## Die Biologie des Transkriptionsfaktors Yin Yang 2

Dissertation (kumulativ) zur Erlangung

des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

## eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

David Drews

aus Frankfurt (Oder)

November, 2012

Die Arbeit wurde in einem Zeitraum von 4 Jahren unter der Leitung von Prof. Dr. Christof Dame in der Klinik für Neonatologie (Molekulare Neonatologie) der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christof Dame
- 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Constance Scharff

Disputation am 17.9.2013

#### Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die während der letzten vier Jahre zum Gelingen der Promotionsarbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Christof Dame möchte ich für die Betreuung der Promotion, anregende Diskussionen sowie die gewissenhaften Korrekturen des Manuskripts, herzlich danken. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er stets in meine Arbeit vertraut und mir den Raum für meine eigene Entwicklung gegeben hat. Besonders möchte ich ihm dabei für die Ermöglichung des Forschungsaufenthalts in Japan danken.

Weiterer Dank gilt meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Anja Bräuer und Prof. Dr. Masayuki Yamamoto, die mir immer mit anregenden Diskussionen und innovativen Ansätzen zur Seite gestanden sowie mir ihre Laboreinrichtungen und Mittel zur Verfügung gestellt haben. Ich habe mich immer von ihnen und ihren Mitarbeitern willkommen und als Teil der Gruppe gefühlt.

Bei Prof. Dr. Constance Scharff möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ohne das Vertrauen der Charité Universitätsmedizin Berlin, der Sonnenfeld Stiftung, der Nachwuchskommission der Charité, des Förderverein für frühgeborene Kinder im Virchow-Klinikum e.V., des Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) und der Berliner Krebsgesellschaft e.V. hätte diese Arbeit nicht realisiert werden können. Ich danke ihnen für ihre finanzielle Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich dabei bei Prof. Dr.-Ing. Dr. med. h.c. Hansjürgen Freiherr von Villiez von der Sonnenfeld Stiftung, der immer als persönlicher Ansprechpartner zur Verfügung stand und sich immer um das Wohl seiner Stipendiaten gesorgt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Martin Klar, der mich seit meiner Diplomarbeit fast täglich begleitete und mir immer mit seiner Expertise als Wissenschaftler in allen Fragen zur Seite stand. Ich danke ihm für die einmalige Zeit und die Unterstützung in allen Höhen und Tiefen, die die Zeit mit sich brachte.

Sandy von Salisch und Fanny Knöspel möchte ich für das freundschaftliche Miteinander und die Unterstützung während der gemeinsamen Doktorandenzeit herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren	7
1.2 Yin Yang-Proteine	8
1.2.1 Der Transkriptionsfaktor YY1	8
1.2.2 Der Transkriptionsfaktor REX1	8
1.2.3 Der Transkriptionsfaktor YY2	9
1.3 Ziel der Arbeit	.10
2. Ergebnisse	.12
2.1 Genregulation	.12
2.1.1 Vergleichsanalyse der Expression von YY2 und MBTPS2 in humanen Zelllinien	.12
2.1.2 Reportergenanalysen des YY2 5'-Bereichs	.13
2.1.3 Epigenetische Regulierung des YY2 Promotors	.14
2.1.3.1 <i>In vitro</i> Methylierung	.14
2.1.3.2 DNA Demethylierung	.15
2.1.3.3 In vivo Methylierungsstatus des YY2 Promotors	.16
2.2 Expressionsmuster	.18
2.2.1 Expression des <i>yy</i> 2 im Mausembryo	.18
2.2.2 <i>yy</i> 2 Expression während der Mausentwicklung in einzelnen Organen	.19
2.2.2.1 Expression von <i>yy2</i> im murinen Herz und Lunge	.19
2.2.2.2 Expression von <i>yy</i> 2 in verschiedenen Arealen des Gehiri	ns .21
2.2.2.3 Expression von <i>yy</i> 2 in verschiedenen neuronalen Zelltyp	en .22
2.3 Transkriptionelle Funktion	.23
2.3.1 YY2 Zielgene	.24
2.3.1.1 HOX-Gene werden durch YY2 gebunden	.26
2.3.1.2 Funktionelle Analysen zu potentiell YY2 regulierten HOX Genen	- .28
2.3.2 YY2-Protein-Protein Interaktion	.30
2.3.2.1 YY2 Interaktionspartner	.30
2.3.2.1.1 Identifizierung von YY2 Bindungspartnern mittels Massenspektrometrie	.30
2.3.2.1.2 Co-Immunopräzipitation von SP1 in HEK293 Zellen	.31

2.3.2.1.3 Nachweis der direkten Bindung zwischen YY2 und SP13	3
2.4 Konditioneller YY2 <i>knockout</i>	4
2.4.1 Die Klonierung des Targeting-Vektors	4
3. Diskussion und Ausblick	7
3.1 YY2 verfügt über einen eigenständigen Promotor	7
3.2 YY2 als möglicher Regulator der Neurogenese	8
3.3 YY2 ist ein Regulator einer Vielzahl von humanen Genen4	0
3.3.1 Regulation der <i>HOX</i> Gene durch YY24	0
3.4 YY2 interagiert direkt mit dem Transkriptionsfaktor SP14	1
3.5 YY2-knockout Mausmutante4	3
4. Material und Methoden44	4
4.1 Zellkulturtechniken44	4
4.1.1 Zellkultur44	4
4.1.2 Transfektion von HEK29344	4
4.2 Molekularbiologische Techniken44	4
4.2.1 RNA-Techniken	4
4.2.1.1 RNA Isolation und reverse Transkription44	4
4.2.1.2 Real-time PCR4	5
4.2.1.3 Whole mount in situ Hybridiersierung (WISH)4	5
4.2.2 DNA-Techniken4	5
4.2.2.1 Isolierung hochmolekularer DNA aus Zellen: HMW-DNA4	5
4.2.2.2 Bisulfitkonvertierung genomischer DNA mittels EpiTect® Bisulfite Kit4	6
4.2.2.3 in vitro Methylierung und Demethylierung4	6
4.2.2.4 Reportergenanalysen4	6
4.3 Klonierungstechniken4	6
4.3.1 Verwendete Bakterien4	6
4.3.2 Präparativer Restriktionsverdau4	7
4.3.3 Aufreinigung der DNA via QIAquick® Gel Extraction und PCR Purification Kit4	7
4.3.4 Ligation4	7
4.3.5 Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien und ransformation	ו 7
4.3.6 Minipräparation und analytischer Restriktionsverdau4	8
4.3.7 Präparative Plasmidisolierung mittels QIAprep® Plasmid Midi Kit.4	9

4.3.8 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	49
4.3.9 Anlegen von Glyzerinstocks	49
4.4 Proteinbiochemische Arbeitstechniken	50
4.4.1 Protein-Isolierung und immunologischer Nachweis (western B	3lot)50
4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	51
4.4.3 Herstellung rekombinanter Proteine und GST-Pulldown	51
4.5 Immunologische Techniken	52
4.5.1 Immunopräzipitation (IP)	52
4.5.2 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	52
4.5.3 Whole genome amplification	53
4.6 Silbergelfärbung und Massenspektrometrie	53
4.7 Tierexperimentelle Analysen	53
4.7.1 Verpaarung von CD1-Mäusen und Gewinnung von primären Geweben	53
4.8 Verwendete Standardpuffer	54
4.9 Verwendete Plasmide	54
4.9.1 Sh-RNA-Expressionsplasmide	54
4.9.2 Überexpressionsplasmide	54
4.9.3 Reportergenplasmide	55
4.10 Verwendete Primer	55
4.11 Verwendete Antikörper	55
4.12 Verwendete Agarose	56
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	60
7. Publikationen	64
8. Eigenständigkeitserklärung	65
10. Anhang	66

#### 1. Einleitung

Biologische Prozesse werden durch ein komplexes Netzwerk von Proteinen gesteuert, dessen Komponenten je nach Bedarf aktiviert oder inhibiert werden. Der zelluläre Gehalt dieser Proteine muss strikt reguliert werden. Dies geschieht unter anderem auf der Ebene des Genoms und wird als Genregulation bezeichnet. Hierfür ist eine Familie von Proteinen von besonderer Bedeutung, deren Mitglieder in ihrer Gesamtheit als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden<sup>1</sup>. Sie spielen in allen fundamentalen biologischen Prozessen, wie beispielsweise der Entwicklung, Differenzierung und Zellproliferation eine wichtige Rolle<sup>2</sup>. Im Allgemeinen bestehen Transkriptionsfaktoren aus zwei verschiedenen Domänen, der DNA-Bindungs- und der Protein-Transaktivierungsdomäne. Dadurch sind sie in der Lage, nicht nur spezifische Abschnitte der DNA zu binden, sondern auch Multimere mit anderen Faktoren einzugehen, die am komplexen Mechanismus der Genregulation beteiligt können<sup>3</sup>. sein Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften werden Transkriptionsfaktoren nach der DNA-Bindungsdomäne klassifiziert und in die Gruppen "homeodomain", "paired box", "leucine zipper", "helix-loop-helix", "helix-turnhelix", "runt domain", "ets domain" und "zinc finger" eingeordnet. Dabei stellen die Zinkfingerproteine die größte Gruppe unter den Transkriptionsfaktoren dar<sup>1, 4</sup>.

## 1.1 Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren

Prinzipiell werden Proteine zu der Gruppe der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren zugeordnet, wenn sich ein Zink-Ion als strukturgebende Komponente in der DNA-Bindungsdomäne befindet. Zinkfingerproteine werden in 10 verschiedene Sub-Gruppen eingeteilt, wobei die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Faktoren am häufigsten im eukaryotischen System vertreten sind und in verschiedenen Organismen konserviert vorliegen. Jedes C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger Motiv besteht im nativen Protein aus zwei antiparallelen β-Faltblatt-Strukturen, gefolgt von einer α-Helix, die als repetitive Einheit mit bis zu 22 Wiederholungen vorkommen kann. Die tertiäre Proteinstruktur liegt der für C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerproteine typischen Konsensussequenz Cys-X<sub>2,4</sub>-Cys-X<sub>3</sub>-Phe-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-His-X<sub>3,4</sub>-His zugrunde<sup>5</sup>. Dabei gehen die zwei konservierten Cysteine der β-Faltblätter und die Histidin-Seitenketten am C-Terminus der α-Helix eine Verbindung mit einem Zinkion ein, welche zur Ausbildung der räumlichen Struktur der DNA-Bindungsdomäne führt. Die Bindung der spezifischen DNA-Abschnitte erfolgt über nicht-kovalente Bindungen (Wasserstoffbrücken oder hydrophobe bzw. ionische Wechselwirkungen)<sup>6</sup>. Neben den konservierten Zinkfingern zeichnet sich jede Bindungsdomäne durch hoch konservierte Linker-Sequenzen aus, deren Phosphorylierung zur Inaktivierung der DNA-Bindung führen kann<sup>7</sup>. Obwohl Zinkfingerproteine viele biologische Prozesse steuern, ist die Funktion einzelner  $C_2H_2$ -Transkriptionsfaktoren oftmals noch ungeklärt.

#### **1.2 Yin Yang-Proteine**

Eine eigene Proteinfamilie bilden die Yin Yang (YY)-Transkriptionsfaktoren. Die drei bislang bekannten Mitglieder YY1, YY2 und *Reduced Expression Gene* 1 (REX1, ZFP42) zählen zu den C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerproteinen und zeichnen sich durch eine starke Homologie, besonders im Bereich der DNA-Bindungsdomäne, aus<sup>8</sup>. YY-Proteine nehmen eine besondere Rolle unter den Transkriptionsfaktoren ein, da sie die Transkription spezifischer Zielgene nicht nur aktivieren oder reprimieren, sondern auch initiieren können. Diese Eigenschaften spiegeln sich in der Bezeichnung Yin Yang wider.

#### 1.2.1 Der Transkriptionsfaktor YY1

YY1 ist der prominenteste Vertreter der YY-Proteine. Das Protein wird ubiquitär exprimiert und wurde ursprünglich als Repressor des Adeno-assoziierten Virus P5 Promotor identifiziert<sup>9</sup>. Inzwischen wurde das 414 Aminosäuren große Protein als Regulator von einer Vielzahl zellulärer und viraler Gene identifiziert<sup>10</sup>. Seine Bedeutung wird dadurch unterstrichen, dass bei der Maus ein homozygoter *knockout* im Embryonalstadium E8,5 letal ist. Bei heterozygoten Mausmutanten führt die YY1-Ablation zur intrauterinen Entwicklungsverzögerung und Neurulationsdefekten<sup>11</sup>. Die Störung der normalen Aktivität des YY1 Transkriptionsfaktors ist mit einer Vielzahl von Tumorerkrankungen assoziiert. Besonders hervorzuheben sind bösartige Tumore an Brust, Darm, Prostata sowie das Osteosarkom<sup>12-15</sup>.

## 1.2.2 Der Transkriptionsfaktor REX1

*Reduced Expression Gene* 1 wird nur während der Spermatogenese und frühen Embryogenese exprimiert<sup>16</sup>. Rex-1 scheint in der epigenetischen Modifikation eine Rolle zu spielen, da seine Expression für das Überleben der fetalen und neonatalen Maus wichtig ist. Es ist allerdings anzumerken, dass Rex-1 aufgrund der epigenetischen Regulation und der auf den Zinkfinger begrenzten Homologie zu YY1

in der Forschung an den YY Transkriptionsfaktoren bislang wenig Aufmerksamkeit findet.

Als sehr interessant hat sich jedoch das YY2 Protein erwiesen, da es ca. 56% Homologie zum YY1 aufweist und mit seinem Homolog auch außerhalb der DNA-Bindungsdomäne funktionelle Gruppen teilt<sup>17</sup> (Abb. 1).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteinstrukturen von YY2, YY1 und REX1. Die Homologie zweier Faktoren gesamt sowie in den Zinkfingern ist jeweils in Prozent angegeben. Abkürzungen: Ser-rich, serinereiche Domäne; Repo, Repo-Domäne; Zn-Fingers, Zinkfinger; acidic, Domäne mit überwiegend sauren Aminosäuren; His, histidinreiche Domäne; GA, glycin-/alaninreiche Domäne; GK, glycin-/lysinreiche Domäne. (modifiziert nach Nguyen *et al.* 2004)

## 1.2.3 Der Transkriptionsfaktor YY2

Der Transkriptionsfaktor YY2 wurde erstmals 2004 beschrieben<sup>17</sup>. Ziel war es seinerzeit, homologe Proteine zum gut charakterisierten YY1 zu identifizieren. Mit Hilfe der YY1-Sequenz wurden Datenbankanalysen durchgeführt und ein Protein mit 56,2% Homologie identifiziert, welches bezüglich der Zinkfingerdomäne sogar zu 86,4% mit YY1 identisch ist<sup>17</sup>. Das humane *YY2* Gen ist X-chromosomal (Xp22.1-22.2) lokalisiert (NCBI Accession Nummer: BC137215). Es wird vermutet, dass das Gen auf eine Retroposition des *YY1* Gens zurückzuführen ist, da es im Gegensatz zum *YY1* nur aus einem Exon besteht<sup>8</sup>. Zudem ist das *YY2* Gen speziesübergreifend bei plazentalen Säugern zwischen dem 5. und 6. Exon eines anderen Gens, dem

*membrane bound transcription factor protease site 2 (MBTPS2)* Gen, lokalisiert. Diese außergewöhnliche Position ließ lange Zeit vermuten, dass sowohl das *YY2* Gen als auch das *MBTPS2* Gen über einen gemeinsamen Promotor gekoppelt reguliert werden<sup>18</sup>.

