

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

**Darstellung und funktionelle Charakterisierung von DNase I  
hypersensitiven Bereichen an der 5`Grenze des humanen  
Immunoglobulin  $\lambda$  - Locus**

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

vorgelegt von

Ruth Eichner

aus Temeschburg

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Klobeck (verstorben 03/13)  
Prof. Dr. R.Rupp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Hammerschmidt  
Priv.Doiz. Dr. D. Spengler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05. 2014

**Für Prof. Dr. H.-G. Klobeck und Chris Evans**

---

## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	4
1.1	Die Chromatinstruktur als Grundlage der Genexpression.....	4
1.2	Die Regulation von Genloci durch <i>cis</i> -aktive DNA-Elemente .....	7
1.3	Immunoglobuline werden gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert .....	10
1.4	Die Regulation der V(D)J-Rekombination ist Chromatin-abhängig.....	13
1.5	Der humane Ig $\lambda$ -Locus und bisher identifizierte regulatorische Elemente .....	16
1.6	Aufgabenstellung der Arbeit .....	18
2	Material und Methoden .....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Geräte.....	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien.....	19
2.1.4	Radiochemikalien .....	20
2.1.5	Enzyme .....	20
2.1.6	Kits.....	20
2.1.7	DNA.....	20
2.1.8	Bakterien.....	21
2.1.9	Zelllinien.....	21
2.1.10	Computerprogramme .....	21
2.1.11	Datenbanken .....	21
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Zellkultur.....	21
2.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden .....	22
2.2.3	DNA- Extraktion aus eukaryotischen Zelllinien.....	22
2.2.4	RNA- Extraktion aus eukaryotischen Zelllinien und reverse Transkription .....	23
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23

---

2.2.6	Gelelektrophorese .....	26
2.2.7	Isolierung und Reinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	27
2.2.8	Klonierung .....	27
2.2.9	In vitro Mutagenese .....	29
2.2.10	DNase I - Hypersensitivitäts Assays.....	30
2.2.11	Colony-Forming-Assay.....	35
3	Ergebnisse .....	37
3.1	Darstellung des 5' Ende des humanen Ig $\lambda$ -Locus .....	37
3.2	Suche nach DNase I hypersensitiven Regionen 5' des Ig $\lambda$ Locus.....	38
3.2.1	Prinzip der limitierten DNase I Spaltung zur Kartierung von HSS .....	38
3.2.2	Herstellung von DNA-Sonden zur Suche nach HSS .....	39
3.2.3	Auswahl der Zelllinien: B- und non-B-Zelllinien.....	46
3.2.4	Limitierte DNase I Spaltungen .....	46
3.2.5	Southern Blots und Hybridisierungen.....	47
3.2.6	Auswertung der Hybridisierungen.....	48
3.2.7	Ergebnisse der DNase I Hypersensitivitäts-Assays .....	50
3.3	Vergleich der gefundenen HSS mit nachgewiesenen CTCF-Bindungsstellen.....	64
3.4	Funktionelle Analyse der HSS 5'1 und 5'6 mittels Colony-Forming-Assay .....	66
3.4.1	Prinzip des Colony-Forming-Assays .....	66
3.4.2	Herstellung der Vektoren.....	67
3.4.3	Durchführung der Colony-Forming-Assays .....	72
3.4.4	Ergebnisse der Colony-Forming-Assays .....	74
3.5	Prüfung der Abhängigkeit der Insulator/Boundary-Funktion von CTCF .....	78
3.5.1	Gezielte Mutation der CTCF-Bindungsstellen und Klonierung der Konstrukte ..	78
3.5.2	Ergebnisse der Colony-Forming-Assays mit mutierten CTCF Bindungsstellen..	81
3.6	Expression der 5' von Ig $\lambda$ gelegenen Gene .....	85
3.6.1	Untersuchung der Expression von TOP3B und PRAMEL auf mRNA Ebene .....	85
3.6.2	Ergebnisse der RT-PCR zu TOP3B und PRAMEL in B-Zelllinien.....	86

---

4	Diskussion .....	88
4.1	Kritische Auseinandersetzung mit den verwendeten Methoden .....	88
4.1.1	Die DNase I Hypersensitivitätsassays und Alternativen zur Suche nach regulatorischen Elementen .....	88
4.1.2	Kritische Auseinandersetzung mit den Colony-Forming-Assays .....	90
4.2	Korrelation der kartierten HSS mit genomweiten CBS und HSS-Screenings .....	92
4.2.1	Korrelation mit dem genomweiten Screening von <i>in vivo</i> CTCF-Bindungsstellen .....	92
4.2.2	Korrelation mit der genomweiten Kartierung von DNase I - HSS .....	93
4.3	Die Regulation der Immunoglobulinexpression und V(D)J-Rekombination durch CBS und andere regulatorische Elemente .....	96
4.4	Überblick über den Igl-Locus und angrenzende Gene .....	98
4.4.1	Stromaufwärts von Igl gelegene Gene .....	98
4.4.2	Innerhalb des Igl-Locus gelegene Gene .....	99
4.5	Die HSS 5' von Igl und ihre möglichen Rollen in der Regulation des Locus .....	101
5	Zusammenfassung .....	107
6	Abbildungsverzeichnis .....	109
7	Tabellenverzeichnis .....	110
8	Abkürzungsverzeichnis .....	110
9	Literaturverzeichnis .....	112
10	Anhang .....	128
10.1	Sequenzen der verwendeten DNA-Sonden .....	128
10.2	Sequenzen der CTCF-bindenden Elemente 13376 und 13377 .....	131
10.3	Tabellen der verwendeten Membranen .....	131
11	Danksagung .....	134
12	Lebenslauf .....	135

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Chromatinstruktur als Grundlage der Genexpression

Die Grundlage der Erbinformation der Lebewesen ist die Desoxyribonucleinsäure (DNA). Sie befindet sich als DNA-Doppelhelix (Watson and Crick, 1953) im Zellkern, wird im Laufe eines jeden Zellzyklus repliziert und bei Zellteilung in gleicher Weise an beide Tochterzellen weitergegeben. Als Erbsubstanz kodiert die DNA für alle Gene eines Organismus. Diese sind, nach der Definition von Wilhelm Johannsen im Jahre 1909, Einheiten, die mit einem vererbten Merkmal assoziiert sind. Um vom Gen zum Merkmal, vom Genotyp zum Phänotyp, zu gelangen, sind im klassischen Modell des Protein-kodierenden Gens mehrere Stufen notwendig. Durch die Transkription der DNA entsteht eine RNA-Kopie, welche nach dem Triplet-Code in ein Protein translatiert wird, um schließlich z.B. als Strukturprotein oder durch enzymatische Aktivität zum Phänotyp beizutragen.

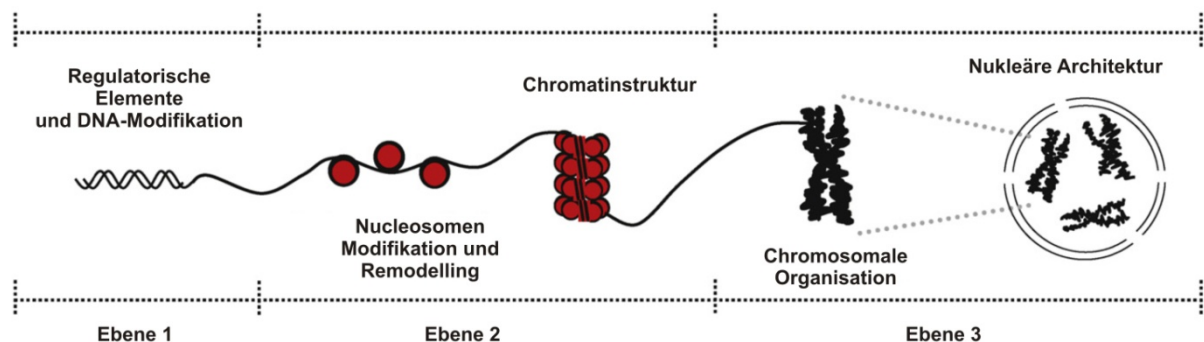
Das menschliche Erbgut, dessen Sequenz 2001 im Rahmen des Human Genome Project entschlüsselt wurde, umfasst etwa 3 Milliarden Basenpaare, welche über 30.000 protein-codierende Gene enthalten (Lander et al., 2001; Pruitt et al., 2012). Diese sind in jeder Körperzelle gleichermaßen enthalten, doch trotz derselben zugrundeliegenden genetischen Information zeigen die verschiedenen Zellen eines Organismus sehr unterschiedliche Phänotypen. Dies ist die Folge unterschiedlicher Expressionsmuster der Gene: durch komplexe Regulationsmechanismen werden einige Gene in bestimmten Geweben exprimiert und in anderen wiederum nicht.

Die Regulation der Genexpression erfolgt bei Eukaryoten auf verschiedenen Ebenen (Babu et al., 2008; van Driel et al., 2003) (siehe Abb. 1). Zum einen enthält die DNA *cis*-aktive Elemente, die mit DNA-bindenden Proteinen, sog. *trans*-aktiven Faktoren, assoziieren. *Cis*-aktive Elemente sind u.a. Promotoren oder Enhancer, welche z.B. Transkriptionsfaktoren (TFs) binden um die Transkription zu initiieren. Eine neuere Definition des Begriffs „Gen“ schließt diese regulatorischen Elemente mit ein. Hiernach ist ein Gen eine lokalisierbare genomische Sequenz, die einer Vererbungseinheit entspricht und regulatorische Elemente, transkribierte Regionen u.a. funktionelle Sequenzen enthält (Pearson, 2006).

Ob ein Gen exprimiert wird oder nicht, liegt jedoch nicht alleine an der Präsenz entsprechender *trans*-aktiver Faktoren, sondern auch an der Zugänglichkeit der *cis*-agierenden DNA-Elemente. Die DNA in eukaryotischen Zellkernen liegt nämlich nicht nackt vor, sondern in einem Komplex mit Histonen und nicht-Histon-Proteinen, dem sogenannten Chromatin, welches unterschiedliche Verpackungszustände erlaubt. Dies verleiht der DNA zum einen Stabilität und bietet zum anderen durch unterschiedliche Verpackungszustände und

Chromatin-Modifikationen viele Möglichkeiten zur Regulation der Genexpression (Babu et al., 2008; van Driel et al., 2003). In transkriptionell aktiven Bereichen beispielsweise liegt die DNA als offenes Euchromatin vor, welches zugänglich ist für z.B. Transkriptionsfaktoren; in inaktiven Bereichen hingegen ist die DNA als Heterochromatin dicht verpackt, was die Bindung von *trans*-aktiven Faktoren verhindert. Diese Verpackungszustände sind dynamisch und können durch Modifikationen der DNA und der assoziierten Proteine ineinander überführt werden (Razin et al., 2007). Neben DNA Methylierung handelt es sich bei den Modifikationen vor allem um Methylierungen, Acetylierungen oder auch Phosphorylierungen der Histonproteine (Bartova et al., 2008). Dabei ist Euchromatin durch einen hohen Grad an Histonacetylierungen sowie Methylierungen an Lysin 4 und 79 von Histon 3 (H3K4 und H3K79) charakterisiert; Heterochromatin hingegen durch Methylierungen an Lysin 9 und 27 von Histon 3 (H3K9 und H3K27) und die Abwesenheit von Histonacetylierungen.

Darüber hinaus korreliert der Kondensationsgrad des Chromatins mit der Position innerhalb des Zellkerns: während Euchromatin vorwiegend zentral lokalisiert ist, finden heterochromatische Regionen eher peripher im Nukleus. Dies stellt eine weitere Ebene der Expressionsregulation dar (Fraser and Bickmore, 2007; Schneider and Grosschedl, 2007) (siehe Abb. 1).

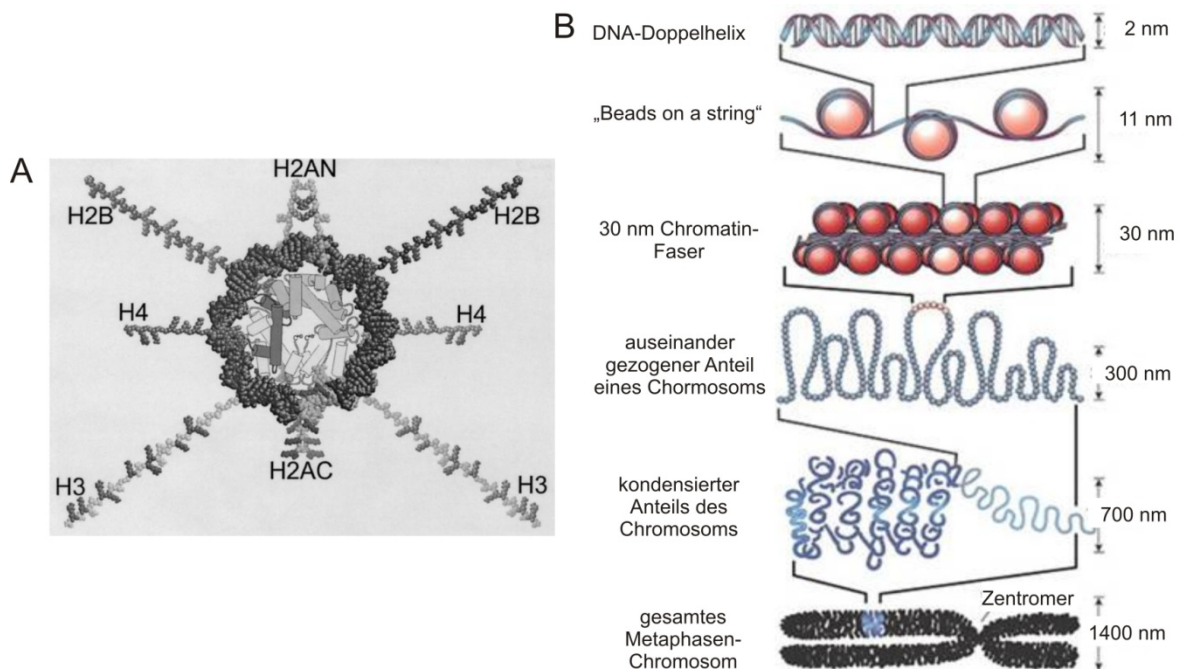


**Abb. 1: Die verschiedenen Ebenen der Genregulation (nach Babu et al., 2008).** Zu sehen sind die 3 Ebenen der Genregulation: regulatorische Elemente auf DNA-Ebene, die Chromatinstruktur und die nukleäre Architektur.

Die kleinste Verpackungseinheit des Chromatins ist das Nucleosom, bestehend aus einem Komplex aus 8 Histonproteinen, um welchen sich die DNA auf einer Länge von 146 - 165 bp 1,65-mal windet (Luger et al., 1997) (siehe Abb. 1 und Abb. 2A). Histone bestehen jeweils aus einer strukturgebenden globulären Domäne („histone fold domain“), welche die Bindung der DNA vermittelt, und den N- und C-Enden („tail domains“), welche aus dem Histonoktamer herausragen, mit anderen Molekülen interagieren und posttranslational modifiziert werden (siehe Abb. 2A). Das klassische Nucleosom enthält jeweils zwei der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4, wobei jeweils zwei Moleküle von H3 und H4 ein zentrales Tetramer bilden, welches von zwei peripheren H2A-H2B Dimeren umgeben wird



(Eickbush and Moudrianakis, 1978; Luger et al., 1997) (siehe Abb. 2A). Ein weiteres Histon, H1, bindet an die DNA zwischen zwei Nucleosomen und wird als linker-Histon bezeichnet (Ramakrishnan, 1997).



**Abb. 2: Das Nucleosom und die verschiedenen Stufen der DNA Kondensation.** A: Das Nucleosoms besteht aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Im Zentrum befinden sich die globulären Histondomänen, peripher ragen die C- und N-terminalen Enden aus dem Histonoktamer (nach Hansen 2002). B: Verschiedene Stufen der DNA-Kondensation führen von der Doppelhelix bis zum Metaphasechromosom. Die Durchmesser sind angegeben (nach Felsenfeld and Groudine, 2003).

Basierend auf dieser Grundstruktur kann die DNA verschiedene Kondensationsstufen erreichen: von kurzen, gänzlich Nucleosom-freien Bereichen bis hin zum hochgradig kondensierten Metaphase-Chromosom. Eine 11 nm dicke Faser, auf der Nucleosomen wie Perlen auf einer Schnur aufgereiht sind („beads on a string“; siehe Abb. 2B), stellt dabei die erste Verpackungsstufe dar. Durch Interaktionen der Histonenden und in Abhängigkeit von der Salzkonzentration wird die nächste Stufe der Verdichtung erreicht, die sog. 30 nm Faser (Hansen, 2002; Razin et al., 2007) (siehe Abb. 2B). Jüngste Untersuchungen stellen allerdings die tatsächliche *in situ* Existenz dieser Konformation wieder in Frage (Fussner et al., 2011). Die weiteren Schritte der Kondensation zu höhergradigen Chromatinstrukturen sind noch nicht umfassend geklärt; es gibt jedoch Hinweise, dass Chromatin-assoziierte Proteine beteiligt sind. So entstehen etwa 300 nm breite Chromatinschleifen, die durch weitere Verdichtung die Chromatiden bilden (siehe Abb. 2B), welche als Metaphase-Chromosomen auch lichtmikroskopisch sichtbar werden. Auf diese Weise wird die etwa 2 m lange DNA um das mehr als 20.000-fache komprimiert und findet in dem  $10^{-5}$  m großen Zellkern Platz (Langst and Becker, 2004; Razin et al., 2007).

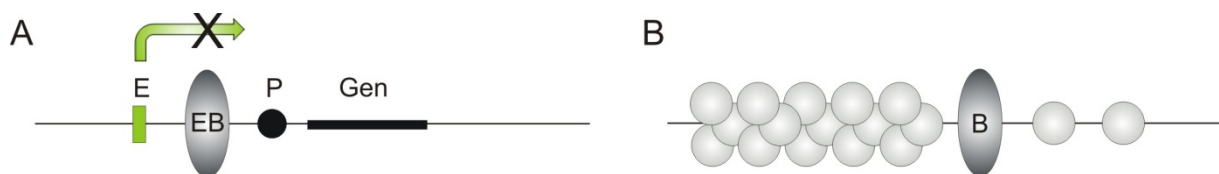
## 1.2 Die Regulation von Genloci durch *cis*-aktive DNA-Elemente

Im menschlichen Genom können Gene mit sehr unterschiedlicher transkriptioneller Aktivität und Chromatinstruktur unmittelbar benachbart sein (Burgess-Beusse et al., 2002; Felsenfeld et al., 2004). Verschiedene regulatorische DNA-Elemente in der Nähe streng regulierter Genloci gewährleisten die Etablierung und Aufrechterhaltung dieser distinkten Aktivitätszustände (Felsenfeld et al., 2004; Ghirlando et al., 2012; Giles et al., 2010). Zu diesen Elementen zählen Enhancer, welche Bindungsmotive für mehrere TFs enthalten, sowie umfassendere Locus-Control-Regionen (LCRs), welche dazu dienen, die Chromatinöffnung eines Genlocus gewebs- und entwicklungspezifisch zu regulieren (Fraser and Grosfeld, 1998; Li et al., 2002). LCRs bestehen aus mehreren funktionellen Elementen und sind definiert durch ihre Fähigkeit, eine stabile, gewebsspezifische Expression eines Transgens, unabhängig von dessen Chromatinumfeld, zu gewährleisten (Dean, 2006; Festenstein and Kioussis, 2000; Li et al., 1999). Dies erfolgt durch die Rekrutierung von *trans*-aktiven Faktoren wie z.B. Chromatin-modifizierenden Enzymen, welche zur Chromatinöffnung führen und Domänen unterschiedlicher Chromatinstruktur errichten können (Dean, 2006; Festenstein and Kioussis, 2000; Li et al., 1999). Letzteres geht auch mit der Bildung intra- und interchromosomaler Schleifen und der Positionierung des Locus innerhalb des Nukleus einher (Babu et al., 2008; Dean, 2006, 2011). Die schrittweise Veränderung der Chromatinstruktur erfolgt beispielsweise über Rekrutierung von Histonacetyltransferasen (HATs), welche über Histonacetylierungen zur graduellen Chromatinöffnung führen (Li et al., 2002). Dieser Prozess ist nach Initiierung selbsterhaltend und breitet sich entlang der DNA aus, was letztlich dazu führt, dass der gesamte Locus mit den zugehörigen regulatorischen Elementen wie Enhancer oder Promotor, für die jeweiligen *trans*-agierenden Faktoren zugänglich wird (Ho et al., 2002; Li et al., 2002).

Die zunehmende Öffnung der DNA hat auch eine erhöhte Zugänglichkeit für Nucleasen wie die DNase I zur Folge, weswegen sich Regionen offenen Chromatins experimentell durch eine generell erhöhte DNase I Sensitivität charakterisieren lassen (Gross and Garrard, 1988). Euchromatische transkriptionell aktive Bereiche, welche sich über ganze Loci erstrecken, zeigen eine 10-fach höhere DNase I Sensitivität als Heterochromatin und gelten als DNase I sensitiv (Stalder et al., 1980; Weintraub and Groudine, 1976). Kurze regulatorische Elemente (200–600 bp) wie Promotoren oder Enhancer hingegen, welche quasi Histon-frei sind und direkt mit non-Histon Proteinen interagieren, zeigen eine um zwei Größenordnungen erhöhte DNase I Sensitivität im Vergleich zu Heterochromatin, und werden als DNase I hypersensitive Sites (HSS) bezeichnet (Gross and Garrard, 1988; Stalder et al., 1980).

Umfassendere Elemente wie LCRs können mehrere HSS enthalten, welche den verschiedenen *cis*-aktiven Elementen innerhalb einer LCR entsprechen (Li et al., 2002).

Neben LCRs gibt es weitere DNase I hypersensitive Elemente, welche essentiell für die Regulation von Genloci sind. Genauso wichtig wie die geregelte Chromatinöffnung eines Locus ist nämlich die Begrenzung dieser Aktivität auf die jeweilige funktionelle Domäne. Hierzu gibt es an den Grenzen streng regulierter Loci mit sog. Boundaries und Insulatoren spezifische *cis*-aktive Elemente, welchen gemeinsam ist, dass sie einen Locus vor ungewollten äußeren Einflüssen schützen (Bell and Felsenfeld, 1999; Burgess-Beusse et al., 2002; Ghirlando et al., 2012; Udvardy, 1999). Allgemein unterscheidet man nach heutigem Verständnis zwei verschiedene Funktionen (Burgess-Beusse et al., 2002; Recillas-Targa et al., 2002) (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Enhancer-blockierende und Barriere-Effekte von Insulator/Boundary Elementen (nach Burgess-Beusse et al., 2002).** A: Insulatoren mit Enhancer-blockierendem Effekt (EB) verhindern die Interaktion von Enhancer und Promotor. B: Insulatoren mit Barrierefunktion (B) hemmen die Ausbreitung von Heterochromatin. E= Enhancer, P=Promotor, hellgraue Kugeln = Nucleosomen.

Zum einen gibt es Enhancer-blockierende Elemente (EB), welche das Übergreifen eines Enhancers auf benachbarte Genloci unterbinden, zum anderen Barriere-Elemente (B), welche die Ausbreitung von Heterochromatin verhindern (Burgess-Beusse et al., 2002; Gaszner and Felsenfeld, 2006; Ghirlando et al., 2012; Sun and Elgin, 1999) (siehe Abb. 3A und B). Ein EB hat klassischerweise keinen intrinsischen hemmenden Effekte auf die Genexpression, sondern verhindert lediglich die Interaktion von Enhancer und Promotor; zu diesem Zwecke muss er zwischen diesen lokalisiert sein (Burgess-Beusse et al., 2002) (siehe Abb. 3A). Ein Modell zur Erklärung dieser Funktion ist die Verankerung der Chromatinfaser an strukturellen Elementen, wodurch Chromatin-Schleifen entstehen, welche funktionelle Einheiten voneinander trennen (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Diese Enhancer-blockierende Funktion ist eng mit der Bindung des multivalenten Transkriptionsfaktors CTCF (CCCTC-binding factor) verbunden (Bell et al., 1999; Ghirlando et al., 2012; Phillips and Corces, 2009). CTCF ist ein hochkonserviertes, ubiquitär exprimiertes Zinkfinger-Phosphoprotein (Lobanenkov et al., 1990), dessen Enhancer-blockierende Funktion erstmals im  $\beta$ -Globin Insulator des Huhns nachgewiesen wurde (das erste in Vertebraten identifizierte Insulator-Element, genannt 5'HS4 = Hypersensitive Site 4 am 5' Ende des  $\beta$ -Globin Locus) (Bell et al., 1999; Chung et al.,

1997). Mit der Zeit wurde eine Vielzahl weiterer Insulatoren identifiziert, deren Enhancer-blockierende Funktion CTCF-abhängig ist (Farrell et al., 2002; Filippova et al., 2001; Gaszner and Felsenfeld, 2006; Magdinier et al., 2004). CTCF-Moleküle können, durch Interaktion mit anderen CTCF-Molekülen oder dem nukleolären Protein Nucleophosmin, Chromatinschleifen ausbilden und am Nukleolus verankern, wodurch z.B. Promotoren und nicht zugehörige Enhancer in unterschiedlichen Schleifen zu liegen kommen (Yusufzai et al., 2004). Essentiell für die Schleifenbildung sind neben CTCF weitere Proteine wie Cohesin, welche mit CTCF interagieren (Merkenschlager and Odom, 2013; Parelho et al., 2008; Wendt et al., 2008).

Je nach zugrunde liegendem Enhancer-Modell kann die EB Wirkung von Chromatinschleifen unterschiedlich erklärt werden. Das „direkt-Kontakt“ Modell geht von direkten Enhancer-Promotor Interaktionen aus; diese Kontakte würden über sterische Effekte innerhalb einer Schleife gewährt, während Interaktionen zwischen verschiedenen Schleifen unterbunden würden (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Das alternative Modell der prozessiven Enhancer-Aktivität geht von einem aktivierenden Signal aus, welches z.B. in Form von Histon-modifizierenden Enzymen, prozessiv von Enhancer zu Promotor wandert. Diesem Modell zufolge würde ein Insulatorkomplex die Ausbreitung dieses Signals am Ende einer Schleife blockieren (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Für dieses Modell spricht die Fähigkeit des  $\beta$ -Globin Insulators 5'HS4, die Ausbreitung von Histoacetylierungen und auch das Voranschreiten der RNA Polymerase II zu verhindern (Zhao and Dean, 2004). Unabhängig davon, welches dieser Modelle eher der Realität entspricht, ist die CTCF-vermittelte Schleifenbildung ein Grundprinzip der Enhancer-Block Funktion.

Die zweite Form von Insulatoren sind Barriere-Elemente, welche zwischen Domänen unterschiedlicher Chromatinstruktur lokalisiert sind und die Ausbreitung von Heterochromatin auf transkriptionell aktive Gene verhindern (Bell and Felsenfeld, 1999; Burgess-Beusse et al., 2002; Felsenfeld et al., 2004; Gaszner and Felsenfeld, 2006; Sun and Elgin, 1999) (siehe Abb. 3B). Initial beschrieben wurden sie als Elemente, welche ein Transgen vor Inaktivierung durch sich ausbreitendes Heterochromatin schützen und damit eine positions-unabhängige Expression gewährleisten (Pikaart et al., 1998).

Dicht kondensiertes Heterochromatin, welches u.a. durch H3K9 und H3K27 Methylierungen und Abwesenheit von Histonacetylierungen charakterisiert ist, hat die Eigenschaft, selbsterhaltend zu sein und sich auszubreiten. Dabei führt H3K9 Methylierung zur Rekrutierung weiterer Histonmethyltransferasen (HMT), wodurch die inhibitorische Methylierung fortschreitet (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Barriere-Elemente können diesen Kreislauf durchbrechen, indem sie HATs oder Nucleosom-Remodelling Komplexe rekrutieren, welche zu aktivierenden Chromatinmodifikationen führen und damit ein

Fortschreiten der heterochromatischen H3K9 Methylierung verhindern (Gaszner and Felsenfeld, 2006; Oki et al., 2004). Der  $\beta$ -Globin Insulator des Huhns zeigt, neben der beschriebenen CTCF-abhängigen EB-Wirkung, eine solche CTCF-unabhängige Barriere-Aktivität (Chung et al., 1997; Pikaart et al., 1998; Recillas-Targa et al., 2002). Diese wird über die Proteine USF 1 (upstream transcription factor 1) und USF2 vermittelt, welche HATs und aktivierende HMTs rekrutieren (West et al., 2004). Diese führen zur Anhäufung euchromatischer Histonmodifikationen im Insulatorbereich, was der Ausbreitung von Heterochromatin Einhalt gebietet (West et al., 2004). Anderweitige Modelle zur Funktion von Barriere-Elementen basieren, ähnlich den Hypothesen zu EB-Elementen, auf der Schleifenbildung und der daraus resultierenden Kompartimentalisierung des Chromatins in unterschiedliche Chromatindomänen (Capelson and Corces, 2004; Gaszner and Felsenfeld, 2006; Labrador and Corces, 2002). Auch kann die Positionierung eines Locus in einem transkriptionell aktiven subnukleären Bereich der Ausbreitung von Heterochromatin entgegen wirken und so die Expression gewährleisten (Capelson and Corces, 2004; Casolari et al., 2004). Durch seine Beteiligung an der Bildung von Chromatinschleifen könnte CTCF in diesem Zusammenhang auch eine Rolle für Barriere-Elemente spielen (Filippova et al., 2005; Gaszner and Felsenfeld, 2006).

Diese Modelle für EB- und Barriere-Funktionen zeigen, wie schon angesprochen, einige Überschneidungen, und tatsächlich können reale Insulator/Boundary-Elemente selten eindeutig einer der beiden Funktionen zugeordnet werden. Dies mag daran liegen, dass dieselben *cis*- bzw. *trans*-aktiven Faktoren an beiden Effekten beteiligt sind, oder aber daran, dass komplexe Insulator/Boundary Elemente (wie der  $\beta$ -Globin Insulator des Huhns) aus verschiedenen Einzelkomponenten mit unabhängigen EB- und Barriere-Funktionen bestehen (Recillas-Targa et al., 2002).

Neben klassischen Boundaries existieren auch weniger definierte, fließende Übergänge zwischen Euchromatin und Heterochromatin, welche aus dem Gleichgewicht entgegengesetzter aktivierender und hemmender enzymatischer Aktivitäten resultieren (Capelson and Corces, 2004; Kimura and Horikoshi, 2004; Kimura et al., 2002). Streng regulierte, sowie eng benachbarte Loci mit deutlich unterschiedlicher Chromatinstruktur benötigen allerdings eine klare Abgrenzung, wie sie nur starke Barriere-Elemente gewährleisten können.

### **1.3 Immunoglobuline werden gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert**

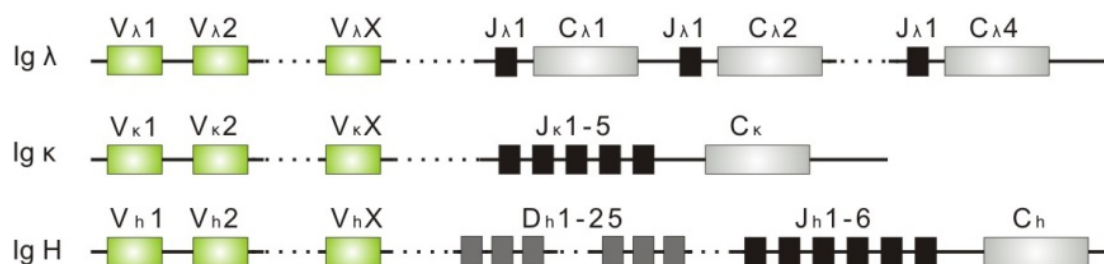
Ein klassisches Beispiel für Gene, deren Expression sehr streng geregelt ist, sind die Immunoglobulin-Gene, welche für die schweren und leichten Ketten der Antikörper kodieren.

Diese werden nur in einem einzigen Zelltyp, den B-Lymphozyten, exprimiert, und dies auch nur ab einem genau definierten Entwicklungsstadium.

Die von B-Zellen gebildeten und sezernierten Immunoglobuline (Ig) gehören zur spezifischen humoralen Abwehr des Immunsystems. Sie bestehen aus jeweils zwei identischen schweren (H= heavy) und zwei leichten (L= light) Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Merler and Rosen, 1966). Die schweren Ketten werden vom IgH Locus auf Chromosom 14 kodiert (Croce et al., 1979). Von den leichten Ketten gibt es zwei Varianten, die Leichtketten vom  $\kappa$ -Typ auf Chromosom 2 (Malcolm et al., 1982; McBride et al., 1982) und die Leichtketten vom  $\lambda$ -Typ auf Chromosom 22 (Erikson et al., 1981; McBride et al., 1982), wobei jede B-Zelle jeweils nur eine der beiden Leichtketten exprimiert und damit Antikörper eines einzigen Leichtkettentyps produziert.

Alle drei Immunoglobulin-Ketten bestehen aus einem konstanten und einem variablen Teil. Der konstante Teil der Schwereketten bestimmt die Klasse der Antikörper: IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM. Über diesen konstanten Bereich am C-Terminus werden Effektorfunktionen wie die Aktivierung des Komplementsystems oder die Bindung an zelluläre  $F_c$ -Rezeptoren vermittelt, während die variable Region, am N-Terminus der leichten und schweren Ketten, der spezifischen Erkennung und Bindung von Antigenen dient.

Um den über  $10^{11}$  verschiedenen Antigenen in der Umwelt zu begegnen, muss das Immunsystem entsprechend viele spezifische Antikörper aufbieten. Dies kann aufgrund der Begrenztheit des Genoms jedoch nicht durch eine riesige Zahl verschiedener Ig-Gene erfüllt werden. Stattdessen hat sich im Laufe der Evolution ein anderer Mechanismus zur Generierung einer enormen Antikörper-Vielfalt entwickelt, welcher auf dem modularen Aufbau der Ig-Gene basiert.

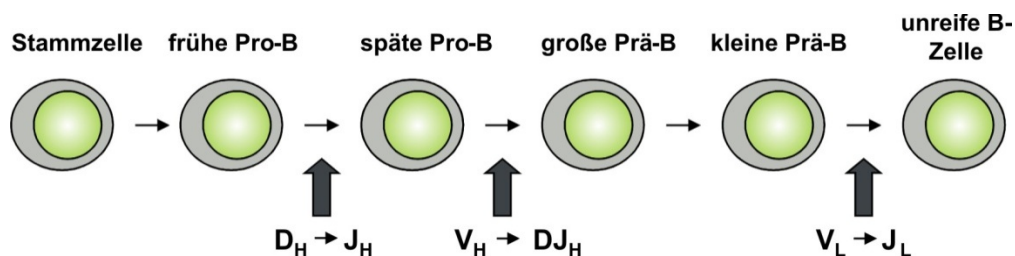


**Abb. 4: Die Struktur der drei verschiedenen Immunoglobulin-Loci.** Im Ig $\lambda$ , Ig $\kappa$  und IgH Locus sind die J- und C-Segmente unterschiedlich angeordnet; D-Segmente sind nur im IgH Locus vorhanden. Die gepunktete Linie steht für eine Lücke in der Kontinuität.

Alle drei Ig-Gene bestehen aus multiplen Gensegmenten, welche im Laufe der B-Zell-Entwicklung durch den Prozess der somatischen Rekombination zu einer funktionellen Transkriptionseinheit zusammengefügt werden (Alt et al., 1992; Hozumi and Tonegawa, 1976; Schatz, 2004; Tonegawa, 1983; Tonegawa et al., 1978). Man unterscheidet bei den

Leichtketten die V(variable)-, J(joining)-, und die für den konstanten Teil kodierenden C(constant)-Segmente, welche jedoch in beiden Leichtketten unterschiedlich angeordnet sind (siehe Abb. 4). Der Ig $\kappa$  Locus enthält 132 V $\kappa$  Elemente, wovon allerdings nur 29 letztlich für funktionale Proteine kodieren, sowie 5 funktionelle J $\kappa$ - und ein C $\kappa$ -Segment (Kawasaki et al., 2001) (siehe Abb. 4). Der Ig $\lambda$  Locus ist anders aufgebaut und beinhaltet 70 V $\lambda$  Segmente, darunter 36 potentiell aktive, sowie 4 funktionelle, gekoppelte J $\lambda$ -C $\lambda$ -Segmente (Kawasaki et al., 1997) (siehe Abb. 4). Die Schwerketten enthalten zusätzlich D(diversity)-Segmente, welche sich zwischen den V $H$ - und J $H$ -Genen befinden (Early et al., 1980; Tomlinson et al., 1995) (siehe Abb. 4). Im Rahmen der somatischen Rekombination wird jeweils ein V-Segment mit einem beliebigen D-Segment, oder, im Falle der Leichtketten, direkt mit einem der J-Segmente, verknüpft, wodurch eine große kombinatorische Diversität entsteht (Alt et al., 1992; Tonegawa, 1983). Hinzu kommt die sog. junktionale Vielfalt, die auf ungenauen Verknüpfungen mittels Einfügen oder Entfernen einzelner Nukleotide bei der Rekombination basiert, und zusätzlich zur Antikörper-Vielfalt beiträgt.

Die somatische Rekombination erfolgt im Laufe der B-Zell-Entwicklung nach einer strengen Reihenfolge (Yancopoulos and Alt, 1986). Am Anfang steht die hämatopoetische Stammzelle, in welcher sich alle drei Ig-Gene in Keimbahnkonfiguration befinden (siehe Abb. 5). Unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren wird die B-Zell-Differenzierung eingeleitet und die Expression von RAG-1 und RAG-2 (recombination activating genes 1 und 2), den Hauptkomponenten der Rekombinationsmaschinerie, induziert. Im Stadium der *frühen* Pro-B-Zelle kommt es zum Rearrangement im IgH Locus: ein beliebiges D $H$ -Segment wird mit einem J $H$ -Segment verknüpft (siehe Abb. 5), welches wiederum in der *späten* Pro-B-Zelle mit einem V $H$ -Gen rekombiniert (Yancopoulos and Alt, 1986). Dabei kommen die den J $H$  Segmenten benachbarten V $H$  Gene initial häufiger zum Einsatz (Yancopoulos et al., 1984).



**Abb. 5: Die V(D)J-Rekombinationen im Laufe der B-Zell-Entwicklung.** Die Stadien der B-Zell-Entwicklung sind durch Rekombinationen innerhalb der Ig-Gene definiert: mit erfolgter D $H$ -J $H$ -Verknüpfung ist das Stadium der späten Pro-B Zelle erreicht, mit V $H$ -DJ $H$ -Verknüpfung die große Prä-B Zelle und mit V $L$ -J $L$  die unreife B-Zelle.

Nach erfolgreicher Rekombination im IgH-Locus wird eine Ig-Schwerkette exprimiert, welche im Stadium der *großen* Prä-B Zelle zusammen mit VpreB und  $\lambda 5$ , den Surrogat-Leichtketten (Karasuyama et al., 1990), den Prä-B-Zellrezeptor bildet. Dieser ist essentiell für

das weitere Fortschreiten der B-Zell-Differenzierung. Im Stadium der *kleinen* Prä-B-Zelle kommt es zu Rekombinationen in den Leichtketten-Loci (siehe Abb. 5), wobei das Ig $\kappa$ -Rearrangement dem Ig $\lambda$ -Rearrangement vorausgeht (Engel et al., 1999; Schatz, 2004). Erst wird ein V $\kappa$ - mit einem J $\kappa$ -Element verknüpft; verläuft dies erfolgreich, wird eine funktionelle  $\kappa$ -Leichtkette exprimiert und es kommt zur Bildung des B-Zellrezeptors (BCR), eines membranständigen IgM-Moleküls, bestehend aus rekombinierter Schwerekette und  $\kappa$ -Leichtkette. Mit Expression eines funktionellen BCRs im Stadium der *unreifen* B-Zelle wird die Rekombinationsmaschinerie inaktiviert, was weitere Rekombinationen in den Leichtkettenloci verhindert (Kuehl, 1983; Melchers et al., 1999). Verläuft die Rekombination im  $\kappa$ -Locus erfolglos, bleibt die Rekombinationsmaschinerie aktiv, es kommt zum Rearrangement im Ig $\lambda$ -Locus und letztlich zur Bildung von Immunoglobulinen mit  $\lambda$ -Leichtketten. Ähnlich verhält es sich mit den beiden Allelen der jeweiligen Ig-Ketten: die Rekombination wird in beiden Allelen initiiert, sobald aber ein Allel eine funktionelle Kette exprimiert und es zur Bildung des Prä-B-Zellrezeptors bzw. des B-Zellrezeptors kommt, werden weitere Umlagerungen im zweiten Allel inhibiert (Alt et al., 1984; Melchers et al., 1999). Dieses Prinzip wird Allelische Exclusion genannt.

Mit Expression des BCRs verlässt die *unreife* B-Zelle das Knochenmark. Nach dem ersten Antigenkontakt folgen somatische Hypermutationen in den Antigen-bindenden Regionen der leichten und schweren Ketten, welche das Repertoire an Antikörpern nochmals potenzieren (Chahwan et al., 2012; French et al., 1989; Teng and Papavasiliou, 2007). Als letzte Modifikation erfolgt bei Aktivierung der *reifen* B-Zelle, in Abhängigkeit von verschiedenen Zytokinen, eine „class-switch“-Rekombination in der konstanten Region der Schwereketten (Alt et al., 1988; Rothman et al., 1989). Die verschiedenen C<sub>H</sub>-Segmente für die Ig-Klassen IgM, IgD, IgG, IgE und IgA liegen in dieser Reihenfolge von 5' nach 3' im IgH Locus, so dass z.B. über eine Deletion von C <sub>$\mu$</sub>  und C <sub>$\delta$</sub>  das C <sub>$\gamma$</sub> -Segment mit dem bereits rekombinierten VDJ<sub>H</sub>-Element verknüpft wird, um ein IgG Immunoglobulin zu bilden (Alt et al., 1988).

Die somatische Rekombination (kombinatorische Diversität), die ungenaue Verknüpfung der Gensegmente (junktionale Vielfalt) und die somatische Hypermutation der Antigen-bindenden Bereiche tragen dazu bei, dass B-Zellen, basierend auf nur drei verschiedenen Ig-Genen, mehr als 10<sup>11</sup> verschiedene Antikörper generieren können, welche eine ebenso große Zahl Antigene spezifisch erkennen können (French et al., 1989; Tonegawa, 1983).

#### **1.4 Die Regulation der V(D)J-Rekombination ist Chromatin-abhängig**

Alle beschriebenen somatischen Rekombinationen werden nach demselben Mechanismus durch die Rekombinationsenzyme RAG-1 und RAG-2 ausgeführt. Dazu sind die



funktionellen V-, J- und D-Segmente flankiert von Rekombinations-Signalsequenzen (RSS). Diese bestehen aus zwei hochkonservierten DNA-Elementen, einem Heptamer (7 Nukleotide) und einem Nonamer (9 Nukleotide), welche von 12 oder 23 nicht-konservierten Nukleotiden getrennt werden (Gellert, 2002; Hesse et al., 1989; Schatz, 2004). Bei den V-Segmenten befinden sich die RSS am 3'Ende, bei den J-Segmenten hingegen am 5'Ende, während D<sub>H</sub>-Segmente, welche sowohl mit V<sub>H</sub>- als auch J<sub>H</sub>-Segmenten rekombinieren, beidseits RSS besitzen. Im Igλ Locus haben die RSS der V<sub>λ</sub>-Gene einen Abstand von 23bp zwischen Heptamer und Nonamer und die J<sub>λ</sub> Elemente einen von 12bp, während es sich im Ig κ Locus umgekehrt verhält (Yancopoulos and Alt, 1986). Entsprechend der 12/23 –Regel wird jeweils eine RSS mit 12 bp Abstand mit einer RSS mit 23 bp Abstand verknüpft, wodurch Fehlverknüpfungen, von z.B. V-Segmenten untereinander, verhindert werden (Steen et al., 1996; Tonegawa, 1983; Yancopoulos and Alt, 1986).

Neben den drei Ig-Loci enthalten auch die T-Zell-Rezeptor-Loci V-, D-, J- und C-Segmente, welche im Laufe der T-Zell-Entwicklung somatisch rekombiniert werden, um eine Vielzahl an T-Zell-Rezeptoren (TCR) zu generieren (Alt et al., 1992; Chan and Mak, 1989). Diese Rekombinationen werden ebenfalls durch RSS vermittelt und durch RAG-1 und RAG-2 ausgeführt (Feeney et al., 1994; Yancopoulos et al., 1986). Dennoch kommt es nur in B-Zellen zu Ig-Umlagerungen und nur in T-Zellen zu TCR-Rekombinationen; zudem ist die Abfolge der einzelnen V(D)J-Umlagerungen im Laufe der Lymphozyten-Differenzierung streng reguliert: D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>- erfolgt vor D<sub>J</sub>-V<sub>H</sub>-Verknüpfung, IgH Umlagerung vor Umlagerung der Leichtketten-Loci (siehe auch Kapitel 1.3 und Abb. 5) (Yancopoulos and Alt, 1986). Die Beschränkung der RAG-vermittelten Rekombinationsprozesse auf Lymphozyten kann durch die Lymphozyten-spezifische Expression von RAG-1 und RAG-2 erklärt werden (Oettinger, 1992). Der streng geordnete Ablauf der Rekombinationen in B- und T-Zellen muss jedoch eine andere Erklärung haben. Bereits Mitte der 80er Jahre wurde von Frederick W. Alt und Kollegen die „Accessibility“-Hypothese aufgestellt, nach der nur jene Segmente rekombinieren, welche zu einem gegebenen Zeitpunkt für die Rekombinationsmaschinerie zugänglich sind (Yancopoulos and Alt, 1985, 1986). Der Nachweis von Keimbahn-Transkripten bestimmter Abschnitte kurz vor ihrer Rekombination, wie z.B. von Transkripten nicht-rekombinierter V<sub>H</sub> Segmente unmittelbar vor V<sub>H</sub>-D<sub>J</sub> Umlagerung, zeugt von einer Öffnung der Region kurz vor der Rekombination und stützt diese Hypothese (Yancopoulos and Alt, 1985). Die Keimbahn-Transkripte scheinen nicht nur ein Nebeneffekt der geöffneten Chromatinstruktur zu sein, sondern, durch die Kopplung von RNA II Polymerasen mit Histonmethyltransferasen (HMTs), essentiell zur Etablierung euchromatischer Strukturen beizutragen (Abarrategui and Krangel, 2009). Heute sind die epigenetische Regulation der

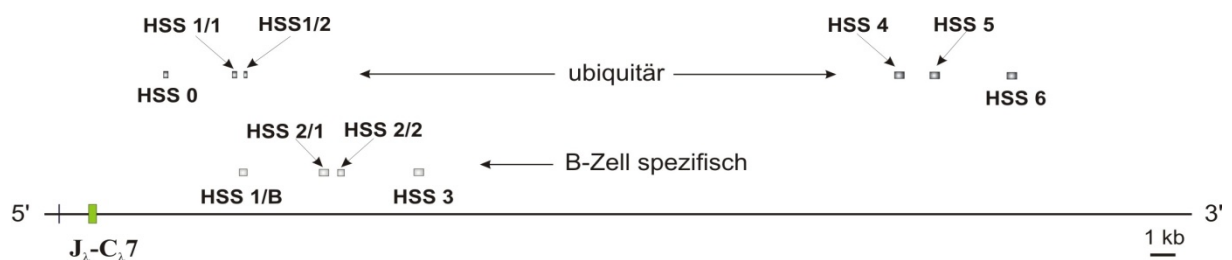
V(D)J-Rekombination und die „Accessibility“-Hypothese unbestritten (Degner-Leisso and Feeney, 2010; Roth and Roth, 2000; Stanhope-Baker et al., 1996). Euchromatische Histonmodifikationen wie Acetylierungen oder H3K4 und H3K79 Methylierungen (siehe Kapitel 1.1) finden sich nur in jenen Abschnitten, welche gerade rekombinieren (Degner-Leisso and Feeney, 2010; Feeney, 2010; Xu and Feeney, 2009). Insbesondere Di- und Trimethylierungen von H3K4 (H3K4me2 und H3K4me3) sind nur zur Zeit der jeweiligen Rekombination im Bereich der V-, D-, und J- Segmente nachweisbar; H3K4me3 ist darüber hinaus direkt an der Bindung von RAG-2 beteiligt (Ji et al., 2010; Matthews et al., 2007; Morshead et al., 2003). Während die Regulation dieser Chromatinmodifikationen noch nicht vollständig geklärt ist, sind zumindest einige beteiligte Faktoren bekannt (Degner-Leisso and Feeney, 2010). So führt das Signaling des prä-B-Zellrezeptors zur Öffnung der Leichtketten-Loci (Xu and Feeney, 2009), während der Transkriptionsfaktor E2A über Rekrutierung von HATs an der Chromatinöffnung eines Abschnitts von V $\kappa$ -Segmenten beteiligt ist (Goebel et al., 2001; Massari et al., 1999; Romanow et al., 2000), und der Transkriptionsfaktor EBF (early B-cell factor) über denselben Mechanismus zur Öffnung des V $\lambda$ -Bereichs führt (Romanow et al., 2000). Die Chromatin-öffnung alleine zieht jedoch nicht automatisch die Rekombination der zugänglichen V-, D- oder J- Elemente nach sich. Es sind im Gegenteil noch weitere Faktoren beteiligt, wie der für die B-Zell-Differenzierung essentielle Transkriptionsfaktor Pax5, in dessen Abwesenheit die Rekombinationseffizienz, trotz offenen Chromatins, reduziert ist (Hesslein et al., 2003). Auch in Euchromatin kann nämlich die Zugänglichkeit von RSS durch einzelne Nucleosomen verbaut sein (Baumann et al., 2003), und erst durch spezifische Chromatin-Remodelling-Komplexe, welche die Position von Nucleosomen verändern können, hergestellt werden.

Darüber hinaus spielen auch höhergradige Chromatinstrukturen eine Rolle, darunter Mechanismen wie Schleifenbildung oder die sogenannte Locus-Kontraktion, welche weit entfernte Gensegmente einander näher bringt und so die Rekombination überhaupt ermöglicht (Jhunjunwala et al., 2008; Roldan et al., 2005; Sayegh et al., 2005). Der IgH-Locus kontrahiert sich im Stadium der pro-B-Zelle zu einer Rosetten-artigen Struktur, während die Leichtketten-Loci erst im Stadium der *kleinen* prä-B-Zelle kontrahieren (Jhunjunwala et al., 2008; Roldan et al., 2005). Trotz dieser Erkenntnisse sind weiterhin viele Faktoren unbekannt. Insbesondere sind neben einigen Enhancern (Asenbauer et al., 1999; Pinaud et al., 2011) nur wenige *cis*-aktive Elemente beschrieben, welche die schrittweise Chromatinöffnung und Rekombination der Ig-Loci regeln (Jhunjunwala et al., 2009). Die Erforschung solcher *cis*-aktiver regulatorischer Elemente innerhalb des Ig $\lambda$ -Locus war das Kernthema der Arbeitsgruppe von Prof. H.-G. Klobeck.

## 1.5 Der humane $Ig\lambda$ -Locus und bisher identifizierte regulatorische Elemente

Der  $Ig\lambda$ -Locus des Menschen erstreckt sich über 911 kb auf Chromosom 22 (22q11.1-22q11.2). Am 5' Ende liegt der  $V_\lambda$ -Bereich mit 36 funktionellen  $V_\lambda$ -Genen sowie 34 Pseudogenen (Kawasaki et al., 1997). Diese können, basierend auf Sequenzhomologien, in fünf Gruppen (Clan 1 - Clan 5) eingeteilt werden (Kawasaki et al., 1997; Kirkham et al., 1992). Die einzelnen  $V_\lambda$ -Segmente enthalten, wie alle V-, D- oder J-Gene, neben den kodierenden Abschnitten, *cis*-aktive Elemente wie zugehörige Promotoren, Spleißstellen oder RSS (Falkner and Zachau, 1984; Hesse et al., 1989; Kawasaki et al., 1997). Die Pseudogene haben dieselbe Struktur wie funktionelle  $V_\lambda$ -Gene, beinhalten aber Mutationen welche z.B. zur Verschiebung des Leserasters (frameshift) oder einem vorzeitigen Stop-Codon führen, weswegen kein funktionelles Protein entstehen kann (Kawasaki et al., 1997). 14 kb stromabwärts des letzten  $V_\lambda$ -Segments befinden sich 7  $J_\lambda$ - $C_\lambda$  Elemente, darunter jedoch nur 4 funktionelle, welche sich an der Rekombination beteiligen (Combriato and Klobeck, 1991; Dariavach et al., 1987; Kawasaki et al., 1997; Vasicek and Leder, 1990).

Stromabwärts der letzten  $J_\lambda$ - $C_\lambda$  Gene konnten von Prof. H.-G. Klobeck und seiner Arbeitsgruppe mehrere regulatorische Elemente identifiziert werden, welche die Aktivierung und Expression des Locus steuern (Asenbauer et al., 1999; Asenbauer and Klobeck, 1996). Die von Hildegard Asenbauer im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführte systematische Suche nach DNase I hypersensitiven Sites (HSS) stromabwärts des  $Ig\lambda$ -Locus ergab insgesamt 7 verschiedene HSS. Diese wurden entsprechend ihrer Abfolge von 5' nach 3' nummeriert und mit HSS 0 bis HSS 6 bezeichnet (siehe Abb. 6).

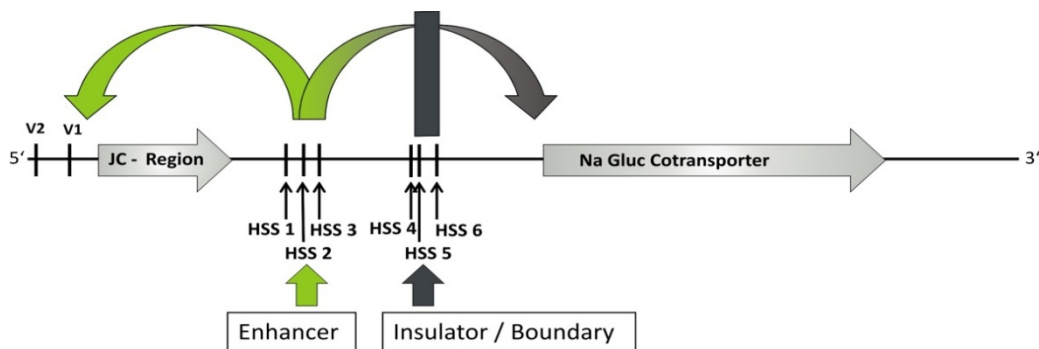


**Abb. 6: Die Lage der HSS stromabwärts des humanen  $Ig\lambda$ -Locus.** 3' des letzten  $J_\lambda$ - $C_\lambda$  Elements (grünes Kästchen) befinden sich HSS 0 bis HSS 6, deren Lokalisation eingezeichnet und deren Expression angegeben ist. HSS 1 und HSS 2 wurden mittels *in vivo* Footprint Experimenten genauer kartiert – HSS 1/1 und 1/2 sind ubiquitär vorhandene Untereinheiten von HSS 1; HSS 1/B sowie HSS 2/1 und HSS 2/2 B-Zell spezifische Untereinheiten von HSS 1 bzw. HSS 2.

HSS 0, HSS 4, HSS 5 und HSS 6 sind ubiquitär und HSS 2 und HSS 3 B-Zell-spezifisch, während HSS 1 in B- und non-B-Zellen eine unterschiedliche Konfiguration zeigt (siehe Abb. 6). Diese unterschiedliche Konfiguration konnte, genauso wie die Aufteilung von HSS 2 in die Untereinheiten HSS 2/1 und HSS 2/2, erst durch *in vivo*-Footprint Experimente von Birthe Friess und Priska Kraißer beschrieben werden (Friess, 2001; Kraißer, 2002). HSS 1/B, HSS 2

und HSS 3, die jeweils 6 kb, 9.8 kb und 13.3 kb flussabwärts von  $C_{\lambda}7$  liegen (Asenbauer and Klobeck, 1996), bilden zusammen den  $Ig\lambda$ -Enhancer. HSS 3 entspricht dem bereits beschriebenen gewebsspezifischen  $Ig\lambda$ -Enhancer HuE lambda (Blomberg et al., 1991). Dieser wird in seiner Wirkung durch HSS 1 und HSS 2, welche alleine keine Enhancer-Effekte auf den  $V_{\lambda}$ -Promotor besitzen, potenziert (Asenbauer et al., 1999). Reporter-genversuche zeigten, dass die synergistisch wirkenden Enhancer-Elemente HSS 1 bis 3 gemeinsam die Transkription eines Reportergens um den Faktor 700 steigern können, womit der kombinierte  $Ig\lambda$ -Enhancer zu den potentesten transkriptionellen Enhancern überhaupt gehört (Asenbauer et al., 1999).

Neben der transkriptionellen Aktivierung spielt zumindest HSS 2 auch eine Rolle bei der Chromatinöffnung des  $Ig\lambda$ -Locus (Kraißer, 2002). Wie die  $IgH$ - und  $IgK$ -Enhancer, deren Deletion zu einem Ausbleiben der Rekombination im jeweiligen Locus führt (Chen et al., 1993; Takeda et al., 1993), kontrolliert auch der  $Ig\lambda$ -Enhancer die Zugänglichkeit des Locus für die Rekombinations- und Transkriptionsmaschinerie und stellt damit auch eine LCR für den  $Ig\lambda$ -Locus dar. Dabei scheint der Transkriptionsfaktor E47, welcher an HSS 2 bindet, die Chromatinöffnung zu steuern (Kraißer, 2002; McMurry and Krangel, 2000). Zusammen mit anderen TFs wie  $NF\kappa B$  und Ikaros, die ebenfalls an HSS 2 binden (Combriato and Klobeck, 2002), trägt E47 zudem zur Steigerung der Enhancer-Aktivität von HSS 3 bei.



