Spur 8 (grau) zeigt Positionen an denen keine geeigneten Primer gefunden wurden. Spur 8 zeigt die annotierten Gene (vergleiche a).

### 3.5 Validierung der ChIP-chip Daten mit ChIP-qPCR

Den ChIP-chip Experimenten zufolge führt die TSA-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der Anreicherung von H3ac und H4ac an mehreren Positionen innerhalb der *CFTR*-Region. Die Daten der ChIP-chip Experimente sollten nun mittels ChIP-qPCR überprüft werden. Für diese Experimente wurden Primerpaare für Positionen mit signifikanter Anreicherung von H3ac und H4ac in den Regionen A-E erstellt (Abb. 29 und 30). Zusätzlich sollten Stellen innerhalb einer publizierten Nup93 Bindungsstelle (Brown, *et al.*, 2008) überprüft werden (Positionen 116.994.989-117.002.487 und 117.004.741-117.008.284 im mittleren Abschnitt von *CFTR*). Die Bindung von Nup93 an Chromatin ist offenbar TSA-sensitiv, jedoch kann an dieser Stelle in den ChIP-chip Datensätzen weder eine Anreicherung von H3ac oder H4ac in unbehandelten Zellen, noch eine Zunahme der Anreicherung nach TSA-Behandlung an diesen Stellen identifiziert werden. Weitere Primerpaare wurden als generelle Kontrolle für die Übereinstimmung von DNA-Chip und qPCR-Daten eingesetzt. Die hochangereicherten intergenische Region in 3'-Richtung von *MET* und der Promotor von *CAPZA2* wurden als positive Kontrollen verwendet. Mehrere, den ChIP-chip Datensätzen zufolge im Falle von H3ac in HeLa Zellen nicht angereicherte Regionen, wurden als negative Kontrollen verwendet. Insgesamt wurden 63 Primerpaare für die ChIP-qPCR Analysen eingesetzt (Abb. 28 b, Spur 7 und Abb. 29/30 a).

Um die ChIP-chip Daten zu überprüfen, wurde die ChIP-WGA aus denselben Experimenten eingesetzt. Die ChIP-WGA aus Experimenten, die für die Hybridisierung kombiniert worden waren, wurden individuell mittels qPCR überprüft. Die Anreicherung von H3ac gegenüber H3pan wurde in unbehandelten und TSA-behandelten HeLa Zellen für fünf-, und in unbehandelten Calu-3 Zellen für drei unabhängige ChIP-Experimente bestimmt. Die Anreicherung von H4ac gegenüber H3pan wurde in unbehandelten und TSA-behandelten HeLa Zellen, sowie in unbehandelten Calu-3 Zellen für jeweils drei unabhängige ChIP-Experimente bestimmt.

TSA-induzierte Repositionierung wurde in den bisher untersuchten *CFTR*-nicht-exprimierenden Zelllinien HeLa, SH-EP N14 und HEK 293 beobachtet (Zink, *et al.*, 2004). Sollte TSA-induzierte Histonacetylierung an bestimmten Positionen die Positionierung von *CFTR* kontrollieren, so sollten diese Positionen in allen diesen Zelllinien die selben Änderungen nach TSA-Behandlung zeigen. Als weiterer Vergleich wurden (neben HeLa Zellen) zusätzlich HEK 293 Zellen mit ChIP-qPCR untersucht. In dieser Zelllinie wurden die Anreicherungen von H3ac und H4ac vor und nach 20 Minuten TSA-Behandlung in jeweils drei unabhängigen ChIP-qPCR Experimenten gemessen. Alle Ergebnisse der ChIP-qPCR Messungen für H3ac sind in Abbildung 29 und Tabelle 6 (Anhang) zusammengefasst. Die Ergebnisse für H4ac sind in Abbildung 28 und Tabelle 7 (Anhang) zusammengefasst. Abbildung 29 a und 30 a zeigen als Orientierung die mittels ChIP-chip

gemessenen Anreicherung der jeweiligen acetylierten Histonisoform (in unbehandelten und TSA-behandelten HeLa Zellen), sowie die Positionen der eingesetzten Primerpaare. Die Positionen 3 und 7 stellen die positiven Kontrollen (intergenische Region in 3'-Richtung von *MET* und *CAPZA2*-Promotor) und die Positionen 4, 6, 8, 19, 23, 27, 31-33\*, 40, und 51-52 die negativen Kontrollen (den CHIP-chip Messungen für H3ac in HeLa Zellen zufolge). Die Positionen 32-33 liegen dabei innerhalb der Nup93 Bindungsstelle.

### 3.5.1 H3ac in HeLa, HEK 293 und Calu-3 Zellen

Außerhalb der unmittelbaren *CFTR*-Region (entspricht Abb. 29/30 a, vergrößerte Region) zeigen die als positive Kontrollen eingesetzten Primerpaare sowohl für die intergenische Region nahe dem 3'-Ende von *MET*, als auch den Promotor von *CAPZA2*, (Abb. 29, Positionen 3 und 7) in allen drei Zelllinien eine hohe Anreicherung (7-45-fach) von H3ac (Abb. 30 b-d). Dabei erscheint die Anreicherung in HeLa Zellen für beide Positionen um etwa einen Faktor 2,5 höher zu sein als in Calu-3 und HEK 293 Zellen. Nach TSA-Behandlung zeigen diese Positionen einen Anstieg der Anreicherung von H3ac in HeLa und HEK 293 Zellen (auf 27-55-fach), der, mit Ausnahme des Promotors von *CAPZA2* in HEK 293 Zellen, signifikant ist (ungepaarter Welch's t-Test,  $p < 0,05$ ). Der Promotor von *CTTNBP2* (Position 61) erscheint in Calu-3 und HEK 293 Zellen in H3ac angereichert, mit einer 7-fachen Anreicherung in Calu-3 Zellen und einer mehr als 10-fachen Anreicherung in HEK 293 Zellen. Der Acetylierungsgrad des Promotors korreliert in diesen beiden Zelllinien mit der gemessenen transkriptionellen Aktivität des Gens, die etwa 0,3% der Expression von  $\beta$ -Actin in Calu-3 Zellen, beziehungsweise 7% in HEK 293 Zellen beträgt (Englmann, 2005). TSA-Behandlung führt zu einer hohen Zunahme der Anreicherung von H3ac auf eine 40-fache Anreicherung im Falle des *CTTNBP2*-Promotors in HEK 293 Zellen. In HeLa Zellen zeigt der Promotor von *CTTNBP2* dagegen, wie in den CHIP-chip Experimenten, keine Anreicherung für H3ac, und auch keinen Anstieg der Anreicherung nach TSA-Behandlung.

Innerhalb der unmittelbaren *CFTR*-Region (Abb. 29/30 a, vergrößerte Region) zeigen die qPCR-Messungen in unbehandelten HeLa Zellen die anhand der CHIP-chip Daten erwartete höchste Anreicherung für H3ac (mehr als 3-fach) in Region A (Abb. 29 d, Positionen 28-30) und Region B (Abb 29 d, Positionen 34-38). Eine mittlere Anreicherung (mehr als 1,3-fach) wird für H3ac an der CTCF-Bindungsstelle in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR* (Abb 29 d, Positionen 20-21), in Region B (Abb 29 d, Positionen 39-40), in Region C (Abb 29 d, Positionen 41-43), in Region D (Abb 29 d Positionen 44-50) und in Region E (Abb 29 d, Positionen 53-57) beobachtet. Alle diese Positionen zeigen in den qPCR Messungen eine höhere Anreicherung von H3ac als die

negativen Kontrollen an den Positionen 22-23, 27, 31-33 und 51-52 (Anreicherungen 0,9-1,1-fach).

TSA-Behandlung führt in HeLa Zellen zu einem signifikanten Anstieg (ungepaarter Welch's t-Test,  $p < 0,05$ ) der Anreicherung von H3ac an mehreren Positionen. Diese Positionen sind in Abbildung 29 d durch Sterne (\*) gekennzeichnet. Regionen mit einem Anstieg der Anreicherung von H3ac auf relative hohe Werte (mehr als 5-fach) finden sich wiederum in Region A (Abb 29 d, Positionen 29 und 30) und Region B (Abb 29 d, Positionen 34, 36-37). Schwächere, aber signifikante, Anstiege der Anreicherung von H3ac finden sich in Region C (Abb 29 d, Positionen 41-43), Region D (Abb 29 d, Positionen 48-50) sowie Region E (Abb 29 d, Position 53). Die qPCR Messungen bestätigen die ChIP-chip Experimente hinsichtlich der starken Anreicherung von H3ac in den Regionen A und B und dem geringeren Anstieg in den Regionen C und D. In Region E zeigt dagegen nur eine von fünf getesteten Positionen einen signifikanten Anstieg der Anreicherung von H3ac. Damit fällt der Anstieg in dieser Region schwächer aus als anhand der ChIP-chip Daten erwartet. Auch die Positionen 20 und 21 (Abb. 29 d) der CTCF-Bindungsstelle in der intergenischen Region, zeigen im Gegensatz zu den ChIP-chip Experimenten keinen signifikanten Anstieg der Anreicherung von H3ac. An keiner der negativen Kontrollen konnte ein signifikanter Anstieg der Anreicherung von H3ac nach TSA-Behandlung beobachtet werden. Dieses trifft auch für die Positionen in der Nup 93 Bindungsstelle (Abb 29 d, Positionen 32-33) zu, die folglich, entsprechend den ChIP-chip Daten, keinen Anstieg der Anreicherung für H3ac zeigen.

In Calu-3 Zellen zeigen die qPCR Experimente in der CFTR-Region, übereinstimmend mit den ChIP-chip Daten, eine hohe Anreicherung (mehr als 3-fach) für H3ac in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR* (Abb 29 b, Position 18), in der Promotorregion von *CFTR* (Abb 29 b, Positionen 27-30), sowie in der Region E (Abb 29 b, Positionen 54-56). Regionen mit vergleichsweise geringfügig erhöhter Anreicherung (zwischen 1,3- und 3-fach) sind die Region B (Abb 29 b, Positionen 34-35, 38-39), Region C (Abb 29 b, Positionen 41-44) und Region D (Abb 29 b, Positionen 46-47). Calu-3 Zellen zeigen in der *CFTR*-Region nur an den Positionen 33,37,40 und 49 eine geringe Anreicherung von H3ac (weniger als 1,2-fach).

In HEK 293 Zellen zeigt keine der Positionen in der *CFTR*-Region eine hohe Anreicherung von H3ac (mehr als 3-fach). Die Positionen mit den relativ höchsten Anreicherungen (mehr als 2-fach) befinden sich relativ gleichmäßig in Region A (Abb 29 c, Position 28), Region B (Abb 29 c, Position 34), Region C (Abb 29 c, Positionen 40 und 44), sowie in Region E (Abb 29 c, Positionen 50 und 53). Die Positionen 22 und 32 (sowie 2,6,59 und 62 außerhalb der *CFTR*-Region) zeigen übereinstimmend mit HeLa Zellen keine Anreicherung von H3ac. Einige der in HeLa Zellen negativen Kontrollen zeigen allerdings in HEK 293 Zellen eine moderat erhöhte Anreicherung von H3ac. Dazu gehören die Positionen 27, 31 und 52 (weniger als 1,5-fache Anreicherung). Dieses legt folglich einige

zelltypspezifische Unterschiede in den Histon H3 Acetylierungsmustern nahe. TSA-Behandlung führt zu einer signifikanten (ungepaarter Welch's t-Test,  $p < 0,05$ ) Zunahme der Anreicherung von H3ac in Region A (Abb 29 c, Positionen 30), Region B (Abb 29 c, Positionen 33, 34, 36-38,40), Region C (Abb 29 c, Position 43), Region D (Abb 29 c, Positionen 47-48) und in Region E (Abb 29 c, Position 54). 7 der insgesamt 11 identifizierten Stellen mit signifikanter, TSA-induzierter Zunahme der Anreicherung von H3ac in HEK 293 Zellen zeigen ebenfalls einen signifikanten Anstieg in HeLa Zellen (Abb. 29 c, d, gelb / rot unterlegt).

Die für die Positionierung des *CFTR*-Gens entscheidenden Positionen sollten in Calu-3 Zellen höher in H3ac angereichert sein, als in unbehandelten HeLa und HEK 293 Zellen. Positionen, die diese erste Bedingung für H3ac erfüllen, sind in Abbildung 29 b mit Pfeilspitzen markiert. Diese Positionen befinden sich in der intergenischen Region zwischen *ASZ1* und *CFTR*, an dem 5'-Ende von *CFTR* (Region A), sowie innerhalb des 3'-Endes von *CTTNBP2* (Region E). In HeLa und HEK 293 Zellen sollte TSA-Behandlung an den für die Repositionierung kritischen Positionen zu einem Anstieg der Anreicherung von H3ac führen. Die einzige Position, die diese Bedingung für H3ac in beiden Zelllinien erfüllt, ist Position 30, die CTCF-Bindungsstelle nahe der *CFTR*-Promotorregion (Abb 29, rot unterlegt). Diese Position stellt auch der Analyse der CHIP-chip Messungen zufolge einen der Kandidaten sowohl für H3ac als auch H4ac (Abb. 30 b, grün eingerahmt).

### 3.5.2 H4ac in HeLa, HEK 293 und Calu-3 Zellen

Außerhalb der unmittelbaren *CFTR*-Region (Abb. 29/30 a, vergrößerte Region) zeigt die positive Kontrolle für Histon H4ac in der intergenischen Region nahe dem 3'-Ende von *MET* (Abb. 30 b,c,d, Position 3) in allen drei Zelllinien eine hohe Anreicherung von H4ac (mehr als 8-fach). Der *CAPZA2*-Promotor (Abb. 30 b, c, d, Position 7) zeigt übereinstimmend mit den CHIP-chip Daten in den drei Zelllinien eine schwächere Anreicherung von H4ac (3-5-fach) als die intergenischen Region in 3'-Richtung von *MET*. In HeLa und HEK 293 Zellen zeigen diese beide Positionen (3 und 7) nach TSA-Behandlung einen Anstieg der Anreicherung von H4ac, der mit Ausnahme der Position 3 (Abb. 30 d) in HeLa Zellen, signifikant ist (ungepaarter Welch's t-Test,  $p < 0,05$ ). Der Promotor von *CTTNBP2* (Position 61) zeigt bei H4ac eine 8-fache Anreicherung in Calu-3 Zellen und einen noch höhere 12-fache Anreicherung in HEK 293 Zellen. Der Acetylierungsgrad dieses Promotors korreliert damit auch für H4 mit der Expressionsrate des Gens in diesen Zelllinien. Nach TSA-Behandlung zeigt der *CTTNBP2*-Promotor in

HEK 293 Zellen einen signifikanten Anstieg der Anreicherung von H4ac (von 12-fach auf 30-fach).

In der unmittelbaren *CFTR*-Region (Abb.30 a, oberes Bild) zeigen HeLa Zellen die höchste Anreicherungen von H4ac (mehr als 8-fach) in Region B (Abb. 30 d, Position 34), sowie in Region D (Abb. 30 d, Position 49). Die Regionen B und D zeigen auch die höchste Anreicherung für H4ac in den ChIP-chip Datensätzen. Eine erhöhte Anreicherung von H4ac (mehr als 2-fach) findet sich sowohl an der intergenischen CTCF-Bindungsstelle (Abb. 30 d, Position 21), der Region A (Abb. 30 d, Positionen 24-25), an weiteren Stellen in Region B (Abb. 30 d, Position 35), in Region C (Abb. 30 d, Positionen 41-44), an weiteren Stellen in Region D (Abb. 30 d, Positionen 47-48 und 50) und Region E (Abb. 30 d, Positionen 53-57). Dagegen zeigen die den ChIP-chip Daten zufolge gering angereicherten Stellen an den Positionen 22-23, 31-33 und 51-52 (Abb. 30 a) geringere Anreicherungen (zwischen 0,9-1,8-fach) für H4ac in der qPCR (Abb. 30 d). Ein signifikanter Anstieg der Anreicherung von H4ac kann nach TSA-Behandlung für Histon H4ac in der Promotorregion von *CFTR* (Abb. 30 d, Position 26), in Region B (Abb. 30, Position 34), in Region D (Abb. 30 d, Position 46), sowie in der Region E (Abb. 30 d, Position 56) gemessen werden. Der Anstieg in Region B an Position 34 übertrifft dabei die Anstiege an den anderen Positionen bei weitem, mit einer etwa 20-fachen Anreicherung von H4ac nach TSA-Behandlung gegenüber weniger als einer 8-fachen an den anderen Positionen in der Umgebung von *CFTR*. Die qPCR-Messungen zeigen damit denselben hohen Anstieg der Anreicherung von H4ac in Region B wie die ChIP-chip Daten, während der Anstieg speziell in Region D vergleichsweise gering ausfällt. Bezüglich Nup93 kann auch für H4ac kein Anstieg der Anreicherung innerhalb der Nup93 Bindungsstelle nach TSA-Behandlung gemessen werden.

In Calu-3 Zellen bestätigen die qPCR-Messungen die starke Anreicherung von H4ac (mehr als 5-fach) in der intergenischen Region von *ASZ1* und *CFTR* (Abb. 30 b, Positionen 18-20), dem 5'-Ende von *CFTR* (Abb. 30 b, Positionen 27-29), sowie in Region E (Abb. 30 b, Positionen 53-57). Eine schwächere Anreicherung (mehr als 2-fach) kann an zusätzlichen Stellen in Region A (Abb. 30 b, Positionen 23-26), Region B (Abb. 30 b, Positionen 35-38), Region C (Abb. 30 b, Positionen 41-43) und Region D (Abb. 30 b, Positionen 45-50) beobachtet werden. Die Positionen 30-32, 34 und 39-40 zeigen eine leicht erhöhte Anreicherung (unter 2-fach) von H4ac gegenüber den einzigen nicht in H4ac angereicherten Positionen 33 und 44 (0,9-1,1-fach).

In HEK 293 Zellen können in der *CFTR*-Region, verglichen mit HeLa Zellen nur sehr geringfügige Anreicherungen von H4ac gemessen werden. Eine Klassifizierung in angereichert und nicht angereichert ist daher nur bedingt möglich. Positionen mit den höchsten Anreicherungen für H4ac (etwa 2-fach) finden sich in Region A (Abb. 30 c, Position 28), Region B (Abb 30 c, Position 34), Region D (Abb 30 c, Position 44), sowie Region E (Abb. 30 c, Positionen 50 und 53). Diese Positionen sind in HEK 293 auch für

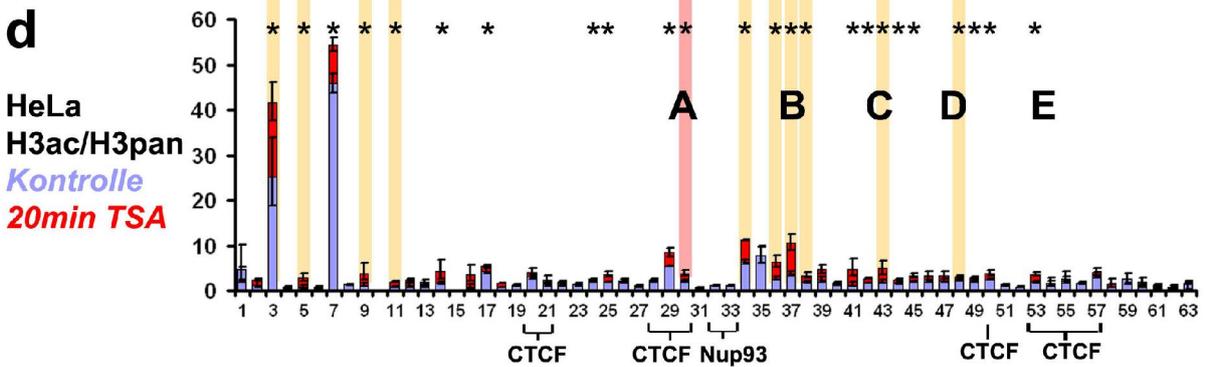
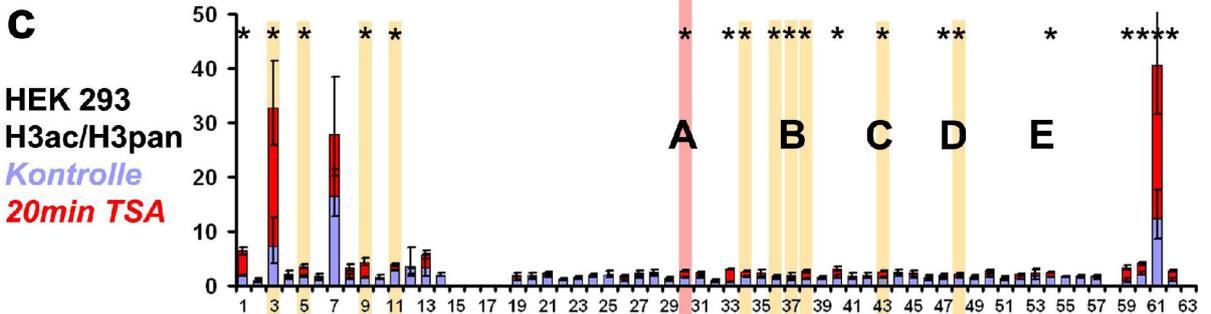
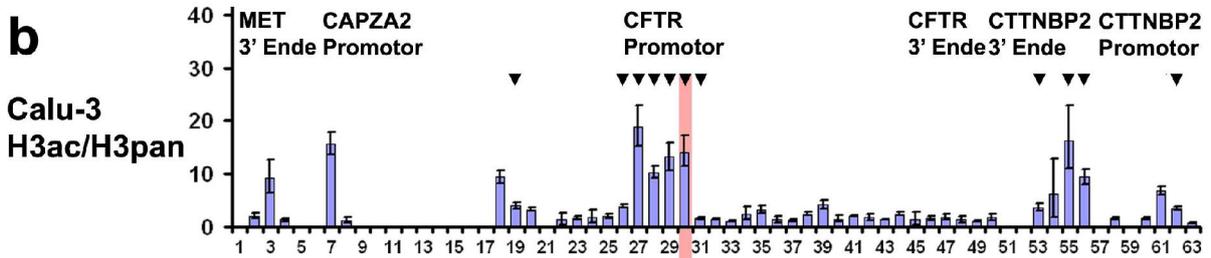
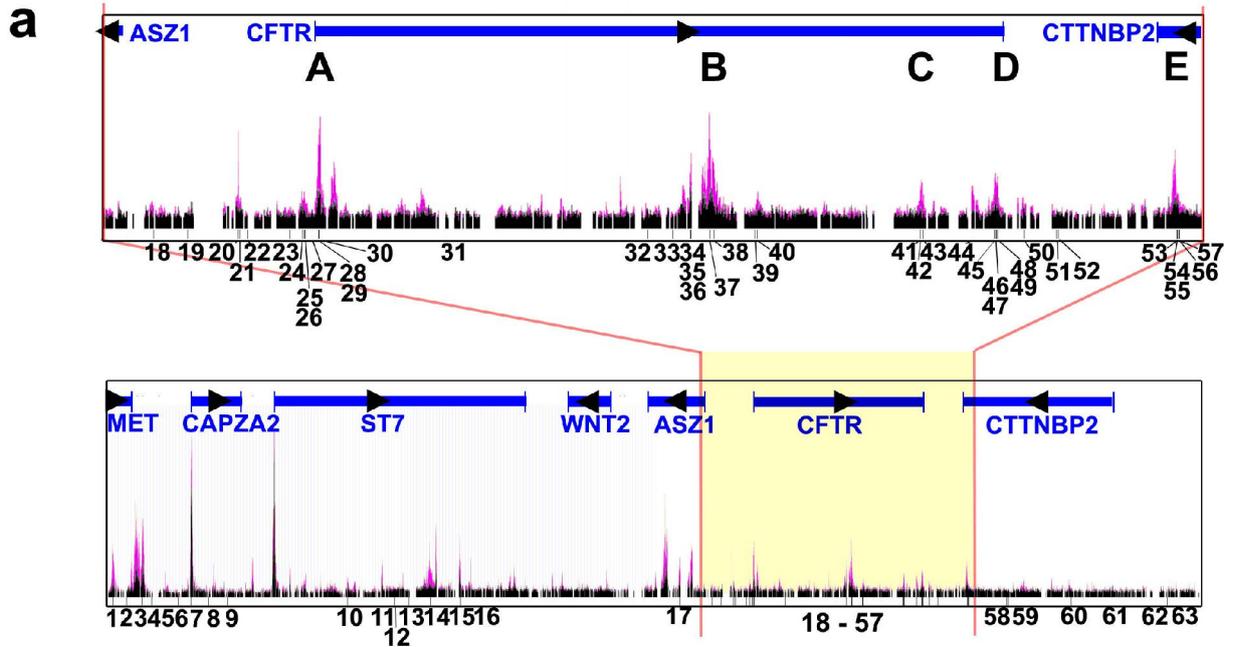


Abbildung 29 (Seite 106): **Anreicherungen von H3ac in den ChIP-qPCR Messungen in Calu-3, HEK 293 und HeLa Zellen** a) Zeigt als Orientierung die ChIP-chip Datensätze für H3ac in HeLa Zellen (Unbehandelte Zellen: schwarz, TSA-behandelte Zellen: pink ) und die Positionen der annotierten RefSeq Gene an. Die CFTR-Region ist vergrößert dargestellt (obere Spur). Nummerierte vertikale Balken unter den ChIP-chip Daten zeigen die Positionen der qPCR-Primerpaare. Die Primerpaare sind entsprechend ihrer genomischen Anordnung nummeriert. Zahlen direkt untereinander zeigen Positionen, die aufgrund ihrer Nähe in dieser Darstellung nicht individuell aufgelöst werden können. Buchstaben A-E kennzeichnen die Regionen A-E aus Abbildung 27. Die Diagramme in b,c und d zeigen die relativen Anreicherungen von H3ac ChIP-WGA gegenüber H3pan ChIP-WGA an den jeweiligen Positionen. Die Indices für die X-Achse geben die Nummern der Primerpaare entsprechend Schaubild a an. b) Gezeigt sind die Anreicherungen für H3ac in unbehandelten Calu-3 Zellen (dunkelblau). c) Gezeigt sind die Anreicherungen für H3ac in HEK 293 Zellen, vor (dunkelblau, Vordergrund) und nach TSA-Behandlung über 20 min (rot, Hintergrund). d) Gezeigt sind die Anreicherungen für h3ac in HeLa Zellen, vor (dunkelblau, Vordergrund) und nach TSA-Behandlung über 20 min (rot, Hintergrund). Pfeilspitzen in b markieren Positionen mit einer signifikant höheren Anreicherung von H3ac in Calu-3 Zellen als in unbehandelten HeLa und HEK 293 Zellen. Sterne (\*) in c und d markieren Positionen mit einer signifikanten Zunahme der Anreicherung von H3ac nach TSA-Behandlung. Positionen mit einer übereinstimmenden Zunahme der Anreicherung von H3ac in HeLa und HEK 293 Zellen in der CFTR-Region (a, obere Spur) sind gelb unterlegt. Die Position mit einer Zunahme der Anreicherung von H3ac sowohl in HeLa als auch HEK 293 Zellen und einer höheren Anreicherung für H3ac in Calu-3 Zellen als in unbehandelten HeLa und HEK 293 Zellen ist rot unterlegt.