YY2 und YY1 sind durch ein identisches DNA-Bindungsmotiv mit der Konsensussequenz 5'-(A/c/g)(A/t)NATG(G/a/t)(C/a)(G/c/t)-3', die in ca. 7 % aller eukaryotischen Promotoren vorkommt<sup>8, 19</sup>, charakterisiert. Daher stellt sich die Frage, ob beide Faktoren auch gleiche Zielgene regulieren bzw. gleiche biologische Funktionen einnehmen. Im Kontext dieser Fragestellung wurden die bekannten YY1 Zielgene c-FOS, c-MYC, P53 und CXCR4 ebenfalls als YY2 Zielgene identifiziert<sup>17</sup>. Ferner wurden Studien am Interferon ß-Promotor durchgeführt, wo erstmals ein Antagonismus zwischen dem YY1 und YY2 beschrieben wurde. YY2 kann am induzierten Interferon 
ß-Promotor den repressiven Effekt von YY1 kompensieren<sup>20</sup>. Kürzlich wurden zudem Mircoarrayanalysen in stabil transduzierten Zelllinien durchgeführt, in denen jeweils YY1, YY2 oder beide YY Proteine konstitutiv herunter reguliert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich beide Proteine nicht nur gemeinsame Zielgene teilen, sondern jedes für sich über eigene Zielgene verfügt<sup>21</sup>. Dadurch bestätigte sich nicht nur die Funktion des YY2 Proteins in biologischen Prozessen, sondern auch eine völlig neue Sichtweise auf die Biologie des YY1-Transkriptionsfaktors.

Ferner wurden Studien zur spezifischen Expression von YY2 und YY1 in einzelnen Geweben bzw. Organen durchgeführt. Dabei konnte das humane YY2, mit einem errechneten Molekulargewicht von 41,4 kDa, auf Proteinebene in Leber, Niere und Milz sowie im Hoden, nicht aber im Dickdarm nachgewiesen werden<sup>17</sup>. Auf RNA-Ebene wurde anhand von *in situ* Hybridisierungsexperimenten gezeigt, dass murines *yy2* im Gehirn und in Spermatozyten, nicht aber in reifen Spermazellen exprimiert wird<sup>18</sup>.

#### 1.3 Ziel der Arbeit

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen zum YY2 Transkriptionsfaktor und der Homologie zum YY1 stellte sich die Frage, welche weiteren Funktionen dieses Protein einnehmen könnte und wie sich das Zusammenspiel mit YY1 genauer gestaltet. Da es jedoch noch an grundlegenden Studien zur Biologie des YY2 mangelte, sollte das Protein auf unterschiedlichen funktionellen Ebenen untersucht werden. Neben der Charakterisierung der Funktion des YY2-Proteins galt es zu klären, wie das Gen reguliert und in welchen Arealen des Organismus exprimiert wird. Dafür sollte die YY2-Genregulation näher untersucht und ein umfassendes Expressionsprofil erstellt werden, bevor Zielgene des YY2 und Bindungspartner identifiziert werden. Deshalb wurde die Arbeit in drei übergeordnete Schwerpunktbereiche eingeteilt: Die Genregulation, das Expressionsmuster und die transkriptionelle Funktion.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Genregulation

# 2.1.1 Vergleichsanalyse der Expression von YY2 und MBTPS2 in humanen Zelllinien

In früheren Publikationen wurde postuliert, dass das YY2 Gen durch seine besondere Position innerhalb des *MBTPS2* Gens gekoppelt, also zusammen über den Promotor des *MBTPS2* reguliert wird. Zusätzlich wiesen *in situ* Hybridisierungen in murinen Gehirnarealen und Fortpflanzungsorganen gleiche Expressionsmuster bzw. Transkript-Mengen beider Gene auf<sup>18</sup>.

Eigene Untersuchungen mit Multiplex-PCRs zeigen jedoch, dass YY2 und MBTPS2 im Vergleich verschiedener immortalisierter humaner Zelllinien völlig unterschiedlich exprimiert werden. Für diese Analyse wurden vier humane Zellinien unterschiedlicher Gewebezuordnung untersucht: Jurkat T-Zellen, die aus leukämischen T-Zellen stammen; NT-2 Zellen, neuronale Teratokarzinomzellen; SH-SY5Y Zellen, die aus Neuroblastomen gewonnen wurden, und die aus embryonalen Nierenzellen abgeleiteten HEK293. Im Gegensatz zu Jurkat T und NT-2 Zellen, bei denen sich eine geringe MBTPS2-Expression im Vergleich zu YY2 zeigt, ist das Verhältnis beider Gene in SH-SY5Y und HEK293 Zellen entgegengesetzt (Abb. 2). Bei einer gekoppelten Regulation wären jedoch Zelllinien gleiche in allen vier Expressionsmuster zu erwarten.

Jurkat	NT-2	SH-SY5Y	HEK293
<i>yy2</i> S2P	<i>yy2</i> S2P	<i>yy2</i> S2P	<i>yy2</i> S2P

Abbildung 2: Vergleich der Expression von YY2 und *MBTPS2*(S2P) mRNA in verschiedenen humanen Zelllinien. Endogene YY2 (PCR-Produkt, oben links, 589 bp) und *MBTPS2* (oben rechts, 666 bp) mRNA-Expression ist in Jurkat T, NT-2, SH-SY5Y und HEK293 Zellen mittels Multiplex-PCR verglichen worden.  $\beta$ -Actin wurde als interne Ladekontrolle in jedem Ansatz co-amplifiziert (untere Bande, 353 bp).

#### 2.1.2 Reportergenanalysen des YY2 5'-Bereichs

Die unabhängige Expression von YY2 und *MBTPS2* weist darauf hin, dass ein autonomer YY2 Promotor existieren könnte. Zur Klärung der Frage, ob der *upstream*-Bereich in unmittelbarer Nähe zum YY2 Exon Promotoraktivität vermittelt, wurde ein 2,6 Kb großer Bereich zwischen dem fünften Exon des *MBTPS2* und dem YY2-Exon in einen pGL2-Reportergenvektor kloniert, sukzessive verkürzt (Abb. 3) und die Aktivität der einzelnen Fragmente mittels Luciferase und im Vergleich zum leeren pGL2-Plasmid im Luciferase-Reportergen-Assay untersucht. Sowohl das vollständige Intron (FL-hYY2p) als auch die Verkürzung auf ein 294 bp langes Fragment ( $\Delta$ hYY2p) weisen im Vergleich zur Kontrolle (pGL2) eine deutlich gesteigerte Luciferaseaktivität auf und zeigen, dass der *upstream*-Bereich des YY2-Exons eine Promotoraktivität vermittelt. Während das FL-hYY2p eine 3-fache und das  $\Delta$ hYY2p sogar eine 20-fache Steigerung ausweisen, zeigt eine Verkürzung des 294 bp großen DNA-Fragments um weitere 70 bp ( $\Delta$ hYY2p(224)) eine Reduktion der Aktivität des Reportergenkonstrukts auf dem Niveau des Kontrollvektors (Abb. 4).



Abbildung 3: Schematische Darstellung des genomischen humanen *MBTPS2/YY2* Locus. Die Exons des *MBTPS2* Gens (1 bis 11) sowie das YY2 Gen sind in der Grafik markiert. FL-hYY2p kennzeichnet den vollständigen *upstream*-Bereich des YY2 Gens mit einer Länge von 2.6 kb.  $\Delta$ hYY2p und  $\Delta$ hYY2p(224) sind Verkürzungen des FL-hYY2p mit einer Länge von 294 bzw. 224 bp.



**Abbildung 4: Promotoranalysen des** *upstream***-Bereichs des YY2-Gens.** Verglichen zum leeren Reportergenkonstrukt pGL2 zeigt das Plasmid mit dem vollständigen *upstream*-Bereich (FL-hYY2p) eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität (20-fach). Das verkürzte Konstrukt ΔhYY2p zeigt eine 3-fach erhöhte Aktivität im Vergleich zu FL-hYY2p. Dagegen fällt die Luziferaseaktivität bei einer Verkürzung auf 224 bp (ΔhYY2p(224)) auf ein Minimum. (n=4, \*\*\*p< 0,001; Student-t-Test)

#### 2.1.3 Epigenetische Regulierung des YY2 Promotors

#### 2.1.3.1 In vitro Methylierung

In den Reportergenanalysen weist der upstream-Bereich des YY2-Gens eine deutliche Promotoraktivität auf und unterstreicht die Existenz eines autonomen YY2-Promotors. Da das ΔhYY2p Fragment die höchste transkriptionelle Aktivität zeigt (Abb. 4), ist es für die weiteren Untersuchungen verwendet worden. Ziel war es, cisregulatorische Elemente zu charakterisieren, die für eine Aktivierung des potentiellen YY2-Promotors verantwortlich sind. Bei genauerer Analyse der Seguenz konnte eine Vielzahl von CpG- Motiven detektiert werden, die auf eine epigenetische Regulation 5A). durch DNA Methylierung hinweisen (Abb. Zur Klärung wurde eine Reportergenanalyse mit einem in vitro methylierten Reportergenkonstrukt durchgeführt, welche erlaubt, den Einfluss von Methylierung auf das AhYY2p-Promotorfragment zu untersuchen. Im Vergleich zum unmethylierten Reportergenkonstrukt weist die in vitro methylierte DNA eine fünffach verminderte Luciferaseaktivität auf (Abb. 5B). Daraus kann geschlossen werden, dass der proximale Bereich *upstream* des YY2-Exons eine Promotoraktivität besitzt, also epigenetisch reguliert werden kann.



Abbildung 5: Verminderung der YY2-Promotoraktivität durch *in vitro* Methylierung. (A) Sequenz des proximalen YY2 Promotors. Die Nukleotide sind relativ zum Transkriptionsstart (Pfeil, NCBI accession no. BC137215) nummeriert. Alle CpG Motive sind grau unterlegt. Potentielle, durch TRANSFAC vorhergesagte PAX Bindungsstellen sind durch eine Linie markiert. (B) Relative Luciferaseaktivität von unmethylierten und methylierten (meth  $\Delta$ hYY2p) Reportergenkonstrukten. Die Luciferaseaktivität des unmethylierten Konstrukts ( $\Delta$ hYY2p) ist auf 100% gesetzt. Die *in vitro* Methylierung senkt die Aktivität des proximalen YY2 Promotors signifikant. (n=3,\*\*p<0,01, Student-t-Test)

#### 2.1.3.2 DNA Demethylierung

Im Umkehrschluss zu den Methylierungsversuchen sollte geprüft werden, ob die Menge an endogenem YY2 durch Demethylierung mit dem Inhibitor 5-Aza-2desoxycytidin (Aza) in HEK293 Zellen gesteigert werden kann. Wenn die Expression des YY2 durch Methylierung vermindert wird, dann sollte eine Demethylierung zu einer gesteigerten Menge an YY2-Transkripten führen. Dafür sind HEK293 Zellen für 96 h mit Aza (5 µM und 10 µM) behandelt worden, was zu einer kontinuierlichen Inhibierung der DNA-Methyltransferasen führt. Nach vier Tagen wurde die Menge an revers transkribierter YY2 mRNA im Vergleich zu einer nicht mit Aza behandelten Probe mittels konventioneller PCR untersucht (Abb. 6A) sowie mittels *real-time* PCR quantifiziert (Abb. 6B). Dabei fand sich eine deutlich gesteigerte YY2 Expression in den mit Aza behandelten Proben. Interessanterweise zeigt der Vergleich von *MBTPS2* Transkripten in den demethylierten Proben keinen Unterschied zur Kontrolle (Abb. 6C). *MBTPS2* scheint also im Gegensatz zu *YY2* nicht methylierungsabhängig reguliert zu sein. Dies bestärkt den Rückschluß, dass beide Gene unabhängigen Regulationsmechanismen unterliegen.



Abbildung 6: Demethylierung induziert die Expression von YY2, jedoch nicht von *MBTPS2*. (A) cDNA ist aus HEK293 Zellen generiert worden, die jeweils mit Wasser (control) oder zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Aza (5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M) behandelt worden sind. Es wurde eine Mutliplex-PCR für YY2 (598 bp) und  $\beta$ -Actin (353 bp) durchgeführt, die zeigt, dass die Expression von YY2 durch Aza-Behandlung gesteigert wird. Im 1% Agarosegel ist ein 1 kb plus ladder Marker als Größenstandard (M, 500 bp sind markiert) verwendet worden. (B) Quantifizierung der durch Aza-Behandlung induzierten Effekte auf die YY2 Expression mittels *real-time* PCR. Die Werte für YY2 sind auf  $\beta$ -Actin normalisiert. (n=3, \*\*p<0,01, Student-t-Verteilung). (C) Die in (A) verwendeten Proben sind in einer weiteren Multiplex-PCR auf die Expression von *MBTPS2* (666 bp) und  $\beta$ -Actin (353 bp) untersucht worden. Die *MBTPS2* Expression wird im Gegensatz zu YY2 nicht durch die Aza-Behandlung beeinflusst.

#### 2.1.3.3 In vivo Methylierungsstatus des YY2 Promotors

Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße der YY2 Promoter *in vivo* methyliert ist, wurden Bisulfitsequenzierungen durchgeführt. Dafür wurde DNA aus HEK293 Zellen isoliert und entsprechend behandelt bzw. analysiert. Die Untersuchung zeigt, dass sämtliche CpG-Motive *in vivo* methyliert vorliegen und der YY2 Promotor in unbehandelten HEK293 Zellen hypermethyliert ist (Abb. 7).



**Abbildung 7: Methylierungsstatus des YY2** upstream-Bereichs in HEK293-Zellen. Die Wildtyp (WT) 5'-Sequenz des YY2 upstream-Bereichs wird gegen drei verschiedene durch Bisulfit umgewandelte Proben verglichen. Die durch Bisulfit konvertierten unmethylierten Cytosine (gezeigt als Thymidine) sind schwarz hinterlegt; fehlende Basen sind durch ein Minus-Zeichen gekennzeichnet. Beim Vergleich mit den grau unterlegten CpG-Motiven wird deutlich, dass diese *in vivo* methyliert sind. Der horizontale Strich markiert die zwei unterschiedlichen Fragmente: – 241 to – 318 ( $\Delta$ hYY2p 5'-angrenzende Sequenz) and + 54 to – 240 ( $\Delta$ hYY2p). Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart. Der Methylierungsstatus wurde aus sechs verschiedenen Klonen verifiziert, wobei in der Abbildung drei repräsentative Klone gezeigt werden.

Die Analyse bestätigt, dass das YY2 Gen über einen methylierungssensitiven Promotor verfügt, der unmittelbar vor dem YY2 Exon lokalisiert ist.

## 2.2 Expressionsmuster

Weiterführend sollte ein genaues Expressionsprofil in der sich entwickelnden und adulten Maus erstellt werden. Diese Untersuchung ist für die Charakterisierung der biologischen Funktion von YY2 essentiell.

#### 2.2.1 Expression des yy2 im Mausembryo

Bisher wurden lediglich *in situ* Hybridisierungen auf Gewebeschnitten der Fortpflanzungsorgane und des Gehirns beschrieben<sup>18</sup>. Für ein umfassendes Expressionsprofil im Mausorganismus sind Hybridisierungen auf Schnitten sehr aufwändig. Um einen ganzheitlichen Blick auf die Verteilung der *yy2*-Transkripte im Mausmodell zu erlangen, sollte eine *whole mount in situ* Hybridisierung (WISH) an Mausembryonen durchgeführt werden.