**Abb. 7: Die Funktion der HSS stromabwärts des  $Ig\lambda$ -Locus.** Die HSS1-3 wirken als Enhancer auf den  $Ig\lambda$ -Locus (grün dargestellt), HSS 4-6 als Insulator/Boundary, welche einen Übergriff des Enhancers auf benachbarte Gene verhindern (dunkelgrauer Balken). Hellgrau: Genloci (JC Region und stromabwärts gelegenes Gen).

Stromabwärts des  $Ig\lambda$ -Enhancers liegen ein Pseudogen (Natrium-Glucose-Cotransporter-1-like) und die funktionellen Gene GNAZ (guanine nucleotide binding protein, ein G-Protein), und RTDR1 (rhabdoid tumor deletion gene 1; ein Protein dessen Funktion bisher nicht hinreichend geklärt ist) (Magovcevic et al., 1995; Zhou et al., 2000). GNAZ und RTDR1 werden unabhängig von  $Ig\lambda$  exprimiert. Angesichts des starken  $Ig\lambda$ -Enhancers müssten diese stromabwärts gelegenen Gene vor dessen Einfluss geschützt werden. Diese Funktion erfüllen

drei ubiquitäre DNase I hypersensitive Sites flussabwärts von HSS 3. Die HSS 4, HSS 5 und HSS 6, welche 32.1 kb, 33.3 kb und 36.7 kb stromabwärts von  $C_{\lambda}7$  lokalisiert sind, zeigen weder Promotor- noch Enhancer-Funktion (Svoboda, 1999). Stattdessen führen sie in transienten Transfektionsstudien zur Abnahme der Reporterexpression auf ein Drittel des Ausgangswertes, was mit Silencer- oder mit Enhancer-blockierenden Funktionen vereinbar wäre (Svoboda, 1999). Damit könnten diese HSS ein Insulator/Boundary Element darstellen, welches den  $Ig\lambda$ -Locus funktionell von benachbarten Genen abgrenzt. Im Rahmen seiner Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. H.-G. Klobeck konnte Sebastian Nagel *in vitro* die Bindung von CTCF an HSS 6 nachweisen (Nagel, 2009), während Antonia Regnier in ihrer Dissertation Enhancer-blockierende und auch Barriere-Funktionen für HSS 5 und HSS 6 zeigte. Diese Befunde bestätigen die Hypothese, dass es sich bei diesen HSS um die 3' Grenze des  $Ig\lambda$ -Locus handelt (Regnier, 2011) (siehe Abb. 7).

## 1.6 Aufgabenstellung der Arbeit

Nach der Kartierung und Charakterisierung der regulatorischen Elemente 3' des  $Ig\lambda$ -Locus durch die Arbeitsgruppe von Prof. H.-G. Klobeck, war es Ziel dieser Dissertation, den 44 kb langen Bereich 5' von  $Ig\lambda$  auf potenzielle *cis*-aktive regulatorische Elemente zu untersuchen. Neben möglichen Enhancern mit Einfluss auf  $Ig\lambda$  oder benachbarte Gene, wären in diesem Bereich u.a. Insulatoren oder Boundaries zu erwarten, welche den  $Ig\lambda$ -Locus funktionell nach 5' abgrenzen, um benachbarte Gene vor dem Einfluss der  $Ig\lambda$ -Enhancer oder auch den Locus selber vor der Ausbreitung angrenzenden Heterochromatins zu schützen.

Der Bereich zwischen  $V_{\lambda(1)70}$ , dem am weitesten 5' gelegenen  $V_{\lambda}$ -Gen, und dem stromaufwärts gelegenen TOP3B-Locus sollte zu diesem Zwecke systematisch nach DNase I hypersensitiven Sites abgesucht werden. Dazu sollten Restriktionsfragmente definiert und passende DNA-Sonden generiert werden, welche anschließend zur Suche nach HSS eingesetzt werden sollten. Für die limitierten *in vivo* DNase I Spaltungen standen B- und non-B-Zelllinien zur Verfügung. Nach Identifikation und Kartierung von HSS sollten diese funktionell untersucht werden, wobei das Augenmerk v.a. auf potentielle EB-Elemente und Boundaries gerichtet war. Die Analyse der HSS auf entsprechende EB- oder Barriere-Funktionen sollte mittels funktioneller Colony-Forming Assays erfolgen, mit dem letztlichen Ziel, die funktionelle 5' Grenze des humanen  $Ig\lambda$ -Locus zu definieren und zu charakterisieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

GeneAmp PCR system 2700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Casy-1 Cell Counter und Analyzer System	Schärfe System, Reutlingen
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	peqLab Biotechnologie, Erlangen
Photo Scanner HP ScanJet G4010	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen
Röntgenfilmentwickler Curix 60	Agfa, Belgien

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blotpapier 3MM CHR Paper	Whatman, Dassel
Blotpapier GB 004 Gel Blotting Paper	Whatman, Dassel
Blotmembran Biodyne B / Plus Membrane	Pall Gelman Laboratory, USA
Casy Ton – isotone Salzlösung	Schärfe System, Reutlingen
Cellstar Röhren, Polypropylen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar Gewebekulturflaschen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar Gewebekulturschalen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturplatten, 24 well, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Multi-Guard, steril	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen Multi, steril	Roth, Karlsruhe
Quick Spin Columns for radiolabeled DNA purification	Roche, Indianapolis, USA
Reaktionsgefäße, 1.5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhren, Polypropylen(15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Medizinischer Röntgenfilm Super RX	Fuji Film, Japan

#### 2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
DMEM High Glucose - Medium	PAA, Pasching, Österreich
dNTPs (Deoxynucleoside-Triphosphate-Set)	Roche, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
G-418 Sulphate	PAA, Pasching, Österreich
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L- $\alpha$ -Lysolecithin Type V	Sigma-Aldrich, USA
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Nanofectin	PAA, Pasching, Österreich
Nanofectin Diluent	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640 –Medium	c.c.pro, Heidelberg
Phenol	Roth, Karlsruhe

alle weiteren Chemikalien	Merck, Darmstadt
<b>2.1.4 Radiochemikalien</b>	
[a- <sup>32</sup> P] dCTP	Hartmann Analytic, Braunschweig
<b>2.1.5 Enzyme</b>	
Acc 65I	Promega GmbH, Mannheim
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim
Pfu-DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen:	Roche Diagnostics, Mannheim
BamH I, Bgl II, Eco RI, Hind III	
Pvu II, Sac I, Sal I	
RNase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
T4-Polynukleotid-Kinase	Promega GmbH, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
<b>2.1.6 Kits</b>	
JETSTAR Plasmid Purification Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Cedar Creek, USA
PCR DNA and Gel Band Purification kit	GE Healthcare, USA
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy total RNA Kit	QIAGEN, Hilden
<b>2.1.7 DNA</b>	
<b>2.1.7.1 Längenstandards</b>	
DNA Molecular Weight Marker X	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker XVI	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker XVII	Roche Diagnostics, Mannheim
<b>2.1.7.2 Vektoren</b>	
pBlueskript Sk-	Stratagene, Cedar Creek, USA
pSV40Pneo und pSV40EPneo	Klonierung durch Antonia Regnier (Regnier, 2011)
<b>2.1.7.3 Oligonukleotide</b>	
PCR-Primer	Eurofins MWG/ Operon (Ebersberg)

## 2.1.8 Bakterien

XL1-Blue Competent Cells

Agilent Technologies, Waldbronn

## 2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
<b>BJAB</b>	humanes B-Zell Lymphom	(Menezes et al., 1975)
<b>HeLa</b>	humanes Zervix-Karzinom	(Scherer et al., 1953)
<b>HeLa Kyoto</b>	humanes Zervix-Karzinom	(Simpson et al., 2007)
<b>HL 60</b>	humane akute myeloische Leukämie	(Dalton et al., 1988)
<b>MOLT-4</b>	humane T-Zell Leukämie	(Minowada et al., 1972)
<b>MN 60</b>	humane B-Zell Leukämie	(Roos et al., 1982)
<b>REH</b>	humane prä-B-Zell Leukämie	(Rosenfeld et al., 1977)

**Tab. 1: Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.**

## 2.1.10 Computerprogramme

Accelrys Gene 2.0	Accelrys Software Inc., USA
Adobe Acrobat 9 Pro	Adobe Systems Inc., USA
CorelDraw Graphics Suite X4	Corel Corporation Inc., Kanada
EndNote X4	Thompson Reuters, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation Inc., USA
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft Corporation Inc., USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation Inc., USA

## 2.1.11 Datenbanken

Blast (basic local alignment search tool)-Suche	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
CTCF-binding site database	<a href="http://insulatordb.uthsc.edu">http://insulatordb.uthsc.edu</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 92% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die in Kapitel 2.1.9 genannten Zelllinien waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die in Suspensionskultur wachsenden myeloischen bzw. lymphatischen Zelllinien BJAB, HL 60, MN 60 und MOLT-4 wurden in RPMI 1640 Medium, 15% FBS und 4mM Glutamin (Wachstumsmedium) in Zellkulturflaschen kultiviert. Bei Erreichen einer Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:3 durch Zugabe frischen Wachstumsmediums verdünnt. HeLa, eine adhären wachsende Zelllinie, wurde in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) High Glucose (mit L-Glutamin und Natriumpyruvat), 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin (Wachstumsmedium) in Zellkulturschalen kultiviert und bei



Erreichen einer Konfluenz von 80% gesplittet. Nach Absaugen des Mediums, Spülen mit PBS und 5-minütiger Inkubation mit Accutase bei 37°C, wurden die Zellen in DMEM aufgenommen und zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in DMEM-Wachstumsmedium resuspendiert. Für Zellzählungen wurde der CasyCounter verwendet. Zur Selektion transfizierter HeLa-Zellen wurde dem üblichen HeLa-Wachstumsmedium 400 µg/ml G418 Sulfat zugesetzt.

#### PBS

8 g/l NaCl  
0,2 g/l KCl  
2,1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O  
0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### HeLa-Wachstumsmedium

DMEM High Glucose mit L-Glutamine und Natriumpyruvat  
10% FBS  
1% Penicillin/Streptomycin  
zur Selektion: 400 µg/ml G418 Sulfat

#### Medium für myeloische/ lymphatische Zelllinien

RPMI 1640  
15% FBS  
4mM Glutamin

### **2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden**

Die molekularbiologischen Standardmethoden wurden in sterilen Gefäßen nach Sambrook (Sambrook, 1989), bei Raumtemperatur (RT) oder auf Eis durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

### **2.2.3 DNA- Extraktion aus eukaryotischen Zelllinien**

Genomische DNA der Zelllinien MN 60 und BJAB wurde nach der Phenol-Chloroform Methode extrahiert (Chomczynski and Sacchi, 1987). Die Zellsuspension wurde 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt, die Zellen in PBS gewaschen und abermals pelletiert, bevor sie in Proteinase K Puffer resuspendiert (1 ml je 10<sup>8</sup> Zellen) und über Nacht bei 50°C inkubiert wurden; dabei führt das Detergens SDS zur Zelllyse und Proteinase K zum Proteinabbau. Phenol, was Proteine in seiner Phase löst, wurde im Verhältnis 1:1 zugegeben, die Suspension vermischt und 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase (welche die DNA enthält) wurde abgezogen, in ein neues Gefäß überführt, mit Chloroform im Verhältnis 1:1 vermischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und der letzte Schritt ab der Zugabe von Chloroform wiederholt, bevor 0,1 x Volumen 2.5M Na-Acetat und 2,5 x

Volumen Ethanol zugegeben wurden, was auf  $-20^{\circ}\text{C}$  die DNA präzipitieren lässt. Nach abermaligem Zentrifugieren wurde das DNA-Pellet getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

#### Proteinase K-Puffer

100 mM	NaCl
10 mM	Tris HCl, pH 8.0
50 mM	EDTA, pH 8.0
0.5%	SDS
20 $\mu\text{g/ml}$	RNase A
0.1 mg/ml	Proteinase K

#### TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
1 mM	EDTA

### **2.2.4 RNA- Extraktion aus eukaryotischen Zelllinien und reverse Transkription**

Gesamt-RNA aus jeweils  $10^7$  Zellen der Zelllinien MN 60, BJAB, REH, MOLT und HL 60 wurde mithilfe des RNeasy total RNA Kits (Qiagen), welches auf der reversiblen Bindung von RNA an Silicamembranen beruht, entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in 60 $\mu\text{l}$  RNase-freiem (DEPC-behandeltem)  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert; die resultierende Konzentration wurde spectrophotometrisch gemessen.

Zur Generierung von cDNA wurde die RNA revers transkribiert. Durch Einsatz von Oligo-dT Primern, welche an den Poly-A Schwanz der mRNAs binden, wurde spezifisch mRNA revers transkribiert. 1 $\mu\text{g}$  RNA und 3 $\mu\text{l}$  der Oligo-dT Primer wurden vermischt und 10 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Nach Kühlung auf Eis wurden 10 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 U RNasin und 200 U M-MLV Reverse Transkriptase mit zugehörigen Puffer zugegeben und 60 min bei  $43^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### **2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient der *in vitro* Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis et al., 1986; Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Ein Reaktionszyklus besteht aus (1) thermischer Denaturierung eines DNA-Doppelstrangs zu Einzelsträngen, (2) Anlagerung spezifischer Oligonukleotide (Primer), deren Sequenzen komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Bereichs sind, und (3) Verlängerung dieser Primer zu einem DNA-Doppelstrang durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Durch die Verdopplung der gewünschten DNA-Fragmente pro Zyklus verläuft die Amplifikation exponentiell. Neben der Matrizen-DNA, den Primern und der DNA-Polymerase werden auch Nukleotide sowie der DNA-Polymerase-Puffer benötigt; die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist aufgeführt.

Standard PCR-Reaktionsansatz (50µl)

25µl	2x PCR-Puffer
1 µl	Primer 1 (50 µM Lösung)
1 µl	Primer 2 (50 µM Lösung)
1 µl	Matrizen-DNA (~200pg)
0,5 µl	Taq-Polymerase (2,5 U)
21,5 µl	dest. H <sub>2</sub> O

10x PCR Puffer

100 mM	Tris-HCl, pH 9.0
15 mM	MgCl <sub>2</sub>
500 mM	KCl
1%	Triton X-100
je 100 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Die PCR wurde zur Herstellung der DNA-Sonden RE 01 - RE 16, zur Generierung der Konstrukte für die Colony Forming Assays, sowie im Sinne einer RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) zur Genexpressionsanalyse (TOPO, PRAMEL, GAPDH) eingesetzt. Alle verwendeten Primer sind Tab. 2 zu entnehmen.

Die Matrizen-DNA zur ersten Generierung der DNA-Sonden RE 01- RE 16 war genomische DNA der Zelllinie MN 60 oder BJAB. Nach Klonierung dieser Sequenzen in pBlueskript Sk-dienten die jeweiligen Plasmide als Matrize. Im Rahmen der RT-PCR von TOPO, PRAMEL und GAPDH wurde Gesamt-cDNA verschiedener Zelllinien als Matrize verwendet.

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
<b>RE 01-1</b>	CCCCGAATTCCTCACCGTCTTGTT
<b>RE 01-2</b>	CCCCGGTACCATTTCTATTTGCATC
<b>RE 02-1</b>	CCCCGGTACCTGGTTAGTGAGGAACT
<b>RE 02-2</b>	CCCCGAATTCGTAAGTGAGATTGGT
<b>RE 03-1</b>	CCCCGGTACCCAAGGGCCCAGG
<b>RE 03-2</b>	CCCCGAATTCTGCCCCAGACAGGTGGGT
<b>RE 04-1</b>	GGAGGGAATTCAAAGATAG
<b>RE 04-2</b>	CCCCGGTACCGAGACAAAATGAAGAC
<b>RE 05-1</b>	CCCCGAATTCAACTCCTGATTCAAACC
<b>RE 05-2</b>	CCCCGGTACCTCTGACCAAGAACACTTC
<b>RE 06-1</b>	CCCCGGTACCTATAACAGGAAGGAAAGGC
<b>RE 06-2</b>	CCCCGAATTCCTTTATGACTAGCTC
<b>RE 07-1</b>	CCCCGAATTCTGAAGGTTCTGTATCAC
<b>RE 07-2</b>	CCCCGGTACCAGCTCAGTTCTTGCTGGA
<b>RE 08-1</b>	CCCCGAATTCCTGACCTGCTTTGGC
<b>RE 08-2</b>	CCCCGGTACCATCTCCAGTGCCTGCCT
<b>RE 09-1</b>	CCCCGAATTCGATAGTGTGGGAGAGAGGTG
<b>RE 09-2</b>	CCCCGTCGACATGACTCCTTTGGCAAAGC
<b>RE 10-1</b>	CCCCGAATTCGCCCTATCAAACTCTAAGAGC

---

<b>RE 10-2</b>	CCCCGTCGACAGCCTGTCTCTGTAGTTCAC
<b>RE 11-1</b>	CCCCGAATTCCTCCCCATTCCCAATTC
<b>RE 11-2</b>	CCCCGTCGACGCACCCTTCATGCAAATCAC
<b>RE 12-1</b>	CCCCGAATTCGAAGCACCAAGCCAAGATAG
<b>RE 12-2</b>	CCCCGTCGACAAATGGAGAGTCATGGAACC
<b>RE 13-1</b>	TCAGAGATCTTCCAAATATATTTTACACAG
<b>RE 13-2</b>	AGCTAAGCTTGTTCCCGGGGCGGCTA
<b>RE 13-3</b>	GGATCCAGCTCCGGTCCTT
<b>RE 13-4</b>	CTTAATTTTAGAATTCATCTTCCA
<b>RE 14-1</b>	AGCTAGATCTGCGTGCAGAATGCATACTG
<b>RE 14-2</b>	AGCTGGATCCGAGTCCCAATAGGGAGACAC
<b>RE 14-3</b>	CCCAGATCTCTCTGACCAAGAACACTTC
<b>RE 14-4</b>	AGCTACGCGTGCGTGCAGAATGCATACTG
<b>RE 14-5</b>	AGCTGCGCGCGAGTCCCAATAGGGAGACAC
<b>RE 14-6</b>	CCCCGCGCGCCTCTGACCAAGAACACTTC
<b>RE 14-7</b>	AGCTGGATCCTCAGGTCCTTCCTAGGGCT
<b>RE 15-1</b>	AGCTAAGATCTGAACGTGTATGAGAGACACC
<b>RE 15-2</b>	AGATCGGATCCGCTGACAGTTGCAGGTATTC
<b>RE 15-3</b>	AGCTAACGCGTGAACGTGTATGAGAGACACC
<b>RE 15-4</b>	AGATCGCGCGCTGACAGTTGCAGGTATTC
<b>RE 16-1</b>	AGCTGAATTCCTATTACTCCTATGCTATGC
<b>RE 16-2</b>	AGCTGTCGACAATCAAGGGGACAGATTTTC
<b>13376MM1</b>	TGAGGCCTGGGTTGATGAAGAATTCTGAGTGGTCAGCTC
<b>13377MM1</b>	CCTGGGCCTAGATGAGGAATTCCACTGTTGGTCTGCTGC
<b>3'IgL-3</b>	AGCTGGTACCCATGAGGGTGTGGAAG
<b>3'IgL-4</b>	AGCTGAATTCGGGACTGAAGACTTGGGAAC
<b>3'IgL-5</b>	GAGTGAGTTATTGGTCTCACAG
<b>3'IgL-6</b>	CAACAGAGGTTCTTGCCCTG
<b>TOPO-1</b>	GCCATGACTGCAAGTACCTG
<b>TOPO-2</b>	AGGACCAGCTCGAAGTCATC
<b>TOPO-3</b>	GTGTTCAAGAGGAAGTTCCAC
<b>TOPO-4</b>	TGTTGAAGTCCACATCAAGC
<b>TOPO-5</b>	AGTGCGTGGAATGTGAGAG
<b>TOPO-6</b>	ATAGTTTGAAGTGCCATGAGG
<b>GAPDH-1</b>	CCCCGGATCCGAGCCACATCGCTCAGACAC
<b>GAPDH-2</b>	CCCCGGATCCTGGGGCTGGTGGTCCAGGGG
<b>GAPDH-3</b>	CGTGGAAGGACTCATGACCA
<b>GAPDH-4</b>	TCCGACGCCTGCTTCACCAC
<b>PRAMEL-1</b>	TGGGGTGAGACCCTTAATG
<b>PRAMEL-2</b>	CGGCCATCTTCTCAATGTG
<b>PRAMEL-3</b>	ACCATCAGCAGTCAAGGCAG
<b>PRAMEL-4</b>	AGATGCAGCAGTCAACTGGG

---

Tab. 2: Übersicht über die Sequenzen aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Ein PCR-Programm besteht klassischerweise aus 3 Phasen: initiale Denaturierungsphase (I), eigentliche DNA-Amplifikationsphase (II) mit ca. 30 Zyklen aus Denaturierung (1), Annealing (2) und Primerextension (3), sowie terminale Extensionsphase (III). Die Denaturierung erfolgte bei 94°C, die Primerextension bei 72°C während die Annealing-Temperatur den jeweiligen Primarpaaren angepasst wurde. Der Erfolg der PCR wurde stets durch Gelelektrophoresen der PCR-Produkte verifiziert (siehe Kapitel 2.2.6).

Phase	Zeit	Temperatur (°C)
I	2 min	94
II	20 sec	94
	20 sec	50-65
	1 min	72
III	7 min	72
	∞	4

**Tab. 3: Übersicht über die drei Abschnitte der PCR.** In Phase I erfolgt über die initiale Denaturierung, in Phase II die Amplifikation mit Denaturierung, Annealing und Primer-Extension, um schließlich in Phase III die terminale Extensionsphase.

### 2.2.6 Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können DNA-Fragmente durch ein elektrisches Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Neben der negativen Ladung der DNA, welche die Wanderung zur Anode bedingt, trägt die Gelstruktur zur Auftrennung nach der Größe bei, indem sie größere Fragmente stärker bremst als kleinere. Durch die Zugabe des DNA-Interkalans Ethidiumbromid, welches in UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) fluoresziert, lassen sich DNA-Fragmente unter UV-Bestrahlung detektieren. Zur Bestimmung der Fragmentgröße dienen Längenstandards mit DNA-Molekülen bekannter Größe, sogenannte Marker, die neben den DNA-Proben auf das Gel aufgetragen werden.

Je nach Größe der DNA-Moleküle wurden unterschiedliche Agarosekonzentration verwendet, die Standardkonzentration war 1%. Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht, in Gelschlitten gegossen und in Elektrophoresekammern mit TAE-Laufpuffer gesetzt. Die DNA Proben wurden mit 0,1 x Volumen Auftragspuffer, welcher u.a. Bromphenolblau enthält (ein Farbstoff, der mit der DNA ko-migriert) versetzt, in die Gelkammern pipettiert und an eine Spannung von 80-100 Volt angeschlossen. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele unter UV-Licht fotografisch dokumentiert.

Gelelektrophoresen wurden zur Analyse von PCR-Produkten, zur Auftrennung von DNA-Molekülen mit anschließendem Blotten auf Membranen für Southern Hybridisierungen oder zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt.

TAE-Puffer (Laufpuffer für Agarosegele)

400 mM	Tris
200 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA
20 ml/l	CH <sub>3</sub> COOH, pH 7.4
0,5 mg/l	Ethidiumbromid

10x Auftragspuffer für Agarosegele

50 mM	EDTA
50 %	Saccharose
0,1 %	Bromphenolblau

**2.2.7 Isolierung und Reinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte mithilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit, entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Diese Methode beruht auf der reversiblen Bindung von DNA an Silica-Membranen (Vogelstein and Gillespie, 1979): in einem Hochsalzpuffer gelöst, bindet die DNA an die Silica-Membran der Säulchen, und wird durch einen Niedrigsalzpuffer (TE-Puffer) wieder von der Membran eluiert.

**2.2.8 Klonierung**

Die Klonierung ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA in Plasmidform mithilfe von Bakterien. Die gewünschte DNA-Sequenz muss hierzu in ein Plasmid integriert werden, dies geschieht bei der sticky-end Methode durch Spaltung der DNA und des Vektors mit denselben Restriktionsenzymen und anschließendes Verknüpfen von DNA und Plasmid durch eine Ligase. Das resultierende Plasmid wird mittels Transformation von Bakterien aufgenommen, und von diesen vervielfältigt.

**2.2.8.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen und DNA- Ligation**

Zum Restriktionsverdau wurde 1 µg DNA mit 10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease in der zugehörigen Pufferlösung 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Bei Spaltung mit zwei Enzymen wurden diese zeitgleich eingesetzt, falls derselbe Puffer benötigt wurde, oder in zwei aufeinanderfolgenden Schritten bei unterschiedlichen Puffern, wobei zuerst der Niedrigsalz-Puffer zum Einsatz kam. Plasmide und Inserts wurden nach den gleichen Bedingungen gespalten. Bei Klonierungen mit nur einem Restriktionsenzym wurde die Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau und Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym (10 min bei 65°C) mit 5U Alkaline Shrimp Phosphatase (in zugehörigem Puffer) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Nach 1 Std Inkubation bei

37°C und erneuter Hitzeinaktivierung wurde die DNA gelelektrophoretisch von den kurzen endständigen Spaltprodukten getrennt. Nach Gelextraktion der DNA-Fragmente wurde deren Konzentration mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spectrophotometers gemessen. Zur Ligation wurden Insert und Vektor in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt, wobei die Menge eingesetzten Vektors etwa 100 ng betragen, die DNA-Gesamtkonzentration jedoch unter 10 ng/µl bleiben sollte. Zusammen mit 0,5 U T4-DNA-Ligase im zugehörigen Ligasepuffer wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert.

### **2.2.8.2 Transformation kompetenter Bakterien**

Zur Transformation von Plasmiden wurden kompetente Bakterien des E. coli Stammes XL1 blue verwendet. Von einem Ligationsansatz wurden 10 µl, bei einer Re-Transformation 1 µl einer 100-fach verdünnten Plasmid-DNA mit jeweils 60 µl kompetenten Bakterien auf Eis vermenget. Nach 30 min Inkubation und einem 45 sec langen Hitzeschock bei 42°C folgte eine erneute 3-minütige Inkubation auf Eis. Diese Temperatur-bedingte Stresssituation führt zu einer vorübergehenden Erhöhung der Bakterien-Permeabilität und so zur Aufnahme von Plasmiden (Hanahan, 1983). Die Bakterien wurden anschließend in 1 ml LB-Medium für 60 min bei 37°C inkubiert (Zeit in der sie die Antibiotikaresistenz ausbilden), zentrifugiert, in 100 µl des Überstandes resuspendiert und auf LB-Ampicillin Agarplatten, welche allein das Wachstum transformierter Bakterien mit Ampicillin-Resistenz erlauben, ausplattiert. Bei Re-Transformationen wurden 50 µl der unkonzentrierten Bakteriensuspension ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden am Folgetag einzelne Kolonien mit einer sterilen Impfföse gepickt, in jeweils 5 ml LB-Ampicillin Medium angeimpft, und 24 Stunden bei 37°C und 190 rpm inkubiert.

#### LB-Medium

5 g/l NaCl  
10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
zur Selektion: 100 mg/l Ampicillin

#### Agarplatten

NaCl, Trypton, Hefeextrakt wie LB-Medium, zusätzlich:  
13 g/l Agar  
150 mg/l Ampicillin

### **2.2.8.3 Isolierung der Plasmide**

Plasmide aus Bakterienkulturen wurden mithilfe des JETSTAR Plasmid Purification Kits nach einem vereinfachten Protokoll isoliert. Dazu wurden 2 ml der Suspension pelletiert und mit 3 verschiedenen Pufferlösungen, entsprechend des Herstellerprotokolls, vermischt und

zentrifugiert. Der wässrige Überstand mit dem gelösten Plasmid wurde abgezogen und mit 1 Vol Isopropanol gemischt, was zur DNA-Präzipitation führt. Das Präzipitat wurde pelletiert und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Erfolgskontrolle der Klonierung wurden Restriktionsspaltungen mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt; positive Plasmide wurden zum Sequenzieren zu Eurofins MWG/Operon (Ebersberg) eingeschickt.

Zum Erhalt einer größeren Menge eines Plasmids wurden 100 ml Ampicillin-haltiges (100µg/ml) LB-Medium mit 0,5 ml Suspension der Vorkultur inokuliert, bei 37°C und 190 rpm über Nacht inkubiert und am Folgetag, nach Einfrieren von 3,6 ml der Kultur mit 400 µl 10x HMFM-Einfriermedium bei -85°C, abzentrifugiert (15 min bei 4000 rpm). Die Plasmide wurden mit dem JETSTAR Plasmid Purification Kit oder dem QIAGEN Plasmid Kit entsprechend der Herstellerprotokolle isoliert und in 2 ml TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer ermittelt.

#### 10x HMFM-Einfriermedium

63 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
4,5 g/l	Natriumcitrat
0,9 g/l	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
9 g/l	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
18 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
414 ml/l	Glyzerin

#### **2.2.9 In vitro Mutagenese**

Eine Abwandlung der klassischen PCR diente zur in vitro Mutagenese der CTCF-Konsensussequenz. Die Methode umfasst zwei konsekutive PCR-Reaktionen im selben Reaktionsgefäß, wobei das PCR-Produkt der ersten PCR als Primer (sog. Megaprimer) für die zweite PCR dient (Ekici et al., 1997). Für die zu mutierende Stelle wird ein Mutationsprimer gewählt, der die mutierte Sequenz in der Mitte und beidseits davon dem Ausgangsfragment entsprechende Komplementärsequenzen enthält. Im ersten PCR-Zyklus generieren Mutationsprimer und ein 3' Primer ein Teilfragment von der Mutationsstelle bis zum 3'Ende. Dieses dient als 3' Primer der zweiten PCR, in welcher mit dem zugegebenen 5' Primer das mutierte Gesamtfragment entsteht, welches, wie andere PCR-Produkte, isoliert, gespalten und kloniert wurde (siehe Kapitel 2.2.6 bis 2.2.8). Für letzteres enthalten die 5' und 3' Primer an ihren Enden Restriktionsenzymststellen. Die Puffer, PCR-Ansätze und -Bedingungen sind aufgelistet.

#### 2x Pfu –PCR-Puffer

200 µl	10xPCR Puffer (Promega)
je 4 µl	100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
784 µl	dest. H <sub>2</sub> O



Primer-Mix (Mutationsprimer und 3'Primer):

2 µl	Mutations-Primer (50 µM)
1 µl	3'Primer (50 µM)
17 µl	dest. H <sub>2</sub> O

1. PCR (Herstellung des Megaprimers):

12,5µl	2x Pfu-PCR-Puffer
1 µl	Template-Plasmid (100 ng)
1 µl	Primer-Mix (5 pMol Mutationsprimer, 2,5 pMol 3'Primer)
1 µl	Pfu-Polymerase (2,5 U)
9,5 µl	dest. H <sub>2</sub> O

PCR-Zyklusbedingungen: 2 min à 94°C, 15 x (20s à 94°C – 20s à 50°C – 1min à 68°C)

2. PCR (Amplifikation mit Megaprimer und 5'Primer):

25µl	Gesamtansatz der 1.PCR
12,5 µl	2x Pfu-PCR-Puffer
1 µl	5' Primer (50µM)
1 µl	Pfu-Polymerase (2,5 U)
10,5 µl	dest. H <sub>2</sub> O

PCR-Zyklusbedingungen: 2 min à 94°C, 15 x (20s à 94°C – 20s à 60°C – 1min à 68°C)

**2.2.10 DNase I - Hypersensitivitäts Assays**

Bei *in situ* DNase I Spaltungen werden lebende Zellen mit Lysolecithin permeabilisiert (Miller et al., 1978, 1979) und mit DNase I behandelt, einer Nuclease, welche DNA je nach Zugänglichkeit relativ unspezifisch schneidet: an besonders zugänglichen Stellen, den DNase I hypersensitiven Sites (HSS), wird die DNA häufiger geschnitten als unzugängliche heterochromatisch verpackte DNA (Pfeifer and Riggs, 1991) (siehe Kap. 1.2 und 3.2.1). Durch Nachspaltungen mit Restriktionsendonukleasen, gelelektrophoretische Auftrennung und Blotting der Fragmente auf eine Nylonmembran und anschließende Hybridisierung der Fragmente mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (Southern Blot) lassen sich Aussagen über die Lokalisation solcher HSS treffen. Genauere Erklärungen zur Methode finden sich in Kapitel 3.2.1.

**2.2.10.1 In situ DNase I – Spaltungen**

Folgende B- und non-B Zelllinien wurden partiellen DNase I Spaltungen unterzogen: MN 60, REH, BJAB, MOLT-4 und HL 60. Jeweils 10<sup>8</sup> Zellen wurden bei 1100 rpm 10 min abzentrifugiert und in 2 ml Puffer I suspendiert (Endkonzentration 10<sup>7</sup> Zellen/ 250 µl). Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden 20 µl 5% Lysolecithin zugegeben (Endkonzentration 0,05%) (Miller et al., 1979). Nach 2 min Inkubation (37°C) wurde die Zellsuspension mit Puffer I auf 50 ml aufgefüllt, abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml

Puffer II aufgenommen. 20 µl DNase I (10U/µl) wurde mit 180 µl Puffer II auf 1U/µl verdünnt und auf Eis gelagert bevor nach u.g. Schema (siehe Tab. 4) eine Verdünnungsreihe aufsteigender DNase I Konzentrationen (DNase I – Lösung (1U/µl) mit Puffer II) vorbereitet wurde. 250 µl der Zellsuspension wurden zugegeben und 5 min bei 25 °C inkubiert, Zeit in der die DNase I in den Zellkern diffundiert und die DNA *in vivo* spaltet.

#	Zellen(µl)	DNase I (1U/µl)	Puffer II (µl)	Endkonz.DNaseI (U)
0	250	-	50	0
1	250	1	49	1
2	250	2	48	2
3	250	5	45	5
4	250	7	43	4
5	250	10	40	10
6	250	20	30	20

**Tab. 4: Verdünnungsschema der DNase I Konzentration für die Versuche der limitierten DNase I Spaltung..**

5 min nach Zugabe der DNase wurde die Reaktion durch 100 µl 4x STOP-Lösung beendet und das Gemisch 1 Stunde bei 55°C inkubiert. Es folgte die DNA-Extraktion nach der Phenol-Chloroform Methode (siehe Kap. 2.2.3), das resultierende Pellet wurde in 200 µl TE – Puffer resuspendiert. Nach DNA-Konzentrationsmessung wurden 10 µl zur Kontrolle des DNase I-Verdaus auf ein Testgel aufgetragen, der Rest bei -20°C tiefgefroren.

#### Puffer I

150 mM	Saccharose
80 mM	KCl
35 mM	HEPES, pH 7.4
5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.5 mM	CaCl <sub>2</sub>

#### Puffer II (50ml Puffer I + 25µl 1M CaCl<sub>2</sub>)

150 mM	Saccharose
80 mM	KCl
35 mM	HEPES, pH 7.4
5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	CaCl <sub>2</sub>

#### 4x STOP-Solution

80 mM	EDTA, pH 8.0
4%	SDS
2,4 mg/ml	Proteinase K

### **2.2.10.2 Restriktionsendonuklease - Spaltungen der DNase I - behandelten DNA**

Die *in situ* DNase I verdaute DNA (siehe Kap. 2.2.10.1) wurde vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Restriktionsenzymen saturierend nachgespalten, um definierte Fragmentlängen zu erhalten (siehe Kapitel 3.2.1.). 50 µg DNA wurden mit 10 µl der jeweiligen Restriktionsendonuclease (ca. 100 U, jew. Eco RI, Acc 65I, Hind III, Bam HI oder Bgl II), 10 µl des entsprechenden 10x Puffers und dest. H<sub>2</sub>O ad 100 µl angesetzt und 1 Std. bei 37°C inkubiert, bevor sie für das spätere Southern Blotting gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde.

### **2.2.10.3 Southern Blot**

Der Southern Blot ist ein Verfahren zum Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz mithilfe spezifischer DNA-Sonden (Southern, 1975). Genomische DNA wird mit Restriktionsenzymen verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen (Blotting) und, nach Denaturierung und Fixierung, mit einer z.B. radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert (Denhardt, 1966). Deren Lokalisation, und somit die Lokalisation und Größe des gesuchten DNA-Fragments, lassen sich mithilfe eines Röntgenfilms ermitteln.

### **2.2.10.4 Auftrennung der DNA-Fragmente und Southern-Transfer**

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente für Southern Blots wurden 1%-ige vertikale Agarosegele der Größe 15 x 25 x 0,5 cm gegossen, deren Ausmaße eine Auftrennung auch größerer DNA-Fragmente bis zu max. 20 000 bp ermöglichen. Pro Geltasche wurde der gesamte Restriktionsenzym-Spaltansatz (100 µl), mit 10 µl Auftragspuffer, sowie im mittleren Slot 10 µl des 1:100 verdünnten DNA Molecular Weight Marker X (70–12200 bp), aufgetragen; im Anschluss wurde die DNA in TAE Laufpuffer (mit 50µg/ml Ethidiumbromid) für 3-4 Std bei 70-80 Volt gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Mithilfe des Kapillar-Blotting Verfahrens wurde die DNA, nach photographischer Dokumentation des Agarosegels unter UV-Licht, vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde ein in Natronlauge (0,4 M NaOH) getränktes Whatman 3 MM Papier so auf ein Tischchen in einer Plastikwanne gelegt, dass die überstehenden Ränder seitlich in die mit 1l Natronlauge gefüllte Plastikwanne ragen. Das Agarosegel wurde auf das feuchte 3 MM Papier gelegt und seitlich mit Saran-Folie versiegelt, um sicherzustellen dass der Flüssigkeitsstrom durch das Gel läuft, bevor eine befeuchtete Nyleonmembran (Biodyne B Membrane) auf dem Gel positioniert wurde. Auf die Membran kamen ein benetztes 3 MM Papier sowie viele Lagen gefalteten Zellstoffs, der zum Schluss mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert wurde, zu liegen. Durch diese Anordnung entsteht ein Sog, der die Natronlauge aus der Wanne über das Gel und die Membran in den saugfähigen Zellstoff zieht.

Auch die DNA, durch die alkalische Lösung zu Einzelsträngen denaturiert, wird aus dem Gel gelöst und mitgetragen, bis sie an der positiv geladenen Nylonmembran gebunden wird.

Der Southern-Transfer lief über Nacht, bis die Natronlauge vollständig aufgesogen war. Zur Neutralisierung wurde die Membran in 0.5 M Tris-Puffer (pH 7.0) geschwenkt und dann zur kovalenten Bindung der DNA 3 Std. im Trockenofen bei 80°C gebacken.

#### **2.2.10.5 Herstellung, radioaktive Markierung und Aufreinigung der DNA-Sonden**

Die DNA-Sonden wurden mit der „Random-Primer Labeling“ Methode radioaktiv markiert. Diese basiert auf einer in vitro Primer-Extension mit Zufallsoligonukleotiden als Primern, radioaktiv markierten Nukleotiden und der DNA-Sonde als Matrize (Feinberg and Vogelstein, 1983). Zunächst wurden die DNA-Sonden per PCR, mit spezifischen Primern und dem jeweiligen Plasmid als Matrize, amplifiziert und mit dem PCR Purification Kit isoliert. Nach DNA-Konzentrationsmessung erfolgte die radioaktive Markierung mit dem Random Primer Labeling Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Es wurden 25 ng der DNA-Sonde eingesetzt; als radioaktives Nukleotid diente [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, ein mit dem  $\beta$ -Strahler Phosphor <sup>32</sup>P markiertes Desoxyribonukleotid. Resultat dieser Art von Markierung sind verschieden lange, radioaktiv markierte DNA-Fragmente, die den gesamten Bereich der ursprünglichen DNA-Sonde abdecken. Diese Fragmente wurden mit „Quick Spin Columns for radiolabeled DNA purification“, entsprechend den Instruktionen des Herstellers, von Überresten radioaktiv markierter Nukleotide gereinigt. Die radioaktive Gesamtaktivität wurde als Zerfälle pro Minute (cpm = counts per minute) mit einem Szintillationszähler gemessen, die spezifische Aktivität bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge sollte bei etwa 10<sup>8</sup> cpm/  $\mu$ g DNA liegen.

#### **2.2.10.6 Hybridisierung der Membranen**

Vor der Hybridisierung der Membranen erfolgen Vorwaschen und Prähybridisierung, um unspezifische Bindungen der Nylonmembran abzusättigen. Danach folgen die eigentliche Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde und ein abschließender Waschschrift um unspezifische Bindungen zu lösen.

Zum Vorwaschen wurden die Membranen 2 x 30 min in Waschpuffer (4 x SSC, 1% SDS) bei 68°C geschwenkt; nach 30 min wurde die Waschlösung gewechselt. Die Prähybridisierung erfolgte in Prähybridisierungspuffer (s.u.), wobei die darin enthaltene Lachs-DNA (zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindungen) 5 min zur Denaturierung aufgeköcht wurde. Je nach Größe der Hybridisierungsröhren (100 oder 250 ml) wurden 100 bzw. 200 ml Prähybridisierungspuffer vorbereitet und vorgewärmt (68°C), wovon 5 bzw. 10 ml für die spätere Hybridisierung abgenommen wurden. Pro Hybridisierungsröhre wurden max. 3 Membranen so eingerollt, dass die DNA-Seite nach innen zeigte und die Rollrichtung ein

Eindringen des Puffers zwischen die Membranen ermöglichte. Nach Zugabe der Prähybridisierungslösung wurden die Röhren 1 Std. bei 68°C im Hybridisierungsdrehofen gerollt, Zeit in der die Sonden radioaktiv markiert wurden (siehe Kap.2.2.10.5).

Nach Messung der Radioaktivität wurden die Sonden zu Einzelsträngen denaturiert (5 min kochen) und den 5 bzw. 10 ml der übrigen Hybridisierungslösung zugegeben. Die Endkonzentration an Aktivität sollte bei  $10^6$  cpm/ml Hybridisierungslösung liegen. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung wurde die Hybridisierungslösung in die Röhren gefüllt und über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsrollofen inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen zweifach bei RT mit 2 x SSC gespült, bevor sie bei 68°C in Spüllösung (2 x SSC, 0.5% SDS) 4 x 30 min nachgewaschen wurden. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Membranen in Saran-Folie verpackt und anschließend mit Röntgenfilmen exponiert.

#### 20x SSC Lösung

3 M	NaCl
0.3 M	NaCitrat

#### 10x Denhardt Lösung (Denhardt, 1966)

0.2%	BSA (bovine serum albumine)
0.2%	Ficoll
0.2%	Poyvinylpyrrolidon
10 mM	EDTA

#### Prähybridisierungspuffer

4x	SSC Lösung
1x	Denhardt Lösung
1%	SDS
0.1%	Na-Diphosphat
50 µg/ml	denaturierte Lachs-DNA

### **2.2.10.7 Exposition und Auswertung der Southern Blots**

Zwei verschiedene Methoden dienen zur Dektektion der radioaktiven Sonden. Zur ersten Abschätzung diente die Storage Phosphor Methode (Johnston et al., 1990), wobei Schirme mit Kristallbeschichtung über Nacht exponiert und am Folgetag die strahlenbedingte Veränderung der Kristalle mithilfe des PhosphorImagers ausgelesen wurde. Diese Kristallschirme sind wesentlich sensitiver als Röntgenfilme, haben jedoch eine geringere Auflösung, weswegen alle Membranen, welche interpretierbare Ergebnisse lieferten, auch einer normalen Autoradiographie unterzogen wurden. Dazu wurde die Membran mit einem Röntgenfilm und Signal-intensivierenden Verstärkerfolien (Laskey and Mills, 1977) in einer Röntgenkassette bei -70°C im Gefrierschrank 3-5 Wochen lichtgeschützt exponiert, bevor die Filme entwickelt

wurden. Die Auswertung basierte auf Korrelationskurven zwischen der Größe (in bp) der DNA Fragmente und deren Position im Gel, welche mithilfe von Markerhybridisierungen (siehe Abb. 15C und Kap. 3.2.2.4) erstellt wurden. Zeigten die Filme mit zunehmender DNase I Konzentration neu aufgetretene Banden, wurde der Abstand dieser Fragmente von der Auftragestelle ausgemessen; anhand der Korrelationskurve wurde mit einer Genauigkeit von ca. +/- 50 bp auf die Länge des Fragments und somit die Lokalisation der HSS geschlossen. Die identifizierten HSS wurden in der Übersicht des Ig  $\lambda$ -Locus (Gene 2.0 Software, Accelrys) eingetragen. Zu weiteren Auswertungsdetails siehe Kapitel 3.2.6.

### 2.2.10.8 Stripping der Southern Blot Membranen

Eine Membran kann in Verlauf mit unterschiedlichen DNA Sonden hybridisiert werden, wenn die jeweils vorhergehende Sonde in einem Prozess namens „Stripping“ abgelöst wird. Hierzu wurden die Membranen 30 min bei 45°C in Stripping Puffer (0,4 M NaOH, 0,1% SDS) gewaschen und anschließend in 0,5 M Tris-Puffer (pH 7.0) neutralisiert.

### 2.2.11 Colony-Forming-Assay

Zur Untersuchung von Insulator/Boundary Funktionen der identifizierten HSS wurde der von Antonia Regnier etablierte Colony-Forming-Assay (CFA) eingesetzt (Regnier, 2011).

Dabei werden Zellen mit linearisierten Konstrukten, die in genomische DNA integrieren und Chromatin-abhängig exprimiert werden, transfiziert, und in Selektionsmedium kultiviert. Anschließend wird die Anzahl der resultierenden Kolonien erfasst und quantitativ ausgewertet. Eine eingehendere Beschreibung der Methode findet sich in Kap. 3.4.1.

<b>Zeit</b>	<b>Einzelne Schritte des Colony Forming Assays</b>
<b>Tag 1</b>	Aussaat der Zellen in 24 well Platten
<b>Tag 2</b>	Transfektion
<b>Tag 3</b>	Ausplattierung und Beginn der Selektion
<b>Tag 8</b>	1. Mediumwechsel
<b>Tag 13</b>	2. Mediumwechsel
<b>Tag 17</b>	Ende des Colony Forming Assays, Anfärbung der Zellen
<b>Tag 18</b>	Auszählung und Auswertung

Tab. 5: Übersicht über die einzelnen Schritte im Rahmen des Colony-Forming-Assays.

#### 2.2.11.1 Herstellung und Linearisierung der Plasmide

Zur funktionellen Analyse der HSS auf Insulator/Boundary Funktion wurden verschiedene Konstrukte basierend auf den Referenzvektoren pSV40Pneo und pSV40EPneo generiert (Regnier, 2011) (siehe auch Kap. 3.4.2). Zur Überprüfung einer Boundary Funktion wurden

die HSS beidseits des Resistenzgens eingefügt, zur Testung einer Insulator-Funktion zwischen Enhancer und Promotor. Die resultierenden Konstrukte sind Kapitel 3.4.2 zu entnehmen.

#### **2.2.11.2 Transfektion von Zellen**

Die CFAs wurden mit HeLa Zellen durchgeführt; die verwendeten Plasmide wurden mit der Restriktionsendonuklease Nde I linearisiert; als Transfectionsreagenz diente Nanofectin. Pro well wurden  $5 \times 10^4$  HeLa-Zellen in 1 ml Medium (in 24-well Platten) ausplattiert und am Folgetag transfiziert, wobei jew. 0,5 µg linearisierte Plasmid-DNA mit 25 µl Nanofectin Diluent und 1,6 µl Nanofectin Transfection Reagent mit 23,4 µl Diluent verdünnt wurden. Die beiden Suspensionen wurden vermischt und 15 min bei RT inkubiert, bevor sie auf die Zellen getropft und über Nacht inkubiert wurden. Als Kontrolle wurde jew. ein well mit Transfektionslösung ohne Plasmid-DNA transfiziert.

#### **2.2.11.3 Ausplattierung und Selektion der transfizierten Zellen**

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Accutase gelöst und gezählt. Jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen wurden in 30 ml Selektionsmedium (HeLa Wachstumsmedium mit 400 µg/ µl G418 Sulfat, siehe Kap. 2.2.1) in großen Gewebekulturschalen (145 mm x 20 mm) ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Alle 5 Tage (Tag 8 und 13; siehe Tab. 5), wurde das Medium gewechselt um eine konstante Konzentration von G418 sicherzustellen.

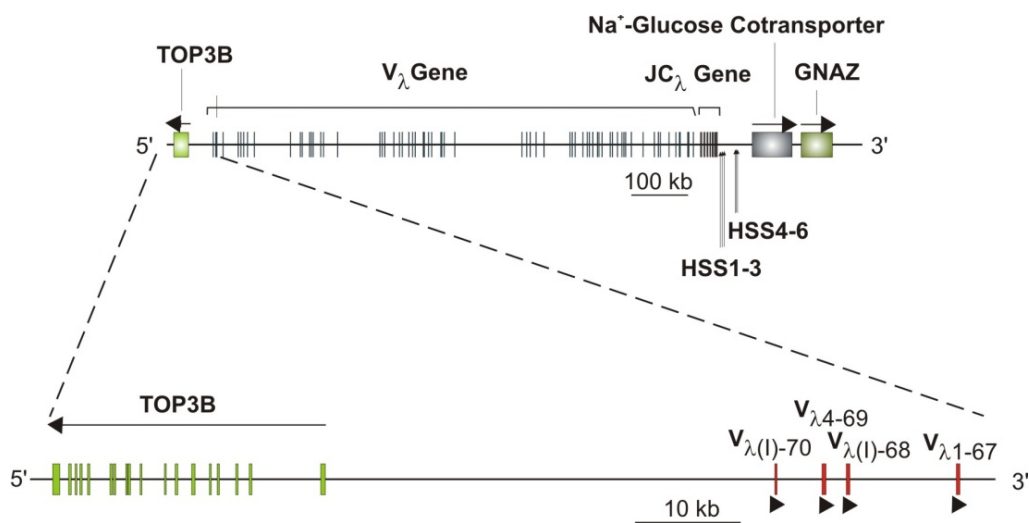
#### **2.2.11.4 Anfärbung und Auswertung der Kolonien**

Nach 14 Tagen wurden die CFAs beendet und die Zellen, nach Waschen mit PBS, 15 min bei RT mit 10 ml Methylenblau-Färbelösung (50% Methanol, 50% H<sub>2</sub>O, 0,5 % Methylenblau) inkubiert, mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült und an der Luft getrocknet. Die Schalen wurden zu Dokumentationszwecken mit dem HP ScanJet G4010 Photo Scanner eingescannt. Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung der intensiv blau gefärbten Zellkolonien mithilfe eines unter die Zellkulturschale gelegten Auszählrasters. Jede mit dem Auge sichtbare Kolonie wurde als eine solche gezählt. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Computerprogrammes Microsoft Excel 2010 (siehe auch Kap. 3.4.3.3).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Darstellung des 5' Ende des humanen $Ig\lambda$ -Locus

Etwa 44 kb stromaufwärts des humanen  $Ig\lambda$ -Locus liegt das Gen TOP3B, welches anlässlich der Analyse des humanen  $Ig\lambda$ -Locus entdeckt wurde (Kawasaki et al., 1997) und für die DNA Topoisomerase III kodiert (Hanai et al., 1996). Diese spielt u.a. bei der Transkription sowie bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen eine Rolle. Ihre Fehlregulation bzw. Deletion kann schwerwiegende Folgen haben wie z.B. Infertilität, Autoimmunität oder Tumorentstehung (Kwan et al., 2007; Kwan et al., 2003; Oliveira-Costa et al., 2010). Angesichts dieser unterschiedlichen Funktionen von TOP3B und  $Ig\lambda$  ist anzunehmen, dass sie unabhängig von einander exprimiert werden.



**Abb. 8: Übersicht über  $Ig\lambda$  und den 5' gelegenen Bereich.** Der  $Ig\lambda$  Locus besteht aus der  $JC_\lambda$  und der  $V_\lambda$ -Region; die einzelnen Striche stehen für jew. ein Gen/Exon. Die stromabwärts liegenden Gene sind dargestellt; in der Region dazwischen befinden sich sechs HSS, HSS 1-3 und HSS 4-6. Die Region stromaufwärts ist vergrößert dargestellt: 44 kb 5' von  $Ig\lambda$  liegt das Gen TOP3B. Die einzelnen TOP3B Exons sowie die am weitesten 5' liegenden  $V_\lambda$ -Gene sind dargestellt. Die Pfeile bzw. Pfeilspitzen zeigen die Leserichtung der Gene (5' nach 3') an.

Folglich sind im 43512 bp umfassenden Bereich zwischen TOP3B und  $V_{\lambda(1)70}$ , dem am weitesten 5' liegenden  $V_\lambda$ -Gen, regulatorische Elemente wie Insulatoren/Boundaries zu erwarten, welche z.B. die Funktion des  $Ig\lambda$  Enhancers oder auch die Chromatinöffnung des  $Ig\lambda$ -Locus im Laufe der B-Zellentwicklung regulieren. Bei  $V_{\lambda(1)70}$  handelt es sich um ein Pseudogen; weitere 4621 bp stromabwärts davon liegt mit  $V_{\lambda 4-69}$  das am weitesten 5' gelegene funktionelle und an V(D)J-Umlagerungen beteiligte  $V_\lambda$  Gen. Über den Bereich zwischen TOP3B und  $Ig\lambda$  war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt, insbesondere gab es keine Erkenntnisse zu regulatorischen Elemente in dieser Region. Vor diesem Hintergrund war es Aufgabe dieser Arbeit, diesen Bereich systematisch zu untersuchen um möglicherweise Insulatoren/Boundaries zu identifizieren, welche das 5' Ende des  $Ig\lambda$ -Locus markieren.

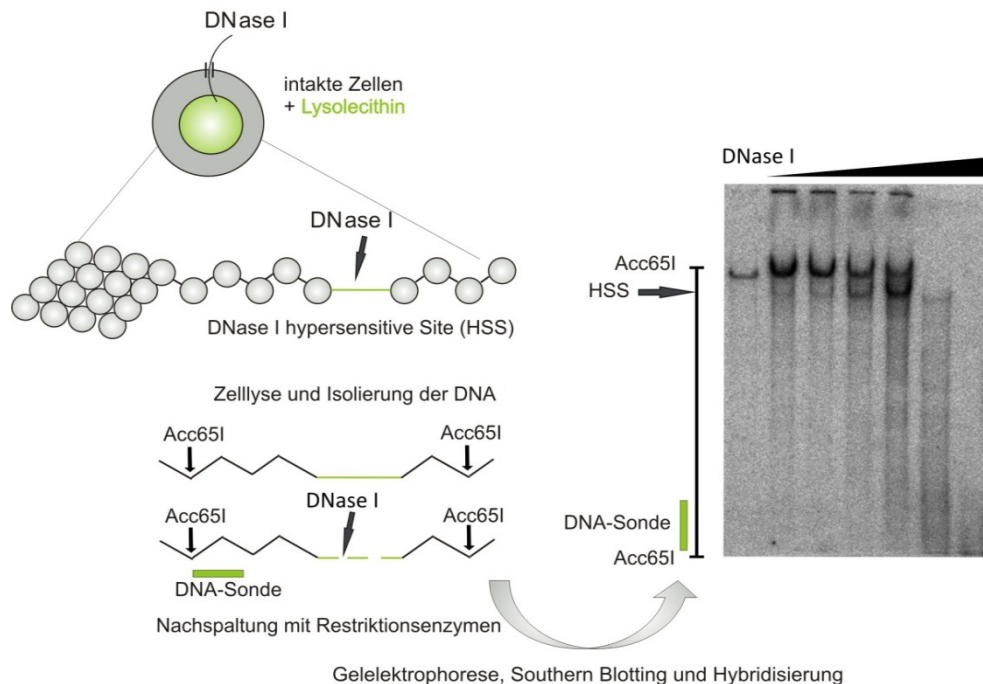


### 3.2 Suche nach DNase I hypersensitiven Regionen 5' des Ig $\lambda$ Locus

Die Methode der Wahl zum systematischen Screening großer Regionen auf potentielle regulatorische Elemente ist die limitierte *in vivo* DNase I Spaltung, mit welcher die AG Klobeck bereits 3' des Locus mehrere regulatorische Elemente identifizieren konnte (Asenbauer et al., 1999; Asenbauer and Klobeck, 1996; Nagel, 2009; Regnier, 2011).

#### 3.2.1 Prinzip der limitierten DNase I Spaltung zur Kartierung von HSS

Die Methode der limitierten DNase I Spaltung beruht auf dem „Accessibility“-Modell (Gross and Garrard, 1988). Dies besagt, dass die jeweils zelltypspezifischen *cis*-aktiven Elemente, die sich durch eine offene Chromatinstruktur (bis hin zur fast völligen Abwesenheit von Nucleosomen) auszeichnen, eine erhöhte Zugänglichkeit nicht nur für *trans*-aktive Faktoren sondern auch z.B. für DNA-spaltende Enzyme haben (Wu et al., 1979) (siehe auch Kapitel 1.2). DNase I, ein pankreatisches Enzym, spaltet DNA am „minor groove“ der Doppelhelix an ApN, TpN, NpA oder NpT Dinukleotidsequenzen (Gross and Garrard, 1988). Angesichts dieser geringen Spezifität wird die DNA bei hohen DNase I Konzentrationen vollständig zu kurzen Fragmenten abgebaut; bei niedrigen Konzentrationen und kurzer Wirkdauer spaltet diese Nuclease jedoch v.a. an exponierten Stellen, den sog. DNase I- hypersensitiven Sites (HSS). Durch die Permeabilisierung der Zellen mit Lysolecithin kann DNase I *in vivo* in den Zellkern diffundieren und DNA *in situ* spalten (Miller et al., 1979) (siehe Abb. 9), was Rückschlüsse auf die Chromatinstruktur in der lebenden Zelle erlaubt.



**Abb. 9: Limitierte DNase I Spaltung und indirect end-labeling zur Kartierung von HSS.** Dargestellt sind die einzelnen Schritte der *in vivo* DNase I Spaltung und des „indirect end-labeling“ (DNase I Behandlung, Nachspaltung, Gelelektrophorese, Blotting und Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde).