H3ac relativ höher angereichert. Positionen ohne Anreicherungen (0,9-1,1-fach) sind 22, 23, 29, 37, und 57 (sowie 2, 59 und 62 in der gesamten von den DNA-ChIPs abgedeckten Region). Nach TSA-Behandlung konnte kein signifikanter Anstieg der Anreicherungen von H4ac in HEK 293 Zellen gemessen werden. Der für H3ac beschriebene Vergleich mit HeLa und Calu-3 Zellen zum Auffinden von für die Genpositionierung bedeutsamen Stellen liefert daher keine Kandidaten im Falle von H4ac.

Um zu überprüfen, ob der hier für die statistische Auswertung angewendete t-Test zulässig ist, wurde die Verteilung der gemessenen  $C_t$ -Werte in einem Q-Q-Plot mit der Normalverteilung verglichen (Abb. 31). Die empirisch beobachtete Verteilung entspricht einer Normalverteilung mit schweren Enden und rechtfertigt damit den t-Test. Zusammenfassend bestätigt der Vergleich von HeLa und Calu-3 Zellen, dass die Regionen A und E in Calu-3 Zellen im Falle von H3ac und H4ac höher angereichert sind als in unbehandelten HeLa Zellen. Die Regionen A und E erfahren in HeLa Zellen nach TSA-Behandlung im Falle von H3ac, jedoch nicht im Falle von H4ac (außer für Region E), eine Zunahme der Anreicherung. Der weitere Vergleich von HEK 293 Zellen mit HeLa Zellen zeigt eine übereinstimmende Zunahme der Anreicherung von H3ac in Region A an Position 30, jedoch keine übereinstimmende Position für H4ac. Damit deutet dieser

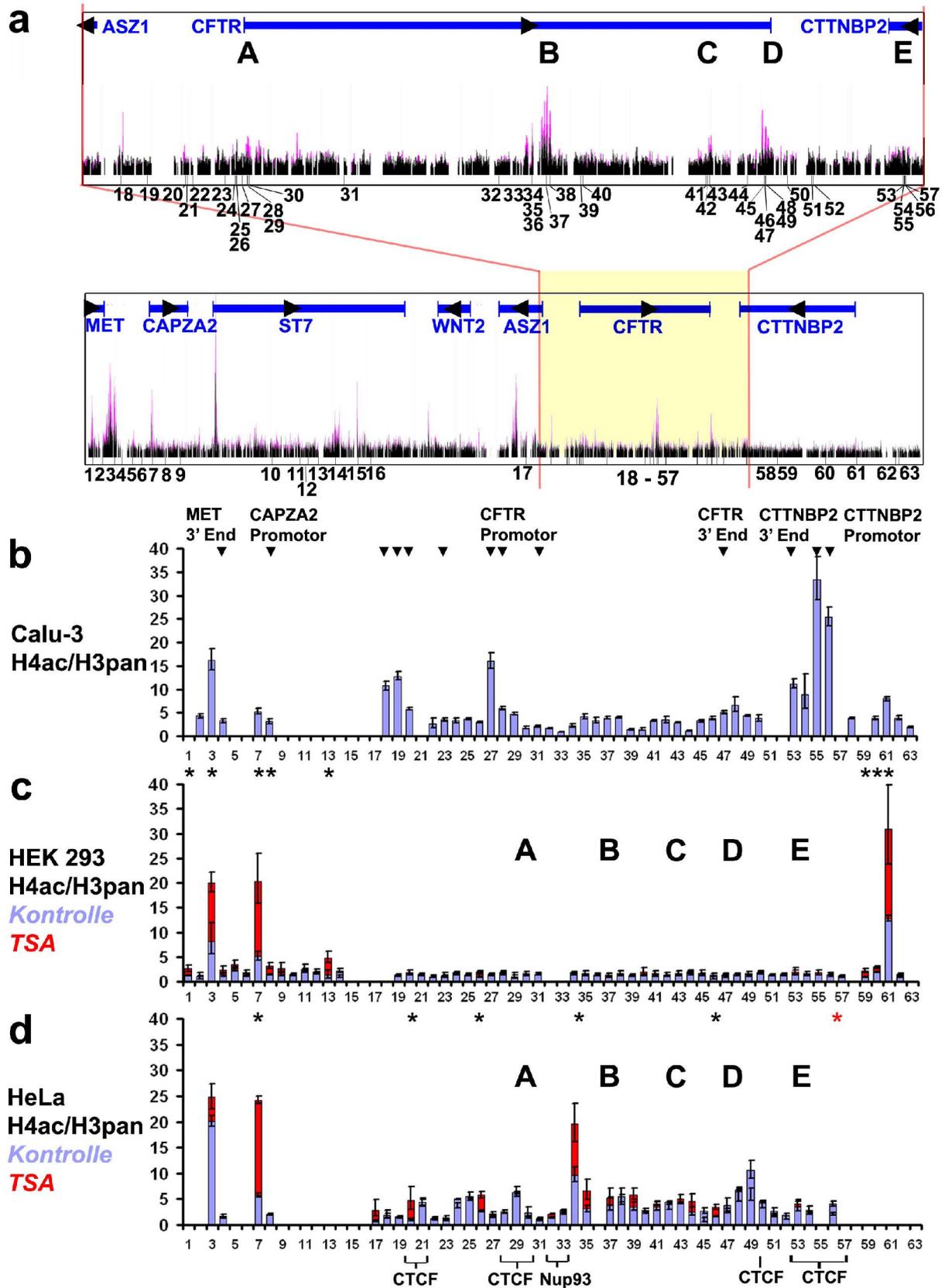


Abbildung 30 (Seite 108): **Anreicherungen von H4ac in den ChIP-qPCR Messungen in Calu-3, HEK 293 und HeLa Zellen** a) Zeigt als Referenz die ChIP-chip Datensätze für H4ac in HeLa Zellen (Unbehandelte Zellen: schwarz, TSA-behandelte Zellen: pink ) und die Positionen der annotierten RefSeq Gene an. Die *CFTR*-Region ist vergrößert dargestellt (obere Spur). Nummerierte vertikale Balken unter den ChIP-chip Daten zeigen die Positionen der qPCR-Primerpaare. Die Primerpaare sind entsprechend ihrer genomischen Anordnung nummeriert. Zahlen direkt untereinander zeigen Positionen, die aufgrund ihrer Nähe in dieser Darstellung nicht individuell aufgelöst werden können. Buchstaben A-E kennzeichnen die Regionen A-E aus Abbildung 27. Die Diagramme in b,c und d zeigen die relativen Anreicherungen von H4ac ChIP-WGA gegenüber H3pan ChIP-WGA an den jeweiligen Positionen. Die Indices für die X-Achse geben die Nummern der Primerpaare entsprechend Schaubild a an. b) Gezeigt sind die Anreicherungen für H4ac in unbehandelte Calu-3 Zellen (dunkelblau). c) Gezeigt sind die Anreicherungen für H4ac in HEK 293 Zellen, vor (dunkelblau, Vordergrund) und nach TSA-Behandlung über 20 min (rot, Hintergrund). d) Gezeigt sind die Anreicherungen für H4ac in HeLa Zellen, vor (dunkelblau, Vordergrund) und nach TSA-Behandlung über 20 min (rot, Hintergrund). Pfeilspitzen in b markieren Positionen mit einer signifikant höheren Anreicherung von H4ac in Calu-3 Zellen als in unbehandelten HeLa und HEK 293 Zellen an. Sterne (\*) in c und d markieren Positionen mit einer signifikanten Zunahme der Anreicherung von H4ac nach TSA-Behandlung. Der rote Stern markiert eine signifikante Abnahme der Anreicherung von H4ac.

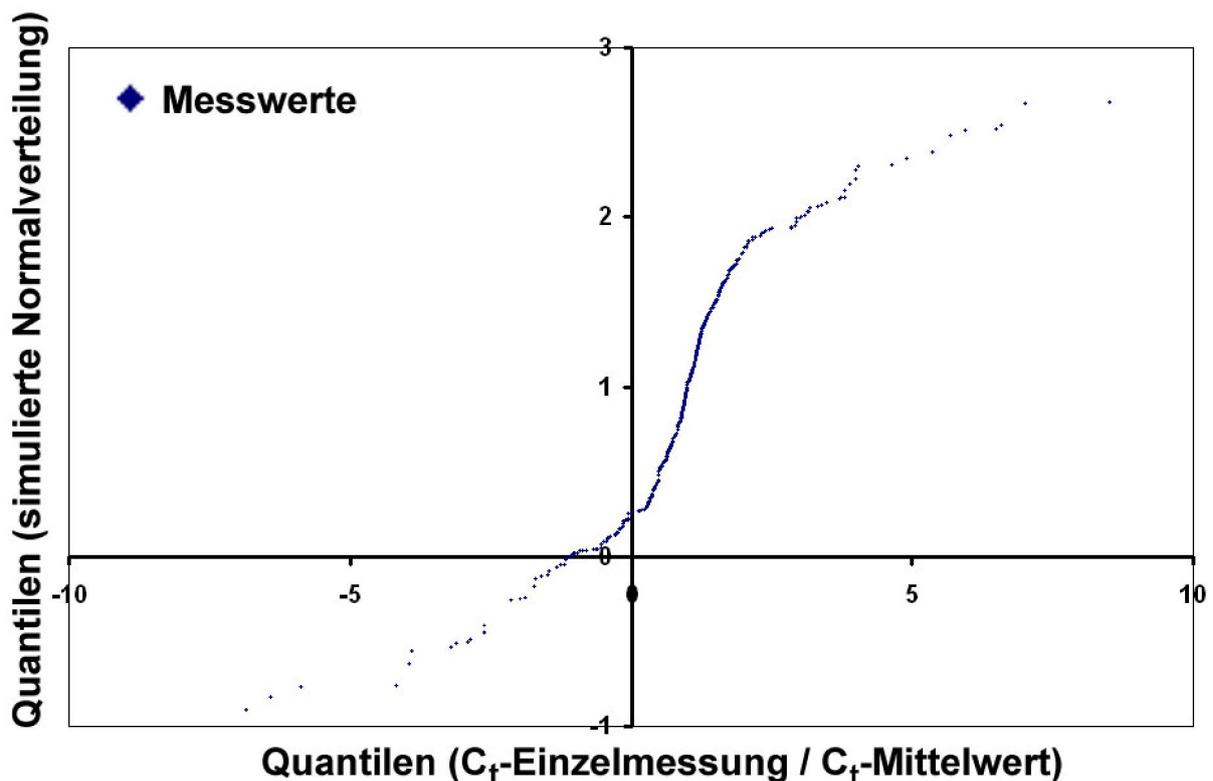


Abbildung 31 (Seite 109): **Quantile-Quantile-Plot der Stichprobenverteilung der  $C_t$ -Werte gegen die Normalverteilung.** Die in unabhängigen Experimenten zu derselben Bedingung (Zeitpunkt, Histonisoform, Primerpaar) gemessenen  $C_t$ -Werte wurden durch den mittleren  $C_t$ -Wert des jeweiligen Experimentes geteilt. Die ermittelten Verhältnisse (blaue Rauten) wurden entsprechend ihrer Größe sortiert und gegen die gleiche Anzahl von normalverteilten Zufallszahlen (Mittelwert = 1, Streuung = 0.08), ebenfalls sortiert nach ihrer Größe, geplottet. Der Plot wurde anhand von insgesamt 449 Einzelmessungen erstellt.

Vergleich der Acetylierungsmuster in Calu-3, HeLa und HEK 293 Zellen im Falle von H3ac am Ehesten auf eine mögliche Beteiligung der CTCF-Bindungsstelle (Position 30, 5'-Ende von *CFTR*) an der Positionierung von *CFTR* hin. Eine mögliche Bedeutung von CTCF auf die Positionierung von *CFTR* sollte daher im Folgenden untersucht werden.

### 3.6 RNA-Interferenz vermittelte Reduktion der CTCF-Konzentration

Die CTCF-Bindungsstelle in der *CFTR*-Promotorregion stellt im Hinblick auf die hier untersuchten Histonacetylierungsmuster den besten Kandidaten für eine Kontrollregion der Positionierung des *CFTR*-Gens dar. Eine mögliche Bedeutung von CTCF für die Positionierung von *CFTR* sollte nun in einem funktionellen Test untersucht werden. Dazu sollte die Menge an verfügbarem CTCF durch RNA-Interferenz vermittelten "Knockdown" erniedrigt werden. Anschließend sollte die Auswirkung dieses Knockdowns auf die Positionierung von *CFTR*, beziehungsweise auf die TSA-induzierte Repositionierung des Gens, untersucht werden. Der Knockdown von *CTCF* ist trotz seiner Bedeutung als Transkriptionsfaktor und Insulator möglich (Mishiro, *et al.*, 2009; Parelho, *et al.*, 2008). Die bis hierhin untersuchten HeLa und HEK 293 Zelllinien eignen sich gut für RNA-Interferenzexperimente, da eine hohe Transfektionseffizienz erreicht werden kann. Für den Knockdown von *CTCF* wurde ein Cocktail aus drei verschiedenen chemisch modifizierten siRNA (Stealth RNAi, Invitrogen, Carlsbad, USA) eingesetzt. Für den Nachweis von CTCF wurde ein Antikörper von Cell Signaling Technologies (Danvers, USA) eingesetzt. Der Antikörper wurde mit Peptiden, die dem C-terminalen Teil von CTCF entsprechen, generiert (<http://www.cellsignal.com/pdf/2899.pdf>).

Der Knockdown von *CTCF* erwies sich als vergleichsweise ineffizient. Durch Einsatz der höchsten empfohlenen Dosis (nach Angaben des Herstellers Invitrogen, Carlsbad, USA) an siRNA und 4 Tagen Inkubation konnte der densitometrischen Auswertung von Western-Blot Messungen zufolge eine Reduktion der CTCF-Menge auf etwa 25-30% (Western-Blot und Immunfärbung, Abb. 32) erreicht werden. Für 2D-Erosionsanalysen ist eine derartige Reduktion normalerweise ausreichend (Englmann, 2005; Rybakina, 2006), um einen Effekt des Knockdowns messen zu können. Da der Knockdown zu keiner offensichtlichen Änderung der Chromatinstruktur führte, wurde die Positionierung von *CFTR* anschließend in unbehandelten-, sowie in mit unspezifischer und *CTCF*-spezifischer siRNA behandelten

HeLa Zellen mittels 2D-FISH in jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Zusätzlich wurden Zellen nach dem Knockdown von *CTCF* eine Stunde mit TSA behandelt und die Positionierung von *CFTR* in drei unabhängigen 2D-FISH Experimenten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den 2D-FISH Zeitserien (Abschnitt 3.2).

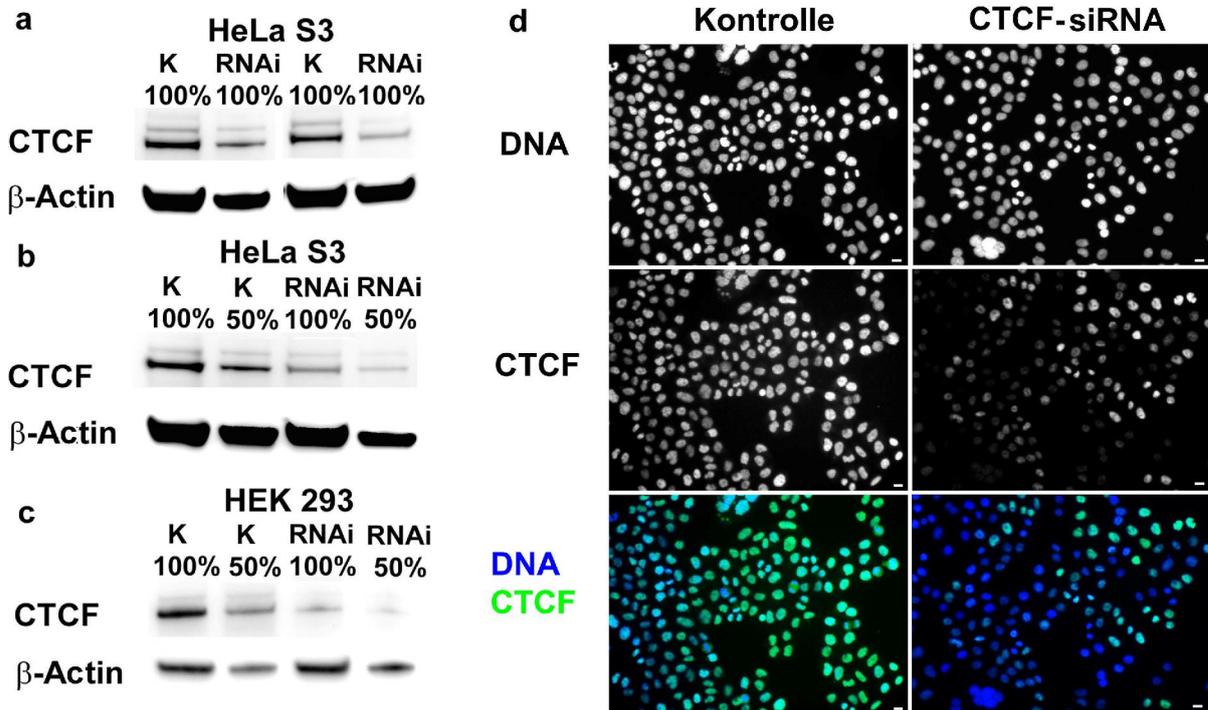


Abbildung 32: **Immunologischer Nachweis der Auswirkung der CTCF-siRNA Behandlung auf die CTCF-Menge.** In a/b/c) Lysate von unbehandelten Zellen (K) und Lysate von mit *CTCF*-spezifischer siRNA behandelten Zellen (RNAi). Prozentwerte geben die relativen Mengen an aufgetragenem Protein an. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem *CTCF*-spezifischen Antikörper (Doppelbande bei 110 kDa). Ein  $\beta$ -Actin spezifischer Antikörper diente als Ladungskontrolle (Bande bei 43 kDa). a) Zwei unabhängige Behandlungen von HeLa Zellen mit *CTCF* siRNA. b,c) Um den dynamischen Bereich der verwendeten Antikörper zu testen, wurden verschiedene Mengen an Gesamtprotein aufgetragen. b) *CTCF*-Knockdown in HeLa Zellen c) *CTCF*-Knockdown in HEK 293 Zellen. d) Nachweis der Auswirkung der *CTCF*-siRNA Behandlung auf die *CTCF*-Menge mittels Immunfluoreszenz. Unbehandelte- (Kontrolle) und mit *CTCF*-siRNA behandelte HeLa Zellen wurden fixiert und *CTCF* durch Immunfärbung nachgewiesen (mittlere Reihe). DNA wurde mit DAPI gegengefärbt (obere Reihe). Die untere Reihe zeigt die Überlagerung der DNA und *CTCF*-Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 10  $\mu$ m

Behandlung von HeLa Zellen mit unspezifischer siRNA bewirkt der Erosionsanalyse (Tabelle 8, Abb. 33) zufolge keine Veränderung der *CFTR*-Positionierung gegenüber Kontrollzellen. Dagegen bewirkte der *CTCF*-Knockdown eine signifikante Repositionierung

des *CFTR*-Gens in das Zellkerninnere (ungepaarter t-Test,  $p=0,002$ ). Die Messungen nach der Doppelbehandlung mit *CTCF*-siRNA (4 Tage) und TSA (eine Stunde) zeigt deutlich abweichende Ergebnisse zwischen den Experimenten, so dass sich anhand der Datenlage keine statistisch begründete Aussage treffen lässt.

Behandlung	Kontrolle		Unspezifische siRNA		CTCF spezifische siRNA		CTCF spezifische siRNA +TSA (1hr)	
	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
Schale								
1	47,4	3,1	44,8	1,6	34,9	1,6	40,3	4,4
2	25,8	2,4	25,1	2,3	26,2	2,4	29,8	1,6
3	14,0	0,5	16,2	1,3	20,6	1,7	13,9	2,4
4	8,8	2,1	10,1	1,1	13,8	1,5	11,1	1,4
5	3,9	1,2	3,8	1,0	4,5	1,0	5,0	0,6

**Tabelle 8: Auswirkungen eines *CTCF*-Knockdowns auf die Positionierung des *CFTR*-Gens.** Die Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der FISH-Signale (*CFTR*) in unbehandelten HeLa Zellen (Kontrolle), nach Behandlung mit unspezifischer- und *CTCF*-spezifischer siRNA sowie nach Behandlung mit *CTCF*-spezifischer siRNA in Kombination mit TSA-Behandlung (10 ng/ml, eine Stunde). Angegeben sind die über 2D-Erosionsanalyse erhaltenen Mittelwerte (MW) der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der FISH-Signale (in %) innerhalb von fünf äquidistanten konzentrischen Schalen (Schale 1: Peripherie, Schale 5: Zentrum) sowie die Standardfehler (SE) von jeweils drei unabhängigen Experimenten (mit jeweils drei technischen Replikaten).

Aufgrund der möglichen Bedeutung von *CTCF* für die Integrität des Chromatins stellte sich jedoch die Frage, ob der Knockdown von *CTCF* die Positionierung von individuellen Genen beeinflusst oder ob seine Auswirkungen global alle Gene betreffen. Dieses sollte anhand von zwei Beispielen untersucht werden. Als Vergleich zu den Messungen mit *CFTR* sollte der Effekt des *CTCF*-Knockdowns auf die Positionierung der an *CFTR* angrenzenden Gene *ASZ1* und *CTTNBP2* untersucht werden (Abbildung 34). Als FISH-Sonden für die Gene *ASZ1* und *CTTNBP2* wurden PCR-Produkte eingesetzt, die von Dr. Andreas Englmann generiert und als FISH-Sonden getestet worden waren (Englmann, 2005a, Zink, *et al.*, 2004). Die Positionierung von *ASZ1* und *CTTNBP2* wurde sowohl in HeLa als auch HEK 293 Zellen vor und nach dem Knockdown von *CTCF* in jeweils zwei unabhängigen 2D-FISH Experimenten bestimmt. Dass der Knockdown von *CTCF* zu einer Repositionierung von *CFTR* führt, war bereits für HeLa Zellen gezeigt. Zusätzlich wurde die Positionierung von *CFTR* in HEK 293 Zellen in Zellen vor und nach dem *CTCF*-Knockdown in jeweils zwei unabhängigen 2D-FISH Experimenten bestimmt (Abb. 35).

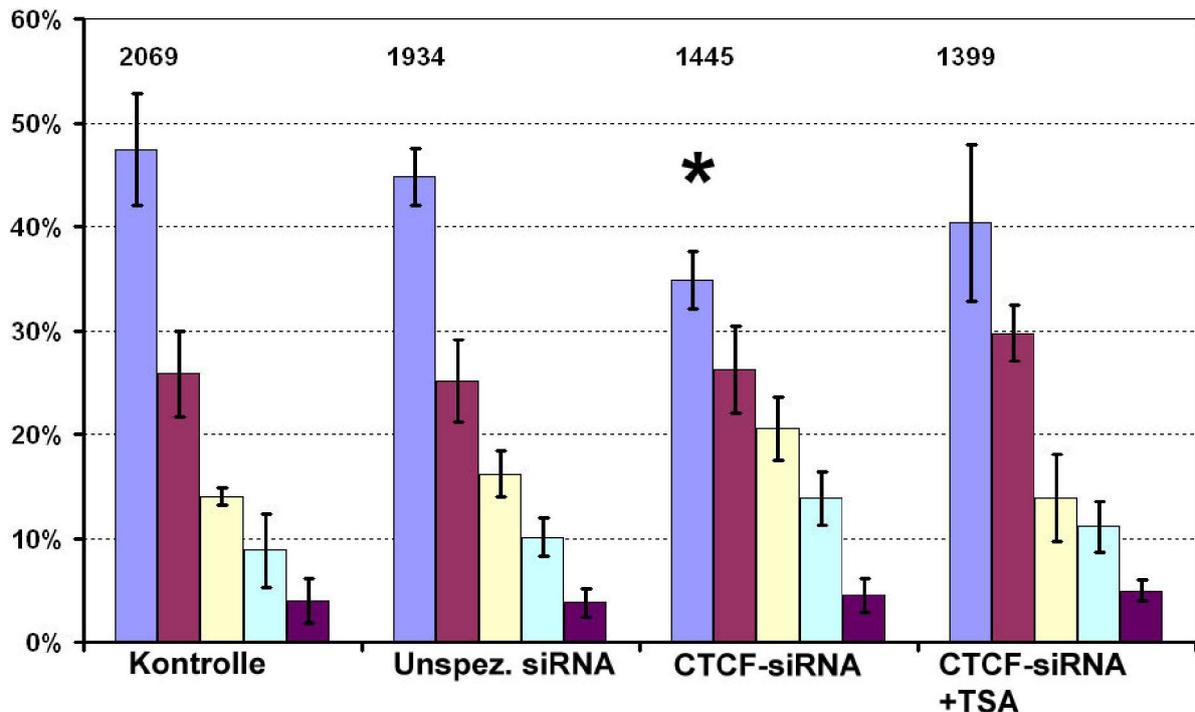


Abbildung 33: **Auswirkungen von Behandlungen mit unspezifischer und *CTCF*-spezifischer siRNA sowie einer simultanen Behandlung mit TSA auf die Positionierung von *CFTR*.** Grafische Darstellung der Daten aus Tabelle 8. Angezeigt sind die Mittelwerte (+/-SE) der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der *CFTR*-Signale mit Dunkelblau: Peripherie (Schale 1), Purpur: Zentrum (Schale 5). Zahlen über den Balken geben die Anzahl der ausgewerteten FISH-Signale an. Der Stern (\*) kennzeichnet eine signifikante Änderung der Verteilung gegenüber der Kontrolle.