Nach Etablierung der Methode der WISH wurden Mausembryonen bis zum Entwicklungsstadium E11.5 untersucht. Die Methode ermöglicht die Detektion von mRNA Transkripten eines spezifischen Gens beispielsweise mit Hilfe von Digoxygenin (DIG)-markierten Sonden. So ist es möglich, die Bereiche im Mausembryo zu lokalisieren, in denen das yy2 Gen transkribiert wird. Im Fall einer Hybridisierung, die mit einer DIG-markierten YY2 Sonde durchgeführt wird, zeigen Bereiche mit yy2 Expression eine deutliche violette Färbung, während yy2-negative Areale weiß bzw. transparent verbleiben (Abb. 8). Die WISH für den Nachweis von yy2 mRNA zeigt, dass es annähernd ubiquitär exprimiert wird und somit ein vergleichbares Expressionsprofil wie yy1 aufweist<sup>11</sup>.



**Abbildung 8: Expression von** *yy2* **in sich entwickelnden Mäusen.** (A) WISH von Mausembryonen im Stadium E11,5 mit einer DIG-markierten *antisense yy2*-Sonde. Für eine bessere Orientierung sind verschiedene Regionen markiert: Vorderhirn (fb), Mittelhirn (mb), Nachhirn (hb), optischer Vesikel (op), Rückenmark (sc), Ansatz der Vorderläufe (fl), Leber (li), Ansatz der Hinterläufe (hl). (B) Die Hybridisierung mit der korrespondierenden *sense yy2*-Sonde diente als Kontrolle (Vergrößerung: 4fach).

#### 2.2.2 yy2 Expression während der Mausentwicklung in einzelnen Organen

Mit dem Resultat der WISH-Experimente ist es jedoch nicht hinreichend möglich gewesen, biologisch interessante Bereiche mit *yy2* Expression einzugrenzen. Daher wurden einzelne Organe oder Gewebe der Maus intensiver untersucht. Im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. A. Bräuer (Institut für Zellbiologie und Neurobiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) war es möglich, auf die cDNA einer longitudinalen Reihe von verschiedenen Organen und Geweben der sich entwickelnden Maus zurückzugreifen und mittels real-time PCR die *yy2* Expression zu quantifizieren.

#### 2.2.2.1 Expression von yy2 im murinen Herz und Lunge

In den longitudinalen Reihen vom Stadium E14 bis zur adulten Maus (P60) wurden verschiedene Organe der Maus auf ihre *yy2* Expression untersucht. Bei der Quantifizierung der Proben ist nicht nur die Menge an *yy2* Transkripten gemessen worden, sondern auch die von *yy1* und *mbtps2*, um einen weiteren Nachweis für die unabhängige Expression und Regulation von *yy2* und *mbtps2* zu erbringen. *yy1* wurde quantifiziert, um einen Vergleich bezüglich der Homologie in der Regulation beider *yy* Gene zu erhalten oder mögliche antagonistische Funktionen, wie bereits von Klar *et al.* sowie Chen *et al.* beschrieben, bezüglich der Expression zu detektieren<sup>20, 21</sup>. In Herz (Abb. 9) und Lunge (Abb. 10) ist für keines der drei Gene während der Embryogenese oder postnatalen Entwicklung eine Änderung des Expressionsniveaus zu erkennen. Jedoch ist auffällig, dass im Gegensatz zum vergleichsweise stark exprimierten *yy1* nur geringe Mengen an *yy2* und *mbtps2* Transkripten gemessen wurden.



Abbildung 9: Quantifizierung der *yy2*, *mbtps2* und *yy1* mRNA Expression im sich entwickelnden und adulten Herz der Maus. Die Mengen an *yy2*, *mbtps2* und *yy1* Transkripten (E14 bis P30; E= embryonal; P= postnatal) wurden mittels real-time PCR quantifiziert. Die Werte sind relativ zu  $\beta$ -*Actin* dargestellt. (n=3 Sets; ANOVA)



Abbildung 10: Quantifizierung von *yy2*, *mbtps2* und *yy1* in der sich entwickelnden und adulten Lunge der Maus (E14 bis P60). Das Diagramm zeigt eine quantitative Bestimmung der Menge an *yy2-*, *mbtps2-* und *yy1-*Transkripten in der Untersuchung mittels TaqMan real-time PCR. Die Werte sind relativ zu  $\beta$ -Actin dargestellt. (n=3 Sets; ANOVA)

20

#### 2.2.2.2 Expression von yy2 in verschiedenen Arealen des Gehirns

In einem weiteren Ansatz sollte die yy2 Expression in spezifischen Arealen des Mausgehirns während der Entwicklung quantifiziert werden, da die Expression beider vy Gene im Gehirn qualitativ mittels in situ Hybridisierung bereits nachgewiesen ist<sup>18</sup>. Aus dem Gehirn worden der Maus wurden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien drei verschiedenen Areale (Neocortex, Hippocampus und präpariert und die resultierenden longitudinalen Cerebellum) Reihen der Gewebeproben mittels real-time PCR analysiert. Im Gegensatz zu Lunge und Herz fand sich im Neocortex und Cerebellum eine entwicklungsabhängige Anderung der Expressionsniveaus von yy2. Im Cerebellum zeigte sich ein stetiger Anstieg an yy2 Transkripten mit dem höchsten Niveau in der adulten Maus (Abb. 11). Die Quantifizierung im Neocortex weist hingegen eher einen U-förmigen Verlauf der Expression von yy2 mit einem Minimum in der frühen neonatalen Phase auf (Abb. 12). Im Gegensatz dazu zeigen die Gene yy1 und mbtps2 eine konstitutive Expression über die Zeit. Ähnlich wie die Analysen in Herz und Lunge weist der Hippocampus im Verlauf der Entwicklung keine Unterschiede im Expressionsniveau von yy2 auf (Abb. 13). yy2 wird in verschiedenen Arealen des Gehirns offensichtlich spezifisch exprimiert bzw. reguliert. Diese Ergebnisse könnten auf eine spezifische Funktion des yy2 in der Entwicklung des ZNS der Maus hinweisen.



Abbildung 11: Quantifizierung von *yy2*, *mbtps2* und *yy1* im sich entwickelnden und adulten, Cerebellum der Maus (E14 bis P60). Die Abbildung zeigt Analysen zur Expression von *yy2*, *mbtps2* und *yy1* Transkripten mittels TaqMan real-time PCR. Die Werte sind relativ zu  $\beta$ -Actin dargestellt. (n=3 Sets; \*p<0,05;\*\*p<0,01; statistische Signifikanz bezieht sich auf E14; ANOVA)



Abbildung 12: Quantifizierung von *yy2*, *mbtps2* und *yy1* im sich entwickelnden und adulten Neocortex der Maus (E14 bis P60). Mittels TaqMan real-time PCR wurde die Expression von *yy2*, *mbtps2* und *yy1* Transkripten quantifiziert. Die Werte sind relativ zu  $\beta$ -Actin dargestellt. (n=3 Sets; \*p<0,05;\*\*p<0,01; statistische Signifikanz bezieht sich auf E14; ANOVA)



Abbildung 13: Quantifizierung von *yy2*, *mbtps2* und *yy1* im sich entwickelnden und adulten, Hippocampus der Maus (E16 bis P60). Die Expressionsmengen an *yy2*, *mbtps2* und *yy1* Transkripten wurden mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die Werte sind relativ zu  $\beta$ -Actin dargestellt. (n=3 Sets; ANOVA)

#### 2.2.2.3 Expression von yy2 in verschiedenen neuronalen Zelltypen

Da die Areale des Gehirns aus verschiedenen Zelltypen gebildet werden, war es von Interesse, die Expression von *yy2* Zelltyp-spezifisch zu untersuchen. Hierfür wurden primäre Neuronen, Astrozyten und Mircroglia isoliert und deren mRNA nach der reversen Transkription zu cDNA quantifiziert. Während das Expressionsniveau von *yy1* und *mbtps2* keine Unterschiede aufweist, war die Menge der *yy2* Transkripte in den Neuronen im Vergleich zur Microglia signifikant geringer (Abb. 14). Allerdings bestand auch in Astrozyten ein deutlich kleineres Expressionsniveau von *yy2* als in Neuronen, wenn gleich keine statistische Signifikanz ermittelt wurde. Um

Unterschiede im Methylierungsmuster als Ursache für die unterschiedliche *yy*2 Expression zu prüfen, wurde in den Neuronen, Microglia und Astrocyten ein Methylierungsprofil erstellt. Hierbei war jedoch kein Unterschied im Methylierungsstatus nachweisbar. Somit unterliegt die geringe Expression des *yy*2 in den Neuronen einem alternativen Regulationsmechanismus.



Primäre Zelltypen der Maus



Das Expressionsprofil von *yy*2 in der Maus zeigt bezüglich der ubiquitären Verteilung im Organismus deutliche Parallelen zum *yy*1. Allerdings findet sich im Gehirn der Maus auch eine entwicklungsabhängige Expression von *yy*2, was eine spezifische biologische Relevanz von YY2 in diesem Organ nahelegt.

#### 2.3 Transkriptionelle Funktion

Die bisherigen Untersuchungen zur Biologie des Transkriptionsfaktors YY2 zielten darauf ab, die unabhängige Regulation zu beweisen und eine mögliche Bedeutung im Organismus zu unterstreichen. Als Transkriptionsfaktor ist YY2 in der Lage in den Zellkern zu migrieren und die DNA direkt zu binden, wodurch Zielgene reguliert werden. Um eine biologische Funktion des YY2 zu belegen, sollten deshalb mögliche Zielgene identifiziert werden.

#### 2.3.1 YY2 Zielgene

Aus den Untersuchungen zu YY1 sind bereits einzelne Gene bekannt, deren Promotoren auch durch YY2 gebunden und reguliert werden. Da YY2 vermutlich ein multifunktionelles Protein ist und seine Funktion somit von Co-Faktoren und auch dem Zelltyp abhängig sein könnte, ist es schwierig, identifizierte Zielgene bzw. Regulationsmechanismen auf alle Zelltypen eines Organismus zu übertragen. Bei multifunktionellen Proteinen ist es sinnvoll, sich auf ein Zellsystem zu fokussieren und dieses zu charakterisieren. Daher konzentrierten sich die folgenden Arbeiten auf HEK293 Zellen. Dieser Zelltyp ist ein gutes Modell für Untersuchungen am humanen Organismus. Um ein umfassendes Screening auf YY2-Zielgene zu erstellen, sollte eine initiale Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) mit anschließendem Microarray (chip) durchgeführt werden. Die ChIP ermöglicht die Isolierung aller durch YY2 gebundenen DNA-Bereiche in der unbehandelten, intakten Zelle durch einen Der darauffolgende chip mit spezifischen Antikörper. 2,1 Mio humanen Promotorbereichen dient der Identifizierung von einzelnen YY2-gebundenen DNA-Fragmenten. So werden alle Bereiche der HEK293 DNA identifiziert, an die das YY2 Protein in vivo bindet. Dies ermöglicht einen Einblick auf potentielle Zielgene, die durch YY2 reguliert werden.

Bei der ChIP-Technologie ist die Funktionalität und Spezifität des verwendeten Antikörpers essentiell. Daher sind vor dem ChIP, Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) und western Blot-Analysen durchgeführt worden. Die Co-IP sollte zeigen, dass der verwendete YY2-Antikörper das Protein unter nativen Bedingungen erkennt und keine Kreuzreaktivität mit dem YY1-Protein besteht. Der Input zeigt, dass in den untersuchten Proben das jeweilige YY-Protein vorhanden ist und die Kontrolle (FLAG) dementsprechend negativ bleibt. Nach einer Co-IP mit dem YY2-Antikörper ist nur das YY2 nachweisbar, was eine mögliche Kreuzreaktivität zum YY1 ausschließt (Abb. 15A). Desweiteren wurde in zusätzlichen western blottings der YY2 Antikörper zum Ausschluss eventueller unspezifischer Bindungen in Gesamtzellextrakten getestet. Da zu diesem Zeitpunkt kein Antikörper erhältlich war, der endogenes YY2 im Immunoblot erkennt, wurde das Protein in den HEK293 Zellen überexprimiert und nachgewiesen. Während in der Probe mit überexprimiertem YY2 ein spezifischer Nachweis des Proteins mit seiner charakteristischen Abbaubande zu erkennen in war. konnten den Gesamtzellextrakten aus den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen

24

(pcDNA3.1(-)) sowie unbehandelten HEK293 Zellen weder YY2 noch zusätzliche unspezifische Signale nachgewiesen werden (Abb. 15 B). Der verwendete Antikörper ist demnach für ChIP-Experimente geeignet und erkennt das YY2 spezifisch. Nach dem ChIP-Experiment wurden die isolierten DNA-Fragmente auf einen Nimblegen 2.1 Mio Human Promoter Deluxe Array hybridisiert und identifiziert. Dabei ergaben sich 14048 signifikant YY2-gebundene DNA-Sequenzen, die 2516 verschiedenen Genen zuzuordnen waren. Um ein mögliches Muster in der Verteilung der Bindungsstellen auf den Promotoren zu erkennen, wurden sämtliche Bindungen (bis -5 kb) in einem Diagramm zusammengefasst. Dabei fällt auf, dass es auch zu Bindungen in den untranslatierten Bereichen sowie zu intragenischen YY2 DNA-Interaktionen kommt. In Bezug auf die Promotorbereiche zeigte die YY2-Bindung keine spezifischen Cluster (Abb. 15 C).



Abbildung 15: Das YY2-Bindungsmotiv, die Spezifität des für den ChIP-chip verwendeten Antikörpers und die Verteilung der YY2-gebundenen Promotorregionen. (A) Die Spezifität des YY2-Antikörpers für die IP wurde unter nativen Bedingungen getestet. Gesamtzellextrakte, die ektopisch exprimiertes FLAG-, FLAGYY1- oder FLAGYY2 beinhalten, wurden, wie beschriftet, zugegeben. Die IP-Proben bzw. der Input wurden mittels *western* Blot untersucht und das FLAG-Epitop nachgewiesen. (B) YY2 *western* Blot mit Gesamtzelllysaten aus HEK293-Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pcDNA(3.1) bzw. zum Überexpressionsplasmid pcDNA(3.1)hYY2 transient transfiziert wurden. Eine unbehandelte Probe dient als Kontrolle. Die Banden des Markers sind dargestellt und mit dem entsprechenden molekularen Gewichten gekennzeichnet. (C) Das Diagramm zeigt die Verteilung von 5419 definierten Peaks (FDR score <0,05), die im ChIP-chip identifiziert wurden. Sie sind relativ zum Transkriptionsstart (TSS) dargestellt. Das Diagramm stellt einen Bereich von 5 kb *up*-bzw. *downstream* Spanne zum TSS dar.

#### 2.3.1.1 HOX-Gene werden durch YY2 gebunden

Bei der Auswertung der Datensätzen aus dem Humanen Promotor Deluxe Array sind einige Genfamilien dahingehend auffällig, dass viele ihrer Mitglieder durch YY2 gebunden werden. Besonders interessant erschien dabei die Familie der Homeobox Gene. Von insgesamt 39 bekannten *HOX*-Genen wurden 30 signifikant durch YY2 *in vivo* in HEK293-Zellen gebunden. *HOX*-Gene werden in vier Subtypen A bis D unterteilt, da sie in Clustern auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. *HOX*-Gene vermitteln essentielle Funktionen in der Entwicklung. In der Tabelle sind die durch YY2 gebundenen *HOX*-Gene mit den dazugehörigen OMIM- bzw. NCBI-Gen-Nummern gemäß der ChIP-chip-Analyse aufgelistet (Tabelle 1).