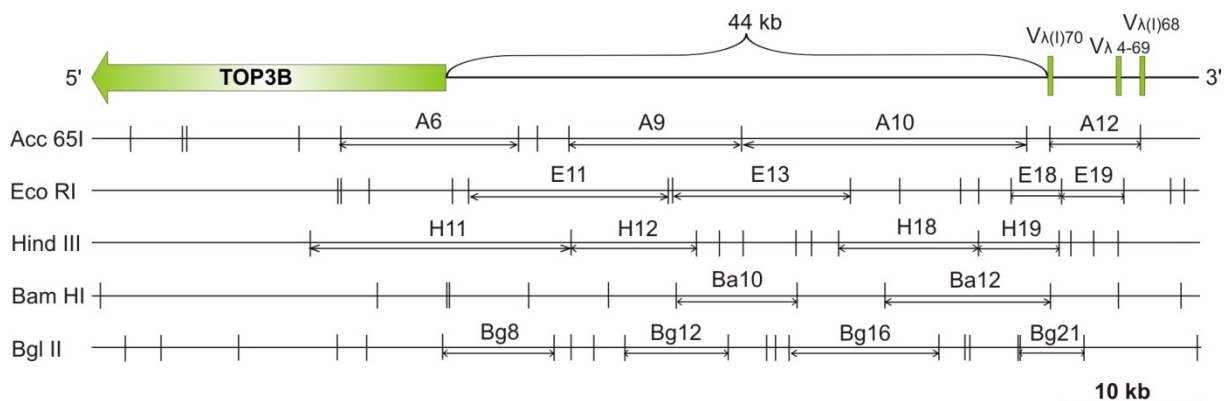
Die Methode des „indirect end-labeling“ dient zur Kartierung der HSS (Nedospasov and Georgiev, 1980; Wu, 1980). Im Anschluss an die limitierte DNase I Spaltung wird die DNA isoliert, mit einer Restriktionsendonuklease saturierend nachgespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert (siehe Abb. 9). Diese sollte komplementär zur DNA-Sequenz am Ende des Restriktionsfragmentes sein (siehe Abb. 9). Enthält das untersuchte Fragment eine HSS, entspricht die Länge des von der Sonde markierten Fragmentes dem Abstand zwischen der Restriktionsenzymspaltstelle und der DNase I Schnittstelle (siehe Abb. 9). Mehrere HSS innerhalb eines Restriktionsfragmentes würden in mehreren neuen Banden resultieren.

### 3.2.2 Herstellung von DNA-Sonden zur Suche nach HSS

Zur Suche und Kartierung von HSS muss man zunächst geeignete Restriktionsendonukleasen-Spaltfragmente sowie passende DNA-Sonden zur Markierung dieser Fragmente definieren.

#### 3.2.2.1 Suche geeigneter Restriktionsendonukleasen-Fragmente

Geeignete Restriktionsendonukleasen-Spaltprodukte im Rahmen von DNase I Assays müssen einige Kriterien erfüllen. So soll die Fragmentlänge aufgrund der begrenzten Auflösungskapazität der Gelelektrophorese max. 20 kb betragen; jenseits davon wird die Längenbestimmung und folglich die Kartierung einer möglichen HSS zu ungenau. Bei kürzeren Fragmenten beträgt die Unschärfe ca. 50 bp; bei längeren nimmt diese zu (Gross and Garrard, 1988). Mithilfe des Softwareprogramms Gene 2.0 (Accelrys) wurde der Abschnitt 5' des *Igλ* Locus systematisch nach Restriktionsspaltstellen durchsucht.



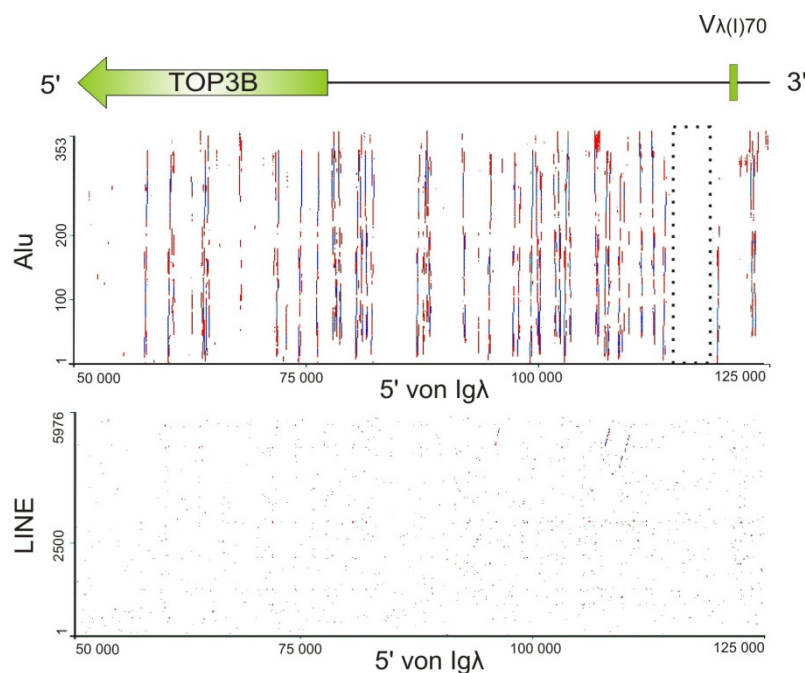
**Abb. 10: Restriktionsendonukleasen-Spaltfragmente 5' von *Igλ*.** Dargestellt sind Restriktionsspaltstellen (senkrechte Striche) der 5 angegebenen Restriktionsenzyme sowie die resultierenden relevanten Restriktionsfragmente 5' von *Igλ* mit Nummerierung.

Wie Abb. 10 zeigt, ergeben Spaltungen mit den Restriktionsendonukleasen Acc 65I, Eco RI, Hind III, Bam HI und Bgl II jeweils Fragmente geeigneter Größen, welche teilweise überlappen. Die Restriktionsfragmente wurden, innerhalb der Gesamtübersicht der Sequenz 5' von *Igλ*, von 5' nach 3' nummeriert.

### 3.2.2.2 Suche geeigneter DNA-Sonden

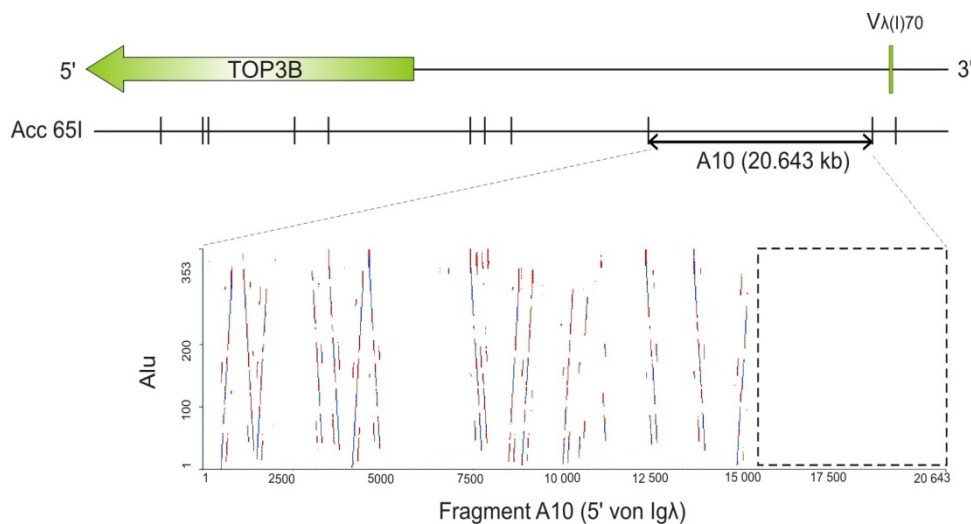
Nach der Identifikation geeigneter Restriktionsfragmente wurden für das „indirect end-labeling“ (Nedospasov and Georgiev, 1980; Wu, 1980) (siehe auch Kapitel 3.2.1), für jedes Fragment passende DNA-Sonden gesucht. Diese sollten die Fragmente so endständig wie möglich markieren, um direkte Rückschlüsse von der Fragmentlänge auf die Lokalisation der HSS zu ermöglichen. Bei mittig gelegenen Sonden wäre bei verkürzten Fragmenten nämlich unklar, auf welcher Seite der Sonde die HSS lokalisiert ist.

Neben der Endständigkeit ist die Spezifität ein weiteres Kriterium für eine geeignete DNA-Sonde. Wäre eine Sonde komplementär zu einer repetitiven Sequenz im Humangenom, würde sie multiple DNA-Fragmente markieren und wäre nicht sinnvoll einsetzbar. Mindestens 50 % des Humangenoms bestehen aus repetitiven Sequenzen, welche in 5 Gruppen unterteilt werden können: Transposon-basierte Elemente, inaktive Kopien zellulärer Gene (Pseudogene), einfache Sequenzwiederholungen einer oder mehrerer Basen sowie Segmentduplikationen von 10 – 300 kb und Blöcke von Tandem-Wiederholungssequenzen wie bei Zentromeren oder Telomeren (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Die darunter häufigsten -und im Rahmen dieser Arbeit relevantesten- sind die Transposon-basierten Elemente, welche LINEs und SINEs (long bzw. short interspersed elements) umfassen. LINE-Sequenzen sind ca. 6000 bp lang, 850 000-fach im Genom enthalten und machen ca. 20% der Genomsequenz aus; unter den SINEs ist der häufigste Vertreter Alu mit einer Länge von 300 bp und  $1 \times 10^6$  Kopien, was ca. 10% des Humangenoms entspricht (Lander et al., 2001).



**Abb. 11: Vorkommen von repetitiven Elementen 5' von Igλ.** Der Bereich 5' von Igλ wurde mittels Dot Plot gegen die Sequenzen der Alu- bzw LINE-Elemente aufgetragen. Homologien sind, je nach Ausmaß der Übereinstimmung, farblich blau oder rot markiert. Der gepunktete Quader markiert einen Alu-freien Bereich.

Zunächst wurde der gesamte Bereichs 5' von  $Ig\lambda$  mittels Dot Plots (mit der Gene 2.0 Software, Accelrys) auf das Vorkommen von LINE und Alu-Sequenzen untersucht. Dabei werden jew. 30 bp lange Fragmente der repetitiven Elemente gegen die genomische Sequenz aufgetragen und homologe Sequenzen durch einen Punkt bzw. Strich markiert. Je nach Ausmaß der Homologie werden die Treffer in unterschiedlichen Farben markiert. Die Dot Plots zeigten eine Vielzahl an Alu-Kopien sowie wenige rudimentäre LINE-Elemente 5' von  $Ig\lambda$  sowie auch Regionen, welche frei von diesen Elementen sind (siehe Abb. 11). Auf der Suche nach passenden DNA-Sonden wurde im Anschluss das Vorhandensein dieser repetitiven Elemente in jedem einzelnen Restriktionsfragment überprüft (siehe Abb. 12). Bereiche, welche keine repetitiven Elemente enthalten und am Ende eines Fragments lokalisiert sind, sind potentiell für die Markierung durch DNA-Sonden geeignet, wie z.B. der Bereich am 3' Ende des Fragments A10 (siehe Abb. 12).

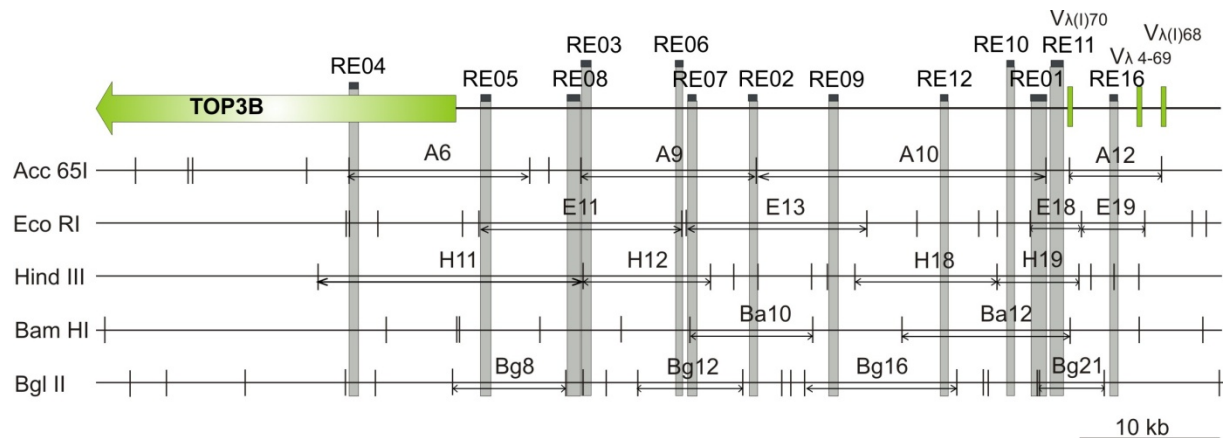


**Abb. 12: Screening eines einzelnen Restriktionsfragments auf repetitive Sequenzen.** Die Sequenz des Acc 651 Spaltproduktes A10 wurde gegen Alu aufgetragen; der markierte Bereich am 3' Ende zeigt eine ca. 5 kb lange Alu-freie Sequenz, welche für die Markierung mit einer DNA-Sonde geeignet ist.

Solch geeignete Regionen wurden einem Feinabgleich mithilfe der Blast-Suche der humanen Sequenzdatenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) unterzogen, um mögliche weitere Konsensussequenzen im Humangenom zu identifizieren. Bei nur einer Konsensussequenz ist davon auszugehen, dass es sich um eine spezifische (single-copy) Sonde handelt; bei mehreren Konsensussequenzen hingegen würde die potentielle Sonde mehrere Fragmente markieren, und folglich ungeeignet sein.

Basierend auf der systematischen Suche wurden schließlich 13 verschiedene DNA-Sonden definiert: zunächst RE 01 - RE 08, welche nach den ersten Ergebnissen zur Verfeinerung der Kartierung erst um die Sonden RE 09 - RE 12 und schließlich RE 16 ergänzt wurden. Diese Sonden erfüllen alle o.g. Kriterien weitestgehend und könnten z.T. zur Markierung mehrerer Fragmente dienen; aufgrund multipler repetitiver Elemente war eine streng endständige

Markierung allerdings nicht immer umsetzbar. Für einige Fragmente konnten jedoch relativ endständige Sonden sowohl für das 5' als auch das 3' Ende gefunden werden. Abb. 13 gibt einen Überblick über die Restriktionsfragmente und jeweils zugehörigen DNA-Sonden.



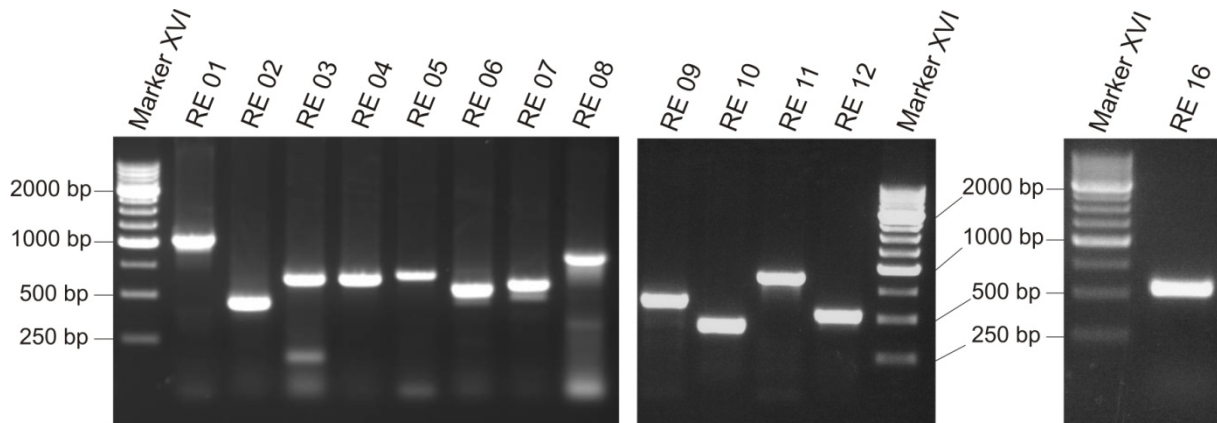
**Abb. 13: Restriktionsfragmente und Lage der DNA-Sonden 5' des Igλ Locus.** Dargestellt sind die 5' von Igλ gelegenen Restriktionsfragmente von Acc 65I, Eco RI, Hind III, Bam HI und Bgl II sowie die Lage der verwendeten DNA Sonden (RE 01 - RE 12; RE 16). Durch die grauen Balken lässt sich erschließen welche Fragmente von welchen Sonden markiert werden.

### 3.2.2.3 Herstellung und Klonierung der DNA-Sonden

Nachdem passende DNA-Sonden ermittelt wurden, wurden diese mittels PCR hergestellt. Dazu wurden zunächst Primer-Paare definiert, welche als Forward- bzw. Reverse-Primer komplementär an die Enden der DNA-Sonde binden und folgende Kriterien erfüllen: eine Länge von ca. 18-35 bp, ein CG-Gehalt von 40-60% und G-oder C-Basen am 5' Ende des Oligonukleotids. Zudem sollten die Primer eines Paares keine zueinander komplementären Bereiche besitzen um z.B. Dimer- oder Schleifenbildung zu verhindern und ähnliche Anlagerungstemperaturen haben, um während der Amplifikationszyklen mit gleicher Effizienz und Spezifität zu binden. Die Anlagerungstemperatur  $T_a$  bzw. Schmelztemperatur  $T_m$  eines Primers wird durch die Zahl der Nukleotide und deren Basenzusammensetzung bzw. CG-Gehalt bestimmt (Wu et al., 1991). Nach der Formel  $T_m = 4x [\text{Summe (G+C)}] + 2x [\text{Summe (T+A)}]$  lässt sich die ungefähre Schmelztemperatur in °C abschätzen; nach der Formel  $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$  die ungefähre Anlagerungstemperatur. Um das Auffinden passender Primer-Paare zu erleichtern wurde von der Gene 2.0 Software (Accelrys) Gebrauch gemacht; aus der Vorauswahl wurden jene Paare, die die längsten PCR-Produkte ergeben, gewählt.

DNA-Sonden, welche auf der Basis von genomischer DNA generiert werden, können durch unspezifische Amplifikate verunreinigt sein, was die Spezifität der Southern Blots beeinträchtigen würde. Daher sollten die DNA-Sonden in Plasmide kloniert werden, welche später als PCR-Matrize dienen sollten. Zur Klonierung wurden die Primer um Restriktionsendonukleasen-Schnittstellen ergänzt: eine Eco RI- Spaltstelle für die 5' Primer, eine Acc 65I bzw. eine Sal I Spaltstelle für die 3' Primer. Die sich ergebenden Sequenzen

sind in Kap. 2.2.5 aufgeführt. Basierend auf genomischer DNA der Zelllinien MN60 oder BJAB als Matrize wurden die DNA-Sonden mithilfe der jeweiligen Primer-Paare generiert.



**Abb. 14: Darstellung der verwendeten DNA-Sonden.** Dargestellt sind die PCR-Produkte der DNA- Sonden RE 01- RE 12 und RE 16, mit genomischer DNA als Matrize. Bei RE 03 und RE 08 finden sich nicht vermeidbare unspezifische Banden.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch von unspezifischen Banden, Primer-Rückständen oder übrigen Nukleotiden getrennt, unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits aus dem Gel extrahiert und unter Einsatz der Restriktionsenzyme EcoRI und Acc65I bzw. SalI in pBlueskript Sk- Vektoren (Stratagene) kloniert. Zur Durchführung siehe Kapitel 2.2.8. Nach Aufreinigung der klonierten Plasmide erfolgten Testspaltungen mit o.g. Restriktionsendonukleasen zur Erfolgskontrolle; positive Klone wurden abschließend sequenziert.

Ein Gesamtüberblick über die DNA-Sonden, ihre Länge, ihre zugehörigen Primer und die durch sie markierten Fragmente ist Tab. 6 zu entnehmen; die Sequenzen der Sonden sind im Anhang vermerkt (siehe Kap. 10.1).

Sonde	Größe	Primer	Markierung
<b>RE 01</b>	1067 bp	RE 01-1, RE 01-2	A 10, E 17, H 19, Ba 12
<b>RE 02</b>	467 bp	RE 02-1, RE 02-2	A 9, E 12, H 14, Ba 10, Bg 13
<b>RE 03</b>	648 bp	RE 03-1, RE 03-2	A 9, E 11, H 12, Ba 8
<b>RE 04</b>	640 bp	RE 04-1, RE 04-2	A 6, E 8, H 11, Ba 4, Bg 6
<b>RE 05</b>	685 bp	RE 05-1, RE 05-2	A 6, E 11, H11, Ba 7, Bg 8
<b>RE 06</b>	568 bp	RE 06-1, RE 06-2	A 9, E 11, H12, Ba 9, Bg 12
<b>RE 07</b>	619 bp	RE 07-1, RE 07-2	A 9, E 12, H 12, Bg 12
<b>RE 08</b>	866 bp	RE 08-1, RE 08-2	A 8, E 11, H 11, Ba 8, Bg 9
<b>RE 09</b>	606 bp	RE 09-1, RE 09-2	A 10, E 12, H 17, Ba 11, Bg 16
<b>RE 10</b>	418 bp	RE 10-1, RE 10-2	A 10, E 16, H 19, Ba 12, Bg 19
<b>RE 11</b>	852 bp	RE 11-1, RE 11-2	A 11, E 17, H 19, Ba 12, Bg 21
<b>RE 12</b>	512 bp	RE 12-1, RE 12-2	A 10, E 14, Ba 12, Bg 12, Bg 16
<b>RE 16</b>	529 bp	RE 16-1, RE 16-2	A 12, E 18, Ba 13, Bg 22

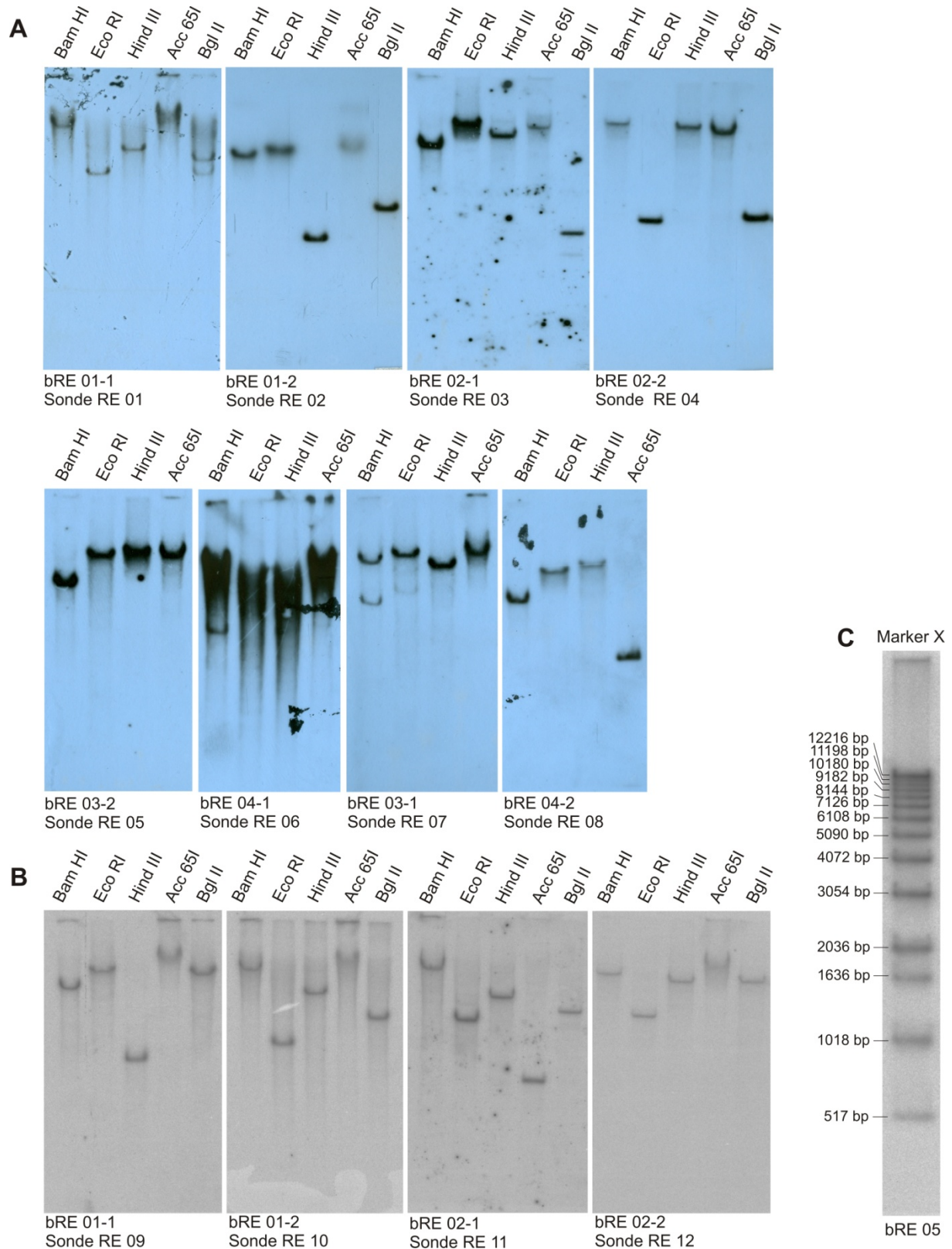
**Tab. 6: Überblick über die verwendeten DNA-Sonden.** Aufgelistet sind die Länge der Sonden, die Primer die zu ihrer Herstellung dienen und die Restriktionsfragmente, welche durch sie markiert werden (siehe Abb. 13).

### 3.2.2.4 Überprüfung der Spezifität der DNA-Sonden

Trotz des computerbasierten Abgleichs mit hochrepetitiven DNA-Sequenzen und des Feinabgleichs mittels der Blast-Suche über die Humangenom-Datenbank, könnten DNA-Sonden dennoch unspezifisch an andere evtl. repetitive Sequenzen binden. Dies würde im Southern Blot, statt in einer spezifischen Bande, in mehreren distinkten Banden oder einer diffusen Markierung des gesamten Blots resultieren. Vor dem Einsatz in DNase I Assays wurden aus diesem Grunde die DNA-Sonden mittels Testhybridisierungen experimentell auf ihre Spezifität hin geprüft. Hierzu wurde genomische DNA der Zelllinie MN 60 extrahiert, mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI, Acc 65I, Hind III, Bam HI bzw. Bgl II gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen geblottet (Membranen bRE 01-1 bis bRE 04-2; siehe Tab. 10 im Anhang) und mit jeweils einer der radioaktiv markierten Sonden hybridisiert (zur Durchführung siehe Kap. 2.2.10.6).

Diese Testhybridisierungen zeigten durchweg spezifische Signale mit distinkten Banden für die Sonden RE 01 – RE 05 sowie RE 07 – RE 12 (siehe Abb. 15). Die doppelte Bande, welche mit der Sonde RE 01 in der Bgl II Spaltung zur Darstellung kommt (siehe Abb. 15A), erklärt sich durch die Lage der Sonde über der Bgl II Spaltstelle, was zur Markierung beider Fragmente führt (siehe Abb. 13 und 15A). Ebenso lässt sich die doppelte Bande der Sonde RE 07 in der Bam HI Spaltung sowie der Sonde RE 03 in der Bgl II Spaltung erklären (siehe Abb. 13 und 15A). Die Sonde RE 06 hingegen führte, auch bei stringenteren Hybridisierungsbedingungen, zu unspezifischen Signalen ohne Markierung einer distinkten Bande (siehe Abb. 15A), so dass diese Sonde verworfen wurde. Alle anderen Sonden erwiesen sich als spezifisch und für die weiteren Versuche geeignet (bis auf die wenigen Konstellationen, die in Doppelbanden resultierten) (siehe Abb. 15).

Zur Überprüfung der Größe der Restriktionsfragmente lief auf jedem Gel ein DNA-Längenstandard mit, und jede Membran wurde (vor Hybridisierung mit den eigentlichen DNA-Sonden) mit radioaktiv markierter Längenstandard-DNA hybridisiert. Abb. 15C zeigt ein Beispiel einer solchen Markerhybridisierung. Anhand dieser Signale wurde eine Korrelationskurve zwischen der Größe (in kb) der DNA Fragmente und der Entfernung des Fragments von der Auftragstasche erstellt, so dass bei jeder Membran von der Position eines Fragments auf dessen Länge in kb rückgeschlossen werden konnte.



**Abb. 15: Spezifitätstest der DNA-Sonden.** A: Dargestellt sind Southern Blots mit genomischer DNA, welche mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen gespalten und den Sonden RE 01- RE 08 hybridisiert wurden. Gezeigt sind Bilder der belichteten Röntgenfilme. B: Testhybridisierungen der Sonden RE 09- RE 12; gezeigt sind Phosphorimager-generierte Bilder. C: Beispiel einer Markerhybridisierung. Der DNA Längenstandard wurde mit radioaktiv markierter Längenstandard-DNA hybridisiert; eine solche Markerhybridisierung wurde für jede Membran durchgeführt; die Abbildung zeigt beispielhaft die Blotmembran bRE 05. Die Längen der Banden sind angegeben.

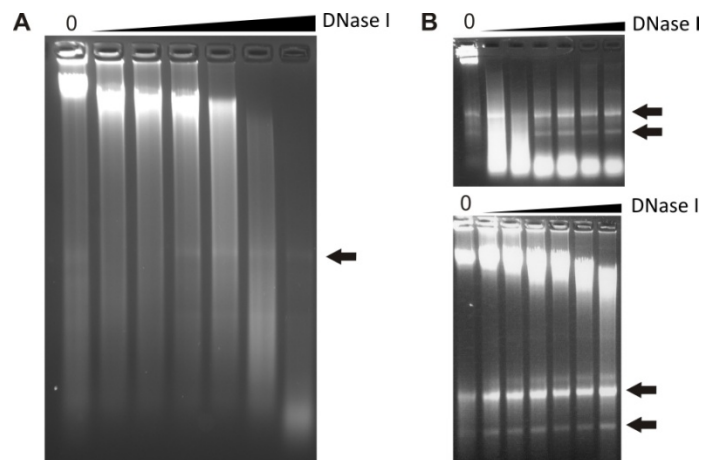


### 3.2.3 Auswahl der Zelllinien: B- und non-B-Zelllinien

Regulatorische Elemente und damit auch DNase I hypersensitive Elemente können konstitutiv, induzierbar, ubiquitär oder auch entwicklungs- oder zelltypspezifisch sein (Gross and Garrard, 1988). 5' des I $\gamma$ -Locus sind sowohl B-Zell spezifische HSS, welche nur in B-Zellen eine Funktion haben, als auch ubiquitäre HSS, die über den B-Zell Kontext hinaus von Bedeutung sind, denkbar. Da sich aus dem Expressionsmuster auch Rückschlüsse auf die mögliche Funktion ziehen lassen, sollten die DNase I Assays in B- sowie non-B Zelllinien durchgeführt werden. Als Vertreter der B-Zellreihe wurden die humanen Zelllinien BJAB (humanes B-Zell Lymphom), MN 60 (humane B-Zell Leukämie) und REH (humane prä-B-Zell Leukämie) gewählt, womit verschiedene Differenzierungs-stufen der B-Zell-Reihe - von der prä-B-Zelle bis hin zur reifen B-Zelle - vertreten sind (siehe Kapitel 2.1.9). Als non-B-Zellen wurden die Zelllinien HL 60 (humane akute myeloische Leukämie), MOLT-4 (humane T-Zell Leukämie), sowie HeLa (humanes Zervixkarzinom) gewählt (siehe Kap. 2.1.9). Diese Zelllinien waren alle bereits zuvor in der AG Klobeck vorhanden und wurden unter den in Kapitel 2.2.1 genannten Bedingungen kultiviert.

### 3.2.4 Limitierte DNase I Spaltungen

Zur Identifikation von B-Zell-spezifischen oder ubiquitären HSS stromaufwärts von I $\gamma$  wurden die o.g. B- und non-B-Zelllinien *in vivo* DNase I Spaltungen unterzogen. Dabei mussten aufgrund unterschiedlicher DNase I Sensitivitäten die optimalen Bedingungen (siehe Abb. 16A) für jede Zelllinie ermittelt werden. Ein zu geringer DNase I Verdau (siehe Abb. 16B unten) hätte zur Folge, dass hypersensitive Elemente nicht oder kaum erkennbar sind, während ein zu starker DNase I Verdau (siehe Abb. 16B oben) in stark degradiertes DNA resultieren würde, was die Erkennung von HSS ebenfalls unmöglich macht.



**Abb. 16: Limitierte DNase I Spaltungen.** Dargestellt sind Gelelektrophoresen von *in vivo* DNase I verdauter DNA. A: Ideale Verdünnungsreihe der DNase I Konzentration. B: Darstellung einer für den Zelltyp zu hohen (oben) bzw. zu niedrigen (unten) DNase I Konzentration. Die Pfeile markieren jeweils Banden ribosomaler RNA.

Um einen optimalen aufsteigenden DNase I Verdau, wie in Abb. 16A gezeigt, zu erzielen, wurde neben der DNase I Konzentration auch die Lysolecithin Konzentration zelllinienspezifisch optimiert; zudem musste auf unterschiedliche DNase I Aktivitäten in verschiedenen Produktionschargen Rücksicht genommen werden. Die resultierenden Konditionen sind in Kapitel 2.2.10.1 zu finden; die für jeden Blot eingesetzten DNase I Konzentrationen sind in Tab. 10 im Anhang wiedergegeben.

Alle verwendeten Zelllinien wurden DNase I Spaltungen in aufsteigender Konzentrationsreihe unterzogen (zu den einzelnen Konzentrationen siehe Tab. 10). Nach Extraktion der DNA wurde auf einem kleinen Testgel, wie in Abb. 16 zu sehen, der Erfolg des DNase I Verdaus überprüft. Bei gutem Ergebnis wurde die DNA mit jeweils einer der Restriktionsendonukleasen Eco RI, Acc 65I, Hind III, Bam HI oder Bgl II saturierend nachgespalten (siehe Kap. 2.2.10.2 sowie 3.2.2.1).

### **3.2.5 Southern Blots und Hybridisierungen**

Die *in vivo* DNase I verdaute sowie *in vitro* mit Restriktionsenzymen nachgespaltene DNA wurde in aufsteigender DNase I Konzentration mit einem DNA-Längenstandard auf große Agarosegele aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet (Southern Blot; zur Durchführung siehe Kap. 2.2.10.3). Insgesamt wurden im Verlauf 36 Membranen mit DNA unterschiedlicher Zelllinien und Restriktionsspaltungen generiert; eine Übersicht gibt Tab. 10 im Anhang.

Die Membranen wurden im Folgenden mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert (zur Durchführung siehe Kap. 2.2.10.6). Nach der Hybridisierung wurden Kristall-beschichtete Imaging-Platten über Nacht mit den jeweiligen Membranen exponiert (Storage Phosphor Methode, siehe Kap. 2.2.10.7) und mithilfe des PhosphorImagers ausgelesen, um die Hybridisierung schnell beurteilen zu können. Eine gute und verwertbare Hybridisierung ist dadurch gekennzeichnet, dass das ursprüngliche Restriktionsfragment gut erkennbar ist und mit steigender DNase I Konzentration an Intensität abnimmt. Desweiteren sollten möglichst wenig Artefakte die Bildqualität beeinträchtigen. Eine zu geringe Signalintensität kann verschiedene Gründe haben: zu geringe DNA-Mengen auf der Membran, eine zu niedrige radioaktive Aktivität der  $\alpha$ -<sup>32</sup>P markierten Sonde, oder aber zu stringente Bedingungen während der Waschschrte. Zu starke bzw. zu unspezifische Signale können im Gegenzug durch zu wenig stringente Waschbedingungen, zu starke Aktivität der Sonde, oder unzureichende Prähybridisierung, welche zu vermehrt unspezifischen Bindungen führt, bedingt sein. Letztlich wurden nur Hybridisierungen ausreichender Qualität einer normalen

Autoradiographie mit Röntgenfilmen, welche 3-5 Wochen exponiert wurden, unterzogen (siehe Kap. 2.2.10.7).

Bei den Hybridisierungen wurde systematisch vorgegangen, um den gesamten Bereich zwischen TOP3B und I $\gamma$  auf HSS zu untersuchen. Zunächst wurde mit den Sonden RE 01 – RE 08 gearbeitet, wobei anfangs vorzugsweise längere Restriktionsfragmente mit möglichst endständigen DNA-Sonden hybridisiert wurden, um schnell einen Überblick über mögliche HSS zu erhalten. Des Weiteren wurde jede spezifische Hybridisierung sowohl mit DNA von B-Zelllinien als auch non-B-Zelllinien durchgeführt. Mit den ersten Hinweisen auf HSS wurde die Suche verfeinert und um die Sonden RE 09 - RE 12 sowie RE 16 erweitert, um gefundene HSS zu bestätigen, von Artefakten abzugrenzen, und genauer zu kartieren.

### **3.2.6 Auswertung der Hybridisierungen**

Zur Auswertung wurde zunächst jeder Film einzeln hinsichtlich neu aufgetretener Banden unter DNase I Einwirkung untersucht. Dabei war es wichtig, potentielle HSS von Artefakten abzugrenzen: während eine echte HSS schon mit geringen DNase I Konzentrationen zu einem neuen Fragment führt, welches mit steigenden Konzentrationen verschwindet, sind repetitive Banden bei hohen DNase I Konzentrationen durch zunehmend unspezifischen nucleosomalen Abbau bedingt. Dieser entsteht durch Schneiden der DNase I nicht nur an HSS sondern auch an Linker-DNA zwischen Nucleosomen, was in einer Vielzahl von Banden resultiert, die sich um ca. 146 - 165 bp, der Länge der nucleosomalen DNA, unterscheiden. Nach Beurteilung einzelner Filme wurden jeweils mehrere Hybridisierungen verglichen, welche auf denselben DNA-Sonden und Restriktionsspaltungen basierten. Ist die gleiche neu aufgetretene Bande in mehreren Zelllinien nachweisbar, ist diese wahrscheinlich durch eine HSS bedingt. Ist eine Bande nur bei einer Zelllinie zu sehen, könnte es sich entweder um eine Zelltyp-spezifische HSS, einen Polymorphismus oder lediglich ein Artefakt handeln. Durch den Vergleich mehrerer Zelllinien konnten auch B-Zell spezifische (z.B. gleichermaßen in REH, MN 60 und BJAB nachweisbare) von ubiquitären HSS unterschieden werden.

Als nächstes wurde die Lokalisation der identifizierten HSS über die Lage der verwendeten DNA-Sonde und die Länge des durch sie markierten Fragmentes ermittelt (siehe Kap. 2.2.10.7 und 3.2.1). Zur Längenbestimmung der HSS-bedingten Fragmente dienten die (für jede Membran erstellten) Korrelationskurven zwischen Fragmentgröße (in bp) und Position im Gel, welche auf Markerhybridisierungen beruhen (siehe Abb. 15C und Kapitel 3.2.2.4). Wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, lief auf jedem Gel ein DNA-Längenstandard mit, der nach Hybridisierung mit radioaktiv markierter Längenstandard-DNA auf jeder Membran die Lokalisation der unterschiedlichen Markerfragmente zeigte. Die

genauen Wanderungslängen aller Marker-Banden wurden auf jeder Membran ausgemessen, mit ihrer Größe korreliert und auf feines Kartierpapier übertragen.

Um die Länge der HSS-bedingten Fragmente zu ermitteln wurde ihr jeweiliger Abstand von der Auftragstasche per Lineal ausgemessen. Über die Korrelationskurve konnte dann, mit einer Ungenauigkeit von mind. +/- 50 bp bei Fragmenten von  $\geq 1$  kb (Gross and Garrard, 1988), auf die Fragmentlänge rückgeschlossen werden.

Zur Bestimmung der HSS-Lokalisation musste neben der Fragmentlänge noch die Lage der verwendeten DNA-Sonde berücksichtigt werden. Liegt eine Sonde endständig am 5' Ende eines Restriktionsfragmentes der Länge 10 kb und erscheint mit steigenden DNase I Konzentrationen eine zusätzliche Bande der Länge 6 kb, so liegt die HSS 6 kb stromabwärts der 5' Restriktionsschnittstelle. Markiert eine DNA-Sonde ein ebenfalls 10 kb langes Restriktionsfragment eher mittig, ist ein direkter Rückschluss auf die Lokalisation schwierig: eine neu aufgetretene 6 kb lange Bande könnte auf eine 6 kb vom 5' Ende oder 6 kb vom 3' Ende entfernte HSS (4 kb vom 5' Ende) hinweisen; zudem könnten innerhalb des Fragmentes zwei HSS im Abstand von 6 kb lokalisiert sein, was auch in einem 6 kb langen Mittelstück resultieren würde. Bei zwei HSS sollten allerdings auch Fragmente mittlerer Länge nachweisbar sein, welche durch Spaltung an nur einer der beiden HSS resultieren. Des Weiteren musste die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass eine HSS genau im Bereich der DNA- Sonde liegt und zur Markierung beider Fragmente führt. In diesem Fall würden zwei Banden nicht auf zwei, sondern eine HSS zurückzuführen sein.

Diese Überlegungen zeigen, wie wenig Rückschlüsse einzelne Southern Blots auf die Lokalisation von HSS zulassen, gerade bei nicht endständig liegenden Sonden. Aus diesem Grunde wurden alle Blots stets mit Hybridisierungen überlappender Restriktionsfragmente, innerhalb des Fragmentes gelegener kleinerer Fragmente oder mit Hybridisierungen desselben Fragmentes mit anderen DNA-Sonden abgeglichen. Nachdem initial, basierend auf Fragmentlänge und Sonden-Position einer Hybridisierung, die möglichen HSS-Lokalisationen festgehalten wurden (z.B. 6 kb vom 5' oder vom 3' Ende), konnten diese Hypothesen durch den Vergleich mit anderen Blots geprüft werden. Daher ermöglichte oft erst die Zusammenschau verschiedener Southern Blots die genaue Kartierung einer HSS.

Identifizierte HSS wurden abschließend in der Übersicht des  $Ig\lambda$ -Locus (Gene 2.0 Software; Accelrys) eingetragen und nummeriert. Nachdem die stromabwärts von  $Ig\lambda$  gelegenen HSS von 5' nach 3' mit HSS 1 bis HSS 6 benannt wurden, wurden die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten - und nicht anderen Genloci zugehörigen - HSS mit dem Zusatz 5' von stromaufwärts nach stromabwärts nummeriert (HSS 5'1 bis HSS 5'6).

### 3.2.7 Ergebnisse der DNase I Hypersensitivitäts-Assays

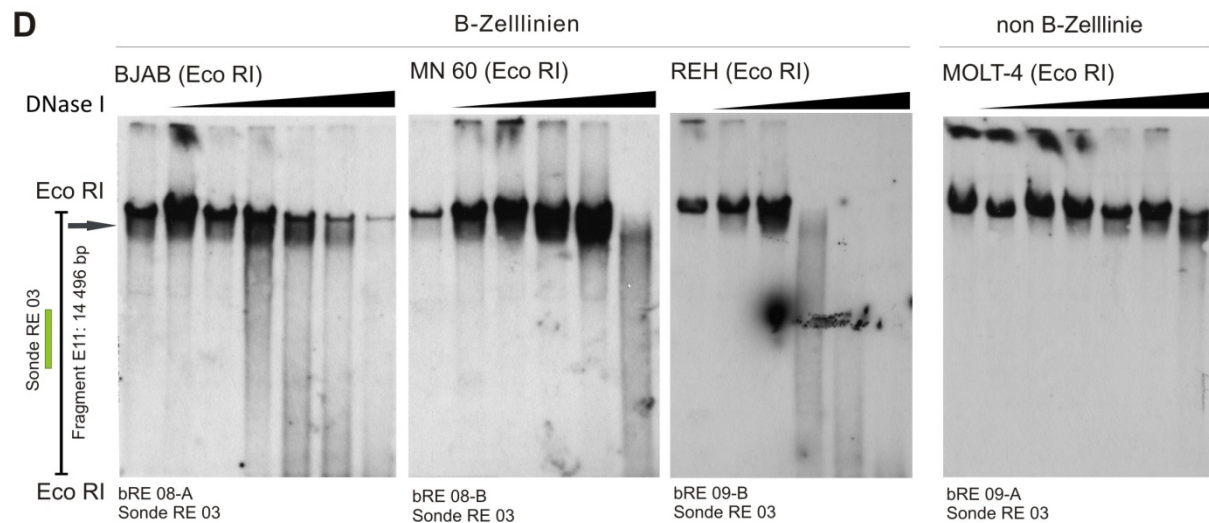
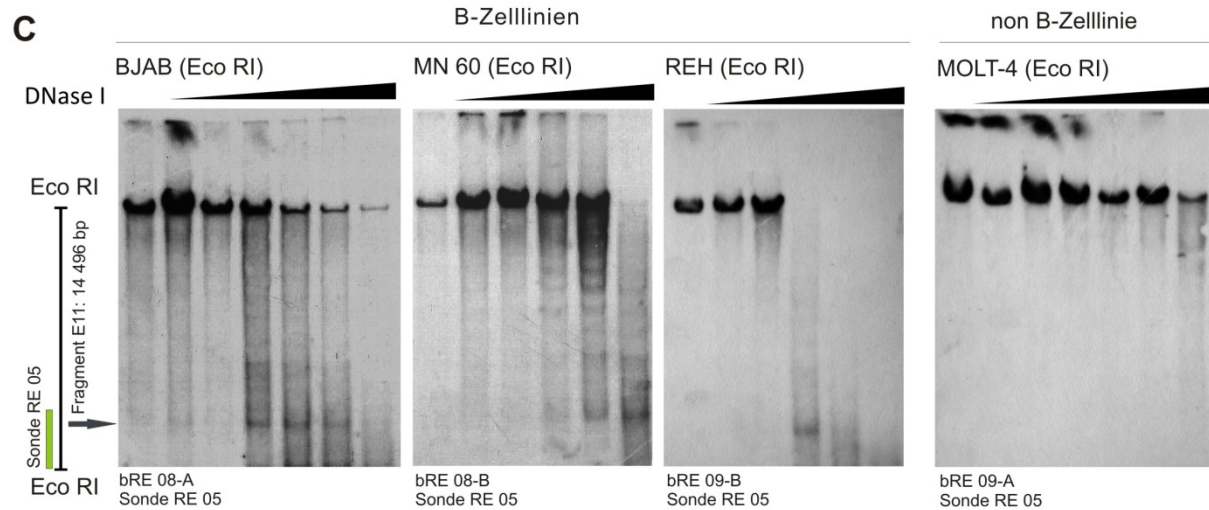
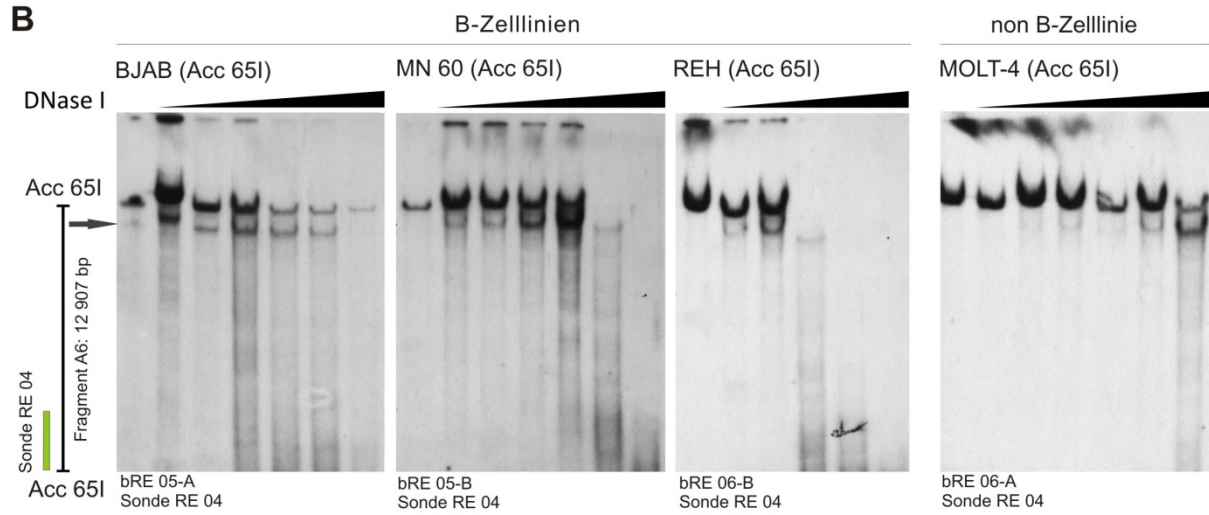
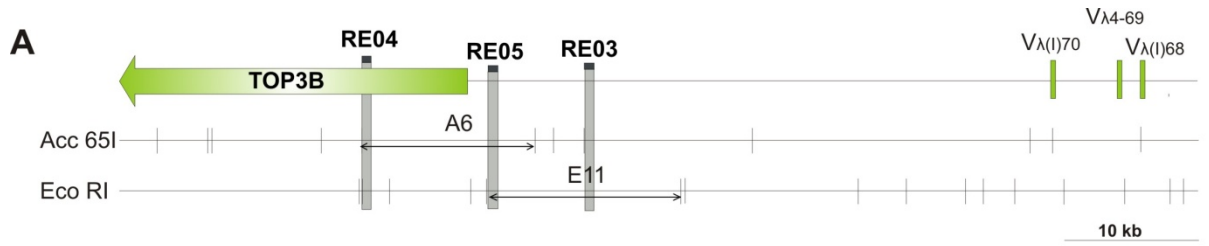
Die Ergebnisse der multiplen Southern Blots zur Kartierung von DNase I hypersensitiven Sites 5' von I $\gamma$  werden im Folgenden, von 5' nach 3' geordnet, präsentiert.

#### 3.2.7.1 HSS am 5' Ende des untersuchten Bereichs zwischen TOP3B und I $\gamma$

Der am weitesten stromaufwärts gelegene Bereich ist durch die beiden relativ langen Restriktionsfragmente A6 (12907 bp) und E11 (14496 bp) abgedeckt (siehe Abb. 17). Dabei lässt sich A6, welches in den TOP3B Locus hineinreicht, durch die Sonde RE 04 5'endständig markieren, während E11 5'endständig durch die Sonde RE 05, welche eher 3'auch mit A6 hybridisiert, gebunden wird. Zudem bindet RE 03 mittig an das Fragment E11.

Hybridisierungen der Sonde RE 04 mit DNase I-verdauter und Acc 65I-nachgespaltener DNA der B-Zelllinien BJAB, MN 60 und REH sowie der non-B-Zelllinie MOLT-4 (Blot bRE 05 A und B, bRE 06 A und B), zeigten die 12907 bp lange Bande des Fragments A6 (siehe Abb. 17A). Mit zunehmender DNase I Konzentration erschien in allen 4 Zelllinien eine zusätzliche Bande, welche auf eine ubiquitiäre HSS hinweist. Die Länge des Fragments beträgt entsprechend der Korrelationskurve ca. 7400-7900 bp, was aufgrund der endständigen Markierung auf eine HSS 7400-7900 bp stromabwärts der Acc 65I Spaltstelle schließen lässt. Diese HSS befindet sich innerhalb des TOP3B Locus und kolokalisiert mit dem TOP3B Promotor (Cho et al., 2004), weswegen sie HSS T (T für Topoisomerase) genannt wurde (siehe Abb. 22). Neben der HSS T-bedingten Bande zeigten sich bei den Hybridisierungen mit RE 04, insbesondere bei der Zelllinie MN 60, schwache Signale im unteren Membranbereich (siehe Abb. 17B), welche schlecht abgrenzbar und nicht zwischen den Zelllinien konserviert schienen und deswegen als Artefakte gewertet wurden.

Etwas weiter stromabwärts liegt das Eco RI Fragment E11, welches, im Gegensatz zu A6, nicht in den TOP3B Locus hinein ragt, sich aber 3648 bp mit A6 überschneidet. Bei Hybridisierung mit der Sonde RE 05, welche E11 5' endständig markiert, zeigte sich, neben dem erwarteten 14496 bp langen Gesamtfragment, bei zunehmender DNase I Konzentration in allen drei betrachteten B-Zelllinien eine zusätzliche Bande von ca. 600-700 bp, welche sich bei MOLT-4 nicht nachweisen ließ. Damit kann von einer, möglicherweise B-Zell spezifischen, HSS ausgegangen werden, welche sich 600-700 bp vom 5' Ende des E11 Fragments, und damit noch innerhalb des Hybridisierungsbereichs der Sonde RE 05, befindet. Diese HSS ist, von 5' betrachtet, die erste im Bereich zwischen TOP3B und I $\gamma$  und wurde daher HSS 5'1 genannt. Sie erschien, im Vergleich zu HSS T, erst bei höheren DNase I Konzentrationen, weswegen von einer etwas geringeren DNase I Hypersensitivität ausgegangen werden kann (vgl. Abb. 17B und C).



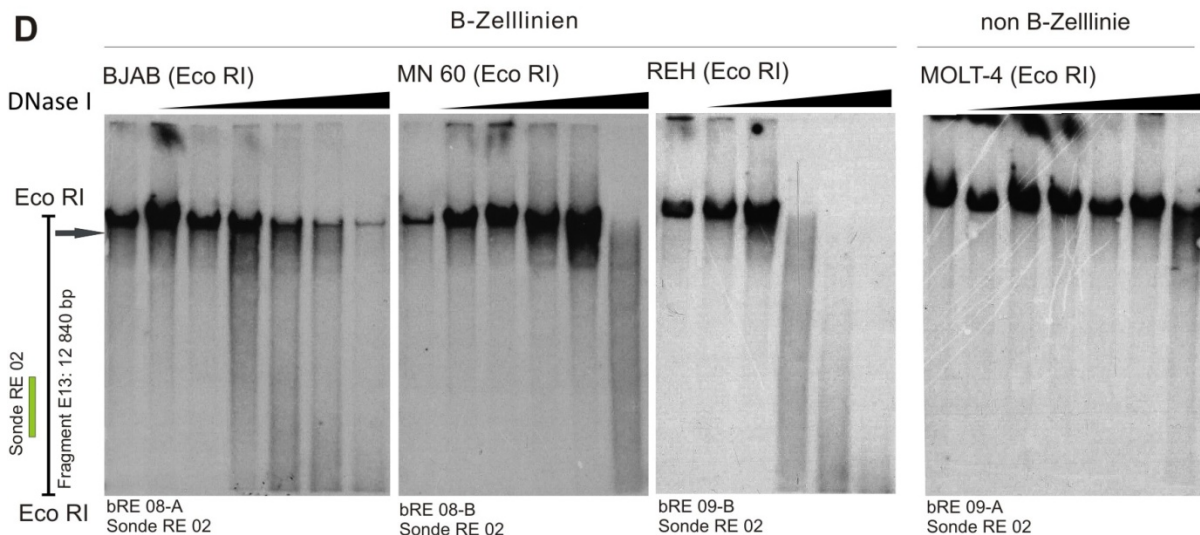
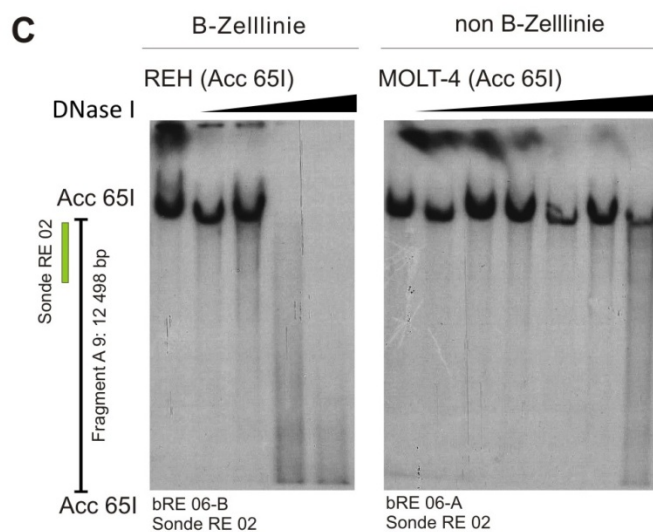
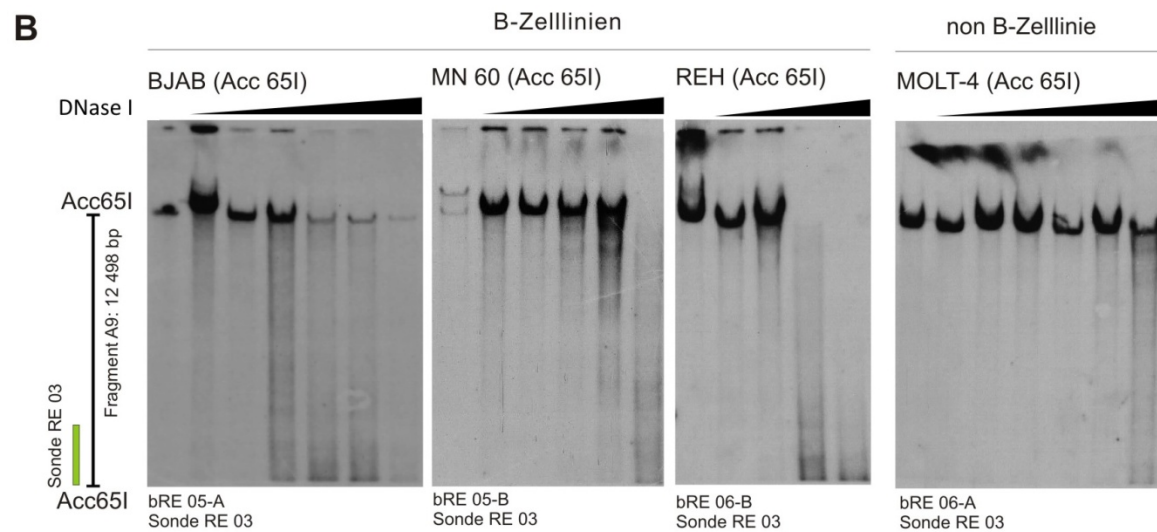
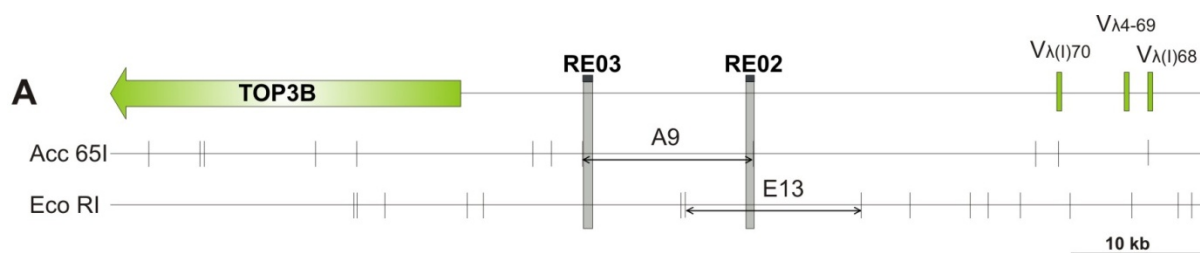
**Abb. 17: HSS am 5' Ende des untersuchten Bereichs zwischen TOP3B und Igλ.** A: Schematische Übersicht der untersuchten Region mit relevanten Restriktionsfragmenten (Acc 65I und Eco RI) und Lage der DNA-Sonden (RE 04, RE 05 und RE 03). B-D: Southern Blots von DNA der angegebenen Zelllinien, welche *in vivo* mit DNase I und *in vitro* mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten wurden. B: Hybridisierung von Acc 65I Fragmenten mit der Sonde RE 04. C-D: Hybridisierungen von Eco RI Fragmenten mit der Sonde RE 05 (C) bzw. RE 03 (D). Mit steigenden DNase I Konzentrationen neu aufgetretene Fragmente sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die multiplen weiteren Banden der Zelllinie MN 60 wurden als Artefakte gewertet, da sie bei keiner anderen Zelllinie nachweisbar waren (siehe Abb. 17C) und Hybridisierungen desselben Fragmentes (E11) mit der Sonde RE 03 kein solches Muster zeigten (siehe Abb. 17D). Hingegen konnte die Markierung des Fragments E11 mit der mittig gelegenen Sonde RE 03, die Existenz und Lage der HSS 5'1 bestätigen: mit steigenden DNase I Konzentrationen zeigte sich in allen Zelllinien eine unscharfe, breitere Bande dicht unterhalb des 14469 bp langen Ursprungsfragments (siehe Abb. 17D). Allein basierend auf dieser Hybridisierung könnte - aufgrund der mittigen Lage von RE 03 - sowohl eine 5', als auch eine 3' gelegene HSS vermutet werden. Zusammen mit den Ergebnissen der RE 05-Hybridisierungen bestätigte sich aber die HSS 5'1 (siehe auch Abb. 22). Die vermeintliche B-Zell Spezifität dieser HSS (siehe Abb. 17C) hingegen ließ sich durch die RE 03-Hybridisierungen nicht bestätigen (siehe Abb. 17D): mit Nachweis der HSS in MOLT-4 Zellen handelt es sich bei der HSS 5'1 eher um eine ubiquitäre HSS. Weitere relevante HSS im abgedeckten Bereich sind basierend auf den durchgeführten Hybridisierungen unwahrscheinlich.