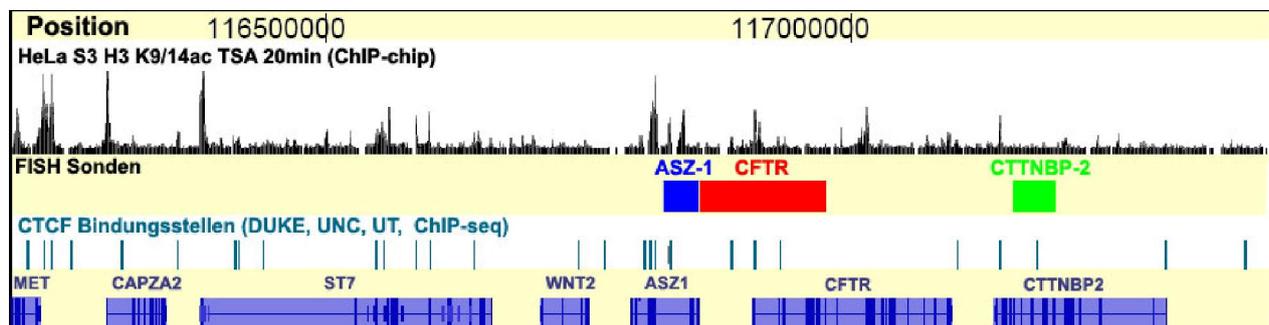


Abbildung 34: **Positionen der FISH-Sonden für *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2* in Relation zu Histonacetylierungsmustern und CTCF-Bindungsstellen.** Spur 1 (gelb unterlegt): die Position in bp auf Chromosom 7 (Genomassemblierung NCBI 36/hg18). Spur 2: ChIP-chip Datensatz der Histon H3 Acetylierungsmuster nach 20min TSA-Behandlung (vergleiche Abb. 28). Spur 3 (gelb unterlegt): Positionen der FISH-Sonden für *ASZ1* (blau), *CFTR* (rot) und *CTTNBP2* (grün). Spur 4: CTCF-Bindungsstellen. Die Daten dieser Bahn sind dem UCSC-Genombrowser entnommen. Spur

5 (gelb unterlegt): Annotierte Gene. Blaue horizontale Balken zeigen die Position der Gene und dunkelblaue vertikale Balken die Positionen der Exons an (Quelle: Refseq)

Zelllinie / Behandlung Gen	HeLa Kontrolle ASZ1		HeLa Kontrolle CFTR		HeLa Kontrolle CTTNBP2	
Schale	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
1	40,1	2,1	47,4	3,1	39,6	2,0
2	29,0	1,1	25,8	2,4	29,4	0,5
3	16,6	1,3	14,0	0,5	15,5	3,6
4	9,5	0,9	8,8	2,1	8,2	2,5
5	4,7	1,1	3,9	1,2	7,3	1,2
Zelllinie / Behandlung Gen	HeLa CTCF-Kd ASZ1		HeLa CTCF-Kd CFTR		HeLa CTCF-Kd CTTNBP2	
Schale	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
1	39,8	1,5	34,9	1,6	40,8	3,6
2	27,3	1,3	26,2	2,4	33,3	1,8
3	16,5	2,7	20,6	1,7	14,2	1,0
4	12,6	1,1	13,8	1,5	8,8	0,8
5	3,7	0,3	4,5	1,0	2,9	1,0
Zelllinie / Behandlung Gen	HEK 293 Kontrolle ASZ1		HEK 293 Kontrolle CFTR		HEK 293 Kontrolle CTTNBP2	
Schale	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
1	42,6	3,2	50,9	1,4	33,1	4,2
2	31,2	1,2	22,7	2,6	35,7	1,5
3	14,4	1,1	16,0	1,6	18,5	2,9
4	8,3	2,4	7,9	1,1	11,1	1,5
5	3,5	0,7	2,5	0,3	1,5	0,3
Zelllinie / Behandlung Gen	HEK 293 CTCF-Kd ASZ1		HEK 293 CTCF-Kd CFTR		HEK 293 CTCF-Kd CTTNBP2	
Schale	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
1	39,6	1,5	41,7	2,0	31,9	4,1
2	31,9	0,8	30,2	1,5	35,7	0,5
3	17,5	0,5	17,6	3,6	18,5	3,4
4	7,8	1,4	9,2	1,6	11,1	1,4
5	2,8	0,5	1,3	0,3	1,5	0,6

Tabelle 9: **Auswirkungen des CTCF-Knockdowns auf die Positionierung der Gene ASZ1, CFTR und CTTNBP2 in HeLa und HEK 293 Zellen.** Angegeben sind die über 2D-Erosionsanalyse erhaltenen Mittelwerte (MW) der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der FISH-Signale (in %) innerhalb von fünf äquidistanten konzentrischen Schalen (Schale 1: Peripherie, Schale 5: Zentrum), sowie die Standardfehler (SE) von jeweils zwei bis drei unabhängigen Experimenten (mit

jeweils drei technischen Replikaten) zu den angegebenen Zelllinien, Genen und Behandlungen mit Kontrolle: unbehandelte Zellen, *CTCF*-Kd: *CTCF*-Knockdown. Die Messwerte für *CFTR* in HeLa Zellen (hellgrau unterlegt) entsprechen denen in Tab. 6.

Sowohl in HeLa als auch HEK 293 Zellen führt der *CTCF*-Knockdown zu einer signifikanten Repositionierung des *CFTR*-Gens in das Zellkerninnere (Abb. 34 a, c, ungepaarter t-Test für HEK 293 Zellen,  $p=0,02$ ). Dagegen konnte weder in HeLa noch in HEK 293 Zellen für *ASZ1* oder für *CTTNBP2* eine signifikante Veränderung der Positionierung nach dem Knockdown von *CTCF* nachgewiesen werden. *CTTNBP2* wird in HEK 293 Zellen exprimiert und befindet sich in diesen Zellen weiter im Zellkerninneren als in HeLa Zellen, in denen es transkriptionell inaktiv ist. Interessanterweise bleibt diese differentielle Genpositionierung von dem *CTCF*-Knockdown unbeeinflusst. Der *CTCF*-Knockdown verhält sich damit analog zu der TSA-induzierten Repositionierung. Wie Dr. Kandasamy zeigen konnte, führt auch die TSA-Behandlung zu einer Repositionierung des *CFTR*-Gens, ohne die radiale Position von *ASZ1* und *CTTNBP2* signifikant zu beeinflussen (Abb. 35 b, d).

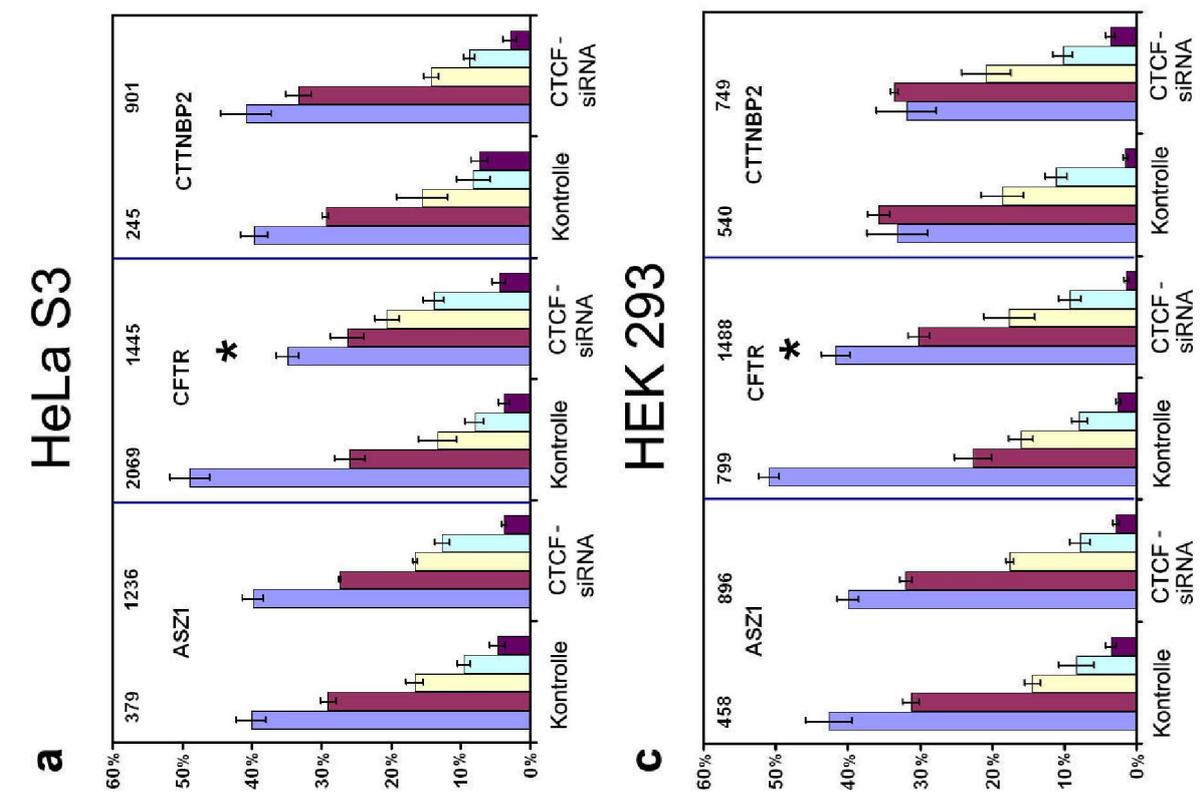
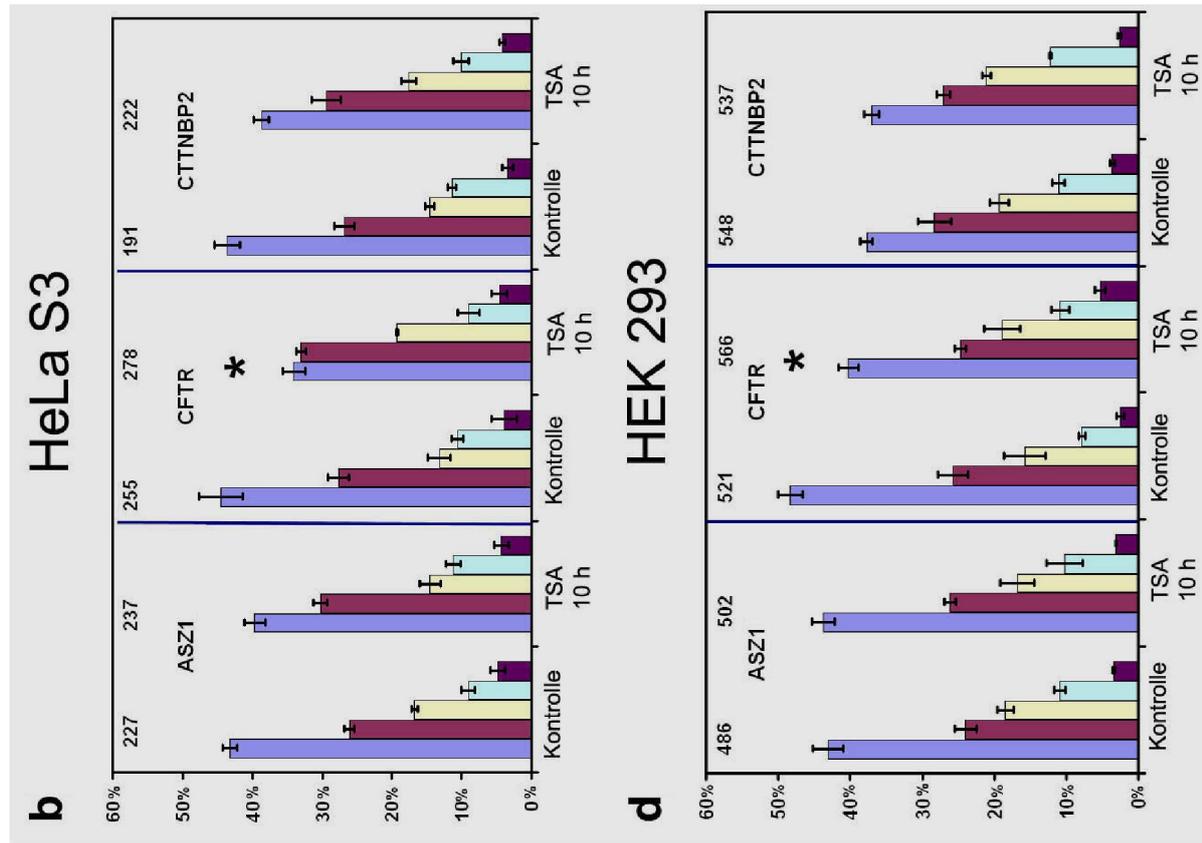


Abbildung 35 (Seite 116): **Vergleich der Auswirkungen des Knockdowns von *CTCF* mit denen der TSA-Behandlung, bezogen auf die Positionierung der Gene *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2*.**

a) und c) grafische Darstellung der Daten aus Tabelle 9. Gezeigt sind die Verteilungen der Gene *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2* in unbehandelten Zellen (Kontrolle) und nach dem Knockdown von *CTCF* (*CTCF*-siRNA) in a) HeLa Zellen und b) in HEK 293 Zellen. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte (+/-SE) der Verteilungen mit Dunkelblau: 1. Schale; Purpur: 5. Schale. Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der ausgewerteten FISH-Signale an. Analog sind die Auswirkungen der TSA-Behandlung (10 Stunden) auf die Positionierung derselben Gene in b) HeLa Zellen und d) in HEK 293 Zellen gezeigt. Die Messungen mit TSA stammen von Dr. Karthikeyan Kandasamy (grau unterlegt).

### 3.7 Test auf unspezifische Effekte der siRNA-Knockdowns auf die Genpositionierung

In vorherigen Arbeiten (Englmann, 2005, Rybakina, 2006) war gezeigt worden, dass RNA-Interferenz vermittelte Reduktion der Zellkernlaminakomponenten Lamin A/C, Lamina-associated Polypeptide 2 (*LAP2*) und Emerin sowie der Kernporenkomponente Translocated Promotor Region (*TPR*) zu einer signifikanten Repositionierung des *CFTR*-Gens in das Zellkerninnere führt. Derselbe Effekt war in dieser Arbeit für den Knockdown von *CTCF* gezeigt worden. Da alle bisher getesteten Behandlungen mit spezifischen siRNA zu einer Repositionierung von *CFTR* führten (auch wenn die Auswahl nicht willkürlich getroffen worden war), stellte sich die Frage, ob die beobachteten Effekte der Knockdowns in der Tat spezifisch oder eine generelle Folge eines funktionalen Knockdowns sind. Als eine weitere negative Kontrolle neben der bisher verwendeten unspezifischen siRNA sollte daher zusätzlich ein funktionaler Knockdown eines mutmaßlich nicht an der Relokalisation von *CFTR* beteiligten Zellkernproteins durchgeführt werden.

Diese Experimente wurden zusammen mit Herrn Mathieu Chevalier (Praktikum an der LMU-München) unter meiner Anleitung durchgeführt. HeLa Zellen wurden mit unspezifischer sowie spezifischer siRNA gegen promyelocytic leukemia (*PML*), Lamin A/C (*LMNA*) und *LAP2* (*Silencer*<sup>®</sup> Select siRNA, Ambion, Carlsbad, USA) behandelt. Der Erfolg der Knockdowns wurde mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz überprüft (Abb. 36). Für den Nachweis wurden Antikörper verwendet, die bereits in vorherigen Arbeiten getestet worden waren (*PML* (Sadoni, *et al.*, 2004) *LAP2*, Lamin A/C (Englmann, 2005)). Mindestens zwei Drittel der Zellen zeigten den Immunfärbungen zufolge eine deutliche Reduktion der Menge des jeweiligen Zielproteins. Anschließend wurde die Position von *CFTR* mittels 2D- Erosionsanalyse in jeweils zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Für eine bessere Vergleichbarkeit dieser Experimente mit den vorhergegangenen Knockdowns wurden die Zellen mit einer abgewandelten Methode (beschrieben in

Englmann, 2005) fixiert. Für die Methanol/ Eisessigfixierung wurden die Zellen zuerst mit Trypsin detachiert und durch Zugabe von Fixativ in Suspension fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen auf Objektträger aufgetropft. Die FISH erfolgte dann wie ab Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben.

Der Erosionsanalyse (Tabelle 10, Abb. 37) zufolge zeigt *CFTR* eine etwa gleiche Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der äußersten Schale in unbehandelten, mit unspezifischer- sowie *PML*-spezifischer siRNA behandelten Zellen (39,6%, 39,3% und 38,5%). Dagegen führt der Knockdown der Kernlaminaproteine *LAP2* und *Lamin A/C* zu einer geringeren mittleren Aufenthaltswahrscheinlichkeit (32,5% bzw. 29%) in der äußersten Schale. Die Verteilung von *CFTR* nach dem *LMNA*-Knockdown unterscheidet sich signifikant von der Verteilung in unbehandelten Zellen (ungepaarter t-Test, p-Wert <0,01). Dagegen konnte nach dem Knockdown von *LAP2* keine signifikante Repositionierung von *CFTR* nachgewiesen werden. Sowohl der niedrigere Mittelwert als auch die zuvor durchgeführten Messungen mit 2D- und 3D-Erosionsanalyse (Englmann, 2005) legen im Falle von *LAP2* nahe, dass der Umfang der hier durchgeführten Untersuchung nicht groß genug war, um die Veränderungen der Positionierung von *CFTR*

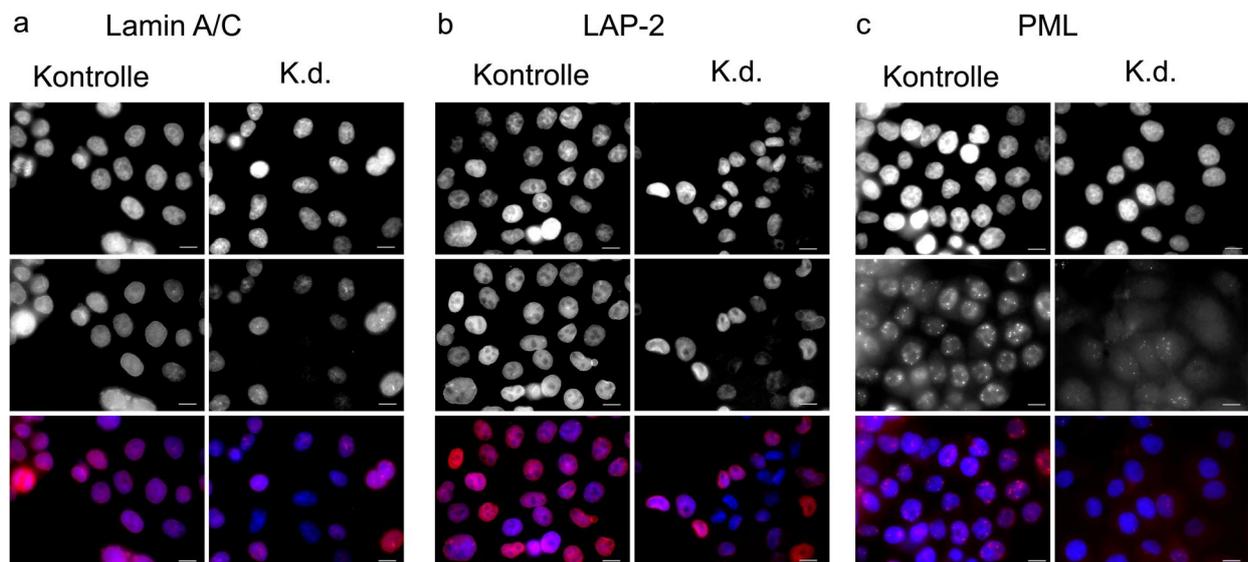


Abbildung 36: **Immunfluoreszenter Nachweis der Knockdowns von *LMNA A/C* (a), *LAP2* (b) und *PML* (c).** Kontrolle: unbehandelte HeLa Zellen, K.d.: HeLa Zellen nach Behandlung mit spezifischer siRNA. Die obere Reihe zeigt die DNA-Gegenfärbung mit DAPI, die mittlere Reihe zeigt den immunologischen Nachweis des jeweiligen Zielproteins und die untere Reihe die Überlagerung der beiden Färbungen (DNA: blau, Zielprotein: rot). Maßstab: 10 µm

nachzuweisen. Da sowohl die Behandlung mit unspezifischer siRNA, als auch der Knockdown von *PML* keine messbaren Auswirkungen auf die Positionierung von *CFTR* zeigten, sprechen diese Messungen für die spezifische Bedeutung von Lamin A/C, Emerin, TPR, CTCF (und eventuell LAP2) für die Positionierung von *CFTR*.

Behandlung	Kontrolle		Unspezifische siRNA		<i>PML</i> spezifische siRNA		<i>LAP2</i> spezifische siRNA	
	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
Schale								
1	39,6	2,2	39,3	2,3	38,5	3,7	32,5	5,1
2	30,0	0,9	27,3	1,1	29,2	1,8	29,8	3,2
3	15,2	4,5	19,2	3,0	19,5	1,6	19,6	2,7
4	10,0	4,4	10,8	2,5	9,1	1,3	14,5	1,5
5	5,2	0,5	3,3	1,8	3,7	1,1	3,7	0,5
Behandlung	<i>LMNA</i> spezifische siRNA							
Schale	MW (%)	SE (%)						
1	29,0	0,1						
2	33,0	1,3						
3	21,8	0,1						
4	11,0	1,8						
5	5,2	1,4						

Tabelle 10: **Auswirkungen der Knockdowns von *PML*, *LAP2* und *LMNA* sowie unspezifischer siRNA auf die Positionierung von *CFTR* in HeLa Zellen.** Angegeben sind die über 2D-Erosionsanalyse erhaltenen Mittelwerte (MW) der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der FISH-Signale (in %) innerhalb von fünf äquidistanten konzentrischen Schalen (Schale 1: Peripherie, Schale 5: Zentrum), sowie die Standardfehler (SE) von jeweils zwei unabhängigen Experimenten (jeweils drei technische Replikate) zu den Behandlungen mit den angegebenen siRNA.

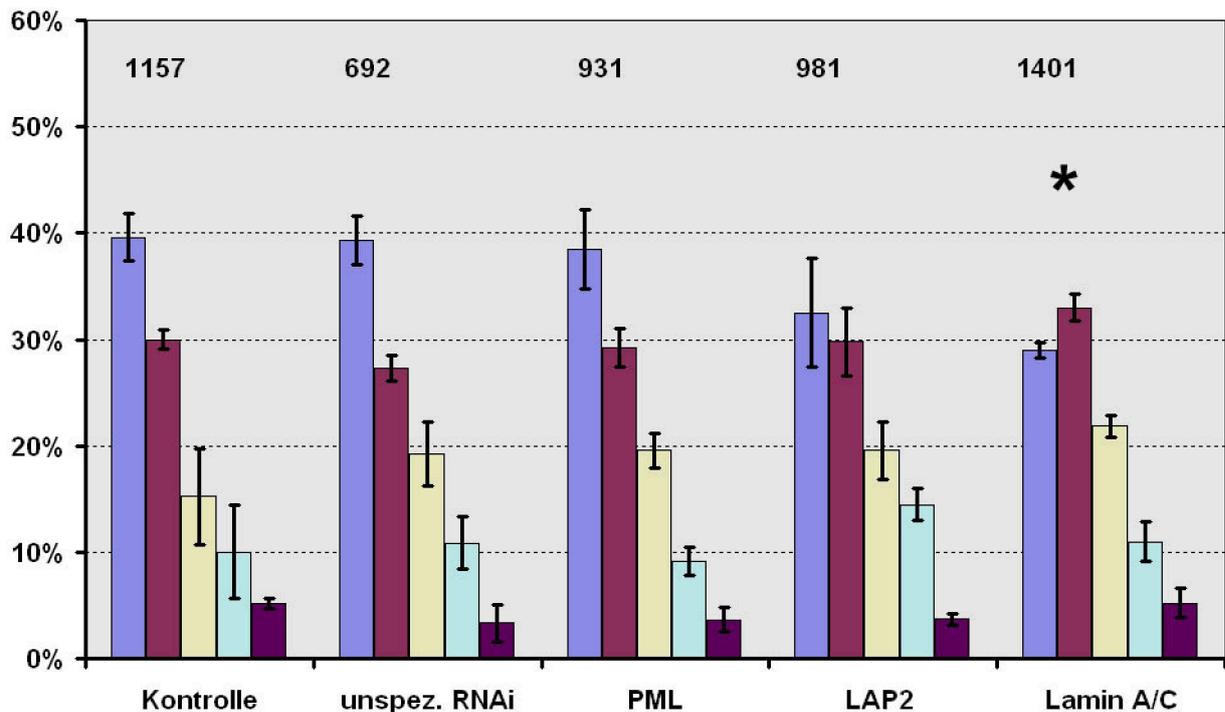


Abbildung 37: **Auswirkungen der Behandlungen mit unspezifischer-, sowie *PML*-, *LAP2*- und *LMNA*-spezifischer siRNA auf die Positionierung von *CFTR*.** Balkendiagramm der Daten aus Tabelle 10. Angezeigt sind die Mittelwerte (+/-SE) der Verteilungen mit Dunkelblau: 1. Schale (Peripherie), Purpur: 5. Schale (Zentrum). Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der ausgewerteten FISH-Signale an. Der Stern (\*) markiert eine signifikante Änderung der Verteilung gegenüber Kontrollzellen.