Gen	OMIM #	Auswahl möglicher Funktionen	NCBI Gene ID
HOXA2	MIM *604685	Bestimmung der Haarverteilung	3199
HOXA3	MIM *142954	Thymus Differenzierung	3200
HOXA4	MIM *142953	_	3201
HOXA5	MIM *142952	Regulation von p53	3202
HOXA6	MIM *142951	_	3203
HOXA7	MIM *142950	Embryonale Entwicklung	3204
HOXA9	MIM *142956	Myeloide Differenzierung	3205
HOXA10	MIM *142957	Regulation der postnatalen	3206
		hämatopoietischen Entwicklung	
HOXA11	MIM *142958	Differenzierung	3207
HOXA13	MIM *142959	Aktivierung der distal-spezifischen	3209
		Genexpression	
HOXB1	MIM *142968	Etablierung der räumlichen Koliniarität im	3211
		Hühnerembryo	
HOXB2	MIM *142967	Neuronenentwicklung	3212
HOXB3	MIM *142966	—	3213
HOXB4	MIM *142965	Zelldifferenzierung	3214
HOXB5	MIM *142960	Embryonale Entwicklung	3215
HOXB6	MIM *142961	Embryonale Entwicklung	3216
HOXB7	MIM *142962	Zelldifferenzierung	3217
HOXB8	MIM *142963	Induktion von Sonic hedgehog	3218
HOXB9	MIM *142964	_	3219
HOXC4	MIM *142974	_	3221
HOXC5	—	—	3222
HOXC6	MIM *142972	Entwicklung	3223
HOXC8	MIM *142970	Knorpeldifferenzierung	3224
HOXC9	MIM *142971	—	3225
HOXC10	MIM *605560	Regulation der Zellinvasivität	3226
HOXC11	MIM *605559	_	3227
HOXC12	MIM *142975	_	3228
HOXD11	MIM *142986	Entwicklung Körperextremitäten	3237
HOXD12	MIM *142988	Entwicklung Körperextremitäten	3238
HOXD13	MIM *142989	Entwicklung Körperextremitäten	3239

**Tabelle 1: Auflistung aller durch YY2 gebundenen HOX-Gene.** Die HOX-Gene sind mit ihrer NCBI sowie OMIM-Nummer aufgelistet. Zusätzlich wird jedem Gen eine Funktion zugeordnet, sofern diese bekannt ist.

#### 2.3.1.2 Funktionelle Analysen zu potentiell YY2 regulierten HOX-Genen

In weiteren Untersuchungen galt es, die Bindung des YY2 an bestimmte Promotoren der *HOX*-Gene durch ein unabhängiges ChIP-Experiment zu bestätigen. Da die Bindung von yy1 an den murinen *hoxA5*-Promotor bereits beschrieben wurde<sup>22</sup>, war dies der Ausgangspunkt für die eigenen Analysen. Zu den verbleibenden HOX-Kandidaten war weniger bekannt, so dass aus jeder Subgruppe je ein repräsentativer Kandidat ausgewählt und analysiert wurde. Die Ergebnisse aus dem Microarray bestätigen sich für die vier ausgewählten Kandidatengene *HOXA5*, *HOXB6*, *HOXC4* und *HOXC13*. Die Methodik ist mit geeigneten Kontrollen wie einem Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 (Positivkontrolle) und einem Ansatz ohne Antikörper (Negativkontrolle) belegt (Abb. 16).



Abbildung 16. Validierung von YY2-gebundenen *HOX*-Genen mittels ChIP. Repräsentative *HOX* Gene jeder Subgruppe wurden ausgewählt und hinsichtlich der Bindung durch YY2 in einem zusätzlichen ChIP-Experiment untersucht. Antikörper gegen YY2 und acetyliertes Histon H3 (acH3; Positivkontrolle) wurden eingesetzt. Eine Probe ohne Antikörper (0) fungierte als Negativkontrolle. Die eingesetzte Gesamt-DNA (Input) sowie Wasser (Kont.) repräsentieren die PCR-Kontrollen. Die Abbildung ist invertiert dargestellt.

Mit den vier identifizierten Kandidaten wurden anschließend funktionelle Analysen durchgeführt, um eine Regulation der Gene durch das YY2 zu überprüfen. Dafür wurden transiente knockdowns von YY2 bzw. YY1 mittels short-haipin-Expressionsplamiden (shRNA) in HEK293 Zellen etabliert. Die Funktion und Effizienz der Plasmide wurden mittels Kotransfektion von FLAG-gekoppeltem YY2 (FLAGYY2)- bzw. YY1 (FLAGYY1) in HEK293 Zellen im Western Blot überprüft. Es konnte in den jeweiligen Proben mit yy2 bzw. yy1 shRNA jeweils eine Reduktion um 90% auf Proteinebene erzielt werden. Als Vergleich diente eine Kontrolle mit einer nicht-funktionellen SCRAMBLE shRNA (shSCR) (Abb.17A). Da ein immunologischer Nachweis des endogenen Proteins mit den zu dieser Zeit erhältlichen Antikörpern nicht möglich war, wurden zusätzlich PCRs durchgeführt, welche die RNAi-Effekte auf endogene YY Transkripte untersuchten. Densiometrische Analysen der PCR-

Produkte zeigten eine Reduktion der YY2 mRNA um 50% und sogar um 80% in Bezug auf YY1-Transkripte in den Proben aus den HEK293 Zellen (Abb. 17B). Nach der Etablierung des *knockdowns* sind die *HOX*-Gene auf eine mögliche Regulation durch das YY2-Protein untersucht worden. Jedoch konnte für keines der im ChIP-chip identifizierten *HOX*-Gene eine Regulation durch YY2 nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigt sich diese Beobachtung auch für die Proben mit YY1-Ablation, obwohl hier zumindest Hinweise für eine Regulation des *HOXA5* bestehen<sup>22</sup>.



**Abbildung 17: Etablierung des transienten YY2 und YY1 knockdowns.** (A) Knockdown-Effizienzen des YY2 shRNA (shYY2) und YY1 shRNA (shYY1) verglichen zu einer SCRAMBLE-Kontrolle (shSCR) wurden durch eine Coexpression von FLAGYY2 bzw. FLAGYY1 verifiziert. Die Reduktion des Proteinlevels wurde mittels Immunoblot gegen das FLAG-Epitop nachgewiesen. SP1 bzw. ein unspezifisches Protein (n.d.) dienen als Ladekontrolle. (B) Die Abbildung zeigt die Etablierung des YY2 bzw YY1 knockdowns im Vergleich zur shSCR. Bei jedem knockdown wurde das YY-Homolog parallel bezüglich des Transkriptlevels mittels konventioneller PCR getestet, um die Spezifität der shRNA nachzuweisen. Die Gele sind invertiert wiedergegeben.

Durch das initiale ChIP-chip Experiment konnte zwar eine Vielzahl von potentiellen YY2-Zielgenen in HEK293-Zellen identifiziert werden, funktionelle Analysen können jedoch momentan keine direkte Regulation der untersuchten Zielgenkandidaten durch YY2 belegen.

#### 2.3.2 YY2-Protein-Protein Interaktion

Aufgrund der ausgeprägten Homologie beider YY-Proteine stellt sich nicht nur die Frage, ob sich YY2 und YY1 gemeinsame Zielgene teilen, sondern auch, ob sie beide in der Lage sind, die gleichen Cofaktoren zu binden bzw. um diese kompetitieren.

#### 2.3.2.1 YY2 Interaktionspartner

Transkriptionsfaktoren sind einerseits in der Lage, DNA zu binden und somit Gene direkt zu regulieren. Andererseits verfügen sie auch über Proteinbindungsdomänen, die es Cofaktoren ermöglichen, ebenfalls an sie zu binden. Da bisher noch keine Cofaktoren von YY2 beschrieben wurden, sollten in einem umfassenden Ansatz sämtliche durch YY2 gebundenen Proteine in einem Gel aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

#### 2.3.2.1.1 Identifizierung von YY2 Bindungspartnern mittels Massenspektrometrie

Als initialer Schritt für eine Identifizierung von Bindungspartnern war eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) vorgesehen. Dabei wird ein Protein zusammen mit Bindungspartnern über einen spezifischen Antikörper seinen aus einem Gesamtzellextrakt isoliert. Da dieses Verfahren unter nativen Bedingungen stattfindet, werden neben dem Antikörper-gebundenen Protein auch alle Interaktionspartner vom Zellextrakt separiert. Diese Cofaktoren können dann, beispielsweise mittels western Blot, immunologisch nachgewiesen werden. Unter nativen Bedingungen sollten in diesem initialen Versuch YY2-gebundene Proteine mittels überexprimiertem FLAGYY2-Proteins und FLAG-Antikörpers isoliert werden. Das erhaltene Eluat wurde in einem Silbergel gefärbt und mit einer Kontrolle verglichen, die kein FLAGYY2 enthielt, um unspezifische Bindungen identifizieren zu können (Abb.18). Aus dem Silbergel wurden einzelne Banden isoliert und sollten Massenspektrometrie analysiert werden. Jedoch konnten mittels aufgrund technischer Probleme, die wahrscheinlich auf zu geringe Proteinkonzentrationen zurückzuführen sind, neben YY2 nur noch das Heat-Shock 70-Kd Protein (HSP70) identifiziert werden.



**Abbildung 18: Vergleichende Co-IP Studien mit YY2 in HEK293 Zellen.** Co-IP-Studien wurden in HEK293 Gesamtzellextrakten durchgeführt, von denen ein Ansatz zusätzlich überexprimiertes FLAGYY2 enthielt. Unter Verwendung eines spezifischen FLAG-Antikörpers wurde das FLAGYY2 Fusionsprotein mit seinen Bindungspartnern isoliert und in einem Silbergel angefärbt. Das Eluat ohne FLAGYY2 dient zur Identifizierung unspezifischer Bindungen (n.d.).

#### 2.3.2.1.2 Co-Immunopräzipitation von SP1 in HEK293 Zellen

Aufgrund der Homologie zu YY1 kam die Frage auf, ob YY2 bekannte Cofaktoren seines Homologs bindet. Da der Zinkfinger beider YY Proteine zu 86 % identisch ist, wurde bei der Auswahl möglicher Kandidaten auf publizierte Bindungen in dieser Domäne fokussiert. Als mögliche Kandidaten kam somit das *Specificity Protein* 1 (SP1) und der CCCTC-*Binding Factor* (CTCF) in Frage.

Die Bindung von YY1 und SP1 wurde erstmal 1993 beschrieben<sup>3</sup>. SP1 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor, dessen Zielgene Funktionen in der Zelldifferenzierung, im Zellzyklus und in der Onkogenese besitzen. Meist ist die Expression von SP1 in verschiedenen Tumorzellen, wie z.B. aus Brust-, Darm- oder Lungenkarzinomen, im Vergleich zu normalen Zellen erhöht<sup>23</sup>. Desweiteren wurde CTCF für Co-IP-Studien ausgewählt. CTCF ist ebenfalls ein Zinkfingerprotein, welches wichtige regulatorische Funktionen, wie zum Beispiel die Bildung von DNA-*loops*, um Immunglobuline und T-Zellrezeptoren zu regulieren, besitzt<sup>24, 25</sup>.

Aufgrund der geringen Konzentration von endogenem YY2 in den HEK293 Zellen wurde für die Interaktionsstudien auf Extrakte von HEK293 Zellen mit überexprimiertem YY2 zurückgegriffen. Dieses Protein ist zusätzlich mit einem HA-FLAG-Tag fusioniert. Der Proteinnachweis konnte bei den Co-IP-Studien daher mit einem FLAG-Antikörper geführt werden.

Der immunologische Nachweis mittels *western* Blot weist deutliche Signale von SP1 und eine schwache Bande bei CTCF in dem Co-IP-Ansatz mit überexprimiertem YY2

(HA-FLAG-YY2) auf. Als Kontrolle diente eine Probe, in der kein YY2, jedoch die beiden Tags HA und FLAG (HA-FLAG) exprimiert wurden, so dass Bindungen von SP1 oder CTCF an diese Epitope ausgeschlossen werden konnten. In dieser Probe konnte jedoch weder SP1 noch CTCF immunologisch nachgewiesen werden. Da die Bindung von SP1 und CTCF an YY1 bereits beschrieben wurde, war eine Co-IP in mit überexprimiertem YY1 (HA-FLAG-YY1) Zellextrakten als adäguate Positivkontrolle unerlässlich. Interessanterweise weist die Bindung von SP1 an YY1 eine deutlich verminderte Affinität im Vergleich zum YY2 auf. Beim CTCF jedoch sind die Signalstärken zwischen den Ansätzen mit überexprimiertem YY2 und YY1 ähnlich. Als Kontrolle für den immunologischen Nachweis wurde zusätzlich ein Gesamtzellextrakt aus HEK293 Zellen aufgetragen. Darüber hinaus zeigte die Kontrolle mit einem HA-FLAG-YY1-Expressionsplasmid nur eine schwache Bindung von SP1 im Vergleich zur Co-IP mit YY2 (Abb. 19).



**Abbildung 19: Co-IP mit YY2 und YY1 in HEK293-Zelllysaten.** Unter nativen Bedingungen wurden Co-IP-Studien in Lysaten aus HEK293 Zellen durchgeführt. In den jeweiligen Proben wurden Fusionsproteine HA-FLAG, HA-FLAG-YY2 und HA-FLAG-YY1 überexprimiert und mittels FLAG-Antikörper isoliert. In nachfolgenden *western* Blots sollten mögliche Bindungspartner, die copräzipitiert wurden, immunologisch nachgewiesen werden. Während im oberen Blot deutliche Signale für SP1 in den Proben mit YY2 bzw. YY1 zu erkennen sind, ist der Nachweis von CTCF im unteren *western* Blot nur gering. Als Kontrolle für den verwendeten Antikörper im Blot wurde jeweils ein Gesamtzellextrakt aus HEK293 Zellen (HEK293-GZE) aufgetragen.

Die Co-IP-Studien mit überexprimiertem YY2 zeigten, dass beide YY-Proteine sowohl SP1 als auch CTCF binden können. Interessanterweise scheint die Bindung von SP1 und YY2 affiner zu sein als mit YY1. Aufgrund der Qualität des immunologischen Nachweises von SP1 und CTCF fokussieren sich weitere Analysen auf die YY2-SP1-Bindung.

#### 2.3.2.1.3 Nachweis der direkten Bindung zwischen YY2 und SP1

Nachdem gezeigt wurde, dass YY2 und SP1 miteinander interagieren, stellte sich die Frage, ob beide Proteine direkt aneinander binden oder Teile eines Komplexes verschiedener Proteine sind. Mit der Co-IP aus Gesamtzellextrakten von HEK293 Zellen konnte jedoch nur untersucht werden, ob SP1 zusammen mit YY2 copräzipitiert wird. Um diese Fragestellung klären zu können, wurde die Bindung von YY2 und SP1 in einem separaten Ansatz ohne zusätzliche Co-Faktoren untersucht. Dafür wurde das Plasmid pGEXGSTYY2 kloniert, um rekombinantes GSTfusioniertes YY2 in E.coli produzieren zu können. Dieses rekombinante YY2 Protein wurde mit kommerziell erworbenem SP1 in einem Pulldown-Experiment verwendet, welches es erlaubt, eine mögliche direkte Bindung beider Proteine nachzuweisen. Bei einer Bindung zwischen YY2 und SP1 kann der entstandene Komplex mittels Gluthation-Agarose isoliert und über das SP1 Protein nachgewiesen werden. Nach dem Pulldown wurde das Präzipitat immunologisch mittels western Blot analysiert. In der Probe mit rekombinantem YY2 (rYY2) und reinem SP1 (reSP1) konnte eindeutig eine SP1 Bande im Vergleich zur Kontrolle mit reinem GST (reGST) und reSP1 bzw. rYY2 allein nachgewiesen werden (Abb. 20). Es besteht demnach eine direkte physiologische Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren YY2 und SP1.