### 3.2.7.2 HSS im mittleren Bereich zwischen TOP3B und Igλ

Die Region weiter stromabwärts entspricht der Mitte des gesamten untersuchten Bereichs 5' von Igλ und lässt sich durch die beiden relativ langen Acc 65I bzw. Eco RI Fragmente A9 (12498 bp) und E13 (12840 bp) (siehe Abb. 18A) gut abdecken. Dabei lässt sich A9, welches 7181 bp mit dem bereits untersuchten Fragment E11 überlappt, durch die Sonden RE 03 und RE 02 beidseits endständig markieren, während E13, welches seinerseits 4996 bp mit A9 überlappt, von RE 02 mittig hybridisiert wird. Für die Hybridisierungen wurden die gleichen Membranen wie in Kapitel 3.2.7.1 verwendet (bRE 05, bRE 06, bRE 08 und bRE 09, jeweils A und B), mit DNA der Zelllinien BJAB, MN 60, REH sowie MOLT-4, welche *in vivo* mit DNase I behandelt und *in vitro* mit Acc 65I bzw. Eco RI nachgespalten wurde.

Die Hybridisierungen der Acc 65I Spaltungen mit der Sonde RE 03 ergaben innerhalb des 12498 bp langen Gesamtfragments keinen Hinweis auf eine HSS (siehe Abb. 18B). Nur bei MN 60 zeigten sich zwei schwache, zusätzliche Banden, wobei sich die obere auch bei MOLT-4 andeutete, bei REH oder BJAB allerdings nicht (siehe Abb. 18B).





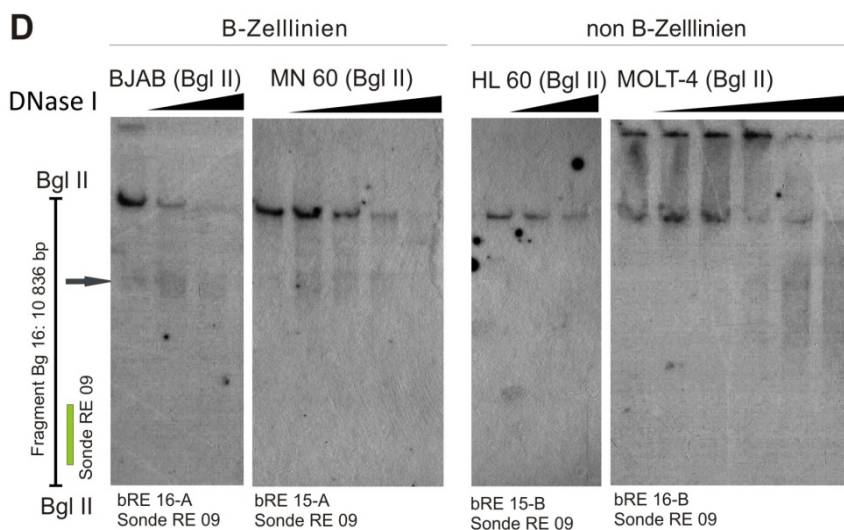
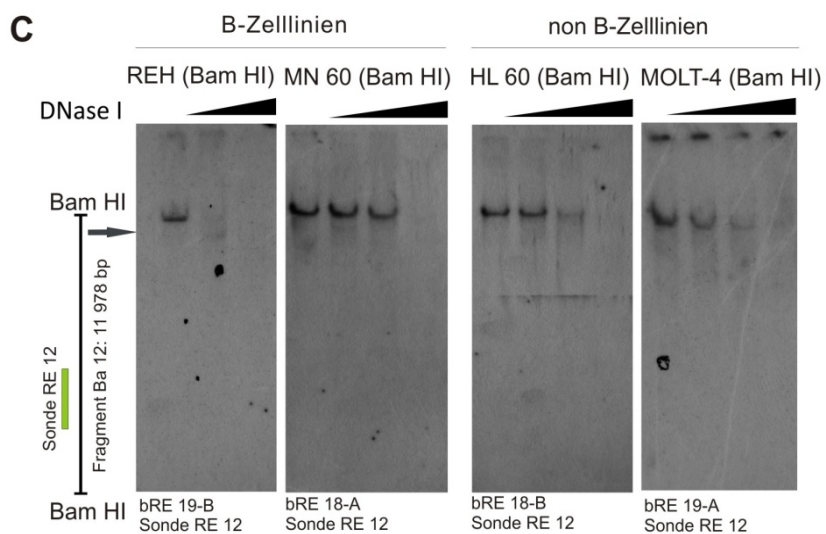
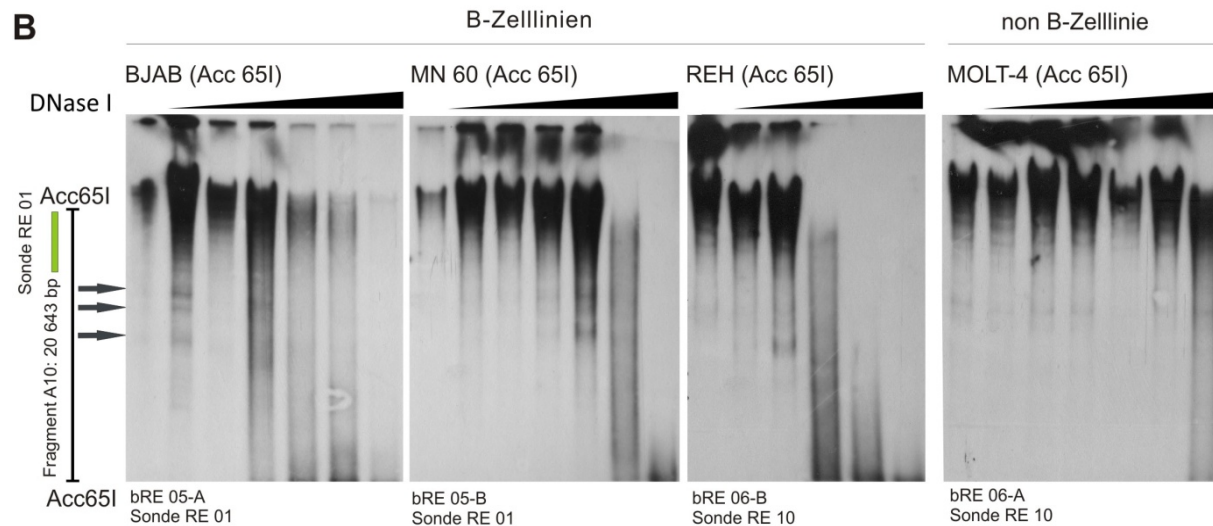
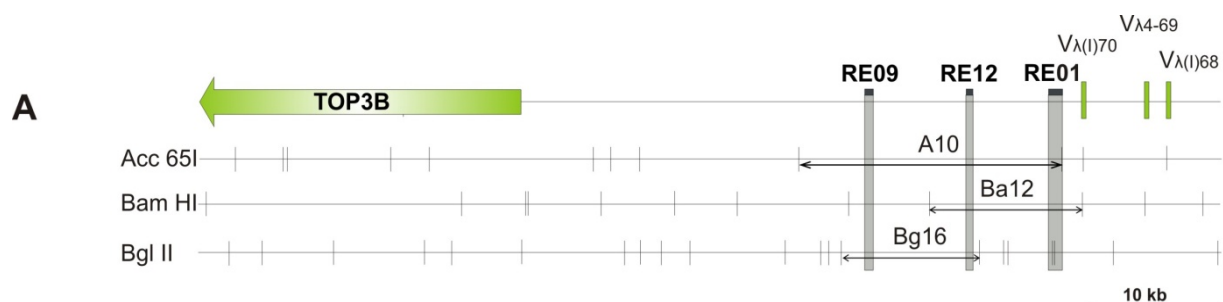
**Abb. 18: HSS im mittleren Bereich zwischen TOP3B und Igλ.** A Schematische Übersicht der untersuchten Region mit relevanten Restriktionsfragmenten (Acc 65I und Eco RI) und Lage der verwendeten DNA Sonden RE 03 und RE 02. B-D: Southern Blots von DNA der angegebenen Zelllinien, welche *in vivo* mit DNase I und *in vitro* mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen gespalten wurden. B: Hybridisierungen von Acc 65I Fragmenten mit der Sonde RE 03. C: Southern Blots mit Acc 65 I Nachspaltung und Hybridisierung mit der Sonde RE 02. D: Hybridisierungen von Eco RI-Fragmenten mit der Sonde RE 02.

Bei Hybridisierung desselben Fragments A9 mit der 3' endständigen DNA-Sonde RE 02 ließen sich ebenfalls keine spezifischen zusätzlichen Banden erkennen (siehe Abb. 18C), so dass eine HSS innerhalb von A9 in Zusammenschau unwahrscheinlich erscheint und die o.g. schwachen Banden bei MN 60 und MOLT-4 (bRE 05-B, bRE 06-A) als Artefakte gewertet wurden. Nicht zuletzt hatten diesselben Membranen im Fall von HSS T oder HSS 5'1 (siehe Abb. 17B und D) wesentlich eindeutiger HSS-bedingte Banden gezeigt, so dass ein zu geringer DNase I Verdau als Erklärung zu schwachen Banden ausscheidet.

Das weiter stromabwärts liegende Eco RI Fragment E13, das mit A9 überlappt (siehe Abb. 18A), wurde anschließend mit der an E13 mittig bindenden Sonde RE 02 hybridisiert. Die entsprechenden Blots zeigten das 12840 lange Gesamtfragment sowie mit zunehmenden DNase I Konzentrationen eine unscharfe Verbreiterung der Ursprungsbande (siehe Abb. 18D). Dies stellte sich ähnlich wie in Abb. 17D dar, allerdings weniger deutlich, und nicht in allen untersuchten Zelllinien gleichermaßen, weswegen eine HSS zwar möglich aber nicht sehr wahrscheinlich erscheint. Mit höheren DNase I Konzentrationen ließ sich zudem bei MN 60, nicht jedoch bei REH oder MOLT-4, eine schwache, relativ unscharfe ca. 5100-5400 bp lange Bande abgrenzen (siehe Abb. 18D), welche aufgrund ihrer Erscheinung nicht als primär HSS-bedingt interpretiert wurde. Damit ergibt sich zusammenfassend im mittleren (von A9 und E13 abgedeckten) Bereich zwischen TOP3B und Igλ, bis auf eine mögliche HSS im 3' Bereich von E13, kein eindeutiger Anhalt für eine HSS. Zur Prüfung dieser möglichen HSS wurde der distale Bereich von E13 im Folgenden mittels überlappender Fragmenten analysiert.

### 3.2.7.3 HSS im 3' Bereich des Bereichs zwischen TOP3B und Igλ

Der Bereich stromabwärts der soeben betrachteten Fragmente (A9 und E13) wird von dem Acc 65I Fragment A10 (20643 bp) komplett abgedeckt (siehe Abb. 19A). Innerhalb dieses langen Fragments liegen kürzere Restriktionsfragmente wie das Bam HI Fragment Ba12 (11978 bp) und das Bgl II Fragment Bg16 (10836 bp), welche sich auch für DNase I Assays eignen (siehe Abb. 19A). Das Fragment A10, welches 7838 bp mit E13 überlappt, wird am 3' Ende von der Sonde RE 01 sowie mittig von den Sonden RE 09, RE 10 sowie RE 12 markiert (siehe Abb. 19A; RE 10 kam in den gezeigten Hybridisierungen nicht zum Einsatz und ist daher nicht abgebildet).



**Abb. 19: HSS im 3' Bereich des untersuchten Bereichs zwischen TOP3B und Igλ.** A: Schematische Übersicht der untersuchten Region mit relevanten Restriktionsfragmenten (Acc 65I, Bam HI und Bgl II) und Lage der verwendeten DNA Sonden RE 09, RE 12 und RE 01. B-D: Southern Blots von DNA der angegebenen Zelllinien, welche *in vivo* mit DNase I und *in vitro* mit den angegebenen Restriktions-endonukleasen gespalten wurden. B: Hybridisierungen von Acc 65I Fragmenten mit der Sonde RE 01. C: Southern Blots mit Bam HI Nachspaltung und Hybridisierung mit der Sonde RE 12. D: Hybridisierungen von Bgl II Nachspaltungen mit der Sonde RE 09.

Das Fragment Ba12 überschneidet sich größtenteils mit A10, reicht jedoch nach 3' 1708 bp darüber hinaus und wird von RE 12 und weiter 3' von RE 01 markiert (am 3'Ende wird Ba12 auch durch RE 11 markiert, hierzu siehe Kap. 3.2.7.4). Das Fragment Bg16 liegt weiter 5' als Ba12 und vollständig innerhalb von A10. Es wird von der Sonde RE 09 eher 5' und von RE 12 fast 3'endständig markiert (siehe Abb. 19A).

Zum Überblick über diese Region diene zunächst die Hybridisierung des langen Fragments A10 mit der endständigen Sonde RE 01, wozu dieselben Blotmembranen wie in Kapitel 3.2.7.1 und 3.2.7.2 verwendet wurden (Acc 65I Spaltungen der Zelllinien BJAB, MN 60 REH und MOLT-4; Blots bRE 05 A und B, sowie bRE 06 A und B). Diese Hybridisierungen zeigten eine verbreiterte unscharfe Bande der erwarteten Länge von 20643 bp (siehe Abb. 19B). Im Gegensatz zu den mit steigenden DNase I Konzentrationen breiter und unschärfer werdenden Banden in Abb. 17D und Abb. 18D, welche auf HSS hinweisen, ist bei A10 die Bande bereits ohne DNase I - Einwirkung verbreitert. Dies zeigte sich bereits in den Testhybridisierungen mit allen A10 markierenden Sonden (RE 01, RE 09, RE 10 und RE 12; siehe Abb. 15) und ist am ehesten durch die Größe des Fragments bedingt, welche an die Grenze der Auflösungskapazität der Gelelektrophorese stößt. Mit steigenden DNase I Konzentrationen zeigten sich in den RE 01-Hybridisierungen, insbesondere bei BJAB, drei zusätzliche Banden der Größe 2100-2300 bp, 2800-2900 bp und 3100-3200 bp (siehe Abb. 19B). In MN 60 war die kürzeste Bande ebenfalls zu sehen, die mittlere nicht und die längste nur schwach abgrenzbar, während sich bei REH nur die kürzeste Bande nachweisen ließ. Bei MOLT-4 zeigte sich eine Bande von ca. 3100-3200 bp, welche jedoch unabhängig der DNase I Konzentration auftrat, und somit am ehesten ein Artefakt darstellt (siehe Abb. 19B). Die in allen drei B-Zelllinien nachweisbare Bande der Länge 2100-2300 bp wurde als B-Zell spezifische HSS gewertet, welche entsprechend der 3' endständigen Lage der Sonde RE 01, 2100-2300 bp stromaufwärts vom 3' Ende des Fragments lokalisiert wäre. Bei den beiden längeren Banden, welche sich nur bei BJAB und MN 60 zeigten, könnte es sich um Artefakte oder Zelltyp-spezifische HSS handeln. Die längste Bande könnte auch schwer nachweisbar sein, da bei steigenden DNase I Konzentrationen zunehmend die zur Sonde näher gelegenen HSS geschnitten werden und damit nur die kürzesten Fragmente von RE 01 markiert werden. Zur Validierung dieser HSS wurden die überlappenden Fragmente Ba12 und Bg16 Hybridisierungen unterzogen. Bei Markierungen von Bam HI Nachspaltungen der Zelllinien

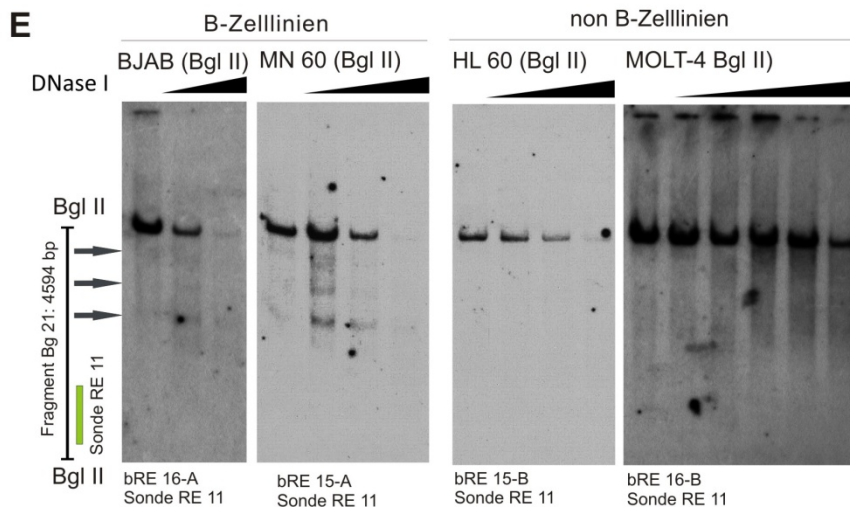
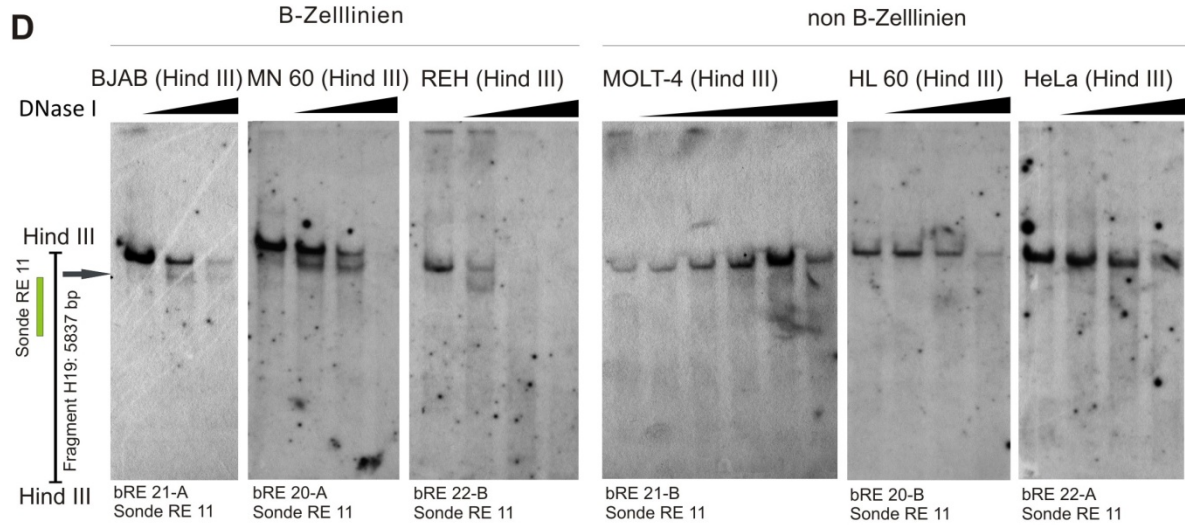
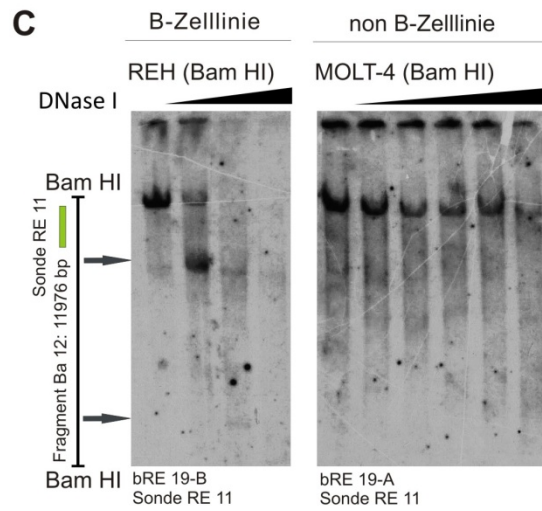
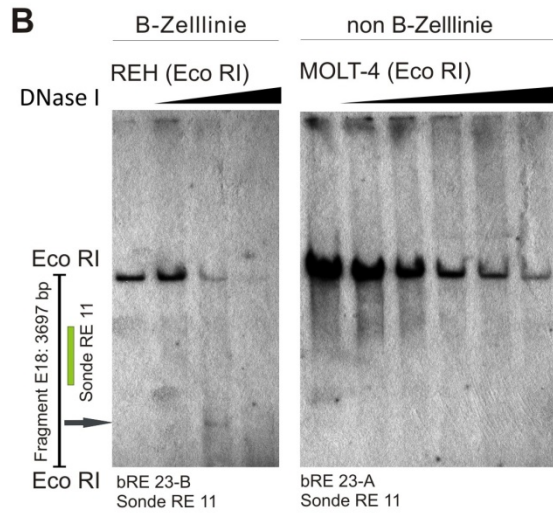
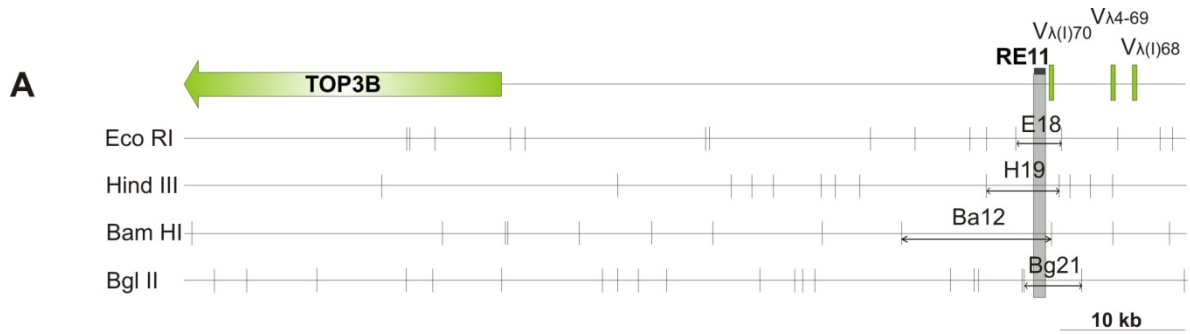
REH, MN 60, HL 60 und MOLT-4 (Membranen bRE 18 A und B und bRE 19 A und B) mit der Sonde RE 12 zeigte sich neben dem 11978 bp langen Ba12-Gesamtfragment mit steigendem DNase I Verdau eine schwache, aber in beiden B-Zelllinien nachweisbare, Bande von ca. 8100-8400 bp (siehe Abb. 19C). In den non-B-Zelllinien HL 60 und MOLT-4 war diese nicht sichtbar (siehe Abb. 19C). Theoretisch könnte diese 8100-8400 bp lange Bande aufgrund der mittigen Lage der Sonde sowohl durch eine HSS 8100-8400 bp vom 5' als auch vom 3' Ende bedingt sein, was allein basierend auf dieser Hybridisierung nicht unterscheidbar ist. Vergleicht man diese Hybridisierung allerdings mit der RE 01-Hybridisierung des Fragments A10, entspricht die Lokalisation 8100-8400 bp vom 5' Ende von Ba 12 auf 100 bp genau der B-Zellspezifischen HSS 2100-2200 bp vom 3' Ende von A10, welche damit bestätigt wurde (siehe auch Abb. 22).

Als nächstes wurde das 10836 bp lange Bgl II Spaltprodukt Bg16 betrachtet, welches vollständig in A10 enthalten ist und 3921 bp mit Ba12 und 4386 bp mit E13 überlappt. Mit Bgl II nachgespaltene, DNase I-behandelte DNA der Zelllinien BJAB, MN 60, HL 60 und MOLT-4 (Blots bRE 15 A und B sowie bRE 16 A und B) wurde mit der relativ endständig bindenden Sonde RE 09 hybridisiert. Es resultierte das 10836 bp lange Gesamtfragment Bg16 sowie, in Anwesenheit von DNase I, eine zusätzliche schwache, etwas breitere Bande von ca. 2800 – 3100 bp (siehe Abb. 19D), welche in beiden B-Zelllinien sichtbar ist (siehe Abb. 19D). In HL 60 ist sie nicht nachweisbar; in MOLT-4 Zellen allerdings, gerade bei höheren DNase I Konzentrationen, ansatzweise erkennbar (siehe Abb. 19D), so dass eine HSS möglich ist, ein Artefakt aber nicht ausgeschlossen werden kann. Das 2800–3100 bp lange Fragment würde einer HSS 2800–3100 bp vom 5' Ende des Bg16-Fragments entsprechen. Dies liegt innerhalb des Bereichs von Bg16, der mit E13 überlappt. Die HSS wäre ca. 1200-1500 bp vom 3' Ende von E13 entfernt, was die beobachteten verbreiterten Banden in den Hybridisierungen von E13 mit der Sonde RE 02 (siehe Abb. 18D) bedingen könnte und so die Existenz der HSS bestätigt. Damit liegt diese HSS auch innerhalb von A10, jedoch mehr als 14000 bp von dessen 3' Ende entfernt, weswegen sie durch die verschmierte Bande des Gesamtfragments in den Hybridisierungen mit der Sonde RE 01 (siehe Abb. 19B) nicht erkennbar ist. Zusammenfassend ergibt sich folgendes Szenario: im überlappenden Bereich von E13 und Bg16 zeigt sich eine schwache HSS (1200-1500 bp vom 3' Ende von E13 bzw. 2800-3100 bp vom 5' Ende von Bg16) welche HSS 5'2 genannt wurde und deren Zellspezifität aufgrund der geringen Signalintensität nicht eindeutig bestimmt werden konnte (siehe Abb. 18D und 19D). Weiter stromabwärts findet sich eine weitere, B-Zell spezifische, HSS (8100-8400 bp vom 5' Ende von Ba 12 bzw. 2100-2200 bp vom 3' Ende von A10), welche als HSS 5'3 bezeichnet wurde (siehe Abb. 22).

### 3.2.7.4 HSS unmittelbar 5' des Pseudogens $V_{\lambda(1)70}$

Unmittelbar stromabwärts der bisher analysierten Bereiche 5' von  $Ig\lambda$  liegt mit dem Pseudogen  $V_{\lambda(1)70}$  bereits das erste  $V_{\lambda}$ -Gen, in dessen Nachbarschaft sich weitere regulatorische Elemente des  $Ig\lambda$ -Locus befinden könnten. Der Bereich um  $V_{\lambda(1)70}$  lässt sich, neben dem bereits betrachteten Fragment Ba12 (siehe Kap. 3.2.7.3) durch drei weitere kurze Fragmente abdecken. Es handelt sich dabei um das 3697 bp lange Eco RI Fragment E18, das 5837 bp lange Hind III Spaltprodukt H19 und das 4594 bp lange Bgl II Fragment Bg21. Alle vier genannten Fragmente umfassen  $V_{\lambda(1)70}$ , überlappen jeweils zu einem gewissen Grad und werden von der Sonde RE 11 markiert (siehe Abb. 20A). Dabei wird Ba12 3' endständig, E18 mittig, H19 eher 3' endständig und Bg21 eher 5' endständig hybridisiert (siehe Abb. 20A).

Zur Analyse des kurzen Fragments E18 wurde DNA der Zelllinien REH und MOLT-4, welche *in vivo* mit DNase I und *in vitro* mit Eco RI verdaut wurde (Blots bRE 23 A und B), mit der Sonde RE 11 hybridisiert. Es zeigte sich das erwartete 3697 bp lange Gesamtfragment E18 (siehe Abb. 20B). Unter DNase I Einwirkung trat zudem bei REH, nicht jedoch bei MOLT-4, eine weitere schwache, aber relativ scharfe Bande von 800-900 bp in Erscheinung (siehe Abb. 20B), welche auf eine B-Zell spezifische HSS hinweist. Dieses Fragment könnte, angesichts der mittigen Lage der Sonde, durch eine HSS 800-900 bp von 5' oder von 3', oder aber durch zwei HSS im Abstand von 800-900 bp bedingt sein. Darauf folgend wurde das Fragment Ba12, welches bereits mit RE 12 hybridisiert wurde (siehe Abb. 19C, Kap. 3.2.7.3), mit RE 11 markiert. Dazu wurden die Membranen bRE 19A und B, mit DNA der Zelllinien REH und MOLT-4, verwendet. Nachdem die eher 5' liegende Sonde RE 12 eine, durch HSS 5'3 bedingte, Bande der Länge 8100-8400 bp gezeigt hatte, ergaben auch diese Hybridisierungen, neben der 11967 bp langen paternalen Bande, HSS-bedingte Fragmente. Zum einen zeigt sich sehr deutlich, bei der B-Zelllinie REH, nicht aber der T-Zelllinie MOLT-4, eine Bande von 3600-3800 bp (siehe Abb. 20C). Mit noch höheren DNase I Konzentrationen war zudem in REH, nicht aber in MOLT-4, eine kurze Bande von 700-800 bp erkennbar (siehe Abb. 20C). Aufgrund der 3' endständigen Lage der Sonde RE 11, lässt sich auf zwei HSS schließen: eine HSS 3700-3900 bp vom 3' Ende von Ba12, welche genau der Lokalisation der HSS 5'3 entspricht, sowie eine weitere HSS 700-800 bp vom 3' Ende von Ba12 entfernt (entsprechend ca. 500-600 bp 5' von  $V_{\lambda(1)70}$ ), was einer neuen HSS entspricht, welche HSS 5'4 genannt wurde (siehe Abb. 22).



**Abb. 20: HSS unmittelbar 5' des Pseudogens V $\lambda$ (I)70.** A: Schematische Übersicht der untersuchten Region mit relevanten Restriktionsfragmenten (Eco RI, Hind III, Bam HI und Bgl II) und Lage der verwendeten DNA-Sonde RE 11. B-E: Southern Blots von DNA der angegebenen Zelllinien, welche *in vivo* mit steigenden DNase I Konzentrationen behandelt und *in vitro* mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen nachgespalten wurden. B: Southern Blots mit Eco RI Nachspaltung und Hybridisierung mit der Sonde RE 11. C: Hybridisierungen von Bam HI Nachspaltungen mit der Sonde RE 11. D: Southern Blots mit Hind III Nachspaltungen und Hybridisierungen mit RE 11. E: Southern Blots mit Bgl II Nachspaltungen und Hybridisierung mit der Sonde RE 11.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur weiteren Analyse wurde das 5837 bp lange Hind III Fragment H19 betrachtet, welches der 3' Hälfte von Ba12 entspricht und 640 bp darüber hinausgeht (siehe Abb. 20A). Dazu wurde DNA der B-Zelllinien BJAB, MN 60 und REH und der non-B-Zelllinien MOLT-4, HL 60 und HeLA *in vivo* mit DNase I und *in vitro* mit Hind III behandelt, der Größe nach aufgetrennt, geblottet (Blots bRE 20 A und B, bRE 21 A und B, bRE 22 A und B) und mit der Sonde RE 11 hybridisiert. Dabei zeigte sich neben dem Ursprungsfragment mit zunehmendem DNase I Verdau eine deutliche Bande der Länge 4300-4500 bp in allen drei untersuchten B-Zelllinien, nicht aber in den drei non-B-Zelllinien (siehe Abb. 20D). Dies deutet entweder auf eine B-Zell spezifische HSS in 4300-4500 bp Entfernung von einer der beiden Fragmentenden hin, oder auf zwei HSS im genannten Abstand. Dabei entspricht die Lokalisation 4300-4500 bp stromaufwärts vom 3' Ende von H19 genau der HSS 5'3, womit dies die plausibleste Deutung der H19 Hybridisierungen darstellt und die B-Zell spezifische HSS 5'3 bestätigt. Fraglich ist allerdings, wieso die HSS 5'4, die innerhalb von H19 liegt (ca. 1500 bp vom 3' Ende), nicht nachweisbar ist (siehe Abb. 20D). Betrachtet man die Hybridisierungen von Ba12 mit RE 11, in denen sich beide HSS darstellen, fallen sehr unterschiedliche Intensitäten auf (siehe Abb. 20C), so dass HSS 5'4 möglicherweise aufgrund der insgesamt geringeren Signalstärke in H19 nicht erkennbar ist.

Als letztes Restriktionsfragment in diesem Bereich wurde das 4594 bp lange Bgl II Fragment Bg21, welches am weitesten nach 3' in den I $\gamma$ L-Locus hineinreicht, mit RE 11 hybridisiert. Dazu wurden die bereits anderweitig eingesetzten Membranen bRE 15 A und B sowie bRE 16 A und B (vgl. Abb. 19D) verwendet. Die Hybridisierung zeigte das 4594 bp lange Gesamtfragment, sowie in beiden B-Zelllinien (BJAB und MN 60) mit steigenden DNase I Konzentrationen drei deutliche Banden (siehe Abb. 20E). Diese Fragmente der Länge 1500-1600 bp, 2700-2900 bp und 3200-3400 bp, waren bei HL 60 und MOLT-4 nicht nachweisbar und sind damit B-Zell spezifisch. Bei niedrigen DNase I Konzentrationen waren dabei alle drei Banden, bei höheren Konzentrationen jedoch v.a. die kürzeste Bande nachweisbar (siehe Abb. 20E). Hinsichtlich der Lokalisation der entsprechenden HSS ergeben sich verschiedene Möglichkeiten bei alleiniger Betrachtung der Bg21 Hybridisierungen. Es könnte sich um drei verschiedene HSS 3' der Sonde handeln; mit steigenden DNase I Konzentrationen wäre nur

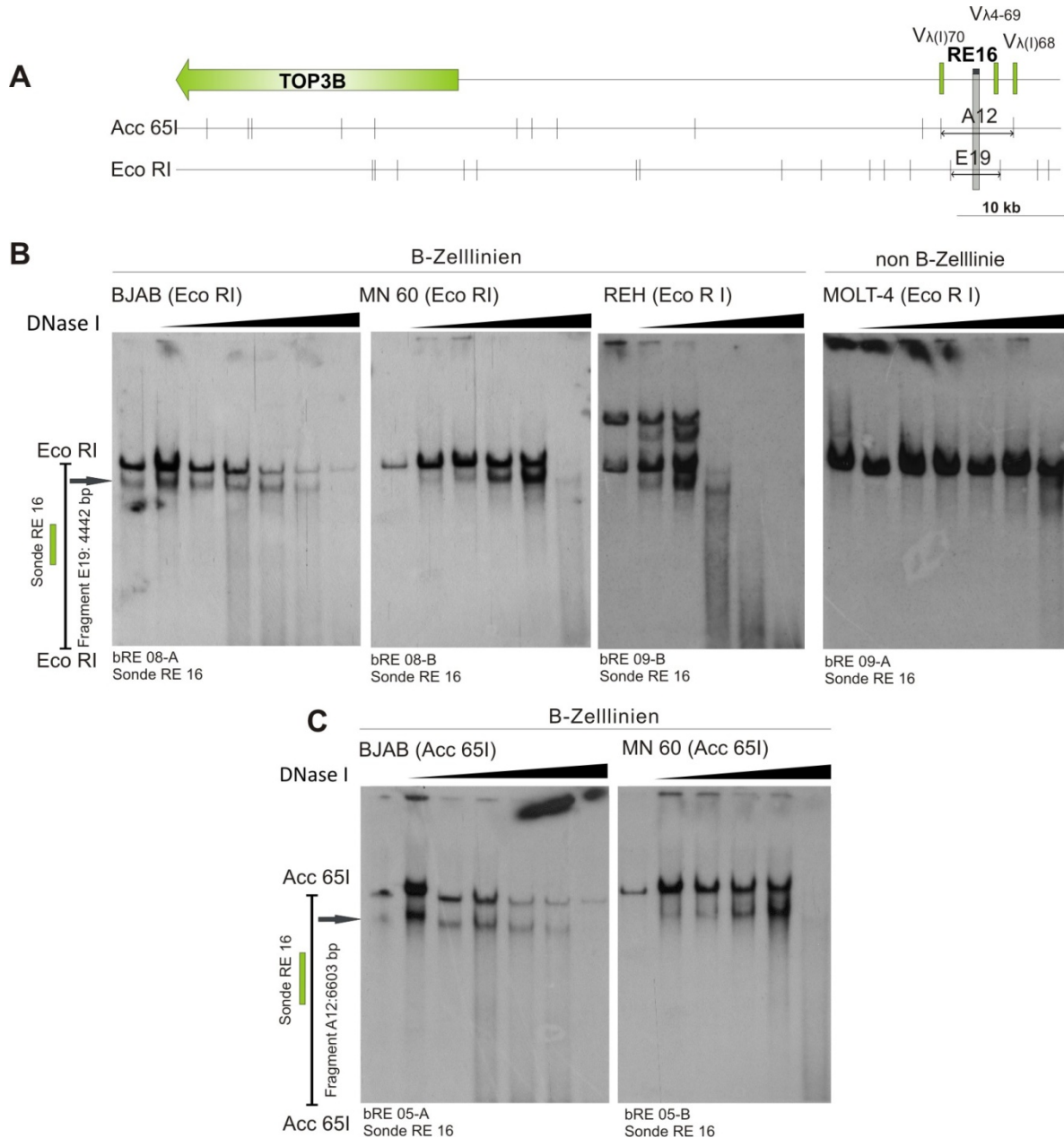
noch das kürzeste Fragment nachweisbar. Denkbar wären auch HSS beidseits der Sonde, wobei es sich in diesem Fall auch nur um zwei HSS handeln könnte: eine 5' und eine 3' der Sonde. Bei niedrigen DNase I Konzentrationen würde die Sonde, neben dem beidseits von DNase I geschnittenen, auch jene beiden Fragmente markieren, die jeweils nur an einer der beiden HSS geschnitten wurden. Bei höheren DNase I Konzentrationen wäre nur noch das beidseits geschnittene Fragment nachweisbar. Zieht man die bisherigen Ergebnisse in Betracht, ergibt sich folgendes Szenario: die HSS 5'4 liegt innerhalb von Bg21, etwa 1300 bp von dessen 5' Ende und 3300 bp vom 3' Ende entfernt, was die 3200-3400 bp lange Bande erklärt. Neben dieser HSS 5' der Sonde muss eine weitere 3' davon liegen, in einem Abstand von 1500-1600 bp von HSS 5'4, was die kürzeste Bande erklären würde. Diese zweite HSS, entsprechend der Nomenklatur HSS 5'5, wäre 2800-2900 bp vom 5' Ende von Bg21 entfernt und entspräche der mittleren Bande. Damit wurde die HSS 5'4 bestätigt, und eine neue B-Zell spezifische HSS 3' der Sonde RE 11 und 3' des ersten Pseudogens  $V_{\lambda(1)70}$  identifiziert (siehe Abb. 22).

### 3.2.7.5 HSS zwischen dem Pseudogen $V_{\lambda(1)70}$ und dem ersten funktionellen $V_{\lambda}$ -Gen $V_{\lambda4-69}$

Bisher wurde der gesamte Bereich vom TOP3B-Locus stromabwärts bis hin zum ersten zu  $Ig\lambda$  gehörigen Gensegment, und damit der 5' Grenze des  $Ig\lambda$ -Locus, untersucht. Nachdem das am weitesten 5' gelegene Pseudogen  $V_{\lambda(1)70}$  nicht rekombiniert, könnte die vermeintliche Locusgrenze jenseits dieses Pseudogens, vor dem am weitesten 5' gelegenen funktionellen Gen  $V_{\lambda4-69}$ , lokalisiert sein. Ein potentiell Insulator/Boundary Element, welches  $Ig\lambda$  vor hemmenden Einflüssen der Umgebung bzw. benachbarte Gene vor dem aktivierenden Einfluß von  $Ig\lambda$  schützt, sollte die funktionellen  $V_{\lambda}$ -Elemente, aber nicht zwingend auch funktionslose Pseudogene mit einschließen. Aus diesem Grunde wurde abschließend die Region zwischen dem Pseudogen  $V_{\lambda(1)70}$  und dem ersten funktionellen Gen  $V_{\lambda4-69}$  untersucht. Dieser 4621 bp lange Bereich wird abgedeckt durch die zwei relativ kurzen Restriktionsfragmente: das 6603 bp lange Acc 65I Fragment A12 und das 4442 bp lange Eco RI Spaltprodukt E19, welches komplett innerhalb von A12 liegt (siehe Abb. 21A). Beide Fragmente werden relativ mittig von der Sonde RE 16 markiert. Für die Hybridisierungen wurden bereits verwendete Membranen mit Eco RI bzw. Acc 65I Spaltungen eingesetzt (Blots bRE 08 A und B, bRE 09 A und B sowie bRE 05 A und B; vgl. Abb. 17 und Abb. 18). Die Hybridisierung der Sonde RE 16 mit Eco RI nachverdauter DNA zeigte neben dem Ursprungsfragment von 4442 bp mit steigenden DNase I Konzentrationen eine eindeutige weitere Bande der Länge 3300-3500 bp (siehe Abb. 21B). Diese war in der Intensität vergleichbar mit der durch die HSS T bedingten Bande (vgl. Abb. 17B). Im Gegensatz zu jener war sie jedoch nur in den B-Zelllinien BJAB,



MN 60 und REH Zellen nachweisbar (siehe Abb. 21B). Bei der Zelllinie REH zeigte sich zudem eine Besonderheit: mit der Sonde RE 16 traten zwei zusätzliche Banden auf: eine DNase I unabhängige von 12100-12300 bp und eine erst mit steigenden DNase I Konzentrationen auftretende (siehe Abb. 21B).



**Abb. 21: HSS 3' des Pseudogens V $\lambda$ (I)70 und 5' des ersten funktionellen V $\lambda$  Gens V $\lambda$ 4-69.** A: Schematische Übersicht der untersuchten Region mit relevanten Restriktionsfragmenten (Acc 65I und Eco RI). B-C: Southern Blots von DNA der angegebenen Zelllinien, welche *in vivo* mit steigenden DNase I Konzentrationen behandelt und *in vitro* mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen nachgespalten wurden. B: Southern Blots mit Eco RI Nachspaltung und Hybridisierung mit der Sonde RE 16. C: Hybridisierungen von Acc 65I Fragmenten mit der Sonde RE 16.

Diese beiden Banden verhalten sich genau gleich den anderen beiden, sind jedoch jeweils um 7700-7900 bp größer. Dieses Phänomen ist vermutlich durch einen heterozygoten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bedingt, welcher zwei unterschiedlich

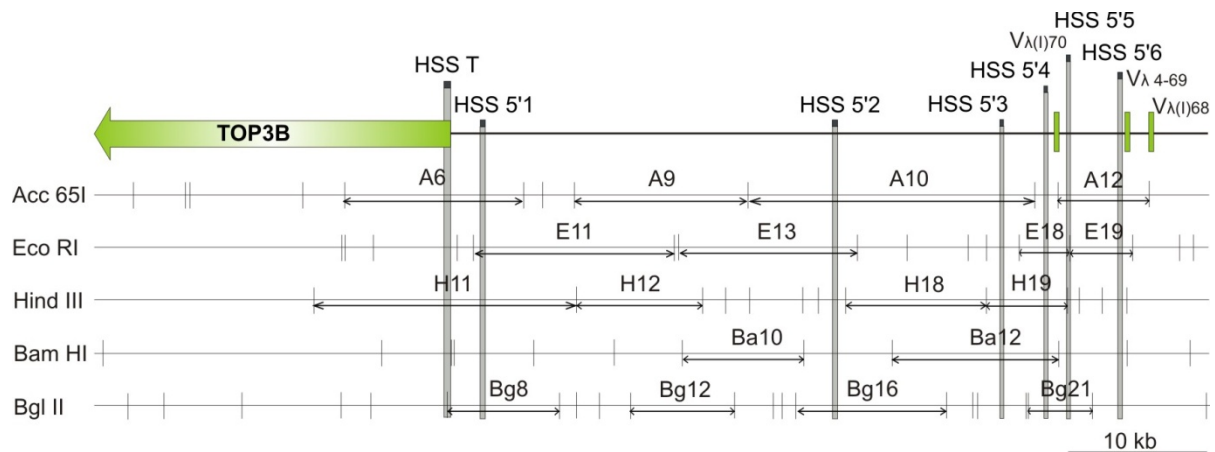
lange Restriktionsfragmente zur Folge hat, die dieselbe HSS enthalten. Folglich handelt es sich weder um einen Artefakt, noch um eine HSS. Damit enthält das Fragment E19 bzw. die Region zwischen  $V_{\lambda(1)70}$  und  $V_{\lambda4-69}$  eine starke, B-Zell-spezifische HSS. Nachdem sich die HSS 5'5 nicht innerhalb von E19 befindet, handelt es sich um eine weitere HSS, die HSS 5'6, welche 3300-3500 bp vom 5' oder 3' Ende von E19 lokalisiert ist.

Abschließend wurden Membranen mit Acc 65I nachgespaltener DNA ebenfalls mit RE 16 hybridisiert. Da das gerade untersuchte Fragment E19 vollständig in A12 enthalten ist, waren HSS zu erwarten. Tatsächlich stellte sich mit RE 16 nicht nur das 6603 bp lange A12 Fragment, sondern auch ein DNase I abhängiges Fragment der Länge 4300-4500 bp dar (siehe Abb. 21C). Dieses zeigte sich in den B-Zelllinien BJAB und MN 60, nicht jedoch in MOLT-4 (aufgrund schlechter Qualität ist die MOLT-4 Hybridisierung nicht gezeigt). Die HSS-bedingte Bande ist ca. 1000 bp länger als jene in E19. Zusammen mit dem 917 bp betragenden Unterschied zwischen dem 5' Ende von E19 und A12, kann von einer Lokalisation 3300-3500 bp stromabwärts vom 5' Ende von E19 ausgegangen werden (bzw. 4300-4500 vom 5' Ende von A12), was unmittelbar 5' des ersten funktionellen  $V_{\lambda}$ -Gens  $V_{\lambda4-69}$  gelegen ist (siehe Abb. 22). Damit konnte durch die A12 Hybridisierungen die B-Zell spezifische HSS 5'6 nicht nur bestätigt sondern auch kartiert werden (siehe Abb. 21B). Die HSS 5'5 hingegen, welche innerhalb von A12 gelegen ist (ca. 600-700 bp entfernt von dessen 5' Ende), wird in den durchgeführten Hybridisierungen erneut nicht sichtbar, was abermals an der relativen Schwäche jener HSS im Vergleich zu HSS 5'6 liegen könnte. Insgesamt konnten diese Hybridisierungen die HSS 5'6 als eine starke B-Zell spezifische HSS identifizieren.

### 3.2.7.6 Zusammenfassung und Überblick über die gefundenen HSS

Nachdem der 44 kb umfassende Bereich zwischen TOP3B und  $Ig\lambda$  untersucht und in 5 untergeordneten Abschnitten dargestellt wurde, werden hier die kartierten HSS nochmals in der Übersicht dargestellt und zusammengefasst.

Am Ende des TOP3B Gens wurde die in allen Zelllinien deutlich nachweisbare HSST identifiziert, welche dem TOP3B Promotor entspricht (siehe Abb. 17). Etwas weiter stromabwärts findet sich mit HSS 5'1 eine ubiquitär nachweisbare schwächere HSS (siehe Abb. 17). Nach HSS 5'1 folgt ein ca. 25 kb langer Bereich ohne erkennbare HSS, bevor sich mit HSS 5'2 eine schwache, fraglich ubiquitär nachweisbare HSS ca. 15 kb 5' des ersten  $Ig\lambda$ -Gens darstellt (siehe Abb. 19). Weiter stromabwärts und bereits in unmittelbarer Nähe von  $Ig\lambda$ , finden sich drei vermutlich B-Zell spezifische HSS: die HSS 5'3, 5'4 und 5'5. Dabei ist HSS 5'3 ca. 4 kb 5' des ersten  $V_{\lambda}$ -Pseudogens  $V_{\lambda(1)70}$  gelegen, während die schwächeren HSS 5'4 und 5'5 das Pseudogen unmittelbar beidseits flankieren (siehe Abb. 20 und 22).



**Abb. 22: Lage der kartierten HSS 5' des Igl-Locus.** Dargestellt sind die 5' von Igl $\lambda$  gelegenen Restriktionsfragmente von Acc 65I, Eco RI, Hind III, Bam HI und Bgl II sowie die Lage der kartierten HSS (HSS T und HSS 5'1 bis HSS 5'6). Durch die grauen Balken lässt sich erschließen, welche Fragmente welche HSS enthalten.

Im Bereich zwischen diesem Pseudogen und dem ersten funktionellen  $V_{\lambda}$ -Gen  $V_{\lambda 4-69}$  befindet sich schließlich, direkt an dessen 5' Ende, mit HSS 5'6 eine starke, B-Zell spezifische HSS (siehe Abb. 21 und 22). Diese könnte aufgrund ihres direkten Bezuges zum ersten funktionellen  $V_{\lambda}$ -Gen eine Art funktionelle 5' Grenze des Igl $\lambda$ -Locus darstellen.

### 3.3 Vergleich der gefundenen HSS mit nachgewiesenen CTCF-Bindungsstellen

Nach der Kartierung der HSS stromaufwärts von Igl $\lambda$  (siehe Kap. 3.2), sollte deren Funktion analysiert werden, wobei die Suche nach einem Insulator/Boundary-Element (als 5' Domänengrenze des Igl $\lambda$  Locus) im Vordergrund stand. Ähnlich der Situation am 3' Ende des Igl $\lambda$ -Locus (Nagel, 2009; Regnier, 2011), könnte am 5' Ende ein Insulator/Boundary Element benachbarte Gene vor dem Einfluss des Igl $\lambda$  Enhancers schützen und den Locus begrenzen. Zur Untersuchung einer möglichen Insulator/Boundary Funktion wählten wir Colony-Forming-Assays (CFAs), die von Antonia Regnier in der AG Klobeck etabliert wurden (Regnier, 2011). Bei den CFAs handelt es sich um funktionelle Reporterassays, welche die Wirkung der HSS auf die Reporterexpression chromatinabhängig untersuchen. Um den Umfang dieser Experimente zu limitieren, wollten wir eine gewisse Vorauswahl an HSS treffen, welche als Insulatoren/Boundaryelemente fungieren könnten.

Ein Weg zur Vorhersage bestimmter Funktionen ist die Untersuchung einer DNA-Sequenz auf Bindungsmotive entsprechender Proteine. Das für Insulatoren und Boundaries essentielle Protein CTCF (Bell et al., 1999) hat aufgrund seiner 11 Zinkfinger jedoch sehr unterschiedliche DNA Bindungsmotive, weswegen komplexere Algorithmen wie die CTCFBSDB (CTCF-binding site database; <http://insulatordb.uthsc.edu>) (Bao et al., 2008) notwendig sind, um Bindungselemente vorherzusagen. Diese Datenbank basiert auf

experimentell identifizierten CTCF-Bindungsstellen, DNA-Sequenzen, genetischen Polymorphismen und Genexpressionsprofilen, und bietet eine online Plattform zur *in silico* Vorhersage von CTCF-Bindungsstellen. Die Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen *in vivo* Bindung wird durch den PWM (position weight matrix) Score angegeben, wobei ein Score von  $> 3,0$  eine wahrscheinliche CTCF-Bindungssequenz darstellt (Bao et al., 2008). Untersuchungen aller identifizierten HSS mit dieser online Plattform ergaben potentielle CTCF-Bindungssequenzen mit sehr hoher Bindungswahrscheinlichkeit innerhalb der HSS 5'1 (PWM von 17,19) und HSS 5'6 (PWM von 16,23). Für alle anderen HSS ergab die Suche keine nennenswerten Treffer (Scores von  $< 2,0$ ), womit unter den gefundenen HSS zwei potentielle Insulator/Boundaries ausgemacht werden konnten.

Eine publizierte Arbeit zur genomweiten Kartierung von *in vivo* CTCF-Bindungsstellen im Humangenom bestätigte diese Ergebnisse. Mithilfe eines genomweiten CTCF-ChIP-on-chip Screens (Chromatin-Immunpräzipitation von CTCF mit daran bindender DNA, gefolgt von einer Array-basierten Analyse der gebundenen DNA-Sequenzen) hatte die Gruppe von Bing Ren in humanen Fibroblasten 13 804 *in vivo* CTCF-Bindungsstellen (CBS) identifiziert und auf 100 bp genau kartiert (Kim et al., 2007). Zwei dieser CBS, 13376 und 13377, fallen mit den von uns identifizierten HSS 5'1 bzw. HSS 5'6 zusammen und enthalten die von der CTCFBSDB vorhergesagten CTCF-Kernbindungssequenzen. Die Sequenzen der CBS 13376 und 13377 sowie deren putative CTCF-Kernbindungssequenz sind in Abb. 23 dargestellt.

#### 13376

```
CAGAAATGCATACTGGTTTTGTAGTTGAAAAATCCTGTAGGTGGAAATTGTCTAAATCGAAGACTGTATATCGGAGATCCCCTCAAGTCT
CCCTGCCTCCCTGCCACCACCCTGATCCGAGCTCCTCCTCCCTCCAGGTCTCCACCTTGCCGCCCTGCAGTGTGTTCTCCACATACCA
GCCAGGGCTAAGATTGGCTCTGTTGGGTGCTACCAAGTTGGTGAAGAGAAACCCAGAGGCCCTCAGCTCATTCCATCAATCCAGTTCCA
GAGTTCATTGTATGGAGCCCTAGGAAGGACCTGAGGCCCTGGGCCAGCAGGAGGCGCTAGTGGTCAGCTCTGAAGGCCAGGGCGTCGGGA
AGTGTCTTGGTCAGAGCAGAGAACTGCAGTTGCCTTGTGCTTTCTCCCGGAGAGCCCTGCAGCTGACCCCTGCCAGAGCTTTGGGT
CAGGCTTCTGACTGACCCCTTAGGTTGACAAATGACCCAGATTCAGAGGAACCCCTCAACTTGGAGGTGTCTCCCTATTGGGACTCCC
```

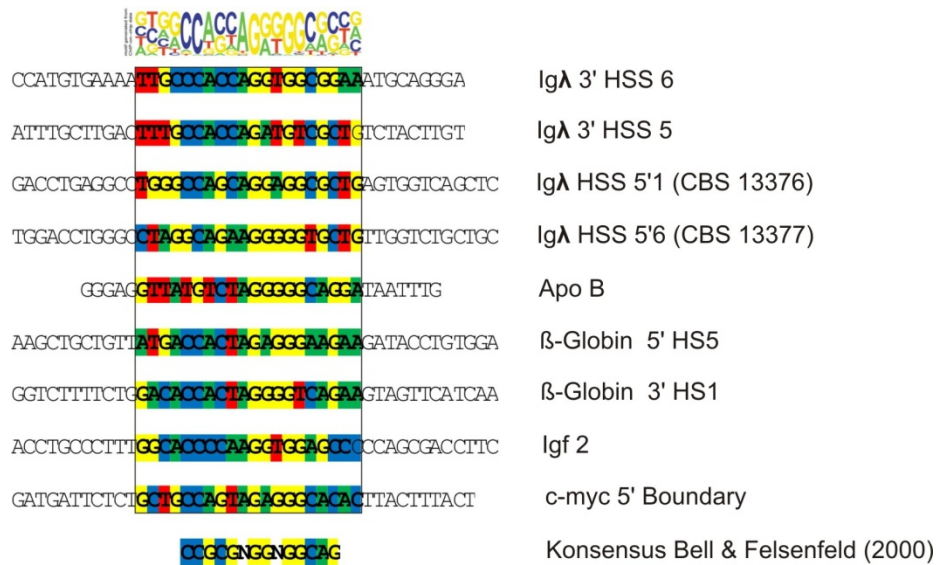
#### 13377

```
GGAGACATTTCTGTTCCAGTCAATGTAATATATCCATTACACCTACCAAATAGAACGTGTATGAGAGACACCTTCTCCTGAGGACTTTT
GCAAAGTGGGGTGGATCATGTGTCCCCTGCCACTGAAAAGGGCTAAATGGAAAACCTAAAGTCTGAAATAAAATAGGAGGCTGCCCTGAC
GAGGGTCCCCTTTGCCCTTGACAGAGAACAGGCCGTGGTCAAGGCCCTGGTCCGGGCAGAAGCCTCTGTCCAGGACCCACTGGCATCT
GGTCACAGACACGATGGACCTGGGCCTAGGCAGAAAGGGGGTGGTCTGGTCTGTGCTGAGGGCTCTGTGGGTTTCTCAGCTGGGAAACC
AAACACTTGAACCTGGTCTCCACGCAGGGTTCACCTGGGGCCAGCAGCTGGGCTCTCTCTGCACCCCTGGAGAGCCTCAGGCCAGGCCAG
CCCAGGTAACCCCTCCAGAAATGTACCCACCCTGGGACTGACACTCAGGCACACGGAGTGATTTGGTTGGGCAGAGGAAGAGGAGC
ACATTTGCATGAAGGGCCCTCTCTCTCTCTGGGACTACAGGGTGGGTAAGAAATACCTGCAACTGTCTCAGCCTCAGCAGAGCTCTGGGG
AGTCTGCACCATGGCTTGGGA
```

**Abb. 23: Sequenzen der CBS 13376 und 13377 mit putativer CTCF-Kernbindungssequenz.** Für 13376 ist die CTCF-Kernbindungssequenz (PMW-Score von 17,19) grün markiert, für 13377 (PMW-Score von 16,23) grau.