### 3.8 Pilotexperiment zur Untersuchung des Einflusses von Actin / Myosin auf die Repositionierung von *CFTR*

Mehreren Publikationen zufolge (siehe Einleitung) scheinen Actin und Myosin in manchen Fällen an der Positionierung und der Relokalisation von Genen beteiligt zu sein. Diese Studien verwendeten unter anderem die Inhibitoren 2,3-Butandion-Monoxim (BDM), Latrunculin oder Actin-/Myosinmutanten für den Nachweis. Um zu untersuchen, ob auch die Positionierung beziehungsweise die TSA-induzierte Repositionierung von *CFTR* von diesen Proteinen abhängt, wurden HeLa Zellen mit dem Myosininhibitor BDM, mit TSA sowie mit BDM und TSA in Kombination behandelt. In letzterem Falle wurde dabei mit der BDM-Behandlung etwa 30 Minuten vor dem Einsetzen der einstündigen TSA-Behandlung begonnen, um einer etwaigen schnelleren Wirkungsentfaltung von TSA vorzubeugen. Die Position von *CFTR* wurde nach diesen Behandlungen mittels 2D-Erosionsanalyse in

jeweils zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Ergebnisse der Erosionsanalysen sind in Tabelle 11 und Abbildung 38 aufgeführt.

Behandlung	Kontrolle		BDM (90min)		BDM (90min) TSA (60min)		TSA (60min)	
	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)	MW (%)	SE (%)
Schale 1	48,9	2,8	49,4	2,4	42,7	1,5	33,9	1,6
Schale 2	25,9	2,2	25,7	1,3	28,3	0,8	26,9	2,2
Schale 3	13,3	2,8	15,6	1,8	16,7	1,1	20,2	2,9
Schale 4	8,0	1,4	7,3	1,5	9,9	0,5	15,5	4,2
Schale 5	3,8	0,7	2,1	0,4	2,4	1,2	3,6	0,9

Tabelle 11: **Auswirkung einer Behandlung mit BDM auf die TSA-induzierte Repositionierung.** Angegeben sind die über 2D- Erosionsanalyse erhaltenen Mittelwerte (MW) der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der FISH-Signale (in %) innerhalb von fünf äquidistanten konzentrischen Schalen (Schale 1: Peripherie, Schale 5: Zentrum), sowie die Standardfehler (SE) von jeweils zwei unabhängigen Experimenten (mit jeweils drei technischen Replikaten) zu den angegebenen Wirkstoffbehandlungen.

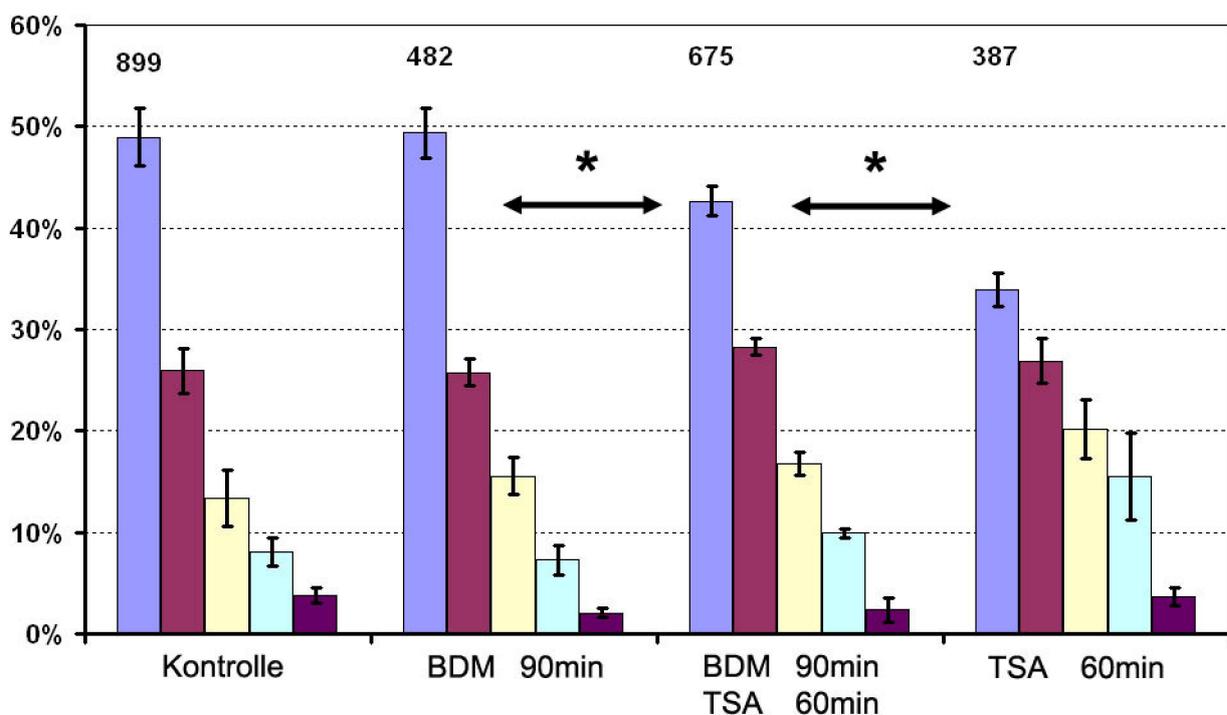


Abbildung 38: **Auswirkung einer Simultanbehandlung mit BDM auf die TSA-induzierte Repositionierung.** Balkendiagramm der Daten aus Tabelle 11. Angezeigt sind die Mittelwerte (+/- SE) der Verteilungen mit Dunkelblau: 1. Schale, Purpur: 5. Schale. Zahlen über den Balken zeigen

die Anzahl der ausgewerteten FISH-Signale an. Ein Stern (\*) markiert einen signifikanten Unterschied zwischen den mit Doppelpfeilen spezifizierten Verteilungen.

TSA-Behandlung über eine Stunde führt wie erwartet zu einer hochsignifikanten Abnahme in der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des *CFTR*-Gens in der äußersten Schale von 48,9 auf 33,9 % (ungepaarter t-Test,  $p=2 \times 10^{-4}$ ). Die gleichzeitige Behandlung mit BDM führt ebenfalls zu einer signifikanten Repositionierung des Gens in das Zellkerninnere ( $p=0,02$ ). Die TSA-induzierte Repositionierung des *CFTR*-Gens ist jedoch bei gleichzeitiger Behandlung mit BDM deutlich reduziert und unterscheidet sich hochsignifikant von der Verteilung nach der alleinigen Behandlung mit TSA (ungepaarter t-Test,  $p=0,003$ ). Die Behandlung ausschließlich mit BDM über denselben Zeitraum führt dagegen zu keiner nachweisbaren Veränderung in der Positionierung von *CFTR*. Diese Experimente legen somit nahe, daß Myosin an der Repositionierung von *CFTR* beteiligt ist.

## 4 Diskussion

Startpunkt dieser Arbeit war die Feststellung, dass die Behandlung von *CFTR*-nichtexprimierenden Zellen mit dem HDACI TSA zu einer Repositionierung des *CFTR*-Gens führt (Zink, *et al.*, 2004). TSA-Behandlung bewirkt Veränderungen im Acetylungsgrad einer Vielzahl von Proteinen. Mindestens 2000 verschiedene Proteine sind potentielle Ziele der Acetylierung im Menschen (Keshava Prasad, *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2011). Zusammen legen die Befunde die Vermutung nahe, dass die Acetylierung bestimmter Proteine direkt oder indirekt die Positionierung von *CFTR* kontrolliert. Besonders attraktive Kandidaten für die Genpositionierung stellen dabei Histone dar, da Histonacetylierung generell mit transkriptioneller Aktivität, und transkriptionelle Aktivität wiederum mit der zellkerninternerer Positionierung von *CFTR* und anderen Genen korreliert.

Daher sollte zuerst in vergleichsweise einfachen Experimenten ermittelt werden, ob die Acetylierung von Histonen grundsätzlich als Mechanismus für die Genpositionierung in Betracht kommen könnte. Um als Ursache für die Repositionierung von *CFTR* in Betracht zu kommen, müsste die TSA-induzierte Histonhyperacetylierung bereits vor oder zumindest während der Repositionierung auftreten. Als erster Schritt wurde daher der zeitliche Verlauf der TSA-induzierten Repositionierung des *CFTR*-Gens mit dem zeitlichen Verlauf des Anstiegs der globalen Histonacetylierung verglichen.

### 4.1 Das zeitliche Verhältnis von TSA-induzierter globaler Histonacetylierung und der Repositionierung des *CFTR*-Lokus.

TSA-induzierte Histonhyperacetylierung wurde in einer Vielzahl von Studien sowohl in murinen- (Clayton, *et al.*, 2000; Hazzalin, *et al.*, 2005) Huhn- (Covault, *et al.*, 1980; Zhang, *et al.*, 1988) und menschlichen Zellen/Zelllinien (Sun, *et al.*, 2001; Toth, *et al.*, 2004) beobachtet. Allerdings zeigt zum Beispiel eine Untersuchung von vier mit TSA behandelten Leukämiezelllinien (Ninos, *et al.*, 2010), dass sich Kinetik und Ausmaß der TSA-induzierten Histonacetylierung dabei in verschiedenen Zelllinien deutlich unterscheiden, und eine Histonhyperacetylierung sogar ausbleiben kann.

Wie in Abbildung 15 gezeigt, führt TSA-Behandlung mit einer Dosis von 10 ng/ml bei den für diese Arbeit verwendeten HeLa-Zellen zu einer deutlichen, zugleich aber auch begrenzten Zunahme der globalen Histonacetylierung. Für die beiden untersuchten Histonisoformen H3ac und H4ac erscheint der Anstieg dabei recht ähnlich, mit einem deutlichen Anstieg der Acetylierung innerhalb der ersten 20 Minuten und dem Erreichen eines Plateaus nach etwa 40-80 Minuten (siehe Abb. 15). Die Menge an acetylierten Histonen erhöht sich dabei durch die TSA-Behandlung auf das etwa 2,5-3-fache. Diese

Beobachtungen decken sich mit *in-vivo*-Messungen zur TSA-induzierten Acetylierung von Histon H4 K5/12 in Cos7- und HeLa Zellen (Sasaki, *et al.*, 2009). In jener Studie wurden auch höhere Konzentrationen an TSA eingesetzt. Eine maximale Acetylierungsrate wird demzufolge mit einer etwa 3-fach höheren Konzentration an TSA erreicht (30 ng/ml). Die in dieser Arbeit durchgehend verwendete Konzentration von 10 ng/ml sollte den Daten zufolge bereits zu ungefähr 80% der maximalen Acetylierungsrate führen. Damit sollten die Messungen relativ robust gegenüber Abweichungen bei der TSA-Konzentration sein. In den hier durchgeführten Messungen zeigt Histon H4K8ac einen verzögerten, in etwa linearen Anstieg (siehe Abb. 15c). Dieses würde sich mit der Hypothese decken, dass die Acetylierungen der N-terminalen Enden von Histon H4 sequentiell auftreten (Ruthenburg, *et al.*, 2007; Thorne, *et al.*, 1990). So stellt Histon H4K16ac anscheinend die dominierende monoacetylierte Isoform dar, zeigt jedoch nur sehr geringfügige Änderungen nach HDACI-Behandlungen. Eine Zunahme der Acetylierung erfolgt offenbar in der Reihenfolge K12, K5 und K8 (de Ruijter, *et al.*, 2003; Su, *et al.*, 2007). Der deutlich stärkere Anstieg der Histonacetylierung, der von dem Histon H4ac Antikörper detektiert wird, würde demnach von einem Anstieg der Acetylierung an Histon H4 K5/12 herrühren, während die Acetylierung von Histon H4 K8 nur einen verlangsamten und geringeren Anstieg aufweist. Im Gegensatz zu diesen recht eindeutigen und einfacher zu messenden Veränderungen der globalen Histonacetylierung, ist die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der *CFTR*-Repositionierung methodisch aufwändiger. Um ein möglichst repräsentatives Gesamtbild zu erhalten, wurden die Messungen mehrmals wiederholt, und die zusammengefassten Messungen statistisch ausgewertet. Die zusammengefassten Messungen zur Repositionierung von *CFTR* zeigen eine erste statistisch signifikante Änderung nach 20 Minuten TSA-Behandlung. Nach etwa 60 Minuten erscheint die Repositionierung vollständig abgelaufen zu sein. Somit erscheint die Repositionierung in einem ähnlichen Zeitrahmen wie die TSA-induzierte Histonhyperacetylierung aufzutreten.

## 4.2 Analyse der lokalen Histonacetylierung mittels ChIP-chip und qPCR

### 4.2.1 Generelle Beobachtungen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die Histonacetylierung nicht nur global, sondern auch lokal innerhalb des *CFTR*-Gens, beziehungsweise seiner näheren Umgebung, nach TSA-Behandlung ändert. Zur Untersuchung der lokalen Histonacetylierung wurde ChIP mit einer Analyse der immunpräzipitierten DNA mittels DNA-Chips eingesetzt. Diese Analyse erfolgte in HeLa Zellen im unbehandelten Zustand

und nach 20 Minuten TSA-Behandlung, sowie in unbehandelten Calu-3 Zellen. Die Analyse der beiden acetylierten Histonisoformen (H3ac und H4ac) zeigt für die in dieser Arbeit untersuchten Region, dass in unbehandelten HeLa Zellen im Wesentlichen nur die Promotorregionen der aktiven Gene *CAPZA2* und *ST7* hochacetyliert sind. Nach TSA-Behandlung kommt es zu einem weiteren Anstieg an diesen hochacetylierten Positionen. Dieses steht im Einklang mit einer genomweiten Untersuchung der Histonacetylierung in TSA-behandelten Zellen (Wang et al., 2009), derzufolge aktive Gene generell den stärksten Anstieg der Histonacetylierung, und diesen bevorzugt in der Promotorregion, verzeichnen.

Zusätzlich zu den Änderungen in den Promotorregionen von *CAPZA2* und *ST7* führt TSA-Behandlung jedoch, wie in Abschnitt 3.4. beschrieben, auch zu einem Anstieg der Histonacetylierung an zahlreichen weiteren Positionen. Dabei verhalten sich die drei in HeLa Zellen inaktiven Gene *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2* nach TSA-Behandlung unterschiedlich. So zeigt das Gen *ASZ1* einen relativ massiven Anstieg der Histonacetylierung an drei Positionen, während der Promotor dieses Gens hypoacetyliert bleibt. In *CFTR* zeigt sich ein Anstieg der Histonacetylierung an beiden Enden, sowie in der Mitte des Gens. Im Gegensatz dazu spricht das Gen *CTTNBP2* nur an seinem 3'-Ende deutlich auf die TSA-Behandlung an. Dieses unterschiedliche Ansprechen von inaktiven Genen auf TSA-Behandlung wurde auch von Wang, et al. (2009) beobachtet. Jener Analyse zufolge stellt die Trimethylierung von Histon H3K4 in der Promotorregion von inaktiven Genen einen Marker für TSA-induzierbare Histonhyperacetylierung dar. Untersuchungen der H3K4 Trimethylierung in den hier verwendeten HeLa Zellen (durchgeführt von Dr. Karthikeyan Kandasamy, nicht dargestellt) zeigt eine hohe Trimethylierung des *CAPZA2* und *ST7* Promotors. Zusätzlich zeigt die Stelle mit zunehmender Histonacetylierung in der Zentralregion von *CFTR* eine höhere H3K4 Trimethylierung. Dagegen zeigt der Promotor von *CTTNBP2*, der keinen deutlichen Anstieg der Histonacetylierung zeigt, auch keine Trimethylierung von H3K4. Die Daten zur TSA-induzierten Histonhyperacetylierung und Histon H3K4 Trimethylierung in der *CFTR*-Region zeigen somit ebenfalls die von Wang, et al., (2009) genomweit beobachtete Korrelation.

Die in dieser Arbeit für Histon H3ac und H4ac erhobenen Daten in unbehandelten HeLa Zellen stimmen dabei teilweise mit ChIP-chip Datensätzen des ENCODE-Pilotprojektes für (unbehandelte) HeLa S3 Zellen überein. Die Messungen des ENCODE-Projektes für H3ac und H4ac, sowie die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen, sind in Abbildung 39 gegenübergestellt. Die Messungen des ENCODE-Pilotprojektes zeigen übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit einen hohen Acetylierungsgrad des *CAPZA2* und *ST7* Promotors. Im Widerspruch zu dieser Arbeit zeigen allerdings die ENCODE-Datensätze eine hohe Histon H3 Acetylierung und H3K4 Trimethylierung (nicht dargestellt) des *CTTNBP2*-Promotors. Anhand der Histonacetylierungs- und (H3K4)

Trimethylierungsmuster würde man folglich auf eine weit stärkere Expression des *CTTNBP2*-Gens in den HeLa S3 Zellen des ENCODE-Projektes, als bei den für diese Arbeit verwendeten HeLa S3 Zellen schließen. Die Expressionsrate des *CTTNBP2*-Gens ist bei den in dieser Arbeit verwendeten HeLa S3 Zellen übereinstimmend sehr niedrig (etwa  $3 \times 10^{-4}$  %, bezogen auf die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; gemessen von Dr. Karthikeyan Kandasamy).

Ein überraschender Befund ist die Feststellung, dass Positionen, die einen Anstieg der Histonacetylierung zeigen, nicht grundsätzlich denselben Acetylierungsgrad erreichen. Da TSA die Deacetylierung der Histone hemmt, würde man a priori eine vollständige Histonacetylierung an allen Positionen erwarten, an denen HATs binden. Eine Zeitserie zu der Histon H3 Acetylierung nach 20, 40 und 60 Minuten TSA-Behandlung (Abb.25, Anhang) zeigt jedoch, dass die Positionen mit geringerer Histonacetylierung nach 20 Minuten TSA-Behandlung keinen weiteren Anstieg der Histonacetylierung zeigen. Das legt nahe, dass an manchen Positionen weitere Mechanismen wirken (zum Beispiel HDAC der Klasse III oder sich ausschließende Histonmodifikationen), welche den Anstieg der Histonacetylierung an diesen Positionen begrenzen.

#### 4.2.2 Lokale Histonacetylierung und Genpositionierung

Nach der Bestimmung der Histonacetylierungsmuster von H3ac und H4ac in HeLa Zellen vor und nach TSA-Behandlung, sowie in unbehandelten Calu-3 Zellen, wurde untersucht, ob die Acetylierung von Histonen die radiale Genpositionierung regulieren könnte. Für die Auswirkung der Histonhyperacetylierung auf die Positionierung des umgebenden Chromatins sind dabei die folgenden Möglichkeiten denkbar: i) die acetylierten Histone ändern selbst die Positionierung des Chromatins unmittelbar durch eine Veränderung der Chromatinstruktur oder ii) sie ändern die Positionierung durch Wechselwirkung mit Proteinen, die acetylierte Histone erkennen (oder nicht mehr erkennen), oder iii) sie ändern die Positionierung durch Wechselwirkung mit Komplexen, die sowohl acetylierte Histone (nicht mehr), als auch bestimmte DNA-Sequenzen erkennen oder iv) sie sind überhaupt nicht an der Positionierung beteiligt. Sollten die Fälle i) oder ii) zutreffen, sollte die Dichte der acetylierten Histone einer breiteren Chromatinregion die radiale Positionierung dieser Region bestimmen. Im Gegensatz dazu würde im Falle iii) nur der Histonacetylierungsgrad an bestimmten, kritischen Positionen (mit der DNA-Sequenz, die der jeweilige Komplex erkennt) über die Positionierung entscheiden. Um Fall iv) nachzuweisen, müsste eine Repositionierung ohne Histonacetylierung beobachtet werden.

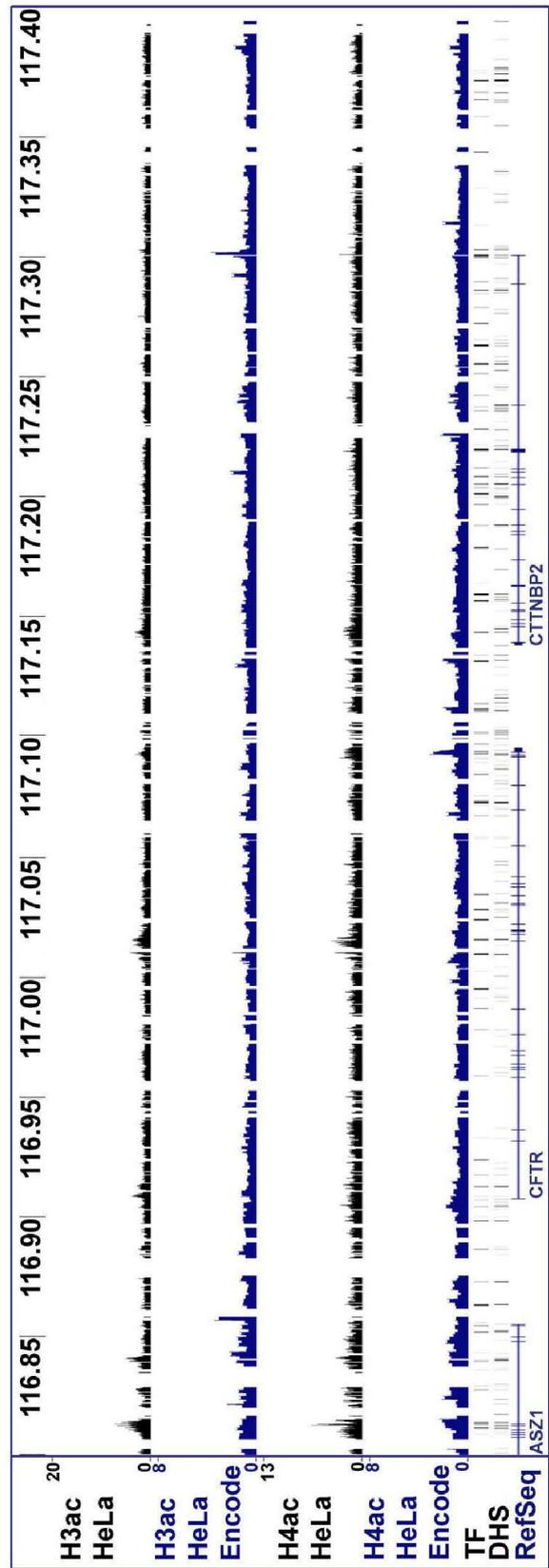
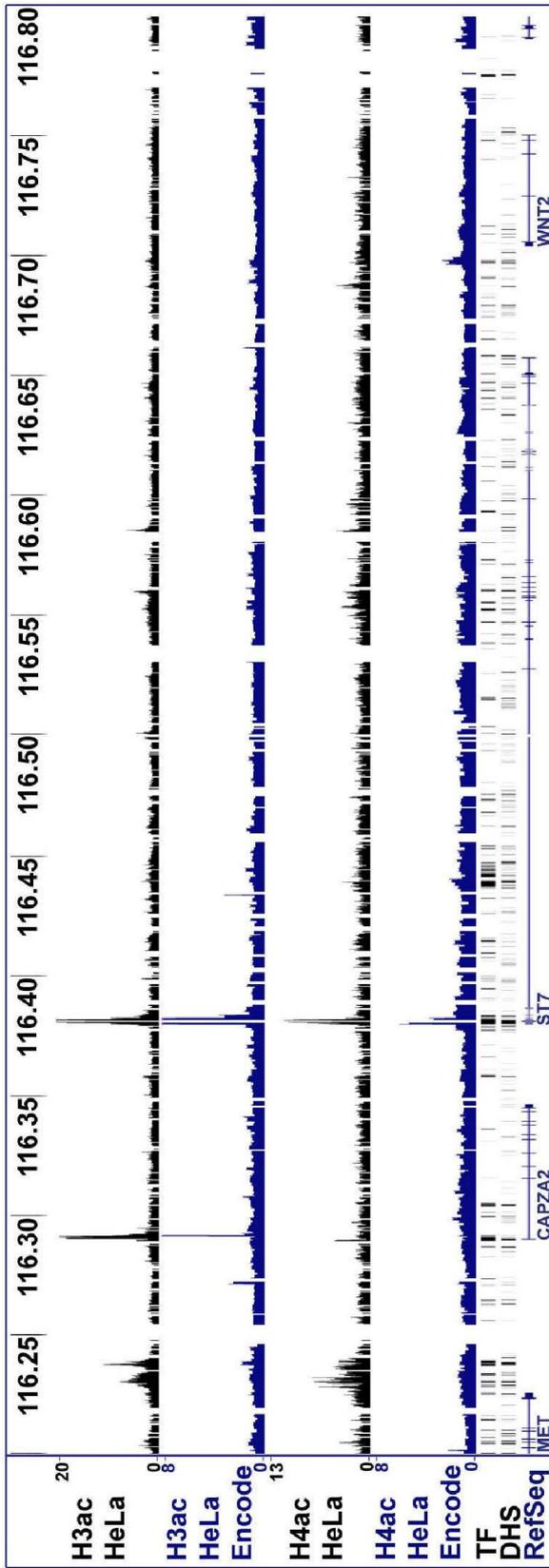