**Abbildung 20: Nachweis der direkten Bindung zwischen YY2 und SP1.** Für die Untersuchung, ob YY2 und SP1 direkt interagieren können, wurden Co-IP-Studien mit GST-fusioniertem rekombinantem YY2 und reinem SP1 durchgeführt. Wenn SP1 direkt an das YY2 bindet, wird der entstandene Proteinkomplex mittels Gluthation-Agarose präzipitiert und im Western Blot immunologisch nachgewiesen. Der Blot zeigt ein eindeutiges SP1-Signal und belegt die direkte YY2-SP1-Bindung. Im Vergleich zeigen die Kontrollen, bei denen reines GST (reGST) mit reinem SP1 (reSP1) bzw. nur rekombinantes YY2 (rYY2) verwendet wurde, keine Banden. Als Positivkontrolle wurde reines SP1 aufgetragen, mit dem die Höhe des zu erwartenden Signals überprüft wurde.

#### 2.4 Konditioneller YY2 knockout

In den vorangegangen Experimenten konnten neue Indizien für die biologische Funktion des YY2 bei der Entwicklung des Säuger-Organismus erbracht werden. Jedoch konnte weiterhin keine explizite Funktion dieses Transkriptionsfaktors beschrieben werden. Hierfür ist eine *yy2* Ablation in der Maus unabdingbar, da so am sichersten ein Phänotyp durch das Fehlen des yy2 definiert wird. Prof. Dr. Masayuki Yamamoto (Tohoku Universität, Sendai, Japan) konnte für ein solches Kooperationsprojekt gewonnen werden. Mit der Unterstützung durch ein 6-monatiges Kurzstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdiensts war es möglich, die Experimente unter der Leitung von Prof. Yamamoto in Japan durchzuführen.

Ziel war es, eine konditionelle *knockout* Maus zu generieren, um eine mögliche Letalität während der Embryogenese ausschließen zu können.

## 2.4.1 Die Klonierung des Targeting-Vektors

Als initialen Schritt sollte ein Targeting-Vektor kloniert werden, der das YY2-Exon im Maus-Genom mit loxP-Schnittstellen versieht, um es später durch die Verpaarung mit einer Cre-Maus zu deletieren. Der dafür geeignete Vektor wird als pgkem7neo bezeichnet und besitzt neben den loxP-Schnittstellen noch ein Diphterie Toxin A Fragment (DTA)- und eine mit frt-Schnittstellen flankierte Neomycinkassette. Beide Kassetten dienen zur Selektion von positiven embryonalen Stammzellen. Für die Generierung des Targeting-Vektors war es wichtig, sowohl das *yy2* Exon mit einem jeweiligen Überhang von 100 bp als auch den 3'- (2,5 kb) bzw. 5'-Bereich (4,3 kb) aus genomischer Maus-DNA zu amplifizieren und an die dafür vorgesehenen Stellen in das Vektorrückgrat zu klonieren. Die Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung des *yy2* Targetingvektors sowie die verwendeten Ausgangskonstrukte.



Abbildung 21: Schematische Darstellung des YY2-Tageting-Vektors mit Ausgangskonstrukten und genetischer Lokalisation des *yy2* Gens Die Abbildung zeigt zirkuläre Vektorkarten der verwendeten Plasmide PGEM7neo und DTA-pBSK mit der Beschriftung *knockout*-relevanter Bereiche (loxP- und frt-Schnittstelle; neo: Neomycin-Kassette; DTA: DTA-Kassette). Zusätzlich ist der Genlocus des *yy2*s auf dem X-Chromosom (Chr. X) linear dargestellt und das *yy2* Exon (gelb) sowie die 5<sup>-</sup> und 3<sup>-</sup> Bereiche (orange). Der linear dargestellte *yy2*-Targeting-Vektor zeigt den Aufbau des finalen Plasmids, das für die *yy2* Ablation genutzt werden soll. Das Vektorrückgrat stammt aus dem PGEM7neo. Die zusätzlichen Bestandteile wurden aus dem DTA-pBSK-Vektor bzw. genomischer DNA kloniert.

Nach der Fertigstellung des Targeting-Vektors wurde ein charakteristischer Restriktionssverdau durchgeführt, um die Vollständigkeit des Vektors zu überprüfen (Abb. 22).



**Abbildung 22: Restriktionsverdau des YY2-Targetingvektors.** Der vollständige Vektor wurde mit EcoRI und HindIII Restriktionsenzymen verdaut, um charakteristische Banden zur Kontrolle zu erhalten. Die Bande mit einer Größe von 1,65 kb entspricht dem yy2 Exon. HindIII Schnittstellen befinden sich sowohl im 3' und 5' Ende (3arm bzw. 5arm Fragment), wobei eine Bande bei 0,918 kb und eine bei 1,56 kb zu erwarten ist.

Die nächsten Schritte zur Erzeugung der yy2 *knockout*-Mutante sind die Elektroporation und Selektion von embryonalen Stammzellen. Hierfür und für die Folgeexperimente (Mikroinjektion und Embryotransfer) werden gegenwärtig neue Drittmittel beantragt.

#### 3. Diskussion und Ausblick

Ziel der experimentellen Arbeit war es, die Funktion des Transkriptionsfaktors YY2 näher zu charakterisieren. Dafür sollte untersucht werden, ob und wie das YY2-Protein transkriptionell reguliert wird, wann und wo es exprimiert wird, und mit welchen DNA-Abschnitten bzw. Proteinen es interagieren kann.

#### 3.1 YY2 verfügt über einen eigenständigen Promotor

Die Entstehung des YY2-Gens ist auf eine Retrotransposition einer vollständig gespleißten bzw. gereiften YY1 mRNA zurückzuführen. Die Besonderheit bei diesem "Verdopplungsereignis" ist jedoch, dass die aus einem Exon bestehende YY2-Sequenz in das Intron eines anderen Gens, dem *MBTPS2*, intergiriert wurde<sup>18</sup>. Nach biostatistischen Schätzungen sind ca. 50 % des humanen Genoms durch Retrotranspositionen entstanden<sup>26</sup>, und eine Vielzahl dieser Kopien fungiert als eigenständiges Retrogen<sup>27</sup>. Nur sehr wenige dieser Gene sind aufgrund ihrer Entstehungsgeschichte in einem anderen Gen lokalisiert. Beispiele für ähnlich außergewöhnlich positionierte Gene sind die Nagetier-spezifischen Gene utp14b, nup62 und snail-like<sup>28-30</sup>. Sie werden zusammen mit ihren umgebenden Genen fusioniert transkribiert und weisen demnach auch ein ähnliches Expressionsmuster auf. Da die kodierende YY2-Sequenz innerhalb des MBTPS2-Gens lokalisiert ist und ein fusioniertes Transkript beider Gene identifiziert werden konnte, wurde lange Zeit angenommen, dass auch YY2 nicht eigenständig reguliert wird<sup>18</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten zur Expressionsanalyse von YY2 und MBTPS2 in vier verschiedenen humanen Zelllinien zeigten jedoch erstmals, dass beide Gene voneinander unabhängig reguliert werden (vgl. Abb. 2). Luziferase-Reportergenanalysen, in Kombination mit Untersuchungen zum Einfluss von DNA-(De-)Methylierung auf die Expression von YY2 und MBTPS2, konnten schließlich untermauern, dass die intronische Sequenz tatsächlich über Promotoraktivität verfügt, und dies offensichtlich in Abhängigkeit vom CpG-DNA-Methylierungsstatus.

Die biologische Relevanz der Methylierung ist allerdings für Gene, die, wie auch YY2, auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, bei Untersuchungen im Zell- oder Tiermodell mit Vorsicht zu betrachten, da die Resultate durch das eine inaktivierte X-Chromosom beeinträchtigt werden können<sup>31</sup>. Bei HEK293 Zellen ist beispielsweise bekannt, dass sie über drei X-Chromosomen verfügen (ATCC<sup>®</sup> Nummer [CRL-

1573<sup>™</sup>]). Dies könnte verursachen, dass alle CpG-Motive des proximalen YY2-Promotors in den Bisulfitsequenzierungsstudien methyliert sind. Ob das dreifach vorhandene X-Chromoson tatsächlich die Methylierung von YY2 beinflusst, muss noch geklärt werden.

Die Daten zu den Reportergenaktivitäten von *in vitro* methylierten Plasmiden lassen jedoch vermuten, dass DNA-(De-)Methylierung tatsächlich die Aktivität des *YY2*-Promotors beeinflusst. Da DNA-Methylierung ein epigenetischer Mechanismus der Genregulation ist, um entwicklungs- bzw. zelltypspezifische Expressionsmuster zu bilden<sup>32</sup>, kann man annehmen, dass YY2 für entwicklungsbiologische Prozesse relevant ist.

Die Deletionsexperimente in den Reportergenanalysen zeigen deutlich, dass der gesamte intronische Bereich neben aktivierenden Bereichen auch repressive DNA-Elemente besitzt. Dass Intronsequenzen über transkriptionell aktive regulatorische DNA-Elemente verfügen, ist bereits seit längerem bekannt<sup>33</sup>. Bioinformatische Vorhersagen über potentielle DNA-Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren mittels TRANSFAC<sup>34</sup> erbrachten eine Vielzahl an Kandidatenproteinen. Neben Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der ETS Proteinfamilie, fanden sich auch DNA Motive für GATA und PAX Transkriptionsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie während der frühen Embryogenese entwicklungsabhängige Gene regulieren<sup>35, 36</sup>. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Mutationsanalysen der vorhergesagten Bindungsstellen ergaben in *vitro* teilweise signifikante Änderungen der transkriptionellen Aktivität des proximalen YY2 Promotorkonstrukts. Jedoch konnten bisher weder PAX noch andere Transkriptionsfaktoren als tatsächliche Regulatoren der YY2-Expression in vivo bestätigt werden (persönliche Mitteilung von Dr. Martin Klar).

#### 3.2 YY2 als möglicher Regulator der Neurogenese

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten zum Expressionsprofil von *yy*2 bei Mäusen standen nur wenige Daten über die Expression im Gehirn, Hoden und Ovar bei 8 Wochen alten Tieren zur Verfügung<sup>18</sup>. Um ein umfassenderes Expressionsprofil erstellen zu können, wurden WISH-Untersuchungen durchgeführt. Interessanterweise deuten die WISH-Untersuchungen ähnlich wie beim *yy1* auf eine ubiquitäre Expression im Embryo hin<sup>11</sup>. Dies lässt eine fundamentale Bedeutung des yy2 Transkriptionsfaktors für die Entwicklung des Säuger-Organismus vermuten.

Aufgrund dass YY2 des Befundes, der neu identifizierte Promotor methylierungssensitiv ist und vermutlich epigenetisch reguliert wird, war es sinnvoll, longitudinale Reihen zur YY2 Expression in Mausgewebeproben zu untersuchen. Hiervon sind die Expressionsunterschiede von yv2 im sich entwickelnden Gehirn besonders hervorzuheben. Während das Transkriptlevel von yy2 im Verlauf der neokortikalen und cerebralen Differenzierung signifikante entwicklungsabhängige Änderungen aufweist, bleibt das Expressionsniveau im Hippocampus im Verlauf der Entwicklung konstant. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass yy2 an der Ausbildung verschiedener Gehirnareale beteiligt ist. Interessanterweise konnte auch das yy1 Protein mit der neuronalen Entwicklung in Zusammenhang gebracht werden. So zeigen heterozygote yy1-knockout Mäuse neben einem verminderten Wachstum deutliche Neurulationsdefekte<sup>11</sup>. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Ablation gemacht<sup>37</sup>. Xenopus Ein des vv1 Homologs (xyy1)in detailliertes Genexpressionsprofil in yy1 depletierten Xenopus-Proben zeigte eine deutliche Verminderung von Genen, die entweder mit der Gliederung des Organismus in Verbindung gebracht werden (z.B. homeobox Gene, engrailed2, otx2) oder in der Spezifizierung und Migration von Zellen der Neuralleiste involviert sind (*slug*, *snail*)<sup>38</sup>. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zur entwicklungsabhängigen yy1-Expression deuten an, dass yy2 im Gegensatz zu yy1 dynamisch reguliert wird (vgl. Abb. 11 und 12). Somit wird deutlich, dass yy2 trotz der Homologie zu yy1 völlig unterschiedlich reguliert wird und möglicherweise gänzlich eigenständige Funktionen übernimmt.

Die weiterführenden Untersuchungen klärten ferner, dass sich die Expression von yy2 in verschiedenen neuronalen Zelltypen unterscheidet. Insbesondere kortikale Neurone zeigten, im Vergleich zu Microglia und Astrozyten, ein geringes Transkriptlevel. In vorangegangenen in situ Hybridisierungen von Luo et al. konnte darüber hinaus die Expression von yy2 in Purkinje- und Granularzellen des Cerebellums von 18-Wochen alten Mäusen nachgewiesen werden<sup>18</sup>. Kortikale Neuronen und Gliazellen zeigten in den Entwicklungsstadien vergleichsweise nur geringe Mengen an yy2-Transkripten auf<sup>18</sup>. Aus allen bisher zusammengetragenen Befunden wird deutlich. dass die Expression von yy2 nicht nur entwicklungsabhängig, sondern auch zelltypspezifisch reguliert ist.

Welche Auswirkungen variierende yy2-Konzentrationen auf zelluläre Prozesse haben, ist bisher nicht untersucht. Da sich Neurone, die bei den gezeigten

39

Ergebnissen das niedrigste *yy2*-Niveau aufwiesen (vgl. Abb. 14), im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zelltypen nicht mehr teilen können, ist eine Assoziation von yy2 mit der Zellproliferation denkbar<sup>18, 39</sup>. Ein funktioneller Zusammenhang von YY-Proteinen mit der Zellproliferation wurde bereits in *knockdown*-Experimenten an HeLa Zellen gezeigt: Während eine Verminderung des YY2 Levels die Proliferation der Zellen steigerte, ging mit der YY1 Ablation eine verminderte Zellteilungsrate einher<sup>21</sup>.

Die Untersuchungen der longitudinalen Reihen und den verschiedenen neuronalen Zelltypen legen deshalb nahe, dass YY2 einen Einfluss auf die Gehirnentwicklung haben könnte. Für die Klärung dieses Sachverhalts ist der angestrebte konditionelle *yy2 knockout* im Mausmodell unerlässlich.

## 3.3 YY2 ist ein Regulator einer Vielzahl von humanen Genen

Der Transkriptionsfaktor YY2 ist durch seine Zinkfinger in der Lage, regulatorische Elemente in der DNA verschiedener Gene zu binden und diese Gene zu regulieren. Bisher wurden jedoch nur wenige Zielgene charakterisiert<sup>20</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine *in vivo* Studie in humanen Zellen durchgeführt, die ein umfassendes Profil von möglichen YY2-Zielgenen liefert. Die ChIP-chip Analyse konnte leider erst zum Ende dieser Dissertationsarbeit durchgeführt werden, da ein geeigneter YY2-Antikörper erst seit kurzem verfügbar ist. Zuvor stand lediglich ein in der Arbeitsgruppe von Prof. Seto generierter YY2-Antikörper zur Verfügung, der jedoch nicht für IP-Studien, also native Applikationen, geeignet war (persönliche Mitteilung von Prof. Edward Seto, Moffitt Cancer Center).