Die Kolo-kalisation der *in vivo* nachgewiesenen CBS mit den von uns identifizierten HSS legt eine funktionelle Relevanz dieser Elemente nahe. Daher beschränkten wir die geplanten CFAs zur Testung einer Insulator/Boundary Funktion auf HSS 5'1 und HSS 5'6, während die restlichen HSS, ohne potentielle CBS, nicht weiter funktionell analysiert wurden.

Abb. 24 gibt eine Übersicht über bekannte Insulator/Boundary Elemente mit CBS, die CBS von HSS 5'1 und 5'6 und der 3' gelegenen HSS 5 und HSS 6, für welche die AG Klobeck eine Insulator-Funktion zeigen konnte (Regnier, 2011).



**Abb. 24: CTFK-Konsensussequenzen der HSS 5' und 3' von Igλ und bekannter Insulatoren.** Die einzelnen Basen sind farblich markiert. Ganz unten ist die von Bell und Felsenfeld definierte Konsensussequenz gezeigt.

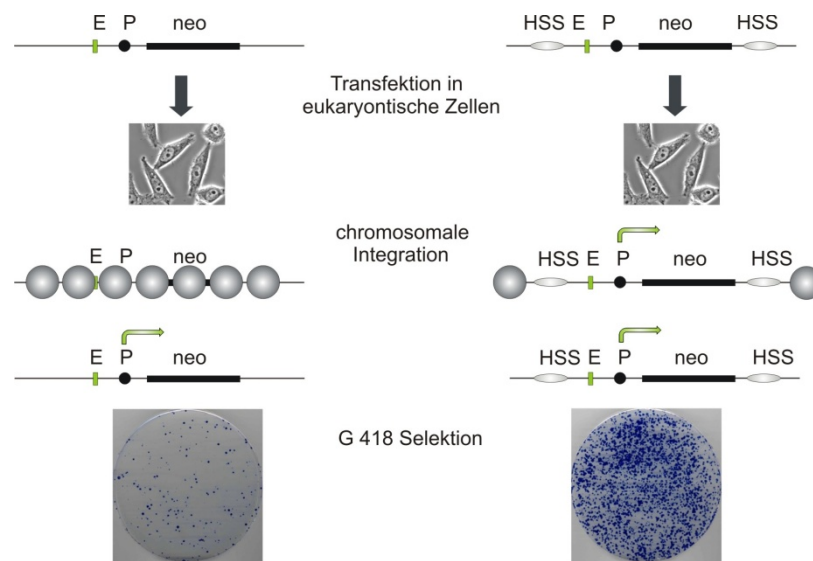
### 3.4 Funktionelle Analyse der HSS 5'1 und 5'6 mittels Colony-Forming-Assay

Um eine mögliche Insulator/Boundary Funktion der HSS 5'1 und 5'6 *in vivo* zu untersuchen, sollten, wie bereits angedeutet, Colony-Forming-Assays (CFAs) zum Einsatz kommen, die in der AG Klobeck von Antonia Regnier etabliert wurden (Regnier, 2011). CFAs sind Reporter-Gen-Assays, welche die Auswirkung eines regulatorischen Elementes auf die Expression eines Reportergens untersuchen.

#### 3.4.1 Prinzip des Colony-Forming-Assays

Die in der AG Klobeck etablierten CFAs basieren auf Reporter-Gen-Konstrukten mit  $neo^R$ , einem Resistenzgen gegen Geneticin (G418), und wurden bereits 1993 in vergleichbarer Form von Chung und Felsenfeld zur Analyse von Insulatorfunktionen genutzt (Chung et al., 1997; Chung et al., 1993).  $Neo^R$  kodiert für eine Phosphotransferase, welche das für eukaryontische Zellen toxische Geneticin phosphoryliert und inaktiviert. Somit überleben nur jene Zellen eine G418-Behandlung, die das  $neo^R$  Gen exprimieren. Die Reporter-Gen-Konstrukte werden vor der Transfektion linearisiert und integrieren nach dem Zufallsprinzip in die chromosomale DNA, wobei das Umfeld, in welches sie integrieren, maßgeblich ihre Expression beeinflusst. Diese Abhängigkeit der Genexpression vom jeweiligen Aktivitätszustand des umgebenden Chromatins (Euchromatin vs. Heterochromatin) wurde als erstes in *Drosophila* beschrieben und als „position effect variegation“ bezeichnet (Henikoff, 1992). Integriert also das Reporter-Gen in eine heterochromatische Umgebung, wird es ebenfalls heterochromatisch

verpackt und nicht exprimiert (siehe Abb. 25); integriert es hingegen in eine euchromatische, transkriptionell aktive Region, ist  $\text{neo}^R$  zugänglich für Transkriptionsfaktoren, wird exprimiert und verleiht der Zelle Resistenz gegenüber G418.



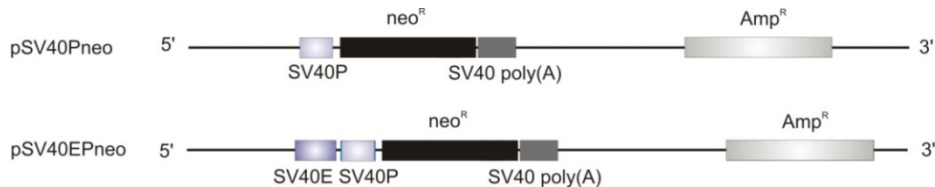
**Abb. 25: Prinzip des Colony-Forming-Assays.** Darstellung der CFA-Reportergenversuche mit oder ohne flankierende HSS mit Barriere-Funktion.  $\text{neo}$  = G418 Resistenzgen, P = Promotor, E = Enhancer. Bei Integration des Konstruktes in Heterochromatin wird die Genexpression verhindert, bei Integration in Euchromatin wird  $\text{neo}$  exprimiert, bei Flankierung durch Barriere-Elemente wird  $\text{neo}$  unabhängig vom Chromatinfeld exprimiert, was insgesamt die Anzahl G418-resistenter Zellen bzw. Kolonien erhöht.

Die Anzahl der Zellen pro Transfektionsansatz, welche  $\text{neo}^R$  exprimieren und G418-resistent sind, ist bei Transfektion des gleichen Konstruktes aufgrund der Vielzahl an Integrationsereignissen relativ konstant, und kann durch Auszählung der gewachsenen Kolonien quantitativ erfasst werden. Bei beidseitiger Flankierung des Reportergens durch Boundary-Elemente, welche die Ausbreitung von Heterochromatin verhindern und eine vom Umfeld unabhängige Expression gewährleisten, ist eine erhöhte Zahl G418-resistenter Zellen bzw. Kolonien zu erwarten (siehe Abb. 25). Zur Testung einer Enhancer-blockierenden Wirkung hingegen müssen die regulatorischen Elemente zwischen Enhancer und Promotor des Reportergens platziert werden, wo sie deren Interaktion verhindern und die Genexpression reduzieren, was zu einer Abnahme der G418-resistenten Kolonien führt.

### 3.4.2 Herstellung der Vektoren

Um sowohl HSS 5'1 und HSS 5'6 auf Barriere- und Enhancer-Blocker (EB) Funktion zu testen, wurden eine Reihe verschiedener Konstrukte generiert. Als Grundlage dafür dienten die von Antonia Regnier klonierten Expressionsplasmide mit  $\text{neo}^R$  Resistenzgenen, welche auf dem pCl Plasmid (Promega) basieren. Das Enhancer-freie, rein Promotor-getriebene Expressionsplasmid enthält den 202 bp langen SV40 Promotor, welcher auf den SV40-Virus (Simian vacuolating virus 40) zurückgeht, und wird im Folgenden pSV40Pneo genannt (p für

Plasmid, SV40P für SV40-Promotor, neo für das Resistenzgen) (siehe Abb. 26). Das Enhancer-getriebene Plasmid enthält zusätzlich, 5' des Promotors, den 236 bp langen SV40 Enhancer, und wird pSV40EPneo genannt (siehe Abb. 26). Beide Plasmide enthalten weiterhin das SV40 poly(A) Polyadenylierungssignal für neo<sup>R</sup> sowie Amp<sup>R</sup>, ein Ampicillin-Resistenzgen (für  $\beta$ -Lactamase kodierend) zur Selektion transformierter Bakterien, welches aufgrund seines prokaryontischen Promotors nur in Bakterien exprimiert wird.



**Abb. 26: Darstellung der Referenzplasmide pSV40Pneo und pSV40EPneo.** Beide Plasmide enthalten das neo<sup>R</sup> Resistenzgen, dessen Expression vom SV40 Promotor (oben) bzw. SV40 Promotor und SV40 Enhancer (unten) getrieben wird. SV40 poly(A) steht für das SV40 Polyadenylierungssignal. Amp<sup>R</sup> kodiert für das Ampicillinresistenzgen und dient zur Selektion transformierter Bakterien.

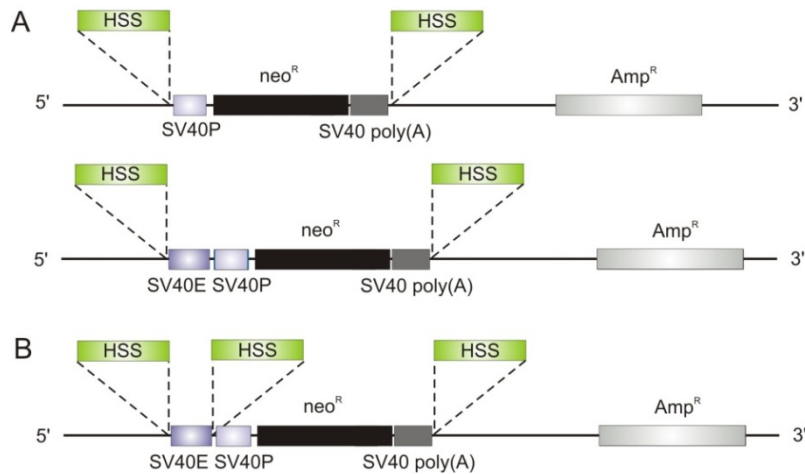
Die beiden Plasmide pSV40Pneo und pSV40EPneo (siehe Abb. 26), stellten die Grundlage für alle weiteren Klonierungen dar, und dienten im Rahmen der CFAs als Referenzplasmide.

### 3.4.2.1 Anordnung der HSS in den Reportergerkonstrukten

Wie bereits skizziert, sind für die Testung einer HSS auf Barriere- bzw. EB-Funktion unterschiedliche Anordnungen der HSS in den Reportergerkonstrukten nötig.

Zur Prüfung einer Boundary-Funktion im Sinne einer Barriere gegen die Ausbreitung inaktiven Heterochromatins (Gaszner and Felsenfeld, 2006; Pikaart et al., 1998) sind Konstrukte nötig deren Resistenzgen (inklusive Promotor/Enhancer) beidseits von der potentiellen Boundary flankiert wird. Damit wird das Reporterger vor inaktivierenden Einflüssen sowohl von stromauf- als auch stromabwärts geschützt. Entsprechend sollten die zu untersuchenden HSS jeweils beidseits der Reportergerkassette in pSV40Pneo bzw. pSV40EPneo inseriert werden (siehe Abb. 27A). Zur Prüfung einer Enhancer-blockierenden Funktion, welche abhängig von der Positionierung zwischen Enhancer und Promotor ist, (Burgess-Beusse et al., 2002; Kellum and Schedl, 1992; West et al., 2002), sollte die jeweilige HSS entsprechend zwischen Enhancer und Promotor kloniert werden (siehe Abb. 27B).

Zu diesem Zwecke wären zusätzliche HSS in Barriere-Position theoretisch nicht notwendig; allerdings könnte dann ein Barriere-Effekt einer HSS mit einem möglichen EB-Effekt derselben HSS interferieren. Aus diesem Grunde wurden zur Analyse von EB-Funktionen die jeweiligen HSS nur zwischen Enhancer und Promotor von Plasmiden mit denselben HSS in Barriere-Position kloniert. Abb. 27 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Anordnungen der HSS.



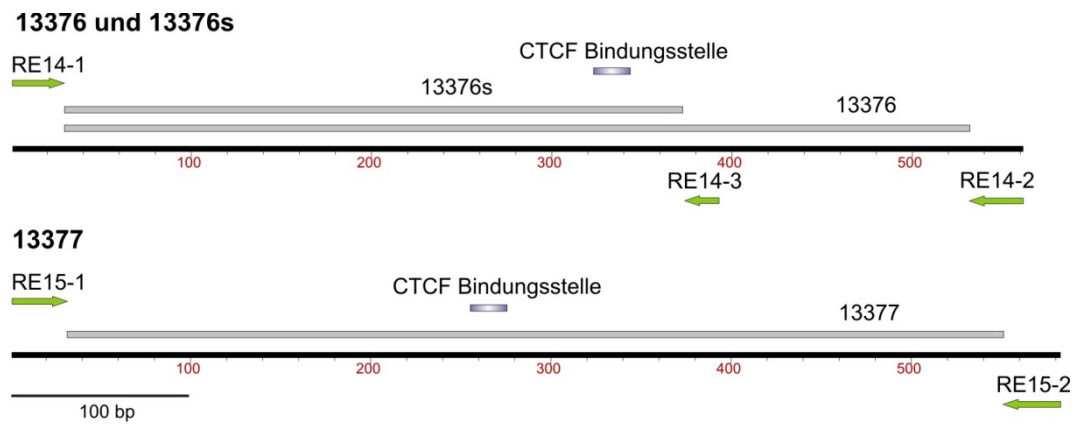
**Abb. 27: Die Anordnung der HSS in den Reporter-Genkonstrukten.** A: Anordnung der HSS zur Testung einer Barrierefunktion: beidseitige Flankierung des Reportergens  $neo^R$  durch die HSS. B: Positionierung der HSS zur Prüfung einer Enhancer-blockierenden Funktion: zusätzliche Insertion der HSS zwischen Enhancer und Promotor. Zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 26 und Kap. 3.4.2.

### 3.4.2.2 Eingrenzung der zu untersuchenden Bereiche aus HSS 5'1 und HSS 5'6

Die HSS-Sequenzen, welche mithilfe der CFAs funktionell untersucht werden sollten, sollen möglichst alle funktionellen Elemente der HSS umfassen, aber dennoch den zu untersuchenden Bereich auf das Nötigste beschränken. Zur Prüfung einer Insulator/Boundary Funktion wäre angesichts der CTCF-Abhängigkeit dieser Funktion (Bell et al., 1999) die 20 bp lange CTCF-Kernbindungssequenz die Minimalvariante. Die experimentell von uns identifizierten HSS-Sequenzen sowie die durch CTCF-Chromatin-IP gefundenen CBS (Kim et al., 2007) sind allerdings länger und könnten weitere, potentiell relevante, regulatorische Elemente enthalten, so dass wir die HSS-Gesamtsequenzen für die funktionelle Analyse wählten. Aufgrund der Unschärfe der HSS-Kartierung mittels DNase I Verdau und „indirect end-labeling“ von mindestens  $\pm 50$  bp (Gross and Garrard, 1988) wurden die Sequenzen der mittels ChIP-on-chip identifizierten CBS 13376 und 13377 (561 bp bzw. 582 bp) gewählt (Kim et al., 2007). Anhand der CBS 13376 wollten wir zudem prüfen, ob eine kürzere Sequenz, welche dennoch die CTCF-Kernbindungssequenz enthält, sich in ihrer Funktion von der Gesamt-CBS-Sequenz unterscheidet.

Für die zu amplifizierenden Bereiche, d.h. die CBS 13376, deren kürzere Teilsequenz CBS 13376s (402 bp), und die CBS 13377, wurden Primerpaare gewählt, welche mit für die Klonierungen in pSV40Pneo bzw. pSV40EPneo passenden Restriktionsenzymspaltstellen versehen wurden. Abb. 28 gibt einen Überblick über die CBS mit Position der Oligonukleotide und der CTCF-Kernbindungssequenzen. Die Oligonukleotidsequenzen sind Tab. 2 (siehe Kap. 2.1.7.3) zu entnehmen.

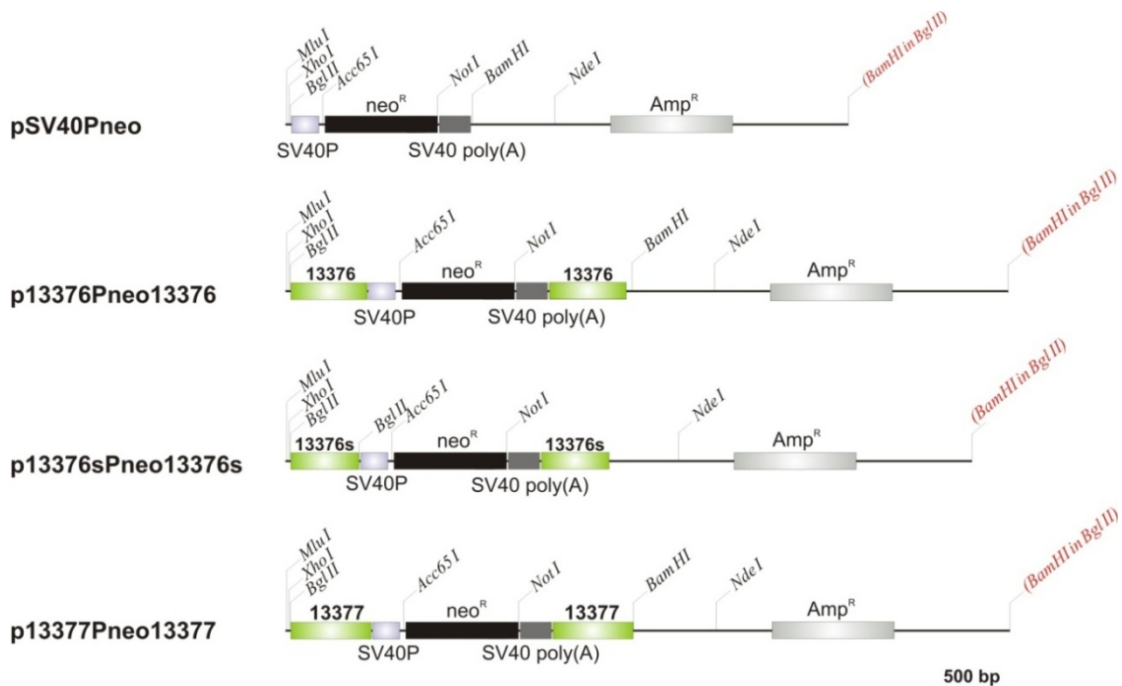




**Abb. 28: Amplifizierte Bereiche der CBS 13376 und 13377.** Dargestellt sind die Sequenzen der CBS 13376 und 13377, die verwendeten Primer (grüne Pfeile) und die Lokalisation der CTCF-Kernbindungssequenz.

### 3.4.2.3 Klonierung der Konstrukte

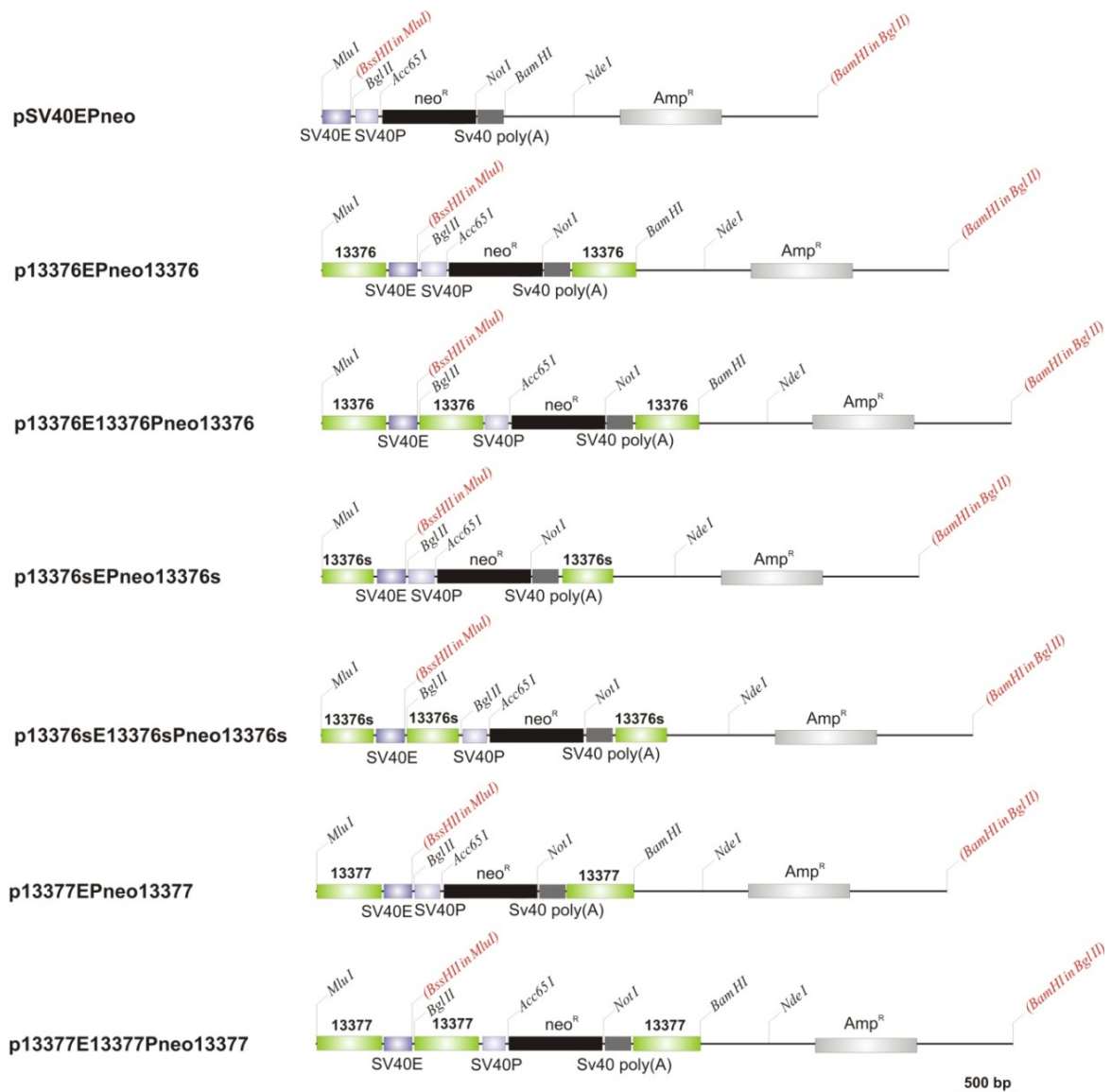
Zunächst wurden die HSS bzw. CBS in Barriereposition in pSV40Pneo kloniert. Basierend auf humaner Plazenta-DNA als Matrize wurden diese Elemente mittels PCR generiert. Für CBS 13376 wurden die Primer RE14-1 und RE14-2 eingesetzt, für 13376s RE14-1 und RE 14-3 und für 13377 die Primer RE 15-1 und RE15-2 (siehe Abb. 28). Die Forward-Primer enthielten eine Bgl II-, die Reverse-Primer eine Bam HI-Spaltstelle. Das Plasmid pSV40Pneo enthält 5' des Promotors eine Bgl II- und 3' des Poly(A)-Signals eine Bam HI-Schnittstelle. Aufgrund der Kompatibilität von Bam HI- und Bgl II-Spaltstellen konnten die mit Bgl II und Bam HI geschnittenen Inserts zunächst in den mit Bgl II gespaltenen Vektor und anschließend in den mit Bam HI verdauten Vektor kloniert werden.



**Abb. 29: Übersicht über die Promotor-getriebenen Reporter-genkonstrukte.** Ausgehend von pSV40Pneo wurden die CBS 13376, 13376s und 13377 in Barriere-Position kloniert. Die Restriktionsschnittstellen sind markiert. Zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 26 und Kap. 3.4.2.

Hieraus ergaben sich drei Promotor-getriebene Vektoren mit HSS bzw. CBS beidseits in Barriere-Position, welche gemäß der CBS p13376Pneo13376, p13376sPneo13376s und p13377Pneo13377 genannt wurden (siehe Abb. 29).

Für die Klonierung der HSS bzw. CBS in Barriereposition in das Enhancer-haltige Plasmid pSV40EPneo wurde die Klonierungsstrategie etwas abgewandelt. In der 3' Position konnte, wie bei pSV40Pneo, die CBS nach Bam HI und Bgl II Spaltung in den Bam HI verdauten Vektor inseriert werden. Auf der 5' Seite befindet sich in pSV40EPneo die Bgl II Spaltstelle allerdings zwischen Enhancer und Promotor, so dass zur Klonierung einer CBS in Barriere-Position stattdessen die 5' des Enhancers gelegene Mlu I Spaltstelle verwendet wurde.



**Abb. 30: Übersicht über die Enhancer-getriebenen Reporterengenkonstrukte.** Ausgehend von pSV40EPneo wurden die CBS 13376, 13376s und 13377 jeweils in Barriere-Position stromauf- und stromabwärts sowie in Enhancer-blockierender Position zwischen Enhancer und Promotor kloniert. Die Restriktionsschnittstellen sind markiert. Zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 26 und Kap. 3.4.2.

Die stromabwärts des Resistenzgens gelegene CBS wurde wie bei pSV40Pneo in die Bam HI Spaltstelle kloniert (s.o.). Für die 5' gelegene CBS wurden mit den Primern RE14-4 und RE14-5 für 13376, RE14-4 und RE 14-6 für 13376s und RE15-3 und RE15-4 für 13377 PCR-Produkte mit Mlu I-(5') bzw. Bss HII (3') Spaltstellen generiert. Aufgrund der Kompatibilität von Mlu I- und Bss HII-Schnittstellen konnten diese CBS nach entsprechendem Restriktionsverdau in die Mlu I-Spaltstelle von pSV40EPneo kloniert werden. Hieraus resultierten die Enhancer-getriebenen Reporter-genkonstrukte mit HSS beidseits in Barriere-Position, welche entsprechend p13376EPneo13376, p13376sEPneo13376s und p13377EPneo13377 genannt wurden (siehe Abb. 30).

Für die Reporter-genkonstrukte mit CBS in EB-Position wurden CBS mit Bgl II- und Bam HI-Schnittstellen in die Bgl II-Spaltstelle zwischen Enhancer und Promotor der gerade genannten Plasmide eingefügt. So entstanden Reporter-genkonstrukte mit CBS in EB-Position, welche entsprechend der CBS Anordnung p13376E13376Pneo13376, p13376sE13376sPneo13376s und p13377E13377Pneo13377 genannt wurden (siehe Abb. 30). Alle Konstrukte wurden nach ihrer Klonierung mittels Testspaltungen auf ihre Richtigkeit überprüft und anschließend von Eurofins MWG/Operon sequenziert. Tab. 7 gibt eine Übersicht über die klonierten und nun zu testenden Reporter-genkonstrukte.

<b>Plasmid</b>	<b>Größe (bp)</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Oligonukleotide</b>
<b>pSV40Pneo</b>	3982	Referenzplasmid	
<b>p13376Pneo13376</b>	5076	pSV40Pneo	RE14-1& RE14-2
<b>p13376sPneo13376s</b>	4758	pSV40Pneo	RE14-1& RE14-3
<b>p13377Pneo13377</b>	5114	pSV40Pneo	RE15-1& RE15-2
<b>pSV40EPneo</b>	4223	Referenzplasmid	
<b>p13376EPneo13376</b>	5317	pSV40EPneo	RE14-4& RE14-5; RE14-1& RE14-2
<b>p13376sEPneo13376s</b>	4999	pSV40EPneo	RE14-4& RE14-6; RE14-1& RE14-3
<b>p13377EPneo13377</b>	5353	pSV40EPneo	RE15-3& RE15-4; RE15-1& RE15-2
<b>p13376E13376Pneo13376</b>	5864	p13376EPneo13376	RE14-1& RE14-2
<b>p13376sE13376sPneo13376s</b>	5387	p13376sEPneo13376s	RE14-1& RE14-3
<b>p13377E13377Pneo13377</b>	5919	p13377EPneo13377	RE15-1& RE15-2

**Tab. 7 Übersicht über die Reporter-genkonstrukte mit HSS 5'1 und 5'6 in Barriere und EB-Position.**

### **3.4.3 Durchführung der Colony-Forming-Assays**

Die CFAs mit den klonierten Reporter-genkonstrukten wurden entsprechend des von Antonia Regnier in der AG Klobeck etablierten Protokolls durchgeführt (Regnier, 2011).

### **3.4.3.1 Wahl der Zelllinie**

Als Zelllinie wurden HeLa Kyoto Zellen, ein Subklon von HeLa Zellen, eingesetzt (Simpson et al., 2007). Von der Verwendung von B-Zelllinien, in welchen die Immunglobulinloci aktiv sind, wurde aufgrund technischer Schwierigkeiten abgesehen. Zum einen ist die Transfektionseffizienz in B-Zelllinien generell sehr gering (Asenbauer and Klobeck, 1996), zum anderen handelt es sich um Suspensionszellen, welche nur Soft-Agar-basierte CFAs erlauben. Diese würden wiederum Probleme hinsichtlich des Wechsels von Medium und Selektionsagens G418 aufwerfen und wären technisch schwieriger als klassische CFAs. HeLa Zellen hingegen sind leicht transfizierbar, können durch ihre starke Adhärenz mehrere Medienwechsel gut überdauern und wachsen auch in einer niedrigen Zelldichte, wie sie für CFAs benötigt wird. HeLa Kyoto Zellen im Speziellen zeigen eine höhere Wachstumsrate als normale HeLa Zellen, bilden besser abgrenzbare Kolonien und sind leichter einzufärben, weswegen sie sich besonders eignen (Regnier, 2011). Aufgrund der Nachweisbarkeit der CBS 13376 und 13377 in Fibroblasten (Kim et al., 2007) und unserer DNase I Assays kann zudem von einer nicht-B-Zell spezifischen Funktion dieser CBS ausgegangen werden, so dass der Einsatz von HeLa Zellen gerechtfertigt ist.

### **3.4.3.2 Transfektion**

Alle Reporterengenkonstrukte wurden vor ihrer Transfektion linearisiert, damit sie auf dieselbe Weise in die genomische DNA integrieren. Dazu wurde die Restriktionsendonuklease Nde I eingesetzt, welche stromabwärts aller für den CFA relevanten Strukturen schneidet (siehe Abb. 29 und 30). Die Plasmid-DNA wurde mittels Gelelektrophorese auf Linearität geprüft. Für die Transfektion wurde mit Nanofectin als Transfektionsreagenz eine chemische Transfektionsmethode gewählt, die auf kationischen Polymeren basiert. Diese sind in poröse Nanopartikeln eingebettet und bilden mit der negativ geladenen DNA einen stabilen Polymer-DNA-Komplex, der mittels Endozytose von Zellen aufgenommen wird und im Zellinneren schließlich die DNA freisetzt.

In den Transfektionsansätzen wurde für alle Konstrukte die gleiche Menge DNA eingesetzt (siehe Kap. 2.2.11.2). Um Unterschiede hinsichtlich der Transfektionseffizienz o.a. auszugleichen, wurde in jeder Versuchsrunde das Referenzplasmid (pSV40Pneo) transfiziert, auf welches alle Werte bezogen wurden. Jedes Reporterengenkonstrukt wurde insgesamt in mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten transfiziert, und die transfizierten Zellen jeweils auf 3 verschiedene Zellkulturschalen ausplattiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne jegliche Plasmid-DNA. Die Transfektionen wurden im Folgenden, wie in Kap. 2.2.11.2 beschrieben, durchgeführt.

### 3.4.3.3 Selektion, Färbung und Auswertung

Zur Selektion der transfizierten und damit das Resistenzgen  $neo^R$  exprimierenden Zellen wurden diese mit G418 Sulfat behandelt, wobei dieses über 14 Tage regelmäßig erneuert wurde um die Konzentration konstant zu halten (siehe hierzu Kap.2.2.11.3). Nach Ende des Selektionszeitraumes wurden die Zellen mit Methylenblau, einem intensiv blauen und dauerhaften Farbstoff, gefärbt (siehe Kap. 2.2.11.4). Die makroskopisch sichtbaren Kolonien wurden im Anschluss vor einem 1 cm x 1 cm Raster auf weißem Hintergrund per Hand ausgezählt. Die weitere Auswertung erfolgte computerbasiert mithilfe von Microsoft Excel 2010. Für jedes Reportergenkonstrukt wurden die Einzelwerte aller damit transfizierten Platten eingegeben und die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Der Mittelwert des Referenzplasmids pSV40Pneo wurde gleich eins gesetzt und die Mittelwerte der anderen Konstrukte auf diese Referenz bezogen (siehe auch Kapitel 3.4.3.2), so dass unabhängige Experimente verglichen werden konnten. Des Weiteren musste die Größe der jeweiligen Plasmide berücksichtigt werden: bei unterschiedlicher Plasmidgröße und Transfektion derselben DNA-Mengen wurden nämlich unterschiedliche Kopienzahlen transfiziert. Um dies in der Auswertung einzukalkulieren, wurde die Länge des jeweiligen Reportergenkonstruktes in Relation zur Länge des Referenzplasmids pSV40Pneo (3982 bp) gesetzt. Der sich ergebende Faktor (Faktor f) wurde mit dem jeweiligen Mittelwert und der entsprechenden Standardabweichung multipliziert. Die daraus resultierenden Werte wurden schließlich dem t-Test unterzogen um zu prüfen, ob die Unterschiede zwischen einzelnen Konstrukten signifikant waren (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ).

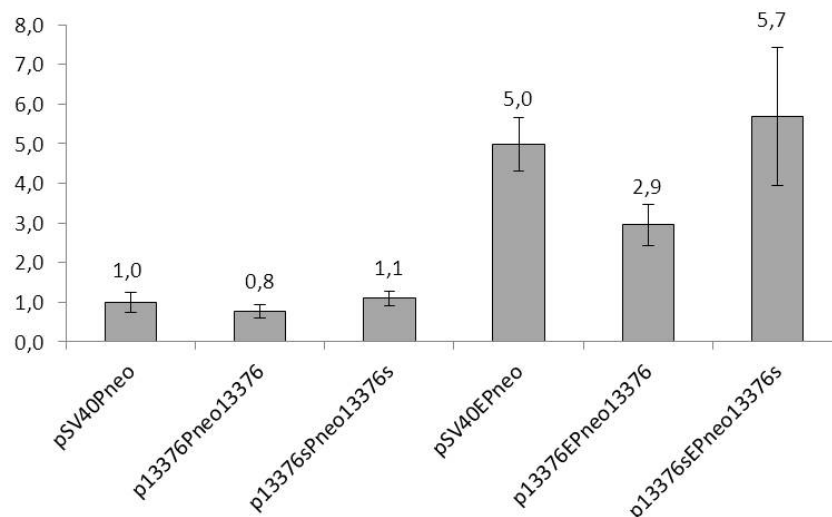
### 3.4.4 Ergebnisse der Colony-Forming-Assays

In drei unabhängigen Experimenten wurden die oben genannten 11 Plasmide (siehe Kap. 3.4.2.3) inklusive Referenzplasmid pSV40Pneo und Negativkontrolle in HeLa Kyoto Zellen transfiziert. Transfektion, Selektion und Auswertung erfolgten wie oben beschrieben (siehe Kap. 3.4.3.2 und 3.4.3.3).

#### 3.4.4.1 Untersuchungen zur Funktion von 13376 und 13376s

Die CBS 13376, welche der HSS 5'1 entspricht und 2 kb stromabwärts des TOP3B Gens liegt (siehe Abb. 17) sowie deren Kurzform 13376s wurden unter Einsatz der in Kap. 3.4.2.3 beschriebenen Plasmide auf ihre mögliche Boundary- und Enhancer-Block Funktion getestet. Zur Prüfung der Barriere-Funktion dienten die Plasmide pSV40Pneo, p13376Pneo13376, p13376sPneo13376s, pSV40EPneo, p13376EPneo13376 und p13376sEPneo13376s, welche die CBS jeweils stromauf- und stromabwärts des Reportergenkomplexes enthalten. Bei den rein Promotor-getriebenen Konstrukten, die auf dem Plasmid pSV40Pneo basieren, bewirkte

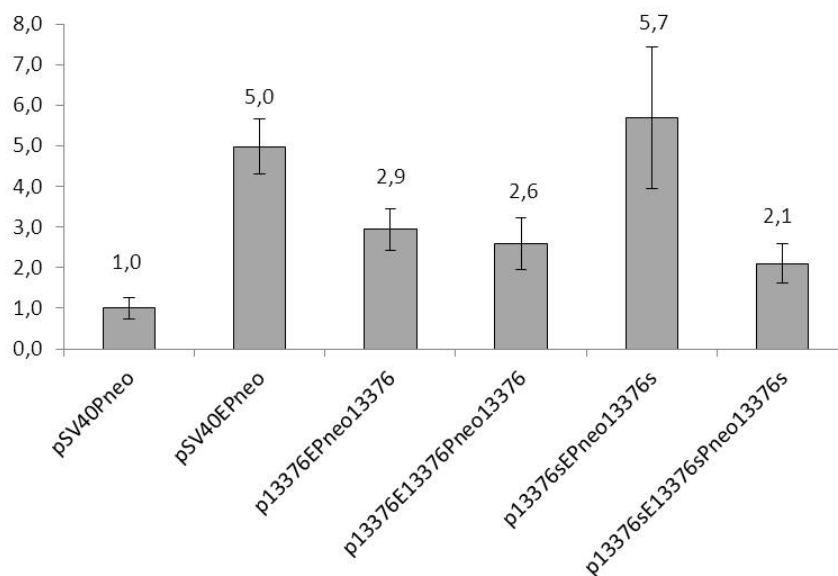
die Anwesenheit von 13376 in Barriere-Position eine leichte, jedoch signifikante Reduktion der Kolonien im Vergleich zum Referenzvektor (p-Wert im t-Test von 0,04), das verkürzte Fragment 13376s hingegen führte in Barriere-Position zu keiner signifikanten Änderung der Kolonienzahl (p-Wert im t-Test von 0,32) (siehe Abb. 31). Das Enhancer- und Promotor-getriebene Reportergerkonstrukt pSV40EPneo führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Zunahme der Kolonienzahlen im Vergleich zu pSV40Pneo (siehe Abb. 31). Die Platzierung der CBS 13376 und 13376s stromauf- und abwärts von Enhancer, Promotor und Resistenzgen führten zu ähnlichen Ergebnissen wie in den rein Promotor-basierten Konstrukten: in Barriere-Position führte 13376 zu einer deutlichen und signifikanten Abnahme der Kolonien-Zahlen auf fast die Hälfte (p-Wert im t-Test von  $2,3 \times 10^{-6}$ ) (siehe Abb. 31), während 13376s wiederum keine signifikante Veränderung der Kolonienzahlen zur Folge hatte (p-Wert im t-Test von 0,42) (siehe Abb. 31).



**Abb. 31: Ergebnisse der CFAs mit den CBS 13376 und 13376s in Barriere-Position.** Dargestellt sind die Ergebnisse der CFAs mit Promotor und Enhancer-getriebenen Reportergerkonstrukten mit CBS 13376 bzw. dessen Kurzform 13376s in Barriere-Position. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte jeweils 9 verschiedener Auszählungen und beziehen sich auf das Referenzplasmid pSV40Pneo, welches gleich 1 gesetzt wurde. Die Mittelwerte sind angegeben; die Standardabweichungen dargestellt.

Hätten die CBS 13376 bzw. 13376s eine Boundary-Aktivität, welche das Reporterger vor Heterochromatin-assoziiierter Inaktivierung schützt, wäre eine Zunahme der Kolonien zu erwarten. Stattdessen führte die beidseitige Flankierung des Reporterger mit der HSS 5'1 bzw. CBS 13376 zu einer deutlich geringeren Koloniezahl, was eine Silencer-Funktion vermuten lässt, wie sie für CTCF-bindende Elemente bereits beschrieben wurde (Burcin et al., 1997; Klochkov et al., 2006). Die Silencer-Funktion scheint zudem durch jenen DNA Abschnitt vermittelt, welcher in der Kurzform 13376s nicht enthalten ist, da letztere zu keinerlei Verminderung der Kolonienzahl führt (siehe Abb. 31).

Als nächstes wurden die CBS 13376 und 13376s auf EB-Funktionen getestet. Dazu wurden die oben genannten Konstrukte mit CBS in Barriere-Position um CBS zwischen Enhancer und Promotor erweitert (siehe Kap. 3.4.2.1). Der Vergleich dieser Plasmide mit den CBS-flankierten Konstrukten sollte Positions-unabhängige Effekte wie Silencer-Funktionen minimieren und eine Evaluation der reinen EB-Funktion ermöglichen. Zur Prüfung der EB-Aktivität wurden die Plasmide pSV40Pneo, pSV40EPneo, p13376EPneo13376, p13376E13376Pneo13376, p13376sEPneo13376s und p13376sE13376sPneo13376s eingesetzt.



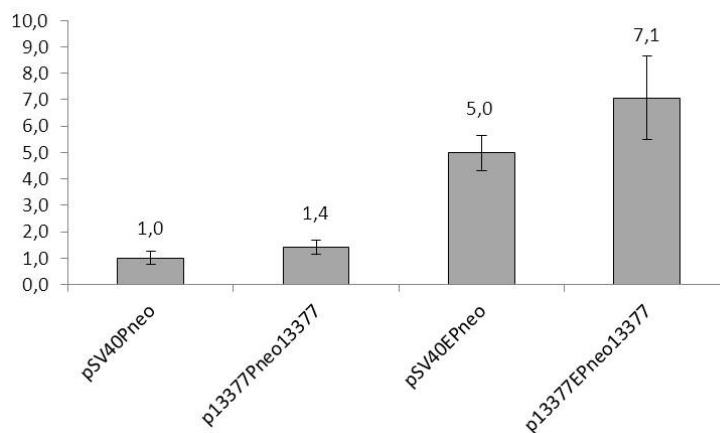
**Abb. 32: Ergebnisse der CFAs mit den CBS 13376 und 13376s in Enhancer-Block Position.** Dargestellt sind die Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13376 und deren Kurzform 13376s in Enhancer-blockierender Position. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte jeweils 9 verschiedener Auszählungen und beziehen sich auf das Referenzplasmid pSV40Pneo, welches gleich 1 gesetzt wurde. Die Mittelwerte sind angegeben; die Standardabweichungen dargestellt.

Die CBS 13376, welche in Barriere-Position bereits zu einer Abnahme der Kolonienzahl führte und damit Silencer-Aktivität zeigte, hatte bei zusätzlicher Positionierung zwischen Enhancer und Promotor keine weitere Verminderung der Kolonienzahl zur Folge (p-Wert im t-Test von 0,17) (siehe Abb. 32). Dies stützt die Hypothese einer Positions- und Kopienzahl-unabhängigen transkriptionellen Silencer-Funktion der CBS 13376. Die Kurzform 13376s hingegen, welche in Barriere-Position keine Auswirkung auf die Kolonienzahl hatte, führte, bei Anwesenheit zwischen Enhancer und Promotor, zu einer deutlichen Abnahme der Kolonienzahl auf weniger als die Hälfte (p-Wert im t-Test von  $3,7 \times 10^{-5}$ ) (siehe Abb. 32). Dementsprechend würde 13376s eine klassische Positions-abhängige EB-Funktion erfüllen. Die unterschiedlichen Effekte von 13376 und 13376s könnten durch verschiedene funktionelle Untereinheiten innerhalb der Gesamtsequenz der CBS 13376 bzw. HSS 5'1 bedingt sein. Die Gesamtsequenz 13376 zeigt eine Silencer-Funktion, welche die Teilsequenz

13376s nicht ausübt, wodurch deren EB-Funktion zutage treten könnte. Entsprechend müsste das Enhancer-blockierende Element in der Gesamtsequenz 13376 enthalten sein, nur scheint dieses innerhalb der CBS von einem stärkeren Silencer-Element dominiert zu werden (siehe Abb. 32).

#### 3.4.4.2 Untersuchungen zur Funktion von 13377

Als nächstes wurde die HSS 5'6, welche der CBS 13377 entspricht und unmittelbar 5' des ersten funktionellen  $V_{\lambda}$ -Gens gelegen ist (siehe Abb. 21), hinsichtlich einer möglichen Barriere- und EB-Funktion untersucht. Die Barriere-Funktion wurde mithilfe der Plasmide pSV40Pneo, p13377Pneo13377, pSV40EPneo und p13377EPneo13377 getestet.

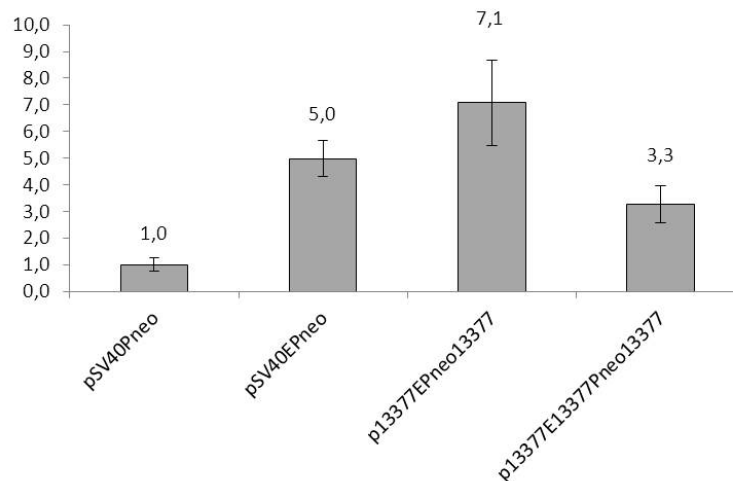


**Abb. 33: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377 in Barriere-Position.** Dargestellt sind die Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377 in Barriere-Position. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte jeweils 9 verschiedener Auszählungen (3 unabhängige Versuchsreihen) und beziehen sich auf das Referenzplasmid pSV40Pneo, Die Mittelwerte angegeben; die Standardabweichungen sind eingetragen.

Sowohl die beidseitige Flankierung des rein Promotor-getriebenen Konstruktes pSV40Pneo, als auch des Enhancer-getriebenen pSV40EPneo mit der CBS 13377 führten zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Kolonienzahl (p-Wert im t-Test von 0,003 bzw. 0,002) (siehe Abb. 33). Damit kann der HSS 5'6 bzw. CBS 13377 eine klassische Barriere-Funktion zugeschrieben werden.

Ob die CBS 13377 auch Enhancer-Block Aktivität ausübt, wurde mithilfe des Plasmids p13377E13377Pneo13377 geprüft. Tatsächlich führte die Anwesenheit der CBS 13377 zwischen Enhancer und Promotor zu einer deutlichen Abnahme der Kolonienzahl sowohl im Vergleich zum Reporter-genkonstrukt mit 13377 in Barriere-Position als auch im Vergleich zu pSV40EPneo (p-Werte im t-Test von  $5,9 \times 10^{-6}$  bezogen auf p13377EPneo13377 bzw.  $6,5 \times 10^{-5}$  bezogen auf pSV40EPneo) (siehe Abb. 34). Damit zeigt die CBS 13377 bzw. HSS 5'6 sowohl eine Barriere- als auch eine EB-Funktion im klassischen Sinne.





**Abb. 34: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377 in Enhancer-Block Position.** Dargestellt sind Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377 in Enhancer-blockierender Position. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte jeweils 9 verschiedener Auszählungen, bezogen auf das Referenzplasmid pSV40Pneo. Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.5 Prüfung der Abhängigkeit der Insulator/Boundary-Funktion von CTCF

Die bisher durchgeführten CFAs konnten Insulator/Boundary Funktionen für die CBS 13376 und 13377 zeigen. Als nächstes sollte geprüft werden, ob diese Funktionen CTCF-abhängig sind oder ob anderweitige Elemente, welche ebenfalls innerhalb der untersuchten Regionen liegen könnten, verantwortlich sind. Dazu sollten die CTCF-Kernbindungssequenzen der CBS mutiert und diese CTCF-bindungsdefizienten Mutanten in CFAs untersucht werden.

#### 3.5.1 Gezielte Mutation der CTCF-Bindungsstellen und Klonierung der Konstrukte

Aufgrund seiner 11 Zinkfinger, welche in unterschiedlicher Weise an der DNA-Bindung beteiligt sein können, kann CTCF eine Vielzahl verschiedener DNA-Motive binden (siehe Abb. 24). Aus diesem Grunde ist eine Punktmutation innerhalb der CTCF-Konsensussequenz nicht ausreichend, um die Bindung von CTCF sicher zu verhindern; es muss stattdessen ein Großteil der CTCF-Konsensussequenz mutiert werden.

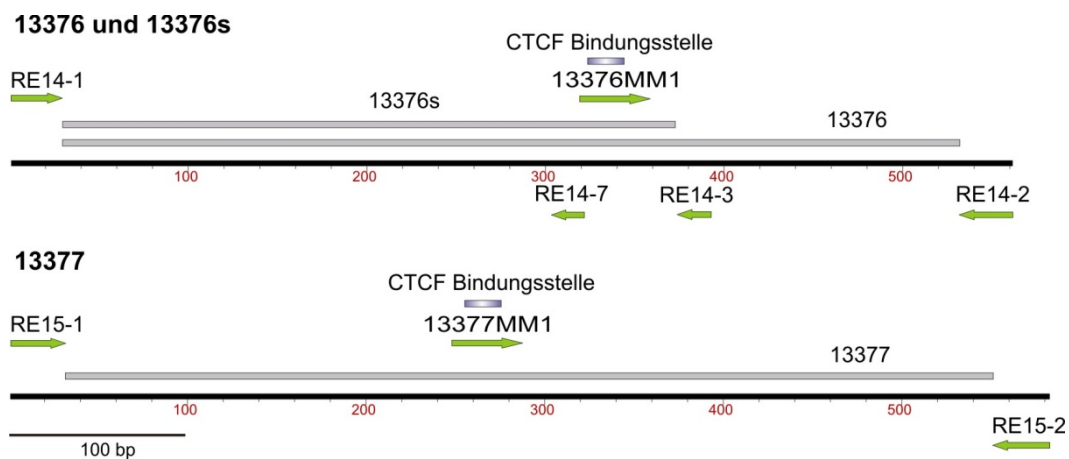
Für die Mutagenese wurde die Megaprimer-Methode gewählt. Dabei wird ein Primer so designt, dass er die gesamte mutierte Sequenz enthält. Zusammen mit einem zweiten Primer, der am 3'Ende des gesamten zu amplifizierenden Bereichs liegt, wird die Sequenz zwischen Mutationsort und 3'Ende im Rahmen einer ersten PCR amplifiziert (Ekici et al., 1997). Dieser amplifizierte Bereich dient in einer zweiten PCR als Megaprimer, der, zusammen mit einem Primer am 5' Ende der Gesamtsequenz, zum gewünschten mutierten Gesamtamplifikat führt (Ekici et al., 1997) (vgl. Kap. 2.2.9). Entsprechend wurden zwei Mutagenese-Primer entworfen, 13376MM1 zur Mutagenese der CTCF-Bindungssequenz von 13376 und 13377MM1 zur Mutagenese von 13377. Durch entsprechende Mutation der inneren 13 bp der Konsensussequenz der CBS 13376 konnte deren PMW-Score von 17,19 (sehr hohe Bindungswahrscheinlichkeit) auf unter -17 reduziert werden (CTCF-Bindung quasi

ausgeschlossen) und durch Mutation der inneren Konsensussequenz der CBS 13377 eine Reduktion des PMW-Scores von 16,23 auf unter -8 (siehe Abb. 35). Die Sequenzen der Mutagenese Primer sind Tab. 2 zu entnehmen; Abb. 35 zeigt eine Übersicht der ursprünglichen und mutierten CTCF-Konsensussequenzen.

	CTCF Konsensussequenz	PMW-Score zur CTCF-Bindung
13376	TGAGGCC <b>TGGGCCAGCAGGAGGCGCTG</b> AGTGGTCAGCTC	17,19
13376m	TGAGGCC <b>TGGG</b> TTGATGAAGAATT <b>CTG</b> AGTGGTCAGCTC	< -17
13377	CCTGGGC <b>CTAGGCAGAAGGGGGTGCTG</b> TTGGTCTGCT	16,23
13377m	CCTGGGC <b>CTAG</b> ATGAGGAATTCCA <b>CTG</b> TTGGTCTGCT	< -8

**Abb. 35: Die CTCF-Kernbindungssequenz der CBS 13376 und 13377 und deren Mutanten.** Dargestellt sind die CTCF-Konsensussequenzen der CBS 13376 (grün) und 13377 (grau), deren mutierte Formen und die jeweiligen PMW-Scores (nach der CTCFBSDB, Bao et al., 2008) zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer CTCF-Bindung.

Neben der Mutation kann auch eine Deletion der Konsensussequenz die Bindung von CTCF verhindern. Diese Strategie wurde beim kurzem 13376s Fragment angewendet, welches die CTCF-Bindungsstelle relativ randständig trägt (siehe Abb. 36). Ohne größere Beeinträchtigung anderer potentiell vorhandener regulatorischer Elemente lässt sich diese Bindungsstelle durch eine weitere Verkürzung der 13376s Sequenz eliminieren. Im Falle von 13376s wurden also beide Methoden, Mutagenese und Deletion, getestet.

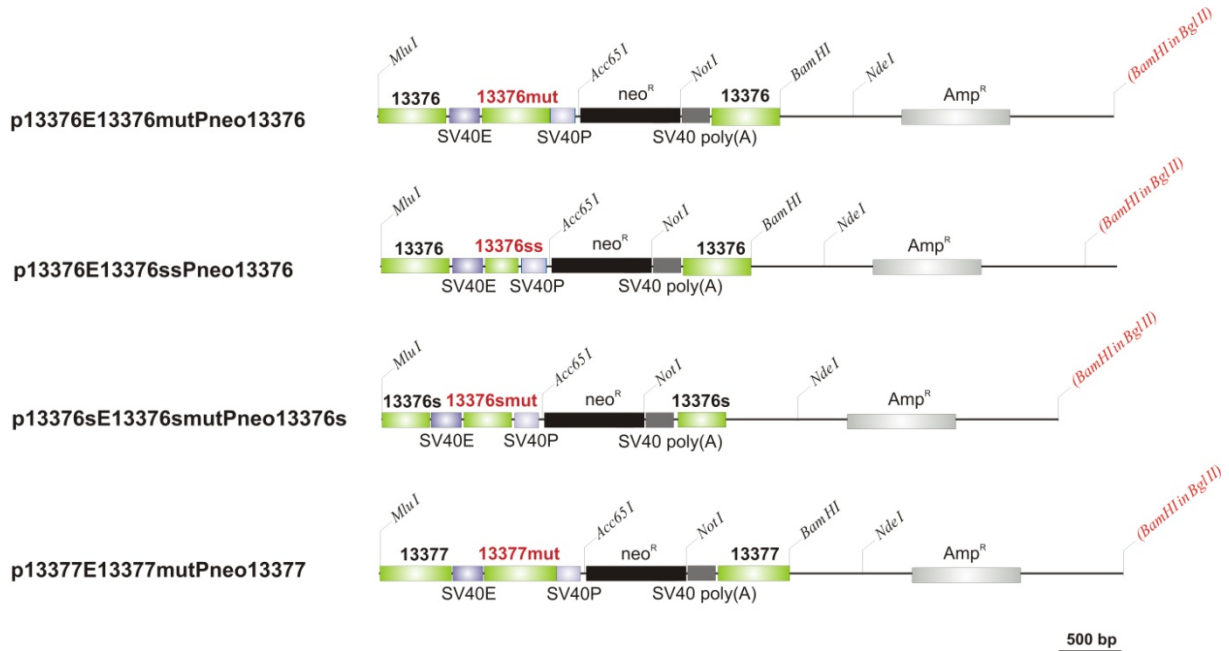


**Abb. 36: Lage der Primer zur Generierung der CTCF-bindungsdefizienten Mutanten.** Dargestellt sind die Sequenzen der CBS 13376 und 13377, die Lokalisation der CTCF-Konsensussequenz sowie die zur Generierung der bindungsdefizienten Mutanten verwendeten Primer (grüne Pfeile).