Abbildung 37: (Seite 127): **Vergleich der in dieser Arbeit gemessenen Acetylierungsmuster von Histon H3 und H4 mit denen des ENCODE-Pilotprojektes.** Die Abbildung zeigt eine modifizierte UCSC-Genombrowser Darstellung der Datensätze der in dieser Arbeit gemessenen ChIP-chip Experimente für unbehandelte HeLa Zellen (schwarz), sowie publizierte Datensätze des ENCODE-Pilotprojektes als Kontrolle (blau). Die Messwerte sind angeordnet entsprechend der genomischen Positionen der Sondensequenzen. Angezeigt ist die von den in dieser Arbeit verwendeten DNA-Chips abgedeckte Region des menschlichen Chromosoms 7 (Basenpaare: 116.200.000-117.400.000; verwendete Genomassemblierung: hg18/NCBI 36, März 2006). Die y-Achse zeigt die Skala für die gemessenen Anreicherungen von H3ac oder H4ac im Verhältnis zu H3pan (für diese Arbeit) oder INPUT (für das ENCODE-Pilotprojekt). Für die bei dieser Auflösung zusammenfallenden Messwerte sind die Mittelwerte angezeigt. Spur 1 zeigt Histon H3ac/H3pan (diese Arbeit). Spur 2 zeigt Histon H3ac/INPUT (ENCODE-Pilotprojekt). Spur 3 zeigt Histon H4ac/H3pan (diese Arbeit). Spur 4 zeigt Histon H4ac/INPUT (ENCODE-Pilotprojekt). "TF" zeigt die Dichte an experimentell nachgewiesenen Transkriptionsfaktorbindestellen und "DHS" DNase Hypersensitive Stellen in mehreren getesteten Zelllinien (ENCODE). "RefSeq" zeigt die Positionen der Exons (blaue, vertikale Linien/Balken) und Introns der annotierten Gene (blaue horizontale Linien) an. Quelle: National Center for Biotechnology Information Reference Sequence (NCBI RefSeq)

Sollte die Fälle i) oder ii) zutreffen, so sollte die radiale Positionierung der drei Gene *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2* ihren mittleren Histonacetylierungsgrad reflektieren. Der Erosionsanalyse zufolge befinden sich die drei durch die *ASZ1*-, *CFTR*- und *CTTNBP2*-Sonden abgedeckten Regionen in unbehandelten HeLa Zellen an der Zellkernperipherie (Tab. 9 / Abb. 35). Dieses wäre anhand der generell niedrigen Histonacetylierung in dieser Region in unbehandelten HeLa Zellen erklärbar (Abb. 27, Spur 1 für H3ac und 3 für H4ac, schwarz). Nach TSA-Behandlung kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Histonacetylierung sowohl in der Region der Sonden für *ASZ1*, als auch für *CFTR* (Abb. 27, Spur 1 für H3ac und Spur 3 für H4ac, pink). Die Region der *CTTNBP2* Sonde zeigt dagegen nur einen sehr geringen Anstieg des Acetylierungsgrades von H3ac oder H4ac nach TSA-Behandlung. Den einfachen Modellen aus Fall i) und ii) zufolge, würde man eine Repositionierung von *ASZ1* und *CFTR* in HeLa Zellen nach TSA-Behandlung erwarten. Die Erosionsanalysen zeigen dagegen nur eine Repositionierung von *CFTR* (Tab. 9 / Abb. 35). Der weitere Vergleich von unbehandelten HeLa und Calu-3 Zellen (Abb. 27, Spur 1 mit 2 im Falle von H3ac, und Spur 3 mit 4 für H4ac), zeigt einen vergleichbaren Acetylierungsgrad für die Region der *ASZ1*-Sonde, sowie einen deutlich höheren Acetylierungsgrad in Calu-3 Zellen für *CFTR* (speziell für H3ac), als auch für *CTTNBP2* (speziell für H4ac). Alle drei Gene befinden sich der Erosionsanalyse zufolge in Calu-3 Zellen weiter im Zellkerninneren (Zink et al, 2004), mit *CFTR* tendenziell am weitesten im Zellkerninnern. Auch in diesem Falle verhält sich abermals die Region der *ASZ1*-Sonde

anders, als anhand der Modell i) und ii) erwartet. Insgesamt erscheinen diese einfachen Modelle, im Hinblick auf die Positionierung von *ASZ1* inkonsistent.

Global führt TSA-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der Histonacetylierung. Ein Teil des normalerweise vergleichsweise dichten Chromatins am Zellkernrand expandiert dabei in das Zellkerninnere (Toth, *et al.*, 2004), jedoch verbleibt ein Großteil des acetylierten Chromatins am Zellkernrand. Immunfärbungen zufolge ist die absolute Dichte an acetylierten Histonen nach HDACI-Behandlung am Zellkernrand sogar am höchsten (Bartova, *et al.*, 2005; Englmann, 2005; Rada-Iglesias, *et al.*, 2007). Ein höherer Histonacetylierungsgrad führt demzufolge, auch global betrachtet, nicht automatisch zu einer Repositionierung des Chromatins in das Zellkerninnere. Auch wenn eine Beteiligung der Histonacetylierung an der Genpositionierung nicht ausgeschlossen werden kann, legen die Resultate insgesamt nahe, dass zumindest weitere Faktoren für die Spezifität der Repositionierung erforderlich sind.

Daher sollte der Fall iii) untersucht werden, demzufolge nur die Histonacetylierung an bestimmten Positionen für die Genpositionierung entscheidend wären. Durch Vergleiche der bereits ermittelten Histonacetylierungsmuster sollten dabei diese für die Genpositionierung kritischen Stellen herausgefiltert werden. Es wurde angenommen, dass in allen Zelllinien derselbe Mechanismus (an denselben regulatorischen Elementen) die Positionierung von *CFTR* kontrolliert. Dabei sollten die Histone an den für die Genpositionierung kritischen Positionen immer hyperacetyliert sein, wenn sich das *CFTR*-Gen im Zellkerninneren befindet, und zumindest deutlich schwächer acetyliert, wenn sich das Gen an der Zellkernperipherie befindet. In unbehandelten HeLa Zellen befindet sich das *CFTR*-Gen dabei an der Zellkernperipherie, während es sich in HeLa Zellen nach TSA-Behandlung, sowie in Calu-3 Zellen konstitutiv, im Zellkerninneren befindet. Um zwischen hyperacetylierten und deacetylierten Stellen zu unterscheiden, wurde das Excel Makro ChIPOTle eingesetzt (Buck, *et al.*, 2005). Wie in Abschnitt 3.4.3 ausgeführt, deuten die Vergleiche der mittels ChIPOTle identifizierten Stellen zwischen HeLa und Calu-3 Zellen, beziehungsweise HeLa Zellen vor und nach der TSA-Behandlung, speziell auf eine mögliche Bedeutung von zwei Positionen für die Positionierung von *CFTR* im Zellkern hin. Eine Position befindet sich in der Nähe der *CFTR*-Promotorregion (Abb. 28b, Region A), und die andere in einer Region nahe dem 3-Ende von *CTTNBP2* (Abb. 28b, Region E). Beide Positionen stellen experimentell ermittelte Bindungsstellen des Proteins CTCF dar (Quelle: <http://genome.ucsc.edu/>). Weitere Regionen mit potentieller Bedeutung für die Positionierung von *CFTR* sind die Regionen B-D (Abb. 28b, nur im Falle von H3ac).

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden diese potentiell interessierenden Positionen mittels qPCR untersucht. Für diese Analyse wurden zusätzlich HEK 293 Zellen als weitere Kontrolle eingesetzt. In HEK 293 ist das *CFTR*-Gen ebenfalls transkriptionell inaktiv und repositioniert nach TSA-Behandlung. Wie in Abschnitt 3.5 ausgeführt, ist dieser Überprüfung zufolge die CTCF-Bindungsstelle nahe der *CFTR*-Promotorregion formal die

einzigste Stelle, an der Histon H3 konsistent in allen Zelllinien und unter allen Bedingungen hochacetyliert ist, wenn sich das *CFTR*-Gen im Zellkerninneren befindet, und signifikant geringer acetyliert, wenn sich das *CFTR*-Gen an der Zellkernperipherie befindet.

In Region E zeigen dagegen in HeLa und HEK293 zwei eng benachbarte Stellen (Abb. 29, Positionen 53/54, Abstand 55bp) einen signifikanten Anstieg der Histon H3 Acetylierung nach TSA-Behandlung, während die Histone an diesen Positionen in Calu-3 Zellen deutlich höher acetyliert sind. Diese beiden Positionen flankieren eine weitere CTCF-Bindungstelle. In den Regionen B-D zeigen mehrere Positionen sowohl in HeLa als auch HEK293 Zellen einen Anstieg der Histon H3 Acetylierung. Dagegen konnte an diesen Stellen kein signifikanter Unterschied der Histonacetylierung zwischen Calu-3 Zellen und unbehandelten HeLa Zellen identifiziert werden.

Generell sind dabei die Vergleiche innerhalb derselben Zelllinie (vor- und nach TSA-Behandlung) zuverlässiger, als die zwischen verschiedenen Zelllinien. Für den Vergleich zwischen verschiedenen Zelllinien fehlt ein definierter Standard, um die Effizienzen der ChIP-Experimente zu vergleichen. So zeigen zum Beispiel das 3'-Ende von *MET* und der Promotor von *CAPZA2* beinahe doppelt so hohe Anreicherungen in HeLa Zellen als in Calu-3 Zellen, was möglicherweise auf eine höhere Effizienz der ChIP in diesen Zellen zurückzuführen sein könnte. Die wirklichen Anreicherungen in Calu-3 Zellen könnten daher potentiell um bis zu einen Faktor 2 höher liegen als die hier ermittelten. Bei den angegebenen CTCF-Bindungsstellen ist der Anstieg der Histonacetylierung nach TSA-Behandlung bei HeLa und HEK 293 Zellen statistisch signifikant. Die Acetylierung in Calu-3 Zellen ist an diesen Positionen den Messungen zufolge um Größenordnungen höher. Der mögliche Fehler, aufgrund des Vergleichs zwischen verschiedenen Zelllinien, sollte hier das Ergebnis daher qualitativ nicht beeinflussen. An mehreren Positionen in den Regionen B-D wurden ebenfalls signifikante Unterschiede der Histonacetylierung nach TSA-Behandlung beobachtet. Den Messungen zufolge sind diese Positionen in Calu-3 Zellen nicht höher acetyliert als in HeLa Zellen. Hier könnte jedoch der potentielle Fehler aus dem Vergleich zwischen den verschiedenen Zelllinien das Ergebnis qualitativ ändern. Eine weitere systematische Fehlerquelle, in diesem Falle bezüglich spezifischer Sequenzen, ist der Amplifikationsschritt während der ChIP-Prozedur. Da bei den hier durchgeführten Analysen ausschließlich amplifizierte DNA miteinander verglichen wurde, sollte dieser Fehler vernachlässigbar sein.

Zusammengefasst zeigen die Messungen, dass die CTCF-Bindungstelle in der Promotorregion die hier geforderten Kriterien einer Kontrollregion der Positionierung von *CFTR* formal erfüllt. Dagegen können weitere Stellen in den Regionen B-E nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Da eine CTCF-Bindungstelle formal als möglicher Kandidat für einen Regulator der Genpositionierung in Betracht kam, wurde eine mögliche Rolle von CTCF bei der Positionierung von *CFTR* mittels Knockdown von *CTCF* getestet.

### 4.3 Die Rolle von CTCF und Histonacetylierungen in der Genpositionierung

Der Knockdown von *CTCF* führt, wie in Abschnitt 3.6. beschrieben, zu einer Repositionierung des *CFTR*-Gens von der Zellkernperipherie in das Zellkerninnere. Dagegen konnte kein Effekt auf die radiale Positionierung der Gene *ASZ1* und *CTTNBP2* durch den Knockdown nachgewiesen werden (Tab. 9, Abb. 35). Dieses gilt sowohl für HeLa- als auch HEK 293 Zellen. Der *CTCF*-Knockdown verhält sich damit bezüglich der Positionierung dieser Gene wie die TSA-Behandlung (Abb.35). Eine Behandlung mit unspezifischer siRNA zeigt dagegen keine nachweisbare Auswirkung auf die radiale Positionierung von *CFTR* (Tab. 8 Abb. 33). Demzufolge sind die beobachteten Effekte nach *CTCF*-Knockdown eine direkte oder indirekte Folge einer reduzierten Menge von CTCF. CTCF könnte dabei die Positionierung von *CFTR* direkt, über seine Bindungsstellen in der *CFTR*-Region, oder aber indirekt, zum Beispiel durch die Änderung der Expression von TFs, die ihrerseits die Positionierung von *CFTR* kontrollieren, beeinflussen. Potentiell könnte der Knockdown von *CTCF*, aufgrund der vielen CTCF-Bindungsstellen im Genom, die Expression etlicher Gene beeinflussen. Stichprobenhafte Untersuchungen zu Änderungen der Genexpression nach einem *CTCF*-Knockdown (Docquier, *et al.*, 2005; Majumder, *et al.* 2008), sprechen dabei gegen globale und damit für genspezifische Effekte. Ein TF, dessen Expression potentiell von CTCF abhängt, und der potentiell auf das *CFTR*-Gen wirkt, ist c-Myc (Qi, *et al.* 2003). Allerdings beeinflusst CTCF die Expression von c-Myc offenbar nicht in allen Zelllinien (Docquier, *et al.*, 2005). Damit lassen sich indirekte Effekte des *CTCF*-Knockdowns auf die Positionierung von *CFTR* nach der derzeitigen Datenlage nicht ausschließen.

Sollte CTCF die Positionierung von *CFTR* direkt kontrollieren, ist das unterschiedliche Ansprechen der benachbarten Gene auf den *CTCF*-Knockdown nicht unmittelbar durch das Vorhandensein von CTCF-Bindungsstellen erklärbar. CTCF-Bindungsstellen finden sich in allen drei von den FISH-Sonden abgedeckten Regionen (Abb. 34). Die CTCF-Bindungsstellen müssten somit qualitativ unterschiedlich sein. So legen die vergleichbaren Effekte des *CTCF*-Knockdowns und der TSA-Behandlung auf die Positionierung der Gene *ASZ1*, *CFTR* und *CTTNBP2* (Tab. 9, Abb. 35) nahe, dass eine mit CTCF assoziierte HDAC für die radiale Positionierung von *CFTR* kritisch ist. CTCF übt seine Repressorfunktion möglicherweise durch Bindung an den Sin3A Repressorkomplex und damit über HDAC1 und HDAC2 (Lutz, *et al.*, 2000), oder einer anderen Studie zufolge über HDAC3 (Dunn, *et al.*, 2003) aus.

Innerhalb der *CTTNBP2*-Sondenregion findet sich dabei nur eine verhältnismäßig schwache CTCF-Bindungstelle, die auch keine besonders erhöhte Histonacetylierung nach TSA-Behandlung zeigt. Insofern wäre hier das Ausbleiben der Repositionierung erklärbar. Dagegen befindet sich in der Sondenregion von *ASZ1* eine stärkere-, sowie (je

nach Datensatz) einige schwächere CTCF-Bindungsstellen. Um diese findet sich eine bedeutende Zunahme der Histonacetylierung nach TSA-Behandlung (Abb. 34). Die ausbleibende radiale Repositionierung von *ASZ1* nach TSA-Behandlung oder nach dem *CTCF*-Knockdown, legen damit nahe, dass weitere Faktoren die Spezifität regulieren.

#### 4.4 Knockdown von Kernlaminaproteinen

Neben dem Knockdown von *CTCF* und TSA der TSA-Behandlung führt der Knockdown einer Reihe von Komponenten der Zellkernlamina zu einer Repositionierung des *CFTR*-Lokus in das Zellkerninnere. Dieses wurde für die Knockdowns von *LMNA*, *LAP2*, *Emerin* (Englmann, 2005a) und *Tpr* (Rybakina, 2006) gezeigt. Interessanterweise verhält sich das repetitive telomerische Element *D4Z4* diesbezüglich ähnlich wie *CFTR*. *D4Z4* ändert ebenso wie *CFTR* seine radiale Positionierung nach dem Knockdown von *CTCF* oder *LMNA* (Ottaviani, *et al.*, 2009) oder nach Behandlung mit TSA (Uhlirva, *et al.*, 2010). Dieses lässt vermuten, dass die beiden genomischen Elemente *CFTR* und *D4Z4* einen ähnlichen Positionierungsmechanismus verwenden.

Behandlungen mit unspezifischer siRNA hatten keine messbaren Auswirkungen auf die Positionierung des *CFTR*-Gens gezeigt (Englmann 2005a; Rybakina 2006). Dasselbe wurde auch in dieser Arbeit beobachtet (Tab. 9,10, Abb. 35,37). Da bis zu diesem Punkt jedoch sämtliche durchgeführten Knockdowns in dem *CFTR*-Modellsystem zu einer Repositionierung geführt hatten, sollte als weitere Kontrolle für die Spezifität noch der Knockdown eines mutmaßlich nicht an der Positionierung von *CFTR* beteiligten Proteins durchgeführt werden. Der Knockdown von *PML* bewirkte in dieser Arbeit keine Veränderung der radialen Positionierung von *CFTR* gegenüber unbehandelten oder mit unspezifischer siRNA behandelten HeLa Zellen (Tab. 10, Abb. 37). Allerdings zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Serien sowohl die unbehandelten, als auch die mit unspezifischer oder *PML*-spezifischer siRNA behandelten Zellen eine reduzierte Aufenthaltswahrscheinlichkeit des *CFTR*-Lokus an der Zellkernperipherie (gegenüber der bei unbehandelten Zellen normalerweise beobachteten). Generell wurden bei den hier durchgeführten 2D FISH-Erosionsanalysen Unterschiede in den Kontrollgruppen beobachtet. Für die anderen Serien sind diese Unterschiede allerdings bedeutend geringer. Die Ursache für diese Unterschiede konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Die wahrscheinlich deutlichste Korrelation ergibt sich mit dem Zeitpunkt der Durchführung der jeweiligen Serie. So liegen die Messwerte innerhalb eines vergleichsweise kürzeren Zeitraumes, also innerhalb einer Serie, deutlich näher beieinander als die Messwerte von verschiedenen experimentellen Serien. Bei den chronologisch früheren Messungen ist dabei die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der äußersten Schale tendenziell niedriger.

Chronologisch geordnet ergibt sich dabei: Knockdown von Lamina Komponenten (München, 39,6%), TSA-Zeitserie (München, Singapur; 43,5%), *CTCF*-Knockdown (Singapur; 47,4%), Behandlung mit BDM (Singapur; 48,9%). Inwieweit sich diese Unterschiede weiter auf Abweichungen in den Kulturbedingungen, Veränderungen in den Zellen, oder die eingesetzten Reagenzien zurückzuführen sind, lässt sich dabei nicht weiter eruieren. Die Auswirkungen von Unterschieden in den Analysen, wie zum Beispiel durch die Bestimmung der Zellfläche an vereinzelt Zellkernen oder an Aufnahmen mit mehreren Zellkernen (siehe ), oder unterschiedliche Experimentatoren, wurden getestet, aber erklären nur Abweichungen im Prozentbereich.

Aufgrund der potentiellen Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des *CFTR*-Lokus in der Kontrollgruppe dieses experimentellen Sets, können jedoch geringfügigere Auswirkungen des PML-Knockdowns auf die Positionierung von *CFTR* nicht ausgeschlossen werden. Dagegen zeigten sowohl der Knockdown von *LAP2* und *LMNA* eine deutlich abweichende durchschnittliche Verteilung der *CFTR*-Loci. Diese Abweichung war im Falle von Lamin A/C, jedoch nicht für *LAP2*, statistisch signifikant. Der Vergleich mit den zuvor durchgeführten Knockdowns (Englmann, 2005a) von *LAP2*, legt daher nahe, dass die hier durchgeführte Analyse nicht mächtig genug war, um den Unterschied statistisch nachzuweisen. Das sowohl der Knockdown von *CTCF*, als auch der Knockdown von *LMNA* eine Repositionierung des *CFTR*-Gens bewirken, und diese beide Proteine potentiell miteinander interagieren (Bell, *et al.*, 1999), legen diese Ergebnisse nahe, dass ein Komplex mit Lamin A/C und *CTCF* die Positionierung von *CFTR* reguliert. Wie in dem vorherigen Abschnitt diskutiert, sollte auch eine HDAC mit diesem Komplex interagieren.

#### 4.5 Der Einfluss von Myosin auf die Positionierung von *CFTR*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Pilotexperimente mit dem Myosininhibitor BDM in dem *CFTR*-Modellsystem deuten auf eine Involvierung von Myosin in der Positionierung des *CFTR*-Lokus hin. Grundsätzlich könnte es sich in diesem Falle um einen indirekten Effekt handeln. Durch ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen Myosin ließe sich eventuell ermitteln, ob Myosin direkt an den *CFTR*-Lokus bindet. Anhand der Datenlage ist es aber derzeit noch nicht möglich zu unterscheiden, ob die BDM-Behandlung zu einer Verlangsamung der Repositionierung von *CFTR*, oder einer Änderung der Gleichgewichtslage führt. In Zukunft wären daher Erosionsanalysen mit Einbeziehung eines weiteren längeren Zeitpunktes wünschenswert. Um mögliche Nebenwirkungen der BDM-Behandlung als Ursache für die verminderte Repositionierung ausschließen zu

können, wären weitere Experimente mit anderen Actin/Myosin Inhibitoren (Latrunculin, Phalloidin-Oleat), oder Actin/Myosin Mutanten (Chuang, *et al.*, 2006) als Vergleich erforderlich. Versuche zur Expression von Actinmutanten mit Kernlokalisierungssequenz (aus Chuang, *et al.*) in HeLa Zellen, waren jedoch mit deutlichen Schwierigkeiten verbunden, sowohl hinsichtlich des Erreichens eines hohen Expressionsniveaus, als auch mit der nur sehr geringen Lokalisation der mutanten Proteine im Zellkern, und konnten daher aus zeitlichen Gründen nicht fertig gestellt werden.

## 4.6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Beobachtung aus vorangegangenen Arbeiten, dass die Behandlung mit dem HDACI TSA zu einer Repositionierung des inaktiven *CFTR*-Gens von der Zellkernperipherie in das Zellkerninnere führt, als Ansatz genommen werden, um den Genpositionierungsmechanismus weiter aufzuklären.

Durch Zeitserien von 2D-Erosionsanalysen wurde die Kinetik der TSA-induzierten Repositionierung ermittelt. Den durch Analyse in diskreten Schritten (Schalenanalyse) gewonnenen Daten zufolge ist eine Repositionierung nach 20 Minuten nachweisbar und nach einer Stunde weitestgehend abgeschlossen. Parallel wurde die Zunahme der Acetylierung von Histon H3/H4 mittels Westernblot ermittelt. Beide Histone zeigen demzufolge einen signifikanten Anstieg der Acetylierung nach 20 Minuten TSA-Behandlung mit einer weiteren Zunahme (speziell im Falle von Histon H4) bis zu etwa 40-80 Minuten. Die zeitliche Korrelation der globalen Histonacetylierung und der Repositionierung von *CFTR* widersprach nicht der Hypothese, dass Histonacetylierung die Positionierung von *CFTR* reguliert. Daher wurde die Histonacetylierung innerhalb der *CFTR*-Region mittels ChIP-chip/qPCR untersucht. Sowohl innerhalb von *CFTR*, sowie seinen benachbarten Genen *ASZ1* und *CTTNBP2*, konnten punktuelle Zunahmen der Histonacetylierungen nach 20 Minuten TSA-Behandlung detektiert werden. Durch den Vergleich von *CFTR*-nichtexpremierenden Zelllinien vor und nach TSA-Behandlung, sowie einer Zelllinie mit aktivem und konstitutiv im Zellkerninneren befindlichem *CFTR*-Gen, wurden die Positionen herausgefiltert, an denen die Histone H3 und H4 immer hyperacetyliert erscheinen, wenn sich das Gen im Zellkerninneren befindet, und deacetyliert, wenn sich das Gen an der Kernperipherie befindet. Die auf diese Weise ermittelten Positionen entsprechen Bindungsstellen von CTCF.

Der Knockdown von *CTCF* führt zu einer Repositionierung des *CFTR*-Gens von der Kernperipherie in das Zellkerninnere, ohne die Position der angrenzenden Gene *ASZ1* und *CTTNBP2* zu beeinflussen. Parallel durchgeführte Studien von Dr. Karthikeyan

Kandasamy zeigten, dass TSA-Behandlung ebenfalls nur *CFTR*, jedoch nicht seine angrenzenden Gene repositioniert.

Untersuchungen zur Verlässlichkeit von RNAi Knockdown Experimenten bezüglich der Positionierung von *CFTR* wurden zusammen mit Herrn Mathieu Chevallier durchgeführt. Die zuvor gezeigte Repositionierung von *CFTR* nach dem Knockdown von *LMNA* und *LAP2* konnte zumindest für *LMNA* bestätigt werden. Der als negative Kontrolle durchgeführte Knockdown von *PML* zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Positionierung von *CFTR*.