Die Tatsache, dass 2516 potentielle *in vivo* Targets für YY2 ermittelt werden konnten, kann als weiteres Indiz für die biologische Relevanz dieses Transkriptionsfaktors gewertet werden.

## 3.3.1 Regulation der HOX Gene durch YY2

Interessanterweise waren aus der *HOX* Genfamilie auffallend viele Vertreter in der ChIP-chip Ergebnisliste zu finden. HOX Proteine sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise Apoptose, Rezeptor-Signalisierung, Differenzierung, Zellmigration und Angiogenese beteiligt<sup>40</sup>. Defekte in der *HOX* Expression führen zu einer gestörten Entwicklung<sup>41</sup>, da HOX Proteine eine wichtige Rolle bei der Gliederung von Embryonen der Wirbeltiere spielen<sup>42</sup>. Es war bereits

Diskussion und Ausblick

bekannt, dass die Expression des murinen *hoxa5*-Gens durch yy1 reguliert wird<sup>22</sup>. YY1 ist in diesem Falle für die Rekrutierung von repressorisch wirkenden Polycomb-Proteinkomplexen (PcG) verantwortlich<sup>22</sup>. Die Rekrutierung erfolgt über die so genannte Repo-Domäne des YY1 Proteins. Diese Domäne ist nicht nur im YY1 Gen speziesübergreifend konserviert, sondern auch beim YY2-Protein vorhanden<sup>43</sup>. Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass YY2 mit *core*-Komponenten der PcGs interagiert. Dazu gehören die Ring-Proteine sowie die PcG-assoziierten Proteine *embryonic ectoderm development* (eed), *RING1 and* YY1 *binding protein* (rybp) und YY1 *associated factor* 2 (yaf2)<sup>44</sup>.

Funktionelle Studien sollten eine Regulation der *HOX* Gene durch YY2 mittels RNA-Interferenz belegen. Die Ablation von YY2 führte jedoch in HEK293 Zellen zu keiner Änderung der Expression ausgewählter *HOX* Gene. Allerdings konnte die beschriebene Regulation von HOXA5 durch YY1 nicht bestätigt werden.

Für eine eindeutige Aussage zum Einfluss von YY2 auf die *HOX*-Gen-Expression ist zudem der immunologische Nachweis des *YY2-knockdown* auf Proteinebene unvermeidlich. Es ist auch nicht auszuschließen, dass in den eigenen Experimenten keine signifikante Verminderung der YY2-Proteinkonzentration vorlag, weil ein *YY2-knockdown* vom deutlich größeren endogenen Pool an YY1 kompensiert wird und somit redundant sein könnte<sup>21</sup>. An dieser Stelle wäre eine vergleichende *in vivo* Analyse *YY1*-assoziierter Promotorbereiche erforderlich. In der Literatur sind YY1 ChIP-chip Daten beschrieben<sup>45</sup>. Diese Untersuchungen sind jedoch mit YY1-Antikörpern durchgeführt worden, von denen wir zeigen konnten, dass sie unter nativen Reaktionsbedingungen für YY2 kreuzreaktiv sind<sup>46</sup>. Folglich müssen bei künftigen Untersuchungen zur *in vivo* DNA-Assoziation von YY2 und YY1 Antikörper verwendet werden, die eindeutig zwischen beiden YY-Transkriptionsfaktoren diskriminieren.

## 3.4 YY2 interagiert direkt mit dem Transkriptionsfaktor SP1

Transkriptionsfaktoren sind Teil eines komplexen Netzwerks von Proteinen, die miteinander interagieren. Das YY2 Protein besitzt neben der YY1-homologen DNA-Bindungsdomäne weitere Bereiche, die wahrscheinlich für die Interaktion YY2spezifischer Proteine verantwortlich sind. Um dies zu untersuchen, wurden Co-IP-Studien mit FLAG-fusioniertem YY2 durchgeführt. Unter nativen Bedingungen war es möglich, YY2-gebundene Proteine zu isolieren und auf einem Silbergel aufzutrennen. Mittels Massenspektrometrie sollten mögliche Bindungspartner identifiziert werden. Jedoch wurden lediglich YY2 und HSP70 detektiert. Für HSP70 ist jedoch bekannt, dass es oft unspezifisch bindet, da es in seiner Funktion als Chaperon mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert und diese faltet<sup>47</sup>. Es stellt sich daher die Frage, warum keine "echten" Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Ein Grund dafür könnte die Konzentration der copräzipitierten Proteine sein. Obwohl das YY2überexprimiert wurde, Zellen muss die "Ausbeute" Protein in den an Bindungspartnern nicht zwangsläufig höher sein als mit endogenem YY2. Eine neue Strategie war daher, sich die Homologie des YY2 zu YY1 zu Nutze zu machen. Da YY2 und YY1 zu 56 % identisch sind<sup>8, 17, 18</sup>, lag es nahe, dass beide Proteine Domänen teilen und somit identische Bindungspartner haben könnten. Daher schien es sinnvoll, bereits bekannte Interaktionspartner von YY1, also Sp1 bzw. CTCF, zu untersuchen und zu überprüfen, ob diese auch mit YY2 interagieren. Wie bereits beschrieben, ist SP1 ein essentieller Transkriptionsfaktor, der unter anderem mit dem Transkriptionskomplex interagiert und in vielen Krebszellen dereguliert vorkommt<sup>23</sup>, hochkonserviertes CTCF ist ein Zinkfingerprotein, das in verschiedenen regulatorischen Prozessen, wie Aktivierung, Repression, Isolierung, Prägung und Xchromosomale Inaktivierung, involviert ist<sup>25</sup>. Beide Proteine konnten in der Co-IP isoliert und anschließend im western Blot nachgewiesen werden. Leider gelang der immunologische Nachweis von CTCF im western Blot nicht gut genug, um Schlussfolgerungen zu ziehen. Im Gegensatz dazu konnte SP1 eindeutig nachgewiesen werden und unter Verwendung rekombinanter Proteine eine direkte Bindung gezeigt werden. Es sollte untersucht werden, ob dieser Proteinkomplex spezielle DNA-Bindungsmotive bindet. Die Interaktion von YY2 und Sp1 könnte auch darauf hindeuten, dass YY2 eine Rolle in der Biologie des Sp1 spielen könnte. YY2 könnte beispielsweise die Aktivität des Sp1 modifizieren. Vom YY1 ist bereits bekannt, dass es in der Lage ist, Sp1-spezifische Zielgene zu reprimieren<sup>48</sup>. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion von YY1 mit Sp1 eine synergistische Steigerung der YY1-vermittelten Initiation der Transkription am adenoassoziierten Virus P5 Promotor erzielt wird<sup>3</sup>. Aufgrund der Homologie beider YY-Proteine und der direkten Bindung mit Sp1 könnte ein ähnlicher Sachverhalt auch für YY2 gelten. YY2 könnte in diesem Kontext einerseits das YY1 ersetzen oder auch antagonistisch wirken. Diese Hypothese ist experimentell zu überprüfen.

#### 3.5 YY2-knockout Mausmutante

Die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit legen eine biologische Relevanz von YY2 nahe. Daher sollte ein endgültiger Beweis durch die yy2-Ablation im Mausmodell erbracht werden. In Kooperation mit Prof. Dr. Masayuki Yamamoto und mit der finanziellen Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) konnte das Projekt durch einen Forschungsaufenthalt in Japan begonnen werden. Dabei wurde der Targeting-Vektor vollständig generiert, so dass er für die Elektroporation in embryonale Stammzellen zur Verfügung steht. Das Konstrukt ist so gestaltet, dass es durch homologe Rekombination am 5'- und 3'-Ende des *yy2* Exons loxP-Schnittstellen einfügt, die später durch Verpaarung mit Cre-Mäusen geschnitten werden, damit das *yy2* im Genom der Mausmutante deletiert wird.

Bei der *knockout*-Variante wurde sich bewusst für einen konditionellen *knockout* entschieden, da der *yy1 knockout* im frühen Embryonalstadium letal ist<sup>11</sup>. Durch das konditionelle Verfahren können methodische Fehler, die zum Abort führen könnten, ausgeschlossen werden, da die genetische Veränderung und die Deletion des Zielgens durch eine Generation voneinander getrennt sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die Verpaarung mit spezifischen cre-Mäusen, also Mutanten, die die cre-Rekombinase nur in bestimmten Zelltypen bilden, ein zellspezifischer *knockout* möglich wäre. Diese Vorgehensweise ist sinnvoll, falls sich herausstellen sollte, dass das yy2 für die intrauterine oder postnatale Entwicklung tatsächlich essentiell ist.

## 4. Material und Methoden

## 4.1 Zellkulturtechniken

## 4.1.1 Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293, ATCC No. CRL-1573) wurden in DMEM (Invitrogen), komplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (Biochrom) und 5% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin; Biochrom), kultiviert.

## 4.1.2 Transfektion von HEK293

Vor der RNA- bzw. Proteinisolierung wurden 4 x  $10^5$  Zellen mit Hilfe des Lipofektionsreagenz Metafectene (Biontex) mit 2 µg Plasmid-DNA nach Herstellerangaben transfiziert und 24 h kultiviert.

Für *knockdown*-Effizienztests wurden die Zellen mit 2 µg shRNA-Expressions-Plasmid und nach 24h ein zweites Mal mit 1µg des korrespondierenden *knockdown*-Plasmids und 1 µg FLAG-gekoppeltes YY2- bzw. YY1-Überexpressionsplasmid transient transfiziert.

## 4.2 Molekularbiologische Techniken

## 4.2.1 RNA-Techniken

## 4.2.1.1 RNA Isolation und reverse Transkription

Die RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen wurde mittels TRIzol® Extraktion nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm, wobei OD260 = 1.0 einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Die RNA wurde bei -80°C gelagert. RNA aus Geweben wurde ebenfalls mit Hilfe von TRIzol® extrahiert, wobei die Gewebeprobe zuvor mit einem Skalpell und anschließend mit einer Spritzenkanüle (21G) homogenisiert wurde. Vor der cDNA-Synthese wurde die RNA mit DNase I behandelt. Die Qualität der DNase I Behandlung wurde anschließend mittels PCR verifiziert. 2 µg RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)15 Primer und 1 µl 10 mM dNTPs für 5 min bei 65°C in einem Thermomixer denaturiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe eines Mixes aus 4 µl 5x *First-Strand Buffer*, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 40 U/µl RNasin sowie 0.5 µl 200 U/µl M-MLV-Reverse Transkriptase wurde bei -20°C gelagert. Danach wurden die zu untersuchenden Gene mittels PCR amplifiziert.

## 4.2.1.2 Real-time PCR

Die real-time PCR diente der Quantifizierung von mRNA, die zuvor mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben wurde (siehe 4.2.1.1). Die real-time PCR wurde, wie in der Publikation von Drews *et. al.* 2009 beschrieben, durchgeführt<sup>39</sup>.

## 4.2.1.3 Whole mount in situ Hybridiersierung (WISH)

Die WISH ist eine Methode, um mRNA in intakten Embryonen mittels einer spezifischen DIG-Sonde nachweisen zu können. Violett gefärbte Areale weisen auf eine Expression der untersuchten mRNA hin, wobei Gewebe ohne Expression weiß bzw. transparent verbleiben. In der Publikation Drews *et al.* 2009 ist der Versuchsablauf beschrieben<sup>39</sup>.

## 4.2.2 DNA-Techniken

## 4.2.2.1 Isolierung hochmolekularer DNA aus Zellen: HMW-DNA

Konfluent gewachsene Zellen einer 6-Well Platte wurden mit PBS gewaschen und mit 0.5 ml *Modified* Bradleys-Lösung lysiert und über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 1 ml 100% Ethanol mit 75 mM Natriumacetat ohne Schütteln 2-3 h bei RT präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1800 rpm wurde die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 1 ml 70% Ethanol für 30 min gewaschen, zentrifugiert und nach Trocknung (10 min, RT) in 20-30 µl TE aufgenommen. Zum vollständigen Resuspendieren der DNA wurde das Gemisch für etwa 1 h bei 37°C geschüttelt. Die erhaltene HMW-DNA wurde direkt für die PCR eingesetzt.

## Modified Bradleys: 10 mM Tris-HCI (pH 7.5) 2 mM EDTA 10 mM NaCI 0.5% SDS 1 mg/ml Proteinase K

## 4.2.2.2 Bisulfitkonvertierung genomischer DNA mittels EpiTect® Bisulfite Kit

Die Bisulfitsequenzierung ist eine Methode um Methylierungen an CpG-Motiven nachzuweisen. Dabei wurden durch die Konvertierung der DNA mittels Bisulfit nur unmethylierte Cytosinreste zu Uracilresten umgewandelt. Anschließend wurde der zu analysierende DNA-Bereich amplifiziert und das PCR-Produkt sequenziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2 µg DNA mittels des EpiTect® Bisulfite Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers konvertiert.

## 4.2.2.3 in vitro Methylierung und Demethylierung

Die *in vitro* Methylierung der DNA erfolgte mit einer CpG-spezifischen M.Sssl Methyltransferase (New England Biolabs). Die Demethylierung wurde mit Aza durchgeführt und direkt in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Beide Methoden sind in der Publikation Klar *et al.* 2009 detailliert beschrieben<sup>52</sup>.

## 4.2.2.4 Reportergenanalysen

Um das Transaktivierungspotential von Promotoren zu charakterisieren, wurden im Verlauf dieser Studie Reportergenanalysen durchgeführt. Bei dieser Methode wurden Plasmide, welche das Reportergen (Luziferase) unter der Kontrolle des zu studierenden Promotors enthalten, in geeignete Zellen transfiziert. Die anschließend gemessene Luziferaseaktivität ist direkt proportional mit der Aktivität des Promotors. Um basalen Luziferaseaktivitäten untersuchten die der Reportergenkonstrukte zu messen, wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) verwendet. Die Messung wurde am Luminometer (Lumat LB 9501. Berthold) durchgeführt. Die Beschreibung des Versuchsablaufs ist in der Veröffentlichung von Klar et al. 2009 nachzulesen<sup>52</sup>.

## 4.3 Klonierungstechniken

## 4.3.1 Verwendete Bakterien

Zur Klonierung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente TOP10 *E.coli* (ursprünglich One Shot® TOP10 von Invitrogen) mit folgendem Genotyp verwendet: *FmcrA\_(mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lacZ\_*M15 *\_lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 *\_(araleu)*7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G. Für die Herstellung des rekombinanten YY2-GST Fusionproteins wurden *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlusTM RIL mit dem Genotyp F- *ompT hsdS* (rB-mB-) *dcm*+Tetr *gal* $\lambda$  (DE3) *end*A Hte [*argU ileY leuW* Camr] verwendet.

#### 4.3.2 Präparativer Restriktionsverdau

Um die für eine Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen zu generieren, wurden 3 µg einer Plasmid-DNA und das entsprechende, aus einem Agarosegel eluierte, PCR-Produkt mit 20 U des jeweiligen Restriktionsenzyms unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung im 5%-igen Agarosegel. Die Banden mit der korrekten Produktgröße wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

# 4.3.3 Aufreinigung der DNA via QIAquick® Gel Extraction und PCR Purification Kit

Die QIAquick® Gel Extraction und PCR Purification (Firma Qiagen) wurden verwendet, um aus Agarosegelen DNA-Fragmente mit einer Größe von 0.1-10 kb zu isolieren beziehungsweise PCR-Fragmente aus PCR-Ansätzen zu reinigen. Die zu isolierende DNA wurde aus einem Agarosegel ausgeschnitten oder der PCR-Ansatz verdünnt und nach Herstellerangaben über eine Silica-Säule gereinigt.