CTCF ist für die EB-Aktivität von Insulatoren essentiell (Bell et al., 1999), während es für die Barriere-Wirkung – zumindest in einigen Fällen- abkömmlich scheint (Recillas-Targa et al., 2002; Yao et al., 2003). Wir beschränkten uns deshalb darauf, die CTCF-bindungsdefizienten CBS-Mutanten lediglich in EB-Position zu testen. Zu diesem Zwecke wurden die mutierten bzw. verkürzten CBS-Segmente mit Bgl II und Bam HI zwischen Enhancer und Promotor der

beidseits von unmutierten CBS flankierten Plasmide (p13376EPneo13376, p13376sEPneo13376s und p13377EP13377) kloniert (vergleiche Kap. 3.4.2.3).

Die CTCF-bindungsdefiziente Mutante CBS 13376mut wurde mit dem Mutageneseprimer 13376MM1, dem 3' Primer RE14-2 und dem 5' Primer RE14-1 nach dem Megaprimer-Verfahren generiert (siehe Kap. 2.2.9 und Abb. 36).



**Abb. 37: Übersicht über die Reporterogenkonstrukte mit mutierter CTCF-Bindungsstelle.** Ausgehend von den Reporterogenkonstrukten mit den jeweiligen unmutierten CBS in Barriere-Position wurden die CTCF-bindungsdefizienten CBS 13376mut, 13376ss, 13376smut und 13377mut in Enhancer-Block Position kloniert. Die Restriktionsschnittstellen sind markiert. Zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 26 und Kap. 3.4.2.

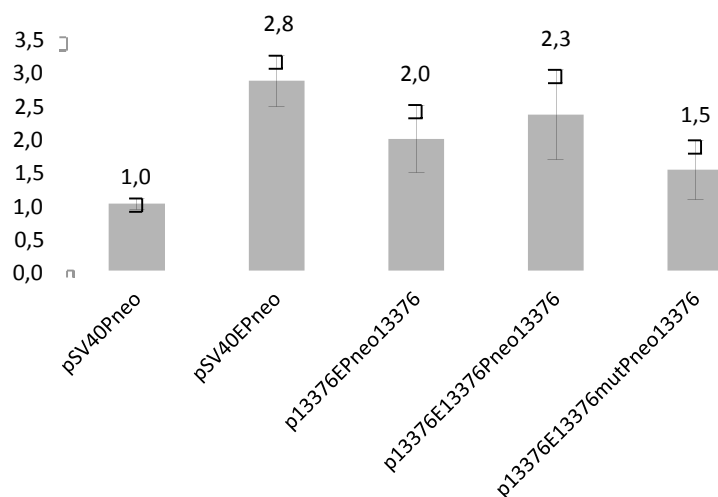
Die CBS 13376s wurde zum einen mit dem Mutageneseprimer 13376MM1 und den 3' bzw. 5' Primern RE14-3 und RE14-1 an der CTCF-Konsensussequenz mutiert, um das Element 13376smut zu erhalten. Zum anderen wurde sie mit den Primern RE14-7 und RE14-1 um die CTCF-Bindungssequenz verkürzt um die Deletions-Mutante 13376ss zu erhalten (siehe Abb.36). Die bindungsdefiziente Mutante 13377mut wurde entsprechend mit dem Mutageneseprimer 13377MM1 und den 3' bzw. 5' Primern RE15-2 und RE15-1 hergestellt. Die mutierten bzw. deletierten CBS enthielten jeweils 5' Bgl II- und 3' Bam HI-Spaltstellen (vergleiche Kap. 3.4.2.3) und wurden in die Bgl II Spaltstelle zwischen Enhancer und Promotor kloniert – jeweils in das Plasmid mit der entsprechenden unmutierten CBS in Barriere-Position. Hieraus resultierten die Plasmide p13376E13376mutPneo13376, p13376sE13376smutPneo13376s, p13376sE13376ssPneo13376s und p13377E13377mut-Pneo13377 (siehe Abb. 37).

### 3.5.2 Ergebnisse der Colony-Forming-Assays mit mutierten CTCF Bindungsstellen

Wäre die EB-Funktion der CBS 13376s und 13377 (siehe Kapitel 3.4.4.1 und 3.4.4.2) CTCF-abhängig, wäre nach Mutation der CTCF-Konsensussequenz keine EB-Aktivität mehr zu erwarten. Um dies zu prüfen, wurden CFAs mit den mutierten Reportergenkonstrukten (siehe Abb. 37) durchgeführt. Neben diesen wurden pSV40Pneo als Referenzplasmid, pSV40EPneo und alle pSV40EPneo basierten Konstrukte mit den CBS 13376, 13376s oder 13377 in Barriere- als auch in Barriere- und Enhancer-Block Position in drei unabhängigen Versuchsreihen in HeLa Kyoto Zellen transfiziert. Transfektion, Selektion und Auswertung erfolgten wie in Kap. 3.4.3.2 und 3.4.3.3 beschrieben.

#### 3.5.2.1 Funktionelle Untersuchung der CTCF-bindungsdefizienten Mutanten der CBS 13376 und 13376s

Die CBS 13376 hatte in Barriereposition zu einer Verminderung der Kolonienzahl, in zusätzlich Enhancer-blockierender Position aber keiner weiteren Änderung der Reporterexpression geführt (siehe Kapitel 3.4.4.1), so dass von einer Mutation der CBS in Enhancer-Block Position, ohne Modifikation der flankierenden Barriere-Elemente, keine Auswirkung auf die Kolonienzahl im CFA zu erwarten war. In den CFAs mit den Plasmiden pSV40Pneo, pSV40EPneo, p13376EPneo13376, p13376E13376Pneo13376 und dem mutierten Konstrukt p13376E13376mutPneo13376 bestätigte sich die signifikante Abnahme der Kolonienzahl bei 13376 in Barriere-Position (p-Wert im t-Test von  $8,0 \times 10^{-4}$ , siehe Abb. 38) sowie auch der ausbleibende Effekt einer zusätzlichen CBS 13376 in Enhancer-Block Position (p-Wert im t-Test von 0,22) (siehe Abb. 38).

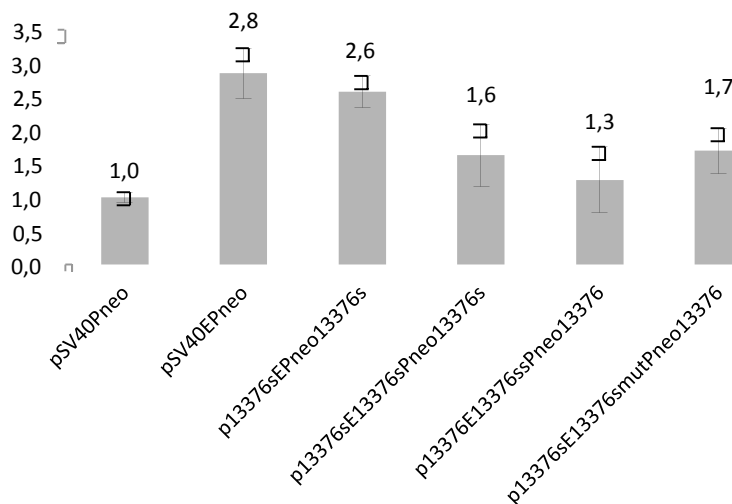


**Abb. 38: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13376mut in Enhancer-Block Position.** Dargestellt sind die Ergebnisse der CFAs mit der CTCF-bindungsdefizienten Mutante 13376mut in Enhancer-Block Position im Vergleich zu den angegebenen Konstrukten. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte jeweils 9 verschiedener Auszählungen und beziehen sich auf das Referenzplasmid pSV40Pneo. Die Mittelwerte sind angegeben; die Standardabweichungen eingetragen.

Bei Mutation der CTCF-Konsensussequenz in EB-Position zeigte sich überraschenderweise eine signifikant verringerte Kolonienzahl (p-Wert im t-Test von 0,0073) im Vergleich zur nicht mutierten CBS 13376 in EB-Position (siehe Abb. 38). Im Vergleich zu p13376EPneo13376, dem Konstrukt ohne CBS zwischen Enhancer und Promotor, ist der Unterschied allerdings nicht signifikant (p-Wert im t-Test von 0,055, siehe Abb. 38). Neben der bestätigten Silencer-Funktion der CBS 13376 zeigten die CFAs also eine gewisse EB-Funktion der mutierten CBS 13376mut, welche die unmutierte CBS 13376 nicht auffwies. Dabei war dieser Effekt nur im Vergleich zur CBS 13376 signifikant, nicht aber im Vergleich zur Abwesenheit jeglicher CBS zwischen Enhancer und Promotor. Dieses Ergebnis ist schwierig zu interpretieren. Es ist denkbar, dass der hemmende Effekt von 13376 CTCF-unabhängig ist und mit Wegfall der CTCF-Bindung weiter zunimmt. Um Aussagen über die CTCF-Abhängigkeit der Silencer-Funktion treffen zu können, müsste man auch die CTCF-Konsensussequenzen der CBS in Barriere-Position mutieren. Auch wäre es zum besseren Verständnis der Funktion der CBS 13376 sinnvoll, Untereinheiten dieser CBS zu untersuchen. Diese könnten unterschiedliche Funktionen haben, welche mit CTCF interferieren, kooperieren oder unabhängig sein könnten.

Dass die CBS 13376 verschiedene Komponenten enthält, ist schon dadurch ersichtlich, dass das Teilfragment 13376s, im Gegensatz zur Gesamtsequenz 13376, in Barriere-Position keine Auswirkung auf die Reporter-Expression hatte, in EB-Position aber zu einer signifikanten Abnahme der Kolonienzahl führte. Damit zeigt es eher Enhancer-Block- als Barriere- oder Silencer-Aktivität (siehe Kap. 3.4.4.1). Wäre diese Aktivität CTCF-abhängig, sollte nach Mutation der CTCF-Konsensussequenz zu einem Wegfall der EB-Wirkung kommen. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde, die CTCF-Konsensussequenz der CBS 13376s sowohl mutiert (13376smut) als auch deletiert (13376ss), so dass in den CFAs folgende Plasmide zum Einsatz kamen: pSV40Pneo, pSV40EPneo, p13376sEPneo13376s, p13376sE13376sPneo13376s sowie p13376sE13376smutPneo13376s und p13376sE13376ssPneo13376s.

Wie in den vorigen CFA-Versuchen zeigte die CBS 13376s in Barriere-Position keinen Effekt auf die Reporterexpression im Vergleich zu pSV40EPneo (p-Wert im t-Test von 0,08, siehe Abb. 39), während sie in Enhancer-Block Position zu einer deutlichen Abnahme der Kolonienzahl führte (p-Wert im t-Test von  $5,4 \times 10^{-5}$ , siehe Abb. 39). Nach Deletion der CTCF-Konsensussequenz (13376ss) ergab sich überraschenderweise keine Umkehrung des Effekts: die Kolonienzahl mit 13376ss in Enhancer-Block Position war vergleichbar mit 13376s in selbiger Lokalisation (p-Wert im t-Test von 0,25, siehe Abb. 39) und ca. 50% niedriger im Vergleich zu p13376sEPneo13376s (p-Wert im t-Test von  $6,0 \times 10^{-9}$ ).



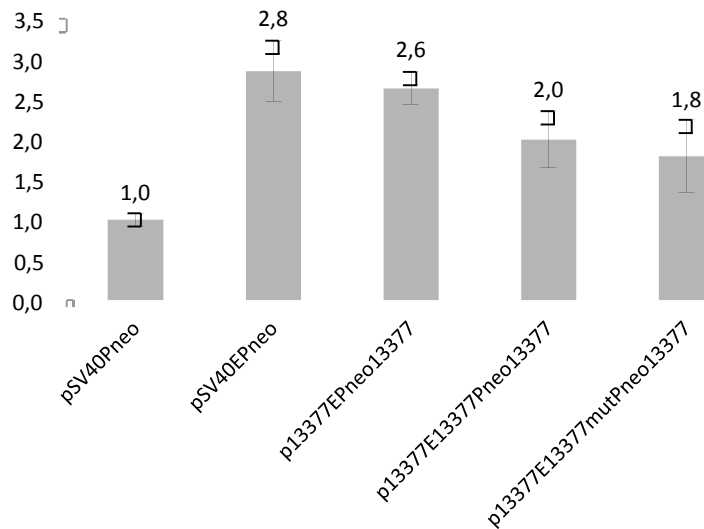
**Abb. 39: Ergebnisse der CFAs mit den CBS 13376smut und 13376ss in Enhancer-Block Position.** Dargestellt sind die Ergebnisse der CFAs mit den CTCF-bindungsdefizienten Mutanten 13376smut (mutiert) und 13376ss (deletiert) in Enhancer-Block Position im Vergleich zu den angegebenen Konstrukten. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen 9 verschiedener Experimente in Bezug auf das Referenzplasmid pSV40Pneo.

Die Ergebnisse mit der CTCF-bindungsdefizienten Mutante 13376smut entsprachen jenen mit 13376ss: auch hier ergaben sich keine Unterschiede in der Kolonienzahl im Vergleich zum unmutierten Konstrukt p13376sE13376sPneo13376s (p-Wert im t-Test von 0,72), sowie eine vergleichbare deutliche Abnahme der Kolonien im Vergleich mit p13376sEPneo13376s (p-Wert im t-Test von  $9,6 \times 10^{-6}$ , siehe Abb. 39). Damit übten die CTCF-bindungsdefizienten CBS 13376ss und 13376smut den gleichen, scheinbar CTCF-unabhängigen, Enhancer-blockierenden Effekt wie 13376s aus.

### 3.5.2.2 Untersuchungen zur Funktion der CTCF-bindungsdefizienten CBS 13377

Die CBS 13377 zeigte in den bisherigen CFAs sowohl eine Barriere- als auch eine EB-Funktion (siehe Kapitel 3.4.4.2). Um zu prüfen ob insbesondere die EB-Funktion abhängig von CTCF ist, wurden CFAs mit der CTCF-bindungsdefizienten Mutante 13377mut in Enhancer-Block Position durchgeführt, wobei die Plasmide pSV40Pneo, pSV40EPneo, p13377EPneo13377, p13377E13377Pneo13377 und das CTCF-bindungsdefiziente Plasmid p13377E13377mutPneo13377 eingesetzt wurden.

Überraschenderweise führte die beidseitige Flankierung des Reportergens mit der CBS 13377 in dieser Versuchsreihe zu keiner signifikanten Veränderung der Kolonienzahl (p-Wert im t-Test von 0,15, siehe Abb. 40), während die EB-Funktion von 13377 bestätigt werden konnte (p-Wert im t-Test von  $2,5 \times 10^{-4}$ , siehe Abb. 40).



**Abb. 40: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377mut in Enhancer-Block Position.** Dargestellt sind die Ergebnisse der CFAs mit der CTCF-bindungsdefizienten Mutante 13377mut in Enhancer-blockierender Position im Vergleich zu den angegebenen Konstrukten. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte 9 verschiedener Experimente bezogen auf das Referenzplasmid pSV40Pneo. Die Mittelwerte sind angegeben; die Standardabweichungen eingezeichnet.

Die Mutation der CTCF-Konsensussequenz von 13377 konnte diese Funktion nicht unterbinden: das Reportergenkonstrukt p13377E13377mutPneo13377 resultierte in einer vergleichbaren Kolonienzahl wie p13377E13377Pneo13377 (p-Wert im t-Test von 0,29, siehe Abb. 40), bzw. in einer deutlich verminderten Kolonienzahl im Vergleich zu p13377EPneo13377 (p-Wert im t-Test von  $1,1 \times 10^{-4}$ , siehe Abb. 40). Entsprechend scheint die Enhancer-blockierende Funktion der CBS 13377 unabhängig von CTCF zu sein.

Die Ergebnisse der CFAs mit den CTCF-bindungsdefizienten CBS sind durchaus überraschend, da die CBS einerseits über die *in vivo* Bindung von CTCF identifiziert wurden (Kim et al., 2007) und andererseits in den durchgeführten CFAs CTCF-typische Silencer, Boundary oder Enhancer-Block Funktionen zeigten.

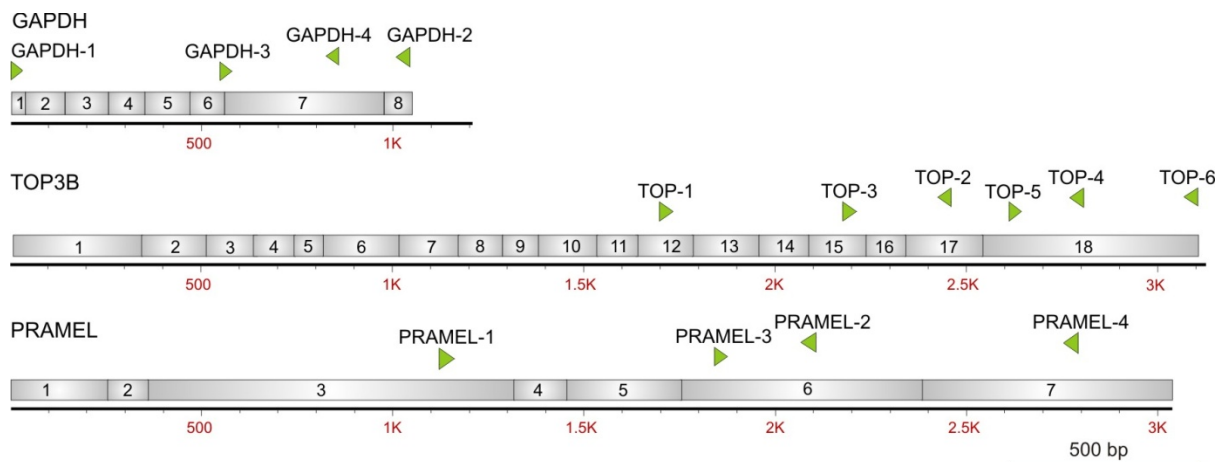
Es ist denkbar, dass die Funktionen der CBS 13376 und 13377 bzw. HSS 5'1 und 5'6 tatsächlich CTCF-unabhängig sind. Eine andere Erklärung wäre, dass die Mutanten über sekundäre CTCF-Bindungsstellen innerhalb der HSS dennoch CTCF binden können und daher ihre Funktion beibehalten. Möglicherweise sind diese unerwarteten Ergebnisse auch durch die Komplexität von multifunktionalen regulatorischen Elementen wie der HSS 5'1 bzw. 5'6 bedingt. CTCF könnte zwar wichtig, aber nicht allein zuständig für die Funktion von Insulatoren/Boundaries sein, so dass die regulatorischen Elemente auch ohne CTCF ihre Funktion größtenteils aufrechterhalten könnten. Zur weiteren Diskussion siehe Kap. 4.1.2 und 4.5.

### 3.6 Expression der 5' von Ig $\lambda$ gelegenen Gene

Insulator/Boundary-Elemente zwischen benachbarten Genen stellen häufig deren unabhängige Expression sicher. Um zu prüfen, ob die Gene stromaufwärts von Ig $\lambda$  tatsächlich unabhängig von Ig $\lambda$  exprimiert werden, wurde ergänzend deren Expression auf mRNA Ebene untersucht.

#### 3.6.1 Untersuchung der Expression von TOP3B und PRAMEL auf mRNA Ebene

Etwa 44 kb stromaufwärts von Ig $\lambda$  liegt das 25,82 kb lange Gen TOP3B, welches für die DNA Topoisomerase III kodiert (Hanai et al., 1996), aus 18 verschiedenen Exonen besteht und im Vergleich zu Ig $\lambda$  durch den gegenläufigen DNA Strang kodiert wird (www.ensembl.org). Im Laufe dieser Arbeit stellte sich zudem heraus, dass mit PRAMEL (preferentially expressed antigen in melanoma-like) ein weiteres Gen auf Chromosom 22q11.22 unmittelbar 5' von Ig $\lambda$  lokalisiert ist, welches sich mit 7 Exons über 52,84 kb erstreckt und damit in den Ig $\lambda$ -Locus hineinragt. Es gibt mehrere prozessierte Transkripte von PRAMEL, allerdings sind diese nicht Protein-kodierend (www.ensembl.org), weswegen PRAMEL ein Pseudogen darstellt. Zur genaueren Beschreibung von TOP3B und PRAMEL siehe auch Kapitel 4.4.1.



**Abb. 41: Lage der Primer für die RT-PCR der Gene GAPDH, TOP3B und PRAMEL.** Dargestellt sind die für GAPDH, TOP3B und PRAMEL kodierenden mRNAs mit ihren Exons, welche von 5' nach 3' nummeriert sind. Die grünen Pfeile zeigen die Lage und Richtung (5' nach 3') der verschiedenen Primer.

Die Transkription von TOP3B und PRAMEL und deren Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des Ig $\lambda$  Locus wurde auf mRNA-Ebene mithilfe der Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) untersucht. Dabei wird durch das Enzym Reverse Transkriptase, basierend auf einer RNA-Matrize, der sog. cDNA-Strang synthetisiert, wobei durch den Einsatz von Oligo(dT) Primern selektiv mRNA-Moleküle vom PolyA-Schwanz aus revers transkribiert werden. Die synthetisierte cDNA dient anschließend als Matrize einer klassischen Polymerasekettenreaktion. Um sicherzustellen, dass nur cDNA und nicht genomische DNA quantifiziert wird, müssen die Primer für die RT-PCR so gestaltet sein, dass

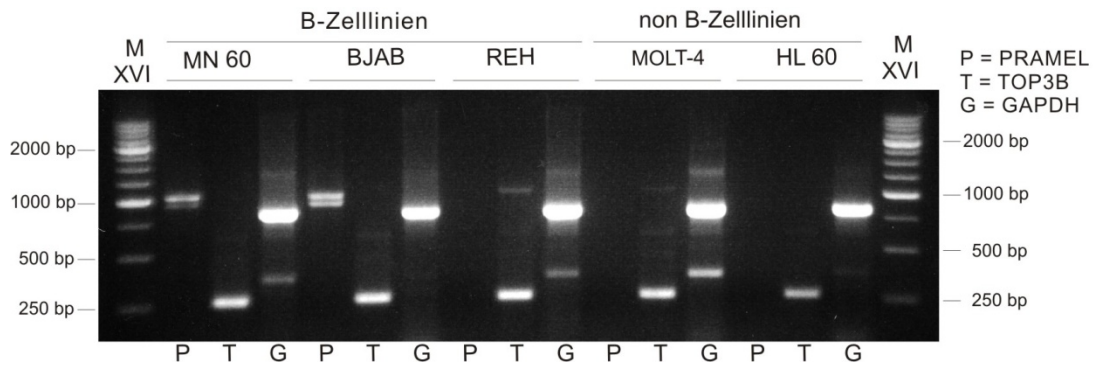


sie entweder nur cDNA-Sequenzen amplifizieren, oder mit genomischer DNA als Matrize ein unterschiedlich langes Produkt ergeben. Entsprechend sollten die Primer auf unterschiedlichen Exons liegen, oder aber Exon-Exon Grenzen überspannen. Für TOP3B und PRAMEL wählten wir mehrere Primer, welche die genannten Kriterien erfüllen: für TOP3B drei Forward (TOP1, -3 und -5) sowie drei Reverse Primer (TOP-2, -4 und -6) sowie für PRAMEL zwei Forward (PRAMEL-1 und -3) und zwei Reverse Primer (PRAMEL-2 und -4) (siehe Abb. 41). Da die reverse Transkription mit Oligo(dT) Primern am 3' Ende der mRNA (Poly-A Schwanz) beginnt, enthalten alle reversen Transkripte das 3' Ende aber nicht unbedingt das vollständige Gen. Aus diesem Grunde wurden für die längeren Gene TOP3B und PRAMEL Primer im 3' Bereich des Gens gewählt (siehe Abb. 41). Um die Genexpression zweier Zelllinien zu vergleichen, benötigt man des Weiteren Kontrollgene, deren Expression unabhängig von der Zelllinie und deren Aktivitätszustand ist, z.B. Strukturproteine oder sogenannte „housekeeping genes“ wie das für den Stoffwechsel essentielle Enzym GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase). Für dieses Gen waren in der AG Klobek bereits die Forward Primer GAPDH-1 und -3 und die Reverse Primer GAPDH-2 und -4 vorhanden (siehe Abb. 41).

Zur Untersuchung der Transkriptionslevel von TOP3B und PRAMEL in B- und non-B-Zellen wurde mRNA der B-Zelllinien MN 60, BJAB, REH und der non-B-Zelllinien MOLT-4 und HL 60 extrahiert und revers transkribiert (zur Durchführung siehe Kap. 2.2.4). Basierend auf der resultierenden cDNA wurden verschiedene Primer-Kombinationen in unterschiedlichen Bedingungen in RT-PCR Reaktionen getestet, für TOP3B z.B. die Kombinationen TOP-1/-2, TOP-3/-4, TOP-5/-6, TOP-1/-4, TOP-1/-6, TOP-3/-2, TOP-3/-4 und TOP-5/-4. Kombinationen innerhalb eines Exons (z.B. TOP-5/-6 und TOP-5/-4), wurden außer Acht gelassen, aus den restlichen wurde das Primerpaar mit der deutlichsten Bande gewählt. Für TOP3B erwies sich die Kombination TOP-3/-2, welche ein 262 bp langes PCR-Produkt ergibt, als ideal, für PRAMEL die Kombination PRAMEL-3/-4, welche in einem 922 bp langen Amplifikat resultiert, und für GAPDH das Primerpaar GAPDH-1/-2 sowie GAPDH-1/-4, welche ein 1053 bp bzw. 822 bp langes Produkt ergeben (siehe Abb. 41 und Abb. 42).

### **3.6.2 Ergebnisse der RT-PCR zu TOP3B und PRAMEL in B-Zelllinien**

RT-PCR-Reaktionen wurden mit cDNA der Zelllinien MN 60, BJAB, REH, MOLT-4 und HL 60 und den genannten Primerpaaren (TOP-3/-2, PRAMEL-3/-4 und GAPDH-1/-4) durchgeführt. Dabei wurde jeweils die gleiche Menge an cDNA eingesetzt. Nach abgeschlossener RT-PCR wurde die gleiche Menge des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen.



**Abb. 42: Expression von PRAMEL, TOP3B und GAPDH in verschiedenen Zelllinien.** Basierend auf RNA der Zelllinien MN 60, BJAB, REH, MOLT-4 und HL 60 wurde mittels RT-PCR die Expression von PRAMEL (P), TOP3B (T) sowie GAPDH (G) als Kontrolle getestet. Für PRAMEL wurden die Primer PRAMEL-3 und -4, für TOP3B TOP-3/-2 und für GAPDH GAPDH-1 und -4 verwendet. M XVI ist der DNA-Längenmarker.

Es zeigten sich erwartungsgemäß vergleichbare GAPDH-Banden und damit eine vergleichbare GAPDH-Expression in allen Zelllinien. Die teils vorhandenen zusätzlichen Banden von ca. 300 bzw. 1700 bp Länge sind vermutlich durch alternatives Spleißen bedingt. Hinsichtlich TOP3B war bei HL 60 eine geringfügig reduzierte TOP3B Expression zu erkennen (siehe Abb. 42). Ein deutlicher Unterschied hingegen zeigte sich hinsichtlich der Transkription von PRAMEL. Während in den non-B-Zelllinien MOLT-4 und HL 60 sowie auch in der prä-B-Zelllinie REH keinerlei PRAMEL-Transkription nachweisbar war, war diese bei MN 60 und BJAB deutlich erkennbar (siehe Abb. 42), was eine Korrelation der Transkription von PRAMEL mit dem Aktivierungszustand des  $Ig\lambda$ -Locus vermuten lässt: in B-Zelllinien mit offenem, transkriptionell aktivem  $Ig\lambda$ -Locus, sind PRAMEL Transkripte nachweisbar (MN 60, BJAB), in non-B-Zelllinien mit inaktivem  $Ig\lambda$ -Locus hingegen nicht (MOLT-4, HL 60); nur die Abwesenheit von PRAMEL Transkripten in der B-Zelllinie REH scheint dieser Hypothese zu widersprechen. Allerdings handelt es sich bei REH um eine B-Zelllinie im prä-B-Zell Stadium, in welchem noch keine V-Umlagerung erfolgt ist und der  $V_\lambda$  Locus heterochromatisch verpackt vorliegt. Dies legt die Vermutung nahe, die Transkription von PRAMEL korreliere eher mit dem Aktivierungszustand des  $V_\lambda$ -Bereichs als mit jenem des gesamten  $Ig\lambda$ -Locus, was aufgrund der Überlappung von PRAMEL mit  $V_\lambda$  plausibel scheint. Damit würde es erst im Stadium der reifen B-Zelle, nach vollständig erfolgter  $Ig\lambda$ -Umlagerung, zur PRAMEL-Transkription kommen. Welche Funktion diese Transkripte haben bzw. ob diese in B-Zellen eine Rolle spielen, ist bisher allerdings noch nicht geklärt.

Was die TOP3B Expression betrifft, so zeigen sich (bis auf die etwas reduzierte Expression in HL 60) keine nennenswerten Unterschiede. Dies bestätigt eine vom Aktivierungszustand des  $Ig\lambda$ -Locus unabhängige Expression, welche durch die Insulator/Boundary Funktion der HSS 5'1 und 5'6 gewährleistet werden könnte.

## 4 DISKUSSION

Die genaue Regulation der gewebs- und entwicklungsspezifischen Expression der Immunoglobulin-Gene ist bis heute nicht vollständig geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bereich stromaufwärts des humanen  $Ig\lambda$ -Locus auf neue regulatorische Elemente, insbesondere im Sinne einer 5' Domänengrenze, untersucht. Mittels limitierter *in vivo* DNase I Spaltungen wurden im 44kb umfassenden Bereich sieben HSS identifiziert, darunter zwei, welche *in vivo* CTCF-Bindungsstellen beinhalten (Kim et al., 2007) und für welche wir in Reporterassays Barriere- bzw. Enhancer-blockierende Effekte nachweisen konnten.

### 4.1 Kritische Auseinandersetzung mit den verwendeten Methoden

Diese durch Experimente gewonnenen Erkenntnisse müssen im Kontext der verwendeten Methoden betrachtet werden, denn jede experimentelle Vorgehensweise ist ein artifizielles Konstrukt, welches nicht die tatsächliche *in vivo* Situation wiedergeben und zu Artefakten führen kann. Aus diesem Grunde sollen die verwendeten Methoden, vor allem die DNase I Hypersensitivitätsassays und die CFAs, diskutiert werden.

#### 4.1.1 Die DNase I Hypersensitivitätsassays und Alternativen zur Suche nach regulatorischen Elementen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die limitierte *in vivo* DNase I Spaltung für die Suche nach regulatorischen Elementen 5' des  $Ig\lambda$ -Locus gewählt. Diese Methode, welche auf der „Accessibility“-Hypothese beruht (siehe Kap. 2.2.10 und 3.2.1) (Gross and Garrard, 1988), ist gut geeignet zum systematischen Screening größerer Regionen (Asenbauer and Klobeck, 1996). Alternative Ansätze, wie die direkte funktionelle Testung von DNA-Fragmenten in Reporterassays, welche bereits u.a. zur Identifikation von transkriptionellen Enhancer-Elementen im Bereich der Immunoglobulin-Loci führten (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983), sind angesichts der Länge der zu untersuchenden Region sehr aufwendig und nicht sinnvoll, insbesondere nachdem Fragmente in unterschiedlichen Positionen in Bezug auf die Reportergene geprüft werden müssten (wie Enhancer-Block oder Barriere-Position, siehe Kap. 3.4.2.1), was den Aufwand nochmals potenzieren würde. Ein weiterer Nachteil dieser Methode wäre, dass Elemente, welche z.B. synergistisch mit anderen zusammen wirken, nicht erkannt werden könnten.

Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre, basierend auf vorhandenen Datenbanken zu DNA-bindenden Proteinen und deren Konsensussequenzen, *in silico* DNA-Abschnitte auf potentielle Bindungssequenzen zu screenen und diese in einem nächsten Schritt experimentell zu validieren (Ding et al., 2010). DNA-bindende Proteine wie z.B. CTCF können allerdings

sehr variable Konsensussequenzen haben (siehe Abb. 24). Zudem können ähnliche DNA-Sequenzen je nach zellulärem Kontext verschiedene *trans*-aktive Faktoren binden, so dass letztlich eine initiale *in silico* Analyse längerer DNA-Abschnitte zu einer sehr unübersichtlichen Datenmenge führen würde. Des Weiteren würde eine primäre *in silico* Analyse die DNA unabhängig von ihrer Zugänglichkeit für *trans*-aktive Faktoren betrachten und könnte damit potentiell relevante regulatorische Elemente nicht von irrelevanten unterscheiden. Damit ist eine primäre *in silico* Analyse längerer DNA-Abschnitte ohne Kenntnisse der Chromatinstruktur nicht direkt zielführend.

Eine andere Methode zur Identifikation von Proteinbindungsstellen ist die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) (Kuo and Allis, 1999; Orlando, 2000), die z.B. zur genomweiten Kartierung von *in vivo* CTCF-Bindungsstellen verwendet wurde (Kim et al., 2007). Diese Methode basiert auf der Formaldehyd-vermittelten Fixierung von DNA-Protein-Interaktionen *in vivo* und der anschließenden Ultraschall-vermittelten Spaltung des Chromatins in kleine Fragmente (Kuo and Allis, 1999; Orlando, 2000). Im Anschluss wird das Protein der Wahl, mit der daran bindenden DNA, durch spezifische Antikörper immunopräzipitiert und die DNA Sequenz analysiert: bei bekannten Bindungssequenzen mithilfe von spezifischen Primern (Das et al., 2004), bei unbekanntem Bindungssequenzen bzw. genomweiten Untersuchungen mithilfe von DNA-Microarrays als „ChIP-on-chip“ Untersuchung (Buck and Lieb, 2004). Allerdings wird durch diese Methode nur die *in vivo* Bindung eines bestimmten Proteins betrachtet. Zur funktions-unabhängigen Identifizierung von regulatorischen Elementen kann jedoch neben spezifischen non-Histonproteinen auch die Verteilung spezifischer Histonformen als Indikator für offenes Chromatin untersucht werden. So konnte mit Antikörpern gegen die acetylierten Histonproteine AcH3 (H3K9acK14ac) und AcH4 (H4K3ac6ac10ac14ac) im Rahmen von ChIP-Analysen gezeigt werden, dass Insulatoren/Boundaries stromabwärts des IgH Locus erst ab dem pro-B-Zell Stadium aktive Chromatinmodifikationen tragen (Garrett et al., 2005). Diese regulatorischen Elemente wurden allerdings initial im Rahmen von DNase I Hypersensitivitäts-Assays identifiziert und erst im Anschluss ChIP-Untersuchungen unterzogen (Garrett et al., 2005).

Allgemein wäre jedoch denkbar, zur Identifizierung von regulatorischen Elementen 5' des Igλ-Locus initial ChIPs mit Antikörpern gegen aktive Chromatinmarker durchzuführen und die gebundenen DNA Fragmente zu analysieren. Dafür wären jedoch DNA-Microarrays oder neue durchsatzstarke Sequenziermethoden wie „next generation sequencing“ im Sinne einer ChIP-Seq Untersuchung nötig. Zudem wäre diese experimentelle Herangehensweise nicht spezifischer oder genauer als die klassische Kartierung von DNase I hypersensitiven Elementen, die wir für diese Arbeit wählten. Diese Methode ist schon lange etabliert, hat sich

über die Zeit bewährt und erlaubt, in jedem zellulären Kontext, *cis*-aktive Elemente aufgrund ihrer offenen Chromatinstruktur *in vivo* und Funktions-unabhängig zu identifizieren (Gross and Garrard, 1988). Damit ist sie meistens immer noch das Mittel der Wahl auf der Suche nach unbekanntem regulatorischen Elementen. Hinzu kommt die umfassende Erfahrung der AG Klobeck mit dieser Methode (Asenbauer and Klobeck, 1996) und die relativ preisgünstige Durchführbarkeit. Im Bereich der Immunglobulin-Loci konnten mit dieser Methode bereits diverse regulatorische Elemente identifiziert werden, u.a. die von Hildegard Asenbauer identifizierten HSS 3' des humanen I $\gamma$ -Locus (Asenbauer et al., 1999; Asenbauer and Klobeck, 1996) sowie viele andere Enhancer, Promotoren, Insulatoren, Silencer oder LCRs in Immunglobulin-Loci (Garrett et al., 2005; Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995) - und nicht zuletzt auch die im Rahmen dieser Arbeit kartierten HSS 5' von I $\gamma$ .

Einige Einschränkungen sind jedoch nennenswert. Zum einen erlaubt der Nachweis einer HSS keinerlei Rückschlüsse auf deren Funktion, so dass stets funktionelle Reporter- oder DNA-Bindungs-Versuche nötig sind, um Aufschluss über die Funktion oder die bindenden *trans*-aktiven Faktoren zu erhalten. Zudem sind DNase I hypersensitive Bereiche in offenem Chromatin schwer von lediglich DNase I sensitiven Regionen zu unterscheiden. Des Weiteren können gerade sehr schwache HSS leicht für Artefakte gehalten werden und umgekehrt. Darüber hinaus kommt es auch unter optimalen Voraussetzungen bei der Kartierung zu Ungenauigkeiten von mindestens +/- 50 bp (Gross and Garrard, 1988). Selbst unter Verwendung von überlappenden Restriktionsfragmenten und mehreren DNA-Sonden pro Fragment können Ungenauigkeiten zwar minimiert werden, eine genaue Kartierung auf das Basenpaar kann jedoch nicht erfolgen. Durch Markierung und anschließende Sequenzierung von DNase I- gespaltenen Fragmenten könnte die Genauigkeit erhöht werden (Thurman et al., 2012), ebenso wie mithilfe von *in vivo*-Footprinting Experimenten, wie sie in der AG Klobeck zur Feinkartierung von Proteinbindungsstellen innerhalb von HSS angewandt wurden (Combriato and Klobeck, 2002; Kraißer, 2002). Solche Analysen wären sicherlich auch für die HSS 5'1 bis 5'6 sinnvoll, um die Lage der *cis*-aktiven Elemente und der daran bindenden *trans*-aktiven Faktoren genauer zu bestimmen.

#### **4.1.2 Kritische Auseinandersetzung mit den Colony-Forming-Assays**

Die Prüfung der HSS 5'1 und 5'6 auf Enhancer-Block-, Silencer- oder Barriere-Funktionen erfolgte mittels CFAs in HeLa Zellen, und damit einer Zelllinie, in welcher der I $\gamma$ -Locus nicht aktiv ist. Nachdem diese HSS allerdings *in vivo* CTCF-Bindungsstellen entsprechen, welche in humanen Fibroblasten nachgewiesen wurden (Kim et al., 2007), kann von einer funktionellen Relevanz über den B-Zell Kontext hinaus ausgegangen werden.

Nichtsdestotrotz könnten dieselben *cis*-aktiven Elemente, gerade bei mehreren funktionellen Untereinheiten, in B- und non-B-Zellen unterschiedliche Funktionen haben, welche z.B. durch spezifische Transkriptionsfaktoren bedingt sind. Eine Prüfung der regulatorischen Elemente im physiologischen B-Zell Kontext war u.a. aufgrund der geringen Transfektionseffizienz von B-Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchführbar (vergleiche Kapitel 3.4.3.1). Eine weitere Einschränkung des gewählten Modells ist die Abhängigkeit der Wirkung regulatorischer Elemente von der Art des interagierenden Enhancers oder Promotors. Derselbe Enhancer kann in Kombination mit verschiedenen Promotoren zu sehr unterschiedlichen Transkriptionsraten führen (Asenbauer et al., 1999), so dass auch Enhancer-Blocker oder Silencer je nach Enhancer/Promotor variierende Funktion zeigen könnten. Aufgrund ihrer Gewebsspezifität konnten I $\gamma$ -Enhancer und -Promotor allerdings nicht in HeLa-basierten CFAs eingesetzt werden, so dass die viralen SV40-Elemente, welche zu einer guten Expression in HeLa führen (Regnier, 2011), eingesetzt wurden. Allerdings sind unterschiedliche Wirkungen der HSS auf den SV40- und den I $\gamma$ -Enhancer nicht auszuschließen. Die ideale Konstellation wäre die Prüfung einer HSS im Zusammenspiel mit den *in vivo* relevanten regulatorischen Elementen im jeweiligen zellulären Kontext, wie sie u.a. hinsichtlich des Insulators HS4 im  $\beta$ -Globin Locus durchgeführt wurde (Chung et al., 1997; Chung et al., 1993). Diese HSS zeigte bei Insertion zwischen Erythroid-spezifischem Enhancer und Promotor in K562, einer Erythroleukämie-Zelllinie, Enhancer-blockierende Eigenschaften in CFAs (Burgess-Beusse et al., 2002; Chung et al., 1997; Chung et al., 1993), wobei jedoch nicht klar ist, ob die HS4 sich *in vivo* funktionell tatsächlich auf den gewählten Enhancer bzw. Promotor bezieht.

Neben dem zellulären Kontext und den interagierenden Elementen muss auch die Anordnung der HSS innerhalb der Reportergerkonstrukte betrachtet werden. In den durchgeführten CFA's wurden zur Prüfung der Barriere-Funktion jeweils beidseits von HSS flankierte Konstrukte eingesetzt (siehe Kap. 3.4.2.1 sowie Abb. 29 und 30), was zwar sinnvoll ist, da sich heterochromatische Inaktivierung von beiden Seiten auf das Reporterger ausbreiten kann; was aber nicht die *in vivo* Situation im I $\gamma$ -Locus widerspiegelt. Dieser ist mit 911 kb unvergleichbar länger und komplexer und enthält verschiedene regulatorische Elemente 5' und 3' des Locus, so dass nicht direkt vom CFA auf die Rolle der HSS *in vivo* geschlossen werden kann. Falls die Funktion der untersuchten CBS außerdem von der Bildung von CTCF-vermittelten Chromatinschleifen abhängt, kann diese über Reportergerkonstrukte, welche nicht im Umfeld des I $\gamma$ -Locus integriert sind, möglicherweise auch nicht nachvollzogen werden.

Ein weiterer Punkt, der bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte, ist die mögliche intrinsische Boundary-Aktivität eines Enhancers. Mit Einsatz des SV40 Enhancers kam es in den CFAs zu einer Steigerung der Kolonienzahl um das 5-fache (siehe Abb. 31 bis 34), welche bei Flankierung mit der HSS 5'6 bzw. der CBS 13377 nur noch gering zunahm (siehe Abb. 33). Die initiale Enhancer-bedingte Zunahme der Kolonienzahl könnte dabei sowohl durch die rein transkriptionelle Enhancer-Aktivität als auch durch eine gewisse Boundary-Funktion bedingt sein. Eine solche Funktion wäre im Kontext des SV40 Virus beispielsweise sinnvoll, um die virale DNA vor Silencing zu schützen. Ähnliche intrinsische Boundary-Aktivitäten sind bereits für einige primär die Transkription regulierende Elemente wie den  $\beta$ -Globin Promotor oder Hox Promotoren beschrieben (Bulger and Groudine, 1999; Chopra et al., 2009). Eine durch den SV40 Enhancer ausgeübte Barriere-Aktivität könnte daher den Boundary-Effekt von HSS 5'6 artifiziell niedrig erscheinen lassen. Nichtsdestotrotz zeigen die durchgeführten CFAs eine Barriere- und Enhancer-Block-Funktion der CBS 13377, eine Silencer-Funktion von 13376 und eine Enhancer-Block-Funktion von 13376s (siehe Kapitel 3.4.4.1 und 3.4.4.2). Basierend auf dem ubiquitären Vorkommen der HSS und der *in vivo* Bindung des ubiquitären CTCF-Proteins in Fibroblasten, ist daher anzunehmen, dass CTCF in B-Zellen in gleicher Weise an die HSS bindet und ähnliche Wirkungen ausübt, auch wenn Zellkontext-abhängige Modifikationen denkbar oder gar wahrscheinlich sind.

## **4.2 Korrelation der kartierten HSS mit genomweiten CBS und HSS-Screenings**

### **4.2.1 Korrelation mit dem genomweiten Screening von *in vivo* CTCF-Bindungsstellen**

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine genomweite Kartierung von *in vivo* CTCF-Bindungsstellen veröffentlicht (siehe Kap. 3.3), welche mithilfe der ChIP-on-chip Methode in humanen Fibroblasten 13.804 CBS nachweisen konnte (Kim et al., 2007). Diese Ergebnisse fanden Eingang in die Gestaltung der Experimente, da die beiden CBS 13376 und 13377 mit den von uns identifizierten HSS 5'1 bzw. 5'6 kolokalisieren. Auch wenn eine CBS in Fibroblasten nicht zwingend auf eine tatsächliche *in vivo* CTCF-Bindung in Lymphozyten oder HeLa-Zellen rückschließen lässt, ist bei nachgewiesener DNase I Hypersensitivität zumindest von einer Zugänglichkeit für CTCF auszugehen, weswegen diese Ergebnisse bei der Auswahl jener HSS, welche funktionell auf Insulator/Boundary Effekte geprüft werden sollten, hilfreich waren (siehe Kap. 3.3).

#### 4.2.2 Korrelation mit der genomweiten Kartierung von DNase I - HSS

Nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit erschien eine Publikation zur genomweiten Kartierung von DNase I hypersensitiven Bereichen (Thurman et al., 2012). Verschiedene Arbeitsgruppen, v.a. aus den USA, hatten 125 unterschiedliche Zelltypen (darunter Primärzellen, immortalisierte Primärzellen, etablierte Zelllinien sowie pluripotente Vorläuferzellen) genomweit auf HSS untersucht und so  $2,9 \times 10^6$  humane HSS identifiziert. Dabei kam eine Abwandlung der klassischen HSS Kartierung zum Einsatz, welche einen großen Durchsatz erlaubt: nach *in vivo* DNase I Behandlung wurde die gespaltene DNA aus den Zellen isoliert, mit einem Linker verknüpft und mittels „massive parallel sequencing“ (eine neue Sequenziermethode, die einen hohen DNA-Durchsatz erlaubt) sequenziert und schließlich nach verschiedenen Algorithmen computerbasiert ausgewertet (Boyle et al., 2008; Thurman et al., 2012). Unter den identifizierten 2.890.742 HSS konnten 970.100 in nur einem Zelltyp nachgewiesen werden, 1.920.642 HSS waren in mindestens 2 Zelltypen vorhanden und lediglich 3.692 waren in allen untersuchten Zellarten nachweisbar (Thurman et al., 2012). Zur Validierung dieses Ansatzes wurden über 7000 der identifizierten HSS durch klassische, Southern Blot-basierte, DNase I Experimente bestätigt. Die gefundenen HSS umfassen quasi alle bisher bekannten und experimentell validierten *cis*-regulatorischen Elemente – sowie eine noch größere Menge unbekannter Sequenzen (Thurman et al., 2012).

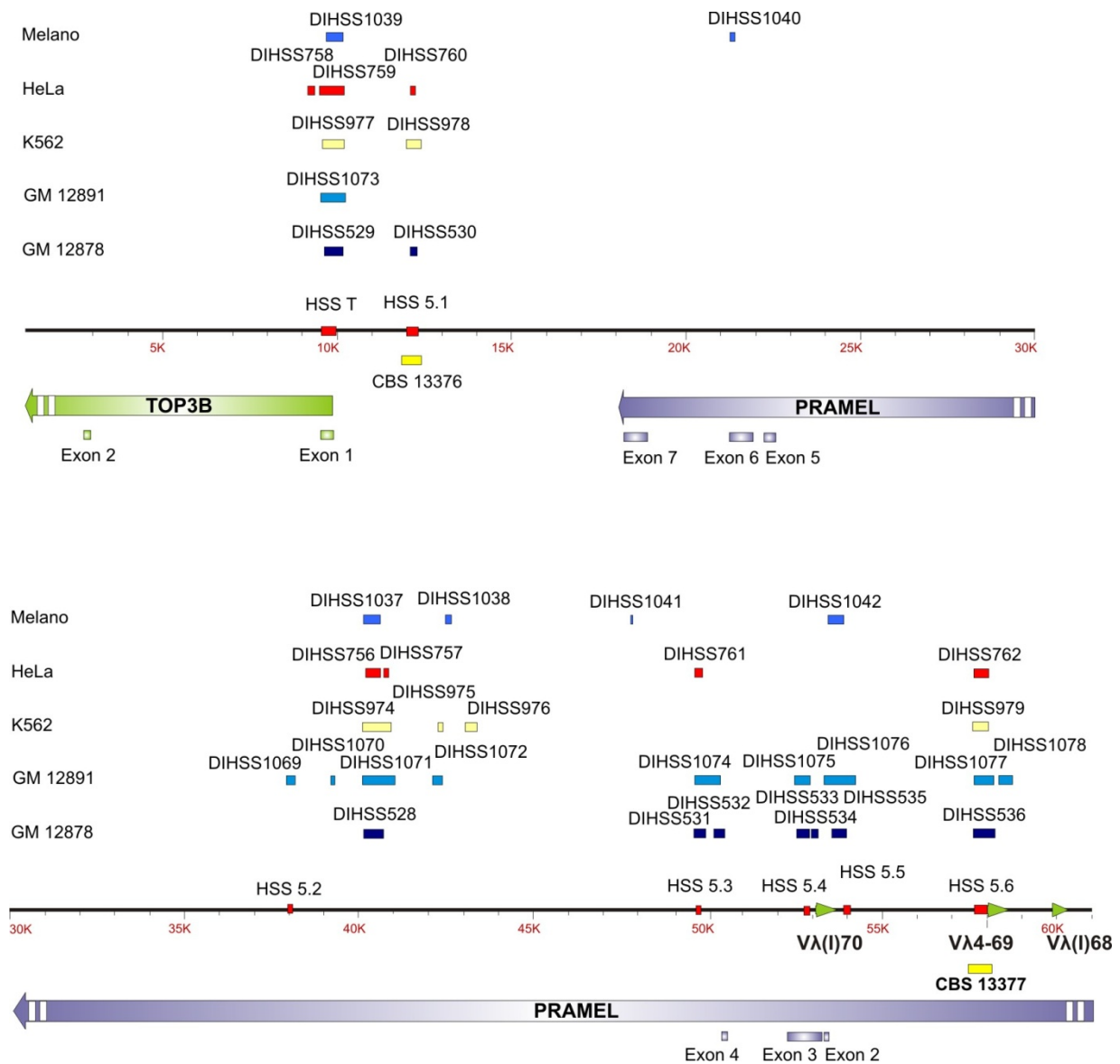
Bei Abgleich der von uns gefundenen HSS mit den HSS-Sequenzen einiger Zelllinien (B-lymphoide und myeloische Zelllinien, HeLa sowie Melanozyten) stellten wir erfreulicherweise große Übereinstimmungen fest. Jede von uns identifizierte HSS war in mehreren anderen Zelllinien nachweisbar (siehe Abb. 43) und umgekehrt wurden keine HSS in mehreren Zelllinien nachgewiesen, welche nicht auch im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden (siehe Abb. 43), was unsere Ergebnisse und die ausreichende Sensitivität und Spezifität unserer methodischen Herangehensweise bestätigt. Vergleicht man die, durch das genomweite Screening, identifizierten HSS mit der genom-weiten Kartierung von CBS, ergeben sich ebenfalls Überschneidungen: wie zu erwarten, entspricht nicht jede HSS einer CBS, aber jede CBS einer HSS (siehe Abb. 43).

Im Folgenden werden die HSS einzeln betrachtet. Die in unseren Versuchen ubiquitär vorhandene HSS T, der Topoisomerase-Promotor, ist auch in allen fünf betrachteten Zelllinien nachweisbar: sie entspricht der DIHSS 529 (DNase I HSS Nummer 529) in der B-lymphoblastoiden Zelllinie GM12878, DIHSS 1073 in der ebenfalls B-lymphoblastoiden Zelllinie GM12891, DIHSS 977 in der myeloischen Zelllinie K562, DIHSS 759 in HeLa und DIHSS 1039 in Melanozyten (Melano) (siehe Abb. 43 und Tab. 8). Die HSS 5'1, welche der CBS 13376 entspricht, kolokalisiert mit den HSS DIHSS 530 in GM12878, DIHSS 978 in



K562 und DIHSS 760 in HeLa, während diese HSS in der anderen B-lymphoblastoiden Zelllinie GM12891 und in Melanozyten nicht nachweisbar war (siehe Abb. 43 und Tab. 8). Die genannten HSS sind, je nach Zelllinie, unterschiedlich lang, liegen aber alle innerhalb der CBS 13376 und enthalten jeweils die CTCF-Konsensussequenz (siehe Abb. 43).

HSS 5'2, in unseren Versuchen nur schwach erkennbar, entspricht der DIHSS 1069 in der B-Zelllinie GM12891. Allerdings zeigen sich in enger Nachbarschaft zu HSS 5'2 HSS in allen Zelllinien. In GM12891 befinden sich neben der DIHSS 1069 weiterhin die DIHSS 1070 bis 1072 im Bereich der HSS 5'2, in GM12878 die DIHSS 528, DIHSS 974 bis 976 in K562, DIHSS 756 und 757 in HeLa, und DIHSS 1037 bis 1038 in Melanozyten (siehe Abb. 43 und Tab. 8). Möglicherweise sind auch in einigen der von uns untersuchten Zelllinien mehrere HSS in diesem Bereich vorhanden; aufgrund der geringen Signalintensität konnten diese aber im Rahmen unserer DNase I Assays nicht identifiziert werden (vgl. Abb. 18 und 19).



**Abb. 43: Korrelation der identifizierten HSS mit den HSS des genomweiten Screens.** Dargestellt ist die Lokalisation der von uns kartierten HSS (rot), sowie die im Rahmen des genomweiten Screens in Melanozyten

(blau), HeLa (rot), K562 (gelb), GM 12891 (blau) und GM 12878 Zellen (dunkelblau) nachgewiesenen HSS (nach Thurman et al., 2012). Zudem ist die Lokalisation der beiden CBS 13376 und 13377 dargestellt. Die Gene TOP3B und PRAMEL mit ihren in diesem Bereich liegenden Exons sind zu sehen, ebenso wie die ersten drei  $V\lambda$ -Gene.

Die HSS 5'3, weniger als 5 kb stromaufwärts des ersten  $V\lambda$  Pseudogens, entspricht DIHSS 531 in GM12878, DIHSS 1074 in GM12891 sowie DIHSS 761 in HeLa, während sie in K562 und Melanozyten nicht vorhanden ist (siehe Abb. 43 und Tab. 8). Die in unseren Versuchen B-Zell spezifische HSS 5'4, welche sich unmittelbar vor dem ersten  $V\lambda$  Pseudogen  $Ig\lambda_{V(1)-70}$  befindet, ist im genomweiten Screening tatsächlich auch nur in B-Zelllinien nachweisbar und entspricht den beiden sehr dicht beieinander liegenden DIHSS 533 bzw. DIHSS 534 in GM12878, sowie der DIHSS 1075 in GM12891, während sie in K562, HeLa oder Melanozyten kein Korrelat findet (siehe Abb. 43 und Tab. 8). HSS 5'5, unmittelbar stromabwärts von  $Ig\lambda_{V(1)-70}$  gelegen und in unseren Versuchen auch B-Zell spezifisch, ist wiederum auch in den B-Zelllinien nachweisbar: (DIHSS 535 in GM12878 und DIHSS 1076 in GM12891), daneben aber auch in Melanozyten (DIHSS 1042 in Melano), nicht jedoch in HeLa oder K562 (siehe Abb. 43 und Tab. 8).

5' $Ig\lambda$	GM12878	GM12891	K562	HeLa	Melano
HSS T	DIHSS 529	DIHSS 1073	DIHSS 977	DIHSS 759	DIHSS 1039
HSS 5'1	DIHSS 530		DIHSS 978	DIHSS 760	
HSS 5'2		DIHSS 1069			
HSS 5'3	DIHSS 531	DIHSS 1074		DIHSS 761	
HSS 5'4	DIHSS 533/4	DIHSS 1075			
HSS 5'5	DIHSS 535	DIHSS 1076			DIHSS 1042
HSS 5'6	DIHSS 536	DIHSS 1077	DIHSS 979	DIHSS 762	

**Tab. 8: Die identifizierten HSS 5' von  $Ig\lambda$  und ihre Korrelate in anderen Zelllinien nach (Thurman et al., 2012).**

Die HSS 5'6, unmittelbar stromaufwärts des ersten funktionellen  $V\lambda$  Gens  $Ig\lambda_{V4-69}$  gelegen, entspricht der CBS 13377 sowie den HSS DIHSS 536 in GM12878, DIHSS 1077 in GM12891, DIHSS 979 in K562 und DIHSS 762 in HeLa, während sie in Melanozyten nicht nachweisbar ist (siehe Abb. 43 und Tab. 8). Diese genannten HSS sind in etwa gleich lang und liegen alle beinahe vollständig innerhalb der Sequenz der CBS 13377 (siehe Abb. 43).

Hinsichtlich der Funktionen konnten wir für HSS 5'1 und 5'6 (CBS 13376 und 13377) eine Silencer bzw. Barriere-Funktion zeigen (siehe Kap. 3.4.4 und 4.5). Die HSS 5'2, 5'3, 5'4 und 5'5 hingegen, welche keiner CBS entsprechen, haben vermutlich anderweitige Funktionen, entweder in Zusammenhang mit  $Ig\lambda$  oder mit den dazwischen oder stromaufwärts lokalisierten, anderweitigen Genen (siehe auch Kap. 4.4 und 4.5). Da die genomweite CBS-Kartierung, im Gegensatz zur genomweiten HSS-Analyse, in nur einer Zellart durchgeführt

wurde, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die anderen HSS dennoch (zelltypspezifische) CBS enthalten. Gerade im unmittelbaren Umfeld des  $Ig\lambda$ -Locus könnten sich B-Zell-spezifische CBS befinden, welche erst während der Öffnung des Locus oder im Laufe der V(D)J-Rekombination für CTCF zugänglich werden. Nachdem jedoch auch die *in silico* Analyse der HSS-Sequenzen mithilfe der CTCFBSDB (Bao et al., 2008) keinen Hinweis auf CTCF-Konsensussequenzen innerhalb dieser HSS lieferte, ist eine CTCF-unabhängige Funktion für diese HSS wesentlich wahrscheinlicher.