Zusammen zeigen die Ergebnisse, dass CTCF und Lamin A/C, sowie Proteinhyperacetylierung die Positionierung von *CFTR* regulieren. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass eine von TSA inhibierte HDAC an den Bindungsstellen von CTCF lokalisiert. Da Lamin A/C ein Bindungspartner von CTCF ist, legen diese Resultate nahe, dass *CFTR* durch die Interaktion von CTCF mit Lamin A/C an der Zellkernperipherie lokalisiert wird, und dass diese Interaktion durch Acetylierung von Proteinen des entsprechenden Komplexes reguliert wird.

## 5 Literaturverzeichnis

### 5.1 Datensätze

Alle diese Datensätze wurden über den UCSC-Genombrowser (<http://genome.ucsc.edu/>) erhalten.

CTCF (Abb. 7, 34)

Die Daten stammen von Alan Boyle, Lingyun Song, Terry Furey, und Greg Crawford, (Duke University's Institute for Genome Sciences & Policy (IGSP), Durham, USA); Paul Giresi und Jason Lieb, (University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, USA); Zheng Liu, Ryan McDaniell, Bum-Kyu Lee und Vishy Iyer, (University of Texas at Austin, Austin, USA)

DNase HS (Abb. 7)

Sabo, *et al.*, 2004; Sabo, *et al.*, 2006

ENCODE-ChIP-seq Datensätze für c-Jun, c-Fos, JunD, Ini1, c-Myc, MAX, Brg1, BAF155, BAF170, RNAPII in HeLa Zellen (Abb. 7):

Die Datensätze stammen aus den Arbeitsgruppen von Myers (HudsonAlpha Institute for Biotechnology), Snyder, M., Gernstein, M., Sherman, W. (Yale University), Farnham, P. (UC Davis) und Struhl, K., (Universität Harvard).

ENCODE ChIP-chipdatensätze für H3ac, H4ac und H3K4me1 in HeLa Zellen (Abb. 37):

Diese Datensätze wurden an dem Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK) erstellt.

RefSeq (Abb. 2, 7, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 37):

The NCBI handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Chapter 18, The Reference Sequence (RefSeq) Project. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

## 5.2 Literatur

- Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C. J., Pillus, L., Workman, J. L. und Cote, J. 1999. NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *The EMBO journal*. 18:5108-19.
- Allis, C. D., Berger, S. L., Cote, J., Dent, S., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhata, R., Shilatfard, A., Workman, J. und Zhang, Y. 2007. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell*. 131:633-6.
- Amouyal, M. 2010. Gene insulation. Part II: natural strategies in vertebrates. *Biochem Cell Biol*. 88:885-98
- Anamika, K., Krebs, A. R., Thompson, J., Poch, O., Devys, D. und Tora, L. 2010. Lessons from genome-wide studies: an integrated definition of the coactivator function of histone acetyl transferases. *Epigenetics & chromatin*. 3:18.
- Andrin, C. und Hendzel, M. J. 2004. F-actin-dependent insolubility of chromatin-modifying components. *J Biol Chem*. 279:25017-23.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. und Zhao, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 129:823-37.
- Bartova, E., Pachernik, J., Harnicarova, A., Kovarik, A., Kovarikova, M., Hofmanova, J., Skalnikova, M., Kozubek, M. und Kozubek, S. 2005. Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci*. 118:5035-46.
- Bell, A. C. und Felsenfeld, G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*. 405:482-5.
- Bell, A. C., West, A. G. und Felsenfeld, G. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. 98:387-96.
- Berstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T. und Schreiber, S. L. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 99:8695-8700
- Berstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J. 3rd, Gingeras, T. R., Schreiber, S. L. und Lander, E. S. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120:169-181.
- Berstein, B. E., Meissner, A. und Lander, E. S. 2007. The mammalian epigenome. *Cell* 128:669-681
- Blackledge, N.P., Carter, E.J., Evans, J.R., Lawson, V., Rowntree, R.K., Harris, A. 2007. CTCF mediates insulator function at the CFTR locus. *Biochem. J*. 408:267-75
- Blackledge, N.P., Ott, C.J., Gillen, A.E., Harris, A. 2009. An insulator element 3' to the CFTR gene binds CTCF and reveals an active chromatin hub in primary cells. *Nucleic Acids Res*. 37:1086-94
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Muller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M. R. und Cremer, T. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol*. 3:e157.

- Botta, M., Haider, S., Leung, I. X., Lio, P. und Mozziconacci, J. 2010. Intra- and inter-chromosomal interactions correlate with CTCF binding genome wide. *Mol Syst Biol.* 6:426.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A. und Jaenisch, R. 2006. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 441:349-353
- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J. M., Mahy, N. L., Ellis, J. A. und Bickmore, W. A. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet.* 10:211-9.
- Brown, C. R., Kennedy, C. J., Delmar, V. A., Forbes, D. J. und Silver, P. A. 2008. Global histone acetylation induces functional genomic reorganization at mammalian nuclear pore complexes. *Genes Dev.* 22:627-39.
- Buck, M. J. und Lieb, J. D. 2004. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics.* 83:349-60.
- Buck, M. J., Nobel, A. B. und Lieb, J. D. 2005. ChIPOTle: a user-friendly tool for the analysis of ChIP-chip data. *Genome Biol.* 6:R97.
- Buggy, J. J., Sideris, M. L., Mak, P., Lorimer, D. D., McIntosh, B. und Clark, J. M. 2000. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J.* 350:199-205.
- Cai, S., Lee, C. C. und Kohwi-Shigematsu, T. 2006. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet.* 38:1278-88.
- Cai, Y., Jin, J., Swanson, S. K., Cole, M. D., Choi, S. H., Florens, L., Washburn, M. P., Conaway, J. W. und Conaway, R. C. 2010. Subunit composition and substrate specificity of a MOF-containing histone acetyltransferase distinct from the male-specific lethal (MSL) complex. *The Journal of biological chemistry.* 285:4268-72.
- Calnan, D. R. und Brunet, A. 2008. The FoxO code. *Oncogene.* 27:2276-88.
- Carter, D., Chakalova, L., Osborne, C. S., Dai, Y. F. und Fraser, P. 2002. Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet.* 32:623-6.
- Chambeyron, S., Bickmore, W.A. 2004. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes. Dev.* 18:1119-1130
- Chavanas, S., Adoue, V., Mechin, M. C., Ying, S., Dong, S., Duplan, H., Charveron, M., Takahara, H., Serre, G. und Simon, M. 2008. Long-range enhancer associated with chromatin looping allows AP-1 regulation of the peptidylarginine deiminase 3 gene in differentiated keratinocyte. *PLoS One.* 3:e3408.
- Chen, Y., Sprung, R., Tang, Y., Ball, H., Sangras, B., Kim, S. C., Falck, J. R., Peng, J., Gu, W. und Zhao, Y. 2007. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics.* 6:812-9.
- Chhabra, D. und dos Remedios, C. G. 2005. Cofilin, actin and their complex observed in vivo using fluorescence resonance energy transfer. *Biophys J.* 89:1902-8.
- Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A.J. und

- Kouzarides T. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*. 118:545-53.
- Clapier, C. R. und Cairns, B. R. 2009. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78:273-304
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V. und Mann, M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325:834-40.
- Chuang, C. H., Carpenter, A. E., Fuchsova, B., Johnson, T., de Lanerolle, P. und Belmont, A. S. 2006. Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr Biol*. 16:825-31.
- Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J. und Mahadevan, L. C. 2000. Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J*. 19:3714-26.
- Covault, J. und Chalkley, R. 1980. The identification of distinct populations of acetylated histone. *J Biol Chem*. 255:9110-6.
- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E.K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber, und C. Zorn. 1982. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet*. 60:46-56.
- Cremer, M., Kupper, K., Wagler, B., Wizelman, L., von Hase, J., Weiland, Y., Kreja, L., Diebold, J., Speicher, M. R. und Cremer, T. 2003. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol*. 162:809-20.
- Cremer, M., von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C. und Cremer, T. 2001. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res*. 9:541-67.
- Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. und Bickmore, W. A. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*. 145:1119-31.
- Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D. E., Roh, T. Y., Cui, K. und Zhao, K. 2009. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res*. 19:24-32.
- Cuny, G., Soriano, P., Macaya, G. und Bernardi, G. 1981. The major components of the mouse and human genomes. 1. Preparation, basic properties and compositional heterogeneity. *Eur J Biochem*. 115:227-33.
- de la Luna, S., Allen, K. E., Mason, S. L. und La Thangue, N. B. 1999. Integration of a growth suppressing BTB/POZ domain protein with the DP component of the E2F transcription factor. *The EMBO journal*. 18:212-228
- de Ruijter, A. J., Meinsma, R. J., Bosma, P., Kemp, S., Caron, H. N. und van Kuilenburg, A. B. 2005. Gene expression profiling in response to the histone deacetylase inhibitor BL1521 in neuroblastoma. *Experimental cell research*. 309:451-67.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. und van Kuilenburg, A. B. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 370:737-49.
- Defossez, P. A., Gilson, E. 2002. The vertebrate protein CTF functions as an insulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 30:5136-41

- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. und Kleckner, N. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science*. 295:1306-11.
- Deshane, J., Kim, J., Bolisetty, S., Hock, T. D., Hill-Kapturczak, N. und Agarwal, A. 2010. Sp1 regulates chromatin looping between an intronic enhancer and distal promoter of the human heme oxygenase-1 gene in renal cells. *J Biol Chem*. 285:16476-86.
- Dialynas, G. K., Makatsori, D., Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., McLean, K., Terjung, S., Singh, P. B. und Georgatos, S. D. 2006. Methylation-independent binding to histone H3 and cell cycle-dependent incorporation of HP1beta into heterochromatin. *J Biol Chem*. 281:14350-60.
- Dimitrova, D. S. und Berezney, R. 2002. The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J Cell Sci*. 115:4037-51.
- Docquier, F., Farrar, D., D'Arcy, V., Chemukhin, I., Robinson, A. F., Loukinov, D., Vatolin, S., Pack, S., Mackay, A., Harris, R. A., Dorricott, H., O'Hare, M. J., Lobanenko, V. und Klenova, E. 2005. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. *Cancer Res*. 65:5112-22
- Dostie, J., Richmond, T. A., Arnaout, R. A., Selzer, R. R., Lee, W. L., Honan, T. A., Rubio, E. D., Krumm, A., Lamb, J., Nusbaum, C., Green, R.D. und Dekker, J. 2006. Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res*. 16:1299-309.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schoneberg, T., Otto, H. und Hucho, F. 2001. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11943-8.
- Duan, Z., Andronescu, M., Schutz, K., McIlwain, S., Kim, Y. J., Lee, C., Shendure, J., Fields, S., Blau, C. A. und Noble, W. S. A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature*. 465:363-7.
- Dundr, M., Ospina, J. K., Sung, M. H., John, S., Upender, M., Ried, T., Hager, G. L. und Matera, A. G. 2007. Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo. *J Cell Biol*. 179:1095-103.
- Dunn, K. L., Zhao, H. und Davie, J. R. 2003. The insulator binding protein CTCF associates with the nuclear matrix. *Exp Cell Res*. 1:218-23.
- Dutrillaux, B., Couturier, J., Richer, C. L. und Viegas-Pequignot, E. 1976. Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment. *Chromosoma*. 288:51-61.
- Edmondson, D. G., Davie, J. K., Zhou, J., Mirnikjoo, B., Tatchell, K. und Dent, S. Y. 2002. Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J Biol Chem*. 277:29496-502.
- Egelman, E. H. 2003. A tale of two polymers: new insights into helical filaments. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:621-30.
- Ellis, L., Pan, Y., Smyth, G. K., George, D. J., McCormack, C., Williams-Truax, R., Mita, M., Beck, J., Burris, H., Ryan, G., Atadja, P., Butterfoss, D., Dugan, M., Culver, K., Johnstone, R. W. und Prince, H. M. 2008. Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces clinical responses with associated alterations in gene expression profiles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 14:4500-10.

- Englmann, A. 2005a. Kernpositionierung und funktionelle Regulation von Genen der Humanen CFTR-Region auf Chromosom 7. Fakultät für Biologie. LMU München, Englmann, A., Clarke, L. A., Christan, S., Amaral, M. D., Schindelbauer, D. und Zink, D. 2005b. The replication timing of CFTR and adjacent genes. *Chromosome Res.* 13:183-94.
- Espinosa, J. M. und Emerson, B. M. 2001. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell.* 8:57-69.
- Euskirchen, G. M., Auerbach, R. K., Davidov, E., Gianoulis, T. A., Zhong, G., Rozowsky, J., Bhardwaj, N., Gerstein, M. B. und Snyder, M. 2011. Diverse Roles and Interactions of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex Revealed Using Global Approaches. *PLoS genetics.* 7:e1002008.
- Farrar, D., Rai, S., Chernukhin, I., Jagodic, M., Ito, Y., Yammine, S., Ohlsson, R., Murrell, A. und Klenova, E. 2010. Mutational analysis of the poly(ADP-ribosyl)ation sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosyl)ation. *Mol Cell Biol.* 30:1199-216.
- Ferraiuolo, M. A., Rousseau, M., Miyamoto, C., Shenker, S., Wang, X. Q., Nadler, M., Blanchette, M. und Dostie, J. 2010. The three-dimensional architecture of Hox cluster silencing. *Nucleic Acids Res.* 38:7472-84
- Ferreira, J., Paoella, G., Ramos, C. und Lamond, A. I. 1997. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol.* 139:1597-610.
- Finlan, L. E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J. R. und Bickmore, W. A. 2008. Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet.* 4:e1000039.
- Fogh, J., Fogh, J. M. und Orfeo, T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 59:221-6.
- Fogh, J., Wright, W. C. und Loveless, J. D. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 58:209-14.
- Foisner, R. 2001. Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J Cell Sci.* 114:3791-2.
- Fromaget, M. und Cook, P. R. 2007. Photobleaching reveals complex effects of inhibitors on transcribing RNA polymerase II in living cells. *Exp Cell Res.* 313:3026-33.
- Furukawa, K. 1999. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci.* 112:2485-92.
- Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M. und Horinouchi, S. 2001. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:87-92.
- Gheldof, N., Smith, E. M., Tabuchi, T. M., Koch, C. M., Dunham, I., Stamatoyannopoulos, J. A. und Dekker, J. 2010. Cell-type-specific long-range looping interactions identify distant regulatory elements of the CFTR gene. *Nucleic Acids Res.* 38:4325-36.
- Gonsior, S. M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B. M. und Hinssen, H. 1999. Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci.* 112:797-809.
- Gorisch, S. M., Wachsmuth, M., Toth, K. F., Lichter, P. und Rippe, K. 2005. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci.* 118:5825-34.

- Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G. I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A. I., Aebersold, R., Raught, B. und Gingras, A. C. 2009. A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol Cell Proteomics*. 8:157-71.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36:59-74.
- Grzanka, A., Grzanka, D. und Orlikowska, M. 2004. Fluorescence and ultrastructural localization of actin distribution patterns in the nucleus of HL-60 and K-562 cell lines treated with cytostatic drugs. *Oncol Rep*. 11:765-70.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. und van Steensel, B. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*. 453:948-51.
- Guelman, S., Suganuma, T., Florens, L., Swanson, S. K., Kiesecker, C. L., Kusch, T., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd, Washburn, M. P., Abmayr, S. M. und Workman, J. L. 2006. Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Molecular and cellular biology*. 26:871-82.
- Ha, M., Ng, D.W., Li, W.H. und Chen, Z.J. 2011. Coordinated histone modifications are associated with gene expression variation within and between species. *Genome Res*. 21:590-8.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K. L. und Hiraoka, Y. 2001. BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci*. 114:4575-85.
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M. und Tilghman, S. M. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*. 405:486-9.
- Hazzalin, C. A. und Mahadevan, L. C. 2005. Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun. *PLoS Biol*. 3:e393.
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E. und Ren, B. 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics*. 39:311-8.
- Hepperger, C., Otten, S., von Hase, J. und Dietzel, S. 2007. Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments. *Chromosoma*. 116:117-33.
- Hinshaw, J. E., Carragher, B. O. und Milligan, R. A. 1992. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell*. 69:1133-41.
- Holaska, J. M., Lee, K.K., Kowalski, A.K. und Wilson, K. L. 2003. Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier-to-autointegration-factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J. Biol. Chem*. 278, 6969-6975.
- Holaska, J. M., Kowalski, A. K. und Wilson, K. L. 2004. Emerin Caps the pointed End of Actin Filaments: Evidence for an Actin Cortical Network at the Nuclear Inner Membrane. *PLOS Biol*. 2:e231

- Holaska, J. M. und Wilson, K. L. 2007. An emerin "proteome": purification of distinct emerin-containing complexes from HeLa cells suggests molecular basis for diverse roles including gene regulation, mRNA splicing, signaling, mechanosensing, and nuclear architecture. *Biochemistry*. 46:8897-908.
- Hou, C., Dale, R. und Dean, A. 2010. Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:3651-6.
- Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A. und Cook, P. R. 1996. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei. *J. Cell Sci*. 109:1427-1436
- Jackson, V., Shires, A., Chalkley, R. und Granner, D. K. 1975. Studies on highly metabolically active acetylation and phosphorylation of histones. *J Biol Chem*. 250:4856-63.
- Jin, C., Zhang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., Felsenfeld, G. 2009. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nature Genetics* 41:941-945
- Jothi, R., Cuddapah, S., Barski, A., Cui, K. und Zhao, K. 2008. Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*. 36:5221-31.
- Keshava Prasad, T. S., Goel, R., Kandasamy, K., Keerthikumar, S., Kumar, S., Mathivanan, S., Telikicherla, D., Raju, R., Shafreen, B., Venugopal, A., Balakrishnan, L., Marimuthu, A., Banerjee, S., Somanathan, D. S., Sebastian, A., Rani, S., Ray, S., Harrys Kishore, C. J., Kanth, S., Ahmed, M., Kashyap, M. K., Mohmood, R., Ramachandra, Y. L., Krishna, V., Rahiman, B. A., Mohan, S., Ranganathan, P., Ramabadrana, S., Chaerkady, R. und Pandey, A. 2009. Human Protein Reference Database--2009 update. *Nucleic acids research*. Database issue:D767-72.
- Kheradmand Kia, S., Solaimani Kartalaei, P., Farahbakhshian, E., Pourfarzad, F., von Lindern, M. und Verrijzer, C. P. 2009. EZH2-dependent chromatin looping controls INK4a and INK4b, but not ARF, during human progenitor cell differentiation and cellular senescence. *Epigenetics Chromatin*. 2:16.
- Kim, M. A., Johannsmann, R. und Grzeschik, K. H. 1975. Giemsa staining of the sites replicating DNA early in human lymphocyte chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*. 15:363-71.
- Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X. J. und Zhao, Y. 2006. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*. 23:607-18.
- Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D., Zhang, M. Q., Lobanenkov, V. V. und Ren, B. 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*. 128:1231-45.
- Kim, T. H., Barrera, L. O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M. A., Richmond, T. A., Wu, Y., Green, R. D. und Ren, B. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436:876-880
- Kiseleva, E., Drummond, S. P., Goldberg, M. W., Rutherford, S. A., Allen, T. D. und Wilson, K. L. 2004. Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore

- complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *Journal of cell science*. 117:2481-90.
- Kitchen, N. S. und Schoenherr, C. J. 2010. Sumoylation modulates a domain in CTCF that activates transcription and decondenses chromatin. *J Cell Biochem*. 111:665-75.
- Klenova, E. M., Chernukhin, I. V., El-Kady, A., Lee, R. E., Pugacheva, E. M., Loukinov, D. I., Goodwin, G. H., Delgado, D., Filippova, G. N., Leon, J., Morse, H. C., 3rd, Neiman, P. E. und Lobanenkov, V. V. 2001. Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol*. 21:2221-34.
- Koch, C. M., Andrews, R. M., Flicek, P., Dillon, S. C., Karaoz, U., Clelland, G. K., Wilcox, S., Beare, D. M., Fowler, J. C., Couttet, P., James, K. D., Lefebvre, G. C., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Dhami, P., Langford, C. F., Weng, Z., Birney, E., Carter, N. P., Vetrie, D. und Dunham, I. 2007. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res*. 17:691-707.
- Kosak, S. T., Skok, J. A., Medina, K. L., Riblet, R., Le Beau, M. M., Fisher, A. G. Singh, H. 2002. Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296: 158-162
- Kouzarides, T. 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J*. 19:1176-9.
- Krull, S., Dörries, J., Boysen, B., Reidenbach, S., Magnius, L., Norder, H., Thyberg, J. und Cordes, V. C. 2010. Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *The EMBO Journal*. 29, 1659-1673
- Kumaran, R. I. und Spector, D. L. 2008. A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence. *J Cell Biol*. 180:51-65.
- Kurdistani, S. K., Tavazoie, S. und Grunstein, M. 2004. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell*. 117:721-33.
- Kurz, A., Lampel, S., Nickolenko, J.E., Bradl, J., Benner, A., Zirbel, R.M., Cremer, T. und Lichter, P. 1996 Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol*. 135:1195-205.
- Lee, K. K., Haraguchi, T., Lee, R. S., Koujin, T., Hiraoka, Y. und Wilson, K. L. 2001. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J Cell Sci*. 114:4567-73.
- LeRoy, G., Weston, J. T., Zee, B. M., Young, N. L., Plazas-Mayorca, M. D. und Garcia, B. A. 2009. Heterochromatin protein 1 is extensively decorated with histone code-like post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics*. 8:2432-42.
- Levy-Young, B. K. und Navre, M. 1992. Growth and developmental regulation of wnt-2 (irp) gene in mesenchymal cells of fetal lung. *Am J Physiol*. 262:L672-83.
- Levinger, L. und Varshavsky, A. 1982. Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell*. 28:375-85.
- Lieb, J. D., Liu, X., Botstein, D. und Brown, P. O. 2001. Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet*. 28:327-34.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., Dorschner, M. O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M. A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L. A.,

- Lander, E. S. und Dekker, J. 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 326:289-93.
- Lima-de-Faria, A. 1959. Differential Uptake of Tritiated Thymidine into Hetero- and Euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 6:457-466.
- Lin, R., Leone, J. W., Cook, R. G. und Allis, C. D. 1989. Antibodies specific to acetylated histones document the existence of deposition- and transcription-related histone acetylation in *Tetrahymena*. *J Cell Biol.* 108:1577-88.
- Liu, Z., Cao, J., Gao, X., Zhou, Y., Wen, L., Yang, X., Yao, X., Ren, J. und Xue, Y. 2011. CPLA 1.0: an integrated database of protein lysine acetylation. *Nucleic acids research*. Database issue 39:D1029-34.
- Luther, K. 2003. Untersuchung zur Positionierung des „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)-Gens im Zellkern. Fakultät für Biologie. LMU München, München. 1-102.
- Ma, L., Buchold, G. M., Greenbaum, M. P., Roy, A., Burns, K. H., Zhu, H., Han, D. Y., Harris, R. A., Coarfa, C., Gunaratne, P. H., Yan, W. und Matzuk, M. M. 2009. GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS Genet.* 5:e1000635.
- Ma, P. C., Jagadeesh, S., Jagadeeswaran, R., Fox, E. A., Christensen, J., Maulik, G., Naoki, K., Schaefer, E., Lader, A., Richards, W., Sugarbaker, D., Meyerson, M. und Salgia, R. 2004. c-MET expression/activation, functions, and mutations in non-small cell lung cancer. *AACR Meeting Abstracts*. 1:430-c-431.
- Maeshima, K., Yahata, K., Sasaki, Y., Nakatomi, R., Tachibana, T., Hashikawa, T., Imamoto, F. und Imamoto, N. 2006. Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *J Cell Sci.* 119:4442-51.
- Majumder, P., Gomez, J. A., Chadwick, B. P. und Boss, J. M. 2008. The insulator factor CTCF controls MHC class II gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions. *J. Exp. Med.* 205:785-98
- Manuelidis, L. 1984. Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:3123-7.
- Mansharamani, M. und Wilson, K. L. 2005. Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J. Biol. Chem.* 280:13863-13870
- Markiewicz, E., Tilgner, K., Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., Dorobek, M., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Ramaekers, F. C., Broers, J. L., Blankesteyn, W. M., Salpingidou, G., Wilson, R. G., Ellis, J. A. und Hutchison, C. J. 2006. The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *The EMBO journal.* 25:3275-85.
- Martin, R. M., Gorisch, S. M., Leonhardt, H. und Cardoso, M. C. 2007. An unexpected link between energy metabolism, calcium, chromatin condensation and cell cycle. *Cell Cycle.* 6:2422-4.
- Martin, S. und Pombo, A. 2003. Transcription factories: quantitative studies of nanostructures in the mammalian nucleus. *Chromosome Res.* 11:461-70.
- Martinez, S. R. und Miranda, J. L. 2010. CTCF terminal segments are unstructured. *Protein Sci.* 19:1110-6.