## 4.3.4 Ligation

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden wurde in einem 10 µl Ansatz 0.1-0.2 pmol eines Vektors mit 0.2-0.4 pmol eines DNA-Fragments, 1 µl 10x Ligase-Puffer und 400-2000 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde anschließend für mindestens 1 h bei RT oder bei 16°C über Nacht inkubiert.

## 4.3.5 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E.coli* Bakterien und Transformation

Eine Übernachtkultur CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E.coli* (TOP10) wurde in SOC-Medium (2 x 300 ml) bis zu einer Absorption von 600 nm (A600) von 0.5 angezogen und durch Zentrifugation sedimentiert (5000 rpm, 10 min, 4°C). Die Zellpellets wurden anschließend in je 20 ml eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 20 min

auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen (5000 rpm, 10 min, 4°C) wurden diese in 3 ml eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und für weitere 3 h auf Eis inkubiert. Die CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Bakterien wurden nach Zugabe von 15% (v/v) Glyzerin in 50 µl- Portionen aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden 5-10 µl Ligationsansatz zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 sec Hitzeschock bei 42°C wurden die Bakterien 3 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz für 45 min bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Abschließend wurden die Zellen mit einem Drigalski-Spatel auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.3.6 Minipräparation und analytischer Restriktionsverdau

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle *E.coli* Laborstämme<sup>53</sup>. Eine 2 ml LB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde für 6-18 h bei 37°C geschüttelt. Nach dem Umfüllen in 2 ml Eppendorfgefäße wurde die Suspension für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in 500 µl STET-Puffer aufgenommen, mit 50 µl LTE versetzt und gemischt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT wurden die Proben für 90 sec in einem Thermomixer bei 95°C erhitzt. Danach wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und dann das zähflüssige Pellet mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Anschließend wurden 50 µl 8 M NH₄Acetat und 500 µl Isopropanol zum Überstand gegeben, gemischt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30-50 µl TER aufgenommen. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 30°C im Thermomixer konnte die Plasmid-DNA einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen werden. Dabei wurden 5 µl der Mini-Präparation mit geeigneten Restriktionsendonukleasen nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden anschließend mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels auf positive Klone analysiert.

STET-Puffer: 8% Sucrose 0.5% Triton X-100 50 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

48

LTE: 10 mg Lysozym/1 ml TE TER: 10 µg RNase A/1 ml TE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle positiven Klone mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger bei der Firma GATC (www.gatc-biotech.com) sequenziert.

## 4.3.7 Präparative Plasmidisolierung mittels QIAprep® Plasmid Midi Kit

Für eine Maxipräparation der Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C für 12 bis 16 h inkubiert. Zur Reinigung der Plasmid-DNA wurde das QIAprep® Spin Midiprep Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

## 4.3.8 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt mit einem Photometer. Dabei wurden die Lichtabsorptionen bei 260 nm im Vergleich zum reinen Lösungsmittel gemessen, wobei eine optische Dichte bei 260 nm (OD260) von 1.0 einer DNA-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml entspricht. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten OD260/OD280 bestimmt; dieser Wert sollte bei 1.8 liegen.

## 4.3.9 Anlegen von Glyzerinstocks

Ein kurzfristiges Aufbewahren (bis zu 6 Wochen) von auf Agarplatten ausgestrichenen Bakterienkolonien erfolgte bei 4 °C. Eine langfristige Lagerung ist als Stammkultur möglich. Hierzu wurde Einfriermedium im Verhältnis 1:1 mit einer Übernachtkultur gemischt und bei -80°C gelagert.

Einfriermedium: 65 ml 99% Glyzerin 2.4 g MgSO4 2.5 ml 1 M Tris-HCl add. 100 ml H2O pH 8.0

## 4.4 Proteinbiochemische Arbeitstechniken

## 4.4.1 Protein-Isolierung und immunologischer Nachweis (western Blot)

Gesamtzellextrakte wurden mit RIPA Lyse Puffer (siehe IP) hergestellt. Die Lysate wurden in einem 10%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran im semi-dry Verfahren (Biorad) transferiert. Anschließend wurde eine Ponceaufärbung (5 min) als Nachweis für gleichmäßige Proteinbeladung bzw. erfolgreichen Transfer durchgeführt. Die Inkubation mit den Antikörpern anti-FLAG (F3165 M2; SIGMA-Aldrich; 1:2000) und anti-Sp1 (sc-59; Santa Cruz Biotechnology; 1:500) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in 3% Magermilch in TBS-T (TBS + 0,1% Tween) nach zuvor erfolgtem Blocken in 5% Magermilch (in TBS-T) über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem anti-mouse (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology; 1:10000) oder anti-rabbit (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology; 1:10000) Zweitantikörper für 30 min, bevor die Membran mit ECL-Lösung (Pierce) behandelt und die Signale mit einem *High performance Chemiluminescence*-Film (Kodak) detektiert wurden.

Standardrezeptur für zwei 10% ige Gele (8 x 6 cm):

Trenngel:

4 ml H<sub>2</sub>O

2.5 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS)

3.3 ml Polyacrylamid (30%)

100 µl 10% SDS

40 µl 25% APS

10 µl TEMED

Sammelgel:

2.25 ml H<sub>2</sub>O

0.95 ml Sammelgelpuffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS)

0.45 ml Polyacrylamid (30%)

38 µl 10% SDS

15 µl 25% APS

8 µl TEMED

1x Laufpuffer:

25 mM Tris pH 8.6

192 mM Glycin; 0.1% w/v SDS Transferpuffer: 25 mM Tris 200 mM Glycin 20% Ethanol

Ponceau: 0.1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure

## 4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen der Gesamtzellextrakte wurden mit dem Protein Assay Reagent von Bio-Rad Laboratories nach der Bradford-Methode anhand des Protokolls des Herstellers ermittelt.

## 4.4.3 Herstellung rekombinanter Proteine und GST-Pulldown

Für die Herstellung des rekombinanten YY2 wurde ein entsprechend klonierter pGEX-Expressionsvektor in *E.coli* BL21 transformiert und mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin selektiert. Für die 20 ml der Hauptkultur wurden 7 ml mit den transformierten *E.coli* über Nacht angeimpft. Diese Vorkultur wurde in die Hauptkultur gegeben und bis zu einer OD 0,5 bei 37°C kultiviert. Danach wurde mit 100 mM IPTG (1  $\mu$ I/ml) induziert und 1 h bei 37°C inkubiert. Das Zellpellet (Zentrifugation: 10 min, 3000 rpm) wurde in 300  $\mu$ I PBS mit Proteaseinhibitor resuspendiert und 2- bis 3-mal mit Ultraschall im Eisbad lysiert. Anschließend wurde der Überstand für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

Für den GST-Pulldown wurde die Glutathion Agarose in Wasser (50% v/v) gequollen, davon wurden 40 µl für den Ansatz verwendet. Dazu wurden 50 µl Überstand (rekombinantes YY2), 200 ng rekombinantes Sp1 (Promega), 10 µl (100-fach) Proteaseinhibitor gegeben und mit PBS bis auf 1 ml aufgefüllt und 2 h bei 4°C rotiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation: 30 sec, 6000 rpm) wurde der Überstand mit einer 27 G Kanüle abgezogen und das trockene Pellet mit 4-fach Probenpuffer versetzt. Vor der SDS-PAGE und dem immunologischen Nachweis von Sp1 wurde das Pellet 5 min lang aufgekocht.

## 4.5 Immunologische Techniken

## 4.5.1 Immunopräzipitation (IP)

5x10<sup>6</sup> HEK293-Zellen wurden mit Phospat Buffered Saline (PBS) gewaschen und anschließend für 60 min in 1 ml RIPA Puffer (0,05 M Tris, pH7.4; 0,15 M NaCl; 0,001 M EDTA; 0,001 M EGTA; 1% Triton-X; 0,25% (Na)DOC) mit Proteaseinhibitor Cocktail (Complete; Roche) lysiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 14000 rpm) wurde der Gesamtzellextrakt von den Zelltrümmern (Pellet) getrennt. Jeweils gleiche Mengen an Zellextrakt wurden in 1 ml RIPA mit Proteaseinhibitor, 20-40 μl Agarose Kugeln und 2 μg Antikörper (sc-47637, Santa Cruz Biotechnology) für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurden die Agarose Kugeln 3-mal in RIPA mit Proteaseinhibitor gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wurde die Agarose direkt in SDS-PAGE Ladepuffer (Proben Puffer) gekocht und die Proben per Kanüle (27G) auf das SDS-Gel aufgetragen.

Probenpuffer (8 x): 0.25 M Tris/HCl pH 6.8 8% SDS 40% Glycerin 20% β-Mercaptoethanol

## 4.5.2 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die ChIP wurde mit dem ChIP Assay Kit (Catalog # 17-295; Upstate) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für jede Probe wurden 1x10<sup>6</sup> HEK293 Zellen verwendet und die DNA mittels Ultraschall (BRANSON Sonifier 150) fragmentiert: 35 Wiederholungen auf Eis (10 sek Ultraschall, 10 sek Pause) auf Stufe 1 des Ultraschallgeräts. Die DNA-Fragmentierung wurde in einem Agarosegel evaluiert, wobei eine Fragmentgröße von 200-1000 bp empfohlen wurde.

10 µg des anti-YY2 (sc-47637; Santa Cruz Biotechnology) oder anti-acH3 (Catalog # 06-599; Upstate) Antikörpers wurden zum Reaktionsmix gegeben. Die Inkubation ohne Antikörper diente als Negativkontrolle. Nach der ChIP wurde die isolierte DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Die Verifizierung der ChIP-Proben erfolgte mittels PCR (35 Zyklen bei 58°C) mit spezifischen Primern für die Amplifizierung der interessanten DNA-Bereiche (Primerliste). Eine PCR mit der

gesamten in die ChIP eingesetzte DNA (Input) diente als Positiv- und nur Wasser als Negativkontrolle.

#### 4.5.3 Whole genome amplification

Um eine höhere Ausbeute an YY2 ChIP-DNA für den Microarray zu erhalten, wurde das GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification Kit (Catalog # WGA2; SIGMA) nach Herstellerangaben benutzt. Die DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt.

Die ChIP-chip-Hybridisierung der ChIP-Proben wurde mittels eines Service von imaGenes GmbH (http://www.imagenes-bio.de/home4) auf einem NimbleGen 2.1 Mio Promotor deluxe (hu) array (Catalog # 05542324001, Roche) durchgeführt. Die YY2- (1 µg) und die input-Probe (1 µg) sind mit Cy5 bzw. Cy3 markiert worden. Für die Hybridisierung wurden jeweils 34 µg in einem Gesamtvolumen von 44 µl eingesetzt. Die Probenmarkierung, die Hybridisierung und die Auswertung der Analyse sind standardisierte Methoden der imaGenes GmbH (Berlin). Die Daten wurden im NCBI's Gene Expression Omnibus<sup>54</sup> hinterlegt und sind mit Hilfe der GEO Series Zugangsnummer GSE22599 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE22599) einsehbar.

#### 4.6 Silbergelfärbung und Massenspektrometrie

Die Färbung des eindimensionalen Silbergels und die anschließende Massenspektrometrie wurden im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik (Charité-Universitätsmedizin, Berlin) nach Standardprotokollen durchgeführt<sup>55</sup>.

## 4.7 Tierexperimentelle Analysen

#### 4.7.1 Verpaarung von CD1-Mäusen und Gewinnung von primären Geweben

Für die WISH wurden CD1 Wildtyp Mäuse verpaart; der Vaginalplug nach der Verpaarung wurde als E0.5 definiert. Anschließend wurden die trächtigen Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen in unterschiedlichen Embryonalstadien präpariert. Das Protokoll zur Tötung der Tiere wurde vom Tierschutzbeauftragten geprüft und von der zuständigen Landesbehörde unter folgender Nummer genehmigt: T0167/08.

## 4.8 Verwendete Standardpuffer

Puffer	Zusammensetzung	
1x Ladepuffer (DNA)	0.002% w/v Bromphenol Blue-Xylene	
	Cyanole;	
	5% v/v Glyzerin	
1x PBS	137 mM NaCl; 2.7 mM KCl;	
	4.3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ;	
	1.2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7.3	
1x TAE	40 mM Tris; 5 mM Natriumacetat;	
	1 mM EDTA; pH 8.0	
1x TBE	89 mM Tris pH 8.3; 2.5 mM EDTA;	
	89 mM Borsäure	
1x TBS	30 mM TrisHCl pH 7.6; 150 mM NaCl	
TBST	1x TBS; 0.1 % v/v Tween®20	
TE-Puffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7.4 oder	
	8.0	

## 4.9 Verwendete Plasmide

## 4.9.1 Sh-RNA-Expressionsplasmide

pBS-U6shYY2 (von Edward Seto, Moffitt Cancer Center) pBS-U6shYY1(von Edward Seto, Moffitt Cancer Center) pBS-U6shScr (von Grace Gill, Tufts Medical Center)

## 4.9.2 Überexpressionsplasmide

pcDNA3.1(-)FLAGYY1 pcDNA3.1(-)FLAGYY2 pcDNA3.1(-)FLAG pGEX GST pGEX GSTYY2 pcDNA3.1(-) HA-FLAG pcDNA3.1(-) HA-FLAG YY2 pcDNA3.1(-) HA-FLAG YY1

# 4.9.3 Reportergenplasmide

pGL2 pGL2- FL-hYY2p pGL2-ΔYY2p pGL2-ΔYY2p(224)

## 4.10 Verwendete Primer

**PCR-Primer** 

Name	5'-3'-Sequenz	Bandengröße	Annealingtemperatur	
β-Actin fw	GCTCGTCGTCGACAACGGCTC	353 bp	60°C	
β-Actin re	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	000 00		
yy2 fw	ATGGCCTCCAACGAAGATTTCTCC	589 bp	60°C	
yy2 re	CTTGGTCATTGTTATCGTTAGGGG			
mbtps2 fw	GGTGCTGAAGTCATCTGTCTAT	666 bp	60°C	
mbtps2 re	ACTGGGAGGAGAACAAGAGCTA	000 VP		
yy1 fw	GAAAACATCTGCACACCCACG	569 bp	60°C	
yy1 re	GTCCTCCTGTTGGGACCAC			

#### ChIP-Primer

Name	5'-3'-Sequenz	Bandengröße	Annealing- temperatur	
CHIP_HoxA5_fw		349 bp	60°C	
CHIP_HoxA5_rev	GCTGGTATTGGCTGTGTGTGAG	0.0.0		
HOXB6_Chip_fw	TGCCAAGTAGTGAACCCCGA	315 hn	60°C	
HOXB6_Chip_re	GGCAAATGTGAATCTGTGTT	010 00		
HOXC4_Chip_fw	AGCTGAGTAATAAAAGTTTACGATCG	326 bp	60°C	
HOXC4_Chip_re	AGATGCCCTCAACTTCTGTCTC	020 00		
HOXD13_Chip_fw	CAGCCTCCGGCTTTGCGTAC	296 bp	60°C	
HOXD13_Chip_re	CATGTACTTCTCCACGGGAAA			