### 4.3 Die Regulation der Immunoglobulinexpression und V(D)J-Rekombination durch CBS und andere regulatorische Elemente

Um die mögliche Rolle der gefundenen HSS und CBS hinsichtlich der Regulation des  $Ig\lambda$ -Locus besser diskutieren zu können, werden zunächst bekannte Funktionen von CTCF, entsprechenden CBS und anderweitigen regulatorischen Elementen in der Regulation der Immunoglobuline dargestellt.

Was CTCF betrifft, so sind die Funktionen dieses Proteins hinsichtlich der Regulation der Immunoglobulin-Loci vielfältig. Zum einen sind CBS als klassische Enhancer-Block oder Barriere-Elemente an einigen Enden der Loci beschrieben, wie z.B. innerhalb der HSS 5 und HSS 6 stromabwärts des humanen  $Ig\lambda$ -Locus (Nagel, 2009; Regnier, 2011). Darüber hinaus ist CTCF über die Bildung von Chromatinschleifen und die Vermittlung der Locuskontraktion auch an der Regulation der V(D)J-Rekombination beteiligt (Chaumeil and Skok, 2012) (siehe auch Kap. 1.4).

Der 2,7 Mb umfassende murine  $IgH$ -Locus, welcher als der am besten charakterisierte  $Ig$ -Locus im Folgenden exemplarisch beschrieben wird, beinhaltet den  $E\mu$  Enhancer, welcher in einem Intron zwischen den  $J_H$  Elementen und  $C\mu$  gelegen ist, die Zugänglichkeit des  $J_H$  Bereichs reguliert, und so auf die  $V_H$ - $DJ_H$  Verknüpfung Einfluss nimmt (Afshar et al., 2006; Chakraborty et al., 2009; Perlot et al., 2005; Serwe and Sablitzky, 1993). Unmittelbar stromabwärts des letzten  $C_H$ -Elements, befindet sich mit der 3' regulatorischen Region (3<sub>RR</sub>) ein weiterer Enhancer-Komplex, der aus den HSS hs3A, hs1,2, hs 3B und hs4 besteht (Khamlichi et al., 2000; Michaelson et al., 1995; Pinaud et al., 2011) und neben der Expression auch die Klassenswitch-Rekombinationen der  $IgH$ -Gene reguliert (Pinaud et al., 2001; Pinaud et al., 2011). Im Laufe der B-Zellentwicklung zeigen sich, beginnend mit hs4, aktive Chromatinmodifikationen im Bereich der 3<sub>RR</sub> (H3 und H4 Acetylierungen und H3K4 Dimethylierungen), welche in reifen B-Zellen bestehen bleiben (Garrett et al., 2005; Giannini et al., 1993). Weiter distal davon liegen mit hs5, hs6 und hs7 weitere HSS (Garrett et al., 2005), welche zusammen mit hs4, unter dem Einfluss des B-Zell Transkriptionsfaktors Pax5,

bereits ab dem pro-B Zellstadium (zeitlich vor den proximalen hs1-hs3) eine offene Chromainstruktur aufweisen (Giambra et al., 2008). Mehrere dieser Elemente (hs4, hs5 und hs6) enthalten *in vivo* bestätigte CBS (Garrett et al., 2005) und führten bei Deletion (hs5-7) im Mausmodell zu einer geringeren Locus-Kontraktion, einer vermehrten Beteiligung der proximalen V<sub>H</sub> Segmente an der V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub> Rekombination, und einer erhöhten Expression der 3' gelegenen Gene Hole und Rik1 (Volpi et al., 2012). Diese Konstellation ähnelt der Situation 3' des humanen Igλ-Locus: neben HSS 1-3, welche Enhancer-Funktion haben, folgen stromabwärts weitere HSS mit CBS und Enhancer-Block bzw. Barriere-Funktion (Asenbauer et al., 1999; Asenbauer and Klobeck, 1996; Nagel, 2009; Regnier, 2011).

Der murine IgH-Locus enthält neben den hs4-6 weitere CBS: in der 96 kb langen „intergenischen“ Region zwischen V<sub>H</sub> und D<sub>H</sub> befinden sich 6 HSS, darunter zwei mit nachgewiesener *in vivo* CTCF-Bindung und Enhancer-Block Funktion (Featherstone et al., 2010). Dieses HSS-Cluster wird Intergenic Control Region-1 (IGCR1) genannt, und ist, zusammen mit dem intronischen E<sub>μ</sub>-Enhancer, wichtig für eine reguläre V(D)J-Rekombination (Guo et al., 2011b). Funktionell führt die IGCR1, über Bindung von *trans*-aktiven Insulatorproteinen wie CTCF, innerhalb des IgH-Locus zur Bildung von Chromatinschleifen. Diese umfassen distal gelegene Enhancer, führen zugehörige regulatorische Elemente zusammen und tragen dazu bei, dass auch distal gelegene V<sub>H</sub> Segmente im Rahmen der Rekombination zum Einsatz kommen (Guo et al., 2011b). Die IGCR1 verhindert zudem die Chromatinöffnung der V<sub>H</sub> Region während der D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> Rekombination und damit eine vorzeitige V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub> Verknüpfung. Somit ist die IGCR1 mit CTCF-vermittelter Schleifenbildung wichtig für die geordnete V(D)J-Rekombination, die Aufrechterhaltung der Antikörper-Diversität, und, via Feedback-Regulation, auch für die allelische Exklusion (Guo et al., 2011b). Mittels CTCF ChIP-on-chip wurden, neben den CBS in der IGCR1 und der 3<sub>RR</sub>, 53 weitere CBS innerhalb der V<sub>H</sub> Region des murinen IgH-Locus identifiziert, welche wahrscheinlich über Locus-Kontraktion und Schleifenbildung auf die Rekombination Einfluss nehmen (Degner et al., 2009).

Andere Immunoglobulinloci sind weniger gut untersucht, CBS scheinen jedoch allgemein nach demselben Prinzip die V(D)J-Rekombination zu regeln. Im murinen Igκ-Locus konnten mittels ChIP-on-chip, je nach Entwicklungsstadium der B-Zelle, bis zu 11 CBS (in pre-B Zellen) in der V<sub>κ</sub> Region identifiziert werden, daneben eine CBS im intronischen Silencer sis (zwischen V<sub>κ</sub> und J<sub>κ</sub>) sowie eine CBS am 3' Ende des Locus, welche an Schleifenbildung und der Errichtung höherer Chromatinstrukturen beteiligt sind (Degner et al., 2009).

Betrachtet man zusammenfassend CBS im Immunoglobulin-Loci, finden sich darunter CBS mit Enhancer-Block Funktion (Featherstone et al., 2010; Garrett et al., 2005; Volpi et al.,

2012), sowie CBS die über CTCF und Cohesin eine Rolle bei der Locus-Kontraktion spielen und zur höhergradigen Chromatinstruktur beitragen (Degner et al., 2011; Degner et al., 2009; Guo et al., 2011a; Guo et al., 2011b; Merckenschlager and Odom, 2013). Dabei scheint CTCF zwar nicht unabdingbar für die V(D)J-Rekombination an sich, aber doch wichtig für die Beschränkung von Enhancer-Aktivitäten und den geordneten Ablauf der Rekombination zu sein (Chaumeil and Skok, 2012; Ribeiro de Almeida et al., 2011).

#### **4.4 Überblick über den Igl $\lambda$ -Locus und angrenzende Gene**

Regulatorische Elemente innerhalb und vor allem angrenzend an den Igl $\lambda$ -Locus können sich funktionell auf Igl $\lambda$  oder auf angrenzende bzw. mit Igl $\lambda$  überlappende Gene beziehen. Eine genaue Betrachtung des Igl $\lambda$ -Locus und seiner benachbarten Gene ist daher sinnvoll, um die Funktion der identifizierten HSS 5' von Igl $\lambda$  im Kontext interpretieren zu können.

##### **4.4.1 Stromauffwärts von Igl $\lambda$ gelegene Gene**

Das Gen TOP3B, welches 44 kb stromauffwärts des letzten V $\lambda$  Pseudogens lokalisiert ist, kodiert für eine Topoisomerase (vgl. Kap. 3.1 und 3.6) (Hanai et al., 1996). Diese hat die Aufgabe, durch Setzen und Wiederverknüpfen von DNA-Einzelstrangbrüchen im Rahmen der Transkription DNA-Supercoils zu lockern, wobei sie mit der DNA Helikase SGS1 interagiert (Ng et al., 1999). Zudem ist sie für die DNA Rekombination und die Aufrechterhaltung der Genomintegrität von Bedeutung (Ng et al., 1999). Es gibt 3 verschiedene Isoformen der TOP3B mit unterschiedlichen Gewebsspezifitäten und intrazellulären Lokalisationen: Isoform 1 ist im Nukleus nachweisbar und spielt eine Rolle bei der Chromosomensegregation, während Isoform 2 im Zytoplasma lokalisiert ist (Kobayashi and Hanai, 2001; Ng et al., 1999). Ein Ausschalten des Gens im Mausmodell führte zu Infertilität und Autoimmunität während einige Tumore eine Überexpression zeigen, welche mit einer gesteigerten Invasivität korreliert (Kwan et al., 2007; Kwan et al., 2003; Oliveira-Costa et al., 2010). Als regulatorisches Element, welches die Expression von TOP3B regelt, ist bisher nur der Promotor bekannt (Cho et al., 2004), welcher der von uns identifizierten HSS T entspricht.

Zwischen TOP3B und der V $\lambda$  Region, bzw. überlappend mit den ersten V $\lambda$ -Genen, liegt PRAMEL (preferentially expressed antigen in melanoma-like) mit 7 Exons. Wie bereits erwähnt, gibt es mehrere prozessierte, aber nicht Protein-kodierende Transkripte von PRAMEL ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), weswegen PRAMEL ein Pseudogen darstellt. Es gehört zur Gruppe der PRAME-like Proteine, die im Laufe der Evolution durch Genduplikation entstanden ist. Im Rahmen eines Screens wurden allein auf Chromosom 1 mehr als 22 PRAME-like Gene sowie 10 Pseudogene gefunden (Birtle et al., 2005). Bisher gibt es keine genaueren Erkenntnisse zur Funktion der PRAME-like Proteine. PRAMEL und PRAME-like

Proteine sind mit PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma) verwandt, welches interessanterweise ebenfalls auf Chromosom 22q11.22, innerhalb des  $Ig\lambda$ -Locus, liegt (Kawasaki et al., 1997) (siehe Abb. 44 und Kap. 4.4.2)

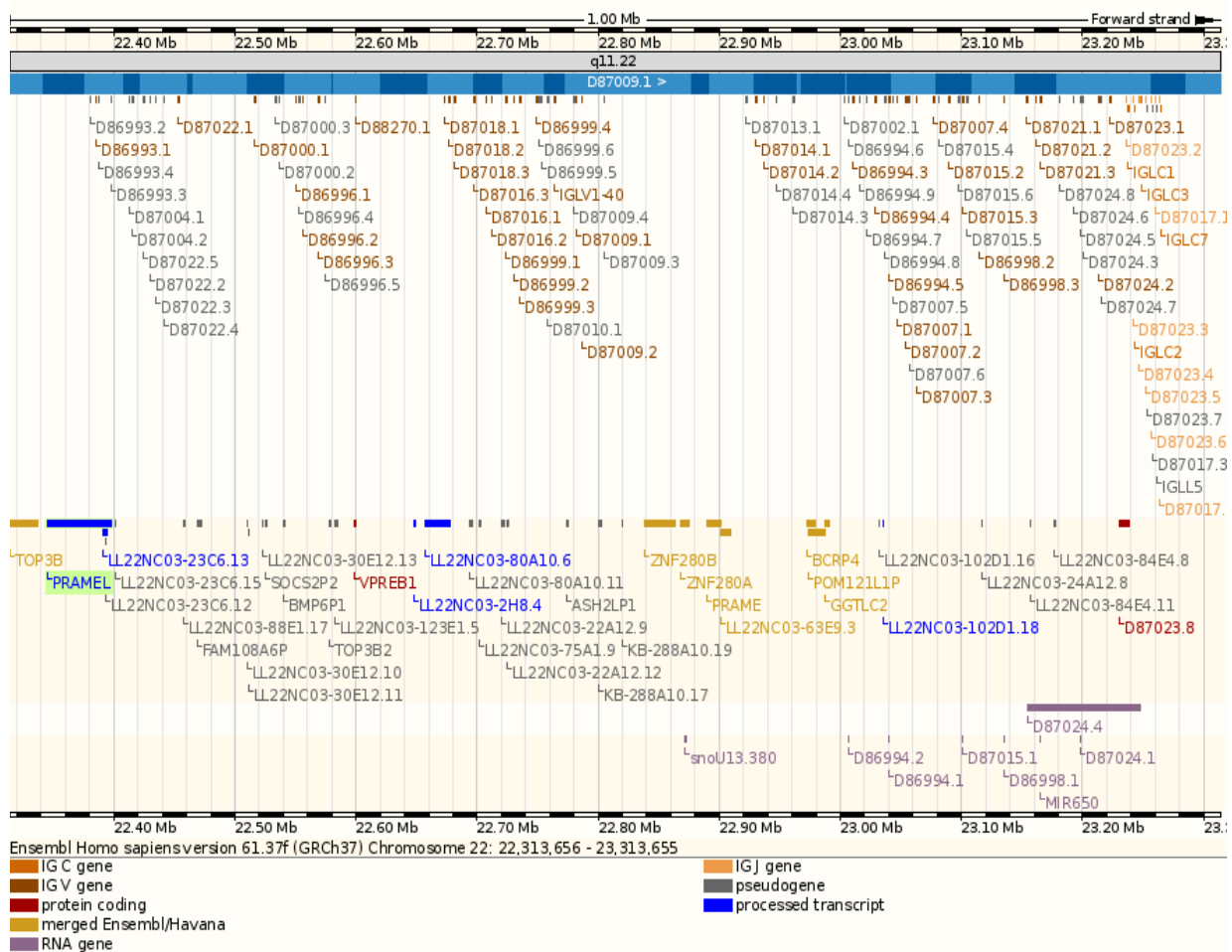
#### 4.4.2 Innerhalb des $Ig\lambda$ -Locus gelegene Gene

Die Struktur des  $Ig\lambda$ -Locus ist bereits durch die vielen funktionellen  $V_{\lambda}$ -,  $J_{\lambda}$ - und  $C_{\lambda}$ -Gene, die  $V_{\lambda}$ -,  $J_{\lambda}$ - und  $C_{\lambda}$ -Pseudogene und die jeweils zugehörigen *cis*-aktiven Elemente wie z.B. Rekombinationssignalsequenzen, sehr komplex. Hinzu kommen 3 Cluster repetitiver Alu-Elemente (siehe Abb. 44), andere repetitive Elemente und non-Immunoglobulin-Gene, die mitten im  $Ig\lambda$ -Locus lokalisiert sind (Kawasaki et al., 1997). Darunter finden sich viele Pseudogene, aber auch prozessierte Transkripte, protein-codierende Gene und auch microRNA-Gene wie die microRNA-650 (Das, 2009) (siehe Abb. 44). Unter den Pseudogenen ist besonders BCR4 (breakpoint cluster region 4) hervorzuheben, welches bei Translokationen und Rearrangements in Chromosom 22q11, welche bei Leukämien manchmal nachweisbar sind, involviert sein kann (Croce et al., 1987) (siehe Abb. 44).

Zu den protein-kodierenden non- $Ig\lambda$ -Genen gehört das VpreB-Gen (Bauer et al., 1988; Kawasaki et al., 1995) (siehe Abb. 44), welches für die Surrogat-Leichtkette kodiert, die B-Zell spezifisch exprimiert wird und zusammen mit der umgelagerten Immunoglobulin-Schwerkette in prä-B Zellen den prä-B-Zellrezeptor bildet (Kudo and Melchers, 1987).

Es befinden sich jedoch auch Gene innerhalb des  $Ig\lambda$ -Locus, die ein B-Zell unabhängiges Expressionsmuster zeigen. Darunter sind ZNF280A und ZNF280B, beides Zinkfingerproteine (Kawasaki et al., 1997), POM121L1, ein putatives Membranglykoprotein, GGTL2, eine  $\gamma$ -Glutamyl Transferase sowie PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma) (siehe Abb. 44). Letzteres gehört zu den Tumor-Hoden (Cancer-Testis) Antigenen und wurde ursprünglich in einem Melanompatienten identifiziert (Ikeda et al., 1997). Es ist in verschiedenen Tumoren überexprimiert, neben Melanomen auch in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Sarkomen und akuten Leukämien, während PRAME physiologischerweise nur in Hoden, Ovar, Nebennieren und Endometrium nachweisbar ist (van Baren et al., 1998; Wadelin et al., 2010). Funktionell ist PRAME ein Repressor des Retinsäurerezeptor Signalweges, hemmt Differenzierung und Apoptose und führt so zu Wachstumsvorteilen (Epping et al., 2005; Wadelin et al., 2010). Dieses Gen, das trotz seiner Lage inmitten des  $Ig\lambda$ -Locus weder in hämatopoetischen Vorläuferzellen noch im Laufe der B-Zellentwicklung exprimiert wird (Oehler et al., 2009), zeigt, wie wenig im Einzelfall das Umfeld von Genloci mit deren Expressionsmuster korreliert und wie genau letztlich die Expression einzelner Gene reguliert wird. Dabei ist die Regulation von PRAME

bisher kaum verstanden (Wadelin et al., 2010). Da das unmittelbare Umfeld von PRAME keine zu  $Ig\lambda$  gehörigen Gensegmente enthält, wäre denkbar, dass Insulator/Boundary Elemente über die Bildung eines Chromatinloops PRAME von  $Ig\lambda$  abgrenzen (siehe Abb.



44).

**Abb. 42. Überblick über den  $Ig\lambda$ -Locus und die darin enthaltenen Gene.** Dargestellt sind die einzelnen  $Ig\lambda$ -Gensegmente ( $V\lambda$ ,  $J\lambda$  und  $C\lambda$  im oberen Abschnitt in braun/orange, Pseudogene in grau), sowie innerhalb und stromaufwärts/stromabwärts gelegene Gene, darunter RNA-Gene (violett, unten), prozessierte Transkripte (blau) und protein-kodierende Gene (rot, Mitte) (aus [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Im Gegensatz dazu gibt es auch non- $Ig\lambda$ -Gene, wie z.B. das Gen für die microRNA-650, welche sich mit protein-kodierenden  $V\lambda$ -Exons überschneiden, was die Situation noch komplexer gestaltet. Diese microRNA ist im  $Ig\lambda$ -Locus in 9-facher Kopie vorhanden und überschneidet sich jeweils mit dem Leading Exon einer Untergruppe von  $V\lambda$ -Genen, wobei die microRNA und die  $V\lambda$ -Gene interessanterweise unter dem Einfluss der gleichen Promotoren stehen, aber dennoch unabhängig voneinander exprimiert werden (Das, 2009).

Neben der komplexen Expressionsregulation dieser Gene inmitten des  $Ig\lambda$ -Locus, gibt es noch eine weitere Besonderheit: sie dürfen in B-Zellen, zumindest ab dem Stadium der reifen B-Zelle, keine Rolle mehr spielen, da sie im Laufe der V(D)J-Rekombination deletiert werden können, wenn z.B. ein  $V\lambda$ -Gen stromaufwärts mit einem stromabwärts gelegenen  $J\lambda$ -Gen

rekombiniert (siehe auch Kapitel 1.3). Für das VpreB-Gen trifft dies zu: es wird nur im Stadium der prä-B Zelle exprimiert und für die Bildung des prä-B-Zellrezeptors benötigt.

Angesichts der Gene innerhalb des Igl $\lambda$ -Locus wird es zum Gesamtverständnis von dessen Regulierung und Aktivierung nötig sein, neben den Bereichen 5' und 3', auch die Strukturen im Inneren des Locus zu erforschen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Focus jedoch auf dem Bereich 5' von Igl $\lambda$  bleiben.

#### **4.5 Die HSS 5' von Igl $\lambda$ und ihre möglichen Rollen in der Regulation des Locus**

Nach Betrachtung aller derzeit verfügbaren Daten inkl. der genomweiten Kartierung von HSS und CBS und der bisherigen Untersuchungen zu regulatorischen Elementen innerhalb der Immunoglobulin-Loci, werden die von uns kartierten und teils funktionell analysierten HSS abschließend einzeln betrachtet und ihre mögliche Funktion diskutiert.

Die am weitesten distal gelegene, von uns kartierte HSS, ist die HSS T, welche in B- als auch non-B-Zelllinien bei Hybridisierung von Acc 65I Spaltungen mit der Sonde RE 04 deutlich als HSS sichtbar war (vgl. Abb. 17). Im genomweiten Screen war sie in beiden B-lymphoblastoiden Zelllinien (GM12878 und GM12891), in der myeloischen Zelllinie K562, in HeLa und auch in Melanozyten nachweisbar (siehe Abb. 43 und Tab. 8). Sie lokalisiert genau in den Beginn des ersten Exons von TOP3B und entspricht aller Wahrscheinlichkeit nach dem bereits charakterisierten Promotor von TOP3B (Cho et al., 2004).

Etwas stromabwärts davon liegt die HSS 5'1, welche mit der CBS 13376 kolokalisiert. In den DNase I Assays war die HSS 5'1 in allen B-Zelllinien vorhanden. In der T-Zelllinie MOLT-4 waren die Ergebnisse nicht eindeutig: bei Hybridisierung des Eco RI-Spaltfragments E11 mit der Sonde RE 05 war keine HSS nachweisbar, bei Hybridisierung desselben Fragmentes mit der Sonde RE 03 allerdings schon, so dass eher von einer ubiquitären HSS ausgegangen werden kann (siehe Abb. 17). Im genomweiten HSS-Screening zeigt sich ein ähnliches Bild: das Korrelat zu HSS 5'1 ist in mehreren, jedoch nicht allen, B- und non-B-Zelllinien nachweisbar (vgl. Kap. 4.2.2 und Abb. 43) (Kim et al., 2007). Zur funktionellen Analyse der HSS 5'1 mittels CFA wurde die publizierte Sequenz der CBS 13376 eingesetzt, sowie die um 159 bp verkürzte Form 13376s. Die vollständige Sequenz 13376 zeigte in Barriere-Position eine deutliche Abnahme der Kolonienzahl; die zusätzliche Platzierung zwischen Enhancer und Promotor hatte keine weiteren Auswirkungen (siehe Abb. 31 und 32). Die verkürzte Form 13376s hingegen, welche die CTCF-Kernbindungssequenz noch enthält, führte in Barriere-Position zu keiner signifikanten Änderung der Reporterexpression, in Enhancer-Block Position jedoch zu einer deutlichen Abnahme der Kolonienzahl (siehe Abb. 31 und 32). Damit scheint die Gesamtsequenz Silencer-, und die verkürzte Form Enhancer-blockierende Aktivität zu haben, was widersprüchlich scheint aber durch das Vorhandensein mehrerer *cis*-



aktiver Elemente innerhalb der HSS erklärt werden könnte (siehe Kap. 3.4.4.1). Die 159 bp umfassende Sequenz, welche in 13376, nicht aber in 13376s enthalten ist, könnte einen *trans*-aktiven inhibitorischen Faktor binden. Denkbar wäre Kaiso, ein Zinkfingerprotein und repressiver Transkriptionsfaktor, der mit CTCF interagiert und dessen Aktivität beeinflussen kann (Defossez et al., 2005). Kaiso bindet an methylierte CpG Dinukleotide oder eine unmethylierte Konsensussequenz (TNGCAGGA und Abwandlungen), wie sie im humanen 5'  $\beta$ -Globin Insulator in unmittelbarer Nähe zur CTCF-Bindungsstelle gefunden wurde, wo Kaiso die die Enhancer-blockierende Aktivität von CTCF reduzierte (Defossez et al., 2005). In einem anderen Kontext zeigte Kaiso, über die Rekrutierung von Chromatin Remodelling Komplexen, einen direkten repressiven Effekt auf die Transkription (Buck-Koehntop et al., 2012). Die o.g. Konsensussequenz konnte zwar nicht innerhalb der CBS 13376 identifiziert werden, nachdem aber die Kaiso-Konsensussequenz, wie die von CTCF (siehe Kap. 3.3), erheblich variieren kann, schließt dies eine Bindung von Kaiso nicht aus. Denkbar wäre sicherlich auch die Bindung anderer inhibitorischer *trans*-aktiver Faktoren; genauere Aussagen hierzu bedürften allerdings einer genaueren Kartierung der Protein-Bindungsstellen innerhalb der HSS, z.B. mittels *in vivo*-Footprinting Experimenten. Die beobachtete Silencer-Funktion der CBS 13376 könnte potentiell auch durch CTCF selbst vermittelt werden, denn für CTCF sind, neben Insulator-Funktionen, auch Silencer-Aktivitäten beschrieben (Baniahmad et al., 1990; Burcin et al., 1997; Hancock et al., 2007; Klochkov et al., 2006). Geht man von CTCF als hauptsächlichem Silencer aus, ist allerdings unklar, weswegen diese Funktion durch die CBS 13376s nicht mehr ausgeübt wird, enthält sie doch ebenfalls die CTCF-Kernbindungssequenz. Es ist daher davon auszugehen, dass jene 159 bp, um welche die CBS 13376 länger ist, einen *trans*-aktiven Faktor binden, welcher zur Silencer-Funktion beiträgt. Ob *in vivo* allerdings der Silencing-Effekt der CBS 13376 bzw. HSS 5'1 oder doch ein EB-Effekt im Vordergrund steht, ist unklar. Fraglich ist auch, auf welchen Locus sich diese Effekte *in vivo* hauptsächlich beziehen, d.h. ob die EB- bzw. Silencer-Funktion eher den TOP3B Locus vor Einflüssen des I $\gamma$ -Enhancers schützt oder eher der Eindämmung der TOP3B zugehörigen *cis*-aktiven Elemente dient. Eine Barriere-Funktion im klassischen Sinne konnte für die CBS 13376 im Rahmen der CFAs jedenfalls nicht gezeigt werden, da keines der beiden Konstrukte vermochte, bei beidseitiger Flankierung des Reportergens dessen Expression zu steigern (siehe Abb. 31 und 32). Bei Mutation der CTCF-Konsensussequenz der CBS 13376 in EB-Position kam es überraschenderweise zu verminderten Kolonienzahlen in den CFAs, welche zwar nur im Vergleich zur unmutierten CBS, nicht aber zum Plasmid ohne CBS in EB-Position, signifikant waren (siehe Abb. 38). Die Mutation oder Deletion der CTCF-Konsensussequenz innerhalb der CBS 13376s hatte keine Auswirkung auf die

Funktion der CBS: wie mit dem unmutierten Konstrukt kam es zu einem Enhancer-blockierenden Effekt (siehe Abb. 39). Diese unerwarteten Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass CTCF trotz Mutation an die Konsensussequenz bindet, was durch EMSA-shift Assays oder ChIPs geprüft werden müsste. Andererseits könnte die beobachtete Silencer- bzw. EB-Funktion der CBS 13376 bzw. 13376s tatsächlich unabhängig von CTCF sein. Die Bindung von CTCF an die CBS könnte primär der Ausbildung von Chromatinschleifen, z.B. innerhalb des *Igλ*-Locus, dienen, wofür die Interaktion mit angrenzenden CBS und die korrekte intragenomische Lokalisation nötig ist. Durch das artifizielle Reportergenkonstrukt im Rahmen der CFAs ist dies nicht gegeben, so dass ohne Ausbildung der entsprechenden Chromatinschleifen die Effekte anderer, innerhalb der HSS gelegener *cis*-aktiver Elemente wie z.B. einer möglichen Kaiso-Bindungsstelle, im Vordergrund stehen.

Die weiter 3' gelegene, in unseren CFAs schwach darstellbare HSS 5'2 findet auch im genomweiten Screen ein Korrelat in allen betrachteten Zelllinien. In der direkten Lokalisation der HSS 5'2 findet sich zwar nur eine HSS in der B-Zelllinie GM12891, allerdings weisen alle betrachteten Zelllinien sich in der unmittelbaren Nachbarschaft zum Teil mehrere HSS auf: GM12878 eine korrelierende HSS, in GM12891 liegen in dieser Region vier HSS nahe beieinander, in K562 drei, in HeLa zwei und in Melanozyten ebenfalls zwei (siehe Abb. 43). Diese HSS liegen im Intronbereich zwischen den PRAMEL Exons 4 und 5, ohne offensichtlichen Bezug zu diesen. Sie enthalten keine potentielle CTCF-Konsensussequenz und auch im genomweiten CBS Screen wurde hier keine CTCF-Bindungsstelle identifiziert. Funktionell könnte sich die HSS 5'2 entweder auf *Igλ*, auf TOP3B oder auch auf PRAMEL beziehen. Da regulatorische Elemente auch viele tausend Basenpaare entfernt liegen können von dem Gen, welches sie regulieren (Bartkuhn and Renkawitz, 2008; Dean, 2006, 2011), könnte sich diese HSS z.B. als Enhancer oder LCR auch auf ein unbekanntes, weit entfernt liegendes Gen beziehen. Erste Hinweise auf die Rolle dieser HSS könnten funktionelle Reporterassays geben, welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

Weiter stromabwärts, bereits in der Nähe des *Igλ*-Locus, liegt HSS 5'3, welche sich bei Hybridisierungen des Fragments A10 mit der Sonde RE 01 oder Hybridisierungen von Ba12 mit RE 12 zeigte (siehe Abb. 19). Im genomweiten Screen ist sie nur in einigen Zelllinien nachweisbar, darunter in beiden betrachteten B-Zelllinien und in HeLa, jedoch nicht in der myeloischen Zelllinie K562 oder in Melanozyten (siehe Abb. 43). Passend dazu konnten wir die HSS 5'3 auch nur in B-Zellen und nicht in non-B-Zelllinien identifizieren. Diese HSS enthält keine CBS und steht in engem räumlichem Bezug zum 4. Exon von PRAMEL, weswegen sie sich auf PRAMEL beziehen und z.B. eine Rolle beim Spleißvorgang spielen

könnte. Aufgrund der B-Zell-Spezifität und der Lage, weniger als 4 kb 5' des ersten  $V_{\lambda}$ -Pseudogens, könnte sie allerdings auch in Bezug zu  $Ig\lambda$  stehen. Allerdings zeigten RT-PCR Versuche auch für PRAMEL eine B-Zell spezifische Transkription (siehe Abb. 42). In Melanozyten ist diese HSS nicht vorhanden; es wurde jedoch nicht untersucht, ob PRAMEL, und nicht nur PRAME, in Melanozyten transkribiert wird, so dass sich daraus keine Schlussfolgerungen ziehen lassen.

Die nächsten beiden HSS, HSS 5'4 und 5'5, welche u.a. durch Hybridisierungen des Fragments Bg21 mit der Sonde RE 11 identifiziert wurden (siehe Abb. 20), flankieren beidseits  $V_{\lambda(1)70}$ , das erste  $V_{\lambda}$ -Pseudogen. Beide HSS waren in unseren Versuchen B-Zell spezifisch. Im genomweiten Screen sind sie ebenfalls in beiden betrachteten B-Zelllinien, nicht aber in myeloischen Zellen oder HeLa nachweisbar, während in Melanozyten nur HSS 5'5 ein Korrelat findet (siehe Abb. 43 und Tab. 8). Keine der beiden HSS enthält eine CBS. Sie stehen neben der engen örtlichen Beziehung zum ersten  $V_{\lambda}$ -Pseudogen auch in Bezug zu Exon 3 und Exon 2 von PRAMEL. Damit ergibt sich erneut die Möglichkeit, dass diese Elemente funktionell zu PRAMEL gehören. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass sie sich auf das  $V_{\lambda}$ -Gen beziehen und z.B. Rekombinationssignalsequenzen oder Spleißsignale darstellen (Falkner and Zachau, 1984; Hesse et al., 1989; Kawasaki et al., 1997). Zwar wird das  $V_{\lambda(1)70}$  Pseudogen im Rahmen der V(D)J-Umlagerung nicht rekombiniert, entsprechende Signalsequenzen können aber dennoch vorhanden, nur nicht vollständig funktionell sein (Kawasaki et al., 1997).

Die benachbarte HSS 5'6 könnte ein weiterer Grund sein, weswegen  $V_{\lambda(1)70}$  nicht rekombiniert. Diese HSS liegt etwa 5 kb stromabwärts von  $V_{\lambda(1)70}$ , unmittelbar 5' von  $V_{\lambda 4-69}$ , dem ersten funktionellen  $V_{\lambda}$ -Segment, und entspricht der CBS 13377. In unseren Untersuchungen zeigte sich diese HSS mit der Sonde RE 16 in Acc 65I und Eco RI Spaltungen in den untersuchten B-Zelllinien, nicht aber in der T-Zelllinie MOLT-4 (siehe Abb. 21). In der genomweiten Kartierung finden sich in dieser Lokalisation HSS sowohl in beiden B-Zelllinien als auch in K562 und HeLa (siehe Abb. 43). Trotz unserer Ergebnisse kann deshalb wohl nicht von einer reinen B-Zell Spezifität ausgegangen werden. Wie auch HSS 5'1, prüften wir HSS 5'6 mithilfe von CFAs auf Insulator/Boundary Aktivitäten, wobei für die funktionellen Analysen die publizierte Sequenz der CBS 13377 verwendet wurde (Kim et al., 2007). Die beidseitige Flankierung des Reportergens durch die HSS 5'6 führte zu einer signifikanten Zunahme der Kolonienzahl (im Gegensatz zur Flankierung durch HSS 5'1, welche eine Abnahme der Kolonienzahl zur Folge hatte; vgl. Abb. 31 und 33). Bei zusätzlicher Platzierung der HSS 5'6 bzw. CBS 13377 zwischen Enhancer und Promotor kam es zu einer deutlichen Abnahme der Kolonienzahl (siehe Abb. 34), womit HSS 5'6 sowohl

Barriere- als auch EB-Funktionen erfüllt (siehe Abb. 33 und 34). Während die Zunahme der Kolonienzahl durch HSS 5'6 in Barriereposition auch durch eine Enhancer-Aktivität von HSS 5'6 erklärbar wäre, wird diese Hypothese durch die hemmenden Effekte von HSS 5'6 in EB-Position widerlegt. Aufgrund dessen und angesichts der nachgewiesenen *in vivo* CTCF-Bindung (Kim et al., 2007), ist es wesentlich plausibler, die Zunahme der Kolonienzahl durch eine Barriere-Funktion zu erklären. Damit stellt HSS 5'6 ein klassisches Insulator/Boundary Element dar, welches, wie auch der bekannte 5'HS4 Insulator des  $\beta$ -Globin-Locus des Huhns, sowohl Barriere- als auch EB-Effekte vermittelt (Recillas-Targa et al., 2002). Ob allerdings die Barriere- und EB-Funktion wie bei 5'HS4 durch unabhängige Elemente bedingt werden, ist basierend auf unseren CFAs nicht feststellbar. Für CTCF wurden beide Funktionen mehrfach beschrieben (Bell and Felsenfeld, 1999; Bell et al., 1999; Klochkov et al., 2006), allerdings ist bei 5'HS4 nur die Enhancer-Block Funktion CTCF-abhängig (Recillas-Targa et al., 2002). Zur Prüfung einer entsprechenden CTCF-Abhängigkeit der EB-Funktion von HSS 5'6 bzw. CBS 13377 wurde die CTCF-Kernbindungssequenz wie bei CBS 13376 und 13376s mutiert. Wie auch mit den CBS 13376 und 13376s zeigte jedoch die Mutante bei Insertion zwischen Promotor und Enhancer den gleichen Effekt wie die unmutierte CBS (siehe Abb. 40). Wie bereits für die HSS 5'1 bzw. CBS 13376 diskutiert, könnte dies daran liegen, dass CTCF trotz Mutation an die Kernbindungssequenz bindet, was allerdings sehr unwahrscheinlich ist. Viel eher könnte auch hier CTCF nur einer von mehreren *trans*-aktiven Faktoren sein, der innerhalb der HSS bindet und zu deren Gesamteffekt beiträgt. CTCF könnte vorrangig der Bildung von Chromatinschleifen dienen, welche im artifiziellen Rahmen der CFAs nicht der *in vivo* Situation innerhalb des  $Ig\lambda$ -Locus entsprechen, so dass die Effekte der anderen *trans*-aktiven Faktoren dominieren. Zum besseren Verständnis wären in dieser Hinsicht genauere Kartierungen der HSS mittels *in vivo*-Footprinting Experimenten hilfreich, welche weitere Proteinbindungssequenzen aufdecken könnten, oder aber funktionelle Untersuchungen mit Untereinheiten der HSS. Zusammenfassend kann jedoch für die HSS 5'6 bzw. die CBS 13377 sowohl eine gewisse Barriere- wie auch eine deutliche EB-Aktivität festgestellt werden. Die HSS 5'6 ist direkt 5' des ersten funktionellen, rekombinierenden und exprimierenden  $V_\lambda$ -Gens  $V_{\lambda 4-69}$  lokalisiert, hat keinen Bezug zu Exons anderer Gene (siehe Abb. 43), und steht damit sehr wahrscheinlich in funktionellem Zusammenhang mit den  $Ig\lambda$ -Locus. Damit könnte HSS 5'6 die 5' Begrenzung des  $Ig\lambda$ -Locus darstellen, welche den Einfluss der  $Ig\lambda$ -Enhancer auf 5' gelegene Gene eindämmt und  $Ig\lambda$  vor der Ausbreitung benachbarten Heterochromatins schützt. Zudem könnte HSS 5'6 an der Bildung von Chromatinschleifen während der V(D)J-Rekombinationen beteiligt sein und zur Locuskontraktion beitragen.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, findet sich mit HSS 5'6 ein direkt an Ig $\lambda$  grenzendes Enhancer-Block und Barriere-Element und mit HSS 5'1 ein stromaufwärts in der Nähe des TOP3B Gens gelegenes Silencer-Element mit Enhancer-Block Eigenschaften. Dazwischen liegen vier weitere HSS, deren Funktion bisher nicht weiter untersucht werden konnte. Welche dieser Elemente sich auf Ig $\lambda$  beziehen, und in welcher Form sie an der Regulation des Locus oder der V(D)J-Rekombination beteiligt sind, lässt sich auf den bisherigen Daten basierend nicht sagen. Die HSS 5'6 könnte die 5' Begrenzung des Ig $\lambda$  Locus darstellen, während der Beginn der Locus-spezifischen Chromatinöffnung im Laufe der B-Zell Entwicklung eher von den 3' gelegenen Enhancer-Elementen auszugehen scheint (Asenbauer et al., 1999). Des Weiteren könnten, wie im murinen IgH oder Ig $\kappa$ -Locus, innerhalb des Locus gelegene Elemente an der Regulation der V(D)J-Rekombination beteiligt sein (Degner et al., 2009; Featherstone et al., 2010). Tatsächlich wurden im Rahmen der genomweiten CBS-Kartierung auch innerhalb des humanen Ig $\lambda$ -Locus CTCF-Bindungsstellen identifiziert (Kim et al., 2007), welche zur geregelten V(D)J-Rekombination beitragen könnten. Denkbar wäre allerdings auch die Existenz mehrerer Barriere-Elemente im V $\lambda$ -Bereich, so dass, je nach stattgefunder Umlagerung, die nächstliegende CBS die Locusgrenze darstellt.

Für ein umfassenderes Verständnis der verschiedenen Regulationsvorgänge sind jedoch viele weiterführende Analysen notwendig, sowohl hinsichtlich der identifizierten HSS beidseits des Ig $\lambda$ -Locus als auch der inmitten von Ig $\lambda$  gelegenen Elemente. Hinsichtlich der HSS 5' von Ig $\lambda$  müssten zum einen die bisher nicht näher untersuchten HSS 5'2 bis HSS 5'5 funktionell charakterisiert werden. Zum anderen müssten die bereits mittels CFAs untersuchten HSS 5'1 und HSS 5'6 eingehender analysiert werden. Die nächsten Schritte wären beispielsweise *in vivo*-Footprinting Experimente zur Kartierung der genauen Proteinbindungsstellen, die Analyse kürzerer Sequenzen in CFAs oder auch das *in silico* Screening auf potentielle Bindungsstellen bekannter Insulator/Boundary-assoziiierter Proteine gefolgt von ChIP Experimenten zur Bestätigung ihrer Bindung.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der humane  $Ig\lambda$ -Locus auf Chromosom 22q11.2 umfasst etwa 911 kb und besteht aus 70  $V_\lambda$ -Genen sowie 7  $J_\lambda$ - $C_\lambda$  Komplexen. Die Voraussetzung für die B-Zell spezifische V(D)J-Rekombination und anschließende Expression ist dabei die geregelte Öffnung des Chromatins in bestimmten Stadien der B-Zell Entwicklung, welche über *cis*-regulierende DNA Elemente und daran bindende *trans*-aktive Faktoren koordiniert wird. Diese müssen zum einen z.B. als Locus-Control-Region den Locus aktivieren und zum anderen durch Insulator/Boundary Funktionen sicherstellen, dass die Aktivierung auf den Locus beschränkt bleibt und nicht auf benachbarte Gene übergreift. Flussabwärts, 3' des  $Ig\lambda$ -Locus, wurden in Vorarbeiten der AG Klobeck mithilfe von limitierten *in vivo* DNase I- Spaltungen sieben DNase I hypersensitive Bereiche, die HSS 0-6 (Asenbauer and Klobeck, 1996) kartiert. Während für HSS 1 bis HSS 3 eine Enhancer-Funktion nachgewiesen werden konnte (Asenbauer et al., 1999), zeigten HSS 5 und 6 eine Enhancer-Block und Barriere-Funktion (Nagel, 2009; Regnier, 2011), welche den  $Ig\lambda$ -Locus von benachbarten Genen funktionell isolieren und demzufolge die 3' Grenze des Locus darstellen könnten.

Über mögliche regulatorische Elemente flussaufwärts, am 5' Ende des humanen  $Ig\lambda$ -Locus, war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Diese Region zwischen dem ersten  $V_\lambda$ -Pseudogen  $V_{\lambda(1)70}$  und dem flussaufwärts gelegenen Gen TOP3B beträgt 44kb und beinhaltet zudem das Pseudogen PRAMEL, welches in den  $Ig\lambda$ -Locus hineinreicht. Dieser Bereich wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe von limitierten DNase I Spaltungen auf HSS untersucht. Dabei gelang es, insgesamt sieben HSS zu identifizieren. Die am weitesten 5' von  $Ig\lambda$  gelegene HSS ist im ersten TOP3B-Exon lokalisiert, entspricht dem TOP3B Promotor und wurde HSS T genannt. Die stromabwärts folgenden wurden von 5' nach 3' aufsteigend nummeriert (HSS 5'1 bis HSS 5'6). Regulatorische Elemente in diesem Bereich können zum einen Promotoren, Enhancer oder Silencer mit Bezug auf  $Ig\lambda$  oder benachbarte Gene darstellen, zum anderen auch Insulator/Boundary Elemente, welche die unabhängige Expression benachbarter Gene gewährleisten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die identifizierten HSS insbesondere hinsichtlich einer möglichen Insulator/Boundary Funktion geprüft. Nachdem diese Funktion meist mit der Bindung des Proteins CTCF einhergeht, wurden sämtliche HSS mithilfe einer Prädiktionsoftware (CTCFBSDB = CTCF-binding site database) *in silico* auf CTCF-Bindungsstellen (CBS) untersucht. Dabei ergaben sich potentielle CBS für die HSS 5'1 und 5'6, welche durch eine genomweite *in vivo* Untersuchung von CTCF-Bindungsstellen bestätigt wurden (Kim et al., 2007). Die beiden HSS 5'1 und 5'6 wurden Colony-Forming-Assays zur Prüfung ihrer möglichen Enhancer-Block bzw. Barriere-Funktion unterzogen. Während die

Gesamtsequenz von HSS 5'1 Silencer-Aktivität und eine Teilsequenz von HSS 5'1 hauptsächlich Enhancer-blockierende Funktionen zeigte, übte HSS 5'6, welche sich direkt neben dem ersten funktionellen  $V_\lambda$ -Gen  $V_{\lambda(1)70}$  befindet, sowohl Barriere- als auch Enhancer-Block Funktionen aus. Zur Prüfung der CTCF-Abhängigkeit dieser Aktivitäten wurden die CTCF Konsensussequenzen mutiert; überraschenderweise hatten die Mutationen allerdings keine Beeinträchtigung der Enhancer-Block oder Barriere-Funktion zur Folge. Bevor allerdings von einer CTCF-unabhängigen Insulator/Boundary Funktion für diese HSS ausgegangen werden kann, müssten zur Validierung dieser Ergebnisse weitere Analysen erfolgen. Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit sieben HSS stromaufwärts von  $Ig\lambda$  identifiziert werden, darunter HSS 5'1 und HSS 5'6 mit Insulator/Boundary Funktion, wobei HSS 5'6 alleine oder in Kombination mit anderen HSS die funktionelle 5' Grenze des humanen  $Ig\lambda$ -Locus darstellen könnte.

## 6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Die verschiedenen Ebenen der Genregulation.
- Abb. 2: Das Nucleosom und die verschiedenen Stufen der DNA Kondensation.
- Abb. 3: Enhancer-blockierende und Barriere-Effekte von Insulator/Boundary Elementen.
- Abb. 4: Die Struktur der drei verschiedenen Immunoglobulin-Loci.
- Abb. 5: Die V(D)J-Rekombinationen im Laufe der B-Zell-Entwicklung.
- Abb. 6: Die Lage der HSS stromabwärts des humanen  $Ig\lambda$ -Locus.
- Abb. 7: Die Funktion der HSS stromabwärts des  $Ig\lambda$ -Locus.
- Abb. 8: Übersicht über  $Ig\lambda$  und den 5' gelegenen Bereich.
- Abb. 9: Limitierte DNase I Spaltung und indirect end-labeling zur Kartierung von HSS.
- Abb. 10: Restriktionsendonukleasen-Spaltfragmente 5' von  $Ig\lambda$ .
- Abb. 11: Vorkommen von repetitiven Elementen 5' von  $Ig\lambda$ .
- Abb. 12: Screening eines einzelnen Restriktionsfragments auf repetitive Sequenzen.
- Abb. 13: Restriktionsfragmente und Lage der DNA-Sonden 5' des  $Ig\lambda$  Locus.
- Abb. 14: Darstellung der verwendeten DNA-Sonden.
- Abb. 15: Spezifitätstest der DNA-Sonden.
- Abb. 16: Limitierte DNase I Spaltungen.
- Abb. 17: HSS am 5' Ende des untersuchten Bereichs zwischen TOP3B und  $Ig\lambda$ .
- Abb. 18: HSS im mittleren Bereich zwischen TOP3B und  $Ig\lambda$ .
- Abb. 19: HSS im 3' Bereich des untersuchten Bereichs zwischen TOP3B und  $Ig\lambda$ .
- Abb. 20: HSS unmittelbar 5' des Pseudogens  $V_{\lambda(I)70}$ .
- Abb. 21: HSS 3' des Pseudogens  $V_{\lambda(I)70}$  und 5' des ersten funktionellen  $V_{\lambda}$  Gens  $V_{\lambda 4-69}$ .
- Abb. 22: Lage der kartierten HSS 5' des  $Ig\lambda$ -Locus.
- Abb. 23: Sequenzen der CBS 13376 und 13377 mit putativer CTCF-Kernbindungssequenz.
- Abb. 24: CTCF-Konsensussequenzen der HSS 5' und 3' von  $Ig\lambda$  und bekannter Insulatoren.
- Abb. 25: Prinzip des Colony-Forming-Assays.
- Abb. 26: Darstellung der Referenzplasmide pSVPneo und pSV40EPneo.
- Abb. 27: Die Anordnung der HSS in den Reportergenkonstrukten.
- Abb. 28: Amplifizierte Bereiche der CBS 13376 und 13377.
- Abb. 29: Übersicht über die Promotor-getriebenen Reportergenkonstrukte.
- Abb. 30: Übersicht über die Enhancer-getriebenen Reportergenkonstrukte.
- Abb. 31: Ergebnisse der CFAs mit den CBS 13376 und 13376s in Barriere-Position.
- Abb. 32: Ergebnisse der CFAs mit den CBS 13376 und 13376s in Enhancer-Block Position.
- Abb. 33: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377 in Barriere-Position.
- Abb. 34: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377 in Enhancer-Block Position.
- Abb. 35: Die CTCF-Kernbindungssequenz der CBS 13376 und 13377 und deren Mutanten.
- Abb. 36: Lage der Primer zur Generierung der CTCF-bindungsdefizienten Mutanten.
- Abb. 37: Übersicht über die Reportergenkonstrukte mit mutierter CTCF-Bindungsstelle.
- Abb. 38: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13376mut in Enhancer-Block Position.
- Abb. 39: Ergebnisse der CFAs mit den CBS 13376smut und 13376ss in Enhancer-Block Position.
- Abb. 40: Ergebnisse der CFAs mit der CBS 13377mut in Enhancer-Block Position.
- Abb. 41: Lage der Primer für die RT-PCR der Gene GAPDH, TOP3B und PRAMEL.
- Abb. 42: Expression von PRAMEL, TOP3B und GAPDH in verschiedenen Zelllinien.



Abb. 43: Korrelation der identifizierten HSS mit den HSS des genomweiten Screens.

Abb. 44: Überblick über den I $\gamma$ L-Locus und die darin enthaltenen Gene.

## 7 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Tab. 2: Übersicht über die Sequenzen aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 3: Übersicht über die drei Abschnitte der PCR.

Tab. 4: Verdünnungsschema der DNase I Konzentration für die Versuche der limitierten DNase I Spaltung.

Tab. 5: Übersicht über die einzelnen Schritte im Rahmen des Colony Forming Assays.

Tab. 6: Überblick über die verwendeten DNA-Sonden

Tab. 7: Übersicht über die Reportergenkonstrukte mit HSS 5'1 und 5'6 in Barriere und EB-Position.

Tab. 8: Die identifizierten HSS 5' von I $\gamma$ L und ihre Korrelate in anderen Zelllinien.

Tab. 9: Übersicht der Blotmembranen für die Testhybridisierungen.

Tab. 10: Übersicht der Blotmembranen für die DNase I Hypersensitivitätstests.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare (base pairs)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CTCF	CCCTC-bindender Faktor ( <i>CCCTC-binding factor</i> )
CTCFBSDB	CTCF-binding site database
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuclease
EB	Enhancer-Blocker / Enhancer-blockierendes Element
EBF	early B-cell factor, ein Transkriptionsfaktor
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FBS	fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
g	Gramm
GNAZ	guanine nucleotide binding protein
h	Stunde(n)
HAT	Histonacetyltransferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HMT	Histonmethyltransferase
HSS	DNase I hypersensitiver Bereich (hypersensitive site)
Ig	Immunoglobulin
inkl.	inklusive

---

k	kilo [ $10^3$ ]
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
l	Liter
LCR	Locus-Control Region
LINE	long interspersed element
m	milli [ $10^{-3}$ ]
M	Molar [mol/l]
$\mu$	mikro [ $10^{-6}$ ]
min	Minute(n)
n	nano [ $10^{-9}$ ]
o.g.	oben genannt
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PRAMEL	preferentially expressed in melanoma- like gene
RAG-1/-2	recombination activating genes 1 / 2
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen/Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RSS	Rekombinations-Signalsequenz
RT	Raumtemperatur
RTDR1	rhabdoid tumor deletion gene 1
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat)
sec	Sekunde
SINE	short interspersed element
sog.	sogenannt(e/s)
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TOP3	Topoisomerase 3B
TF	Transkriptionsfaktor
U	Unit
u.a.	unter anderem
u.g.	unten genannt
USF 1/USF 2	upstream transcription factor 1 / 2
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

Abarrategui, I., and Krangel, M.S. (2009). Germline transcription: a key regulator of accessibility and recombination. *Adv Exp Med Biol* 650, 93-102.

Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A., and Oltz, E.M. (2006). Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J Immunol* 176, 2439-2447.

Alt, F.W., Ferrier, P., Malynn, B., Lutzker, S., Rothman, P., Berman, J., Blackwell, K., Mellis, S., Pollock, R., Furley, A., *et al.* (1988). Control of recombination events during lymphocyte differentiation. Heavy chain variable region gene assembly and heavy chain class switching. *Ann N Y Acad Sci* 546, 9-24.

Alt, F.W., Oltz, E.M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G., and Chen, J. (1992). VDJ recombination. *Immunol Today* 13, 306-314.

Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* 3, 1209-1219.

Asenbauer, H., Combriato, G., and Klobeck, H.G. (1999). The immunoglobulin lambda light chain enhancer consists of three modules which synergize in activation of transcription. *Eur J Immunol* 29, 713-724.

Asenbauer, H., and Klobeck, H.G. (1996). Tissue-specific deoxyribonuclease I-hypersensitive sites in the vicinity of the immunoglobulin C lambda cluster of man. *Eur J Immunol* 26, 142-150.

Babu, M.M., Janga, S.C., de Santiago, I., and Pombo, A. (2008). Eukaryotic gene regulation in three dimensions and its impact on genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 18, 571-582.

Banerji, J., Olson, L., and Schaffner, W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33, 729-740.

Baniahmad, A., Steiner, C., Kohne, A.C., and Renkawitz, R. (1990). Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61, 505-514.

Bao, L., Zhou, M., and Cui, Y. (2008). CTCFBSDB: a CTCF-binding site database for characterization of vertebrate genomic insulators. *Nucleic Acids Res* 36, D83-87.

Bartkuhn, M., and Renkawitz, R. (2008). Long range chromatin interactions involved in gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1783, 2161-2166.

Bartova, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G., and Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56, 711-721.

Bauer, S.R., Huebner, K., Budarf, M., Finan, J., Erikson, J., Emanuel, B.S., Nowell, P.C., Croce, C.M., and Melchers, F. (1988). The human Vpre B gene is located on chromosome 22 near a cluster of V lambda gene segments. *Immunogenetics* 28, 328-333.

- Baumann, M., Mamais, A., McBlane, F., Xiao, H., and Boyes, J. (2003). Regulation of V(D)J recombination by nucleosome positioning at recombination signal sequences. *EMBO J* 22, 5197-5207.
- Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* 9, 191-198.
- Bell, A.C., West, A.G., and Felsenfeld, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387-396.
- Birtle, Z., Goodstadt, L., and Ponting, C. (2005). Duplication and positive selection among hominin-specific PRAME genes. *BMC Genomics* 6, 120.
- Blomberg, B.B., Rudin, C.M., and Storb, U. (1991). Identification and localization of an enhancer for the human lambda L chain Ig gene complex. *J Immunol* 147, 2354-2358.
- Boyle, A.P., Davis, S., Shulha, H.P., Meltzer, P., Margulies, E.H., Weng, Z., Furey, T.S., and Crawford, G.E. (2008). High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell* 132, 311-322.
- Buck-Koehntop, B.A., Stanfield, R.L., Ekiert, D.C., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., Wilson, I.A., and Wright, P.E. (2012). Molecular basis for recognition of methylated and specific DNA sequences by the zinc finger protein Kaiso. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15229-15234.
- Buck, M.J., and Lieb, J.D. (2004). ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 83, 349-360.
- Bulger, M., and Groudine, M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13, 2465-2477.
- Burcin, M., Arnold, R., Lutz, M., Kaiser, B., Runge, D., Lottspeich, F., Filippova, G.N., Lobanenkova, V.V., and Renkawitz, R. (1997). Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol Cell Biol* 17, 1281-1288.
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., and Felsenfeld, G. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4, 16433-16437.
- Capelson, M., and Corces, V.G. (2004). Boundary elements and nuclear organization. *Biol Cell* 96, 617-629.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P.A. (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* 117, 427-439.
- Chahwan, R., Edelmann, W., Scharff, M.D., and Roa, S. (2012). AIDing antibody diversity by error-prone mismatch repair. *Semin Immunol* 24, 293-300.
- Chakraborty, T., Perlot, T., Subrahmanyam, R., Jani, A., Goff, P.H., Zhang, Y., Ivanova, I., Alt, F.W., and Sen, R. (2009). A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an

epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J Exp Med* 206, 1019-1027.

Chan, A., and Mak, T.W. (1989). Genomic organization of the T cell receptor. *Cancer Detect Prev* 14, 261-267.

Chaumeil, J., and Skok, J.A. (2012). The role of CTCF in regulating V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 24, 153-159.

Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K., and Alt, F.W. (1993). Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J* 12, 4635-4645.

Cho, Y.H., Park, J.Y., Han, S.Y., and Chung, I.K. (2004). Identification of the functional elements in the promoter region of human DNA topoisomerase IIIbeta gene. *Biochim Biophys Acta* 1679, 272-278.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Chopra, V.S., Cande, J., Hong, J.W., and Levine, M. (2009). Stalled Hox promoters as chromosomal boundaries. *Genes Dev* 23, 1505-1509.

Chung, J.H., Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 575-580.

Chung, J.H., Whiteley, M., and Felsenfeld, G. (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74, 505-514.

Combriato, G., and Klobeck, H.G. (1991). V lambda and J lambda-C lambda gene segments of the human immunoglobulin lambda light chain locus are separated by 14 kb and rearrange by a deletion mechanism. *Eur J Immunol* 21, 1513-1522.

Combriato, G., and Klobeck, H.G. (2002). Regulation of human Ig lambda light chain gene expression by NF-kappa B. *J Immunol* 168, 1259-1266.

Croce, C.M., Huebner, K., Isobe, M., Fainstain, E., Lifshitz, B., Shtivelman, E., and Canaani, E. (1987). Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: order of BCR loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7174-7178.