- Masternak, K., Peyraud, N., Krawczyk, M., Barras, E. und Reith, W. 2003. Chromatin remodeling and extragenic transcription at the MHC class II locus control region. *Nat Immunol.* 4:132-7.
- McCarthy, V. A. und Harris, A. 2005. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol.* 40:1-8.
- Mehta, I. S., Amira, M., Harvey, A. J. und Bridger, J. M. 2010. Rapid chromosome territory relocation by nuclear motor activity in response to serum removal in primary human fibroblasts. *Genome Biol.* 11:R5.
- Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C. und Horikawa, I. 2005. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell.* 16:4623-35.
- Misteli, T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell.* 128:787-800.
- Montes de Oca, R., Lee, K. K. und Wilson, K. L. 2005. Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1. *J Biol Chem.* 280:42252-62.
- Mouchel, N., Henstra, S. A., McCarthy, V. A., Williams, S. H., Phylactides, M. und Harris, A. 2004. HNF1alpha is involved in tissue-specific regulation of CFTR gene expression. *Biochem J.* 378:909-18.
- Murray, K. 1964. THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES. *Biochemistry.* 3:10-5.
- Nagy, Z., Riss, A., Fujiyama, S., Krebs, A., Orpinell, M., Jansen, P., Cohen, A., Stunnenberg, H. G., Kato, S. und Tora, L. 2010. The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 67:611-28.
- Nakayasu, H. und Berezney, R. 1989. Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol.* 108:1-11.
- Nelson, C. J., Santos-Rosa, H. und Kouzarides, T. 2006. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell.* 126:905-16.
- Niedojadlo, J., Perret-Vivancos, C., Kalland, K. H., Cmarko, D., Cremer, T., van Driel, R. und Fakan, S. 2011. Transcribed DNA is preferentially located in the perichromatin region of mammalian cell nuclei. *Exp. Cell. Res.* 317:433-444
- Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Remboutsika, E., Chambon, P. und Losson, R. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell.* 7:729-39.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E. und Kouzarides, T. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature.* 412:561-5.
- Nili, E., Cojocar, G. S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Berger, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Brok-Simoni, F., Simon, A. J. und Rechavi, G., 2001. Nuclear membrane protein, LAP2 $\beta$ , mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ cell-less). *J. Cell. Sci.* 114:3297-3307
- Ninios, Y. P., Sekeri-Pataryas, K. E. und Sourlingas, T. G. 2010. Differential sensitivity of human leukemic cell lines to the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A. *Leuk Res.* 34:786-92.

- Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I. und Sakai, H. 1987. Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:5262-6.
- Nishizuka, Y., Ueda, K., Honjo, T. und Hayaishi O. 1968. Enzymic adenosine diphosphate ribosylation of histone and poly adenosine diphosphate ribose synthesis in rat liver nuclei. *J Biol Chem.* 243:3765-7.
- Noma, K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Moazed, D. und Grewal, S. I. 2004. RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet.* 36:1174-80.
- Nuthall, H. N., Moulin, D.S., Huxley, C., Harris, A. 2000. Analysis of DNase I hypersensitive sites at the 3' end of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem. J.* 341:601-611
- Nuthall, H. N., Vassaux, G., Huxley, C., Harris, A. 1999 Analysis of a DNase I hypersensitive site located -20.9 kb upstream of the CFTR gene. *Eur. J.Biochem.* 266:431-443
- O'Geen, H., Nicolet, C. M., Blahnik, K., Green, R. und Farnham, P. J. 2006. Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays. *Biotechniques.* 41:577-80.
- O'Keefe, R. T., Henderson, S. C. und Spector, D. L. 1992. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol.* 116:1095-110.
- Ord, M. G. und Stocken, L. A. 1966. Metabolic properties of histones from rat liver and thymus gland. *Biochem J.* 98:888-97.
- Ott, C. J., Blackledge, N. P., Kerschner, J. L., Leir, S. H., Crawford, G. E., Cotton, C. U. und Harris, A. 2009. Intronic enhancers coordinate epithelial-specific looping of the active CFTR locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:19934-9.
- Ott, C. J., Blackledge, N. P., Leir, S. H. und Harris, A. 2009. Novel regulatory mechanisms for the CFTR gene. *Biochem Soc Trans.* 37:843-8.
- Ott, C. J. und Harris, A., 2010. Genomic approaches for the discovery of CFTR regulatory elements. *Transcription* 2:23-27
- Ott, C. J., Suszko, M., Blackledge, N. P., Wright, J. E., Crawford, G. E. und Harris, A. 2009. A complex intronic enhancer regulates expression of the CFTR gene by direct interaction with the promoter. *J Cell Mol Med.* 13:680-92.
- Ottaviani, A., Rival-Gervier, S., Boussouar, A., Foerster, A. M., Rondier, D., Sacconi, S., Desnuelle, C., Gilson, E. und Magdinier, F. 2009. The D4Z4 macrosatellite repeat acts as a CTCF and A-type lamins-dependent insulator in facio-scapulo-humeral dystrophy. *PLoS Genet.* 5:e1000394.
- Pante, N. und Aebi, U. 1996. Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 31:153-99.
- Paul, T., Li, S., Khurana, S., Leleiko, N. S. und Walsh, M. J. 2007. The epigenetic signature of CFTR expression is co-ordinated via chromatin acetylation through a complex intronic element. *Biochem J.* 408:317-26.
- Peart, M. J., Smyth, G. K., van Laar, R. K., Bowtell, D. D., Richon, V. M., Marks, P. A., Holloway, A. J. und Johnstone, R. W. 2005. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102:3697-702.

- Pendleton, A., Pope, B., Weeds, A. und Koffer, A. 2003. Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem.* 278:14394-400.
- Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S. W., Solovei, I., Brugman, W., Graf, S., Flicek, P., Kerkhoven, R. M., van Lohuizen, M., Reinders, M., Wessels, L. und van Steensel, B. 2010. Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol Cell.* 38:603-13.
- Phillips, J. E. und Corces, V. G. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell.* 137:1194-211.
- Phylactides, M., Nuthall, H.N., Majetti, M.E., Harris, A., 2002. Evaluation of potential regulatory elements identified as DNaseI hypersensitive sites in the CFTR gene. *Eur. J. Biochem.* 269:553-559
- Pickersgill, H., Kalverda, B., de Wit, E., Talhout, W., Fomerod, M. und van Steensel, B. 2006. Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet.* 38:1005-14.
- Pikaart, M. J., Recillas-Targa, F. und Felsenfeld, G. 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* 12:2852-62.
- Qi, C. F., Martensson, A., Mattioli, M., Dalla-Favera, R., Lobanenko, V. V. und Morse, H. C. 2003. CTCF functions as a critical regulator of cell-cycle arrest and death after ligation of the B cell receptor on immature B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:633-8
- Rabl, C. 1885. Ueber Zelltheilung. *Morphol. Jahrbuch.* 10.
- Rada-Iglesias, A., Enroth, S., Ameer, A., Koch, C. M., Clelland, G. K., Respuela-Alonso, P., Wilcox, S., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Dunham, I., Komorowski, J. und Wadelius, C. 2007. Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res.* 17:708-19.
- Ragoczy, T., Bender, M. A., Telling, A., Byron, R., Groudine, M. 2006. The locus control region is required for association of the murine  $\beta$ -Globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes. Dev.* 20:1447-1457
- Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E. und Singh, H. 2008. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature.* 452:243-7.
- Reeves, R. und Beckerbauer, L. 2001. HMG1/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta.* 1519:13-29.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T.L., Wilson, C.J., Bell, S.P. und Young, R. A. 2000. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science.* 290:2306-9.
- Rhead, B., Karolchik, D., Kuhn, R. M., Hinrichs, A. S., Zweig, A. S., Fujita, P. A., Diekhans, M., Smith, K. E., Rosenbloom, K. R., Raney, B. J., Pohl, A., Pheasant, M., Meyer, L. R., Learned, K., Hsu, F., Hillman-Jackson, J., Harte, R. A., Giardine, B., Dreszer, T. R., Clawson, H., Barber, G. P., Haussler, D. und Kent, W. J. The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Res. Database issue:*D613-9.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L. und et al. 1989. Identification of the

- cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245:1066-73.
- Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., Zeng, T., Euskirchen, G., Bernier, B., Varhol, R., Delaney, A., Thiessen, N., Griffith, O. L., He, A., Marra, M., Snyder, M. und Jones, S. 2007. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods*. 4:651-7.
- Roh, T.Y., Cuddapah, S., Cui, K. und Zhao, K. 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:15782-15787
- Roh, T.Y., Cuddapah, S. und Zhao, K. 2005. Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev.* 2005 19:542-52.
- Rosenfeld, J. A., Wang, Z., Schones, D. E., Zhao, K., DeSalle, R. und Zhang, M. Q. 2009. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics*. 10:143.
- Ross, R. A., Spengler, B. A. und Biedler, J. L. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 71:741-7.
- Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. und Allis, C. D. 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:983-94.
- Rybakina, E. 2006. Nuclear positioning and functional regulation of endogenous genes and transgenes in the fruit fly *Drosophila melanogaster* and in mammalian cells. Fakultät für Biologie. LMU München,
- Sabo, P.J., Hawrylycz, M., Wallace, J.C., Humbert, R., Yu, M., Shafer, A., Kawamoto, J., Hall, R., Mack, J., Dorschner, M., McArthur, M., und Stamatoyannopoulos, J.A. 2004. Discovery of functional noncoding elements by digital analysis of chromatin structure. *PNAS*. 101:16837-16842.
- Sabo, P.J., Kuehn, M.S., Thurman, R., Johnson, B.E., Johnson, E.M., Cao, H., Yu, M., Rosenzweig, E., Goldy, J., Haydock, A., Weaver, M., Shafer, A., Lee, K., Neri, F., Humbert, R., Singer, M.A., Richmond, T.A., Dorschner, M.O., McArthur, M., Hawrylycz, M., Green, R.D., Navas, P.A., Noble, W.S. und Stamatoyannopoulos J.A. (2006) Genome-scale mapping of DNase I sensitivity in vivo using tiling DNA microarrays. *Nature Methods*. 3:511-518.
- Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C., Bernardi, G., Cremer, T., Turner, B. M. und Zink, D. 1999. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol.* 146:1211-26.
- Sadoni, N., Targosz, B. S., Englmann, A., Fesser, S., Koch, J., Schindelhauer, D. und Zink, D. 2008. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and conserved adjacent loci are not conserved in human and murine nuclei. *Chromosoma*. 117:381-97.
- Sadoni, N. und Zink, D. 2004. Nascent RNA synthesis in the context of chromatin architecture. *Chromosome Res.* 12:439-51.
- Sasaki, K., Ito, T., Nishino, N., Khochbin, S. und Yoshida, M. 2009. Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:16257-62.

- Scherer, W. F. und Hoogasian, A. F. 1954. Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa). *Proc Soc Exp Biol Med.* 87:480-7.
- Schermelleh, L., Solovei, I., Zink, D. und Cremer, T. 2001. Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells. *Chromosome Res.* 9:77-80.
- Shiio, Y. und Eisenman, R.N. 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13225-30.
- Schiltz, R. L., Mizzen, C. A., Vassilev, A., Cook, R. G., Allis, C. D. und Nakatani, Y. 1999. Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *The Journal of biological chemistry.* 274:1189-92.
- Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R., 3rd und Gerace, L. 2003. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science.* 301:1380-2.
- Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R., 3rd und Gerace, L. 2005. Identification of novel integral membrane proteins of the nuclear envelope with potential disease links using subtractive proteomics. *Novartis Found Symp.* 264; discussion 76-80, 227-30.
- Schneider, R. und Grosschedl, R. 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21:3027-43.
- Schoenenberger, C. A., Buchmeier, S., Boerries, M., Sutterlin, R., Aebi, U. und Jockusch, B. M. 2005. Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. *J Struct Biol.* 152:157-68.
- Sealy, L. und Chalkley, R. 1978. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell.* 14:115-21.
- Shimabukuro, K., Ichinose, S., Koike, R., Kubota, T., Yamaguchi, M., Miyasaka, M. und Aso, T. 2001. Hepatocyte growth factor/scatter factor is implicated in the mode of stromal invasion of uterine squamous cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 83:205-15.
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B. und de Laat, W. 2006. Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet.* 38:1348-54.
- Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S., Pack, C. G., Solovei, I., Goldman, A. E., Adam, S. A., Shumaker, D. K., Kinjo, M., Cremer, T. und Goldman, R. D. 2008. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* 22:3409-21.
- Shmueli, O., Horn-Saban, S., Chalifa-Caspi, V., Shmoish, M., Ophir, R., Benjamin-Rodrig, H., Safran, M., Domany, E. und Lancet, D. 2003. GeneNote: whole genome expression profiles in normal human tissues. *C R Biol.* 326:1067-72.
- Smith, A. N., Nuthall, H. N., Majetti, M. E., Harris, A. Multiple potential intragenic regulatory elements in the CFTR gene. *Genomics* 64:90-96
- Smith, A. N., Wardle, C.J., Harris, A. 1995 Characterization of DNASE I hypersensitive sites in the 120 kb 5' to the CFTR gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211:274-281

- Solomon, M. J., Larsen, P. L. und Varshavsky, A. 1988. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*. 53:937-47.
- Solovei, I., Kreysing, M., Lanctot, C., Kosem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J. und Joffe, B. 2009. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell*. 137:356-68.
- Somech, R., Shaklai, S., Geller, O., Amariglio, N., Simon, A. J., Rechavi, G. und Gal-Yam, E. N. 2005. The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J Cell Sci*. 118:4017-25.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T. und Kramer, O. H. 2009. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:185-98.
- Stack, S. M., Brown, D.B. und Dewey, W.C. . 1977 Visualization of interphase chromosomes. *J Cell Sci*. 26:281-99.
- Strahl, B. D. und Allis, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.
- Su, X., Zhang, L., Lucas, D. M., Davis, M. E., Knapp, A. R., Green-Church, K. B., Marcucci, G., Parthun, M. R., Byrd, J. C. und Freitas, M. A. 2007. Histone H4 acetylation dynamics determined by stable isotope labeling with amino acids in cell culture and mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 363:22-34.
- Sun, J. M., Chen, H. Y. und Davie, J. R. 2001. Effect of estradiol on histone acetylation dynamics in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 276:49435-42.
- Takahashi, H., McCaffery, J. M., Irizarry, R. A. und Boeke, J. D. 2006. Nucleocytosolic acetyl-coenzyme a synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Mol Cell*. 23:207-17.
- Tanabe, H., Habermann, F. A., Solovei, I., Cremer, M., Cremer, T. 2002. Non-random radial arrangement of interphase territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res*. 504:37-45
- Tanabe, H., Muller, S., Neusser, M., von Hase, J., Calcagno, E., Cremer, M., Solovei, I., Cremer, C. und Cremer, T. 2002. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:4424-9.
- Tatamiya, T., Saito, A., Sugawara, T. und Nakanishi, O. 2004. Isozyme-selective activity of the HDAC inhibitor MS-275. *AACR Meeting Abstracts*. 1:567-a-
- Taverna, S. D., Ueberheide, B. M., Liu, Y., Tackett, A. J., Diaz, R. L., Shabanowitz, J., Chait, B. T., Hunt, D. F. und Allis, C. D. 2007. Long-distance combinatorial linkage between methylation and acetylation on histone H3 N termini. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:2086-91.
- Thome, A. W., Kmiciek, D., Mitchelson, K., Sautiere, P. und Crane-Robinson, C. 1990. Patterns of histone acetylation. *European journal of biochemistry / FEBS*. 193:701-13.
- Tolhuis, B., Palstra, R. J., Splinter, E., Grosveld, F. und de Laat, W. 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell*. 10:1453-65.

- Toth, K. F., Knoch, T. A., Wachsmuth, M., Frank-Stohr, M., Stohr, M., Bacher, C. P., Muller, G. und Rippe, K. 2004. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci.* 117:4277-87.
- Tumbar, T. und Belmont, A. S. 2001. Interphase movements of DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator. *Nat. Cell. Biol.* 3:134-139
- Turner, B. M., O'Neill, L. P. und Allan, I. M. 1989. Histone H4 acetylation in human cells. Frequency of acetylation at different sites defined by immunolabeling with site-specific antibodies. *FEBS Lett.* 253:141-5.
- Vaquerizas, J. M., Suyama, R., Kind, J., Miura, K., Luscombe, N. M. und Akhtar, A. 2010. Nuclear pore proteins nup153 and megator define transcriptionally active regions in the Drosophila genome. *PLoS Genet.* 6:e1000846.
- Vernimmen, D., De Gobbi, M., Sloane-Stanley, J. A., Wood, W. G. und Higgs, D. R. 2007. Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression. *EMBO J.* 26:2041-51.
- Verschure, P. J., van der Kraan, I., Manders, E. M., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A. B. und van Driel, R. 2003. Condensed chromatin domains in the mammalian nucleus are accessible to large macromolecules. *EMBO Rep.* 4:861-6.
- Verschure, P. J., van Der Kraan, I., Manders, E. M. und van Driel, R. 1999. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J Cell Biol.* 147:13-24.
- Vigushin, D. M., Ali, S., Pace, P. E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I. und Coombes, R. C. 2001. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res.* 7:971-6.
- Volpi, E. V., Chevret, E., Jones, T., Vatcheva, R., Williamson, J., Beck, S., Campbell, R. D., Goldsworthy, M., Powis, S. H., Ragoussis, J., Trowsdale, J., Sheer, D. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* 113:1565-1576
- Walther, P. 2008. High-resolution cryo-SEM allows direct identification of F-actin at the inner nuclear membrane of Xenopus oocytes by virtue of its structural features. *J Microsc.* 232:379-85.
- Wang, J., Da, X., Xiang, Q., Deng, Y., Feng, J., Dai, Z. und He, C. 2010. Identifying the combinatorial effects of histone modifications by association rule mining in yeast. *Evol Bioinform Online.* 6:113-31.
- Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., Li, H., Xie, L., Zhao, W., Yao, Y., Ning, Z. B., Zeng, R., Xiong, Y., Guan, K. L., Zhao, S. und Zhao, G. P. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science.* 327:1004-7.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W. und Zhao, K. 2009. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell.* 138:1019-31.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Peng, W., Zhang, M. Q. und Zhao, K. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet.* 40:897-903.

- Wansink, D. G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R. und de Jong, L. 1993. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol.* 122:283-93.
- Waterborg, J. H. und Kapros, T. 2002. Kinetic analysis of histone acetylation turnover and Trichostatin A induced hyper- and hypoacetylation in alfalfa. *Biochem Cell Biol.* 80:279-93
- Wenzel, A., Cziepluch, C., Hamann, U., Schurmann, J. und Schwab, M. 1991. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J.* 10:3703-12.
- Williams, R.R., Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Dvorkina, M., Jorgensen, H., Roix, J., McQueen, P., Misteli, T., Merkschlager, M., Fisher, A. G., 2006. Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci.* 119:132-140
- Wilson, K. L. und Berk, J. M. 2010. The nuclear envelope at a glance. *J Cell Sci.* Pt 123:1973-8.
- Wolffe, A. P. und Hayes, J. J. 1999. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* 27:711-721
- Wondrak, G. T., Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L. und Jacobson, M. K. 2000. Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem J.* 351:769-77.
- Wu, X., Yoo, Y., Okuhama, N. N., Tucker, P. W., Liu, G. und Guan, J. L. 2006. Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nat Cell Biol.* 8:756-63.
- Yasui, D., Miyano, M., Cai, S., Varga-Weisz, P. und Kohwi-Shigematsu, T. 2002. SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature.* 419:641-5.
- Ye, J., Zhao, J., Hoffmann-Rohrer, U. und Grummt, I. 2008. Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 22:322-30.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. und Beppu, T. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* 265:17174-9.
- You, X., Wu, Y., Zeng, Y., Deng, Z., Qiu, H. und Yu, M. 2008. Mycoplasma genitalium-derived lipid-associated membrane proteins induce activation of MAPKs, NF-kappaB and AP-1 in THP-1 cells. *FEMS immunology and medical microbiology.* 52:228-36.
- Yusufzai, T. M., Tagami, H., Nakatani, Y. und Felsenfeld G. 2004. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell.* 30;13:291-8.
- Zenklusen, J. C., Conti, C. J. und Green, E. D. 2001. Mutational and functional analyses reveal that ST7 is a highly conserved tumor-suppressor gene on human chromosome 7q31. *Nat Genet.* 27:392-8.
- Zhang, D. E. und Nelson, D. A. 1988. Histone acetylation in chicken erythrocytes. Rates of deacetylation in immature and mature red blood cells. *Biochem J.* 250:241-5.
- Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Heqyi, L., Roberts, R. G., Weissber, P. L., Ellis, J. A., Shanahan, H. M. 2001. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-

- containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell. Science* 114:4485-98
- Zhang, W., Bone, J. R., Edmondson, D. G., Turner, B. M. und Roth, S. Y. 1998. Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J.* 17:3155-67.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y. und Guan, K. L. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science.* 327:1000-4.
- Zimmerman, S. B. und Minton, A. P. 1993. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 22:27-65.
- Zink, D., Amaral, M. D., Englmann, A., Lang, S., Clarke, L. A., Rudolph, C., Alt, F., Luther, K., Braz, C., Sadoni, N., Rosenecker, J. und Schindelbauer, D. 2004. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol.* 116:815-25.
- Zink, D., Bornfleth, H., Visser, A., Cremer, C. und Cremer, T. 1999. Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp Cell Res.* 247:176-88.
- Zirbel, R.M., Mathieu, U.R., Kurz, A., Cremer, T., Lichter, P. 1993 Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res.* 1:93-106.
- Zlatanova, J. und Caiafa, P. 2009. CTCF and its protein partners: divide and rule? *J Cell Sci.* 22:1275-84.

## 6 Anhang

Position	HeLa Kontrolle		HeLa TSA		HEK 293 Kontrolle		HEK 293 TSA		Calu-3 Kontrolle	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
1	2.27	1.08	1.61	0.78	0.93	0.06	2.68	0.36		
2	0.31	0.79	1.26	0.06	-0.11	0.10	-0.11	0.85	1.06	0.27
3	4.66	0.42	5.38	0.14	2.86	0.55	5.03	0.15	3.22	0.44
4	-0.43	0.44	-0.46	0.38	0.39	0.39	1.14	0.45	0.47	0.29
5	-0.37	0.47	1.51	0.39	0.84	0.16	1.81	0.26		
6	-0.70	0.32	-0.34	0.21	0.04	0.14	0.78	0.25		
7	5.52	0.07	5.77	0.04	4.05	0.25	4.80	0.35	3.97	0.18
8	0.47	0.12	0.43	0.15	0.68	0.14	1.72	0.24	0.29	0.49
9	0.36	0.36	1.90	0.73	0.53	0.25	2.13	0.46		
10					0.61	0.19	0.73	0.22		
11	-0.41	0.21	0.95	0.08	1.48	0.14	1.94	0.46		
12	0.11	0.51	1.18	0.26	1.79	0.15	1.37	0.34		
13	-0.08	0.30	0.89	0.36	1.71	0.85	2.51	0.34		
14	0.64	0.19	2.09	0.68	1.02	0.31	0.79	0.26		
15										
16	-0.28	0.76	1.80	0.72						
17	2.09	0.19	2.44	0.06						
18									3.23	0.19
19	0.26	0.17	0.16	0.31	0.45	0.29	0.98	0.27	1.99	0.20
20	1.58	0.23	1.98	0.34	0.98	0.12	0.36	0.40	1.71	0.11
21	0.38	0.42	1.28	0.45	0.76	0.19	1.19	0.27		
22	0.12	0.14	0.96	0.20	0.23	0.20	0.23	0.28	0.43	0.99
23	0.45	0.19	0.10	0.15	0.41	0.20	0.64	0.53	0.70	0.25
24	1.12	0.13	1.38	0.03	0.93	0.16	0.89	0.15	0.83	0.84
25	0.94	0.02	1.81	0.25	1.04	0.27	0.80	0.20	0.97	0.27
26	0.87	0.26	1.13	0.19	0.34	0.52	0.79	0.19	1.96	0.09
27	0.10	0.15	-0.30	0.21	0.65	0.23	1.27	0.17	4.24	0.28
28	1.22	0.17	1.13	0.20	0.95	0.31	1.40	0.24	3.36	0.16
29	2.45	0.01	3.07	0.15	0.37	0.41	-0.08	0.75	3.72	0.28
30	1.14	0.15	1.93	0.20	0.58	0.08	1.43	0.27	3.82	0.28
31	-0.66	0.17	-0.67	0.16	0.61	0.13	1.19	0.17	0.71	0.15
32	0.10	0.26	0.06	0.23					0.51	0.11
33	0.13	0.20	0.21	0.17					0.09	0.11
34	2.66	0.11	3.48	0.00	0.77	0.22	1.39	0.11	1.31	0.62
35	2.94	0.32	2.97	0.34	0.56	0.04	1.24	0.37	1.69	0.32
36	1.42	0.24	2.65	0.29	0.35	0.12	0.86	0.31	0.48	0.59
37	1.89	0.21	3.39	0.25	0.16	0.21	1.04	0.22	0.26	0.22
38	0.83	0.19	1.76	0.23	0.34	0.01	1.42	0.32	1.31	0.13
39	1.23	0.40	2.21	0.29	0.18	0.17	0.63	0.27	2.06	0.25
40	0.50	0.15	0.70	0.25	0.74	0.15	1.61	0.47	0.54	0.55
41	0.37	0.50	2.27	0.56	0.32	0.04	0.88	0.36	1.06	0.11
42	0.73	0.06	1.38	0.06	0.61	0.08	0.98	0.39	0.83	0.49

43	0.93	0.25	2.27	0.47	0.54	0.22	1.40	0.36	0.48	0.10
44	0.76	0.23	1.27	0.11	1.08	0.36	1.34	0.15	1.32	0.14
45	1.06	0.06	1.73	0.22	0.78	0.28	1.26	0.41	0.49	1.00
46	1.25	0.38	1.67	0.37	0.62	0.29	0.34	0.69	0.67	0.31
47	1.16	0.18	1.74	0.37	0.47	0.13	0.99	0.51	0.90	0.34
48	1.07	0.03	1.58	0.15	0.59	0.08	1.07	0.13	0.41	0.52
49	1.00	0.05	1.54	0.12	0.72	0.24	0.50	0.27	0.12	0.16
50	1.28	0.10	1.96	0.19	0.85	0.14	1.43	0.24	0.81	0.49
51	-0.05	0.04	0.37	0.16	0.44	0.09	0.45	0.13		
52	-0.35	0.07	-0.46	0.09	0.55	0.15	1.11	0.13		
53	0.85	0.18	1.85	0.16	0.89	0.38	1.26	0.50	1.89	0.24
54	0.74	0.79	0.73	0.41	0.61	0.05	1.29	0.21	2.64	1.06
55	1.36	0.69	1.35	0.24	0.66	0.00	0.76	0.34	4.03	0.48
56	0.72	0.26	0.65	0.18	0.58	0.23	0.79	0.47	3.22	0.22
57	1.77	0.24	2.03	0.30	0.87	0.18	0.45	0.17		
58	0.07	0.50	0.52	0.89					0.68	0.25
59	1.32	0.58	0.59	0.20	-0.08	0.06	1.70	0.26		
60	-0.11	0.44	0.96	0.55	1.13	0.06	2.01	0.11	0.68	0.21
61	-0.40	0.37	0.23	0.32	3.63	0.07	5.34	0.37	2.77	0.17
62	-0.95	0.62	-0.38	0.47	0.01	0.30	1.45	0.19	1.79	0.11
63	0.70	0.33	-0.46	1.29					-0.47	0.21

Tabelle 6: **Anreicherungen von H3ac bei den ChIP-qPCR Messungen in Calu-3, HEK 293 und HeLa Zellen.** Die Tabelle gibt die Mittelwerte (MW) sowie den Standardfehler (SE) der gemessenen Differenzen in den  $C_T$ -Werten zwischen H3ac und H3pan an. Angegeben sind die Messungen in unbehandelten und TSA-behandelten HeLa und HEK 293 Zellen, sowie in unbehandelten Calu-3 Zellen an. Spalte 1 gibt die Position des jeweiligen Primerpaares (die Nummern entsprechen denen in Abb.29, für die exakten Koordinaten siehe 2.1.10)

Position	HeLa Kontrolle		HeLa TSA		HEK 293 Kontrolle		HEK 293 TSA		Calu-3 Kontrolle	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
1					0.30	0.06	1.39	0.36		
2					0.00	0.10	-0.04	0.85	2.10	0.13
3	4.33	0.08	4.63	0.14	3.02	0.55	4.33	0.15	4.01	0.20
4	0.74	0.31	0.53	0.17	0.42	0.39	1.17	0.45	1.69	0.17
5					1.22	0.16	1.83	0.26		
6					0.18	0.14	0.91	0.25		
7	2.52	0.11	4.60	0.04	2.34	0.25	4.34	0.35	2.39	0.18
8	1.01	0.11	0.95	0.02	0.49	0.14	1.68	0.24	1.63	0.23
9					0.55	0.25	1.45	0.46		
10					0.57	0.19	0.50	0.22		
11					1.27	0.14	1.34	0.46		
12					0.85	0.15	0.97	0.34		
13					0.40	0.85	2.28	0.34		
14					1.12	0.31	0.07	0.26		
15										
16										
17	-0.29	0.23	1.54	0.73						
18	0.88	0.63	0.83	0.28					3.42	0.12
19	0.51	0.22	0.63	0.11	0.22	0.29	0.38	0.27	3.67	0.10
20	0.07	0.31	2.24	0.64	0.49	0.12	0.80	0.40	2.54	0.06
21	2.14	0.23	2.06	0.23	0.57	0.19	0.51	0.27		
22	0.21	0.37	0.37	0.27	-0.12	0.20	0.08	0.28	1.36	0.56
23	-0.16	0.23	0.56	0.25	0.12	0.20	0.30	0.53	1.79	0.16
24	2.32	0.03	1.90	0.17	0.57	0.16	0.84	0.15	1.71	0.25
25	2.45	0.19	2.36	0.05	0.43	0.27	0.40	0.20	1.86	0.06
26	1.42	0.10	2.54	0.17	0.13	0.52	0.96	0.19	1.54	0.09
27	0.68	0.17	1.13	0.17	0.44	0.23	0.56	0.17	4.00	0.15
28	1.32	0.19	1.36	0.18	0.70	0.31	0.89	0.24	2.56	0.07
29	2.65	0.05	2.68	0.23	0.03	0.41	0.05	0.75	2.25	0.09
30	1.27	0.52	0.48	0.16	0.29	0.08	0.66	0.27	0.86	0.19
31	-0.20	0.19	0.31	0.25	0.47	0.13	0.63	0.17	1.07	0.09
32	0.54		1.09						0.77	0.06
33	1.47		1.13						-0.13	0.05
34	3.27	0.22	4.29	0.27	0.69	0.22	0.83	0.11	1.12	0.24
35	1.62	0.29	2.73	0.43	0.35	0.04	0.74	0.37	2.04	0.17
36					0.30	0.12	0.46	0.31	1.73	0.27
37	1.98	0.45	2.38	0.46	-0.22	0.21	0.46	0.22	1.96	0.10
38	2.48	0.34	2.27	0.29	0.17	0.01	0.74	0.32	2.01	0.05
39	1.81	0.32	2.55	0.27	0.15	0.17	0.27	0.27	0.52	0.19
40	1.48	0.14	1.25	0.07	0.41	0.15	1.00	0.47	0.54	0.19
41	1.83	0.32	2.06	0.12	0.14	0.04	0.72	0.36	1.71	0.07
42	2.14	0.07	1.81	0.19	0.33	0.08	0.42	0.39	1.77	0.29

43	2.09	0.05	2.33	0.22	0.36	0.22	0.78	0.36	1.51	0.03
44	1.37	0.40	2.19	0.41	0.70	0.36	1.03	0.15	0.13	0.10
45	1.45	0.26	-0.03	0.49	0.45	0.28	0.78	0.41	1.70	0.11
46	0.72	0.12	1.79	0.19	0.38	0.29	-0.44	0.69	1.95	0.12
47	1.92	0.48	1.42	0.21	0.40	0.13	0.17	0.51	2.33	0.10
48	2.78	0.08	2.50	0.30	0.59	0.08	0.40	0.13	2.72	0.33
49	3.40	0.24	2.54	0.29	0.70	0.24	0.15	0.27	2.12	0.08
50	2.18	0.08	1.92	0.16	0.91	0.14	0.77	0.24	1.94	0.26
51	1.42	0.28	0.79	0.14	0.33	0.09	0.39	0.13		
52	0.93	0.17	0.47	0.29	0.51	0.15	0.35	0.13		
53	1.82	0.39	2.04	0.24	0.79	0.38	1.02	0.50	3.48	0.12
54	1.52	0.32	1.20	0.11	0.31	0.05	0.77	0.21	3.14	0.59
55					0.60	0.00	0.81	0.34	5.06	0.20
56	2.02	0.17	1.11	0.14	0.32	0.23	0.41	0.47	4.67	0.11
57					0.01	0.18	0.30	0.17		
58									1.94	0.09
59					-0.16	0.06	1.13	0.26		
60					0.97	0.06	1.56	0.11	1.94	0.15
61					3.68	0.07	4.95	0.37	2.99	0.09
62					-0.05	0.30	0.50	0.19	1.95	0.16
63									0.99	0.12

**Tabelle 7: Anreicherungen von H4ac bei den ChIP-qPCR Messungen in Calu-3, HEK 293 und HeLa Zellen.** Die Tabelle gibt die Mittelwerte (MW) sowie den Standardfehler (SE) der gemessenen Differenzen in den  $C_T$ -Werten zwischen H4ac und H3pan an. Angegeben sind die Messungen in unbehandelten und TSA-behandelten HeLa und HEK 293 Zellen, sowie in unbehandelten Calu-3 Zellen an. Spalte 1 gibt die Position des jeweiligen Primerpaares (die Nummern entsprechen denen in Abb.30, für die exakten Koordinaten siehe 2.1.10)

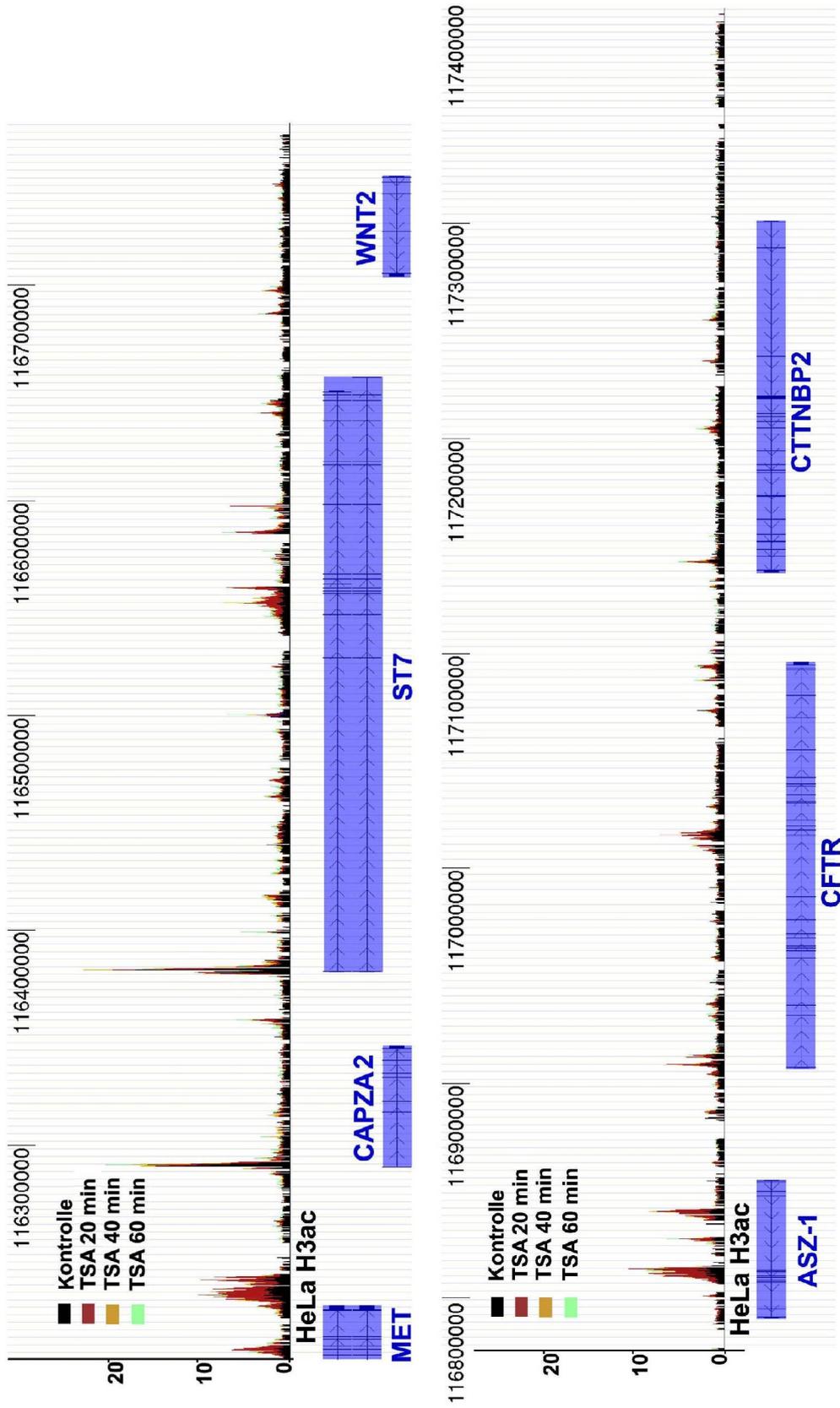


Abbildung 25: **Entwicklung der Acetylierungsmuster von Histon H3 in der CFTR-Region über einen längeren Zeitraum der TSA-Behandlung.** Die Abbildung zeigt eine modifizierte UCSC-Genombrowser Darstellung der Datensätze einer ChIP-chip Zeitserie. Angezeigt ist die gesamte von den in dieser Arbeit verwendeten DNA-Chips abgedeckte Region. (Chr. 7 Basenpaare 116,8-117,4 M) Die Histone H3 Acetylierungsmuster wurden in unbehandelten HeLa Zellen (schwarz), sowie nach 20- (Dunkelbraun), 40- (Hellgrün) und 60- (Hellblau) Minuten TSA-Behandlung bestimmt. Blaue horizontale Balken zeigen die Position der Gene und dunkelblaue vertikale Balken die Positionen der Exons an (Quelle: Refseq) Wie der Abbildung zu entnehmen ist, ändert sich Histoneacetylierung zu Zeitpunkten nach 20-Minuten TSA-Behandlung in der CFTR-Region nicht mehr offensichtlich.

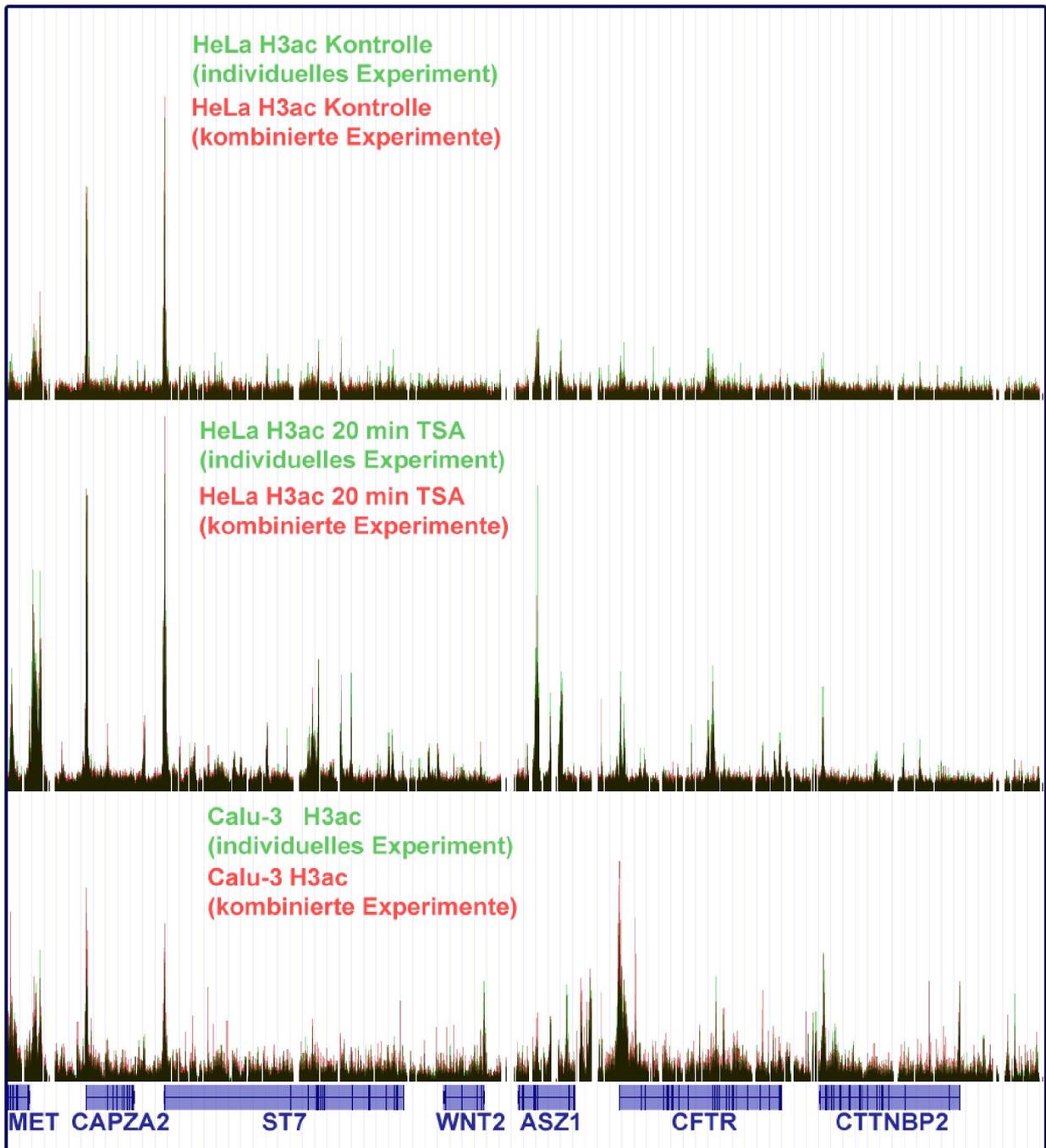


Abbildung 26: **Reproduzierbarkeit der ChIP-chip Experimente.** Die Abbildung zeigt eine Überlagerung der Datensätze von Hybridisierungen der ChIP-WGA von individuellen Experimenten (grün) und den Datensätzen von kombinierter ChIP-WGA aus mehreren unabhängigen Experimenten (rot) in der gesamten, durch die DNA-Chips abgedeckten Region (Chromosom 7 116,2-117,4 Mb). Überlappende Flächen sind schwarz dargestellt. A) Gegenüberstellung der Histon H3ac ChIP-chip Datensätze für unbehandelte HeLa Zellen. B) Gegenüberstellung der ChIP-chip Histon H3ac Datensätze für TSA-behandelte HeLa Zellen (20

---

min) c) Gegenüberstellung der Histon H3ac ChIP-chip Datensätze für unbehandelte Calu-3 Zellen. Blaue horizontale Linien zeigen die Positionen der annotierten Gene, und blaue, vertikale Linien/Balken die der Exons an. Quelle: National Center for Biotechnology Information Reference Sequence (NCBI RefSeq)

## 7 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
2D-FISH	zweidimensionale Fluoreszenz- <i>insitu</i> -Hybridisierung
3C	“Chromosome Conformation Capture“
3D	dreidimensional
3D-FISH	dreidimensionale Fluoreszenz- <i>insitu</i> -Hybridisierung
Abb.	Abbildung
Ac-CoA	Acetylcoenzym A
Ac-CoA	Acetylcoenzym A
ACH	Active Chromosome Hub
ad	„zum Endvolumen auffüllen“
Alu I	( <i>Arthrobacter luteus</i> ) I
AP-1	Activator Protein 1
AP-2	Activating Enhancer binding Protein 2 Alpha
ARP	Actin related Protein
ASZ-1	Germ Cell-specific Expression and the Presence of Four Ankyrin Repeats, a Sterile- $\alpha$ Motif and a Basic Leucine Zipper
BAC	“Bacterial Artificial Chromosome“
BAF (155/170)	BRG1/brm-associated factor
BAF	Barrier to autointegration factor1
BDM	2,3-Butanedione
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C <sub>(t)</sub>	Cycle Threshold
C/EBP	CAAT/ Enhancer binding Protein
C6(Transgen)	Transgen (10-20 Kopien von 256 Tandemwiederholungen des Lac Operators) in CHO DG44 C6 Zellen
Calu-3	Lung Carcinoma
CAPZA2	F-Actin capping Protein Muscle Z-Line Alpha-2 Untereinheit
CTCF	CCCTC-binding Factor
CD4	Cluster of Differentiation 4
Cdx2	Caudal Type Homeobox 2
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CGH	Comperative genomic Hybridisation
ChIP	Chromatin Immunoprezipitation
ChIP-chip	Chromatin Immunoprezipitation mit DNA Analyse mittels
ChiPOTle	“Chromatin ImmunoPrecipitation on Tiled Arrays“
ChIP-qPCR	Chromatin Immunoprezipitation mit DNA Analyse mittels quantitativer PCR
ChIP-seq	Chromatin Immunoprezipitation mit DNA Analyse mittels Sequenzierung
Chr.	Chromosom(en)
CIITA	Class II, Major Histocompatibility Complex, Transactivator
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
c-Myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
CP 190	Centrosomal Protein 190 kDa
CRE	cyclic Adenosine monophosphate Response Element
CT	Chromosomenterritorium

CTCF	CCCTC-Binding Factor
CTTNBP-2	Cortactin-binding Protein-2
DamID	DNA Adenine Methyltransferase Identification
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindole
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DHS	DNase hypersensitive Stelle
DME	Alternative Abkürzung für DMEM
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
DOP	degenerative oligonucleotide primer (-PCR)
Dr	Doktor
DRB	5,6-dichloro-1-ribofuranosylbenzimidazol
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ERK2	extracellular signal-regulated kinase 2
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
F/T-Actin	Filamentöses / "tilted" Actin
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-dUTP	Fluorescein-12-2'-desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
FoxO	Forkhead Box
FRAP	"Fluorescence Recovery After Photobleaching"
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G13R	Glycin 13 mutiert in Arginin
GC	Guanin/Cytosin
GCL	Germ Cell-less
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid Response Element
h	Stunde
H(x)	Histon H(x)
H(x)K(y)ac	Histon H(x) acetyliert an Lysin (y)
H(x)K(y)me1	Histon H(x) monomethyliert an Lysin (y)
H(x)K(y)me2	Histon H(x) dimethyliert an Lysin (y)
H(x)K(y)me3	Histon H(x) trimethyliert an Lysin (y)
HAT(s)	Histon Acetyltransferase(n)
HDAC(s)	Histon Deacetylase(n)
HDACi	Histon Deacetylase Inhibitor

---

HEK 293	Human Embryonic Kidney
HeLa	Henrietta Lacks, (Subklon S3)
hg18	Human Genome Assembly 18
HMG	High Motility Group
HLA-DQA1	Major Histo-compatibility Complex, Class II, DQ alpha 1
HLA-DRB1	Major Histo-compatibility Complex, Class II, DR beta
HNF1A	Hepatic Nuclear Factor 1 homeobox A
HOX	Homeobox
HP1	Heterochromatin Protein 1
IBN	Institute of Bioengineering and Nanotechnology
IgG	Immunglobulin G
INK4a	Inhibitor of Cyclin-dependent Kinase 4A
K.d.	Knockdown
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LAP2	Lamina-associated Polypeptide 2
LBR	Lamin B Receptor
LCR	Lokus Kontroll Region
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LEM (Domäne)	LAP2, Emerin, MAN1 (Domäne)
LMNA	Lamin A/C
Log	Logarithmus
Log <sub>e</sub>	Natürlicher Logarithmus
LP	Longpassfilter
M	Molar (Konzentrationseinheit)
MAX	MYC associated Factor
Mb	Megabasenpaare
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfon säure
MET	Mesenchymal Epithelial Transition Factor
mg	Milligramm
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NBT/BCIP	Nitroblau-tetrazolium / (5-bromo-4-chloro-3-indolyl) Phosphat
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NF-κB	Nuclear Factor Kappa Light-Chain-Enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMI	Nuclear Myosin I
NPC	Nuclear Pore Complex
Nup (93, 153)	Nucleoporin (93 kDa / 153 kDa)
PAC	P1 artifizielles Chromosom
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP1	Poly (ADP-ribose) Polymerase 1
PARylierung	Polyadenosindinukleotid phosphatribosylierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSTT	Phosphate Buffered Saline mit Triton X-100 und Tween 20

---

PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PD	Privatdozent
Pdm I	( <i>Pseudomonas diminuta</i> ) I
Pi	Phosphorylierung (Phosphat inorganisch)
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
Q-Q-Plot	Quantile-Quantile Plot
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RefSeq	Reference Sequence
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNAPII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S14C	Serin 14 mutiert in Cystein
SATB1	Special AT-rich Sequence-binding Protein 1
SD	Standard-Abweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Standard-Fehler
SIN3A	SIN3 Homolog A, Transcription Regulator
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
Sp1	Specificity Protein 1
SSC	Sodium Citrate
ST7	Suppression of Tumorigenicity 7
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
Suz12	Suppressor of Zeste 12 Homolog
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taf1/Set	TAF1 RNA Polymerase II, TATA Box Binding Protein (TBP)-Associated Factor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tcf4	Transcription Factor 4
TF(s)	Transkriptionsfaktore(n)
TMPO	Thymopoietin (alternative Bezeichnung für LAP2)
TNF $\alpha$	Tumornekrosisfaktor Alpha
Topo II	Topoisomerase II
TPR	Translocated Promotor Region
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
Triton X-100	Octylphenoldecaethyl englycolether
TSA	Trichostatin A
TSS	Transkriptionsstartstelle
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan monolaureat
U2 snRNA	U2 small nuclear RNA
UCSC	University of California Santa Cruz

---

UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
WNT	Wingless -Type MMTV Integration Site
WNT2	Wingless-Type MMTV Integration Site, Familienmitglied 2
Xist	X-inactive Specific Transcript;
YB1	Y Box Binding Protein 1
Yy1	Yin-Yang-1
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

## 8 Lebenslauf

*Name:* Joscha Sergej Muck

*Geburtsdatum:* 31.05.1979

*Geburtsort:* Frankfurt a. M.

### *Schulbildung:*

09/1985-07/1989 Geschwister Scholl Schule, Schwalbach a. Ts.

09/1989-07/1995 Albert Einstein Schule, Schwalbach a. Ts.

09/1995-07/1998 Friedrich Dessauer Gymnasium, Höchst a. M.

### *Hochschulausbildung*

10/1999-04/2005 Diplom-Studiengang der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt a. M.

11/2003-8/2004 Diplomarbeit am Max Planck Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.

Seit 06/2005 Promotion am Department für Biologie II der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, bei PD Dr. Daniele Zink

(12/ 2007-12/ 2010) Fortsetzung der Promotion unter PD Dr. Daniele Zink am Institute of Bioengineering and Nanotechnology in Singapur

## 9 Publikationen

Corsi J., Dymond M.K., Ces O., Muck J., Zink D. und Attard G.S. "DNA that is dispersed in the liquid crystalline phases of phospholipids is actively transcribed" *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 28 (2008) 2307-2309

Muck J. und Zink D., "Nuclear organization and dynamics of DNA replication in eukaryotes" *Frontiers in Biosciences*, 14 (2009) 5361-5371 (Review)

Berchtold D., Fesser S., Bachmann G., Kaiser A., Eilert J.C., Frohns F., Sadoni N., Muck J., Kremmer E., Eick D., Layer P.G. und Zink D. "Nuclei of chicken neurons in tissues and three-dimensional cell cultures are organized into distinct radial zones" *Chromosome Research*, 19 (2011) 165-182

Muck J., Kandasamy K., Günther M. und Zink D. "Perinuclear positioning of the inactive human cystic fibrosis gene depends on CTCF, A-type lamins and a histone deacetylase." *Journal of Cellular Biochemistry*, 113 (2012) 2607-2621