## 4.11 Verwendete Antikörper

Anti-YY2 (sc-47637, Santa Cruz Biotechnology) Anti-acH3 (Catalog # 06-599; Upstate) Anti-FLAG (F3165 M2; SIGMA-Aldrich) Anti-Sp1 (sc-59; Santa Cruz Biotechnology) Anti-mouse (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology) Anti-rabbit (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology)

## 4.12 Verwendete Agarose

Flag-Agarose (sc-2002, Santa Cruz Biotechnology) Glutathion-Agarose (G4510, SIGMA)

#### 5. Zusammenfassung

Das Yin Yang 2 (YY2) Gen kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der bisher nur teilweise charakterisiert wurde. Das Protein erkennt das identische DNA-Bindungsmotiv 5'-(A/c/g)(A/t)NATG(G/a/t)(C/a)(G/c/t)-3' wie das zuerst beschriebene Gründungsmitglied der YY Transkriptionsfaktor-Familie, YY1, und kann im spezifischen zellulären Kontext entweder als Repressor oder als Aktivator agieren. Obwohl YY2 und YY1 an das gleiche Motiv binden, zeigen neueste Daten aus knockdown Analysen, dass beide Proteine unterschiedliche regulatorische Funktionen auf die jeweiligen Zielgene haben. Um die biologische Funktion des humanen YY2 untersuchen zu können, mussten wir dessen Regulation im genomischen Kontext analysieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die upstream Region des YY2 Gens eine signifikante Promotoraktivität aufweist. In vitro zeigte der CpG-reiche YY2 Promotor eine signifikante Repression durch DNA-Methylierung. Darüber hinaus geht die Behandlung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) mit 5-Aza-2-desoxycytidin (Aza) mit einer bis zu 3-fachen Steigerung der endogenen YY2 Expression einher. Desweiteren wurde das yy2 Expressionsmuster in verschiedenen Organen während der Embryogenese und postnatalen Entwicklung bis hin zur ausgewachsenen Maus näher untersucht. Während ein konstantes Expressionsniveau von yy2 im Herz- und Lungengewebe nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in verschiedenen Gehirnarealen eine dynamisch regulierte yy2 Expression. Zusätzlich wurde die yv2 Expression in primären murinen Zellen, Mikroglia, Neurone und Astrozyten untersucht. Das Expressionslevel in Mikroglia und Astrozyten war im Vergleich zu den Neuronen erhöht. Zum ersten Mal konnten somit entwicklungsabhängige Unterschiede in der Transkription des yv2 im murinen Gehirn gezeigt werden. Dies lässt einen Zusammenhang zwischen YY2 und der Regulation von entwicklungsabhängig regulierten Genen vermuten. Bezüglich der Funktion von YY2 als Transkriptionsfaktor wurde die Häufigkeit von YY2 DNA-Bindungen im humanen Genom mittels Chromatin Immunopräzipitation in Kombination mit einem Promotor Microarray (Chip-chip) untersucht. In HEK293 Zellen konnte eine Vielzahl YY2-Bindungen an Promotoren und intergenische Bereiche in vivo von nachgewiesen werden. Die Daten zeigten, dass nahezu alle HOX Gencluster durch YY2 gebunden werden. Nachdem deutlich wurde, dass YY2 eine Vielzahl von

Zusammenfassung

Promotoren *in vivo* bindet, wurden zusätzlich Proteininteraktionen näher untersucht. Mittels Co-Immunopräzipitation und *in vitro* Bindungsstudien konnte SP1 als direkter Interaktionspartner von YY2 identifiziert werden. Die Parallelen zwischen den beiden YY Proteinen lassen vermuten, dass YY2 eine relevante biologische Funktion hat. Um die Funktion des YY2 im gesamten murinen Organismus analysieren zu können, wurde ein Targetingvektor für die Ablation von YY2 in der Maus generiert. Die YY2 *knockout* Mutante wird den finalen Schritt zur Beschreibung der Relevanz von YY2 für entwicklungsabhängige Prozesse darstellen.

#### Summary

The Yin Yang 2 (YY2) gene encodes a zinc finger transcription factor that is only partially characterized yet. The protein recognizes the identical DNA-binding motif 5'-(A/c/g)(A/t)NATG(G/a/t)(C/a)(G/c/t)-3' like the founding member of the YY transcription factor family, YY1, and acts either as repressor or as activator depending on its specific cellular context. Although YY2 and YY1 bind to the same core motif, recent data from knockdown analyses indicate differential regulatory properties of both proteins on their target genes. To elucidate the biological function of human YY2, we studied its regulation within the genomic context. The upstream region of YY2 indeed mediates significant promoter activity. In vitro, transcriptional activity of the CpG-rich YY2 promoter is clearly repressed by DNA methylation. DNA demethylation experiments performed by treating human embryonic kidney (HEK293) cells with 5-Aza-2-deoxycytidine (Aza) revealed that endogenous YY2 expression is more than 3-fold enhanced. Furthermore, we analyzed in detail the expression pattern of  $yy^2$  in various organs during embryonic and postnatal mouse development till adulthood. Thereby, a constant yy2 level was detected in heart and lung tissue, whereas in different brain regions yy2 expression was dynamically regulated. In addition, we detected yy2 mRNA in primary mouse neurons, microglia cells, and astrocytes. Higher yy2 expression levels were detected in microglia cells and astrocytes than in primary neurons. For the first time, developmental changes of yy2 transcription became obvious in various areas of the brain. This suggests that yy2 is involved in developmental gene regulation. Regarding the function as transcription factor and in order to identify potential target genes of YY2, we studied the frequency of YY2 DNA-binding sites in the human genome using chromatin immunoprecipitation combined with a whole-genome human promoter microarray (ChIP-chip). In HEK293 cells, multiple annotations of YY2-bound promoters and intergenic regions were identified. Detailed data mining revealed that almost all *HOX* gene clusters exhibit YY2 binding. In a further approach, we analyzed potential binding partners of YY2. In co-immunoprecepitation and *in vitro* binding experiments we identified the SP1 transcription factor as a direct binding partner of YY2. These findings suggested a biological relevance of the YY2 and parallels between both YY proteins became obvious. Subsequently, we generated a conditional targeting vector for the ablation of YY2 in mice to analyze the function of YY2 in the entire murine organism. The YY2 knockout mouse will be the final step to prove the importance of YY2 for developmental processes.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1. Ganss B, Jheon A. Zinc finger transcription factors in skeletal development. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15:282-97.
- Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, Malaponte G, Militello L, Russo AE, McCubrey JA, Canevari S, Libra M. The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression. Cell Cycle 2009; 8:1367-72.
- 3. Seto E, Lewis B, Shenk T. Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. Nature 1993; 365:462-4.
- 4. luchi S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. Cell Mol Life Sci 2001; 58:625-35.
- 5. Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2000; 29:183-212.
- 6. Brayer KJ, Segal DJ. Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. Cell Biochem Biophys 2008; 50:111-31.
- Rizkallah R, Hurt MM. Regulation of the transcription factor YY1 in mitosis through phosphorylation of its DNA-binding domain. Mol Biol Cell 2009; 20:4766-76.
- 8. Kim JD, Faulk C, Kim J. Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1. Nucleic Acids Res 2007; 35:3442-52.
- 9. Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. Cell 1991; 67:377-88.
- 10. Hahn S. The Yin and the Yang of mammalian transcription. Curr Biol 1992; 2:152-4.
- 11. Donohoe ME, Zhang X, McGinnis L, Biggers J, Li E, Shi Y. Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. Mol Cell Biol 1999; 19:7237-44.
- Abbondanza C, de Nigris F, De Rosa C, Rossiello R, Puca GA, Napoli C. Silencing of YY1 downregulates RIZ1 promoter in human osteosarcoma. Oncol Res 2008; 17:33-41.

- Chinnappan D, Xiao D, Ratnasari A, Andry C, King TC, Weber HC. Transcription factor YY1 expression in human gastrointestinal cancer cells. Int J Oncol 2009; 34:1417-23.
- 14. Lieberthal JG, Kaminsky M, Parkhurst CN, Tanese N. The role of YY1 in reduced HP1alpha gene expression in invasive human breast cancer cells. Breast Cancer Res 2009; 11:R42.
- Ren G, Zhang G, Dong Z, Liu Z, Li L, Feng Y, Su D, Zhang Y, Huang B, Lu J. Recruitment of HDAC4 by transcription factor YY1 represses HOXB13 to affect cell growth in AR-negative prostate cancers. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41:1094-101.
- 16. Kim JD, Kim H, Ekram MB, Yu S, Faulk C, Kim J. Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. Hum Mol Genet; 20:1353-62.
- Nguyen N, Zhang X, Olashaw N, Seto E. Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. J Biol Chem 2004; 279:25927-34.
- 18. Luo C, Lu X, Stubbs L, Kim J. Rapid evolution of a recently retroposed transcription factor YY2 in mammalian genomes. Genomics 2006; 87:348-55.
- Yant SR, Zhu W, Millinoff D, Slightom JL, Goodman M, Gumucio DL. High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT) and distribution of potential binding sites within the human beta globin cluster. Nucleic Acids Res 1995; 23:4353-62.
- 20. Klar M, Bode J. Enhanceosome formation over the beta interferon promoter underlies a remote-control mechanism mediated by YY1 and YY2. Mol Cell Biol 2005; 25:10159-70.
- 21. Chen L, Shioda T, Coser KR, Lynch MC, Yang C, Schmidt EV. Genome-wide analysis of YY2 versus YY1 target genes. Nucleic Acids Res; 38:4011-26.
- 22. Kim SY, Paylor SW, Magnuson T, Schumacher A. Juxtaposed Polycomb complexes co-regulate vertebral identity. Development 2006; 133:4957-68.
- 23. Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. Ann Anat 2012; 192:275-83.
- 24. Chaumeil J, Skok JA. The role of CTCF in regulating V(D)J recombination. Curr Opin Immunol 2012; 24:153-9.
- 25. Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. Cell 2009; 137:1194-211.
- 26. Gogvadze E, Buzdin A. Retroelements and their impact on genome evolution and functioning. Cell Mol Life Sci 2009; 66:3727-42.

- 27. Emerson JJ, Kaessmann H, Betran E, Long M. Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome. Science 2004; 303:537-40.
- Locascio A, Vega S, de Frutos CA, Manzanares M, Nieto MA. Biological potential of a functional human SNAIL retrogene. J Biol Chem 2002; 277:38803-9.
- 29. Rohozinski J, Bishop CE. The mouse juvenile spermatogonial depletion (jsd) phenotype is due to a mutation in the X-derived retrogene, mUtp14b. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:11695-700.
- 30. Wiemann S, Kolb-Kokocinski A, Poustka A. Alternative pre-mRNA processing regulates cell-type specific expression of the IL4I1 and NUP62 genes. BMC Biol 2005; 3:16.
- 31. Morey C, Avner P. Genetics and epigenetics of the X chromosome. Ann N Y Acad Sci; 1214:E18-33.
- 32. Kiefer JC. Epigenetics in development. Dev Dyn 2007; 236:1144-56.
- 33. Stemmler MP, Hecht A, Kemler R. E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. Development 2005; 132:965-76.
- 34. Wingender E, Dietze P, Karas H, Knuppel R. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. Nucleic Acids Res 1996; 24:238-41.
- 35. Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. Annu Rev Cell Dev Biol 2007; 23:645-73.
- 36. Orkin SH. Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. Int J Dev Biol 1998; 42:927-34.
- 37. Morgan MJ, Woltering JM, In der Rieden PM, Durston AJ, Thiery JP. YY1 regulates the neural crest-associated slug gene in Xenopus laevis. J Biol Chem 2004; 279:46826-34.
- 38. He Y, Casaccia-Bonnefil P. The Yin and Yang of YY1 in the nervous system. J Neurochem 2008; 106:1493-502.
- 39. Drews D, Klar M, Dame C, Brauer AU. Developmental expression profile of the YY2 gene in mice. BMC Dev Biol 2009; 9:45.
- 40. Foronda D, de Navas LF, Garaulet DL, Sanchez-Herrero E. Function and specificity of Hox genes. Int J Dev Biol 2009; 53:1404-19.
- 41. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. Nat Rev Cancer 2010; 10:361-71.

- 42. Deschamps J, van den Akker E, Forlani S, De Graaff W, Oosterveen T, Roelen B, Roelfsema J. Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse. Int J Dev Biol 1999; 43:635-50.
- 43. Wilkinson FH, Park K, Atchison ML. Polycomb recruitment to DNA in vivo by the YY1 REPO domain. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:19296-301.
- 44. Garcia-Tunon I, Guallar D, Alonso-Martin S, Benito AA, Benitez-Lazaro A, Perez-Palacios R, Muniesa P, Climent M, Sanchez M, Vidal M, Schoorlemmer J. Association of Rex-1 to target genes supports its interaction with Polycomb function. Stem Cell Res 2011; 7:1-16.
- 45. Xi H, Yu Y, Fu Y, Foley J, Halees A, Weng Z. Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. Genome Res 2007; 17:798-806.
- 46. Klar M. It is not necessarily YY1--the frequently forgotten Yin-Yang-2 transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:E190.
- 47. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci 2005; 62:670-84.
- 48. Galvin KM, Shi Y. Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1. Mol Cell Biol 1997; 17:3723-32.
- 49. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. Science 2006; 312:1389-92.
- 50. Casper KB, Jones K, McCarthy KD. Characterization of astrocyte-specific conditional knockouts. Genesis 2007; 45:292-9.
- 51. Kwon CH, Zhou J, Li Y, Kim KW, Hensley LL, Baker SJ, Parada LF. Neuronspecific enolase-cre mouse line with cre activity in specific neuronal populations. Genesis 2006; 44:130-5.
- 52. Klar M, Drews D, Dame C. Transcriptional activity of the novel identified human yy2 promoter is modified by DNA methylation. Gene 2009; 430:58-63.
- 53. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem 1981; 114:193-7.
- 54. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res 2002; 30:207-10.
- 55. Diedrich M, Kitada T, Nebrich G, Koppelstaetter A, Shen J, Zabel C, Klose J, Mao L. Brain region specific mitophagy capacity could contribute to selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Proteome Sci 2011; 9:59.

## 7. Publikationen

Klar M, **Drews D**, Dame C. Transcriptional activity of the novel identified human yy2 promoter is modified by DNA methylation. Gene 2009; 430:58-63.

DOI-Link:

http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2008.10.013

**Drews D**, Klar M, Dame C, Brauer AU. Developmental expression profile of the YY2 gene in mice. BMC Dev Biol 2009; 9:45.

DOI-Link:

http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-9-45

#### Konferenzbeitrag Posterpräsentation

**Drews, D.**, Klar, M., von Salisch, S., Dame, C., Bräuer, A.U., Genome-wide detection of Yin Yang 2-bound target genes in human embryonic kidney cells. 9. Japanese Biochemical Society (JBS) Bio-Frontier Symposium, zugleich 5. Internationales Symposium über Gata-Transkriptionsfaktoren, Sendai, Japan

## 8. Eigenständigkeitserklärung

Sämtliche experimentellen Arbeiten wurden von mir eigenhändig etabliert, durchgeführt und ausgewertet. Lediglich die Aufarbeitung der Proben für die longitudinalen Reihen von den verschiedenen Mausgeweben wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Anja Bräuer durchgeführt und mir zur Analyse mittels *realtime* PCR zur Verfügung gestellt.

## 10. Anhang

Auf den Folgenden Seiten befinden sich die zur dieser Arbeit zugehörigen Publikationen.