Croce, C.M., Shander, M., Martinis, J., Cicurel, L., D'Ancona, G.G., Dolby, T.W., and Koprowski, H. (1979). Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3416-3419.

Dalton, W.T., Jr., Ahearn, M.J., McCredie, K.B., Freireich, E.J., Stass, S.A., and Trujillo, J.M. (1988). HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71, 242-247.

Dariavach, P., Lefranc, G., and Lefranc, M.P. (1987). Human immunoglobulin C lambda 6 gene encodes the Kern+Oz-lambda chain and C lambda 4 and C lambda 5 are pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9074-9078.

- Das, P.M., Ramachandran, K., vanWert, J., and Singal, R. (2004). Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* 37, 961-969.
- Das, S. (2009). Evolutionary origin and genomic organization of micro-RNA genes in immunoglobulin lambda variable region gene family. *Mol Biol Evol* 26, 1179-1189.
- Dean, A. (2006). On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet* 22, 38-45.
- Dean, A. (2011). In the loop: long range chromatin interactions and gene regulation. *Brief Funct Genomics* 10, 3-10.
- Defossez, P.A., Kelly, K.F., Filion, G.J., Perez-Torrado, R., Magdinier, F., Menoni, H., Nordgaard, C.L., Daniel, J.M., and Gilson, E. (2005). The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *J Biol Chem* 280, 43017-43023.
- Degner-Leisso, S.C., and Feeney, A.J. (2010). Epigenetic and 3-dimensional regulation of V(D)J rearrangement of immunoglobulin genes. *Semin Immunol* 22, 346-352.
- Degner, S.C., Verma-Gaur, J., Wong, T.P., Bossen, C., Iverson, G.M., Torkamani, A., Vettermann, C., Lin, Y.C., Ju, Z., Schulz, D., *et al.* (2011). CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9566-9571.
- Degner, S.C., Wong, T.P., Jankevicius, G., and Feeney, A.J. (2009). Cutting edge: developmental stage-specific recruitment of cohesin to CTCF sites throughout immunoglobulin loci during B lymphocyte development. *J Immunol* 182, 44-48.
- Denhardt, D.T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 23, 641-646.
- Ding, X.M., Pan, X.Y., Xu, C., and Shen, H.B. (2010). Computational prediction of DNA-protein interactions: a review. *Curr Comput Aided Drug Des* 6, 197-206.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981-992.
- Eickbush, T.H., and Moudrianakis, E.N. (1978). The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* 17, 4955-4964.
- Ekici, A.B., Park, O.S., Fuchs, C., and Rautenstrauss, B. (1997). One-tube, two-stage PCR-directed *in vitro* mutagenesis using megaprimers. *Technical Tips Online* 2, 121-123.
- Engel, H., Rolink, A., and Weiss, S. (1999). B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages. *Eur J Immunol* 29, 2167-2176.
- Epping, M.T., Wang, L., Edel, M.J., Carlee, L., Hernandez, M., and Bernards, R. (2005). The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 122, 835-847.
- Erikson, J., Martinis, J., and Croce, C.M. (1981). Assignment of the genes for human lambda immunoglobulin chains to chromosome 22. *Nature* 294, 173-175.

- Falkner, F.G., and Zachau, H.G. (1984). Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* 310, 71-74.
- Farrell, C.M., West, A.G., and Felsenfeld, G. (2002). Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human beta-globin loci. *Mol Cell Biol* 22, 3820-3831.
- Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., and Corcoran, A.E. (2010). The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J Biol Chem* 285, 9327-9338.
- Feeney, A. (2010). Epigenetic regulation of V(D)J recombination. *Semin Immunol* 22, 311-312.
- Feeney, A.J., Victor, K.D., Vu, K., Nadel, B., and Chukwuocha, R.U. (1994). Influence of the V(D)J recombination mechanism on the formation of the primary T and B cell repertoires. *Semin Immunol* 6, 155-163.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Felsenfeld, G., Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Ghirlando, R., Huang, S., Jin, C., Litt, M., Magdinier, F., Mutskov, V., *et al.* (2004). Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 245-250.
- Festenstein, R., and Kioussis, D. (2000). Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Curr Opin Genet Dev* 10, 199-203.
- Filippova, G.N., Cheng, M.K., Moore, J.M., Truong, J.P., Hu, Y.J., Nguyen, D.K., Tsuchiya, K.D., and Disteche, C.M. (2005). Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* 8, 31-42.
- Filippova, G.N., Thienes, C.P., Penn, B.H., Cho, D.H., Hu, Y.J., Moore, J.M., Klesert, T.R., Lobanenkova, V.V., and Tapscott, S.J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet* 28, 335-343.
- Fraser, P., and Bickmore, W. (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447, 413-417.
- Fraser, P., and Grosveld, F. (1998). Locus control regions, chromatin activation and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 10, 361-365.
- French, D.L., Laskov, R., and Scharff, M.D. (1989). The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science* 244, 1152-1157.
- Friess, B. (2001). Untersuchungen zur Funktion einer regulatorischen DNA-Sequenz im Bereich des I $\gamma$ -Enhancers des Menschen. In Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Fussner, E., Ching, R.W., and Bazett-Jones, D.P. (2011). Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem Sci* 36, 1-6.

- Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenkova, V.V., and Birshtein, B.K. (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the *igh* locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25, 1511-1525.
- Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7, 703-713.
- Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71, 101-132.
- Ghirlando, R., Giles, K., Gowher, H., Xiao, T., Xu, Z., Yao, H., and Felsenfeld, G. (2012). Chromatin domains, insulators, and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1819, 644-651.
- Giambra, V., Volpi, S., Emelyanov, A.V., Pflugh, D., Bothwell, A.L., Norio, P., Fan, Y., Ju, Z., Skoultchi, A.I., Hardy, R.R., *et al.* (2008). Pax5 and linker histone H1 coordinate DNA methylation and histone modifications in the 3' regulatory region of the immunoglobulin heavy chain locus. *Mol Cell Biol* 28, 6123-6133.
- Giannini, S.L., Singh, M., Calvo, C.F., Ding, G., and Birshtein, B.K. (1993). DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J Immunol* 150, 1772-1780.
- Giles, K.E., Gowher, H., Ghirlando, R., Jin, C., and Felsenfeld, G. (2010). Chromatin Boundaries, Insulators, and Long-Range Interactions in the Nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
- Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., and Tonegawa, S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33, 717-728.
- Goebel, P., Janney, N., Valenzuela, J.R., Romanow, W.J., Murre, C., and Feeney, A.J. (2001). Localized gene-specific induction of accessibility to V(D)J recombination induced by E2A and early B cell factor in nonlymphoid cells. *J Exp Med* 194, 645-656.
- Gross, D.S., and Garrard, W.T. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 57, 159-197.
- Guo, C., Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., and Sen, R. (2011a). Two forms of loops generate the chromatin conformation of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Cell* 147, 332-343.
- Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., *et al.* (2011b). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477, 424-430.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanai, R., Caron, P.R., and Wang, J.C. (1996). Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3653-3657.



- Hancock, A.L., Brown, K.W., Moorwood, K., Moon, H., Holmgren, C., Mardikar, S.H., Dallosso, A.R., Klenova, E., Loukinov, D., Ohlsson, R., *et al.* (2007). A CTCF-binding silencer regulates the imprinted genes AWT1 and WT1-AS and exhibits sequential epigenetic defects during Wilms' tumourigenesis. *Hum Mol Genet* *16*, 343-354.
- Hansen, J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *31*, 361-392.
- Henikoff, S. (1992). Position effect and related phenomena. *Curr Opin Genet Dev* *2*, 907-912.
- Hesse, J.E., Lieber, M.R., Mizuuchi, K., and Gellert, M. (1989). V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* *3*, 1053-1061.
- Hesslein, D.G., Pflugh, D.L., Chowdhury, D., Bothwell, A.L., Sen, R., and Schatz, D.G. (2003). Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev* *17*, 37-42.
- Ho, Y., Elefant, F., Cooke, N., and Liehaber, S. (2002). A defined locus control region determinant links chromatin domain acetylation with long-range gene activation. *Mol Cell* *9*, 291-302.
- Hozumi, N., and Tonegawa, S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *73*, 3628-3632.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J.F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., *et al.* (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* *6*, 199-208.
- Jhunjhunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., Cutchin, S., Riblet, R., van Dongen, J.J., Grosveld, F.G., Knoch, T.A., and Murre, C. (2008). The 3D structure of the immunoglobulin heavy-chain locus: implications for long-range genomic interactions. *Cell* *133*, 265-279.
- Jhunjhunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., and Murre, C. (2009). Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. *Cell* *138*, 435-448.
- Ji, Y., Resch, W., Corbett, E., Yamane, A., Casellas, R., and Schatz, D.G. (2010). The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci. *Cell* *141*, 419-431.
- Johnston, R.F., Pickett, S.C., and Barker, D.L. (1990). Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* *11*, 355-360.
- Karasuyama, H., Kudo, A., and Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* *172*, 969-972.
- Kawasaki, K., Minoshima, S., Nakato, E., Shibuya, K., Shintani, A., Asakawa, S., Sasaki, T., Klobeck, H.G., Combriato, G., Zachau, H.G., *et al.* (2001). Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vkappa genes. *Eur J Immunol* *31*, 1017-1028.

- Kawasaki, K., Minoshima, S., Nakato, E., Shibuya, K., Shintani, A., Schmeits, J.L., Wang, J., and Shimizu, N. (1997). One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res* 7, 250-261.
- Kawasaki, K., Minoshima, S., Schooler, K., Kudoh, J., Asakawa, S., de Jong, P.J., and Shimizu, N. (1995). The organization of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res* 5, 125-135.
- Kellum, R., and Schedl, P. (1992). A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol Cell Biol* 12, 2424-2431.
- Khamlichi, A.A., Pinaud, E., Decourt, C., Chauveau, C., and Cogne, M. (2000). The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv Immunol* 75, 317-345.
- Kim, T.H., Abdullaev, Z.K., Smith, A.D., Ching, K.A., Loukinov, D.I., Green, R.D., Zhang, M.Q., Lobanenko, V.V., and Ren, B. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128, 1231-1245.
- Kimura, A., and Horikoshi, M. (2004). Partition of distinct chromosomal regions: negotiable border and fixed border. *Genes Cells* 9, 499-508.
- Kimura, A., Umehara, T., and Horikoshi, M. (2002). Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet* 32, 370-377.
- Kirkham, P.M., Mortari, F., Newton, J.A., and Schroeder, H.W., Jr. (1992). Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J* 11, 603-609.
- Klochkov, D., Rincon-Arango, H., Ioudinkova, E.S., Valadez-Graham, V., Gavrillov, A., Recillas-Targa, F., and Razin, S.V. (2006). A CTCF-dependent silencer located in the differentially methylated area may regulate expression of a housekeeping gene overlapping a tissue-specific gene domain. *Mol Cell Biol* 26, 1589-1597.
- Kobayashi, M., and Hanai, R. (2001). M phase-specific association of human topoisomerase IIIbeta with chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 282-287.
- Kraiber, P. (2002). Charakterisierung von HSS-2, einer B-zell-spezifischen, regulatorischen DNA-Sequenz im Bereich des Ig lambda-Enhancers des Menschen. In Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kudo, A., and Melchers, F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J* 6, 2267-2272.
- Kuehl, W.M. (1983). Sequential generation of antibody diversity during B-cell development. *Surv Immunol Res* 2, 52-61.
- Kuo, M.H., and Allis, C.D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19, 425-433.

- Kwan, K.Y., Greenwald, R.J., Mohanty, S., Sharpe, A.H., Shaw, A.C., and Wang, J.C. (2007). Development of autoimmunity in mice lacking DNA topoisomerase 3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 9242-9247.
- Kwan, K.Y., Moens, P.B., and Wang, J.C. (2003). Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2526-2531.
- Labrador, M., and Corces, V.G. (2002). Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell* *111*, 151-154.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Langst, G., and Becker, P.B. (2004). Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* *1677*, 58-63.
- Laskey, R.A., and Mills, A.D. (1977). Enhanced autoradiographic detection of 32P and 125I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Lett* *82*, 314-316.
- Li, Q., Harju, S., and Peterson, K.R. (1999). Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends Genet* *15*, 403-408.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., and Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Blood* *100*, 3077-3086.
- Lobanenkov, V.V., Nicolas, R.H., Adler, V.V., Paterson, H., Klenova, E.M., Polotskaja, A.V., and Goodwin, G.H. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* *5*, 1743-1753.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- Madisen, L., and Groudine, M. (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev* *8*, 2212-2226.
- Magdinier, F., Yusufzai, T.M., and Felsenfeld, G. (2004). Both CTCF-dependent and -independent insulators are found between the mouse T cell receptor alpha and Dad1 genes. *J Biol Chem* *279*, 25381-25389.
- Magovcevic, I., Khetarpal, U., Bieber, F.R., and Morton, C.C. (1995). GNAZ in human fetal cochlea: expression, localization, and potential role in inner ear function. *Hear Res* *90*, 55-64.
- Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C., Ferguson-Smith, M.A., Bentley, D.L., and Rabbitts, T.H. (1982). Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 4957-4961.
- Massari, M.E., Grant, P.A., Pray-Grant, M.G., Berger, S.L., Workman, J.L., and Murre, C. (1999). A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell* *4*, 63-73.

- Matthews, A.G., Kuo, A.J., Ramon-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N., *et al.* (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* *450*, 1106-1110.
- McBride, O.W., Hieter, P.A., Hollis, G.F., Swan, D., Otey, M.C., and Leder, P. (1982). Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *J Exp Med* *155*, 1480-1490.
- McMurry, M.T., and Krangel, M.S. (2000). A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science* *287*, 495-498.
- Melchers, F., ten Boekel, E., Yamagami, T., Andersson, J., and Rolink, A. (1999). The roles of preB and B cell receptors in the stepwise allelic exclusion of mouse IgH and L chain gene loci. *Semin Immunol* *11*, 307-317.
- Menezes, J., Leibold, W., Klein, G., and Clements, G. (1975). Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine* *22*, 276-284.
- Merkenschlager, M., and Odom, D.T. (2013). CTCF and cohesin: linking gene regulatory elements with their targets. *Cell* *152*, 1285-1297.
- Merler, E., and Rosen, F.S. (1966). The gamma globulins. I. The structure and synthesis of the immunoglobulins. *N Engl J Med* *275*, 480-486 contd.
- Michaelson, J.S., Giannini, S.L., and Birshtein, B.K. (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res* *23*, 975-981.
- Miller, M.R., Castellot, J.J., Jr., and Pardee, A.B. (1978). A permeable animal cell preparation for studying macromolecular synthesis. DNA synthesis and the role of deoxyribonucleotides in S phase initiation. *Biochemistry* *17*, 1073-1080.
- Miller, M.R., Castellot, J.J., Jr., and Pardee, A.B. (1979). A general method for permeabilizing monolayer and suspension cultured animal cells. *Exp Cell Res* *120*, 421-425.
- Minowada, J., Onuma, T., and Moore, G.E. (1972). Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* *49*, 891-895.
- Morshead, K.B., Ciccone, D.N., Taverna, S.D., Allis, C.D., and Oettinger, M.A. (2003). Antigen receptor loci poised for V(D)J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 11577-11582.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* *155*, 335-350.

- Nagel, S. (2009). Untersuchung zur Funktion von DNase I hypersensitiven Bereichen an der 3'Grenze der I $\gamma$ l-Domäne im Sinne eines „Insulator/Boundary“ Elementes. In Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Nedospasov, S.A., and Georgiev, G.P. (1980). Non-random cleavage of SV40 DNA in the compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 92, 532-539.
- Ng, S.W., Liu, Y., Hasselblatt, K.T., Mok, S.C., and Berkowitz, R.S. (1999). A new human topoisomerase III that interacts with SGS1 protein. *Nucleic Acids Res* 27, 993-1000.
- Oehler, V.G., Guthrie, K.A., Cummings, C.L., Sabo, K., Wood, B.L., Gooley, T., Yang, T., Epping, M.T., Shou, Y., Pogossova-Agadjanyan, E., *et al.* (2009). The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood* 114, 3299-3308.
- Oettinger, M.A. (1992). Activation of V(D)J recombination by RAG1 and RAG2. *Trends Genet* 8, 413-416.
- Oki, M., Valenzuela, L., Chiba, T., Ito, T., and Kamakaka, R.T. (2004). Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains. *Mol Cell Biol* 24, 1956-1967.
- Oliveira-Costa, J.P., Zanetti, J., Oliveira, L.R., Soares, F.A., Ramalho, L.Z., Silva Ramalho, F., Garcia, S.B., and Ribeiro-Silva, A. (2010). Significance of topoisomerase III $\beta$  expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. *Hum Pathol* 41, 1624-1630.
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25, 99-104.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., *et al.* (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132, 422-433.
- Pearson, H. (2006). Genetics: what is a gene? *Nature* 441, 398-401.
- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., and Pinaud, E. (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14362-14367.
- Pfeifer, G.P., and Riggs, A.D. (1991). Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR. *Genes Dev* 5, 1102-1113.
- Phillips, J.E., and Corces, V.G. (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137, 1194-1211.
- Pikaart, M.J., Recillas-Targa, F., and 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, 2852-2862.

- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., and Cogne, M. (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* *15*, 187-199.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Peron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogne, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* *110*, 27-70.
- Pruitt, K.D., Tatusova, T., Brown, G.R., and Maglott, D.R. (2012). NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res* *40*, D130-135.
- Ramakrishnan, V. (1997). Histone H1 and chromatin higher-order structure. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* *7*, 215-230.
- Razin, S.V., Iarovaia, O.V., Sjakste, N., Sjakste, T., Bagdoniene, L., Rynditch, A.V., Eivazova, E.R., Lipinski, M., and Vassetzky, Y.S. (2007). Chromatin domains and regulation of transcription. *J Mol Biol* *369*, 597-607.
- Recillas-Targa, F., Pikaart, M.J., Burgess-Beusse, B., Bell, A.C., Litt, M.D., West, A.G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6883-6888.
- Regnier, A. (2011). Insulator/Boundary-Elemente an der 3' Grenze des Igl-Locus des Menschen. . In Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Ribeiro de Almeida, C., Stadhouders, R., de Bruijn, M.J., Bergen, I.M., Thongjuea, S., Lenhard, B., van Ijcken, W., Grosveld, F., Galjart, N., Soler, E., *et al.* (2011). The DNA-binding protein CTCF limits proximal V $\kappa$  recombination and restricts kappa enhancer interactions to the immunoglobulin kappa light chain locus. *Immunity* *35*, 501-513.
- Roldan, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus 'decontraction' and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat Immunol* *6*, 31-41.
- Romanow, W.J., Langerak, A.W., Goebel, P., Wolvers-Tettero, I.L., van Dongen, J.J., Feeney, A.J., and Murre, C. (2000). E2A and EBF act in synergy with the V(D)J recombinase to generate a diverse immunoglobulin repertoire in nonlymphoid cells. *Mol Cell* *5*, 343-353.
- Roos, G., Adams, A., Giovanella, B., Lundgren, E., Nilsson, K., Nordenson, I., and Sundstrom, C. (1982). Establishment and characterization of a human EBV-negative B cell line (MN 60). *Leuk Res* *6*, 685-693.
- Rosenfeld, C., Goutner, A., Choquet, C., Venuat, A.M., Kayibanda, B., Pico, J.L., and Greaves, M.F. (1977). Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* *267*, 841-843.
- Roth, D.B., and Roth, S.Y. (2000). Unequal access: regulating V(D)J recombination through chromatin remodeling. *Cell* *103*, 699-702.

- Rothman, P., Li, S.C., and Alt, F.W. (1989). The molecular events in heavy chain class-switching. *Semin Immunol* *1*, 65-77.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning* 2nd edition. Cold Spring Harbour Press, New York, USA *1-1-1989*.
- Sayegh, C.E., Jhunjhunwala, S., Riblet, R., and Murre, C. (2005). Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev* *19*, 322-327.
- Schatz, D.G. (2004). Antigen receptor genes and the evolution of a recombinase. *Semin Immunol* *16*, 245-256.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T., and Gey, G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* *97*, 695-710.
- Schneider, R., and Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* *21*, 3027-3043.
- Serwe, M., and Sablitzky, F. (1993). V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J* *12*, 2321-2327.
- Simpson, J.C., Cetin, C., Erfle, H., Joggerst, B., Liebel, U., Ellenberg, J., and Pepperkok, R. (2007). An RNAi screening platform to identify secretion machinery in mammalian cells. *J Biotechnol* *129*, 352-365.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* *98*, 503-517.
- Stalder, J., Larsen, A., Engel, J.D., Dolan, M., Groudine, M., and Weintraub, H. (1980). Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNAase I. *Cell* *20*, 451-460.
- Stanhope-Baker, P., Hudson, K.M., Shaffer, A.L., Constantinescu, A., and Schlissel, M.S. (1996). Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro. *Cell* *85*, 887-897.
- Steen, S.B., Gomelsky, L., and Roth, D.B. (1996). The 12/23 rule is enforced at the cleavage step of V(D)J recombination in vivo. *Genes Cells* *1*, 543-553.
- Sun, F.L., and Elgin, S.C. (1999). Putting boundaries on silence. *Cell* *99*, 459-462.
- Svoboda, S. (1999). Regulatorische Elemente im Immunglobulin-Lambda-Locus des Menschen. In Diplomarbeit der Fachhochschule Weihenstephan, Fachbereich Biotechnologie, durchgeführt am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Takeda, S., Zou, Y.R., Bluethmann, H., Kitamura, D., Muller, U., and Rajewsky, K. (1993). Deletion of the immunoglobulin kappa chain intron enhancer abolishes kappa chain gene rearrangement in cis but not lambda chain gene rearrangement in trans. *EMBO J* 12, 2329-2336.
- Teng, G., and Papavasiliou, F.N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* 41, 107-120.
- Thurman, R.E., Rynes, E., Humbert, R., Vierstra, J., Maurano, M.T., Haugen, E., Sheffield, N.C., Stergachis, A.B., Wang, H., Vernot, B., *et al.* (2012). The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* 489, 75-82.
- Tomlinson, I.M., Cook, G.P., Walter, G., Carter, N.P., Riethman, H., Buluwela, L., Rabbitts, T.H., and Winter, G. (1995). A complete map of the human immunoglobulin VH locus. *Ann N Y Acad Sci* 764, 43-46.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N., and Pirrotta, V. (1978). Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 Pt 2, 921-931.
- Udvardy, A. (1999). Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO J* 18, 1-8.
- van Baren, N., Chambost, H., Ferrant, A., Michaux, L., Ikeda, H., Millard, I., Olive, D., Boon, T., and Coulie, P.G. (1998). PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol* 102, 1376-1379.
- van Driel, R., Fransz, P.F., and Verschure, P.J. (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* 116, 4067-4075.
- Vasicek, T.J., and Leder, P. (1990). Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. *J Exp Med* 172, 609-620.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 615-619.
- Volpi, S.A., Verma-Gaur, J., Hassan, R., Ju, Z., Roa, S., Chatterjee, S., Werling, U., Hou, H., Jr., Will, B., Steidl, U., *et al.* (2012). Germline deletion of Igh 3' regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5-7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the Igh locus. *J Immunol* 188, 2556-2566.
- Wadelin, F., Fulton, J., McEwan, P.A., Spriggs, K.A., Emsley, J., and Heery, D.M. (2010). Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia. *Mol Cancer* 9, 226.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.



- Weintraub, H., and Groudine, M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* *193*, 848-856.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., *et al.* (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* *451*, 796-801.
- West, A.G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev* *16*, 271-288.
- West, A.G., Huang, S., Gaszner, M., Litt, M.D., and Felsenfeld, G. (2004). Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell* *16*, 453-463.
- Wu, C. (1980). The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* *286*, 854-860.
- Wu, C., Bingham, P.M., Livak, K.J., Holmgren, R., and Elgin, S.C. (1979). The chromatin structure of specific genes: I. Evidence for higher order domains of defined DNA sequence. *Cell* *16*, 797-806.
- Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J., and Wallace, R.B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* *10*, 233-238.
- Xu, C.R., and Feeney, A.J. (2009). The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *J Immunol* *182*, 1362-1369.
- Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* *40*, 271-281.
- Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu Rev Immunol* *4*, 339-368.
- Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Suh, H., Hood, L., and Alt, F.W. (1986). Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* *44*, 251-259.
- Yancopoulos, G.D., Desiderio, S.V., Paskind, M., Kearney, J.F., Baltimore, D., and Alt, F.W. (1984). Preferential utilization of the most JH-proximal VH gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* *311*, 727-733.
- Yao, S., Osborne, C.S., Bharadwaj, R.R., Pasceri, P., Sukonnik, T., Pannell, D., Recillas-Targa, F., West, A.G., and Ellis, J. (2003). Retrovirus silencer blocking by the cHS4 insulator is CTCF independent. *Nucleic Acids Res* *31*, 5317-5323.
- Yusufzai, T.M., Tagami, H., Nakatani, Y., and Felsenfeld, G. (2004). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell* *13*, 291-298.
- Zhao, H., and Dean, A. (2004). An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucleic Acids Res* *32*, 4903-4919.

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

## 10 ANHANG

### 10.1 Sequenzen der verwendeten DNA-Sonden

#### Sonde RE 01:

GGTCACTTTCCCTCACCGTCTTGGTTTCAGTAGGTTTTGGCCGGCTTCTTTAGCGTATCCTGTCTTATC  
 AGCAGGGTCTTTATGACCTGTATCTTGTGATCCAGTCTGGTTGACTTCCTAGCTCATCCTGTGACTA  
 AGAATGCCTAACCTCCTGGAAATGCAGGCCAGCATGCCTAAGCCTCATTTAATCAAGCCCCATTCAA  
 CATGGAGTCACTCTGGTTCTAACACCTCTGACTTAGGGTGGCTGCAGAGCTGGAGGTGCAGATTGGGG  
 CAGATCAGCCTCCTGAGAAAAGCACACAGAGCCACTGCGGGGCTGTGAGGTGGGAGAGATGAACTCAC  
 ATTGGCATTGATCAGTGACTCTCCAGCTGTAATGAGAATAGAATGGAGAGGCCTGGGACAGGAAGAC  
 AGGATGTGGTTGCTCATGCCATCCTGGTGGGAAGATCTAGGTGAGTTACTGTGGGGTAAAGAGGAGAG  
 AGCAGATTCCCTGTCACTTTATGCTGTAGAATACATTGGACATGGAGAGGGCTTGGAGCTTGTGTGTG  
 AGAAAAGCAGATCTATCTCGGCTGACTCCCAACAACTGGCTGAGAATTTAGATGGAGGATTATTATT  
 AAATAAAAGAGGAAGACTGAAATGAATATTGTCATCGTATTTTTTTTACCCAGGGTTGGGATAGGTGGA  
 AATGT  
 TTTACTGCGTGACTACTAAGTAATAATATTATACAGTTTTTAGCGTTACCATGGAGAATCAAATTGTC  
 AAGGTCACAGGCATCTTTTTGTTTTGTGTGGATCACTGTGAAAGATACTATGCTAAATTTTTTCTGAA  
 TCATGCAGATGAAAGCATTAAACACATACACAAACATTTACGTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
 GTGTGTATGTGTAATCTATCTCAGCATACAATGCCACTGAAACTACACTTGCGGATTAGGTCCTCGGA  
 AAAATAATCGTGTTAACATTACAGATGCAAATAGAATGGTACCTGAC

#### Sonde RE 02:

GTTATTTAACTGGTTAGTGAGGAACTGAGAAGGTGTTAAAAATCAGTTCTAGGGAGAATCCAAAATAA  
 GATCCAGAATATTGAAATGAATATGCAAATGGAGGTAAAATTTGGCTTCCAGTAGGGAGAGAAGCCAAT  
 TGAATAGGACAAAATGTACATGTCTAGAGACGAGAATTATGTTGCAGTGCTATCACCAGTCTTCTAAA  
 GTAGCTCAAAACAATGAAAGACGAGAGACAACCTGGAAGGGTTGTGATCCACTTCAGTGGAAAATAT  
 CCTATCCACCTAGGATAGGATAGAATCCATCATTACAGCCAGCTTATTCATCCCAAGTCATACTAGATT  
 CAAGTTTGAGTTCTACGAGACAGACTAAAATTTACAGGGCTATTTTATTACCAAATTCGAAAACATAA  
 ATTGAAAATGATGTCTCTAAAATTTAACTACTGACCAATCTCACTTACGAATATCAAT

#### Sonde RE 03:

GCAGGGTACCCAAGGGCCAGGGATCATGTAGGACAAGTCGTTGACGCTCAGATCCAGCTTCTTCAGG  
 CAGGTGGTATGATGGCTCCGGGACAAGTAGGTGATGTGAGTGTCCAGAAGCTTGCAGTTGCAGATCTC  
 CAGGGAATGTAGTGGGACCCACAGACAGCTGAGGAGAGAAGGGTGGCTCTGTGAGGGGAGGGCCAGG  
 CACCCACCCGGAACACCTATTTGTCCATGGAGGAGGCTAGTCCTATGGCCACCCCTCATCAGGGAA  
 GCCATTTACCAGCAGGGTCAGGAGCATGTCTTTGGTGTCCCAAGGCCTGGCTCTCTCTCAACAGACC  
 TACCAGGTCTCCACGAACCCTTCTAACTCTAAGTTTCTCTTCGGTCAAAGGGAGATGCACATTATCC  
 ATACCTAATAAGACTGCTGAGAGGAGCCATTTGAAAGCGCTTATCTGATGAGAAGTAACCATAGGCTG  
 AGGCCATTATTCCTCAGGTTTGGGTTTGGGAAGCTGCTGCTCAGGCTTCCATTTAAGCCAGGGCTGG  
 GGGTCTGAATGCCCTATCTTGAAATTTCTAGGAGACGTGCACAGAGTGGATACTGATTGTCCTTCAG  
 GGCTCTGTACCCACCTGTCTGGGGCAGTATGAGCTC

#### Sonde RE 04:

GGAGGGAATTCAAAGATAGGGGGAAACAGCACCTACCAACCACCCAGTGGCCAGAGTTGGGGGTGA  
 GTGGCAGACATTCCCTCTCGAGCTCCCTGGTGTCTCAGTAGTGCCTGTGGCCATAGCTCAGTCCATTG  
 GCTACTCTGGAGTGACGTGAGGTCCACAGGACAGTGGGAGTATCCAGGGGTGACAATGCCTGGGGCAT  
 AGCCTCATCAGACCTTGACTGGGGTGTAGTCCCTGGCTGCGTCTCCTTCCAGGGCTGGTTTCTAC  
 TACCTGTACCTAATAGCCCCACCAGGCCAGCATATGGATAATGACTGTCTTCAATTTTCAATTGTA  
 TTGTGCCTTGTGCCTTATGGGAACCCAGCTTTGGCACATTGCCAGGAGTGGAAGCAAATGCACCCCA  
 CTGTGACATACTGAGATGCTTCAATTACCACCTGCCGACCCGAACCAAATCTACCCAGCCAGGGTGG  
 ATCACATTAGGAAAAATGTCTGTAACACATAAACGACCGTGTTACAGACCAAAGCAGGGCTGGTC

TCTCCTACCTCTAGAGAGGATTTTGGCAATTGACTGTGCCAAGGACGGCTTTTCAGCAACCATGAGCA  
CAGTCTTCATTTTGTCTCGGTCCCTCAC

**Sonde RE 05:**

TTCAAAGCAGAACTCCTGATTCCAAACCCACACCTTGGTAGGTTCTTCGTCTCCAAAATGGCAACTCC  
ATCTTCCTGGTTGCTCAGGGACAGAGCCTGGGAGCATCCTGGACCACCCACAAATCCTGCCATTACTG  
TCTTTACAATACAGATGCTCCTCAACTTCAGATGGAACCTACATCCACATAAACCCATCTTAAGTTGAA  
AATATTGTGACTCGAAAGTACGTTTTTACTTATGGTATTTTCAACTTACTATGGGCTTACCCAGATG  
TAGCCCCATCATGAGTCAAGAAGCGTGCAGAATGCATACTGGTTTTGTAGTTGAAAAATCCTGTAGGT  
GGAAATTGTCCTAAATCGAAGACTGTATATCGGAGATCCCCTCAAGTCTCCCTGCCTCCCTGCCACCA  
CCCTGATCCGAGCTCCTCCTCTCCCTCCAGGTCTCCACCTTGCCGCCCTGCAGTGTGTTCTCCACATA  
CCAGCCAGGGCTAAGATTGGCTCTGTTGGGTGCTACCAGTTGGCTGAAAGAGAAAACCCAGAGGCCCTC  
AGCTCATTCCATCAATCCAGTTCCAGAGTTTATTGTATGGAGCCCTAGGAAGGACCTGAGGCCTGGGC  
CAGCAGGAGGCGCTGAGTGGTCAGCTCTGAAGGCCAGGGCGTCGGGAAGTGTCTTGGTCAGAGCAGA  
GAAAC

**Sonde RE 06:**

GTAATCCCCCTATACAGGAAGGAAAGGCATATCCTTATTTCCAAAGATGAACGCTTGCCAAGAGGGAT  
CTGAACACACAGGCCCGCTGTTCCGCCATTTTATTACACTTGGCTCATACTCTCATACTTCTTTTGTCT  
TTATCATTATTTCTCCATGACTAATCAAAATTTTTTCTCTCTATATATAAACATATATATATAAT  
ATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGACAGAGAGACAGAGAGACAGA  
GAAAGAAAGAGAGAGGGAAAGAGAGGAGCTGTATCATGGGTATTTTTGTTGATGTCTGAATTAGAAAC  
AAGCATGCACACTATCAACATTGTTTGGGAAAGTTGTAGCCGGTGCAGTAAGACACATAACAATAGGG  
TTGTCTAGGGCAATAAAAAGAGGCCAAACGATTATGTACATAGTGTAGGAAAAAATGGTGTGCGGCTC  
AGAATGTCACCCCGAAATACGGAACTTTGAAGGTGTCTCTCTGACTTTTCCCTGCCTTTCTGTGTGAG  
AGCTAGTCATAAAGGAATTCCTTG

**Sonde RE 07:**

TCTTCATTTCTGAAGGTTCCCTGTATCACGCAAACTTTGATACATTTGTTATGGTGTCCCTTTGTTAA  
TCTGCCTTTTTTAAAATAGGGGTATCAGCAAAGACCCTTGAGATGGGTGAGGAAAAGCTATGATTTTTT  
CTCCTCTACAGTGGAAGCAATGGATCCTCTGTAATGTACCCTTCTGGGTTATCAGATTTGAGTCCCTG  
TTCATTATCTTTGAGCTATTTTTTAACCTTTATAAGTTGTAGGTAACCTGATAGACATATAAATTTCTGTC  
TGGTCTGGTAATGATTTTCTCCTAACCTTCTACCTGTGGAAAATTTGTCTCCATCTGAAATTCATCTC  
AACATCCCTTCATGTCATATAAATATGTGCTGTCTTAACCTTCTTTAACATCTGCCTGGTACTTCAT  
ATTATATGAGTAAAATAAATTTCTTTAATACATGTTTCTTATATCTGTATAAAGTCACAATTTCTAC  
TTTTCTGAAAATTTCTTTTAAACAATTGGAAGCTAAAAGGATAAATAGGAAACAGTTAATATAATT  
AATAGGAGTATTTCTGCTGATGTGACTGCACAAGAGTGCCAGTATTTCCAGCAAGAAGTGTGAGCTGTA  
AATGTAT

**Sonde RE 08:**

AGGTGCCTTCCCTGACCTGCTTTGGCAGCCACTCCTGATTCTTCTGACTTTGCCCTGTTGTAGGGACT  
TCCTAAACGGTTGTGACCCATGCTCTCCATGTATGCCCGGTCTGAGGACAGCAGCGCTGGCCCAAGC  
ACACGCTCGATGGTGATCAGCTGACTGATGGCCGCTGCTCTGGGTTTTGGTGCCAGGCATGTGCCTCC  
TTCCAGTCTCCCAACAGCCCCAGAGCTGTTTCCAGACTCCAGTGCACAGCTCATGTCCAAAGGTGGGG  
AAGTCAGCTAAGGACCCACTTCATTCTACCCAGAAGCATAAGACAAAGAGAACTGAGTGAGTGGCCA  
GAAGAGGGAGTGTTCGCCAGGGAGGGCTGGACCTCTGGGGTCTCTGGTGTGATCTGGCGGTAGAGCCACC  
TGGATAACGTGTGCCGATTGAATGAACAGGTGAAACAGGCCAGGCTTTTCCACTGGGGAAAGGGGAGCGA  
GAGGAATGAAGAAAGCGCCAGATAGTTCCCATGGAAGTTTATTTTATGTTTCTTGCACAAACATGTG  
GCCTCAGCTGTGATTCCAGCTGCCCTCTCTGACTTCTGTTCCCTGAGCCTGGCTCCTGTTCTTCATTC  
AAACTGCACCAGCTGCATAAGCAAAGACAGTGGAGGGGCTCCACTGCATGTCAGCCTGCTGCATGGCT  
TGCAGCTGCTTCTGTATCTCGGCCGCAACTGGCACAGCTTGTCTCGTTTACAGGACCCCGGCAGAC  
GCCATGCAGGTAGATGCAGCAGTCAACTGGGATGGGATAGAGTACCTGCTTCCAGCTCCATCAGCCCCA  
TGGTGTGCTCCAGCAGGCTCAGGAGGCAGGCACTGGAGATGGGGTTGTGCG

**Sonde RE 09:**

GATAGTGTGGGAGAGAGGTTACATTTATTTTAAATGATGATTGTTCTTTTCTAAGCCGAAGGGATT  
TATTCAAAGTGATAGGCATAGCAAGTCTTATGATGAGATTTTTTTTCAATGATACCAATCAAATTTCT  
AGCCTCCAAAATCAACTCTGACAGGATTAGAAAAGGAAAATGGAGACAAACATGTCTGTGGGGTGAGG  
GGGGCTGTTTGGAACTAGGATGTGTGGCATGGAGTTTTTGGCTTGGAGCAGGAAGTAGACTAGTGTGA  
AAGACACAATACATTAGACAATTAAGGAGAAGATATTATTTCAGCTTATTGCAGTAGAGAGAGCACCCC  
AGATCCAATGGCTAAAGTGTCTCAGCACAGTGGTTCTACCTTAGACTTTTTATAGCCAGGGGTAAACAA  
GTTGCAGAAGGTGTTGTTTTGCAAGTAGGGGACGTCTTGGTTATCTGAACGTCAAATGTTTTCTCTGT  
GGTCAGTTTCAGTGGGATAGACTCTTCTAATCTGCTAATCAATCAAAGAATAGGAGGTTGGAGCATCT  
GGGTCTAACCTTGTGAGCAGGCTCAGGCAAAGGGACTGTTTGGCTTTGCCAAAGGAGTCAT

**Sonde RE 10:**

GCCCTATCAAACTCTAAGAGCATTGTGTGCTGTTAGAGGTAAAGCATTGTGTGAAATGTTTGCTGAG  
AATTGCCATCTTTTAAAGAAGGCCACCAACCTTATCTCCTGGGAATTTTCCATTCAATGCCATTCCTG  
AACAGCCCCTACACATGTTTGAACCATCAACTGTAACAGTGTCTGTGATGCTGACCAGATGGCACAC  
GTGGGTCAATCAACTTTTTCCAGAATATACTCTGGGGGTACAAACACCTTAAAAAGTTACATTCACAG  
CAGTTTGTACCACATAGAAACCAAGACTCCTTTTGGGAGTGAGAACTACAATAATAAAGTACAACAT  
ATCAGGATCACAGAAGGTAGGATTCGGATGATGGATGTGTGAACAGAGATGATGGATGGTGAACACTACA  
GAGACAGGCT

**Sonde RE 11:**

CCTCCCCATTCCCAATTTACCCCTGATGTGCACATCCTACCTGGTGCCTAGTCATCCCGGTGGCCCC  
TCTCTGGGCTGTATCTAGGGAGAGTGGTGACCTTGGTCATCTTCCCTCAGGTCCAAGTATCCATAAGAG  
AAGCAGACTTTTCTCTCTTTTATAATGATGGTCTCTTCTTGAATAATTTCCCTGTGCATTTTCATTAA  
GGGTCTCACCCCATCAAGGGTGTGATGAGGACAGTGTGAGGGTACCGGAGCCCGGCCCTCCACGGGG  
GGATGTGGGGTATGATGAGAGAGAGAAGCAGGTGCCCTCAGGCCATATGGAGGCTGGGGAGGGTTGT  
TAACCTCCTGCCCTCCTGGCCACTGGGTGCAGGACATGTTCTCTCTGAGGCTCACTCACCTATGGCC  
CCAACCACACAAAAATCTAAATGGGGAAGAAGCAGAGGATGACTTCATGCTGAGGAGGCCATCTTGC  
AGCGAGAAATGTGCTGTGGTGTGACACCTGCAGCACAAAGAGCCTGGGGTGGGGTGGAGGTGCGTGAG  
CGCTGCCTCTGTGTGGGGATGGTGTGCGCAAGGCAGTGTGAGGACCTTCAAGCCAGTCAGGAATGAA  
CCTGGGCTCTGAGACAGTGGAGGGAAGTGTGGCCTGTCCCTGAGGGTCTGTGGGGTTTTCAACTGGGA  
AACCAGGCCCTGGACCCCTACCTTGGGCCCTCTGCTCTGTGCTTTCTGGGGCCAGCAGCTGGGACCT  
CCCAGGAGCAGAAGAGGCTCCTCTAGCCCCACCCACACTCAACTTTCCCCAAGTTCAGGCCAGGGA  
TAGCAGGGGGAGGGGTGTGATTTGCATGAAGGGTGC

**Sonde RE 12:**

GAAGCACCAAGCCAAGATAGTTTTATAGGGGAATGCTACTAAACTTTATCCTGAACAGGGACATCTCA  
TTCTAAATGAGATGTGTCCGAGGCATATCTCACAATGTGAGGGAAGGGACAAGGACACCCACGTTTCAT  
GTATTCTAATTAATACCATACTGGAGAGCCTAGTCAGGGTGTAAAGGAATGAAAATTATATTAAGAC  
ACAGGATTAGAAATGAATAAATACAATTGCTGTTATTGCAGATGACACGGAAAACACAAAAGTATCCA  
TAAATTAATTAAGAAATAGAAGGAAGAATAGCAATAGAAGTCTCAAGGAGTGCAGGATGGGTGAGGG  
GCGGCATGGGAATGAGACATGCATTTAGTATCAGTAACGTATGCAACAAAAATATTAAAAACAATTCCA  
CTTAATTAGCCTGTTTCCACCTTAATCACCTGTGTTCCATCCAGTTGCTTCTTCTCCAGGTGACTTC  
ACATGAAGGGCCAAGGGTTCCATGACTCTCCATTTG

**Sonde RE 16:**

AGCTGAATTCCTATTACTCCTATGCTATGCTGATGGAAGAGAAGTCTTCTCTAACTTAGTCCCAGTGA  
GATTGCCTCCTCTGGGCCAACAAATGCTCATCTAGAACTTGGAAATTTTCGATAAATCCATTCTGAGGTGA  
TGAGCAGCAGCAGCACCAGAAAAGTTGATCCAGGCCATCTAGGACCCTCCAGGGAAGGGCTCAGGCCT  
GTCAAAGAGGCCTGATAGAACTGGGGCCTGCAGTCAGTCAGGACATTGAAGCTCTCCTGACACGGT

CCCACCAGCTGGGAAAACACTCGGGGTCTCCCTCGGGTTTGTATCAGATGGCAAGTTCCCCATTCCCTG  
 ATTGGCCCAAAGCTTTGACCTGTTGGACCCGGGGCCTATCAAAGGCCAGGTGTCCTCTCCCCATTGGA  
 AACCTCCCTAGGCTCAACTCTTCTTCTCATTTCTCCTGCTGGCCTGGGAGCATCCAGGCCAAGGGGT  
 GAGGTGGGGACAGCCCTACATTAAGTTTTTATTTCAAGGTAGAAAATCTGTCCCTTGATTGTGCGACA  
 GCT

## 10.2 Sequenzen der CTCF-bindenden Elemente 13376 und 13377

13376:

CAGAATGCATACTGGTTTTGTAGTTGAAAAATCCTGTAGGTGGAAATTGTCCTAAATCGAAGACTGTA  
 TATCGGAGATCCCCCTCAAGTCTCCCTGCCTCCCTGCCACCACCCTGATCCGAGCTCCTCCTCTCCCTC  
 CAGGTCTCCACCTTGCCGCCCTGCAGTGTGTTCTCCACATAACCAGCCAGGGCTAAGATTGGCTCTGTT  
 GGGTGTACCAGTTGGCTGAAAAGAGAAACCCAGAGGCCCTCAGCTCATTCCATCAATCCAGTTCCAGA  
 GTTCATTGTATGGAGCCCTAGGAAGGACCTGAGGCC **TGGGCCAGCAGGAGGCGCTG**AGTGGTCAGCTC  
 TGAAGGCCAGGGCGTCGGGAAGTGTCTTGGTCAGAGCAGAGAAACTGCAGTTGCCTTGTGCTTTCTT  
 CCCGGAGAGCCCTGCAGCTGACCTCTGCCAGAGCTTTGGGTGAGGCTTTCTGACTGACCCTTAGGTT  
 GACAAATGACCCAGATTCAGAGGAACCCTTCAACTTGGAGGTGTCTCCCTATTGGGACTCCC

13377:

GGAGACATTCTGTTCCAGTCAATGTAATTTATCCATTACACCTACCAAATAGAACGTGTATGAGAGA  
 CACCTTTCTCCTGAGGACTTTTGCAAAGTGGGTGGATCATGTGTCCCGCTCCCACTGAAAAGGGCTA  
 AATGAAAACATAAGTCTGAAATAAAATAGGAGGCTGCCCTGACGAGGGGTCCCACTTTGCCCTTGGA  
 CAGAGAACAGGCCGTGGTCAAGGCCCTGGTCCGGGCAGAAGCCTCTGTCAGGACCCACTGGCATCTGG  
 TCACAGACACGATGGACCTGGGC **CTAGGCAGAAGGGGTGCTG**TTGGTCTGCTGCTGAGGGCTCTGTG  
 GGTTCCTCAGCTGGGAAACCAAACACTTGAACTTGGTCTCCACGCAGGGTTCCTGAGGGCCAGCAGCT  
 GGGCTCTCTCTGCACCCTTGAGAGCCTCAGGCCAGGCCAGCCAGGTAACCCCTCCCAGAAATGTC  
 ACCCCACCACTGGGACTGACACTCAGGCACACGGAGTGATTTGGTTGGGCAGAGGAAGAGGAGCACAT  
 TTGCATGAAGGGCCCTCTCTCTCCTCTGGGACTACAGGGTGGGTAAGAAAATACCTGCAACTGTCAGC  
 CTCAGCAGAGCTCTGGGGAGTCTGCACCATGGCTTGGA

## 10.3 Tabellen der verwendeten Membranen

Membran	Zelllinie	DNase I Konz.	Spaltungen
<b>bRE 01-1</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I, Bgl II
<b>bRE 01-2</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I, Bgl II
<b>bRE 02-1</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I, Bgl II
<b>bRE 02-2</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I, Bgl II
<b>bRE 03-1</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I
<b>bRE 03-2</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I
<b>bRE 04-1</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I
<b>bRE 04-2</b>	MN 60	-	Bam HI, Eco RI, Hind III, Acc 65I

**Tab. 9: Übersicht der Blotmembranen für die Testhybridisierungen.** Die Ursprungs-DNA und die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angegeben.

Membran	Zelllinien	DNase I	Spaltungen
<b>bRE 05 A</b>	BJAB	0-20 U	Acc 65I
<b>bRE 05 B</b>	MN 60	0-20 U	Acc 65I
<b>bRE 06 A</b>	MOLT-4	0-20 U	Acc 65I

---

<b>bRE 06 B</b>	REH	0-20 U	Acc 65I
<b>bRE 07 A</b>	HeLa	0-20 U	Acc 65I
<b>bRE 07 B</b>	HeLa	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 08 A</b>	BJAB	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 08 B</b>	MN 60	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 09 A</b>	MOLT-4	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 09 B</b>	REH	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 10 A</b>	BJAB	0-20 U	Acc 65I
<b>bRE 10 B</b>	MN 60	0-20 U	Acc 65I
<b>bRE 11 A</b>	BJAB	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 11 B</b>	MN 60	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 12 A</b>	BJAB	0-20 U	Hind III
<b>bRE 12 B</b>	MN 60	0-20 U	Hind III
<b>bRE 13 A</b>	HeLa	0-20 U	Acc 65I
<b>bRE 13 B</b>	HeLa	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 14</b>	HeLa	0-20 U	Hind III
<b>bRE 15 A</b>	MN 60	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 15 B</b>	HL 60	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 16 A</b>	BJAB	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 16 B</b>	MOLT-4	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 17</b>	HeLa	0-40 U	Bgl II
<b>bRE 18 A</b>	MN 60	0-3 U	Bam HI
<b>bRE 18 B</b>	HL 60	0-3 U	Bam HI
<b>bRE 19 A</b>	MOLT-4	0-3 U	Bam HI
<b>bRE 19 B</b>	REH	0-3 U	Bam HI
<b>bRE 20 A</b>	MN 60	0-3 U	Hind III
<b>bRE 20 B</b>	HL 60	0-3 U	Hind III
<b>bRE 21 A</b>	BJAB	0-3 U	Hind III
<b>bRE 21 B</b>	MOLT-4	0-3 U	Hind III
<b>bRE 22 A</b>	HeLa	0-40 U	Hind III
<b>bRE 22 B</b>	REH	0-3 U	Hind III
<b>bRE 23 A</b>	MOLT-4	0-3 U	Eco RI
<b>bRE 23 B</b>	REH	0-3 U	Eco RI
<b>bRE 24</b>	HeLa	0-40 U	Bam HI
<b>bRE 25</b>	REH	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 26 A</b>	MN 60	0-3 U	Eco RI
<b>bRE 26 B</b>	HL 60	0-3 U	Eco RI
<b>bRE 27 A</b>	BJAB	0-3 U	Eco RI
<b>bRE 27 B</b>	HeLa	0-20 U	Eco RI
<b>bRE 28 A</b>	MN 60	0-1 U	Acc 65I
<b>bRE 28 B</b>	HL 60	0-1 U	Acc 65I
<b>bRE 29 A</b>	BJAB	0-3 U	Acc 65I
<b>bRE 29 B</b>	MOLT-4	0-3 U	Acc 65I
<b>bRE 30 A</b>	HeLa	0-1 U	Acc 65I
<b>bRE 30 B</b>	REH	0-1 U	Acc 65I

---

<b>bRE 31 A</b>	HL 60	0-3 U	Bam HI
<b>bRE 31 B</b>	REH	0-3 U	Bam HI
<b>bRE 32</b>	HeLa	0-3 U	Bam HI
<b>bRE 33 A</b>	MOLT-4	0-1 U	Bam HI
<b>bRE 33 B</b>	MN 60	0-1 U	Bam HI
<b>bRE 34 A</b>	MOLT-4	0-1 U	Hind III
<b>bRE 34 B</b>	MN 60	0-1 U	Hind III
<b>bRE 35 A</b>	HL 60	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 35 B</b>	REH	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 36 A</b>	BJAB	0-3 U	Bgl II
<b>bRE 36 B</b>	HeLa	0-3 U	Bgl II

**Tab. 10 Übersicht der Blotmembranen für die DNase I Hypersensitivitätstests.** Die verwendeten Zelllinien sowie die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angegeben.



## 11 DANKSAGUNG

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. H.G. Klobeck für die sehr engagierte Betreuung dieser Arbeit, für seine stetige Hilfe und seine Unterstützung, auch über diese Arbeit hinaus, für seine Anregungen und Ideen, die Neugierde und die Passion die er wecken konnte, und nicht zuletzt für sein Verständnis und seine Geduld. Leider konnte er, nach seinem unerwarteten und tragischen Tod im März 2013, die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr erleben. Die Erinnerungen an ihn bleiben jedoch lebendig und ich werde ihm immer dankbar sein.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Adolf-Butenandt-Institutes für die Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, besonders bei Andrea Schmid und Edith Mentele.

Ganz besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. R. Rupp, der sich nach dem Versterben von Prof. Dr. H.G. Klobeck freundlicherweise bereit erklärte, diese Arbeit weiter zu betreuen.

Zudem danke ich dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) für die Schaffung der finanziellen Rahmenbedingungen dieser Arbeit.

Auch meiner Familie, meinen Freunden und Arbeitskollegen möchte ich danken für ihre Unterstützung während der Arbeit. Hervorheben möchte ich darunter Chris Evans, einen engen Freund, der mir gerade in den letzten Monaten wertvolle Motivation und mentale Unterstützung war, und leider ebenfalls nicht mehr unter uns weilt.

## 12 LEBENS LAUF

- Name:** Ruth Eichner
- Geburtsdatum:** 25.11.1983
- Schulbildung:** Clavius Gymnasium Bamberg 1995-2003  
Abitur (27.06.2003) mit der Note 1,0
- Studium:** Humanmedizin, TU München 2003-2010  
- 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (26.08.2005): Note 1,5  
- 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (19.11.2010): Note 1,5  
Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ (FöFoLe), LMU 2006-2007  
Erasmus-Aufenthalt, Université Paul Sabatier Toulouse 02-06/2008  
Famulaturen u.a. in New York (Mt. Sinai) und San Francisco (UCSF)  
PJ-Tertiale u.a. in New York (Cornell), Tel Aviv, Zürich und München
- Master „Cancérologie“ (Molekulare Onkologie) an der Université Paul Sabatier Toulouse 2008-2009, Note „bien“
- USMLE (US Medical Licensing Examination) Steps I, II CK, II CS, ECFMG certificate 2011
- PhD Program “Molecular Life Science and Technology” an der TUM, seit 10/2011
- Forschung:** Doktorarbeit über regulatorische Elemente im humanen I $\gamma$ L-Locus bei Prof. H.-G. Klobeck, Adolf-Butenandt Institut, LMU München, 2006-2011, eingereicht 2013
- Masterarbeit über die Rolle der microRNA 125b in der B-Zell akuten lymphatischen Leukämie bei Prof. P. Brousset am Institut für Pathologie, Université Paul Sabatier Toulouse, 2008-2009
- Wissenschaftliche Mitarbeiterin/PhD-Studentin bei PD Dr. Bassermann, III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, TU München, seit 2011
- Ärztliche Tätigkeit:** Assistenzärztin in der III. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar, München, seit 05/2011
- Stipendien/Preise:** Stipendiatin des Max Weber-Programms der Studienstiftung / des Elite Netzwerks Bayern (vormals bayrische Begabtenförderung) 2003-2010
- Auslandsstipendium der Carl-Duisberg Stiftung (Bayer AG) 2008/2009
- Erster Preis bei der Summer School Oncology der ESO (European School for Oncology) und ESO-Stipendium 2009

**Publikationen:**

**Eichner R**, Essler M, Specht K, Wörtler K, Peschel C, Bassermann F, Ringshausen I. (2013). PET-MRI hybrid imaging in a rare case of B cell lymphoblastic lymphoma with musculoskeletal manifestation. *Ann Hematol*. 2013 Jun 18. [Epub ahead of print].

Bassermann F, **Eichner R**, Pagano M. (2013). The ubiquitin proteasome system - Implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar 1. doi:pii: S0167-4889(13)00086-4. 10.1016/j.bbamcr.2013.02.028. [Epub ahead of print].

Fernández-Sáiz V, Targosz BS, Lemeer S, **Eichner R**, Langer C, Bullinger L, Reiter C, Slotta-Huspenina J, Schroeder S, Knorn AM, Kurutz J, Peschel C, Pagano M, Kuster B, Bassermann F. (2013). SCFFbxo9 and CK2 direct the cellular response to growth factor withdrawal via Tel2/Tti1 degradation and promote survival in multiple myeloma. *Nat Cell Biol*. 2013 Jan;15(1):72-81.

**Eichner R**, Wörtler K, Essler M, Rudelius M, Peschel C, Ringshausen I, Götze K. (2013). Symmetric multifocal bone marrow involvement diagnosed by whole-body magnetic resonance imaging in a patient with B lymphoblastic lymphoma. *Ann Hematol*. 2013 Jan;92(2):277-8. doi: 10.1007/s00277-012-1552-9. Epub 2012 Aug 19.

Puissegur MP\*, **Eichner R\***, Quelen C, Coyaud E, Mari B, Lebrigand K, Broccardo C, Nguyen-Khac F, Bousquet M, Brousset P. (2012). B-cell regulator of immunoglobulin heavy-chain transcription (Bright)/ARID3a is a direct target of the oncomir microRNA-125b in progenitor B-cells. *Leukemia*. 2012 Oct;26(10):2224-32. doi: 10.1038/leu.2012.95. Epub 2012 Apr 3.

\* contributed equally

**Eichner R**, Schwendy S, Liebl F, Huber A, Langer R. Two cases of primary pulmonary angiosarcoma as a rare cause of lung haemorrhage.(2011). *Pathology*. 2011 Jun;43(4):386-9. doi: 10.1097/PAT.0b013e3283468789.

Coyaud E, Struski S, Prade N, Familiades J, **Eichner R**, Quelen C, Bousquet M, Mugneret F, Talmant P, Pages MP, Lefebvre C, Penther D, Lippert E, Nadal N, Taviaux S, Poppe B, Luquet I, Baranger L, Eclache V, Radford I, Barin C, Mozziconacci MJ, Lafage-Pochitaloff M, Antoine-Poirel H, Charrin C, Perot C, Terre C, Brousset P, Dastugue N, Broccardo C. (2010). Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique study. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3089-97. doi: 10.1182/blood-2009-07-234229. Epub 2010 Feb 16.

## Eidesstattliche Versicherung

# Eichner, Ruth

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Darstellung und funktionelle Charakterisierung von DNase I hypersensitiven Bereichen an der 5' Grenze des humanen Immunoglobulin  $\lambda$ - Locus**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 08.05.14**

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand